

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

**ИНДУКЦИЯ НОВОГО ИЗОФЕРМЕНТА  
ГЛЮТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
В КЛЕТКАХ ХЛОРЕЛЛЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЛЮКОЗЫ**

Ранее нами было показано, что в клетках хлореллы (*Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82Т) содержатся две глутаматдегидрогеназы (ГДГ): конститутивная, функционирующая как с НАД, так и с НАДФ (К.Ф. 1.4.1.3), и индуцируемая  $\text{NH}_4^+$  ГДГ, специфичная к НАДФ (К.Ф. 1.4.1.4) <sup>(1-3)</sup>. У ряда микроорганизмов содержатся также две ГДГ <sup>(4)</sup>. Однако в отличие от хлореллы обе ГДГ у этих микроорганизмов строго специфичны к кофактору: одна к НАД, а другая к НАДФ. Синтез ГДГ у этих микроорганизмов регулируется источником азота в питательной среде. В последнее время для пекарских дрожжей <sup>(5)</sup> и *Neurospora crassa* <sup>(6)</sup> показано, что синтез ГДГ контролируется не только источником азота, но и зависит от источника углерода. Стрикленд <sup>(7)</sup> высказывает гипотезу, что у *N. crassa* регуляция синтеза ГДГ контролируется балансом между фондом свободных аминокислот и сахарозой или ее метаболитами. Целью настоящей работы было выяснить влияние условий углеродного питания на ГДГ хлореллы.

Объектом исследования являлись клетки термофильного штамма *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82Т. Культуру выращивали в стерильных условиях на среде Тамийя (источником азота служил  $\text{KNO}_3$ ) при непрерывном освещении люминесцентными лампами ЛД-40 (8000 лк), продувании смесью воздуха и 1,5%  $\text{CO}_2$  и температуре 31—32°. Хлореллу, выращенную в таких условиях, принимали за исходную культуру. Опыты проводили с исходной культурой; после выдерживания ее в течение 15 час. в темноте при непрерывном продувании смесью воздуха и 1,5%  $\text{CO}_2$  и после азотного голодания также в течение 15 час. Выдерживание в темноте и голодание по азоту проводили с целью сдвига баланса между углеродными и азотными соединениями в клетках.

Клетки полученных указанными способами культур отмывали от среды и суспендировали равные количества в равных объемах свежей среды Тамийя, содержащей в качестве источника азота  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  или  $\text{KNO}_3$ , из расчета 138 мг N на 1 л. Инкубацию проводили в течение 5 час. в условиях, которые указаны в табл. 1—3. Активные бесклеточные экстракты получали по методике, описанной ранее <sup>(8)</sup> с той лишь разницей, что отстаивание проводили быстро при температуре 30°. Активность ГДГ определяли на спектрофотометрах SP-700 или Hitachi-356 по окислению НАД(Ф)-Н при 340 мμ в реакционной среде, содержащей в объеме 3 мл: 0,05 М трис-НСI буфер рН 8,7 или 8,2;  $0,94 \cdot 10^{-4}$  М НАД-Н или  $1,2 \cdot 10^{-4}$  М НАДФ-Н;  $8 \cdot 10^{-3}$  М α-кетоглутарат;  $8 \cdot 10^{-2}$  М  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  и 0,05—0,1 мл экстракта. Реакцию начинали добавлением  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  и сравнение проводилось с аналогичной смесью, но без  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее окисление 1 μмоля НАД(Ф)-Н за 1 мин., а активность рассчитывали как число единиц на 1 мл экстракта. Белок определяли по методу Лоури и других <sup>(9)</sup> после диализа бесклеточных экстрактов против 0,005 М фосфатного буфера рН

Таблица 1

Влияние глюкозы на ГДГ в клетках исходной культуры

Вариант	Добавки к безазотистой среде Тамия	Белок, мг/мл	Активность	
			с НАДФ-Н	с НАД-Н
I	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	13,8	1,09	4,38
II	KNO <sub>3</sub>	11,3	0,67	4,25
III	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + + 1% глюкозы	12,9	0,77	3,92
IV	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12,0	0,92	4,00

Примечание. Инкубация в течение 5 час. на свету. I и II — продувание смесью воздуха и 1,5% CO<sub>2</sub>; III и IV — продувание воздухом, не содержащим CO<sub>2</sub>.

Таблица 2

Индукция НАДФ-ГДГ-2 в клетках хлореллы, выдержанных предварительно в темноте

Вариант	Добавки к безазотистой среде Тамия	Белок, мг/мл	Активность	
			с НАДФ-Н	с НАД-Н
I	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (на свету)	8,2	0,89	2,12
II	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 1,5% глюкозы (в темноте)	6,5	0,55	1,92
III	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (в темноте)	6,7	0,55	1,87

Примечание. Продувание во время инкубации смесью воздуха и 1,5% CO<sub>2</sub>. Инкубация в течение 5 час.

