

Э. П. БЕРС, В. В. ПИНЕВИЧ

О ВЛИЯНИИ СЕРЫ НА РАСТВОРИМЫЙ БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС И НЕКОТОРЫЕ ИЗОФЕРМЕНТЫ *CHLORELLA VULGARIS*

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 21 V 1970)

Условия питания серой оказывают многостороннее влияние на обмен растительного организма. В целом темновой и световой обмен серы у низших водорослей не отличается от метаболизма этого элемента у высших растений (^{1, 2}). В настоящее время установлено значение серусодержащих белков и других соединений в период аутосинтетической интерфазы и митоза. Отмечается их особая роль в построении и функционировании митотического аппарата (^{3, 4}). У низших водорослей отсутствие серы в питательном растворе блокирует деление ядра и цитокinesis (⁵⁻⁸). Рядом исследователей были выделены нуклеотидпептиды, содержащие серу и принимающие непосредственное участие в делении клетки (⁹⁻¹⁴). Роль этих соединений, очевидно, сводится к их участию в перестройке молекул ферментов и структурных белков, характерных для определенных периодов клеточных циклов (¹⁵). Однако экспериментальные данные, подтверждающие действие условий серного питания на качественный состав белков и ферментных комплексов у растений, недостаточны (¹⁶).

Цель данного исследования — выяснить изменение растворимого белкового комплекса *Chlorella vulgaris* при отсутствии серы в среде и его реактивацию при возвращении клеток на полный питательный раствор.

Объектом исследования служила *Chlorella vulgaris* Beijer., штамм 157, из коллекции Биологического института Ленинградского университета. Выращивание водорослей осуществлялось в типовых сосудах ИФР на среде Таммья при круглосуточном освещении лампами ЛДЦ-80 (интенсивность суммарной радиации 0,07 кал/см²·мин) и продувании воздухом с 5% содержанием углекислоты (по объему). При исключении серы из питательной среды MgSO₄ заменяли на MgCl₂ при эквивалентном количестве Mg²⁺. Водоросли, выращенные на полном питательном растворе (ППР), снимали на середине линейной фазы роста и использовали для засева в контрольном и опытном (-S) вариантах. В дальнейшем водоросли выращивали в течение 14 суток, после чего часть суспензии обоих вариантов

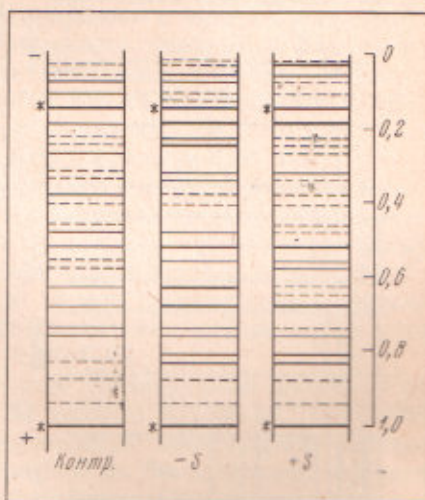


Рис. 1. Электрофореграммы суммарного растворимого белкового комплекса. Контр. — полный питательный раствор, (-S) — питательный раствор без серы, (+S) — возвращение на ППР. Звездочкой отмечен белок, связанный с хлорофиллом

