

Е. Б. КИРИЧЕНКО, Л. Д. СМОЛЫГИНА, О. П. СЕРДЮК

**ИЗМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСА ПОЛИПЕПТИДОВ ЛАМЕЛЛ
ПРИ РАЗВИТИИ ПЛАСТИД МЕЗОФИЛЛА И ОБКЛАДКИ
ZEA MAYS L.**

(Представлено академиком А. С. Спириным 25 II 1975)

Развитие представлений о молекулярных основах формирования фотосинтетического аппарата высших растений придало особую актуальность вопросам биогенеза ламелл в процессе превращения этиопластов в хлоропласты. Конечным результатом дифференциации ламелл в пластиде является образование гран. Важнейшую роль в становлении и дифференциации ламеллярной системы выполняют мембранные белки (¹⁻⁴). Исследованиями последних лет установлено, что комплекс ламеллярных белков состоит из 10—16 полипептидов (^{2, 5, 7, 8}), большая часть которых предсуществует в этиопластах (^{3, 7, 8}). Однако в настоящее время нет единого мнения о механизмах формирования комплекса белков фотосинтетических мембран хлоропластов. Согласно представлениям ряда исследователей (⁹⁻¹¹), при зеленении этиолированных растений под действием света в пластидах синтезируются *de novo* ламеллярные белки нового типа. Наряду с этим Дюрантоном и сотрудниками развивается выдвинутая более десяти лет назад гипотеза о том, что этиопласты содержат все или почти все белки, необходимые для образования ламелл и гран (^{12, 13}). В этой связи предполагается, что рост и дифференциация ламелл происходит скорее в результате перестройки имеющихся белковых компонентов, нежели за счет биосинтеза новых ламеллярных белков.

Имеющиеся данные характеризуют в основном комплекс ламеллярных белков хлоропластов *C₃*-растений. Растения с *C₄*-механизмом фотоассимиляции CO₂, к которым относится *Zea mays* L., обладают двумя типами хлоропластов, отличающихся специфическими особенностями ламеллярной организации. В клетках мезофилла локализованы хлоропласты гранального типа, а в клетках обкладки сосудистых пучков — хлоропласты ламеллярного типа. Состав ламеллярных белков хлоропластов *Zea mays* L. изучался Дюрантоном и сотрудниками (^{7, 12, 13}), А. Л. Курсановым и сотрудниками (²), по их исследования выполнены на суммарной фракции фотосинтетических органелл листа. Апдерсон и Левин (¹⁴) сравнили состав полипептидов двух типов хлоропластов *Zea mays* L. Используя метод электрофореза в полиакриламидном геле, авторы показали, что агранальные хлоропласты обкладки содержат в меньшем количестве, чем гранальные, два основных полипептида, образующих, по их мнению, белковый компонент фотосистемы II.

В настоящей работе поставлена задача исследовать особенности комплекса ламеллярных белков пластов мезофилла и обкладки *Zea mays* L. на основных стадиях биогенеза фотосинтетических органелл: этиопласт, пропластида, зрелый хлоропласт. Представлялось важным выяснить, какие изменения происходят в составе ламеллярных белков при дифференциации ламелл пропластов мезофилла, превращающихся в хлоропласты гранального типа, и при становлении мембранной организации пропластов обкладки, превращающихся в хлоропласты ламеллярного типа.

Опыты проводились на растениях *Zea mays* L. (сорт Стерлинг), выращенных методом песчаной культуры. Этиопласты выделялись из растений, выращенных в темноте в течение 7 дней, пропластиды — из растений, освещенных (24 часа) в условиях 12-часового фотопериода, при интенсивности освещения $50\,000\text{ эрг/см}^2\cdot\text{сек}$ и температуре $26\pm 1^\circ$. В темном периоде температура воздуха была $23\pm 1^\circ$. Для выделения хлоропластов использовались 14-дневные растения, выращенные при аналогичном режиме. Для гомогенизации вырезали среднюю часть второго и третьего листьев этиолированных или зеленеющих растений и третьего, считая от верхушки, листа 14-дневных растений. Использовалась среда гомогенизации следующего состава: трис-(гидроксиметил)-аммонетан 6,06 г,

MgCl_2 10,15 г, сорбит 72,88 г в 1 л приготовленного раствора, pH 7,5.

