

УДК 581.19; 612.015.33

## ОБРАТИМОЕ ПОДАВЛЕНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКА ФРАКЦИИ I ПОД ВЛИЯНИЕМ 2-ДЕЗОКСИ-D-ГЛЮКОЗЫ

*В. Е. СЕМЕНЕНКО, Т. И. КАСАТКИНА, Т. С. РУДОВА*

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

Ранее нами было показано, что 2-дезоксид-D-глюкоза (2дДГ), как слабометаболизуемый при экзогенном введении аналог конечных продуктов фотосинтеза, вызывает глубокое, но полностью обратимое подавление фотосинтеза, синтеза хлорофилла и структурной организации хлоропласта клеток хлореллы.

В данной работе проведено сравнительное изучение действия 2дДГ на синтез (количественное содержание) в клетках *Chlorella* sp. К высокообогащенного рибулезодифосфаткарбоксилазой белка «фракции I» (БФ I), суммарного комплекса растворимых белков и белковой фракции, не содержащей БФ I. Показано, что 2дДГ вызывает специфическое, но полностью обратимое подавление БФ I в отличие от других растворимых белков, синтез которых не подавляется. Изучено также влияние актиномицина Д, рифампицина, хлорамфеникола и циклогексимида на возобновление синтеза БФ I после удаления (отмывания) 2дДГ. Показано, что возобновляющийся после удаления 2дДГ синтез БФ I подавляется актиномицином и рифампицином почти в равной степени, а хлорамфениколом примерно в 5 раз сильнее, чем циклогексимидом. Делается вывод о том, что 2дДГ репрессирует функциональную активность хлоропласта на уровне синтеза белков, нарушая в хлоропласте процесс транскрипции. Высказывается предположение о существовании в хлоропласте молекулярного механизма (feed back механизма) метаболической регуляции фотосинтеза на уровне синтеза хлоропластных белков, в котором глюкоза выполняет функцию корепрессора.

Для понимания принципиальной организации и молекулярных механизмов эндогенной регуляции фотосинтеза особенно важное значение имеет исследование механизмов, контролирующих синтез энзиматических и структурных белков хлоропласта.

Являясь генетически детерминированной физиологической функцией растений, фотосинтез и структурная организация фотосинтетического аппарата подвержены в системе целой клетки строгому генетическому контролю и тонкой метаболической регуляции. В настоящее время относительно полно изучены кинетические свойства многих из важнейших ферментов хлоропласта и регуляции фотосинтеза на уровне действия (активности) этих ферментов, значительное число которых обладает аллостерическими свойствами [1—7]. Вместе с тем регуляция фотосинтеза на уровне синтеза энзиматических и структурных белков хлоропласта и в особенности механизмы динамической регуляции их синтеза в сформированном хлоропласте совершенно не изучены и остаются неясными даже в общих чертах; наличие в хлоропласте собственной ДНК с достаточно большой информационной емкостью, рибосом и других компонентов белоксинтезирующей системы предопределяет существование в хлоропласте регуляторных механизмов, контролирующих функциональную активность фотосинтетического аппарата на уровне белковонуклеинового обмена хлоропласта [8—10]. Существенный интерес при этом представляет изучение регуляторной роли конечных продуктов фотосинтеза и углеводного обмена хлоропласта и выяснение вопро-

са о существовании в системе эндогенной регуляции синтеза белков в хлоропласте *feed back* механизма метаболической регуляции с участием в качестве корепрессора соединений, образующихся в хлоропласте в процессе фотосинтеза.