Таблица 3

Влияние глюкозы на синтез ГДГ в голодавших по азоту клетках хлореллы

Вариант	Добавки к безазотистой среде Тамия	Белок, мг/мл	Активность		(1)/(2)
			с НАДФ-Н (1)	с НАД-Н (2)	
I	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11,0	0,32	1,2	3,8
II	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + + 1% глюкозы	9,1	0,43	1,68	3,9
III	KNO <sub>3</sub>	9,0	0,40	2,02	5,0
IV	KNO <sub>3</sub> + 1% глюкозы	9,4	0,57	2,90	5,0

Примечание. Продувание во время инкубации смесью воздуха и 1,5% CO<sub>2</sub>. Инкубация в течение 5 час. на свету.

7.4. Электрофорез проводили по методу Дэвиса и Орнштейна (<sup>10</sup>, <sup>11</sup>), а проявление ГДГ — по методу Термена и других (<sup>12</sup>).

Данные табл. 1 показывают, что за время инкубации в среде с (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> независимо от других условий активность ГДГ по отношению к НАД-Н практически не изменилась. Это свидетельствовало о постоянном уровне конститутивной НАД(Ф)-ГДГ. В то же время активность ГДГ по отношению к НАДФ-Н увеличилась под влиянием NH<sub>4</sub><sup>+</sup> за счет индукции НАДФ-ГДГ (<sup>3</sup>). Увеличение было одинаковым как в условиях фотосинтеза, так и в отсутствие CO<sub>2</sub>. Самое низкое увеличение наблюдалось в присутствии глюкозы. Можно предполагать, что глюкоза или ее метаболиты подавляют индукцию НАДФ-ГДГ. Зимограммы, представленные на рис. 1А, подтверждают данные табл. 1. В дополнение к этому,

можно видеть, что в присутствии глюкозы появляется новый изофермент НАДФ-ГДГ-2. Следует отметить, что контроли, показанные на рис. 1А, были всегда одинаковыми для всех вариантов и в дальнейшем приводиться не будут.

Таким образом, в присутствии глюкозы, с одной стороны, подавляется индукция НАДФ-ГДГ-1 под влиянием  $\text{NH}_4^+$ , а с другой стороны, индуци-

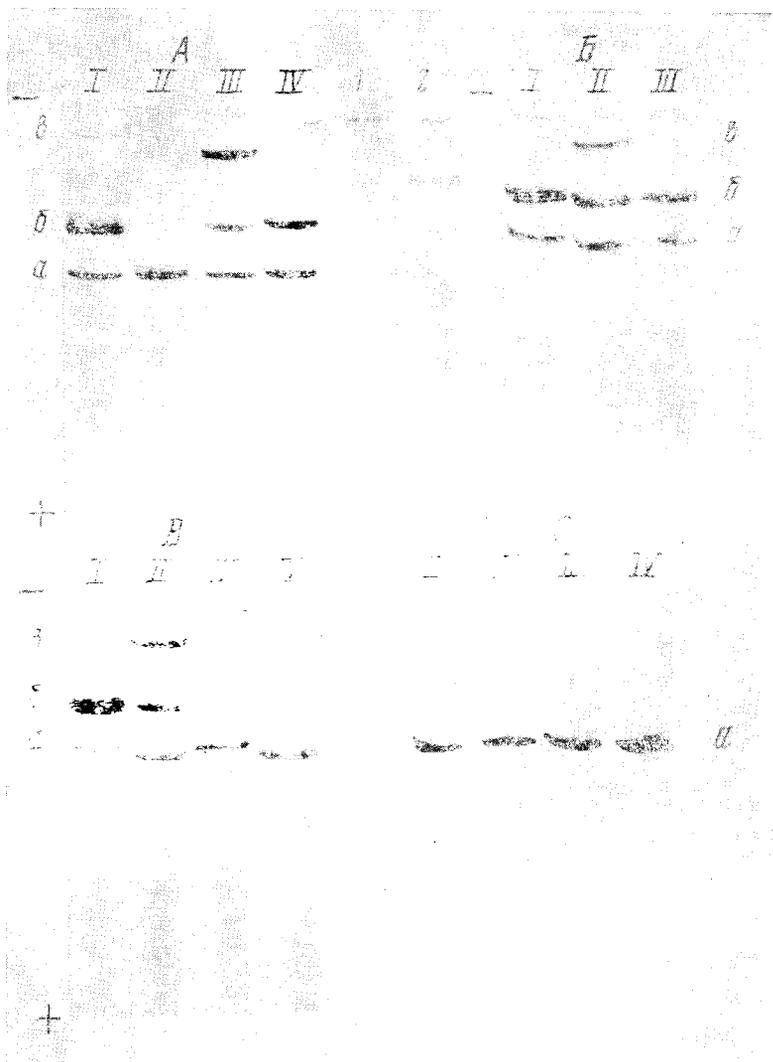


Рис. 1. Зимограммы ГДГ, проявленные в  $\text{НАДФ}^+$ , из клеток хлореллы, инкубированных в условиях, указанных в табл. 1 (А), в табл. 2 (Б), в табл. 3 (В); I — то же, что и В, но проявленные с  $\text{НАД}^+$ . а — конститутивная  $\text{НАД(Ф)-ГДГ}$ , б —  $\text{НАДФ-ГДГ-1}$ , индуцированная в присутствии  $\text{NH}_4^+$ , в —  $\text{НАДФ-ГДГ-2}$ , индуцированная в присутствии глюкозы и  $\text{NH}_4^+$ . 1 — проявление без глюкозы; 2 — проявление без  $\text{НАДФ}^+$