Гомогенизацию проводили с помощью изготовленного в лаборатории прибора при 10 000 об/мин в течение 3 мин. Гомогенат фильтровали, и в фильтре содержались пластиды мезофилла. На фильтре оставались фрагменты тканей и клетки обкладки, которые отличаются повышенной устойчивостью при гомогенизации. Для разрушения оболочек клеток обкладки проводили повторную гомогенизацию при 15 000 об/мин в течение 5 мин. Гомогенат фильтровали и получали суспензию пластид об-

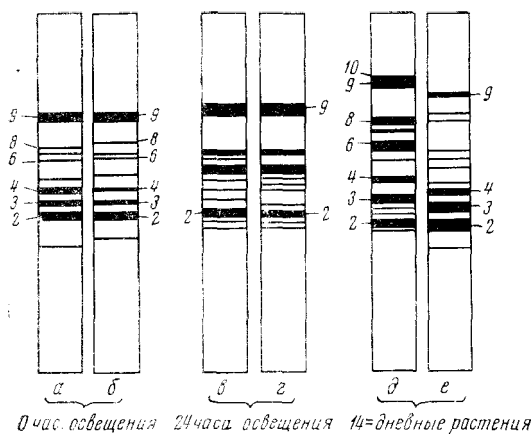


Рис. 1. Электрофореграммы ламеллярных белков пластид мезофилла и обкладки *Zea mays* L. на основных стадиях биогенеза. α, β, γ — мезофилл; δ, ε, ζ — обкладка. 1—10 — белки

кладки. Для получения очищенных фракций интактных пластид проводили ряд центрифугирований.

Для разрушения оболочек пластид и получения фракций субпластидных компонентов органеллы ресуспендировались в среде, содержащей трис и MgCl_2 в той же концентрации. Разрушенные пластиды осаждались центрифугированием при 15 000 об/мин в течение 15 мин. Полученные осадки трехкратно промывались для удаления растворимых белков. Для солубилизации ламеллярных белков фрагменты ламелл обрабатывались в течение 15 мин. раствором, содержащим 2% додецилсульфат натрия и 0,16 M боратный буфер (в соотношении 3:1), pH 8,9. После этого проводилось центрифугирование при 15 000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочная жидкость, содержащая растворенные белки ламелл, использовалась для дальнейшего анализа и разделения белков методом электрофореза в полиакриламидном геле. Были подобраны оптимальные условия проведения электрофореза, что позволяло получить воспроизводимые результаты разделения белков. Использовался 9% гель полиакриламида. Все реактивы перед употреблением перекристаллизовывались. Электрофорез проводился в 0,1% додецилсульфате натрия в 0,5 M боратном буфере, pH 8. На гель наносилось 200 мкг растворенного ламеллярного белка. Продолжительность электрофореза 5 час. Сила тока 7 ма на трубку. Гель окрашивался 0,25% кумасси голубым в смеси: метанол — уксусная кислота — вода (5:1:5) и отмывался от красителя в 10% уксусной кислоте. Полученные электрофореграммы белков подвергались сканированию на денситометре G-2 фирмы «К. Цейсс». Количественные определения белков в исследуемых растворах проводились по методике Лоури.