Особенно интересным в этой связи является, как мы отмечали [8, 9], изучение регуляторной роли глюкозы. Для глюкозы известна, с одной стороны, высокая регуляторная активность в клетках многих прокариотных организмов, где в ряде случаев она вызывает репрессию синтеза белков [11—13]. С другой стороны, глюкоза может занимать ключевое положение в регуляции функции хлоропласта на уровне белкового синтеза, так как возникновение ее в углеводном обмене хлоропласта в свободном виде может иметь место, очевидно, только после полного удовлетворения потребностей клетки в транспортируемых из хлоропласта продуктах фотосинтеза и заполнения в хлоропласте пула запасного крахмала [9], т. е. тогда, когда может быть биологически целесообразным полное «выключение» функции хлоропласта. Следует подчеркнуть, что многие исследователи неоднократно обращались к изучению влияния глюкозы на фотосинтез, используя методы инфильтрации листьев растворами глюкозы или внесения ее в среду одноклеточных водорослей, и не нашли сколь-либо заметного угнетения фотосинтеза. Подобные результаты были получены на клетках хлореллы и в нашей лаборатории [8, 14], что формально указывает на отсутствие регуляторного действия глюкозы в хлоропласте. Однако такое заключение, очевидно, является преждевременным, поскольку на пути из околочлоропластного пространства глюкоза наталкивается на многочисленные метаболические барьеры, в которых молекула ее подвергается деградации и окислению или конденсируется в полисахариды. Поэтому такого рода эксперименты не являются, как нам кажется, достаточными для заключений о регуляторной функции глюкозы в хлоропласте.

Для выяснения этого, старого по существу вопроса «о влиянии ассимилятов на фотосинтез» нами впервые был применен новый подход, основанный на использовании неметаболизируемых или слабометаболизируемых химических аналогов конечных продуктов фотосинтеза [8, 9, 15], в частности аналогов глюкозы — 2-дезоксид-глюкозы (2дДГ) и 3-о-метилглюкозы, что позволило обнаружить ярко выраженный глюкозный эффект светозависимой легко обратимой репрессии фотосинтетического аппарата.

Было показано [8, 9, 15, 16], что под влиянием 2дДГ в клетках *Chlorella sp.* К происходит глубокое, но полностью обратимое подавление фотосинтеза, которое сопровождается постепенным уменьшением угла наклона и уровня плато световых кривых; полное, вплоть до появления бесцветных клеток, подавление синтеза хлорофилла также легко восстанавливается после удаления (отмывания) 2дДГ.

Процесс подавления функциональной активности и биосинтеза хлоропласта под влиянием 2дДГ, как показала Владимирова, сопровождается существенными изменениями ультраструктуры хлоропласта, характерной особенностью которых является расхождение и фрагментирование тилакоидов, вплоть до появления свободно плавающих тилакоидных мешков, полное исчезновение пиреноида [17]. При этом полученные кинетические и временные характеристики процесса подавления функциональной активности и биосинтеза хлоропласта и обратного их восстановления после отмывания аналога глюкозы различаются достаточно длительными интервалами времени — 3—5 ч, что наводит на мысль о возможности репрессирующего действия 2дДГ на уровне синтеза белков в хлоропласте.

Целью настоящей работы было изучение действия 2дДГ на синтез белка фракции I, в которой локализован один из ключевых ферментов

пентозофосфатного восстановительного цикла углерода — рибулезо-1,5-дифосфаткарбоксилаза, а также выяснение влияния органеллспецифических ингибиторов транскрипции (актиномицина Д и рифампицина) и трансляции (хлорамфеникола и циклогексимида) на возобновление синтеза этого белка после удаления 2дДГ.

## МЕТОДИКА

Объект исследования и условия проведения опытов. Опыты ставили на штамме *Chlorella* sp. K. Выращивание проводили в стерильных условиях в специальных стеклянных микрочайках объемом 19 мл [8] и в стеклянных сосудах с плоскопараллельными стенками объемом 250 мл в условиях интенсивной накопительной культуры [18] при круглосуточном двухстороннем освещении люминесцентными лампами (60 тыс. эрг·см<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>), при температуре 36° и непрерывном барботировании газовой смеси с 1,7% CO<sub>2</sub>. В качестве питательной среды использовали среду Таммий с нитратным азотом [18].

