

УДК 577.03

БИОФИЗИКА

В. И. ПОПОВ, Ю. П. САРАНЧА, С. В. ТАГЕЕВА, А. Д. МАКАРОВ
**РОЛЬ СОПРЯГАЮЩЕГО ФАКТОРА В ФОРМИРОВАНИИ
ГРАН ХЛОРОПЛАСТОВ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 17 IV 1976)

Одним из подходов к проблеме взаимосвязи структуры и функции фотосинтетического аппарата является одновременный функциональный и электронномикроскопический анализ молекулярной организации мембран хлоропластов. Успехи, достигнутые в области электронномикроскопического исследования структуры мембран во многом связаны с применением методов замораживание — скалывание и замораживание — травление (¹⁻³). Основными структурно-функциональными единицами хлоропласта являются гранальные и межгранные (агранальные) тилакоиды. Формирование гран при слипании агранальных тилакоидов неразрывно связано с биосинтезом пигментов, эффективным функционированием электронно-транспортной цепи (э.т.ц.) и одним из важнейших компонентов мембраны — сопрягающим фактором CF_1 (²). Поэтому представлялось целесообразным определить роль CF_1 в формировании структуры фотосинтетических мембран. Хлоропласты второго и третьего классов выделяли из листьев 10-дневных проростков гороха, выращенных в люминестате при 25° и освещенности 70 Вт/м², по методу (⁴). Разрушенные 10 мМ NaCl (рН 7,8) хлоропласты осаждали при 3000 g. Полученные фрагменты хлоропластов: системы гранальных и межгранных тилакоидов, обозначались нами как субхлоропластные частицы (с.х.ч.). С.х.ч., лишенные CF_1 , получали по методу (⁵) путем двухкратной промывки в 0,75 мМ растворе Na_2 -ЭДТА при рН 7,4. Полученные осадки с.х.ч., исходных и лишенных CF_1 , гомогенизировали в буфере следующего состава: сахароза 200 мМ, трис-HCl 20 мМ (рН 7,8), NaCl 10 мМ. Пробы на функциональный и электронномикроскопический анализ отбирались одновременно. Восстановление феррицианида регистрировали спектрофотометрически при 420 нм на «Specord UV VIS», снабженном светоприставкой и самописцем GIB. Синтез АТФ определяли люциферин-люциферазным методом (⁶). Удаление CF_1 контролировали измерением Са-зависимой АТФазой активности надосадочной жидкости в хлоропластах, обработанных Na_2 -ЭДТА (⁷). Концентрацию хлорофилла определяли по методу (⁸), белка — по Лоури (⁹). Электрофоретически гомогенный CF_1 получали по (¹⁰). Стадию сопряжения проводили по (⁹). Пробы хлоропла-

Рис. 1. Структура гранальных (т.г) и агранальных (т.а.) тилакоидов в хлоропластах (контроль), полученная методом ультратонких срезов (слева) и замораживания — скалывания (справа)

Рис. 2. Изменения в структуре тилакоидов хлоропластов после удаления CF_1 , полученные методами ультратонких срезов (слева) и замораживания — скалывания (справа). Разлипание тилакоидов гран коррелирует с изменениями частиц на наружной (н. п. с. м. т.) и внутренней (в. п. с. м. т.) комплементарных поверхностях скола

Рис. 3. Динамика удаления частиц CF_1 из гранальных и агранальных тилакоидов (слева) и реконструкция гран при добавлении электрофоретически гомогенного CF_1 (справа). Метод ультратонких срезов