руется синтез нового изофермента ГДГ, специфичного к  $\text{НАДФ}$ . Появление нового изофермента  $\text{НАДФ-ГДГ}$  в ответ на источник углерода (сахарозу, глюкозу, фруктозу, пируват, глицерин и цитрат) было показано также для *N. crassa* (13). Как у *N. crassa*, так и у хлореллы этот изофермент является минорным и обладает самой низкой электрофоретической подвижностью.

Далее индукция НАДФ-ГДГ-2 была исследована в клетках хлореллы, дефицитных по углероду, т. е. выдержанных в темноте в среде с  $KNO_3$  в течение 15 час. Данные таких опытов представлены в табл. 2 и на рис. 1Б. Сравнивая табл. 2 с рис. 1Б, можно видеть, что НАДФ-ГДГ-2 содержится только в клетках, инкубированных в присутствии глюкозы, хотя спектрофотометрически активность в этих клетках не отличается от активности в клетках, инкубированных в среде без глюкозы. При сравнении этих данных с данными табл. 1 и рис. 1А видно, что НАДФ-ГДГ-2 синтезируется в ответ на глюкозу при инкубации клеток как на свету, так и в темноте.

Чтобы выяснить появляется ли НАДФ-ГДГ-2 специфически под влиянием глюкозы или зависит также от источника азота, индукция этого изофермента была изучена также при инкубации клеток в среде с  $KNO_3$ . Для этой цели использовали культуру, предварительно голодавшую по азоту. Полученные данные показывают (рис. 1В), что НАДФ-ГДГ-2 синтезируется только при инкубации клеток в среде с  $(NH_4)_2SO_4$ , причем как в присутствии, так и в отсутствие глюкозы. Однако в варианте без глюкозы НАДФ-ГДГ-2 обнаруживается в очень незначительном количестве. Вероятно, что синтез этого изофермента зависит, с одной стороны, от продуктов ассимиляции  $NH_4^+$ , а с другой — от наличия в клетках определенных углеродных соединений, возможно, продуктов гликолиза. Достаточный уровень таких соединений может возникнуть или в голодавших по азоту клетках, или при ассимиляции экзогенной глюкозы, о чем свидетельствуют данные последнего опыта. Следует отметить, что в этом опыте активность ГДГ по отношению к НАД-Н была почти в 2 раза выше в клетках ассимилировавших  $NO_3^-$  по сравнению с клетками, получавшими  $NH_4^+$  (табл. 3). Особенно высокая активность наблюдалась в присутствии глюкозы. Такое увеличение активности не связано с появлением нового изофермента, специфичного к НАД-Н, поскольку ни в одном случае в клетках, ассимилирующих  $NO_3^-$  не было обнаружено других изоферментов, кроме конститутивной НАД(Ф)-ГДГ (рис. 1Г).

На основании полученных в настоящей работе данных можно сделать следующие выводы: глюкоза или продукты ее метаболизма индуцируют в клетках *Ch. rupeoidosa* Pr. 82Т синтез нового изофермента ГДГ, специфичного к НАДФ; эффект глюкозы проявляется только при ассимиляции  $NH_4^+$ , но не  $NO_3^-$ ; можно предполагать, что синтез этого изофермента контролируется балансом углеродных и азотных соединений, как это высказано для ГДГ *N. crassa* (7).

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

Поступило  
21 VI 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Р. Шатилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Биохимия, 34, 409 (1969). <sup>2</sup> Н. Г. Томова, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Биохимия, 34, 249 (1969). <sup>3</sup> В. Р. Шатилов, Г. С. Калошина, В. Л. Кретович, ДАН, 194, 964 (1970). <sup>4</sup> P. J. Casselton, Sci. Progr., 57, 207 (1969). <sup>5</sup> I. Núñez de Castro, M. Ugarte et al., Europ. J. Biochem., 16, 567 (1970). <sup>6</sup> W. N. Strickland, Austr. J. Biol. Sci., 22, 425 (1969). <sup>7</sup> W. N. Strickland, ibid., 24, 905 (1971). <sup>8</sup> В. Р. Шатилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Прикл. биохим. и микробиол., 2, 667 (1966). <sup>9</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). <sup>10</sup> B. J. Davies, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, Part 2, 404 (1964). <sup>11</sup> L. Ornstein, ibid., p. 321. <sup>12</sup> D. A. Thurman, C. Palin, M. V. Laycock, Nature, 207, 493 (1965). <sup>13</sup> M. Кароог, A. K. Grower, Canad. J. Microbiol., 16, 33 (1970).