Культуру выращивали до плотности 100·10<sup>6</sup> клеток в мл, после чего вносили 2дДГ в конечной концентрации 0,5%. 2дДГ фирмы «Реанал» (Венгрия) и «Хемапол» (Чехословакия) перед внесением в культуру стерилизовали холодным методом посредством фильтрации через бактериальный стеклянный фильтр G-5 (Jena). Через 48 ч действия 2дДГ, когда клетки практически обесцвечивались [8], проводили отмывание 2дДГ посредством центрифугирования в стерильных условиях и ресуспендирования клеток в свежую питательную среду Таммий без 2дДГ. Далее отмывую от 2дДГ культуру разливали в 5 сосудов (5 вариантов) по 50 мл и ставили в описанные выше условия, оптимальные для роста данного штамма. При этом 1-й вариант оставляли расти в обычных условиях для выяснения обратимости действия 2дДГ на белковый синтез, а во 2-й—5-й варианты вносили соответственно актиномицин Д фирмы «Serva» (конечная концентрация 80 мкг/мл), рифампицин производства группы «Lepetit» (конечная концентрация 300 мкг/мл), хлорамфеникол советского производства (конечная концентрация 1 мг/мл) и циклогексимид фирмы «Serva» (конечная концентрация 5 мкг/мл) для выяснения влияния органеллспецифических ингибиторов транскрипции и трансляции на возобновляющийся после снятия 2дДГ-репрессии синтез белков и восстановление функций хлоропласта.

Анализ количественного содержания различных фракций белков, содержания хлорофилла, численности клеток и некоторых других параметров проводили до внесения в культуру 2дДГ — исходная культура, через 48 ч действия 2дДГ и через 50 ч после удаления (отмывания) 2дДГ и соответственно действия в 2—5 вариантах различных антибиотиков.

Дезинтеграция клеток и количественное извлечение растворимых белков. Для разрушения клетки отделяли центрифугированием на холоду от культуральной жидкости, промывали буфером и ресуспендировали в охлажденный 0,067 М фосфатный буфер с рН 7,4. Дезинтеграцию клеток проводили на холоду в ротационном дезинтеграторе со стеклянными бусами по описанной ранее методике [19], которая обеспечивает практически 100%-ное разрушение клеток и полный выход растворимых белков, что позволяет рассчитывать их содержание на индивидуальную клетку. После разрушения клеток гомогенат количественно отделяли от бус, проводили ступенчатое центрифугирование последовательно при 3, 5, 14 и 18 тыс. g соответственно 5, 10, 20 и 60 мин при 2° и тотальный препарат растворимых белков из надосадочной жидкости подвергали фракционированию.

Фракционирование тотального препарата растворимых белков и извлечение белка фракции I проводили посредством дробного высаливания сульфатом аммония. При этом преследовали цель разделить комплекс растворимых белков на две фракции: фракцию, максимально обогащенную рибулезо-1,5-дифосфаткарбоксилазой, и белковую фракцию, лишенную карбоксилирующей активности, с тем, чтобы провести сравнительное изучение действия 2дДГ на количественное содержание белков двух таких фракций. Получаемые фракции белков тестировали с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле, гель-фильтрации через колонки с сефадексом Г-200, измерения энзиматической активности — в реакции карбоксилирования рибулезо-1,5-дифосфата. Было показано, что при высаливании сульфатом аммония в концентрации 34% от насыщения из тотального препарата растворимых белков клетки хлореллы выделяется достаточно простая фракция, основную часть которой составляет электрофоретически малоподвижный высокомолекулярный белок. При гель-фильтрации через колонки с сефадексом Г-200 этот белок выходит в виде одного пика и имеет молекулярный вес 496 000, рассчитанный из соотношения  $lg M = 6,698 - 0,987 v_e/v_0$ .

Вторую белковую фракцию получали из тотального препарата растворимых белков после выделения из него первой фракции путем высаливания сульфатом аммония в концентрации от 34 до 80% от насыщения. Как показал электрофоретический анализ в ПААГ, эта фракция имеет достаточно сложный набор индивидуальных белков с различной электрофоретической подвижностью.

