

Е. Н. МАРКАРОВА, С. С. БАСЛАВСКАЯ

**СВЯЗЬ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА ПОЛИФОСФАТОВ
С ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ В КЛЕТКАХ
SCENEDESMUS OBLIQUUS (TURPIN) KÜTZING**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 18 IX 1969)

У автотрофных организмов связь синтеза полифосфатов с энергодающими процессами, в частности с дыханием, изучена еще недостаточно.

Результаты работ ряда авторов, использовавших такие ингибиторы окислительного фосфорилирования, как 2,4-динитрофенол (ДНФ), KCN, моноподуксусная кислота (МИУ), не согласуются друг с другом. Так, некоторыми исследователями у водорослей обнаружена высокая степень подавления новообразования полифосфатов в темноте в присутствии ДНФ и KCN и таким путем показана зависимость этого процесса от фосфорилирования в цепи транспорта электронов (¹⁻³). В других работах образование этих соединений в большей степени подавлялось МИУ, чем ДНФ (⁴), что говорит о большем значении для биосинтеза полифосфатов в данных условиях фосфорилирования в процессе гликолиза, чем в цепи транспорта электронов.

Дыхание водорослей в зависимости от условий их культивирования, возраста клеток, характера субстрата может осуществляться разными путями (⁵⁻⁷). При этом энергетическая эффективность процесса в целом и отдельных его этапов может быть различна. Очевидно, и синтез полифосфатов может быть связан с разными дыхательными системами.

Целью настоящей работы было изучение связи биосинтеза полифосфатов с фосфорилированием в процессе эндогенного дыхания водорослей (дыхания за счет внутриклеточного субстрата). Для этой цели использовали ДНФ в разбавляющей концентрации, ингибирующей образование АТФ в цепи транспорта электронов, и МИУ в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М, которая, ингибируя активность дегидрогеназы трифосфоглицеринового альдегида и подавляя в связи с этим дыхание на начальном этапе, исключает и фосфорилирование субстратного типа и фосфорилирование в электронтранспортной цепи дыхания. Изучали действие указанных ингибиторов на включение фосфора, меченного радиоизотопом P^{32} , в разные фракции полифосфатов. В специальной серии опытов расчленили действие ингибитора на поглощение фосфора и на процесс биосинтеза полифосфатов.

Работу проводили со стерильной альгологически чистой культурой *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing. Водоросли культивировали так же, как и в ранее проводившихся работах (⁸). Для опытов использовали культуру, состоящую по преимуществу из клеток в фазе роста. В этот период в клетке активно идет процесс синтеза полифосфатов, среди которых преобладают кислотонерастворимые формы (⁸), а дыхание, как показали наши определения, осуществляется в основном гликолитическим путем. Для получения такой культуры взвесь водорослей после выращивания в течение 25—30 дней на питательном растворе переносили на свежую питательную смесь без фосфора и выдерживали ее на этом растворе 2 дня в нормальных условиях освещения и 1 день в темноте. В этих условиях культура делилась и к концу 3 суток состояла в основном из автоспор. Эту суспензию молодых клеток освещали в течение двух-трех час., центрифугировали и использо-

вали для опытов, перенося на свежий питательный раствор без фосфора. Радиоактивный изотоп P^{32} вносили в питательный раствор в смеси с обычным фосфором в форме $NaH_2P^{32}O_4$. Удельная активность раствора была около 0,022 μC , а концентрация P^{32} 5,7 мг/л.

Дробное фракционирование полифосфатов проводили по модифицированному методу Лаугена и Лисса (9, 8).

Взвесь водорослей после экспозиции на растворе с P^{32} отмывали от изотопа питательным раствором без фосфора (рН 5,5). Из отцентрифугированного свежего осадка водорослей извлекали три фракции полифосфатов: кислоторастворимую (10 и 5% ТХУ), щелочерастворимую (NaOH, рН 12) и фракцию, экстрагируемую горячей хлорной кислотой.

В каждой фракции определяли радиоактивность разных форм фосфора на установке Б-2, используя торповую трубку Си-2Б, и сумму фосфора P^{31} и P^{32} . Активность выражали в импульсах в минуту на 1 млрд клеток. Рассчитывали удельную активность в импульсах в минуту на 1 μg Р.

