

УДК 581.132/133 : 582.264

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОГЕКСИМИДА НА ПРОЦЕСС ПЕРЕСТРОЙКИ БИОСИНТЕЗА КЛЕТОК ХЛОРЕЛЛЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЙ АЗОТНЫМ ГОЛОДАНИЕМ

В. Е. СЕМЕНЕНКО, Т. С. РУДОВА

*Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР, Москва*

Изучали влияние циклогексимида на процесс перестройки направленности биосинтеза двух штаммов *Chlorella* в условиях азотного голодания. Липиднакапливающий штамм *Chlorella pyrenoidosa* 82 практически полностью теряет способность синтезировать липиды уже при концентрации циклогексимида 3 мкг/мл суспензии. При этом несколько уменьшается суммарное количество белка, а количество углеводов составляет 100% от прироста биомассы. В то же время у штамма *Chlorella* sp. К., обладающего углеводной направленностью биосинтеза, циклогексимид не оказал никакого действия на распределение веществ, синтезируемых при азотном голодании. Кинетический ингибиторный анализ показал, что при вызываемой экстремальным воздействием перестройке липиднакапливающего штамма имеется начальный период, длящийся 1,0—1,5 ч, в течение которого в цитоплазме на 80 S рибосомах начинается и завершается синтез белков, которые и обуславливают последующую способность клеток осуществлять синтез липидов. Делается вывод, что у «липидных» штаммов *Chlorella* вызываемый азотным голоданием процесс направленного синтеза липидов сопряжен с необходимостью предварительного синтеза соответствующих ферментов, которые относятся, вероятно, к числу индуцируемых адаптивных белков, синтез которых идет *de novo*.

В условиях азотного голодания [1—6], а также при действии экстремальной температуры [7, 8], растворов высокой ионной силы [9] и при ингибировании деления клеток с помощью митомидина С [10] наблюдается разобщение функций фотосинтеза и деления клеток хлореллы и существенно изменяется направленность их биосинтеза. Причем качественная направленность биосинтеза зависит не от природы действующих внешних факторов, а определяется генотипом штаммов, среди которых есть типичные формы, накапливающие липиды или углеводы [4, 5].

Для понимания конкретных регуляторных механизмов, лежащих в основе перестройки направленности биосинтеза клеток хлореллы при разобщении их клеточных функций, существенный интерес представляет выяснение вопроса о том, сопряжен ли экспериментально вызываемый переход клеток к направленному синтезу веществ с необходимостью предварительной индукции синтеза соответствующих ферментов или, по крайней мере, с работой белоксинтезирующих систем.

Выяснение этого интересного в теоретическом отношении вопроса затрагивает также остающийся неясным, но важный для разработки теории управления качественной направленностью биосинтеза фотосинтезирующих клеток вопрос о том, можно ли получить на одном и том же штамме хлореллы систему, осуществляющую направленный синтез не только, допустим, липидов, но и углеводов в зависимости от характера применяемого воздействия.

Для изучения поставленных вопросов мы осуществили ингибиторный анализ, который широко используют в исследованиях индукции адап-

тивных ферментов как одно из доказательств синтеза белка de novo [11, 12]. Изучено влияние на вызываемый азотным голоданием процесс перестройки биосинтеза «липидного» и «углеводного» штаммов хлореллы циклогексимида — антибиотика, являющегося, как известно, специфическим ингибитором синтеза белка на 80 S рибосомах вследствие блокирования процессов транслокации и не влияющего на синтез белка на 70 S рибосомах [13—16]. Эффективность этого антибиотика в отношении подавления синтеза белка у водорослей, в том числе у хлореллы, показана в работах многих исследователей [16—22].