На полученных электрофореграммах (рис. 1а) комплексы ламеллярных

белков этиопластов мезофилла и обкладки представлены девятью компонентами с почти одинаковой подвижностью. Последнее указывает на близкое сходство состава предсуществующих ламеллярных белков в пластидах мезофиллы и обкладки на начальной стадии их развития. Полипептид 9 является голохромным белком, предназначенным для формирования пигмент-белкового комплекса 1. В проламеллярном теле этиопластов предсуществует также основной голохромный полипептид (компонент 2), образующий при зеленении пигмент-белковый комплекс II. Правомерно сделать заключение, что комплекс структурных белков, образующих проламеллярное тело пластид, является многокомпонентным. Наряду с голохромными белками, образующими при зеленении листьев белковые компоненты двух фотосистем, этиопласты содержат ламеллярные белки, роль которых остается невыясненной. Сопоставление денситограмм,

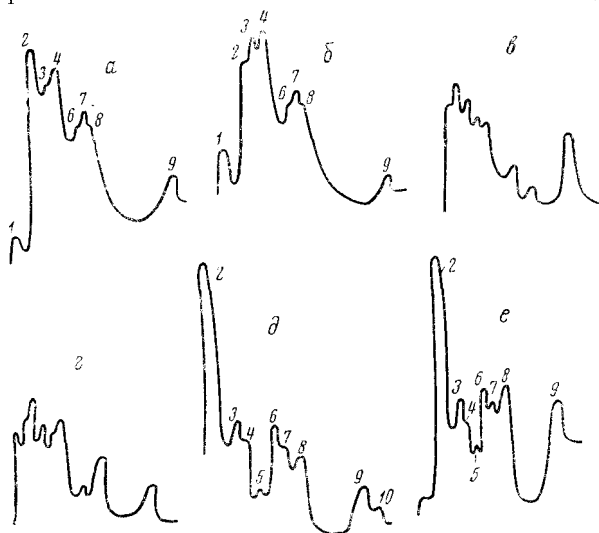


Рис. 2. Денситограммы, полученные при сканировании электрофореграмм ламеллярных белков пластид мезофилла и обкладки *Zea mays* L. а, в, д — мезофилла; б, г, е — обкладка. а, б — 0 час. освещения; в, г — 24 часа освещения; д, е — 14-дневные растения. 1—10 — то же, что на рис. 1

полученных при сканировании электрофореграмм белков этиопластов мезофилла и обкладки (рис. 2а, б), показывает неодинаковые соотношения количественных фондов белков двух исследуемых комплексов. Наиболее выраженные различия наблюдаются по следующим пяти компонентам: 1, 2, 3, 4 и 9.

В течение первых 24 час. зеленения листьев *Zea mays* L. на свету в пластидах формируется система первичных и, частично, вторичных тилакоидов⁽¹⁵⁾. Для построения первичных тилакоидов используются белки проламеллярных тел, которые под влиянием света распадаются с образованием везикул, разрастающихся затем в тилакоиды. Комплексы ламеллярных белков пластид мезофилла и обкладки после 24 час. развития представлены десятью компонентами (рис. 1в, г). Увеличение числа полипептидов обусловлено появлением минорных компонентов. По-видимому, на этой стадии развития органелл синтезируются в основном ламеллярные белки, аналогичные белкам, предсуществующим в этиопластах. В то же время не исключена возможность биосинтеза ламеллярных белков нового типа, не содержащихся в проламеллярных структурах. Однако резких отличий состава голохромных белков пластид мезофилла и обкладки еще не наблюдается. Сравнение денситограмм, полученных при сканировании электрофореграмм ламеллярных белков этиопластов и развивающихся пластид (рис. 2в, г),

позволяет отметить изменение количественных соотношений полипептидов, связанное с активным формированием фотосинтетических мембран под действием света. В частности, наблюдается накопление компонента 9 в пластидах мезофилла. По-видимому, при зеленении листьев в течение 24 час. комплексы ламеллярных белков в развивающихся пластидах мезофилла и обкладки приобретают определенные отличия по сравнению с этиопластидами.

