

В. М. ИВАНЧЕНКО

## О КООПЕРАТИВНЫХ СВОЙСТВАХ ХЛОРОПЛАСТОВ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 27 X 1971)

С. В. Конев с соавторами (<sup>1</sup>), развивая выдвинутую им ранее (<sup>2</sup>) гипотезу кооперативного механизма регуляции в клетке, приводят ряд убедительных аргументов в пользу возможности существования такого механизма в ряде клеточных органелл, в том числе и в хлоропластах. Однако прямым экспериментом на хлоропластах, насколько нам известно, это еще не было подтверждено.

Авторы считают, что для однозначного решения вопроса о том, является ли клетка и ее органеллы (хлоропласты) сверхполимерными системами, которые способны к авторегуляции своих функций путем кооперативных конформационных переходов, затрагивающих большую часть их объема, необходимо зарегистрировать в опытах следующее.

1. Два или более дискретных структурных состояния всех или большинства белков клетки (органеллы). 2. Кооперативную (S-образную) форму переходных кривых между этими состояниями (кривые типа эффект — доза). 3. Скачкообразное изменение многих биологических функций вслед за структурным переходом.

Исследуя влияние на структуру и важнейшие функции хлоропластов неспецифического мембран-активного препарата — аминофиллина (АФ), мы получили данные, указывающие на возможность кооперативного механизма регуляции структуры и функций хлоропластов.

Хлоропласты выделялись из 8—12 дневных растений гороха, выращенных под люминистатом. Методика выделения хлоропластов, изучения реакции Хилла с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (2,6-ДХФИФ) описана нами в работе (<sup>3</sup>). Методика изучения объемных изменений хлоропластов по изменению оптической плотности (*D*) суспензии описана в работе (<sup>4</sup>).

Прежде всего нами было обнаружено скачкообразное изменение функциональной активности хлоропластов с увеличением концентрации АФ в реакционной среде от  $1,25 \cdot 10^{-2}$  до  $4 \cdot 10^{-2}$  мол/л (рис. 1). Скорость реакции Хилла с ДХФИФ, будучи почти нечувствительной к увеличению концентрации АФ от  $10^{-5}$  до  $1,25 \cdot 10^{-2}$  мол/л, резко падала практически до нуля в весьма узком интервале более высоких концентраций АФ. Аналогичное скачкообразное изменение скорости реакции Хилла с феррицианидом, фотофосфорилирования — с флавиномононуклеотидом (ФМН) и феназинметасульфатом (ФМС), имевшее место в области тех же концентраций АФ и рассмотренное нами ранее (<sup>5</sup>, <sup>6</sup>) с точки зрения влияния структуры хлоропластов на скорость электронного потока на разных участках фотосинтетической электронтранспортной цепи, свидетельствует об исчерпывающе полном выполнении третьего условия кооперативности хлоропластов.

Такая картина влияния АФ на функции хлоропластов заставила нас более тщательно, чем это было сделано ранее (<sup>4</sup>), изучить влияние этого препарата на объем хлоропластов. Оказалось, что объем хлоропластов (рис. 2) в области концентраций АФ  $1,25 \cdot 10^{-2}$  —  $4 \cdot 10^{-2}$  мол/л также изменяется по явно выраженной S-образной кривой. Переход хлоропластов из одного структурного состояния, характеризующегося большим объемом (изменение плотности суспензии обратно изменению объема хлоропласт-

тов) в другое, характеризующееся меньшим их объемом, происходит в столь узком интервале концентраций АФ (концентрация полуперехода  $\sim 2 \cdot 10^{-2}$  мол/л), что он изображается почти ступенчатой кривой.

S-образный ход кривой изменения объема хлоропластов с увеличением концентрации АФ в сущности можно считать свидетельством выполнения первых двух условий, позволяющих рассматривать хлоропласт как кооперативную систему.

Несмотря на то что нам пока не удалось зарегистрировать непосредственно структурные переходы белков мембран хлоропластов (обычно они регистрируются по изменению степени поляризации и положения максимума спектра флуоресценции триптофанилов белков, однако во много

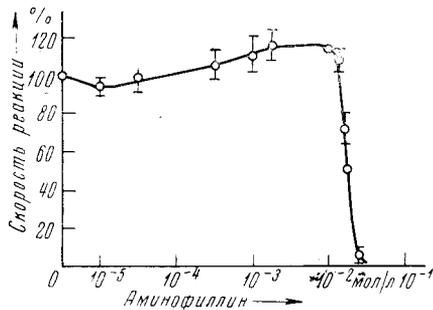


Рис. 1

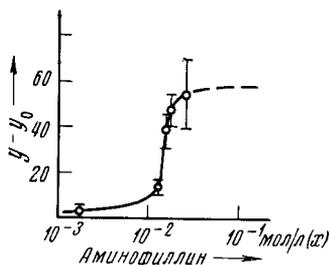


Рис. 2

Рис. 1. Относительная скорость реакции Хилла с ДХФИФ при различных концентрациях АФ

Рис. 2. Изменение оптической плотности суспензии хлоропластов с увеличением концентрации АФ

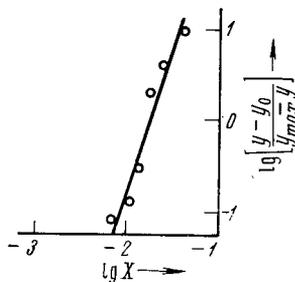


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость плотности суспензии хлоропластов от концентрации АФ

раз более сильная флуоресценция пигментов хлоропластов, чем белков, не позволяет это сделать в нашем случае), с большой степенью уверенности можно считать, что изменение объема хлоропластов под действием АФ является следствием структурных перестроек внутренних мембран, обусловленных изменением конформации протеинов. На это нами указывалось ранее (7).