Определение рибулезо-1,5-дифосфаткарбоксилазы (НФ 4.1.1.3.9) в выделенных белковых фракциях, проведенное<sup>1</sup> радиометрическим методом с использованием в качестве субстрата рибулезо-1,5-дифосфата, показало, что в первой из выделенных фракций (34%) практически полностью локализована рибулезо-1,5-дифосфаткарбоксилаза с высокой удельной активностью, тогда как удельная активность второй фракции (34—80%) составляет менее 1%.

Белковые фракции (высаливание (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , %	Удельная активность РДФК МЕ/мг белка
30	3 627,3
30—80	142,0
34	10 228,0
34—80	6,3

Таким образом, на основании всех приведенных характеристик первая из выделенных фракций (34%) должна быть идентифицирована как белок, получивший в литературе название белок «фракции I».

Количество белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм на спектрофотометре, который предварительно был проградуирован по белкам данного штамма хлореллы, определявшимся по Кьельдалю и Лоури после их высаливания сульфатом аммония и обессоливания на колонках с сефадексом Г-25.

Кроме перечисленных методов для идентификации рибулезодифосфаткарбоксилазы в выделенных белковых фракциях использовали иммунохимический метод преципитации в агаре с применением моноспецифической антисыворотки, полученной против высокоочищенного препарата рибулезодифосфаткарбоксилазы, выделенной из этого же штамма хлореллы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние 2-дезоксид-Д-глюкозы (2дДГ) на синтез белка фракции I и других растворимых белков клетки *Chlorella sp. K*. Для понимания механизма и специфичности действия 2дДГ на фотосинтетический аппарат существенным является изучение влияния 2дДГ на количественное содержание в клетке специфических для хлоропласта белков в сопоставлении с ее действием на суммарное содержание растворимых белков и белков цитоплазматического происхождения. В качестве представителя хлоропластных белков в данной работе был избран белок «фракции I», основную массу которого составляет, как известно, один из наиболее специфических, ключевых ферментов хлоропласта — рибулезодифосфаткарбоксилаза, что видно также из представленных выше характеристик этого белка. В качестве сравнимой белковой фракции была взята фракция растворимых белков, из которой был полностью извлечен белок «фракции I». Следует при этом подчеркнуть, что для решения поставленных вопросов важным является изучение действия 2дДГ именно на количественное изменение содержания отдельных белков в клетке, а не на их энзиматическую активность, которая, как известно, может изменяться не только вследствие нарушений синтеза ферментов, но и в результате изменения их каталитической активности.

Как видно из табл. 1, 2дДГ вызывает значительное уменьшение количества содержащихся в клетке хлореллы растворимых белков. При этом уменьшение содержания суммарного растворимого белка обусловлено, очевидно, подавлением синтеза именно белка «фракции I», количество которого уменьшается за 48 ч более чем на 70%, в то время как содержание белковой фракции, не содержащей белка «фракции I», за время экспозиции не только не уменьшилось, но даже возросло, что свидетельствует о специфичности действия 2дДГ на синтез белков хлоропласта. Следует при этом подчеркнуть, что иммунохимическое тестирование белков «фракции I», оставшихся после действия 2дДГ, не давало реакции преципитации с антисывороткой, специфичной к рибулезодифосфаткарбоксилазе.

<sup>1</sup> Определение активности рибулезодифосфаткарбоксилазы в полученных белковых фракциях проведено И. Г. Чернядьевым.

Таблица 1

Действие 2-дезоксид-Д-глюкозы на синтез белка «фракции I» и других растворимых белков клетки *Chlorella sp.* K

Вариант	Содержание белка на 10 <sup>9</sup> клеток, мг		
	суммарный растворимый белок	белок фракции I, 34% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	белок фракции, 34—80% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Исходная культура	1,36	0,68	0,32
+2дДГ	0,88	0,20	0,49
-2дДГ	1,52	0,76	0,41

Особенно важным является то, что после удаления (отмывания) 2дДГ синтез белка возобновляется и количество белка «фракции I» полностью восстанавливается до исходного уровня, указывая на полную обратимость эффекта репрессии синтеза белка под влиянием 2дДГ.

