

А. Б. ЦИОМЕНКО, В. М. ВАГАБОВ, И. С. КУЛАЕВ

**ДЕЙСТВИЕ 2-ДЕЗОКСИГЛЮКОЗЫ НА СИНТЕЗ И СЕКРЕЦИЮ
КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ И МАННАНА ДРОЖЖЕВЫМИ
ПРОТОПЛАСТАМИ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 4 X 1974)

Дрожжевые протопласты способны в определенных условиях секретировать в среду инкубации некоторые физиологически активные макромолекулы, наиболее важными среди которых являются ферменты-гликопротеиды. В частности, одним из таких ферментов у дрожжей является кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2), которая, как известно, локализована на периферии клетки, в ее клеточной стенке (¹). Считается, что данный фермент может секретироваться протопластами только в форме маннопротеида

Таблица 1

Действие 2-дезоксиглюкозы на секрецию маннана и потребление глюкозы протопластами *S. cerevisiae* *

2-ДГ, мМ	Маннан, имп·мин ⁻¹ /мл	Глюкоза, 10 ³ имп·мин ⁻¹ /мл
0	1939	301
1,25	1122	331
2,5	795	299
5,0	600	229
10,0	367	192

* В данном случае, как и во всех последующих, продолжительность инкубации протопластов 150 мин.

(«тяжелая» форма фермента), и для него, в отличие от инвертазы, не обнаружено существования другой («легкой») формы, лишенной маннана (²).

Исследование закономерностей секреции некоторых ферментов дрожжевыми протопластами, помещенными в среду, содержащую в качестве источника углерода фруктозу (³), показали, что подавление биосинтеза маннана 2-дезоксиглюкозой (2-ДГ), или ингибирование белкового синтеза циклогексимидом (ЦГИ), приводит к торможению биосинтеза и секреции кислой фосфатазы. Остается, однако, неясным, сохраняется ли эффект 2-ДГ в случае, если источником углерода служат иные моносахариды (глюкоза или манноза). Выяснение этого и некоторых других вопросов явилось основной целью настоящей работы.

Объектом исследования служили дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* 332-ИБФМ. Выращивание проводили на среде Ридер с 2% глюкозы, 0,2%

дрожжевого экстракта («Serva»), в качалочных колбах на 500 мл с 200 мл среды, в термостате при 29°, на механической качалке. Биомассу собирали после достижения середины логарифмической фазы роста клеток. Отмытые от среды клетки (5 г) суспендировали в 40 мл 0,8 М маннита в цитратном буфере pH 6,0 с 1,5% 2-меркаптоэтанола, инкубировали 10 мин. при 30°, после чего вносили 1 г лиофилизированного «улиточного» фермента. После инкубации с ферментом (30–40 мин.) протопласты промывали трижды раствором маннита в цитратном буфере. Отмытые протопласты суспендировали ($6 \cdot 10^7$ /мл) в среде с pH 6,0, содержащей все необходимые элементы питания и витамины (Bacto yeast nitrogen base for carbon assimilation test), а также 0,8 М маннит как осмотический протектор. В качестве источников углерода, в зависимости от целей, использовали глюкозу, фруктозу или маннозу (50 мМ). Концентрация ортофосфата (K_2HPO_4) составляла 5 мМ, 2-ДГ («Serva», glucosfrei) от 1,25 до 10 мМ и ЦГИ («Serva») 5 мкг/мл. Инкубацию проводили при 30° с постоянным перемешиванием суспензии. Через определенные интервалы времени отбирали пробы по 2 мл для определения активности кислой фосфатазы (3). В опытах с ^{14}C -глюкозой меченный маннан выделяли из 5 мл среды путем образования комплекса с Cu^{2+} (4).

В предварительных опытах было исследовано влияние различных концентраций 2-ДГ на потребление глюкозы и секрецию маннана протопластами (табл. 1).

Представленные в табл. 1 результаты показывают, что увеличение концентрации 2-ДГ до 2,5 ммол/л не приводило к снижению потребления глюкозы, в то время как секреция маннана тормозилась уже при минимальной из использованных концентраций (1,25 ммол/л). Используя в дальнейших опытах 2-ДГ в концентрации 2,5 ммол/л, мы обнаружили, что добавление данного ингибитора к суспензии протопластов в начале инкубации практически не влияло на секрецию кислой фосфатазы. В то же время, при внесении 2-ДГ после 30 мин. инкубации наблюдалась резкая стимуляция секреции фермента (рис. 1). Уровень ферментативной активности в среде возрастал при этом почти в два раза по сравнению с контролем. Добавление ЦГИ в среду инкубации приводило к быстрому подавлению секреции. Опыты, в которых одновременно определяли секрецию кислой фосфатазы и маннана (табл. 2), показали, что независимо от момента внесения 2-ДГ секреция маннана подавлялась в одинаковой мере, в то время как секреция кислой фосфатазы увеличивалась при внесении ингибитора после 30 мин. инкубации.

