

М. И. МОЛЧАНОВ, В. М. ТРУСОВА

ВКЛЮЧЕНИЕ ^{32}P В ФОСФОЛИПИДЫ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ ХЛОРОПЛАСТОВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 5 XI 1974)

В пропластидах кукурузы наряду с фосфатидилглицерином, лецитином, фосфатидилинозитом и кардиолипином была обнаружена фосфатидная кислота (¹). Роль фосфатидной кислоты в биосинтезе некоторых фосфолипидов в животной клетке общеизвестна (²). Предстояло выяснить, может ли фосфатидная кислота растительной клетки служить предшественником для биосинтеза фосфатидилглицерина — основного фосфолипида тилакоидов ламеллярной системы хлоропластов. Для этого были проведены опыты по включению ^{32}P в фосфолипиды дифференцирующихся хлоропластов кукурузы *in vivo*.

Объектом исследования служили 4-дневные проростки кукурузы сортов «Молдаванка оранжевая» и «Буковинская-3». Семена кукурузы после 24 час. набухания в воде при 37° помещали в кюветы с фильтровальной бумагой, смоченной водопроводной водой. Для включения ^{32}P проростки переносили в минеральную среду Кроне в модификации Тевини (³). Один литр среды содержал 250 мг NH_4NO_3 , 500 мг $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12,5 мг K_2SO_4 , 12,5 мг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,075 мг H_3BO_3 , 0,065 мг ZnSO_4 , 0,065 мг MnSO_4 , 0,038 мг Na_2MoO_4 , 0,38 мг NaCl . Кроме того, было добавлено 0,6 мл раствора, составленного из 0,5% FeSO_4 и 0,4% винной кислоты. В 200 мл среды Кроне вносили 5 мС $\text{K}_2^{32}\text{PO}_4$ (24,3 мС/ммоль). Пластиды различных стадий зеленения выделяли из первично этиолированных проростков, которые освещали лампами ЛДЦ-30 (4500 лк) в течение 1, 5, 6 и 72 час. при 12-часовом фотопериоде, сформированные хлоропласты — из зеленых проростков (⁴). Для получения препаратов мембран пластиды разрушали осмотически в среде, содержащей 0,02 М трис-НСl буфер pH 7,6 и 0,001 М ЭДТА (⁴). Суспензию освобождали от неразрушенных частиц двухкратным центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость, содержащую мембранную систему пластид, центрифугировали в течение часа при 40 000 g (центрифуга ЦВР-1). Все операции проводили при 2—4°. Суммарная фракция мембран, полученная указанным выше способом, состояла в случае хлоропластов из ламеллярной системы, в случае пропластид — из пластидных «центров», а при разных стадиях развития пластид — из смеси обоих. Кроме того, в эти фракции попадала и внешняя мембрана пластид (⁵). Метод получения фракции фосфолипидов описан ранее (⁶). Разделение фосфолипидов проводили с помощью одномерной (табл. 1, опыт 1) и двухмерной хроматографии в тонком слое на пластинках с силикагелем (Kieselgel G по Шталоу, фирма Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода (65:25:4, первое направление) и хлороформ — метанол — аммиак (14:6:1, второе направление) (⁷). Фосфолипиды обнаруживали йодом. Содержание фосфора фосфолипидов в пробах определяли по методу (⁸), глицерина — по методу (⁹), радиоактивность образцов — в жидкостном спинтилляционном счетчике «Интертехник СЛ-30».

Количество фосфолипидов в препаратах мембран зависит от стадии дифференциации хлоропластов. Оно максимально в пропластидах и ми-

нимально в сформированных хлоропластах (соответственно 7,2 и 2,5 мкг фосфора фосфолипидов на 1 мг мембранного белка; даны средние величины для трех препаратов мембран из пропластид и хлоропластов).

