

Академик АН УССР Р. Е. КАВЕЦКИЙ, С. Д. КАЗЬМИН

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЕКСОЗОМОНОФOSFATНОГО ШУНТА НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА КЛЕТОК РАКА ЭРЛИХА

Окисление гексоз через гексозомонофосфатный шунт (ГМФШ) обеспечивает клеткам синтез фосфорилированных сахаров с различной длиной углеродной цепи и снабжение разнообразных восстановительных синтезов необходимым для этого коферментом НАДФ-Н₂. Удельный вес ГМФШ в метаболическом балансе глюкозы обычно невелик, но роль его и значение для разнообразных реакций пластического обмена чрезвычайно высоки. Известно, что первый энзим ГМФШ — дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата (ДГ Г6Ф, КФ.1.1.1.49) имеет аллостерический центр и может менять свою активность под влиянием длинноцепочечных ацилпроизводных КоА⁽¹⁾, неорганического фосфата, АТФ⁽²⁾, фруктозодифосфата⁽³⁾ и гормонов^(4, 5). Кроме того, скорость окисления регламентируется, по-видимому, еще и соотношением НАДФ/НАДФ-Н₂ в цитоплазме. Поскольку уровень синтеза пентоз по «безокислительному» пути в клетках рака Эрлиха сравнительно невелик⁽⁵⁾, то все эти данные позволяют предполагать, что именно ДГ Г6Ф обеспечивает авторегуляцию процесса в целом, определяет скорость поступления глюкозо-6-фосфата в систему шунта и регламентирует уровень концентраций интермедиантов.

В настоящем сообщении приводятся данные об изменении активности некоторых ферментов ГМФШ на протяжении митотического цикла клеток рака Эрлиха и данные о скорости окисления НАДФ-Н₂ системой глутатионредуктазы. Разделение клеток экспоненциально растущей опухоли по фазам цикла и маркирование получаемых фракций проводили методом, описанным в предыдущих публикациях^(6, 7). Активность ферментов измеряли в гомогенатах при 25° и рН 7,5. Активность дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата (ДГ Г6Ф) и 6-фосфоглюконата (ДГ 6ФГ, ДГ 1.1.1.44) определяли по Глок и Мак Лин⁽⁸⁾. Активность транскетолазы (ТК, КФ 2.2.1.1) определяли по скорости образования 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА) в среде, содержащей трис-НСI 50 ммол., КСI 100 ммол. и рибозо-5-фосфат 2 ммоль⁽⁹⁾. О скорости образования 3-ФГА судили по изменению оптической плотности среды при 340 нм в присутствии 0,25 мМ НАДФ-Н₂ и 0,4 единиц активности α-глицерофосфатдегидрогеназы из мышц кролика. Определение активности глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) проводили спектрофотометрическим методом^(10, 11) по прописи, изложенной в⁽¹²⁾. Скорость энзиматических реакций выражали в пикомолях прореагировавшего за 1 час субстрата в пересчете на клетку.

На рис. 1 приведены данные об активности ДГ Г6Ф, ДГ 6ФГ и ТК, выраженные в абсолютных единицах (рис. 1а) и в процентах (рис. 1б). Наибольшей активностью обладает ДГ Г6Ф, наименьшей — ДГ 6ФГ. Все три энзима активируются в начале цикла, затем их активность столь же резко снижается, некоторое время поддерживается неизменной, после чего снова возрастает, достигая в конце цикла примерно двойной, по сравнению с начальными стадиями, уровня. Отчетливо видно, что активация ферментов шунта в начале цикла происходит почти синхронно, тогда как второй подъем активности, приходящийся на конец фазы синтеза ДНК, в раз-

ное для каждого фермента время. Первой активируется ДГ Г6Ф, несколько позже ДГ 6ФГ и лишь затем возрастает активность ТК, т. е. наблюдается последовательность, совпадающая с расположением энзимов в самом ГМФШ. Строго следуя классификации Митчисона (¹³), невозможно отнести ферменты ГМФШ к одной из 4 предложенных им групп. В начале цикла эти энзимы ведут себя как типичные нестойкие пикообразные ферменты, тогда как на поздней стадии цикла активация их происходит по механизму ступенчатого синтеза. Это кажущееся противоречие вполне

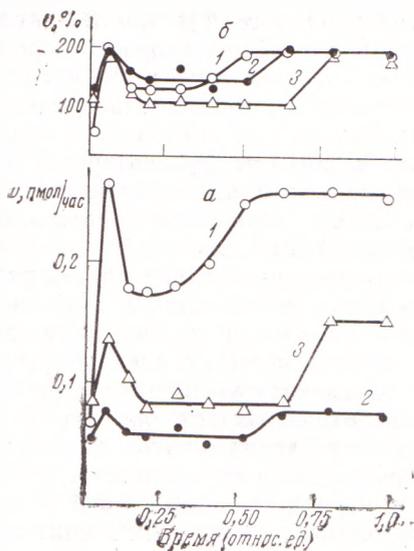


Рис. 1

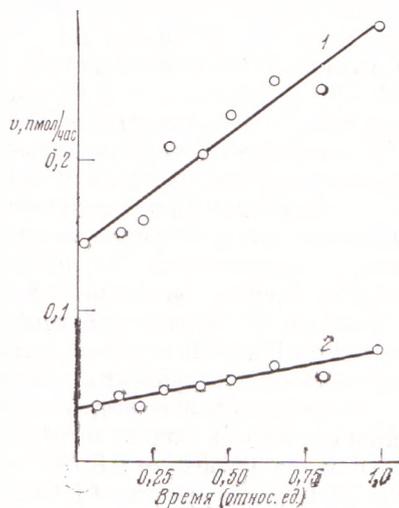


Рис. 2

Рис. 1. Изменение активности ДГ Г6Ф (1), ДГ 6ФГ (2) и ТК (3) на различных этапах митотического цикла клеток рака Эрлиха в абсолютных (а) и относительных (б) единицах. За 200% принят уровень активности в конце цикла