Ортофосфат во всех фракциях определяли методом Беренблума и Чайна в модификации Вейль-Малербе и Грина (10).

Для изучения закономерностей включения фосфора в кислотонерастворимые полифосфаты, с которых начинается синтез этих соединений в клетке, были проведены две серии опытов. В I серии изучали включение P^{32} в разные фракции при длительной экспозиции (60—90 мин.); во II серии — в течение 20 мин. Затем растения отмывали от изотопа и переносили на свежий питательный раствор без фосфора. Изучали перераспределение включенного радиоизотопа по фракциям за 60—90 мин.

О синтезе полифосфатов из экзогенного фосфора судили по включению P^{32} в разные фракции этих соединений. Интенсивность синтеза характеризовали в опытах I серии активностью этих соединений и их удельной активностью, а в опытах II серии — изменением этих показателей после того, как предварительно меченную P^{32} культуру переносили на раствор без фосфора.

В I серии опытов в клетках *Scenedesmus obliquus* в темноте происходило значительное новообразование высокополимерных полифосфатов. От 14 до 40% от общего P^{32} , поглощенного за 60—90 мин. экспозиции, обнаруживалось во фракциях этих соединений.

Результаты опытов II серии показали, что на синтез соединений кислотонерастворимой фракции может использоваться фосфор кислоторастворимых соединений, так как, когда меченная P^{32} культура переносилась на среду без фосфора, происходило уменьшение активности соединений кислотонерастворимой фракции (не полифосфатов) при возрастании таковой соединений кислотонерастворимой фракции, и в частности полифосфатов (табл. 1).

Связь биосинтеза полифосфатов с окислительным фосфорилированием изучали также в двух сериях опытов. В I серии поглощение фосфора происходило в присутствии ДНФ. Изучали действие последнего на включение фосфора в полифосфаты клеток за 1- или 1,5-часовую экспозицию на растворах с P^{32} . Во II серии водоросли, предварительно поглощавшие P^{32} в течение 20 мин. в отсутствие ингибитора, переносили на раствор с ДНФ или МИУ, но без фосфора. Изучали действие ингибитора на перераспределение включенного P^{32} по фракциям.

В I серии опытов (табл. 2) при общем снижении поглощения фосфора водорослями на 42—66% включение его в кислотонерастворимую фракцию тормозилось в меньшей степени (28—55%), чем в кислотонерастворимые полифосфаты (84—100%). Величины удельной активности менялись в тех же пределах.

Таким образом, проникновение фосфора в клетку снижалось в меньшей степени, чем включение его в полифосфаты. Это дает основание предполагать, что процесс синтеза этих макроорганических полимеров в темноте связан с окислительным фосфорилированием. Но все же при данной поста-

Таблица 1

Изменение активности и удельной активности разных фосфорсодержащих соединений при экспозиции меченой P^{32} культуры на среде без фосфора (% от исходного)

Фракция	Активность			Удельная активность		
	оп. 1	оп. 2	оп. 3	оп. 1	оп. 2	оп. 3
Кислоторастворимые						
$P_{\text{общ}}$	73,0	70,2	73,6	109	89,0	91,0
$P_{\text{орто}}$	62,5	70,0	80,0	85,0	70,0	90,0
$P_{\text{лаб}}$	—	72,1	—	—	82,0	—
$P_{\text{ПФ}}$	—	142,0	—	—	165,0	—
$P_{\text{стаб}}$	94,5	70,5	64,5	121,0	200,0	97,0
Кислотонерастворимые						
$P_{\text{общ}}$	140,0	148,0	207,0	—	165,0	211,0
$P_{\text{ПФ NaOH}}$	151,0	112,0	—	164,0	104,0	—
$P_{\text{ПФ HClO}_4}$	141,0	143,0	—	150,0	184,0	—
$P_{\text{ПФ общ}}$	144,0	121,0	243,0	199,0	140,0	286,0

Таблица 2

Ингибирование в присутствии 2,4-динитрофенола активности разных фосфорсодержащих фракций (% ингибирования)

