

УДК 581.132; 582.232

© 1990 г.

А.Г. МАРКЕЛОВА, М.Г. ВЛАДИМИРОВА, В.Е. СЕМЕНЕНКО

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ РБФК В КЛЕТКАХ  
ВОДОРОСЛЕЙ*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева  
Академии наук СССР, Москва*

Исследовали ультраструктурную локализацию РБФК с помощью реакций связывания со специфическими антителами и с белком А, меченным коллоидным золотом в цельных клетках *Dunaliella salina* и мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15. Выявлено, что РБФК локализована только в пиреноиде и вблизи его крахмальной обкладки. В зависимости от условий выращивания выделяется три типа распределения метки (коллоидного золота) в пиреноиде: по его поверхности, по внутренним ламеллам пиреноида, по всему его объему. Обсуждается функциональная роль пиреноида как пула РБФК, которая может находиться: а) в депонированной, б) активной форме, в) одновременно в активной и в депонированной формах.

*Dunaliella salina* – *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 – ультраструктура – пиреноид – локализация РБФК – protein-A-gold.

Отличительная особенность организации хлоропластов эукариотических водорослей – наличие в них достаточно крупного белкового тела – пиреноида, который у зеленых одноклеточных водорослей окружен зернами крахмала ("крахмальная обкладка"), обычно пересечен ламеллами тилакоидов и является важным таксономическим признаком.

При исследовании ультраструктуры одноклеточных водорослей на различных стадиях роста клеток и в зависимости от физиологических воздействий была отмечена связь между изменением количества РБФК – ключевого фермента фотосинтеза – структурой и размерами пиреноида, послужившая основанием для предположения, что пиреноид является депо РБФК [1, 2]. Биохимическими методами на изолированных пиреноидах было показано, что основной составляющей белка пиреноида является РБФК [3, 4]. Учитывая, что препаративное выделение белка пиреноида затруднено, поскольку это образование не имеет ограничивающей мембраны и не является истинной органеллой, мы применили цитоиммунохимический метод тестирования и, таким образом, с помощью непрямой иммунофлуоресценции доказали локализацию основного количества РБФК клетки водорослей именно в пиреноиде [5, 6]. Затем в тилакоидной области хлоропласта также иммунохимическими методами было обнаружено некоторое количество РБФК [7]. Однако в работе [7] были использованы антитела против субъединиц фермента. В литературе данных о наличии молекул фермента вне пиреноида мы не обнаружили. Это усложняет решение вопроса о функциональной роли пиреноида. Остается неясным смысл уницентральной локализации РБФК как видимого в световой микроскоп компактного образования, которое оказалось практически нереализованным в ходе эволюции. Открытым остается также вопрос, существует ли перераспределение фермента в процессе жизнедеятельности клетки или при изменении условий ее существования. На основании выявленной локальной компартиментализации РБФК мы условно назвали пиреноид "гигантской карбоксисомой" и предположили следующие возможные

варианты ее функционирования [6]: 1) РБФК пиреноида – запасной белок, 2) пиреноид – активно работающая карбоксисома, 3) лабильность и изменчивость размеров пиреноида – отражение способа регуляции карбоксилазной активности через изменение компарментализации фермента.

Для визуализации распределения РБФК в различных компартаментах хлоропласта важен переход на ультраструктурный уровень с применением электронно-плотных иммунохимических зондов и изучение зависимости компарментации фермента от физиологических условий.

#### МЕТОДИКА

Объектами, как и ранее [5, 6], служили не имеющие клеточной стенки одноклеточные водоросли: *Dunaliella salina* (Teod.) и мутант *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 (Dang) (соответственно IPPAS D-209 и IPPAS D-221 из коллекции водорослей ИФР АН СССР).

Было поставлено два физиологических опыта. Водоросли выращивали в двух повторностях в культуральных сосудах на среде Абдуллаева-Семеновко при барботаже воздухом с 1,7% CO<sub>2</sub> и температуре 28°. В работе представлены результаты, полученные для культуры *Dunaliella*, выращенной при трех различных условиях освещения от люминесцентных ламп ЛБ-40: 1) круглосуточное освещение, 50 Вт · м<sup>-2</sup>, 2) в условиях синхронизации роста при смене свет/темнота – 12/12, 50 Вт · м<sup>-2</sup>, 3) круглосуточное освещение, 10 Вт · м<sup>-2</sup>.

Применяли непрямой иммунохимический метод: реакции проводили на интактных клетках после префиксации параформальдегидом по специально отработанной методике, обеспечивающей сохранение иммунореактивности исследуемого фермента и проникновение иммуноглобулинов в клетку [8, 9]. Был использован метод иммунохимических реакций с применением в качестве метчика коллоидного золота, связанного с белком А. В данной работе принципиальным было проведение иммунохимических реакций не на срезах, а на целых клетках до обезвоживания и заключения их в смолу. Это обеспечивало реальную картину прижизненного распределения исследуемого фермента в клетках.