МЕТОДИКА

Опыты ставили на *Chl. pyrenoidosa* 82 и *Chlorella* sp. K. — штаммах, являющихся типичными представителями культур соответственно с липидной и углеводной направленностью биосинтеза. Культивировали водоросли в специальных культуральных ячейках [23] в накопительном режиме на среде Тамия при круглосуточном освещении (43 тыс. эрг/см²·сек) и барботаже газовой смеси с 1,7% CO₂ при температурах, оптимальных для каждого штамма. Фактором, индуцирующим перестройку биосинтеза микроводорослей, было азотное голодание. В предварительных опытах было изучено влияние на рост и биосинтез использованных штаммов концентраций циклогексимида от 3 до 30 мкг/мл (конечная концентрация) и длительность действия однократно вносимой дозы антибиотика.

Рост культуры определяли прямым подсчетом числа клеток под микроскопом в камере Горяева. Рост клеток и фотосинтетическую продуктивность — по сухому весу биомассы и отдельной клетки. Белок определяли в лиофильно высушенной биомассе по общему азоту микрометодом Кьельдаля с умножением на пересчетный коэффициент 6,25, углеводы — методом фенол-серная кислота [24] в свежесобранной биомассе. Липиды определяли по разнице. При этом в предварительных опытах было показано соответствие между рассчитываемым изменением содержания липидов и изменением их количества, определяемым спектрофотометрически по поглощению в области 1750 см⁻¹ [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективное действие антибиотик оказывает уже при минимальных (3—5 мкг/мл культуры) концентрациях. Концентрация в 30 мкг/мл вызывала неспецифические реакции. При однократном внесении циклогексимида в концентрации 3 мкг/мл действие его сохраняется в течение

Сравнительная характеристика действия циклогексимида на перестройку биосинтеза двух штаммов *Chlorella* при азотном голодании
анализ проведен через 48 ч азотного голодания

Вариант	Сухой вес, мг/мл	Белок		Углеводы		Липиды	
		мг/мл	% от прироста биомассы	мг/мл	% от прироста биомассы	мг/мл	% от прироста биомассы
<i>Chl. pyrenoidosa</i> 82							
Исходная	1,91	0,93		0,33		0,64	
(—N) контроль	3,88	0,73	—10,1	1,70	69,5	1,44	40,6
(—N) + циклогексимид, 3 мкг	3,27	0,76	—12,5	1,70	100,7	0,80	11,7
(—N) + циклогексимид, 10 мкг	2,47	0,89	—7,1	1,17	150,0	0,40	—42,8
<i>Chlorella</i> sp. K							
Исходная	1,36	0,67		0,46		0,22	
(—N) контроль	4,06	0,58	—3,3	1,96	55,5	1,51	47,7
(—N) + циклогексимид, 3 мкг	4,14	0,51	—5,7	2,31	66,5	1,31	47,1
(—N) + циклогексимид, 10 мкг	2,82	0,46	—14,3	1,85	95,2	0,50	19,1

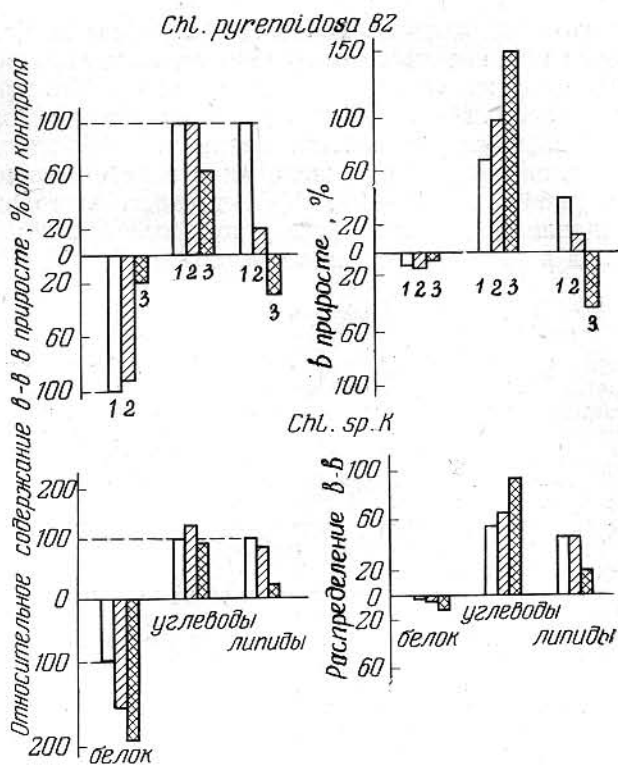


Рис. 1. Влияние циклогексимида на биосинтез клеток *Chl. pyrenoidosa* 82 и *Chlorella* sp. K. в условиях азотного голодания