Рис. 3

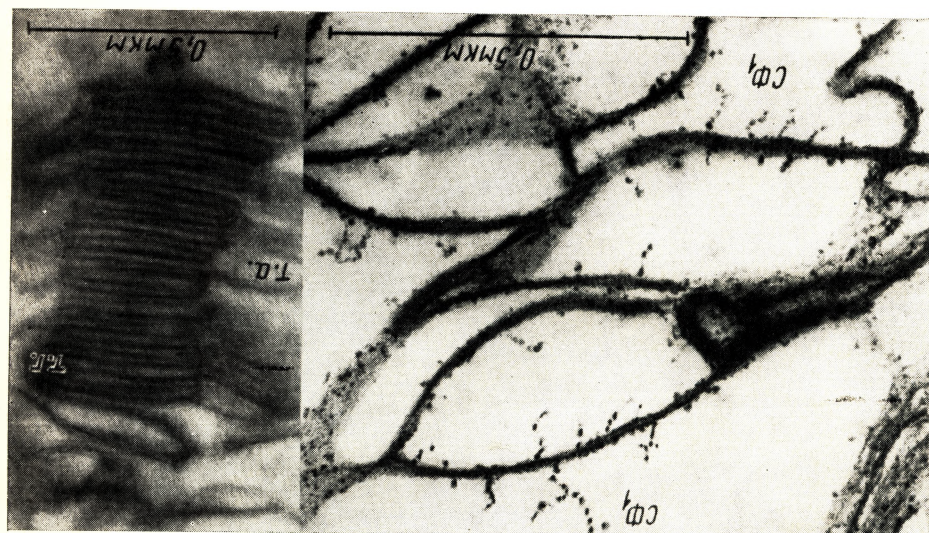


Рис. 2

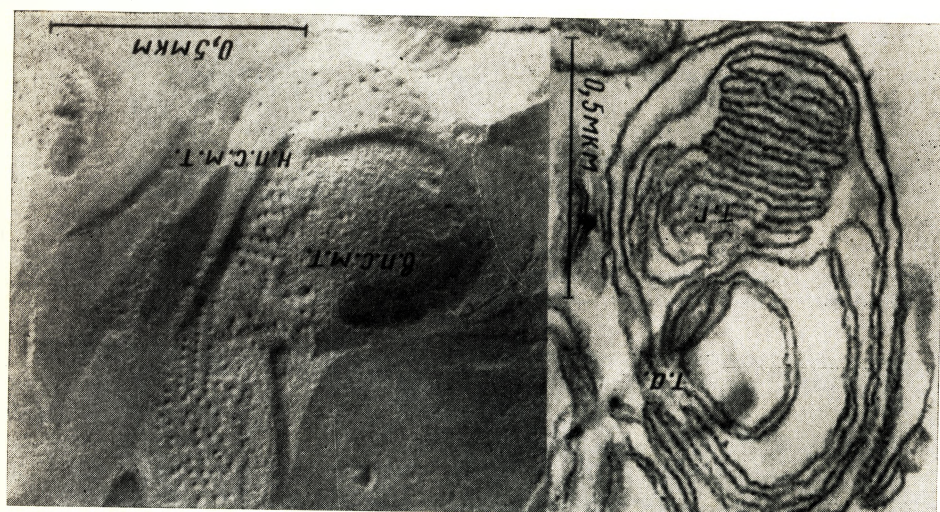
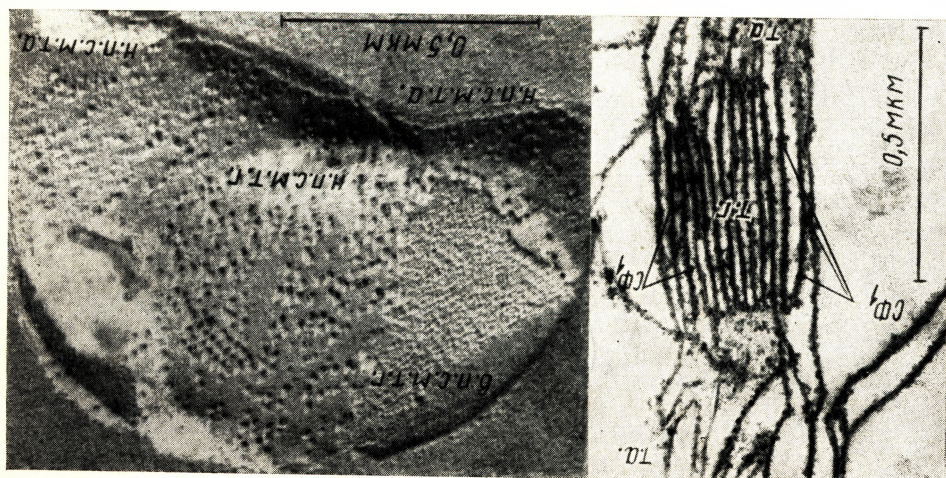


