Доклады Академии наук СССР
1955. Том 102, № 1

БИОХИМИЯ

Т. В. ВЕНКСТЕРН и академик В. А. ЭНГЕЛЬГАРДТ

ПОВЕРХНОСТНО-ЛОКАЛИЗОВАННАЯ АДЕНОЗИНПОЛИФОСФАТАЗА ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

Богатые энергией (макроэргические) связи АТФ служат непосредственным источником энергии для осуществления разнообразных физиологических функций и источником подвижных фосфатных остатков для фосфорилирования различных соединений. Ферменты, осуществляющие освобождение энергии макроэргических связей АТФ или осуществляющие трансфосфорилирование, с правом должны рассматриваться как одни из особенно важных катализаторов в функциональном обмене клетки.

Ферментативный гидролиз АТФ осуществляется в одних случаях таким образом, что отщепляется лишь один терминальный фосфатный остаток, а образующийся продукт, аденозиндифосфорная кислота, дальше не расщепляется; ферменты с таким действием обозначаются как аденозинтрифосфатазы (АТФазы). В других случаях отщепляются в виде ортофосфата оба макроэргических фосфорных остатка; такие ферменты обозначаются как аденилпирофосфатазы (сокращенно апиразы) и дальше будут обозначаться АПФазы.

В мышце мощная АТФазная активность принадлежит основному белку сократительного вещества мышцы, миозину. Другим объектом, в котором давно были обнаружены интенсивно протекающие превращения АТФ, являются ядерные эритроциты птиц ([1]). Эти клетки содержат значительное количество АТФ, примерно того же порядка, как и в скелетных мышцах. При выключении дыхания ядерных эритроцитов наблюдается гидролитическое расщепление содержащейся в клетках АТФ. Скорость этого процесса такова, что примерно за 1 час весь лабильный фосфат АТФ оказывается гидролизованным. Так как отщепляются оба лабильных остатка фосфорной кислоты, то мы имеем дело с «апиразным» типом расщепления, и будем говорить о соответствующем ферменте как об АПФазе.

Активность АПФазы эритроцитов выражается величинами порядка $Q_P = 1—1{,}5$. По сравнению с мышцей, где в расчете на вес ткани (а не на изолированный миозин) мы имели бы $Q_P = 1000$, активность, найденная в эритроцитах, представляется очень незначительной. Если учесть, что в эритроците не менее 80% сухого веса приходится на метаболически инертный гемоглобин, то активность в пересчете на собственно клеточное вещество должна быть увеличена минимум в 5 раз и приблизится к $Q_P = 10$. Это тоже сравнительно небольшая величина. Однако уже в ранних опытах ([2]) было обнаружено, что скорость распада АТФ, содержащейся в эритроцитах, колоссально возрастает при разрушении структуры этих клеток. При гемолизе замораживанием и оттаиванием наблюдается «взрывообразный» распад АТФ, происходящий в самое короткое время (несколько минут) и даже при температуре не выше $+1$ или $+2°$. Причина этого явления осталась тогда неясной.

Для выяснения этого вопроса и были предприняты излагаемые ниже опыты. Они показали, что в неповрежденной красной кровяной клетке птиц имеется весьма активная АПФаза, но она пространственно обособле-

на от субстрата. Она локализована в подавляющей своей части на поверхности эритроцита и не способна действовать на АТФ внутреннего содержимого клетки. Эта АПФаза способна расщеплять АТФ омывающей клетку наружной среды, притом с весьма большой скоростью. Для такого фермента, локализованного на поверхности клетки и действие которого направлено лишь на вещества окружающей среды, мы предлагаем обозначение «э к т о-фермент». В данном случае мы говорим об э к т о-аденозинполифосфатазе (экто-АПФазе). Экто-ферменты следует резко отличать от экзо-ферментов — таких, которые выделяются клеткой в окружающую среду. Поверхностно-локализованную АПФазу обнаружили в клетках асцитической раковой опухоли венгерские исследователи ([3]).

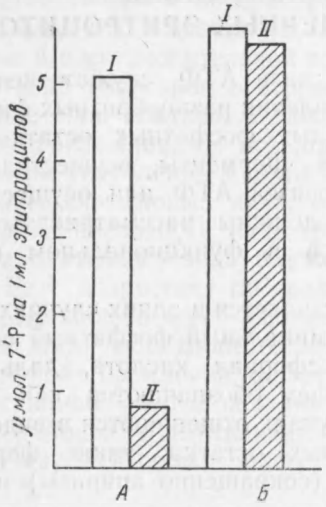


Рис. 1. Расщепление суспензией эритроцитов добавленной АТФ и сохранность ихсобственной АТФ. *А* — суспензионная жидкость, *Б* — эритроциты. *I* — инкубация 0 мин., *II* — инкубация 30 мин.