Таким образом, представленные результаты показывают, что 2дДГ, вызывая репрессию функциональной активности фотосинтетического аппарата, затрагивает уровень синтеза белков хлоропласта, что видно на примере специфического и обратимого подавления синтеза белка «фракции I».

Влияние органеллспецифических ингибиторов транскрипции и трансляции на возобновление синтеза белка «фракции I» после снятия 2-дезоксид-Д-глюкозной репрессии. Для выяснения вопроса о локализации репрессирующего действия 2дДГ в системе синтеза белков хлоропласта было изучено влияние актиномицина Д, рифампицина, хлорамфеникола и циклогексимида на возобновление синтеза белка «фракции I» в клетках хлореллы после отмывания 2дДГ.

Таблица 2

Влияние хлорамфеникола, циклогексимида, актиномицина Д и рифампицина на возобновление синтеза белка «фракции I» в клетках хлореллы после удаления из среды 2-дезоксид-Д-глюкозы

Вариант	Содержание белка на 10 <sup>9</sup> клеток	
	мг	%
-2дДГ (контроль)	0,76	100,0
-2дДГ+хлорамфеникол (1 мг/мл)	0,03	4,0
-2дДГ+циклогексимид (5 мкг/мл)	0,14	18,4
-2дДГ (контроль)	0,88	100,0
-2дДГ+актиномицин Д (80 мкг/мл)	0,38	43,0
-2дДГ+рифампицин (300 мкг/мл)	0,52	59,0

Как видно из табл. 2, возобновляющийся после отмывания 2дДГ синтез белка «фракции I» подавляется хлорамфениколом почти в 5 раз сильнее, чем циклогексимидом, и подавляется также актиномицином Д и рифампицином. Из этого следует, что во время действия 2дДГ были репрессированы процессы, репарация которых после отмывания 2-дезоксид-Д-глюкозы начинается, очевидно, с синтеза РНК.

При этом особый интерес представляет ингибирование возобновляющегося после отмывания 2дДГ синтеза белка «фракции I» под влиянием рифампицина — специфического ингибитора бактериальной и хлоропластной ДНК-зависимой РНК-полимеразы и неактивного в отношении РНК-полимеразы животных [20—22]. Как видно из табл. 2, степень по-

давления возобновляющегося синтеза белка «фракции I» под влиянием рифампицина близка к подавлению его актиномицином Д — неспецифическим ингибитором ДНК-зависимого синтеза РНК у прокариотических и эукариотических клеток. Этот результат указывает, что возобновляющийся синтез белка «фракции I» зависит от восстановления синтеза РНК, локализованного в основном в хлоропласте. Но поскольку значительную часть выделяемого применявшимися методами белка «фракции I» составляет рибулез-1,5-дифосфаткарбоксилаза, малые субъединицы которой кодируются в ядерной ДНК, из полученных зависимостей следует, что репарация процессов синтеза белка «фракции I» связана, по-видимому, не с синтезом иРНК, а с синтезом других форм нуклеиновых кислот, возможно рРНК или тРНК, тем более что процесс 2дДГ-репрессии вызывает, как мы видели, подавление также синтеза хлорофилла, функции хлоропласта и является светозависимым процессом [8, 9]. Однако для решения этих важных и очень интересных вопросов необходимы, безусловно, дальнейшие исследования с применением кинетического ингибиторного анализа  $\alpha$ -аманитина (специфического ингибитора для ядерного ДНК-зависимого синтеза РНК) и прямых методов измерения синтеза хлоропластных и цитоплазматических нуклеиновых кислот.