Рис. 1



стов, реконструированных с СФ_1 , отбирали в темноте на электронномикроскопический анализ. Для исследования надмолекулярной организации фотосинтетических мембран использовали метод ультратонких срезов ⁽¹⁰⁾ и метод замораживание — скалывание ^(1, 11). Толщина реплик подбиралась экспериментально и, как следует из данных сравнения размеров 155 Å класса частиц, выявляемых круговым оттенением «прямой» и «обращенной» реплик, она в среднем составляла 25–30 Å. «Обращенную» реплику получали круговым оттенением рельефа скола углем. Угольная реплика интенсивно промывалась и на ее поверхность, прилегающую к рельефу скола, напыляли круговым оттенением платину. «Прямую» реплику получали круговым оттенением рельефа скола платиной и углеродом.

Полученные реплики и срезы снимали на сеточки и просматривали в электронном микроскопе JEM-7 при ускоряющем напряжении 80 кв.

На ультратонких срезах мембран гранальных и межгранных тилакоидов выявляются частицы, которые согласно ⁽¹⁰⁾ относят к СФ_1 (рис. 1, слева). Представленные на рис. 1 (справа) наружная и внутренняя поверхности сколов мембран тилакоидов (соответственно н.п.с.м.т. и в.п.с.м.т.) выявляют популяции частиц, которые в результате латерального движения в плоскости мембраны ⁽³⁾ могут образовывать области частиц с правильной упаковкой. При обработке хлоропластов $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ наблюдается разлипание гранальных тилакоидов (рис. 2, слева). Разлипание гран коррелирует с резкими изменениями в функционировании э.т.ц. (табл. 1) и появлением Са-зависимой АТФазной активности

Таблица 1

Функциональные характеристики исследуемых с.х.ч.

С.х.ч.	АТФ, мкмол на 1 мг хлорофилла в час (с ФМС)	Восстановление $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ мкмол на 1 мг хлорофилла в час
Контрольные	580	135
Обработанные $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$	110	205
Реконструированные с СФ_1	435	160

Примечание. Применялись следующие концентрации субстратов (М): АДФ 10^{-3} ; K_2HPO_4 $2 \cdot 10^{-3}$; трис- HCl (рН 7,8) $2 \cdot 10^{-2}$; MgCl_2 10^{-3} ; NaCl $2 \cdot 10^{-2}$; феназинметасульфат (ФМС) $2,5 \cdot 10^{-3}$; $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $8 \cdot 10^{-5}$; альбумин 40 мкг мл⁻¹.

(2–4 мол Ф_n на 1 мг белка в час) в надосадочной жидкости с.х.ч., «промытых» $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$. Обработка хлоропластов 10 мМ NaCl (рН 7,4) аналогично $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ -обработке не приводит к такому изменению структуры гран.

Можно считать установленным, что уменьшение скорости фотофосфорилирования связано с удалением СФ_1 с наружной поверхности мембран тилакоидов ⁽¹²⁾. Вследствие этого резкое возрастание скорости электронного транспорта (табл. 1), вероятно, связано с падением протонного градиента в результате увеличения протонной проводимости сопрягающей мембраны.

