

М. Г. ЗВЕРЕВА, Л. М. ШУБИН, Л. А. КЛИМОВА, В. Е. СЕМЕНЕНКО

**ОБРАТИМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРОВ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ИНТАКТНЫХ КЛЕТОК CHLORELLA,
ВЫЗЫВАЕМОЕ РЕПРЕССИЕЙ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА
2-ДЕЗОКСИ-D-ГЛЮКОЗОЙ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 1 VIII 1978)

Являясь одной из важнейших энергопреобразующих органелл растительной клетки, хлоропласт включает в себя не только систему реакций, которые непосредственно участвуют в процессах фотосинтетического преобразования энергии, но содержит также собственную генетическую и белоксинтезирующую системы, которые участвуют в синтезе ряда важных компонентов фотосинтетического аппарата. Взаимодействие и интеграция этих двух систем лежат в основе механизмов эндогенной регуляции фотосинтеза и определяют способность хлоропласта к самонастраиванию и регуляции функциональных адаптивно-приспособительных перестроек его структурной организации, что может осуществляться через регуляцию синтеза ферментов и других белков хлоропласта с участием, в качестве эффектов, продуктов фотосинтетического восстановления углерода^(1, 2).

Ранее было показано, что 2-дезоксид-D-глюкоза (2дДГ), использованная как слабометаболизируемый химический аналог конечных продуктов фотосинтеза, вызывает глубокое, но полностью обратимое подавление включения ¹⁴C-урацила в РНК клеток Chlorella⁽³⁾, подавление синтеза белка фракции 1^(2, 4), рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы, фосфорibuлокиназы, рибозо-5-фосфатизомеразы, карбоангидразы⁽³⁾. Процесс этот сопровождается обратимым подавлением фотосинтетического выделения кислорода⁽¹⁻³⁾ и синтеза хлорофилла, вплоть до появления бесцветных клеток⁽¹⁾. Показано также, что 2дДГ вызывает существенные нарушения ультраструктурной организации хлоропласта, которые выражаются в расхождении спрессованных в норме тилакоидов, их расхождении и фрагментации^(5, 6).

Нарушение синтеза хлорофилла, фотосинтетического выделения кислорода и ультраструктурной организации хлоропласта может указывать на то, что 2дДГ вызывает репрессию синтеза не только растворимых белков и ферментов, но также и структурных белков фотосинтетических мембран хлоропласта, среди которых имеются, как показано, быстрообновляемые компоненты⁽⁷⁾.

В настоящей работе исследовано действие 2дДГ на изменение состояния пигментов, в частности, степень агрегации хлорофилла и состояние фотохимических систем хлоропластов в клетках хлореллы с помощью методов измерения 2-й производной спектров поглощения и низкотемпературных (-196 °C) спектров флуоресценции. Исследования проводили на клетках Chlorella sp.К. Культуру выращивали на среде Тамия в стерильных условиях, в накопительном режиме⁽⁸⁾, при оптимальной (36 °C) температуре, непрерывном барботировании суспензии газовой

смесью с 1,7% CO₂ и круглосуточном освещении люминесцентными лампами (50 тыс. эрг/см²·с). 2дДГ (фирмы «Хемапол») стерилизовали холодным способом, фильтрованием через бактериальные фильтры и вносили в культуры в конечной концентрации 0,5%. Спектры поглощения и их вторые производные измеряли при комнатной температуре и при -196 °С на двухлучевом двухволновом спектрофотометре «Хитачи» (модель 356), оборудованном специальной приставкой. Спектры низкотемпературной флуоресценции регистрировали по общепринятой методике (9). Длина волны возбуждающего света 430 нм. Для исключения реадсорбции использовали разбавленные образцы, менее 0,2D в 1-сантиметровой кювете, а измерения проводили в тонком слое, менее 0,1 см.

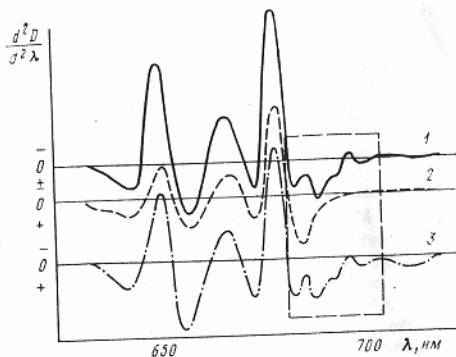


Рис. 1. Влияние 2-дезоксид-Д-глюкозы на вторую производную спектров поглощения клеток *Chlorella* при -196 °С. 1 — контроль; 2 — 36 ч действия 2дДГ; 3 — восстановленная культура после отмывания 2дДГ

Известно, что фотосистемы I и II различаются по составу длинноволновых (агрегированных) и коротковолновых (слабоагрегированных, мономерных) форм хлорофилла, низкотемпературные спектры флуоресценции которых имеют различные максимумы излучения: фотосистема I в области 725—735 нм, фотосистема II в области 693—698 нм (10—12).

