

А. А. НЕРСЕСЯН, С. П. ОГАНЕСЯН, М. А. ДАВТЯН

ВЛИЯНИЕ ДНФ И KCN НА ПРОНИКНОВЕНИЕ И НАКОПЛЕНИЕ ВАЛИНА И NH_4^+ У ДРОЖЖЕЙ РОДА CANDIDA

Изучалось влияние ингибиторов (ДНФ и KCN), подавляющих метаболические процессы клетки, как на проникновение и накопление DL-валина и NH_4^+ , так и на уровень глутамина у дрожжей рода *Candida* (*C. guilliermondii* и *C. guilliermondii membranaefaciens*).

Установлено, что ДНФ и KCN, подавляя биосинтез АТФ, оказывают ингибирующее влияние на проникновение и накопление валина и NH_4^+ и на биосинтез глутамина.

Полученные данные говорят о том, что система переноса указанных соединений непосредственно не нуждается в энергии АТФ.

Одним из главных подходов к разрешению проблемы путей использования энергии метаболических процессов в механизмах активного транспорта является изучение влияния ингибиторов на эти механизмы.

Ходкин и Кейнес [9] показали, что динитрофенол и цианид сильно тормозят транспорт ионов K^+ и Na^+ в гигантских аксонах *Sepia officinalis* и *Loligo forbesi*. Показано также, что при ингибировании эндогенного дыхания цианидом, ДНФ, арсенатом понижается способность опухолевых клеток концентрировать глицин [5].

Накоплено много данных по влиянию ингибиторов на проникновение аминокислот через слизистую оболочку кишки [4]. В частности, показано, что в кишках 2,4-ДНФ понижает количество внутриклеточного K^+ , вероятно, путем разобщения окислительного фосфорилирования [11]. Следует отметить, что при этом степень ингибирования транспорта K^+ зависит от концентрации последнего [12].

Проницаемость лизина в клетки *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus faecalis* также подавляется под влиянием многих метаболических ядов: цианида, монойодофосфорной кислоты, флюорида, ацида Na, ДНФ [7]. В клетках *Streptococcus faecalis* ацид Na, 2,4-ДНФ и кристалвиолет ускоряют накопление глутаминовой кислоты, тогда как у *Staphylococcus aureus* — тормозят. Кристалвиолет ингибирует также дальнейший обмен проникнутой глутаминовой кислоты [6].

Известно, что ДНФ разобщает окислительное фосфорилирование, усиливая АТФ-азную активность (при этом концентрация АДФ увеличивается) [10].

Цианид, будучи неспецифическим ингибитором, может ингибировать активность ферментов разными путями [1]: может соединиться с металлом или вытеснить его из фермента; соединиться с карбоксильной группой субстрата или целиком с субстратом; действовать как восста-

навливающий агент, расщепляющий дисульфидные связи ферментов. Цианид сильно действует также на цитохромную систему.

В литературе очень мало данных по влиянию дыхательных ингибиторов на проникновение аминокислот. С этой точки зрения почти не изучены дрожжи рода *Candida* [2].

Данная работа посвящена изучению воздействия ингибиторов на проникновение и накопление аминокислот и NH_4^+ , а также на синтез глутамина у *Candida guilliermondii* и *Candida guilliermondii membranaefaciens*.

Материал и методика. Объектом исследования служили дрожжи рода *Candida* — *C. guilliermondii* (штамм 71) и *C. guilliermondii membranaefaciens* (штамм 72).

В качестве субстратов использовались DL-валин и $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ в tris буфере, pH 5.5

Выращивание исследуемых штаммов, состав синтетических сред, техника подготовки культур к опытам, техника голодания и постановка опытов описаны в наших предыдущих работах [3].

В качестве ингибиторов использовались KCN и 2,4-ДНФ.

Инкубационная смесь имела следующий состав: дрожжи в виде суспензии—110—120 мг (сух. в-ва) в 12 мл, валин в буферном (tris) растворе—47 μM в 1,5 мл, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ в 0,15 М растворе NaCl — 47 μM в 1,5 мл, ингибиторы в концентрациях 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} М, конечный объем—15 мл.

