

Г. М. ЭЛБАКИДЗЕ, Н. В. ЕРМОЛАЕВА

**ИНГИБИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ АТФ НА ПРОЦЕСС
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕГРАДАЦИИ
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИДА**

(Представлено академиком А. С. Спириным 13 IX 1973)

Согласно одному из допущений, сделанных в гипотезе о существовании антагонистических взаимодействий между ядром и митохондриями клетки, понижение внутриклеточной концентрации АТФ должно приводить к иницированию в клеточном ядре распада ДНП⁽¹⁾. С целью проверки этого предположения были проведены эксперименты на ДНП с высоким содержанием белка, выделенным из печени крысы по методу Н. В. Ермолаевой⁽²⁾. Оказалось, что присутствие в среде инкубирования АТФ в концентрации, близкой к физиологической, действительно приводит к замедлению ферментативного распада ДНП, протекающего за счет сопутствующих ему ферментов, в то время как добавление АМФ и пирофосфата в тех же условиях не оказывает заметного влияния на этот процесс⁽³⁾. В ходе дальнейшего исследования этого эффекта необходимо было установить, на какой именно фермент из группы ферментов, обладающих способностью разрушать ДНП, действует АТФ. К их числу, как известно, принадлежат протеазы⁽⁴⁾, нейтральные и кислые ДНКазы⁽⁵⁾, а также отличающийся от них по ряду свойств ферментный фактор, обнаруженный Н. В. Ермолаевой в ядрах некоторых тканей и выделенный ею из тимуса телят⁽⁶⁾. Воздействие АТФ на активность ферментного фактора представлялось нам наиболее вероятным, так как последний занимает, по-видимому, ключевое положение в катаболизме ДНП, увеличивая доступность субстрата для других автолитических ферментов. Определенный интерес представляло также и изучение влияния АТФ на распад ДНП в суспензии клеток тимуса в процессе их инкубирования в глюкозо-солевой среде, ввиду приближенности данной модели к условиям, имеющим место *in vivo*. Настоящее исследование посвящено изучению этих вопросов.

Препараты ДНП и ферментную фракцию, деградирующую ДНП, получали из тимуса телят по ранее описанным методам⁽⁶⁾ с небольшими модификациями. В опытах использовали ферментные фракции, содержащие незначительную примесь ДНКазы. Условия опытов с суспензией клеток тимуса были описаны нами ранее⁽⁷⁾. Чистота использованного АТФ проверялась электрофоретически. Ионная сила уравнивалась во всех испытуемых пробах добавлением фосфатного буфера. Деградацию ДНП оценивали методом солевого фракционирования⁽⁸⁾, определение ДНК проводили методом Бартона⁽⁹⁾.

Из данных, приведенных на рис. 1, можно заключить, что добавление АТФ в реакционную среду приводит к глубокому ингибированию распада ДНП под действием очищенного ферментного фактора как при умереннокислом, так и при нейтральном значении рН. Как видно из рис. 2, ингибирование развивается уже при концентрации АТФ в 2,5 μM , причем присутствие в среде 1 mM ЭДТА исключает влияние на фермент примесей ионов металла в добавленном препарате АТФ. Ингибирующее действие

АТФ можно рассматривать как свидетельство участия ДНП-разрушающего ферментного фактора в ядерно-митохондриальных взаимодействиях. Угнетение ферментативного распада ДНП в присутствии АТФ, казалось бы, представляет исключение из общей закономерности в регулировании внутриклеточных процессов. Известные в настоящее время случаи ингибирования ферментов с помощью АТФ относятся к реакциям, предшествующим образованию макроэргических соединений. Так, было показано ингибирование в присутствии АТФ активностей фосфорилáзы В (¹⁰),

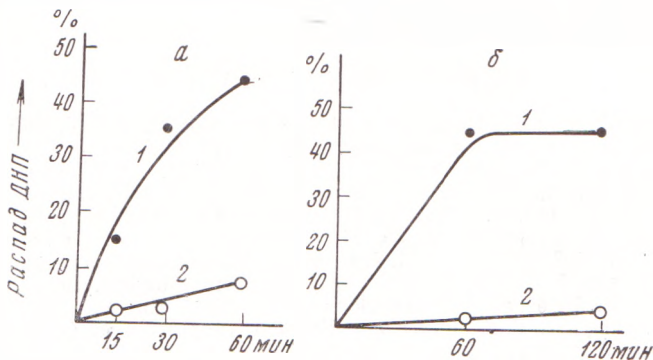


Рис. 1. Влияние АТФ (7,5 μ мол/мл) на величину распада препаратов ДНП под действием ферментной фракции. а — инкубация при рН среды 6,5–6,7, $\mu=0,03$; б — инкубация при рН 7,0–7,2 при той же ионной силе. 1 — распад ДНП без АТФ, 2 — распад в присутствии АТФ