Приведенные в работе данные о специфическом, но полностью обратимом действии 2дДГ на синтез белка «фракции I», а также результаты действия ингибиторов транскрипции и трансляции на возобновление синтеза этого белка после удаления 2дДГ указывают на то, что 2дДГ репрессирует функциональную активность хлоропласта на уровне синтеза белков, нарушая, очевидно, в хлоропласте процессы транскрипции. Это может указывать на существование в хлоропласте системы метаболической регуляции синтеза белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bassham T. A. Science, **172**, 597, 1971.
2. Sugiyama T., Matsumoto C., Akazawa T. Arch. Biochem. and Biophys., **129**, 737, 1969.
3. Bowes G., Ogren W. J. Biol. Chem., **247**, 2171, 1972.
4. Paulsen T. M., Lane M. D. Biochemistry, **5**, 2350, 1966.
5. Романова А. К. Успехи микробиол., **10**, 27, 1975.
6. Johnson E., McElroy R. D. Arch. Mikrobiol., **93**, 23, 1973.
7. McElroy R. D., Mack H. M., Johnson E. T. J. Bacteriol., **112**, 532, 1972.
8. Семенов В. Е., Афанасьева В. П. Физиол. растений, **19**, 1074, 1972.
9. Семенов В. Е. В сб.: Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений, 135. «Наука», 1975.
10. Семенов В. Е., Зверева М. Г., Климова Л. А. В сб.: Итоги исследования механизма фотосинтеза, 65. Пушино-на-Оке, 1976.
11. Magasanik A. K., Boyarska A. Biochem. et Biophys. Res. Commun., **2**, 77, 1960.
12. Магасаник Б. В сб.: Регуляторные механизмы клетки, 358. «Мир», 1964.
13. Моно Ж., Жакоб Ф. В сб.: Регуляторные механизмы клетки, 477. «Мир», 1964.
14. Афанасьева В. П., Семенов В. Е. В сб.: Материалы VII Всесоюзного рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе, 133. Киев, «Наукова думка», 1972.
15. Semenenko V. E. XII International Botanical Congress, 412.
16. Семенов В. Е., Касаткина Т. И., Купцова Е. С., Рудова Т. С. В сб.: Материалы VIII Всесоюзного рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе, 58. Киев, «Наукова думка», 1974.
17. Владимирова М. Г., Семенов В. Е. Материалы X Всесоюзной конференции по электронной микроскопии, 357. Ташкент, 1976.
18. Владимирова М. Г., Семенов В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. Изд-во АН СССР, 1962.
19. Семенов В. Е., Касаткина Т. И. Физиол. растений, **19**, 169, 1972.
20. Berger S. Protoplasma, **64**, 13, 1967.
21. Wehrli W., Rnüsel F., Schmid K., Stachelin M. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **61**, 667, 1968.
22. Surzycki S. J., Goodenough U. W., Levine R. P., Armstrong J. J. Sympos. Soc. Experiment. Biol., **24**, 13, 1970.

Поступила в редакцию  
9.VII.1976

## REVERSIBLE SUPPRESSION OF FRACTION I PROTEIN SYNTHESIS BY 2-DEOXY-D-GLUCOSE

V. E. SEMENENKO, T. I. KASATKINA, T. S. RUDOVA

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

As was previously shown, 2-deoxy-D-glucose (2dDG) as a weakly metabolized analogue of terminal products of photosynthesis, induced deep, but totally reversible inhibition of photosynthesis, chlorophyll synthesis and chloroplast structural organization of *Chlorella* cells. In this paper the comparative investigation of 2dDG effect on the synthesis of protein rich in ribulosediphosphate carboxylase «fraction I» (PF I), crude complex of soluble proteins and protein fraction free of PF I in *Chlorella* sp. K. cells is described. It was demonstrated that 2dDG induced specific but totally reversible inhibition of PF I, whereas other soluble proteins were not inhibited. The effect of actinomycin D, rifampycin, chloramphenicol and cycloheximide on the resumption of PF I synthesis after the removal of 2dDG was studied. The synthesis of PF I resumed after the 2dDG removal was shown to be equally inhibited both by actinomycin and rifampycin while chloramphenicol was five times as effective as cycloheximide. Thus 2dDG repressed the functional activity of chloroplasts at the level of protein synthesis via the inhibition of transcription. It is supposed that there exists a feedback mechanism of metabolic regulation of photosynthesis in chloroplasts at the level of chloroplast protein synthesis where glucose plays a role of corepressor.

---