1 — культура без азота (контроль), 2, 3 — то же + циклогексимид в концентрациях 3 (2) и 10 (3) мкг/мл

35—48 ч, после чего снижается и культура репарирует, очевидно, из-за постепенной детоксикации или деградации молекул антибиотика. Поэтому в длительных экспериментах, в особенности при кинетическом ингибиторном анализе роли белоксинтезирующей системы в перестройках биосинтеза хлореллы, циклогексимид в концентрации 5 мкг/мл вносили дважды с интервалом 48 ч.

Культуры выращивали на полной среде Тамия до плотности 200—300 млн. клеток на мл, затем суспензию центрифугировали, промывали водой, снова центрифугировали и ресуспендировали на свежую среду Тамия без азота. Все операции проводили в стерильных условиях. Циклогексимид (производство фирмы «Serwa») вносили в момент перевода культур на среду без азота. Далее контрольный (среда без азота) и опытный (среда без азота + циклогексимид) варианты культур экспонировали в культуральных ячейках в оптимальных для роста и фотосинтеза каждого штамма условиях.

Как видно из таблицы и рис. 1, циклогексимид существенно изменяет индуцируемый азотным голоданием характер перестройки биосинтеза клеток хлореллы. А именно: липиднакапливающий штамм *Chl. pyrenoidosa* 82 практически полностью теряет способность синтезировать липиды уже при концентрации циклогексимида 3 мкг/мл, что следует как из сопоставления с контрольным вариантом, так и из распределения веществ в приросте. Суммарное количество белка при этом несколько уменьшается, но в такой же мере, как и в контрольном варианте, а количество углеводов составляет 100% от прироста биомассы. При концентрации циклогексимида 10 мкг/мл эти процессы еще более усугубляются

и наблюдается даже убыль липидов, что связано, возможно, уже с специфическим действием антибиотика. В то же время у штамма *Chlorella* sp. K., обладающего углеводной направленностью биосинтеза и конденсирующего продукты фотосинтеза в виде крахмала в хлоропласте [2, 7], циклогексимид в концентрации 3 мкг/мл, как видно из таблицы и рис. 1, не оказал никакого действия на распределение веществ, синтезируемых при азотном голодании.

В рассмотренных опытах действие азотного голодания было сравнительно кратковременным (48 ч), когда еще не завершаются типичные для этих условий перестройки биосинтеза водорослей. Анализ соотношения веществ проведен только в конце опыта.

Особый интерес представляет влияние циклогексимида на динамику перестройки биосинтеза у липиднакапливающего штамма *Chl. rugenoidosa* 82 при достаточно длительном азотном голодании. Как видно из рис. 2, в этих условиях без антибиотика (в контроле) наблюдается процесс закономерного возрастания количества липидов в биомассе и снижение содержания углеводов, появляющихся в начальный период азотного голодания. Внесение же циклогексимида (5 мкг/мл, конечная концентрация) одновременно с переводом культур на безазотистые среды приводит к полному подавлению синтеза липидов, количество которых остается на исходном уровне в течение практически всего эксперимента. В то же время содержание углеводов в этих условиях непрерывно возрастает.

Таким образом, полученные результаты приводят к выводу, что вызываемый азотным голоданием у «липидных» штаммов *Chlorella* процесс направленного синтеза липидов сопряжен с необходимостью предварительного синтеза соответствующих ферментов, которые относятся, вероятно, к числу индуцируемых адаптивных белков, синтез которых идет *de novo*.

Подавление функциональной активности 80S рибосом, на которых осуществляется синтез этих белков, делает потенциально накапливающую липиды клетку *Chl. rugenoidosa* 82 системой, направленно синтезирующей углеводы.

