

УДК 577.158

БИОХИМИЯ

Р. В. ВАНКОВА, В. Р. ШАТИЛОВ, В. Г. АМБАРЦУМЯН,
член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ

ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА ИНДУКЦИЮ АММОНИЕМ НАДФ-ГЛЮТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ХЛОРЕЛЛЫ

Имеется много литературных данных о влиянии света на ряд биохимических процессов и на синтез некоторых ферментов у растений (¹⁻⁵). Так, например, свет активирует синтез белка и образование РНК в этиолированных листьях бобов (³); вызывает индукцию не только фотосинтетических ферментов таких, как рибулезодифосфаткарбоксилаза и НАДФ-глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (³), но и регулирует уровень многих других ферментов: нитратредуктазы (⁵), гликолатоксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, НАД-глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (³), фенилаланин-аммиаклиазы (⁶), глиоксалатаминотрансферазы (⁷) и др. Недавно было показано, что свет индуцирует в хлоропластах гороха синтез глютаматдегидрогеназы, функционирующей как с НАД, так и с НАДФ (НАД(Ф)-ГДГ) (⁸). Аналогичный фермент содержится в клетках хлореллы (*Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82T), где он является конститутивным (⁹). Под влиянием NH_4^+ у хлореллы синтезируется de novo ГДГ, специфичная только к НАДФ (НАДФ-ГДГ) (¹⁰). Имея в виду вышеперечисленные данные, целью настоящей работы было исследование влияния света на индукцию НАДФ-ГДГ хлореллы.

Объектом исследования являлись клетки термофильного штамма *Ch. pyrenoidosa* Pringsheim 82T. Культуру выращивали в стерильных условиях на среде Таммийя (источником азота служил KNO_3) при непрерывном освещении (8000 лк) люминесцентными лампами ЛД-40, продувании смесью воздуха и 1,5% CO_2 и температуре 31–32°. Хлореллу, выращенную в таких условиях, принимали за исходную культуру. Опыты проводили с клетками исходной культуры, а также с клетками, дефицитными по углероду (после выдерживания исходной культуры в течение 15 час. в темноте при непрерывном продувании смесью воздуха и 1,5% CO_2). Клетки полученных указанными способами культур отмывали от среды и суспендировали в равных количествах и в равных объемах свежей среды Таммийя, но содержащей в качестве источника азота $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из расчета 138 мг N на 1 л. Инкубацию проводили в течение 5 час. в условиях, указанных в таблицах. Контрольным вариантом служили клетки, инкубированные на среде с KNO_3 в тех же условиях; в таких клетках всегда присутствовала только конститутивная НАД(Ф)-ГДГ, и ни в одном случае не проявлялась индукция НАДФ-ГДГ.

Получение бесклеточных экстрактов и определение активности ГДГ проводили по ранее описанной методике (¹¹). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее окисление 1 $\mu\text{моля}$ НАД(Ф)-Н за 1 мин., а активность рассчитывали как число единиц на 1 мл экстракта. Белок определяли по методу Лоури и др. (¹²) после dialиза бесклеточных экстрактов против 0,005 M фосфатного буфера pH 7,4. Электрофорез проводили по методу Дэвиса (¹²), а проявление ГДГ — по методу Термена и др. (¹⁴). Содержание аммиака в питательной среде определяли микродиффузионным методом в модификации Любимова и др. (¹⁵).