На первом этапе проводили реакцию связывания с иммунной сывороткой (разведение – 1:64), содержащей антитела против РБФК, полученную иммунизацией кроликов препаративно выделенным ферментом [10, 11]. На втором этапе использовали белок А, меченный коллоидным золотом ("Serva", ФРГ). Как на первом, так и на втором этапе для проведения реакций связывания префиксированные клетки инкубировали 2 ч при 25° и затем 22 ч при 4°.

Постфиксацию OsO<sub>4</sub> (1,5 ч), обезвоживание и заключение в эпон проводили после проведения иммунохимических реакций по стандартным методам. Срезы клеток без дополнительного контрастирования исследовали в электронном микроскопе JEM 100 В ("JEOL", Япония). Система контроля была построена с учетом общепринятых критериев специфичности иммунохимических реакций и подробно описана ранее [5].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты представлены на рисунке (а–г). В контрольных вариантах (рисунок, а) при использовании неиммунной сыворотки (или буфера), где нарушается цепь специфического связывания, частицы коллоидного золота практически отсутствуют. Лишь иногда они встречаются вблизи поврежденной плазмалеммы. Это свидетельствует о том, что в клетках не происходит реакции неспецифического связывания как белка А, меченного коллоидным золотом, так и иммунной сыворотки. Высокая специфичность является преимуществом метода, используемого впервые на целых клетках водорослей, в отличие от значительной неспецифичности реакций, обнаруживаемой иногда при проведении иммунохимических реакций на срезах [12]. (Рис. а–г – вклейка).

В опытных вариантах (рисунок, б–г) метка выявляется только в области пиреноида и практически не обнаруживается ни в строме, ни в области тилакоидов хлоропласта. При этом могут быть выделены три типа локализации метки в области пи-

пиреноида. 1. Наиболее часто как на продольных, так и на поперечных срезах клетки наблюдается распределение частиц золота по периферии пиреноида, следовательно, по его поверхности. Частицы золота иногда окружают крахмальные зерна обкладки пиреноида (рисунок, б), а сам пиреноид имеет плотный матрикс. 2. В случаях, когда пиреноид имеет рыхлую структуру, частицы золота плотно, равномерно распределены по всей площади среза пиреноида (рисунок, в), а следовательно, по всему его объему. 3. При отсутствии крахмальной обкладки вокруг пиреноида частицы золота приурочены к ламеллам, пронизывающим пиреноид или прилегающим к нему (рисунок, г).

Крайне незначительное количество частиц золота в строме хлоропласта во всех вариантах свидетельствует об отсутствии здесь молекул РБФК. Этот факт не противоречит результатам исследователей [7], обнаруживших иммунохимически некоторое количество как больших, так и малых субъединиц РБФК, в хлоропластах *Ochromonas* и *Chlamydomonas reinhardtii* вне пиреноида. Известно, что синтез малой субъединицы РБФК осуществляется в цитоплазме, а большой — в хлоропласте. До сборки фермента в хлоропласте существует пул свободных субъединиц, что и могло определить результаты, полученные в работе [7]. Поскольку нами использовалась антисыворотка, полученная против молекул фермента, по-видимому, можно полагать, что у изучаемых одноклеточных водорослей все молекулы РБФК локализованы в пиреноиде или близлежащей зоне. Следует подчеркнуть, что позже по той же методике на срезах клеток *Chlorella pyrenoidosa* было показано [13], что плотность частиц золота, связанного с белком А, в пиреноиде в сотни раз превышает таковую в строме хлоропласта. Эти результаты практически совпадают с нашими. Более того, как в работе [13], так и в настоящем нашем исследовании (см. ниже) не обнаружено перераспределения молекул фермента между пиреноидом и тилакоидной областью хлоропласта при изменении интенсивности и режима освещения. Таким образом, учитывая применение различных методов в работах [7, 13] и в нашей работе (соответственно иммунохимические реакции на срезах и на целых клетках), можно с известной уверенностью обсуждать реальность того, что РБФК в хлоропластах одноклеточных водорослей локализована исключительно в пиреноиде.

Выявленные в данной работе различные типы распределения метки в области пиреноида (по ламеллам, по поверхности и во всем объеме пиреноида) связаны с различным физиологическим состоянием культуры.