Для доказательства того, что при экспериментально вызываемом посредством разобщения клеточных функций направленном синтезе липидов у липиднакапливающего штамма *Chl. rugenoidosa* 82 мы действительно имеем дело со случаем адаптивного предварительного синтеза белка *de novo*, существенный интерес представляет кинетический ингибиторный анализ динамики биосинтеза липидов в зависимости от времени внесения ингибитора после индуцирующего синтеза липидов воздействия.

С этой целью мы провели серию опытов, в которых циклогексимид вносили в культуру через 30 мин, 1, 1,5, 2, 4, 6 и 12 ч после начала азотного голодания культур, а также одновременно с переводом их на безазотистую среду. Конечная концентрация однократно вносимой дозы

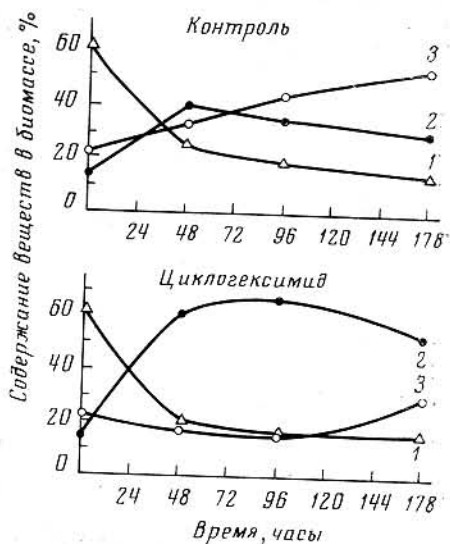


Рис. 2. Влияние циклогексимида на перестройку направленности биосинтеза липидов и углеводов у *Chl. rugenoidosa* 82 в условиях азотного голодания

1 — белок, 2 — углеводы, 3 — липиды

антибиотика — 5 мкг/мл суспензии. Для того чтобы рибосомы были все время блокированы в опытах с длительностью более 48 ч, циклогексимид вносили повторно через 48 ч после предыдущего внесения с соответствующим сдвигом интервала по времени. Контролем служила культура на среде без азота, в которую ингибитор не вносили.

Результаты одного из опытов представлены на рис. 3. Видно, что циклогексимид подавляет на 90% способность клетки к переходу к направленному синтезу липидов в случае внесения антибиотика одно-



Рис. 3. Зависимость вызываемого азотным голоданием синтеза липидов в клетках *Chl. rupeoidosa* 82 от времени внесения циклогексимиды с момента начала азотного голодания. Анализ проведен через 48 ч азотного голодания. Пунктиром отмечен уровень липидов в контрольном варианте (—N)

временно с переводом культур на безазотистую среду. Подавляет он также этот процесс и при внесении его через 30 мин и 1 ч после начала азотного голодания. Внесение же ингибитора через 1,5 ч и в более поздние сроки (через 2, 4, 6 и 12 ч) после начала азотного голодания уже не вызывает подавления синтеза липидов и накапливаемое количество их такое же или несколько большее, чем в контрольном варианте.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты можно интерпретировать, как нам представляется, только однозначно. При вызываемой экстремальным воздействием перестройке биосинтеза липиднакапливающего штамма *Chl. rupeoidosa* 82 имеется начальный период, длящийся 1—1,5 ч, в течение которого в цитоплазме на 80S рибосомах начинается и завершается синтез белков, которые и обуславливают последующую способность клеток осуществлять синтез липидов, что видно из ингибирующей активности вносимого в этот период циклогексимиды.

Отсутствие ингибирования синтеза липидов под влиянием циклогексимиды, вносимого после этого периода, свидетельствует о завершении индуцированного синтеза ферментов, которые и осуществляют синтез липидов, несмотря на то, что 80S рибосомы блокированы.

Интересно отметить, что найденное нами время индукции синтеза белков, ответственных за синтез липидов, равное 1—1,5 ч, очень близко к времени индукции синтеза у *Chlorella* НАДФ-глутаматдегидрогеназы (1 ч) под влиянием аммония [12, 20].