Рис. 2. Изменение активности НАДФ-Н₂-зависимой ГР (1) и НАДФ-зависимой ГР (2) на различных этапах митотического цикла клеток рака Эрлиха

может быть разрешено в рамках теории генного контроля синтеза ферментов (¹⁴). В соответствии с существующими представлениями транскрипция отдельных групп генов происходит лишь в определенный период митотического цикла, и в последовательности, совпадающей с последовательностью расположения генов в хромосоме. Следовательно, активация ферментов ГМФШ в начале и в конце цикла должна быть обусловлена транскрипцией различных участков генома, поскольку в начале цикла ферменты активируются практически синхронно, тогда как в конце цикла отмечается строгая последовательность. Поэтому мы склонны думать, что в результате транскрипции различных участков генома на протяжении митотического цикла меняются интимные характеристики ферментов ГМФШ, но регистрируемые при определении тотальной активности в гомогенате, т. е. их изотимный спектр. Синтез изоферментов, закодированных на первом участке генома, последовательно активируется и репрессируется в начале цикла, в результате чего активность энзимов ГМФШ претерпевает подъем и спад, оставаясь затем пониженной вплоть до начала транскрипции второго участка хромосомы и синтеза новых изоферментов.

Как указывалось выше, скорость окисления гексозомонофосфатов может регламентироваться соотношением НАДФ/НАДФ-Н₂ в цитоплазме и в этой связи зависеть от систем окисления НАДФ-Н₂. Наряду с циклом жирных кислот и системой перекисного окисления, глутатионредуктаза является одной из главных реакций, поддерживающих необходимый клеткам

уровень окисленного кофермента. На рис. 2 приведены данные об активности НАДФ-Н₂ и НАД-Н₂-зависимых ГР. Активность НАДФ-Н₂-ГР измерима по величине с активностью ДГ 6ФФ и примерно в 3 раза превосходит активность ДГ 6ФГ. Следовательно, потенциальная возможность ГР-системы достаточна, чтобы удовлетворить потребности ГМФШ в коферменте, тем более, что активность этого энзима линейно возрастает на протяжении митотического цикла, удваиваясь к митозу. Основываясь на приведенных данных, можно заключить, что отношение НАДФ/НАДФ-Н₂ вряд ли сильно уменьшится на протяжении митотического цикла, и, следовательно, мощность ГМФШ в целом должна меняться симбатно активности его энзиматических звеньев. Очевидно, что общая скорость переработки гексозомонофосфатов по этому метаболическому пути не может превышать скорости самой медленной реакции цепи, в данном случае скорости на ДГ 6ФГ. Сопоставление скорости гликолиза (6) с активностью этого энзима показывает, что утилизация гексоз в ГМФШ не должна превышать 2—5% от общего количества потребляемой глюкозы, и лишь на ранних этапах цикла этот показатель может быть несколько выше. Необходимо отметить, что наибольшей активности ферменты ГМФШ достигают в те периоды митотического цикла, когда активируется энергообмен клеток рака Эрлиха. Это совпадение, по-видимому, не является случайным, поскольку активация каких-либо сторон пластического обмена, целям которого служит ГМФШ, не мыслима без обеспечения его энергетических запросов. Стимуляция ГМФШ, по нашему мнению, не связана с увеличением потребностей в фосфорилированных пентозах, необходимых для синтеза ДНК. Простой расчет показывает, что скорость потребления пентоз для нужд репликации генома приблизительно на порядок ниже скорости самого медленного звена ГМФШ — ДГ 6ФГ — даже в период его наименьшей активности. К тому же уровень ГМФШ не коррелирует во времени с синтезом ДНК (6).

В начальный период цикла резко возрастает содержание белка в клетках опухоли (6). Поскольку ГМФШ имеет отношение к синтезу РНК, а через шикимовую кислоту связан с синтезом циклических аминокислот, то представляется вполне вероятным, что первая активация ГМФШ обусловлена интенсивным белковым синтезом. Второй же подъем активности, вероятнее всего, связан с синтезом различных сахаридов клеточных мембран и непосредственной подготовкой клеток к митозу.

Институт проблем онкологии
Академии наук УССР
Киев

Поступило
18 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Eger-Neufeld et al., Biochem. Res. Commun., v. 19, 43 (1965). ² G. Avigad, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 56, 1543 (1966). ³ Л. С. Мильман, Ю. Г. Юровицкий, ДАН, т. 179, № 2, 472 (1968). ⁴ H. I. Sie, A. Hablanian, Biochem. J., v. 97, 32 (1965). ⁵ С. Д. Казьмин, Е. А. Баглей, Биохимия, т. 36, 816 (1971). ⁶ Р. Е. Кавецкий, С. Д. Казьмин, ДАН, т. 212, № 5, 1217 (1973). ⁷ Р. Е. Кавецкий, С. Д. Казьмин, ДАН, в печати, (1974). ⁸ G. E. Glock, P. MacLean, Biochem. J., v. 55, 400 (1953). ⁹ Ю. М. Островский, Д. В. Требухина, Вопросы мед. хим., № 2, 149 (1962). ¹⁰ H. Horn, F. Bruns, Biochem. Zs., B. 64, 315 (1958). ¹¹ H. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Weinheim, 1962, p. 877. ¹² В. С. Асатуни, Ферментативные методы анализа, «Наука», 1969, стр. 607. ¹³ I. M. Mitchison, Science, v. 165, 657 (1969). ¹⁴ P. Tauro, H. O. Halvorson, R. L. Epstein, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 59, 277 (1968).