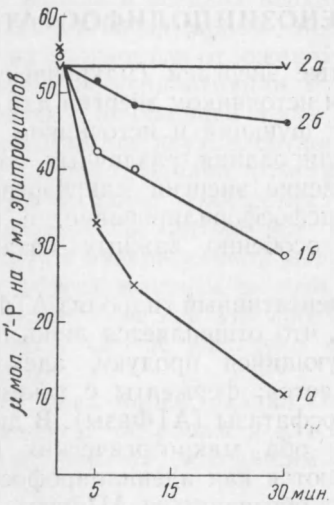


Рис. 2. Расщепление АТФ эритроцитами голубя (*1*) и кролика (*2*) и их гемолизатами. *а* — эритроциты, *б* — гемолизаты

Опыты проводились на эритроцитах голубя, полученных центрифугированием дефибринированной крови. Суспензия отмытых эритроцитов в изотоническом растворе поваренной соли инкубировалась при 37° с раствором натриевой соли АТФ. По истечении времени инкубации эритроциты отделялись центрифугированием, к отстою добавлялся равный объем 10% трихлоруксусной кислоты. По изменению орто-Р и 7′-Р в опытной пробе по сравнению с контрольной судили о распаде АТФ. Об изменении содержания собственной АТФ в эритроцитах судили по изменению орто-Р и 7′-Р в трихлоруксусном фильтрате, полученном из эритроцитов. Гемолизаты получали замораживанием суспензии эритроцитов в смеси спирта и сухого льда.

Рис. 1 показывает, что из 5,1 μM лабильного фосфора АТФ, добавленных к эритроцитам извне, за 30 мин. инкубации расщепилось 4,3 μM Р (все расчеты даются на 1 мл кровяных клеток). За это же время содержание АТФ в самих эритроцитах практически не изменилось.

В работах последнего времени Штрауба и сотр. ([4, 5]) обстоятельно обследованы условия распада АТФ под действием ферментов безъядерных эритроцитов млекопитающих. Здесь венгерскими авторами найдены совершенно иные соотношения, нежели те, которые нами обнаружены у ядерных, аэробных кровяных клеток птиц. По данным Штрауба, которые мы могли полностью подтвердить в наших опытах, неповрежденные безъядерные эритроциты никакой направленной в окружающую среду

АПФазной активностью не обладают и приобретают способность расщеплять АТФ, добавленную извне, только после гемолиза. На рис. 2 можно видеть полное отсутствие АПФазной активности у эритроцитов кролика и высокую АПФазную активность эритроцитов голубя.

Гемолизирование вызывает у этих двух видов эритроцитов противоположный эффект: у эритроцитов кролика после гемолиза проявляется способность действовать на прибавленную АТФ, а у эритроцитов голубя гемолиз снижает присущую неповрежденным клеткам экто-АПФазную активность. Причина снижения экто-АПФазной активности при гемолизе пока остается неясной. Это снижение составляет около 50%.