В вариантах с ингибиторами последние вносились в суспензию дрожжей за 15 мин до добавления раствора аминокислот. Момент последнего внесения считался началом инкубации. Инкубационные сосудики взбалтывались на круговой качалке (140—150 об/мин) при температуре $30 \pm 2^\circ$

Пробы брались на 5-ой, 30-ой, 60-ой мин от начала инкубации. Биомасса, содержащаяся в каждой пробе, отделялась от жидкой фазы путем центрифугирования, затем экстрагировалась 70% спиртом в течение 1 часа с гидромодулем (V спирт/р биомасса) — 30.

Скорость проникновения аминокислот определялась в интервалах 0—5, 5—30, 30—60 мин по формуле: аминокислота (в мг дрожжей сух. в-ва), продолжительность интервала (мин) $\times 10^3$. В основном бралась скорость в интервале 0—5 мин (V). Уровень накопления (H) определялся по количеству аминокислот (мг), обнаруживаемых в 100 мг сухих дрожжей в данный период инкубации.

Результаты и обсуждение. Влияние ДНФ и KCN на проникновение и накопление валина и $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ у *C. guilliermondii* и *C. guilliermondii membranaefaciens*. Результаты опытов, приведенные на рис. 1, показывают, что под влиянием 10^{-4} М концентрации ДНФ у *C. guilliermondii* проникновение и накопление валина подавляется на 90%, а при 10^{-3} и 10^{-2} М — на 100%.

В противоположность *C. guilliermondii*, у *C. guilliermondii membranaefaciens* 10^{-4} М ДНФ подавляет проникновение и накопление валина всего на 10—15%, а при концентрациях 10^{-3} и 10^{-2} М — на 50—55% и 90% соответственно.

KCN в концентрации 10^{-4} М в течение 5 мин инкубации подавляет проникновение валина приблизительно на 30%, а при концентрации 10^{-2} и 10^{-3} М — на 70—90%.

Результаты опытов по влиянию на проникновение и накопление $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ приведены на рис. 2. В присутствии ДНФ у *C. guilliermondii*