гексокиназы (¹¹), цитратсинтетазы (¹²), а также начального этапа биосинтеза пуринов, катализируемого фосфорибозилпирозинфосфат-амидотрансферазой (¹³). Между тем, по общепринятому мнению, ни распад ДНП на белок и ДНК, ни последующий гидролиз ДНК не сопряжены с накоплением энергии. Однако это противоречие окажется формальным, если принять во внимание результаты наших опытов, в которых добавление гидролизата ДНК, полученного действием на ДНК нейтральной ДНКазы, к водорастворимой фракции клеточного ядра, предварительно прогретой с безмитохондриальной цитоплазматической фракцией, приводило к значительному снижению разобщающей активности этой смеси. Это обстоятельство позволяет рассматривать ингибирование распада ДНП с помощью АТФ как акт регулирования антагонистических взаимодействий между ядром и митохондриями клетки, направленных на стабилизацию клеточной энергетики. Отличительной способностью рассмотренного регулирования является и то обстоятельство, что «запуск» механизма стабилизации энергетики осуществляется здесь при понижении концентрации АТФ, в то время как в упомянутых выше случаях ингибирование отдельных звеньев метаболизма с помощью АТФ наступало при повышении концентрации последней.

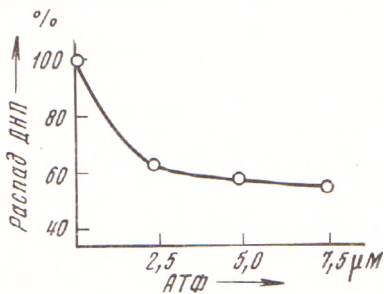


Рис. 2. Влияние различных концентраций АТФ на величину распада ДНП при воздействии ферментативной фракции, в присутствии ЭДТА-буфера (1 мМ), рН 6,6–6,7

Результаты экспериментов с добавлением АТФ к суспензии клеток тимуса, инкубируемых в течение 4 час., свидетельствуют об ингибирующем действии АТФ на распад ДНП в условиях, максимально приближенных к таковым в нормальной ткани (добавление 10 μ мол/мл через 2 часа после начала инкубации дает угнетение

распада ДНП на 45%, через 1 час — на 67%, добавление 5 μ мол/мол через 1 и 2,5 часа дает 63-процентное угнетение распада ДНП). Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что регулирование катаболизма ДНП посредством изменения уровня АТФ действительно может иметь место в живых клетках.

Авторы выражают свою глубокую благодарность И. Г. Ананишвили и Г. А. Макашвили за содействие в проведении этого исследования.

Институт биофизики
Министерства здравоохранения СССР
Москва

Поступило
30 VII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. М. Элбакидзе, М. Ш. Гордезиани, Сообщ. АН ГрузССР, 65, 2, 698 (1972). ² Н. В. Ермолаева, Биохимия, 32, 4, 774 (1967). ³ Г. М. Элбакидзе, Н. К. Рогава, Сообщ. АН ГрузССР, 67, 3, 705 (1972). ⁴ P. Henson, Y. Walker, Biochem. J., 122, 1, 22 (1971). ⁵ R. J. Billings, J. Bonner, Biochim. et biophys. acta, 281, 3, 453 (1972). ⁶ Н. В. Ермолаева, Биохимия, 31, 4, 860 (1960). ⁷ Н. В. Ермолаева, Биохимия, 35, 11, 17 (1970). ⁸ L. J. Cole, M. F. Ellis, Radiation Res., 7, 5, 508 (1957). ⁹ К. Бартош, Методы исследования нуклеиновых кислот, М., 1970, стр. 7. ¹⁰ N. V. Madsen, Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 4, 390 (1964). ¹¹ K. Iyeda, E. Backer, J. Biol. Chem., 240, 4682 (1965). ¹² I. A. Hathaway, D. E. Atkinson, Biochem. Biophys. Res. Commun., 20, 5, 661 (1965). ¹³ J. B. Wuyngaerden, D. M. Ashton, J. Biol. Chem., 234, 6 (1959)