В препаратах проламеллярной и ламеллярной систем пластид главную массу фосфолипидов составляют кислые фосфолипиды (табл. 1). Их содержание заметно изменяется при формировании ламеллярной системы

Таблица 1

Содержание фосфора фосфолипидов в различных препаратах мембран (в % от суммы фосфора фосфолипидов)

Источник получения мембран	№ опыта	Фосфатидная кислота и кардиолипин	Фосфатидилглицерин	Лецитин	Фосфатидилинозит
Пропластиды	1	65,0	20,0	12,9	2,1
	2	55,6	25,0	7,2	12,1
Хлоропласты (24 часа освещения проростков)	1	43,2	36,2	13,9	6,6
	2	46,2	35,8	11,0	6,9
Сформированные хлоропласты	1	26,1	42,0	14,3	17,6
	2	20,8	53,5	15,7	9,7

Таблица 2

Радиоактивность фосфолипидов (имп/мин) пропластид и хлоропластов

Фосфолипиды	Величина R_f		Пропластиды	Хлоропласты
	первое направление	второе направление		
Фосфатидная кислота	*	0,05	11 510 (3,3)	496 (0,4)
Кардиолипин	0,79	0,39	30 404 (8,7)	11 302 (7,3)
Фосфатидилглицерин	0,43	0,37	165 377 (47,6)	68 383 (44,1)
Лецитин	0,22	0,24	95 148 (27,4)	55 141 (35,6)
Фосфатидилинозит	6,19	0,10	45 213 (13,0)	19 583 (12,6)

Примечание. Здесь и в табл. 3 величины в скобках — радиоактивность индивидуальных фракций фосфолипидов, выраженная в % от общей радиоактивности суммы фосфолипидов.

* Вытянутое пятно, перекрывающее зоны дигалактозилдиглицерида, кардиолипина и моногалактозилдиглицерида.

хлоропластов. При этом увеличивается содержание фосфатидилглицерина — наиболее характерного и стабильного фосфолипида тилакоидов хлоропластов, и уменьшается сумма кардиолипина и фосфатидной кислоты. Последняя была идентифицирована нами не только хроматографически, но и по продукту ее деацилирования (α -глицерофосфат), а также по молярным соотношениям входящих в ее состав глицерина и фосфора (1,00:1,09).

При включении ^{32}P в фосфолипиды пропластид и сформированных хлоропластов *in vivo* в течение 96 час. основная радиоактивность была сосредоточена в пятнах фосфатидилглицерина, лецитина, фосфатидилинозита и кардиолипина. Радиоактивность фосфатидной кислоты, особенно в сформированных хлоропластах, была сравнительно небольшой (табл. 2).

При перенесении 4-дневных этиолированных проростков на минеральную среду с ^{32}P и последующем их выращивании на свету в течение раз-

личных периодов времени удельная радиоактивность суммы фосфолипидов заметно увеличивалась (табл. 3). Обращает на себя внимание, что через 1,5 часа инкубации проростков с меткой ^{32}P лишь фосфатидная кислота и фосфатидилглицерин имели высокую удельную радиоактивность. Удельная радиоактивность лецитина и фосфатидилинозита заметно возрастала лишь в последующие периоды времени. Характерно, что по мере дифференцировки хлоропластов уменьшалась общая радиоактивность фосфатидной кислоты, тогда как радиоактивность остальных индивидуальных фракций фосфолипидов либо возрастала (лецитин, кардиолипин, фосфатидилинозит), либо мало изменялась, но сохранялась на высоком уровне

Таблица 3

Удельная радиоактивность фосфолипидов (имп/мин на 1 мг липидного фосфора) дифференцирующихся хлоропластов

Фосфолипиды	Время инкубации, час.		
	1,5	6	72
Сумма	98 000	1 091 311	5 850 500
Фосфатидная кислота	166 071 (27,1)	16 003 334 (17,4)	18 605 000 (4,6)
Кардиолипин	84 375 (7,9)	388 571 (10,8)	1 851 765 (11,9)
Фосфатидилглицерин	145 438 (48,4)	1 545 058 (47,6)	7 663 414 (39,5)
Лецитин	48 627 (14,5)	738 353 (22,7)	9 969 090 (41,4)
Фосфатидилинозит	9 487 (2,1)	1 360 000 (1,5)	2 258 889 (2,6)

Примечание. Радиоактивность при 1,5 час. инкубации была равна 1714, при 6 час. 27614, при 72 час. 79516 имп/мин.