Для оценки степени кооперативности системы по кривым эффект — доза применяют различные модификации уравнения Хилла (цит. по (8)). Мы воспользовались этим уравнением в модификации Шанже и Подлеского (8), в общем виде оно выглядит следующим образом:

$$\lg \frac{Y - Y_0}{Y_{\max} - Y} = n \lg [X],$$

где  $Y_0$  — исходное значение функции (объема хлоропластов) до воздействия на объект эффектором (100%);  $Y$  — значение функции при различных концентрациях эффектора ( $X$ );  $Y_{\max}$  — максимальное значение функции, полученное линейной экстраполяцией и равное в нашем случае 160%.

В этом уравнении величина константы Хилла ( $n$ ) является мерой кооперативности системы. Если  $n$  численно больше единицы, можно говорить о существовании кооперативных свойств у системы. При  $n = 1$  кооперативность отсутствует, и кривая эффект — доза превращается из S-образной в гиперболу.

С помощью указанного уравнения мы исследовали S-образную часть кривой, описывающей изменение объема хлоропластов с увеличением концентрации АФ. Как видно из рис. 3, в логарифмическом представлении наша кривая эффект — доза неплохо линеаризуется. Расчет константы  $n$  из отношения

$$d \lg \left[ \frac{Y - Y_0}{Y_{\max} - Y} \right] / d \lg [X]$$

показывает, что она близка к 3. Такая величина  $n$  говорит о весьма высокой кооперативности мембран хлоропластов и означает, что с одной молекулой рецепторного белка, инициирующего конформационный переход

Таблица 1

Степень обратимости структурного и функционального состояния хлоропластов, обусловленного воздействием высокой концентрации АФ

Варианты	Объем хлоропластов (% D)	Реакция Хилла с ДХФИФ, %
Контроль, АФ отсутствует	100	100
Хлоропласты, обработанные АФ в концентрации $6 \cdot 10^{-2} M$	150,3	—
$2 \cdot 10^{-2} M$	—	59,3
Хлоропласты, перенесенные в среду с низкой концентрацией АФ $7 \cdot 10^{-5} M$	119,6	—
$3 \cdot 10^{-4} M$	—	85,8

структурных протеннов всех мембран хлоропластов, связываются 3 молекулы эффектора (в случае регуляции процесса по не кооперативному механизму с одной молекулой рецептора связывается не более одной молекулы эффектора).

Чтобы убедиться, что структурный переход хлоропластов под действием АФ не связан с их гибелью, а лишь характеризуется потерей их функциональной активности (с физиологической точки зрения, наибольший интерес представляют именно такие конформационные переходы мембран), мы проверили степень обратимости его. Оказалось, что перенесение хлоропластов из среды, содержащей высокую концентрацию АФ, в среду с низкой концентрацией АФ приводит их объем и функцию к уровню, близкому к исходному (табл. 1).

Таким образом, изложенные выше данные позволяют, как нам кажется, утверждать, что хлоропласты способны к структурной регуляции функциональной активности по кооперативному механизму, т. е. их мембраны могут находиться по крайней мере в двух структурных состояниях, одно из которых характеризуется потерей хлоропластами функциональной активности.

В заключение приношу благодарность проф. С. В. Коневу за обсуждение изложенных в статье материалов.

Институт экспериментальной ботаники  
Академии наук БССР  
Минск

Поступило  
20 X 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> С. В. Конев, С. Л. Аксенцев, Е. А. Черницкий. Кооперативные переходы белков в клетке. Минск, 1970. <sup>2</sup> С. В. Конев, Электронно-возбужденные состояния биополимеров, Минск, 1965. <sup>3</sup> В. М. Иванченко, Т. А. Урбанович и др., Докл. АН БССР, 13, № 10 (1969). <sup>4</sup> В. М. Иванченко, С. С. Кручинина, М. Н. Гончарик, Докл. АН БССР, 15, № 6 (1971). <sup>5</sup> В. М. Иванченко, Т. А. Урбанович и др., Докл. АН БССР, 15, № 7 (1971). <sup>6</sup> В. М. Иванченко, М. И. Маршкова и др., Докл. АН БССР, 15, № 8 (1971). <sup>7</sup> В. М. Иванченко, С. С. Кручинина, Физиол. раст., 16, в. 5 (1969). <sup>8</sup> J. P. Changeux, T. R. Podleski, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 59, № 3 (1968).