Таким образом, в данном случае мы действительно имеем дело с примером адаптивной ферментной системы, т. е. индуцированного (адаптивного) синтеза белков *de novo*, который инициируется в процессе самонастраивания метаболизма клетки и является одним из необходимых элементов (этапов) цепи событий, развивающихся в системе хлоропласт — цитоплазма при блокировании деления клетки и переходе ее к синтезу запасных веществ.

Поскольку синтез вновь синтезируемых белков осуществляется в представленных опытах на среде, не содержащей азот, то мы должны

сделать и второй вывод о том, что индуцируемый синтез белка осуществляется в этих условиях за счет перераспределения и реутилизации внутриклеточного фонда аминокислот, что достигается, вероятно, путем расщепления каких-то ненужных клетке в этих условиях белков. Такие факты известны и получены при изучении, например, адаптации дрожжей, помещенных на среду, не содержащую азота, к галактозе, когда клетки синтезировали «галактозимазы», а активность ферментов, сбраживающих глюкозу, снижалась [12]. Перестройка активности ряда ферментов в голодающей по азоту синхронной культуре *Chl. pyrenoidosa* 82 показана в работе Бергера и Пирсона [26].

Таким образом, при разобщении клеточных функций нарушается хронологически детерминированная последовательность событий клеточного цикла и клетка хлореллы приобретает качественно новые свойства, превращаясь в своеобразную специализированную клетку с существенно удлиненным жизненным циклом, с новым набором ферментов и специализированным биосинтезом (рис. 4).

Этот вывод представляется нам интересным в связи с более широким кругом проблем внутриклеточной саморегуляции, поскольку клетка, поставленная в определенные условия, «должна решить» не только, **какой фермент** ей нужно синтезировать в данной ситуации, механизм чего можно себе представить, исходя из схемы Жакоба и Моно [27], но также и вопрос о том, за счет **какого белка** ей нужно это сделать и как осуществить **селективное** расщепление ненужных ферментов. Все это проблемы, которые требуют анализа целых систем и переводят нас в область молекулярной физиологии [28—31].

В нашем конкретном случае решение этих вопросов осуществляется, по-видимому, в результате следующей цепи событий.

Известно, что ионы аммония и нитрата являются важнейшими регуляторами процессов синтеза ряда ферментов в живой растительной клетке. Совершенно ясно, что не сам факт исключения из среды NO_3^- является фактором, индуцирующим синтез белков, необходимых для образования липидов, так как такое же, как при азотном голодании, накопление липидов идет, как было показано ранее [8, 10], и на полной питательной среде при разобщении клеточных функций этого штамма *Chlorella* под воздействием экстремальной температуры и при ингибировании деления клеток митомцином С. Однако исключение из среды нитрата, который известен не только как индуктор нитратредуктазы, но как фактор множественной или последовательной индукции целого ряда белков (нитритредуктазы, глутаматдегидрогеназы и др.) [12], ведет,

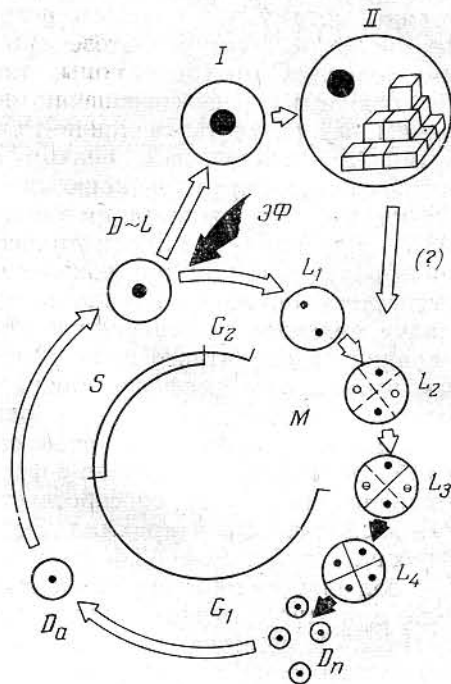


Рис. 4. Схема разобщения клеточных функций и перестройки («специализации») биосинтеза клетки *Chlorella* при действии экстремальных факторов (ЭФ)

$D_n, D_a, D \sim L, L_1 - L_4$ — стадии жизненного цикла по Тамия; G_1, S, G_2, M — периоды митотического цикла; I — период индукции ферментов специализированного биосинтеза, II — специализированный направленный синтез веществ

вероятно, к автоматическому выключению синтеза многих из индуцируемых им ферментов, что высвобождает аминокислоты, необходимые для синтеза других индуцируемых в этих условиях белков.