Комплекс ламеллярных белков сформированных хлоропластов мезофилла содержит 12 компонентов, а хлоропластов обкладки 11 (рис. 1*д*, *е*). Как видно из рис. 2*д*, *е*, два типа хлоропластов отличаются по количественному содержанию компонентов 2, 8, 9. В хлоропластах мезофилла в заметных количествах накапливается полипептид 10 (рис. 2*д*, *е*). Сравнение комплекса ламеллярных белков этиопластов и хлоропластов мезофилла выявляет повышение относительного содержания голохромных белков. Наряду с основными компонентами 2 и 9 появляются минорные компоненты. В хлоропластах обкладки по сравнению с этиопластидами значительно повышается содержание полипептидов 3 и 4, вместе с тем возрастает содержание полипептидов 6 и 8. Это указывает на то, что дифференциация ламелл в хлоропластах связана с изменениями состава и количественных соотношений мембранных белков. Не исключено, что одно из отличий комплексов полипептидов зрелых хлоропластов мезофилла и обкладки вызвано накоплением структурного белка, выполняющего специфическую функцию в образовании гран.

Полученные нами данные позволяют заключить, что этиопласты и пропластиды содержат основные компоненты комплекса ламеллярных белков. В процессе дифференциации мембранной системы количество некоторых структурных белков убывает, другие исчезают и вместе с тем синтезируются новые белки. Эти выводы согласуются в определенной мере с интерпретациями результатов, полученных в исследованиях суммарной фракции пластид *Zea mays* L. (¹¹). Однако наши данные указывают на то, что становление комплекса мембранных белков в пластидах мезофилла и обкладки *C₄*-растений имеет некоторые особенности, касающиеся как состава, так и количественных соотношений индивидуальных белков. Есть основания предполагать, что комплекс голохромных белков, ассоциированных с фотосистемой II и, возможно, необходимых для образования гран, отличается в хлоропластах мезофилла и обкладки.

Исходя из сделанных выводов, нам представляется важным дальнейшее исследование особенностей биосинтеза и функциональной топографии индивидуальных белков гран и межгранных ламелл в пластидах мезофилла и в ламеллярной системе пластид обкладки *C₄*-растений.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушчино-на-Оке

Поступило
19 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ О. П. Осипова, В сб.: Механизм интеграции клеточного обмена, М., «Наука», 1966, стр. 66. ² А. Л. Курсанов, В. И. Сафонов и др., В сб.: Функциональная биохимия клеточных структур, М., «Наука», 1970, стр. 143. ³ R. Remy, S. Phung Nhu Hung, A. Moysse, *Physiol. végét.*, v. 10, 269 (1972). ⁴ W. Menke, *Physiol. végét.*, v. 11, 231 (1973). ⁵ C. Sironval et al., In: *Currents in Photosynthesis*, Rotterdam, 1966, p. 111. ⁶ R. Remy, *FEBS Letters*, v. 13, 313 (1971). ⁷ B. Lagoutte, J. Duranton, *FEBS Letters*, v. 28, 333 (1972). ⁸ R. Remy, *FEBS Letters*, v. 31, 308 (1973). ⁹ M. J. C. Rhodes, E. W. Lemm, *Nature*, v. 200, 1077 (1963). ¹⁰ U. E. Drumm, M. M. Margulies, *Plant. Physiol.*, v. 45, 435 (1970). ¹¹ J. M. Forger, L. Bogorad, *Plant. Physiol.*, v. 52, 491 (1973). ¹² J. Duranton, *Physiol. végét.*, v. 2, 363 (1964). ¹³ D. Collot, L. Guignery, J. Duranton, *Bull. Soc. Chem. Biol.*, v. 52, 241 (1970). ¹⁴ J. M. Anderson, R. P. Levine, *Biochim. et Biophys. acta*, v. 333, 378 (1974). ¹⁵ J. Duranton, M. Lefort-Thran, *Bull. Soc. Frans. Physiol. végét.*, v. 14, 249 (1968).