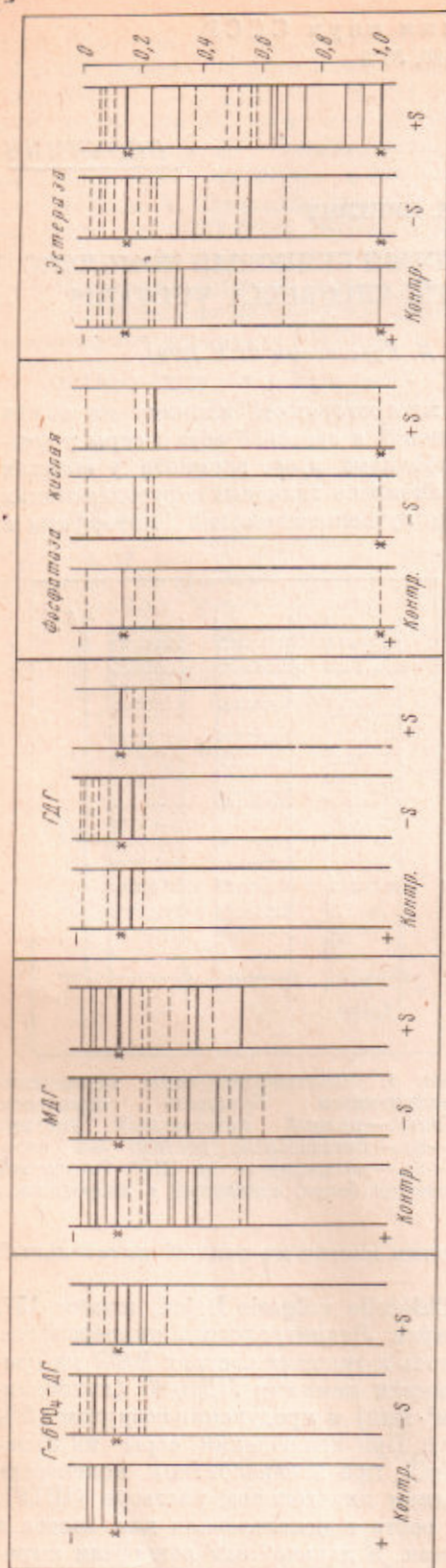


Рис. 2. Зимограммы суммарного белка. Обозначения те же, что на рис. 1

центрифугировали, промывали ППР и пересевали на свежую среду, содержащую серу. Анализ суммарного белкового комплекса проводили в исходном материале, через 14 суток голодания по сере и через 3 дня после реактивации на ППР. Разрушение водорослей, получение белка и его разделение дисковым электрофорезом в геле полиакриламида с последующим выявлением ферментов осуществлялось по принятому нами методу (¹⁷, ¹⁸). Исследовали глюкозо-6РФ_з-дегидрогеназу (Д-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.49), малатдегидрогеназу (*L*-малат, НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.37), глутаматдегидрогеназу (*L*-глутамат: НАД(Ф)-оксидоредуктаза, КФ 1.4.1.3), фосфатазу кислую (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, КФ 3.1.3.2) и неспецифические эстеразы.

Установленное на основании предварительных экспериментов время пребывания водорослей на среде без серы позволило выявить четкую картину морфологических и субстанциональных изменений. При этом в клетках не возникало необратимых патологических процессов. В отсутствие серы клетки достигали гигантских размеров, обнаруживали картины эндорепродукции и приобретали желтую окраску. Аналогичные явления отмечали и другие исследователи (⁸, ¹⁹).

Исключение серы из питательного раствора не вызвало изменения степени гетерогенности суммарного белкового комплекса (рис. 1). Вместе с тем, наблюдалось выпадение фракций *R*, 0,27; 0,46 и 0,58 и новообразование полос 0,02; 0,13; 0,81. При реактивации через 72 часа степень гетерогенности белка увеличилась с 26 до 29 фракций. Происходило восстановление всех полос, исчезнувших за время голодания (0,27; 0,46; 0,58), при сохране-

нии фракций 0,02 и 0,81, появившихся на варианте (-S). В процессе восстановления имело место образование дополнительной полосы 0,65.

Изучение изозимных спектров показало, что в отсутствие серы наблюдалось увеличение числа молекулярных форм исследованных ферментов за исключением малатдегидрогеназы (МДГ) и кислой фосфатазы (рис. 2). Для всех ферментов было характерно появление изоформ на месте неактивных в контроле фракций белка. В варианте (-S) Г-6РО₄-ДГ сохраняла число и подвижность всех изозимов, свойственных контролю, и обнаруживала активность дополнительно во фракциях 0,03; 0,23 и 0,25. Эти же условия вызвали исчезновение изозимов 0,19; 0,41; 0,46 и 0,58 и проявление полос 0,48; 0,52; 0,63 у МДГ. Зимограммы глутаматдегидрогеназы (ГДГ), так же как и Г-6РО₄-ДГ, характеризовались полным сохранением количества и подвижности изоферментов контроля на варианте без серы. Увеличение гетерогенности фермента было обусловлено возникновением новых изоформ с подвижностью 0,02; 0,06 и 0,08. Дефицит серы не вызвал изменения числа форм кислой фосфатазы, так как падение полосы 0,15 компенсировалось проявлением фракции 0,23. Спектр неспецифических эстераз в случае отсутствия серы в питательном растворе отличается от контроля интенсивности новообразованием активных зон с подвижностью 0,19; 0,38; 0,41 и 0,56.