Какова природа внутриклеточного фактора — соединения, которое непосредственно осуществляет индукцию синтеза белков, необходимых для образования запасных липидов, сейчас сказать трудно. С одной стороны, потому, что в синтезе исходных соединений (глицерина и жирных кислот) и в самом синтезе триглицеридов участвует большой комплекс белков. С другой стороны, так как свойства и регуляция синтеза этих белков изучены совершенно недостаточно. Но, как вытекает из полученных результатов, какие-то из этих белков являются индуцируемыми. Возможно этим белком является ацетил-КоА-карбоксилаза, которая катализирует реакцию, ограничивающую скорость синтеза жирных кислот. Возможно таким белком является ацилпереносящий белок (АПБ) или ацил- и малонилтрансферазы. Очевидно, что при блокировании деления клеток при сохраняющейся высокой активности фотосинтетического аппарата начало возникновению соединения — индуктора кладут механизмы «энергетической регуляции», а именно степень «зарядки» аденилатного пула. Известно, что АТФ является отрицательным эффектором фосфофруктокиназы, вследствие этого накапливается фруктозо-6-фосфат, который, с одной стороны, может использоваться для синтеза сахарозы с помощью сахарозофосфат синтетазы, а с другой, преобразоваться в глюкозо-6-фосфат. Последний, в свою очередь, подавляя гексокиназу, способствует превращению глюкозы через глюкозо-1-фосфат-АДФГ в крахмал. Этот эффект может усиливаться стимулирующим действием АТФ на гексозо-дифосфатазу, в результате чего еще больше усиливается накопление фруктозо-6-фосфата. Так обстоит дело, вероятно, с синтезом углеводной фракции.

Но АТФ является также ингибитором цитрат-синтетазы, катализирующей включение ацетил-КоА в цикл Кребса. Подавление этого фермента снижает расходование ацетил-КоА в этом цикле и он может быть использован для синтеза жирных кислот и липидов при индукции соответствующих ферментов.

Таким образом, при управлении биосинтезом фотосинтезирующих клеток посредством разобщения клеточных функций в клетке возникает сложная цепь взаимосвязанных событий. Внешнее воздействие, приводящее в конечном итоге к направленному синтезу тех или иных соединений, оказывается опосредованным многими реакциями и выступает, таким образом, в роли не прямого индуктора синтеза этих соединений, а эвокатора. В данном случае, следовательно, осуществляется механизм, который укладывается в схему, предложенную Уоддингтоном [32].

ЛИТЕРАТУРА

1. Spöehr H. A., Milner H. W. *Plant. Physiol.*, **24**, 120, 1949.
2. Клячко-Гурвич Г. Л. *Физиол. растений*, **11**, 978, 1964.
3. Клячко-Гурвич Г. Л. В сб.: *Управляемый биосинтез*, 116. «Наука», 1966.
4. Клячко-Гурвич Г. Л., Семенов В. Е. Докл. III коорд. совещ. СЭВ, 143. Прага, 1965.
5. Жукова Т. С., Клячко-Гурвич Г. Л., Владимирова М. Г., Курносова Т. А. *Физиол. растений*, **16**, 96, 1969.
6. Гительзон И. И., Садикова Г. И., Бородкина Л. Н., Базанова М. И. В сб.: *Управляемый биосинтез*, 110. «Наука», 1966.
7. Семенов В. Е., Владимирова М. Г., Орлеанская О. Б., Райков Н. И., Кованова Е. С. *Физиол. растений*, **16**, 210, 1969.
8. Семенов В. Е., Зверева М. Г. *Физиол. растений*, **19**, 229, 1972.
9. Семенов В. Е., Касаткина Т. И., Гевондян А., Лапина Е. С. В сб.: *Матер. VII Всес. раб. совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе*, 134. Киев, «Наукова думка», 1972.
10. Семенов В. Е., Рудова Т. С. Там же, стр. 131.
11. Хавкин Э. Е. *Индукцируемый синтез ферментов в процессах роста и морфогенеза растений*. «Наука», 1969.