Удаление СФ_1 с мембран-гранальных тилакоидов приводит также к падению активности фотосистемы 2 (ФС-2) ⁽¹⁴⁾, локализованной, согласно ^(1, 2), в гранальных тилакоидах. В результате разлипания гранальных тилакоидов наблюдается непрерывная связь внутритилакоидных пространств, которые могут быть связаны с пространством между наружной и внутренней мембранами оболочки хлоропласта ⁽¹⁵⁾. Такая организация мембран хлоропластов во многом подобна организации мембран в митохондриях. Реконструкция с.х.ч., «промытых» $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, с СФ_1 в присут-

ствии низких концентраций ионов Mg ($10^{-3} M$) приводит к неполному восстановлению функциональных характеристик фотосинтетических мембран хлоропластов (табл. 1). При этом наблюдается процесс слипания тилакоидов в граны (рис. 3, справа).

Известно ⁽²⁾, что ионы Mg влияют на процесс слипания тилакоидов в концентрациях $5 \cdot 10^{-3} M$, что гораздо выше применявшихся концентраций. Из этого следует важная роль SF_1 в формировании гран хлоропластов, это ранее предполагалось в работе ⁽¹²⁾.

Анализ кривых, построенных на основе гистограммы распределения по размерам частиц на н.п.с.м.т. и в.п.с.м.т. (рис. 4), позволяет выявить определенные классы частиц. Проведено специальное исследование реальных размеров $155 \text{ \AA}$ класса частиц с использованием «прямой» и «обращенной» реплик. При учете толщины слоя платины размер этих частиц равен $86 \pm 9 \text{ \AA}$, это совпадает с $90 \text{ \AA}$ размером SF_1 ^(2, 11, 13, 15). Существенно, что SF_1 удаляется с мембран тилакоидов в виде тяжей, состоящих из 6–8 частиц (рис. 3, слева), такое же число частиц наблюдается в рядах $155 \text{ \AA}$ частиц, образующих правильные упаковки на н.п.с.м.т. (рис. 1, справа). После Na_2 -ЭДТА-обработки размеры всех частиц на н.п.с.м.т. уменьшаются (рис. 4), однако области частиц с правильной упаковкой сохраняются (рис. 2, справа). Эти результаты указывают на связь $155 \text{ \AA}$ класса частиц с SF_1 и позволяют отвести роль SF_1 в регуляции подвижности частиц на поверхностях скола мембран тилакоидов. Обработка хлоропластов Na_2 -ЭДТА влечет за собой также изменения в плотности

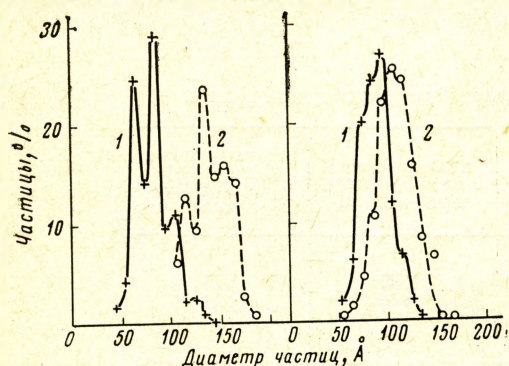


Рис. 4. Кривые распределения по размерам частиц, выявляемых на внутренней (1) и наружной (2) поверхностях скола мембран хлоропластов в контроле (слева) и после удаления SF_1 (справа)

частиц, приходящихся на 1 мкм^2 н.п.с.м.т. и в.п.с.м.т. Если в исходных мембранах плотность частиц на н.п.с.м.т. составляет 1126 ± 73 частиц/ мкм^2 и на в.п.с.м.т. 5938 ± 522 частиц/ мкм^2 , то после воздействия хелатирующего агента: на н.п.с.м.т. 827 ± 28 частиц/ мкм^2 и на в.п.с.м.т. 2131 ± 43 частиц/ мкм^2 . Исходя из диаметра и числа частиц на 1 мкм^2 н.п.с.м.т. и в.п.с.м.т., были определены занимаемые ими площади. На 1 мкм^2 н.п.с.м.т. частицы занимают площадь $0,177 \text{ мкм}^2$, а на 1 мкм^2 в.п.с.м.т. они занимают площадь $0,327 \text{ мкм}^2$; в модифицированных же хлоропластах н.п.с.м.т. $0,09 \text{ мкм}^2$, а в.п.с.м.т. $0,137 \text{ мкм}^2$.