Возвращение клеток на ППР на свету привело к быстрому возобновлению нормальных темпов деления и образования пигментов. Реактивация на белковом уровне выражалась в восстановлении изоформ ферментов, утраченных при голодании и исчезновении тех из них, которые возникли на варианте (-S). Так, у МДГ регенерировали полосы 0,19; 0,41; 0,46 и выпали 0,48; 0,52; 0,63; у ГДГ не проявились фракции 0,02; 0,06; 0,08, а у эстеразы 0,19 и 0,41. Вместе с тем, интенсивным темпам деления и роста клеток при возобновлении питания серой соответствовали специфические картины зимограмм. Это наиболее четко проявилось при анализе спектров эстераз. Множественность форм неспецифических эстераз возрастала с 12 в контроле и 15 на варианте без серы до 18 при возвращении к нормальным условиям культивирования за счет проявления активности в основных полосах 0,48; 0,58; 0,63; 0,65; 0,74; 0,88; 0,94.

Результаты наших опытов подтверждают литературные данные о специфичности действия недостатка серы на низшие водоросли. Отсутствие этого элемента в растворе вызывало немедленную приостановку кардиокинеза и цитотомии. Соответствующие процессы не были связаны с протеолизом и увеличением степени дисперсности белка. Они выражались в изменении множественности молекулярных форм ферментов и их электрофоретических характеристик. Сохранение определенного уровня гетерогенности белков, отмеченное нами при исключении серы из питательного раствора, подтверждает предположения⁽¹⁵⁾ об энергетической целесообразности перестройки белковых комплексов, в соответствии с потребностями клетки на определенных этапах ее онтогенеза, по сравнению с их распадом до аминокислот и синтезом *de novo*. Отмеченные в нашей работе электрофоретические картины, очевидно, явились следствием конформационных изменений белковых молекул, проявляющихся в первую очередь на уровне отдельных изоферментов. Перенесение водорослей на ППР сразу же привело к возобновлению нормального деления клеток и ростовых процессов. Восстановление электрофоретических картин суммарного растворимого белкового комплекса и изоферментов по ряду показателей сопровождалось увеличением их гетерогенности. Окончательная нормализация белкового обмена достигалась на 6 день после перенесения водорослей в нормальные условия культивирования.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. A. Schiff, *Plant Physiol.*, **39**, 176 (1964). ² R. C. Hodson, J. A. Schiff, *Plant Physiol.*, **43**, 563 (1968). ³ Д. Мэзия, Митоз и физиология клеточного деления, ИЛ, 1963. ⁴ Р. Г. Цанев, Г. Г. Марков, Биохимия клеточного деления, М., 1964. ⁵ E. Hase, J. S. Morimura et al., *Arch. Mikrobiol.*, **32**, 87 (1958). ⁶ E. Hase, S. Mihara, H. Tamiya, *Plant Cell Physiol.*, **1**, 131 (1960). ⁷ E. Hase, S. Mihara, H. Tamiya, *Plant Cell Physiol.*, **2**, 9 (1961). ⁸ E. Hase, Cell Division, in: *Physiology and Biochemistry of Algae*, 1962, p. 617. ⁹ E. Hase, S. Mihara et al., *Biochim. et biophys. acta*, **32**, 298 (1959). ¹⁰ E. Hase, S. Mihara H. Tamiya, *Biochim. et biophys. acta*, **39**, 381 (1960). ¹¹ R. Johnson, R. Schmidt, *Biochim. et biophys. acta*, **74**, 428 (1963). ¹² D. Vrana, Z. Fencel, *Folia microbiol.*, **9**, 156 (1964). ¹³ T. K. Virupaksha, A. Shrift, *Biochim. et biophys. acta*, **80**, 587 (1964). ¹⁴ С. В. Горюнова, М. А. Пушева, Л. М. Герасименко, ДАН, **190**, 455 (1969). ¹⁵ R. R. Schmidt, in: *Cell Synchrony*, 1966, p. 189. ¹⁶ P. Hanower, J. Brzozowska, *Agrochimica*, **13**, 129 (1968). ¹⁷ Э. П. Берс, В. В. Пиневич, Вестн. Ленингр. ун-в., сер. биол., **15**, 114 (1969). ¹⁸ В. В. Пиневич, Э. П. Берс, Вестн. Ленингр. ун-в., сер. биол., **15**, 121 (1969). ¹⁹ G. Mandels, *Plant Physiol.*, **18**, 449 (1943).