12. Кретович В. Л. Обмен азота в растениях. «Наука», 1972.
13. Шемякин М. М., Хохлов А. С., Колосов М. Н., Бергельсон Л. Д., Антонов В. К. Химия антибиотиков, 1. Изд-во АН СССР, 1961.
14. Рудин Д., Уилки Д. Биогенез митохондрий. «Мир», 1970.
15. Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. «Наука», 1971.
16. Smillie R. M., Scott N. S., Graham D. Comparative Biochemie a. Biophysics photo-synthesis, 353. Tokyo, 1967.
17. Morris G. Nature, 211, 1190, 1966.
18. Smillie R. M., Scott N. S. Progress in molecular and subcellular biology, 1, 136. Springer — Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1969.
19. Evans W. R. J. Biol. Chem., 246, 20, 6144, 1971.
20. Томова Н. Г., Евстигнеева З. Г., Кретович В. Л. Биохимия, 34, 249, 1969.
21. Kretovich W. L., Evstigneeva Z. G., Tomova N. G. Canad. J. Bot., 48, 1179, 1970.
22. Евстигнеева З. Г., Асеева К. Б., Мочалкина Н. А., Кретович В. Л. Биохимия, 36, 388, 1971.
23. Семененко В. Е., Афанасьева В. П. Физиол. растений, 19, 1074, 1972.
24. Dubois M., Gilles K. A., Namihloh J. K. Ann. Chem., 28, 350, 1956.
25. Клячко-Гурвич Г. Л., Мартемьянова Т. И. В сб.: Материалы VIII Всес. раб. совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе, 76. Киев, «Наукова думка», 1974.
26. Berger C., Pirson A. Flora, 158A, 164, 1967.
27. Jacob F., Monod J. J. Molec. Biol., 3, 318, 1961.
28. Грин Д., Гольдберг Р. Молекулярные аспекты жизни. «Мир», 1968.
29. Боннер Д. Молекулярная биология развития. «Мир», 1967.
30. Курсанов А. Л. В сб.: Теоретические основы фотосинтетической продуктивности, 286. «Наука», 1972.
31. Коротяев А. И. Механизм саморегулирования бактериальной клетки. «Медицина», 1972.
32. Waddington C. H. Principles of development and differentiation. N. Y. Macmillan Co., 1966.

Поступила в редакцию
21.VI.1974

EFFECT OF CYCLOHEXIMIDE ON CHANGES OF THE BIOSYNTHESIS IN CHLORELLA CELLS CAUSED BY NITROGEN STARVATION

V. E. SEMENENKO, T. S. RUDOVA

K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology, USSR
Academy of Sciences, Moscow

The effect of cycloheximide on changes of the biosynthesis in two strains of *Chlorella* was studied in the conditions of nitrogen starvation. The lipid-accumulating strain of *Chl. pyrenoidosa* 82 lost the ability to synthesize lipids if the concentration of cycloheximide was 3 mcg/ml. The total amount of protein decreased and the content of carbohydrates was 100 percent of the biomass increase. Cycloheximide had no effect on substances synthesized in the conditions of nitrogen starvation in the strain of *Chlorella* sp. K accumulating carbohydrates.

Analysis of the kinetics during the extreme inhibitor action on the accumulation of lipids by the strain of *Chl. pyrenoidosa* 82 has revealed a starting period of 1.0 to 1.5 hours. This period is necessary for the synthesis on 80 S ribosomes in the cytoplasm of proteins which are involved in the production of lipids in the cells. Therefore, the accumulation of lipids by this strain in the conditions of nitrogen starvation requires preliminary synthesis *de novo* of presumably induced adaptive enzymes.