(фосфатидилглицерин). По литературным данным, при включении ^{32}P в фосфолипиды листьев бобов *in vivo* в фосфатидной кислоте через 15 мин. инкубации было сосредоточено 58,2% радиоактивности фракции фосфолипидов, тогда как через 24 часа 5,3% (¹⁰). Аналогичные результаты получили при включении ^{32}P в клетки *Spirodela oligorrhiza*. Через 15 мин. инкубации клеток с меткой первым меченым фосфолипидом оказалась фосфатидная кислота (¹¹). Уместно отметить, что этиопласты *Spirodela* имели большее содержание фосфатидной кислоты, чем хлоропласты.

В растительных тканях известны два основных пути биосинтеза фосфолипидов, в которых принимает участие фосфатидная кислота. С одной стороны, это цепь реакций фосфатидная кислота → диглицерид, диглицерид + ЦДФхолин → фосфатидилхолин + ЦДФ (¹²). С другой стороны — фосфатидная кислота + ЦТФ → ЦДФдиглицерид, ЦДФдиглицерид + глицерофосфат → фосфатидилглицеролфосфат → фосфатидилглицерин + неорганический фосфат (¹³). В процессе дифференциации хлоропластов под воздействием света ^{32}P включается в фосфатидилглицерин значительно быстрее, чем в остальные фосфолипиды. По-видимому, это может говорить о том, что в биосинтезе фосфатидилглицерина в хлоропластах и на разных стадиях их дифференциации имеет место цепь биохимических реакций, включающая в себя активацию фосфатидной кислоты при участии ЦТФ. Сравнение радиоактивностей индивидуальных фракций фосфолипидов из протопластов и сформированных хлоропластов, а также результаты включения ^{32}P в фосфолипиды дифференцирующихся хлоропластов позволяют предполагать, что пути биосинтеза фосфатидилглицерина в названных структурах одинаковы, причем фосфатидилглицерин и его предшественники синтезируются в тех компонентах растительной клетки, где они входят в состав их мембран, т. е. в пластидах, а не переходят в них из других

структур клетки. Последнее предположение подтверждают результаты включения ^{32}P на свету в клетки эвглены, выращенной предварительно в темноте (¹⁴).

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 X 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. И. Молчанов, Биохимия, т. 37, 775 (1972). ² Р. Б. Хесин, Биохимия цитоплазмы, Изд. АН СССР, 1960. ³ M. Tevini, Zs. Pflanzenphysiol., В. 66, 459 (1972). ⁴ A. B. Jacobson, J. Cell. Biol., v. 38, 238 (1968). ⁵ K. Lürssen, Zs. Naturforsch., В. 25, 1113 (1970). ⁶ М. И. Молчанов, В. М. Трусова, А. И. Опарин, ДАН, т. 220, № 4 (1975). ⁷ Э. В. Дятловицкая, Т. И. Торховская, Л. Д. Бергельсон, Биохимия, т. 34, 177 (1969). ⁸ E. Gerlach, B. Deuticke, Biochem. Zs., В. 337, 477 (1963). ⁹ O. Renkonen, Biochim. et biophys. acta, v. 56, 367 (1962). ¹⁰ H. Singh, O. S. Privett, Biochim. et biophys. acta, v. 202, 200 (1970). ¹¹ R. L. Bialeski, Plant Physiol., v. 49, 740 (1972). ¹² D. J. Moore, S. Nyquist, E. Rivera, Plant Physiol., v. 45, 800 (1970). ¹³ S. Sumida, J. B. Mudd, Plant Physiol., v. 45, 719 (1970). ¹⁴ R. Schantz, R. Douce, H. M. Durant, FEBS Letters, v. 20, 157 (1972).