Из данных спектрофотометрического определения активностей, представленных в табл. 1, видно, что в дефицитных по углероду клетках хлореллы активность ГДГ по отношению к НАДФ-Н под влиянием NH_4^+ заметно увеличивается на свету. Исходя из этого можно было полагать, что индукция НАДФ-ГДГ происходит только на свету. Однако при рассмотрении зимограмм ГДГ (рис. 1а) можно видеть, что индукция НАДФ-ГДГ

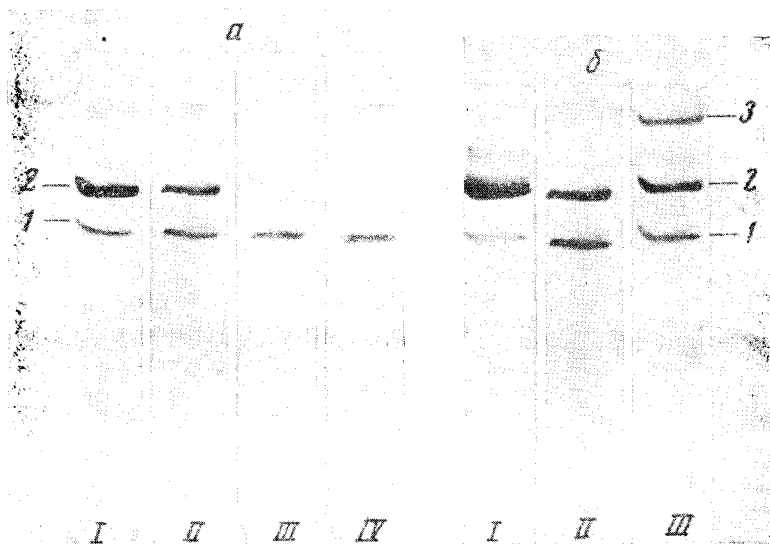


Рис. 1 Зимограммы ГДГ, проявленные с НАДФ⁺ из клеток, инкубированных в условиях, указанных в табл. 1 (а) и в табл. 3 (б). 1 — конститутивная НАД(Ф)-ГДГ, 2 — индуцируемая в присутствии NH_4^+ НАДФ-ГДГ, 3 — индуцируемая в присутствии глюкозы и NH_4^+ НАДФ-ГДГ

имеет место и в темноте, но слабее, чем на свету. Интересно отметить, что во всех случаях, независимо от исходного состояния культуры, индукция НАДФ-ГДГ на свету была выше всегда на одну и ту же величину, 60%.

Активирующее влияние света на индукцию НАДФ-ГДГ может быть связано с повышением внутриклеточного уровня аммиака в силу различ-

Таблица 1

Индукция НАДФ-ГДГ в клетках, предварительно выдержанных в темноте в течение 15 час.

Вариант	Условия инкубации *	Белок, мг/мл	Активность		Колич. μ мол. NH_4 , поглощ. из 1 л среды за 5 час.
			с НАДФ-Н	с НАД-Н	
I	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на свету	8,1	0,89	2,12	1320
II	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в темноте	6,7	0,55	1,87	960
III	KNO_3 на свету	11,4	0,65	1,94	—
IV	KNO_3 в темноте	6,6	0,53	1,92	—

* В процессе инкубации продувание проводилось смесью воздуха и 1,5% CO_2 .

ного поглощения NH_4^+ на свету и в темноте, а также со специфичной зависимостью процесса индукции от фотосинтеза. Как видно из табл. 1 и 2, поглощение NH_4^+ из внешней среды зависит очень сильно от условий, при которых происходила инкубация. Однако эти данные не дают возможности судить о внутриклеточном уровне аммиака, так как неизвестна скорость его метаболизма в клетках при этих условиях. Определить же достоверно в тот или иной момент внутриклеточную концентрацию аммиака в клетках, находящихся в среде с NH_4^+ , оказалось практически невозможным.