Необходимо было проверить наблюдается ли подобный эффект в случае, если вместо глюкозы источником углерода служит другой сахар (фруктоза или манноза). Как показали исследования (табл. 3), характер секреции кислой фосфатазы на средах с различными сахарами в присутствии 2-ДГ совершенно различен. Так, если на среде с глюкозой при внесении 2-ДГ в начале инкубации не наблюдалось существенного изменения секреции, то на среде с фруктозой и еще в большей степени с маннозой наблюдалось торможение. Когда 2-ДГ была внесена после 30 мин. инкубации, то наряду с четкой стимуляцией секреции в варианте с глюкозой происходило лишь незначительное повышение активности на среде с фруктозой и значительное подавление на среде с маннозой.

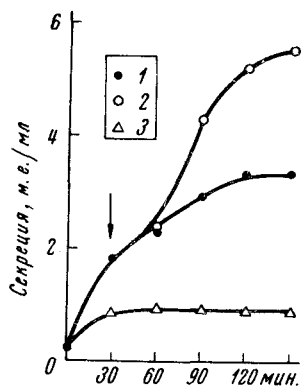


Рис. 1. Секреция кислой фосфатазы протопластами *S. cerevisiae* 332-ИБФМ. 1 — контроль, 2 — добавлен 2-ДГ, 3 — добавлен ЦГИ. Стрелкой показан момент внесения 2-ДГ; ЦГИ вносили в начале инкубации

Таблица 2

Действие 2-дезоксиглюкозы на секрецию кислой фосфатазы и маннана протопластами *S. cerevisiae*

Вариант	С.а. *	О.а. *	Маннан, имп. мин ⁻¹ /мл
Исходная активность	37	206	79
Инкубация без 2-ДГ	276	389	2545
2-ДГ внесена в начале инкубации	240	359	1011
2-ДГ внесена после 30 мин. инкубации	485	627	1035

* Здесь и в табл. 3 с.а.— секретируемая активность, о.а.— общая активность в ме/100 мл.

Таблица 3

Действие 2-дезоксиглюкозы на секрецию кислой фосфатазы протопластами *S. cerevisiae* на средах с различными моносахаридами

Вариант	Глюкоза		Фруктоза		Манноза	
	с.а.	о.а.	с.а.	о.а.	с.а.	о.а.
Исходная активность	32	217	17	292	35	267
Инкубация без 2-ДГ	268	418	234	401	323	468
2-ДГ внесена в начале инкубации	301	468	192	367	229	337
2-ДГ внесена после 30 мин. инкубации	485	662	267	426	250	368

В работе (³), в ссылке на неопубликованные данные, говорится, что ингибирующий эффект 2-ДГ на секрецию кислой фосфатазы проявляется независимо от природы источника углерода (фруктоза, глюкоза или манноза). Результаты, приведенные в табл. 3, показывают, что действие 2-ДГ на секрецию данного фермента совершенно различно на среде с глюкозой и маннозой. Фруктоза в этом смысле занимает промежуточное положение.

Таким образом, изложенные результаты говорят о том, что существующий взгляд на характер взаимоотношений между биосинтезом и секрецией маннана и маннопротеидов, а также действие на эти процессы 2-ДГ (⁵), требуют дальнейшего тщательного изучения. Очевидно, эффект 2-ДГ во многом зависит как от ее концентрации, так и от природы метаболизируемого углерода. В частности, одной из вероятных причин стимуляции биосинтеза и секреции кислой фосфатазы в присутствии 2-ДГ на среде, содержащей глюкозу, является возможность накопления протопластами таких интермедиатов, как глюкозо-6- и глюкозо-1-фосфат. Это обстоятельство, по всей видимости, может привести к индукции синтеза кислой фосфатазы ее субстратами. Синтезируемый в таких условиях фермент, возможно, имеет отличную от «нормальной», модифицированную форму, вследствие нарушения биосинтеза его углеводного компонента. Однако существование «легкой» формы кислой фосфатазы, лишенной маннана, допустить пока невозможно, так как предварительные опыты по гель-фильтрации, проведенные совместно с Ю. А. Шабалиным, показали оди-

наковую подвижность препаратов кислой фосфатазы, выделенных из сред инкубации протопластов с 2-ДГ и контрольной, на колонке с сефадексом G-200.

Предпринимаемое в настоящее время детальное изучение секретируемого фермента должно способствовать выяснению обнаруженного феномена.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
9 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ W. L. McLellan, J. O. Lampen, *Biochim. et biophys. acta*, v. 67, 324 (1963). ² J. O. Lampen, S. C. Kuo, F. R. Cano, *Proc. III Intern. Symp. Yeast Prot.*, Salamanca, London — N. Y., 1973. ³ S. C. Kuo, J. O. Lampen, *J. Bacteriol.*, v. 111, 2, 419 (1972). ⁴ W. E. Trevelyan, J. S. Harisson, *Biochem. J.*, v. 50, 298 (1958). ⁵ V. Farkas, A. Svoboda, S. Bauer, *Biochem. J.*, v. 118, 755 (1970).