Как уже упоминалось, ранее в наших работах была показана зависимость степени выращенности пиреноида, его размеров и плотности от интенсивности света при выращивании культур *Chlorella* [14], *Dunaliella* [2, 15], *Chlamydomonas* (не опубликовано) и связь этих изменений с активностью фотосинтетического аппарата и синтезом РБФК [10, 16]. При этом было показано также, что в сравнении с "темновыми" вариантами при высокой, насыщающей интенсивности света и максимальной фотосинтетической активности количество РБФК оказывается ниже, а матрикс пиреноида становится разреженным. В этой связи в данной работе культуру, выращенную при  $10 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$  (рисунок, г), характеризующуюся клетками с крупным, плотным пиреноидом, практически лишенным крахмальной обкладки, следует рассматривать как "темновую", очень слабо растущую, с низкой активностью фотосинтетического аппарата. Клетки синхронной культуры (рисунок, а, б) хотя и были выращены при более высокой интенсивности света, однако взяты были через 10 ч освещения, т.е. в период подготовки к делению, когда, как известно, существенно снижается активность фотосинтетического аппарата. Здесь также выявляется плотный матрикс пиреноида, однако его крахмальная обкладка указывает на имевшуюся в предыдущий период активную стадию фотосинтеза. В обоих опытных вариантах (рисунок, б, г) при иммунохимических реакциях выявляется активность лишь поверхностного слоя пиреноида, что указывает на плотную упаковку молекул фермента. Это, с одной стороны, затрудняет проникновение иммуноглобулинов, которые могут связываться лишь с теми молекулами антигена (РБФК), чьи иммунные детерминантные группы расположены вблизи поверхности пиреноида, а с другой — возможно, свидетельствует о разной степени

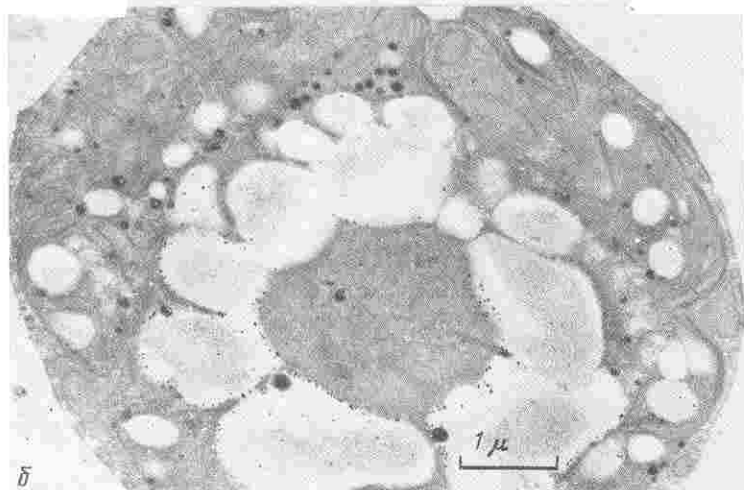
участия молекул фермента в фотосинтетическом процессе. Основную массу пиреноида в этих условиях составляет, по-видимому, фермент, находящийся в неработающем состоянии, и фотосинтетическая ассимиляция  $\text{CO}_2$  обеспечивается лишь молекулами поверхностного слоя пиреноида. Действительно, при низкой скорости фиксации  $\text{CO}_2$  (недостаточная энергетическая обеспеченность или клетка перед делением) кажется вполне оправданным, что клетки не вводят в действие весь пул содержащихся в пиреноиде молекул РБФК.

Принципиально другая картина обнаруживается в активно растущих клетках асинхронной культуры при круглосуточном освещении. Здесь пиреноид оказывается более рыхлым, значительно содержание крахмальных зерен. Распределение иммунной метки свидетельствует о том, что доступными являются все молекулы фермента и, очевидно, "работает" весь его пул, во всем объеме пиреноида. Это находится в соответствии с выводами японских исследователей, сделавших объемную реконструкцию распределения РБФК в пиреноиде у эвглены [17].