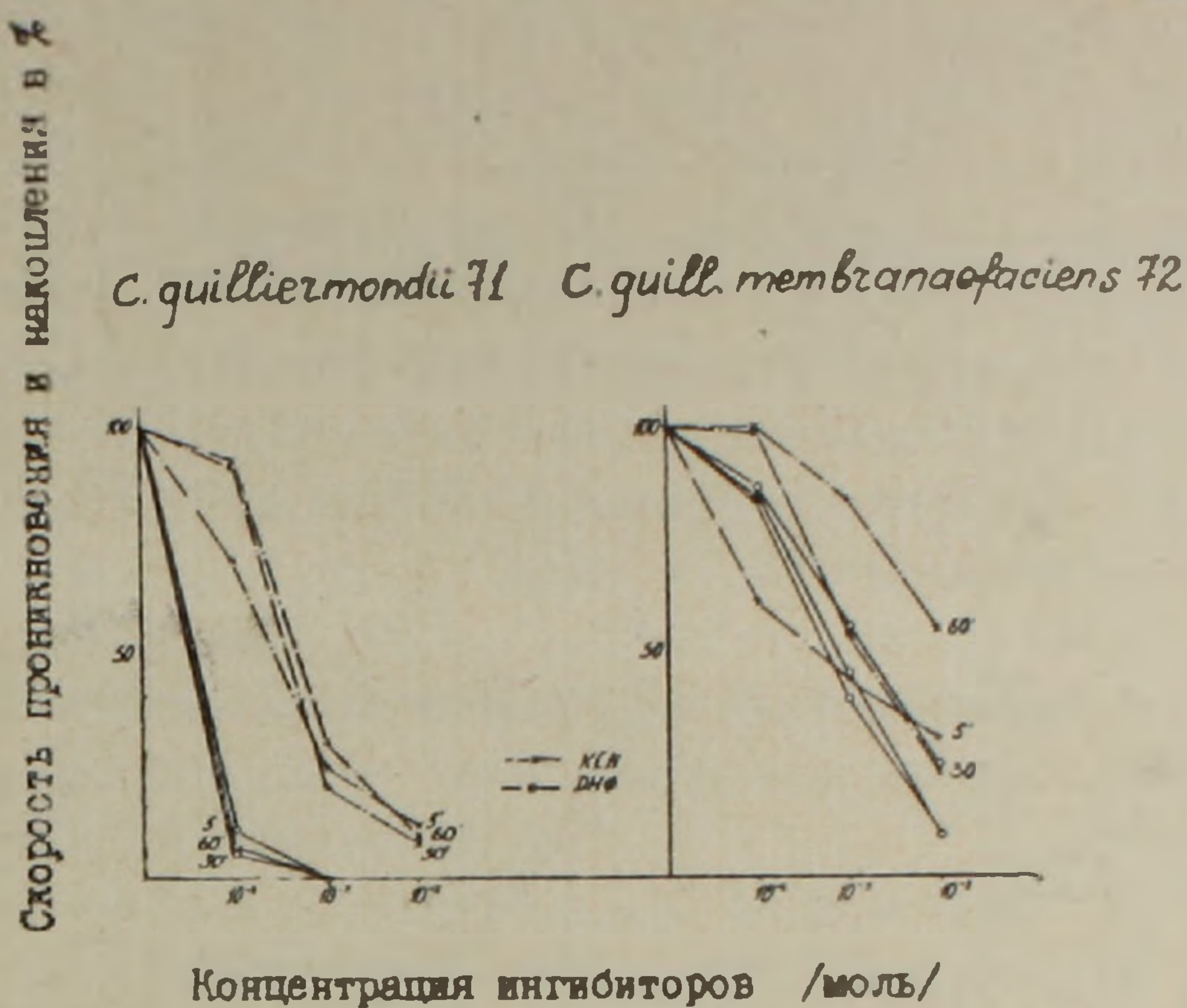


Рис. 1. Влияние ингибиторов (ДНФ и KCN) на проникновение и накопление валина у *C. guilliermondii* и *C. guilliermondii membranaefaciens*.