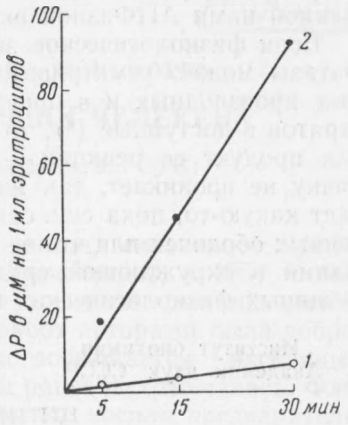


Рис. 3. Активность АПФаз ядерных эритроцитов. *1*—эндо-АПФаза, *2*— экто-АПФаза

Интересно было сравнить величину активности экто-АПФазы с активностью эндо-АПФазы, т. е. фермента, обусловливающего распад АТФ, содержащейся в самом эритроците. При обычных условиях действие этого фермента не улавливается, так как вызываемый им гидролиз АТФ полностью компенсируется непрерывно идущим в аэробных условиях ресинтезом АТФ. Но если прекратить ресинтез, выключив дыхание клеток (удалением кислорода и выдерживанием в анаэробных условиях или путем отравления цианидом), то вызываемый эндо-АПФазой распад поддается прямому определению. Оказалось, что при полном угнетении дыхания цианидом отщепление фосфата из АТФ внутри эритроцита за счет действия эндо-АПФазы, составляет около 1 М Р/мл клеток за 5 мин. За такой же срок экто-фосфатаза из добавленной АТФ отщепляет около 18 μM Р/мл клеток. Следовательно, активность экто-АПФазы по крайней мере на целый порядок выше, чем активность фермента, находящегося внутри эритроцита (см. рис. 3). Можно сказать, что из общего количества АПФазной активности ядерного эритроцита 90—95% приходится на экто-фермент, а на долю эндо-АПФазы приходится всего $^1/_{10}$—$^1/_{20}$ общего количества.

Экто-АПФаза отщепляет от АТФ оба лабильных фосфорных остатка, притом с практически одинаковой скоростью. В отличие от того, что было найдено Штраубом и сотр. на безъядерных эритроцитах, мы не видели сколько-нибудь интенсивного расщепления адениловой кислоты. Экто-АПФаза сравнительно термостабильна — выдерживание суспензии эритроцитов при 50° в течение 20 мин. практически не влияет на ее активность. Экто-АПФаза ядерных эритроцитов, подобно АТФазе электрического органа Torpedo ([6]) и АПФазе безъядерных эритроцитов ([4]), активируется магнием и угнетается кальцием. Активность экто-АПФазы тормозится флуоридом при достаточно высоких концентрациях ($1 \cdot 10^{-2}$ *М* угнетает на 30—40%). Моноиодуксусная кислота до концентрации 0,01 *М* практически не оказывает влияния на активность фермента α-2,4-динитрофенол в концентрации 0,001 *М* незначительно угнетает, в более низких концентрациях — немного активирует фермент.

Наличие экто-АПФазы, локализованной на поверхности клетки, с действием, направленным в окружающую среду, представляет собой несомненно весьма интересный факт. Он ставит нас перед вопросом о возможной биологической роли этого фермента. В настоящее время еще не представляется возможным дать ответ на этот вопрос. Но необходимо отметить, что это далеко не единственный случай подобной локализации фермента. Впервые подобного рода явление было обнаружено Манном на сперматозоидах ([7]). Работами Ротштейн и Мейер ([8]) была детально

изучена способность дрожжевых клеток расщеплять находящиеся в окружающей среде фосфорные производные; в сильно кислой среде (pH 3,6) интактная дрожжевая клетка оказалась способной расщеплять также АТФ. Далее, уже упоминалось сообщение о наличии АПФазной активности у асцитических раковых клеток ([3]). Интересно отметить, что АПФазная активность раковых клеток, весьма значительная по сравнению с активностью ранее изученных объектов, почти в 2 раза меньше обнаруженной нами АПФазной активности ядерных эритроцитов.

Если физиологическое значение поверхностной неспецифической фосфатазы можно усматривать в дефосфорилировании различных фосфорных производных и в превращении их из недоступных для клетки субстратов в доступные ([8]), то роль АПФазы в этом состоять не может, так как продукт ее реакции — адениловая кислота — через клеточную оболочку не проникает, так же как АТФ. Возможно, что экто-АПФаза играет какую-то, пока еще совершенно неясную роль в проницаемости клеточных оболочек или что ее действие направлено на регулирование содержания в окружающей среде компонентов адениловой системы, весьма активных физиологических веществ.

Институт биохимии
Академии наук СССР

Поступило
4 I 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] В. А. Энгельгардт, Biochem. Zs., **227**, No. 1—3, 16 (1930). [2] В. А. Энгельгардт, Klin. Wochenschr., **9**, No. 33, 1550 (1930). [3] G. Acs, W. Ostrowski, F. B. Straub, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., **6**, No. 2—3, 261 (1954). [4] T. Garzó, A. Ullmann, F. B. Straub, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., **3**, No. 3—4, 513 (1952). [4] M. Székely, S. Mányai, F. B. Straub, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 4, No. 1—2, 31 (1953). [6] G. D. Greville, H. Lehmann, Nature, **152**, No. 1, 81 (1943). [7] T. Mann, Biochem. J., **39**, No. 5, 451 (1945). [8] A. Rothstein, R. Meier, J. Cell. Comp. Physiol., **34**, No. 1, 97 (1949).