С целью выяснения возможной зависимости индукции от фотосинтеза были проведены опыты с исходной культурой в условиях, ингибирующих фотосинтез. Ингибирование достигалось добавлением дихлорфенилдиметилмочевины (ДХММ) в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ мол/л или полным исключением CO_2 из продаваемой смеси. Данные табл. 2 показывают, что активирующее влияние света на индукцию НАДФ-ГДГ в клетках хлореллы не связано с фотосинтезом, поскольку активность фермента одинакова в

Таблица 2

Индукция НАДФ-ГДГ в клетках исходной культуры в условиях ингибирующего фотосинтеза

Вариант	Условия инкубации на свету	Белок, мг/мл	Активность		Колич. μ мол. NH_4^+ поглощ. из 1 л среды за 5 час.
			с НАДФ-Н	с НАД-Н	
I	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	13,8	1,09	4,38	7350
II	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 +$ + ДХММ	12,1	0,93	4,02	4700
III	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ без CO_2	12,0	0,92	4,00	1180
IV	KNO_3	11,3	0,67	4,25	—

Примечание. I, II, IV — продувание смесью воздуха и 1,5% CO_2 , III — воздухом, освобожденным от CO_2 .

Таблица 3

Индукция НАДФ-ГДГ в присутствии глюкозы в клетках, предварительно выдержанных в темноте 15 час.

Вариант	Условия инкубации	Белок, мг/мл	Активность	
			с НАДФ-Н	с НАД-Н
I	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на свету	7,9	0,96	1,64
II	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в темноте	6,7	0,51	1,59
III	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 +$ +1% глюкозы в темноте	6,4	0,50	1,57

Примечание. Во всех вариантах продувание смесью воздуха и 1,5% CO_2 .

клетках, инкубировавшихся как в условиях фотосинтеза, так и при его ингибировании.

Для выяснения зависимости индукции НАДФ-ГДГ от энергетических ресурсов клеток, сравнивали степень индукции в автофототрофных и гетеротрофных условиях (в присутствии 1% глюкозы). Результаты представлены в табл. 3 и на рис. 16. Видно, что глюкоза «не заменяет» активирующего влияния света на индукцию НАДФ-ГДГ хлореллы. Наоборот, в присутствии глюкозы наблюдается подавление синтеза НАДФ-ГДГ, т. е. этот фермент подвергается катаболитной репрессии. В то же время при ассимиляции глюкозы в клетках появляется другой изофермент (рис. 16), также специфичный к НАДФ, но обладающий более слабой электрофоретичной подвижностью ⁽¹⁰⁾.

Таким образом, очевидно, что индукция под влиянием ионов аммония НАДФ-ГДГ активируется светом. Однако механизм влияния света пока остается неясным.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Л. Кретович, Обмен азота в растениях, «Наука», 1972.
- ² Т. Ф. Андреева, Фотосинтез и азотный обмен листьев, «Наука», 1969.
- ³ B. Filner, A. Klein, *Plant Physiol.*, **43**, 1587 (1968).
- ⁴ Г. К. Кондорская, Э. С. Каган, В. Л. Кретович, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, **6**, 821 (1964).
- ⁵ L. Beevers, R. H. Hageman, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**, 495 (1969).
- ⁶ M. Zucker, *Plant Physiol.*, **40**, 779 (1965).
- ⁷ J. King, E. R. Waywood, *J. Biochem.*, **46**, 771 (1968).
- ⁸ В. Л. Кретович, Т. И. Карякина и др., *ДАН*, **201**, 1252 (1971).
- ⁹ В. Р. Шатилов, Э. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, *Биохимия*, **34**, 409 (1969).
- ¹⁰ В. Р. Шатилов, Г. С. Калошина, В. Л. Кретович, *ДАН*, **194**, 964 (1970).
- ¹¹ В. Р. Шатилов, Р. В. Ванкова и др., *ДАН*, **207**, № 2 (1972).
- ¹² O. H. Lowry, N. T. Rosenbrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- ¹³ B. J. Davies, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, Part 2, 404 (1964).
- ¹⁴ D. A. Thurman, C. Palin, M. V. Lausock, *Nature*, **207**, 193 (1965).
- ¹⁵ В. И. Любимов, Н. П. Львов, Б. Э. Кирштейнэ, *Прикл. биохим. и микробиол.*, **4**, 120 (1968).