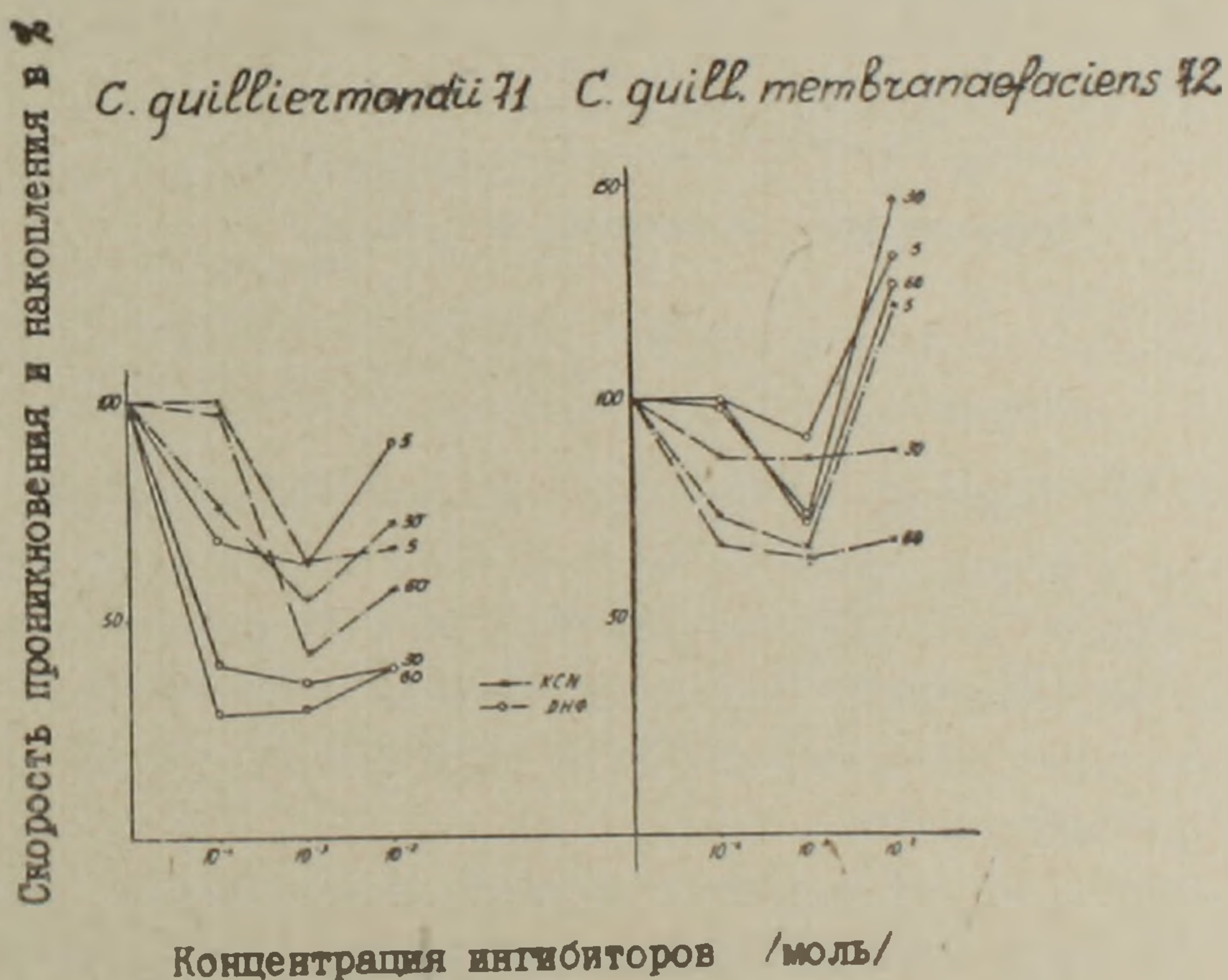


Рис. 2. Влияние ингибиторов (ДНФ и KCN) на проникновение и накопление $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ у *C. guilliermondii* и *C. guilliermondii membranaefaciens*.

подавляется проникновение и накопление $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: при концентрации ДНФ 10^{-4} и 10^{-3} М они полностью подавляются уже на 30 мин инкубации. Концентрация ДНФ 10^{-4} М у *C. guilliermondii membranaefaciens* почти не подавляет проникновение и накопление NH_4^+ , в то время как концентрация 10^{-3} М подавляет всего на 25—30%. При более высокой концентрации ДНФ (10^{-2} М) наблюдается обратная картина—повышается проникновение и накопление NH_4^+ .

Почти аналогичная картина наблюдается при воздействии KCN. Приведенные на рис. 2 данные показывают, что KCN до концентрации 10^{-3} М фактически не действует на проникновение и накопление NH_4^+ .

а при концентрации 10^{-3} М подавляет эти процессы на 50% у *C. guilliermondii* и на 25—30% у *C. guilliermondii membranaefaciens*.

Влияние ДНФ и KCN на уровень глутамина у *C. guilliermondii* и *C. guilliermondii membranaefaciens*. Уже при концентрации ДНФ 10^{-4} М уровень глутамина у *C. guilliermondii* резко понижается, вероятно, вследствие подавления его биосинтеза (рис. 3). У *C. guilliermondii membranaefaciens* ДНФ в этой же концентрации подавляет биосинтез глутамина всего на 10—15%, а в концентрации 10^{-3} и 10^{-2} М — на 60—75%.