№ оп.	Кислоторастворимые фракции				Кислотонерастворимые фракции					Общий фосфор
	$P_{\text{орто}}$	$P_{\text{лаб}}$	$P_{\text{стаб}}$	$P_{\text{общ}}$	$P_{\text{ПФ NaOH}}$	$P_{\text{ПФ HClO}_4}$	$P_{\text{ПФ общ}}$	$P_{\text{нукл. н-т}}$	$P_{\text{общ}}$	
1	65,6	26,7	34,0	54,6	—	—	82,5	74,0	—	64,0
2	10,3	—	95,5	28,5	100	100	100	66,0	75,0	42,0
3	42,5	—	31,5	39,5	88,7	95,7	97,5	83,8	85,0	66,0

Таблица 3

Действие ДНФ на включение P^{32} в кислотонерастворимые полифосфаты (имп/мин на 10^9 клеток)

Фракция	Оп. 1			Оп. 2			Оп. 3			Оп. 4		
	исх	-ДНФ	+ДНФ	исх	-ДНФ	+ДНФ	исх	-ДНФ	+ДНФ	исх	-ДНФ	+ДНФ
Полифосфаты NaOH	579	830	445	616	661	588	145	214	100	80	158	36
Полифосфаты $HClO_4$	487	275	128	352	505	193	0	138	46	45	102	22
Кислотонерастворимые ПФ в целом	766	1105	573	968	1166	781	145	352	146	125	260	58

новке опытов снижение включения P^{32} в полифосфаты могло быть следствием торможения поглощения фосфора водорослями в этих условиях.

Во II серии опытов, в которых действие ингибиторов на поглощение исключалось, обнаружено, что в отсутствие ДНФ (у контрольных растений) активность кислотонерастворимых полифосфатов за время экспозиции возрастала, в присутствии же ингибитора такого увеличения активности не было обнаружено (табл. 3).

МИУ в концентрации $5 \cdot 10^{-3} M$ в тех условиях, что и ДНФ, также полностью подавляла переход P^{32} из кислоторастворимой фракции в высокополимерные полифосфаты. Так, если при перенесении меченой P^{32} куль-

туры на раствор без фосфора в контроле активность в расчете на 10^9 клеток возрастала с 845 до 1060 имп/мин, то в присутствии ингибитора она практически не менялась (890 имп/мин).

Таким образом, в темноте у клеток *Sc. obliquus* в фазе роста, когда дыхание осуществляется за счет эндогенного субстрата, новообразование полифосфатов зависит от фосфорилирования в цепи транспорта электронов. Это согласуется с результатами Куля, Овербека, Штиха (¹⁻³) для других водорослей и отличается от характера новообразования полифосфатов в среде с добавлением глюкозы (экзогенного субстрата дыхания), констатированного Кулаевым и Вагабовым (⁴), в работе которых синтез полифосфатов у *Sc. obliquus* был в большей степени связан с фосфорилированием в процессе гликолиза, чем в электротранспортной цепи дыхания.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
15 IX 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Kuhl, In: *Physiology and Biochemistry of Algae*, N. Y., 1962, p. 211.
² J. Overbeck, *Ber. bot. Ges.*, 76, H. 8 (1964). ³ H. Stich, *Zs. Naturforsch.*, 10B, H. 5 (1955). ⁴ И. С. Кулаев, В. М. Вагабов, *Биохимия*, 32, в. 2 (1967). ⁵ M. Gibbs, In: *Physiology and Biochemistry of Algae*, N. Y., 1962, p. 61. ⁶ C. P. Whittingham, *Handb. Pflanzenphys.*, 12, 2 (1960). ⁷ J. Dvořáková-Hladka, *Biologia Plantarum*, 10, № 1 (1968). ⁸ Е. Н. Маркарова, С. С. Баславская, *Фитопол. раст.*, 16, № 4 (1969). ⁹ И. С. Кулаев, М. С. Крицкий, А. Н. Белозерский, *Биохимия*, 25, в. 4 (1960). ¹⁰ H. Weil-Malherbe, R. H. Green, *Biochem. J.*, 49, № 3 (1951).