Исследование распределения частиц по размерам на н.п.с.м.т. и в.п.с.м.т. в исходном материале определяет $20 \text{ \AA}$ периодичность максимумов выявляемых классов частиц. Удаление SF_1 с поверхности фотосинтетических мембран приводит к нарушению обнаруживаемой периодичности, изменению плотности и площади частиц, что может указывать на важную роль SF_1 в поддержании регулярной организации белков в мембранах хлоропластов. Полученные изменения в структуре и функции мембран, «промытых» Na_2 -ЭДТА, мобильность фермента на поверхности тилакоидной мембраны, локализация его непосредственно с ферредоксин-НАДФ-редуктазой ⁽⁷⁾ позволяют предполагать тесную структурную и функциональную связь SF_1 с э.т.ц., с важнейшими ее компонентами фотосистемами 1 и 2. Не исключено, что SF_1 , располагаясь на наружной поверхности тилакоидной мембраны, может регулировать подвижность и взаимодействие целого ряда белков, подобно интенсивно исследуемым акто-миозиновым системам ⁽¹⁶⁾. Полу-

ченные данные указывают на значительную полифункциональность СФ, и его возможное участие в регуляции различных процессов фотосинтеза.

Авторы выражают благодарность Б. Л. Аллахвердову за помощь в данной работе, а также А. Н. Мальяну за предоставление СФ₁ и участие в обсуждении полученных результатов.

Институт биологической физики
Академии наук СССР

Поступило
6 IV 1976

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино Московской обл.

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. В. Тагеева, В. И. Понов, ДАН, т. 228, № 2 (1976). ² J. M. Anderson, Biochim. et biophys. acta, v. 416, 191 (1975). ³ D. Branton, In: Freeze-etching, Soc. Franc. Micr. Electronique, Paris, 1973, p. 107. ⁴ F. R. Wahle, D. I. Arnon, In: Methods in Enzymology, v. 6, N. Y.—London, 1963, p. 308. ⁵ R. McCarty, E. Racker, J. Biol. Chem. v. 243, 129 (1968). ⁶ B. L. Strehler, S. R. Totter, Arch. Biophys., v. 40, 28 (1952). ⁷ А. Н. Мальян, Ю. П. Саранча, А. Д. Макаров, Биохимия, т. 39, 1062 (1974). ⁸ I. D. Arnon, Plant Physiol., v. 24, 1 (1949). ⁹ А. Н. Мальян, Ю. П. Саранча, А. Д. Макаров, В сб.: Методы выделения и исследования белков компонентов фотосинтетического аппарата, Пушино-на-Оке, 1973, стр. 66. ¹⁰ A. Oleszko, E. N. Moudrianakis, J. Cell Biol., v. 63, 936 (1974). ¹¹ Б. Л. Аллахвердов, В. И. Понов, С. В. Тагеева, В сб.: Электронная микроскопия в ботанических исследованиях, Петрозаводск, 1974, стр. 125. ¹² A. Lockshin et al., Biochim. et biophys. acta, v. 226, 366 (1971). ¹³ M. P. Garber, P. L. Steponkus, J. Cell Biol., v. 63, 24 (1974). ¹⁴ S. Lien, E. Racker, J. Biol. Chem., v. 246, 4298 (1971). ¹⁵ А. И. Шуряев, Автореф. канд. дисс., Киев, 1974. ¹⁶ R. G. Painter, M. Sheetz, S. J. Singer, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 72, 1359 (1975).