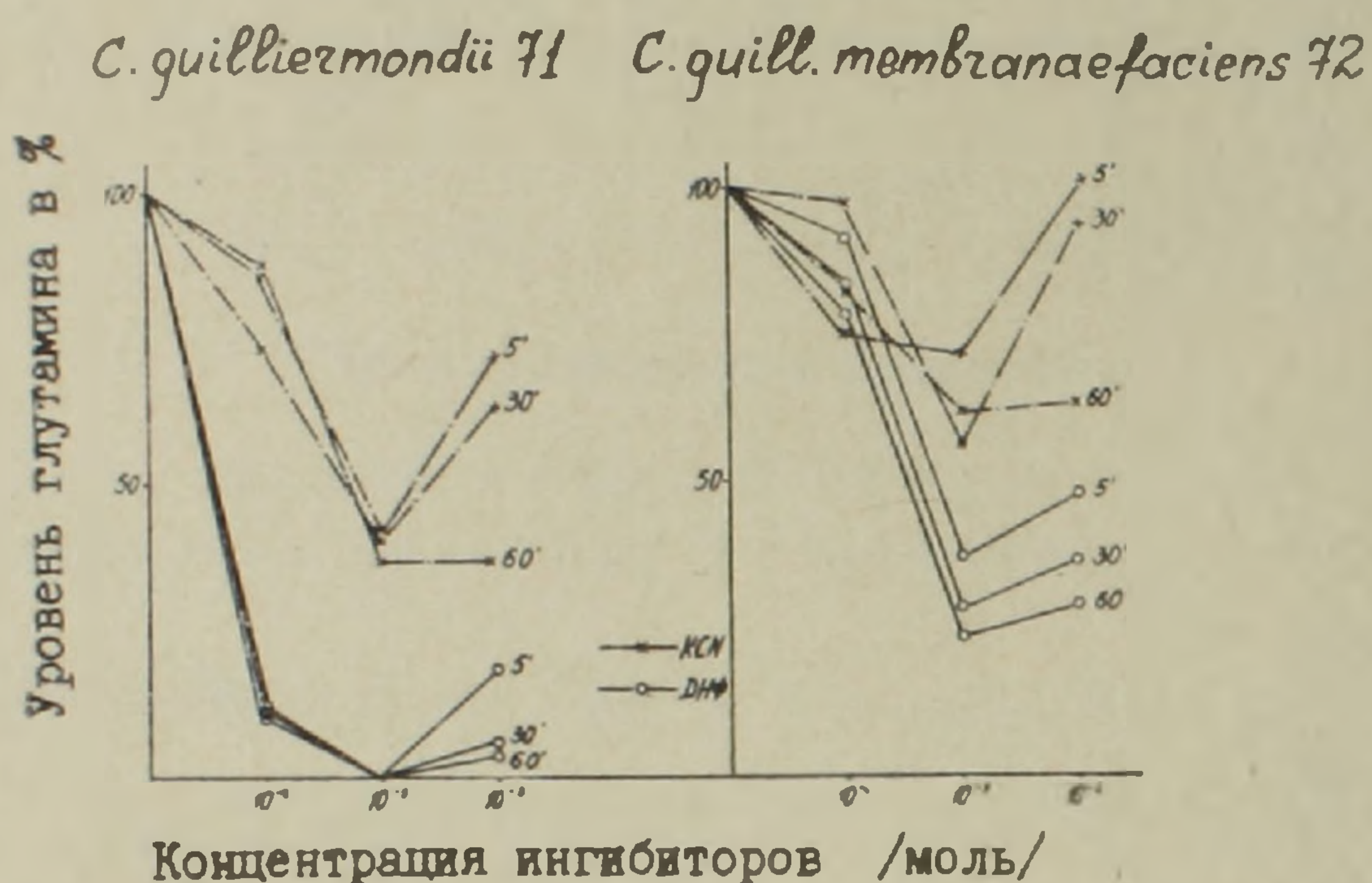


Рис. 3. Влияние ингибиторов (ДНФ и KCN) на уровень глутамина у *C. guilliermondii* и *C. guilliermondii membranaefaciens*.

Аналогичное действие на уровень глутамина оказывает и KCN. У обеих культур в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М он слабо подавляет биосинтез глутамина: в концентрации 10^{-3} М у *C. guilliermondii* — на 50—60%, а у *C. guilliermondii membranaefaciens* — 30—40%.

Ингибирующее свойство как KCN, так и ДНФ более сильно выражено у *C. guilliermondii*.

Таким образом, наблюдается полный параллелизм между проникновением и накоплением $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, а также биосинтезом глутамина при воздействии ДНФ и KCN. Это объясняется, по всей вероятности, тем, что под влиянием ДНФ и KCN подавляется продукция АТФ, что, в свою очередь, приводит к подавлению биосинтеза глутамина и переноса $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Возникает вопрос, посредством какого механизма понижение уровня АТФ приводит к подавлению процесса проникновения. Вероятно, подавление биосинтеза глутамина, т. е. подавление усвоения аммиака, должно в конечном итоге привести к понижению проникновения аммиака вследствие накопления в клетке проникнувшего аммиака. Однако в наших опытах подавление биосинтеза глутамина сопровождается подавлением процесса проникновения аммиака без предварительного накопления его в клетке. Другая возможность заключается в том, что, согласно литературным данным [8], под влиянием ДНФ и, возможно, KCN,

макромолекулы клетки лишаются способности связывать (нековалентными связями) слабыми связями ряд метаболитов, так как, по-видимому, связывание нуждается в энергии АТФ. Можно допустить, что в наших условиях в присутствии ДНФ проникнувший в клетку аммиак не связывается с макромолекулами и остается в свободном виде, тем самым препятствуя процессу катализируемой диффузии.