Таким образом, обращаясь к вопросу о функциональной роли пиреноида, можно предполагать, что пиреноид, являясь пулом РБФК, содержит молекулы фермента, которые могут быть в различной степени доступны для субстратов ( $\text{РБФ}$  и  $\text{CO}_2$ ), и соотношение этих молекул зависит от физиологических условий. Регуляция карбоксилирующей активности РБФК одноклеточных водорослей при изменении физиологических условий осуществляется не только на уровне синтеза [18] и активности фермента, но в большей степени за счет изменения плотности его упаковки, а пиреноид представляет собой пул РБФК, находящейся как в депонированной, так и в активной форме.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимирова М.Г. К изучению функциональной роли пиреноида в клетках хлореллы // Тез. докл. III Всесоюз. симпоз. "Электронная микроскопия в ботанических исследованиях". Петро-заводск: Карельский ф-л АН СССР, 1974. С. 134.
2. Владимирова М.Г. Изменения структурной организации при функциональных перестройках клетки *Chlorella sp.* // Физиология растений. 1976. Т. 23. Вып. 6. С. 1180.
3. Holdsworth R.H. The isolation and partial characterization of Pyrenoid protein of *Eremosphaera viridis* // J. of Cell Biol. 1971. V. 51. P. 409.
4. Kerby N.W., Evans L.V. Isolation and Partial Characterization of Pyrenoids from *Pilayella littoralis* // Planta. 1978. V. 142. N 1. P. 91.
5. Владимирова М.Г., Маркелова А.Г., Семенов В.Е. Выявление локализации рибулозобисфосфаткарбоксилазы в пиреноидах одноклеточных водорослей цитоиммунофлуоресцентным методом // Физиология растений. 1982. Т. 23. Вып. 5. С. 941.
6. Владимирова М.Г., Маркелова А.Г., Касаткина Т.И., Семенов В.Е. Иммунофлуоресцентное выявление локализации рибулозодифосфаткарбоксилазы в пиреноидах клеток водорослей // Тез. докл. Междунар. симпоз. Регуляция метаболизма первичных и вторичных продуктов фотосинтеза. Пушкино: ОНТИ НЦ, 1983. С. 7.
7. Lacoste-Royal G., Gibbs S.P. Immunocytochemical localization of RBPCase in the pyrenoid and thylakoid region of the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. 1987. V. 83. N 3. P. 602.
8. Маркелова А.Г. Фиксация клеток водорослей, обеспечивающая сохранение ультраструктуры и иммунореактивности белков // Тез. докл. VI Всесоюз. симпоз. "Ультраструктура растений". Киев: Ботанический ин-т АН УССР. 1988. С. 245.
9. Маркелова А.Г., Владимирова М.Г., Семенов В.Е. Иммуноэлектронномикроскопическое изучение с использованием меченого коллоидным золотом белка А распределения РБФК в хлоропластах одноклеточных водорослей // Тез. докл. VI Всесоюз. симпоз. "Ультраструктура растений". Киев: Ботанический ин-т АН УССР. 1988. С. 21.
10. Касаткина Т.И., Прошина Н.А., Семенов В.Е. Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза хлореллы и регуляция ее синтеза под действием света разной интенсивности // Матер. X Всесоюз. совещ. "Роль низших организмов в круговороте веществ в замкнутых экологических системах". Киев: Наук. думка, 1979. С. 298.
11. Владимирова М.Г., Маркелова А.Г., Касаткина Т.И. Свойства фотосинтетического аппарата лишайного клеточной стенки мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 // Физиология растений. 1982. Т. 29. Вып. 1. С. 80.
12. Nisius A., Ruppel H.G. Immunocytological and chemical studies on the stromacentre-forming protein // Planta. 1987. V. 171. № 4. P. 443.



Локализация РБФК в клетках *D. salina*. Обработка различными сыворотками и белком А-золото.

*a* – Контроль, синхронная культура (свет/темнота – 12/12), 10-й ч света, неиммунная сыворотка; *б* – опыт, синхронная культура (свет/темнота – 12/12), 10-й ч света, реакция со специфической сывороткой; *в* – опыт, несинхронная культура, интенсивный рост, линейная фаза, реакция со специфической сывороткой; *г* – опыт, несинхронная, «тенева» культура, реакция со специфической сывороткой. *a–в* – освещение 50 Вт·м<sup>-2</sup>; *г* – 10 Вт·м<sup>-2</sup>

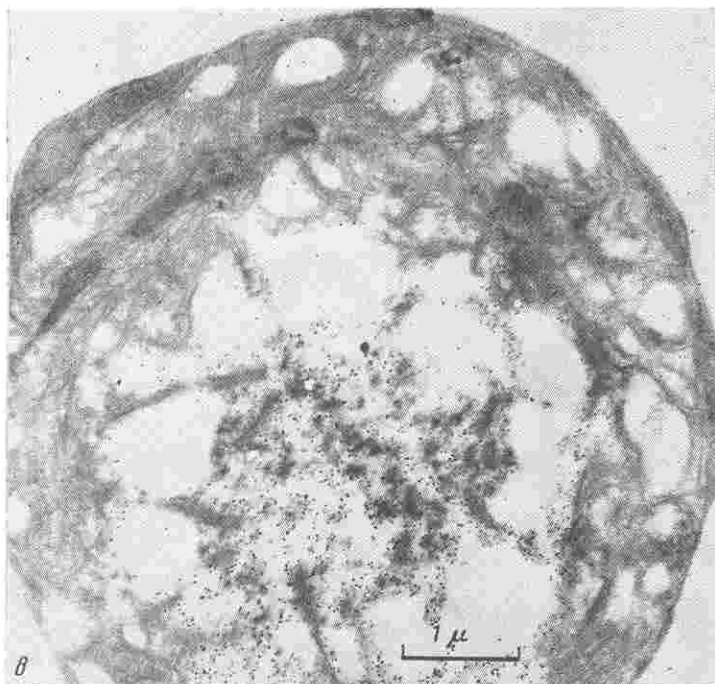


Рис. в, г