Подобное объяснение отрицает прямое воздействие АТФ на переносящие системы, т. е. он действует на процесс переноса непрямым путем. С этим выводом согласуется также то обстоятельство, что, как показали наши эксперименты (рис. 2, 3), ДНФ подавляет биосинтез глутамина значительно сильнее, чем проникновение и накопление аммиака, так как, вероятно, процесс катализируемой диффузии в первые минуты инкубации не зависит от процесса усвоения.

Трудно объяснить парадоксальный факт повышения процесса проникновения аммиака при высоких концентрациях ДНФ (10^{-2} М). Несомненно, усиление проникновения его никак не связано с усилением усвоения, ибо при этом уровень глутамина повышается весьма незначительно (вероятно, это некоторое повышение обусловлено подавлением глутаминазной активности в присутствии больших концентраций аммиака). По всей вероятности, при высоких концентрациях влияние ДНФ на мембрану является первичным.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и проблемная лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 4.X 1972 г.

Ա. Ա. ՆԵՐՍԻՍՅԱՆ, Ս. Պ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ԴՆՖ ԵՎ KCN-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՎԱԼԻՆ-Ի ԵՎ
 NH_4^+ -Ի ԹԱՓԱՆՑԵԼԻՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԿՈՒՏԱԿՄԱՆ ՎՐԱ CANDIDA
ՑԵՂԻ ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հետազոտվել է բջջի նյութափոխանակությունը ընկճող արգելակիչների՝ (ԴՆՖ KCN) ազդեցությունը ինչպես DL-վալինի և NH_4^+ -ի թափանցելիության և կուտակման վրա, այնպես էլ գլուտամինի մակարդակի վրա Candida ցեղի խմորասնկերի՝ (C. guilliermondii-ի և C. guill. membranaefaciens-ի) մոտ:

Կատարված հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ ԴՆՖ-ը և KCN-ը ընկճելով ԱԵՖ-ի բիոսինթեզը, ընկճում են ինչպես վալինի և NH_4^+ -ի թափանցելիությունը և կուտակումը, այնպես էլ գլուտամինի բիոսինթեզը: Հնդորում ԴՆՖ-ը ընկճում է գլուտամինի բիոսինթեզը ավելի ուժեղ, քան NH_4^+ -ի թափանցելիությունը և կուտակումը:

Այս և մի քանի այլ տվյալներ վկայում են, որ վերոհիշյալ նյութերի փոխադրման սիստեմի համար անմիջականորեն ԱԵՖ-ի էներգիան անհրաժեշտ չէ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Диксон М., Уэбб В. Ферменты. Русск. пер. М., 1966.
2. Тер-Карапетян М. А., Оганесян С. П. ДАН АрмССР, 22, 3, 1969.
3. Тер-Карапетян М. А., Оганесян С. П., Тер-Карапетян А. М. ДАН АрмССР, 21, 11, 1968.
4. Abedo. Advances in protein chemistry. 15, 289, 1960.
5. Christensen H. N., Riggs T. J. Biol. Chem., 194, 1. 2663, 1952.
6. Gale E. F. Advances in protein chemistry, 8, 287, 1953.
7. Gale E. F., Taylor E. S. Sympos. Soc. Exptl. biol., 8, 242, 1960.
8. Ghosh N. R. Nature, 200, 4902, 175, 1963.
9. Hodgkin A. L., Keynes R. D. J. Physiol., 119, 513, 121, 403, 1953, по Гизе „Физиология клетки“, 1959.
10. Loomys W. F., Lipmann L. J. Biol. Chem., 173, 807, 1948.
11. Neil M. W. Biochem. J., 71, 118, 1959, по Membrane transport and Metabolism, Praha, 516, 1960.
12. Smyth D. H. Membrane transport and Metabolism, Praha, 488, 1960.