Как видно из второй производной спектров поглощения при -196 °С (рис. 1), в клетках исходной культуры *Chlorella* sp. K обнаруживаются 7 форм хлорофилла а: 662, 668, 678, 687, 692, 697 и 703—705 нм. При действии 2дДГ происходит нарушение характерной структуры красной полосы поглощения хлорофилла а, а именно: наблюдается исчезновение длинноволновых пиков 687, 692, 697 и 703—705 нм, которые соответствуют, как показано (13), высокоагрегированным формам хлорофилла а. Такие изменения свидетельствуют о дезагрегации этих форм, что может быть обусловлено нарушением в результате действия аналога глюкозы упаковки хлорофилла вследствие подавления синтеза каких-то структурных белков, ответственных за организацию пигментбелковых комплексов в хлоропласте.

При отмывании клеток от 2дДГ происходит обратное появление длинноволновых пиков и восстановление исходной структуры красной полосы поглощения хлорофилла. Важно отметить при этом, что агрегированные формы хлорофилла а обнаруживаются уже в первых спектрах, которые удается измерить после отмывания 2дДГ.

В низкотемпературных спектрах флуоресценции контрольных клеток *Chlorella* sp. K (рис. 2) отчетливо видны три максимума в области 693, 705—707 и 735 нм. Нарушения, связанные с действием 2дДГ, приводят, прежде всего, как видно из рисунка, к уменьшению самой длинноволновой флуоресценции при 735 нм (F₇₃₅), которая, по литературным данным, принадлежит фотосистеме I (10, 11). При более длительной инкубации с 2дДГ F₇₃₅ пропадает совсем и спектр флуоресценции состоит в основном из F₆₉₃ и F₇₀₅, что соответствует, очевидно, у этого объекта флуоресценции молекул хлорофилла антенны и хлорофилла, принадлежащего фотосистеме II

(¹¹, ¹²). Описанные изменения спектров низкотемпературной флуоресценции полностью обратимы, на что указывает восстановление характерной их структуры после отмывания клеток хлореллы от 2дДГ и выдерживания их определенное время в оптимальных для роста условиях.

Анализ временного хода изменений флуоресценции при 735 нм при действии 2дДГ на клетки хлореллы и флуоресценции при 705 нм показывает (рис. 3), что угасание флуоресценции фотосистемы I начиналось в описанных условиях опытов через 20 ч. При этом по мере снижения F_{735} происходит возрастание F_{705} , которая увеличивается до 45 ч, после чего

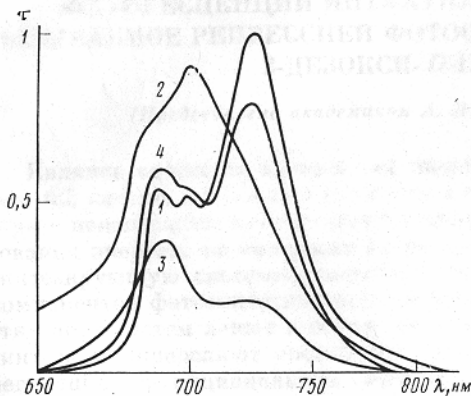


Рис. 2

Рис. 2. Изменение спектров низкотемпературной флуоресценции клеток *Chlorella* под влиянием 2дДГ. 1 — контроль; 2 — 36 ч действия 2дДГ; 3 — 72 ч действия 2дДГ; 4 — 48 ч после отмывания 2дДГ

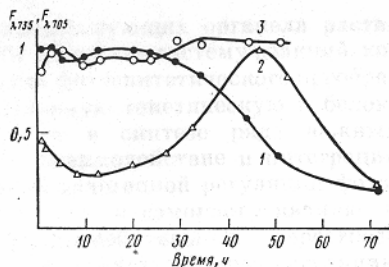


Рис. 3

Рис. 3. Динамика изменения низкотемпературной флуоресценции *Chlorella* при 735 и 705 нм при действии 2-дезоксид-Д-глюкозы на свету и в темноте. 1, 3 — флуоресценция при 735 нм; 2 — флуоресценция при 705 нм; 1 — культура находилась на свету; 3 — культура находилась в темноте

также начинает снижаться. Комплементарный ход этих кривых может свидетельствовать о постепенной дезагрегации длинноволновых форм хлорофилла и переходе его в менее агрегированные формы. Поскольку способность к свечению изменяется пропорционально изменению концентрации агрегированных форм хлорофилла, что показано для зеленющих листьев (¹⁴), можно думать, что уменьшение F_{735} при действии 2дДГ обусловлено постепенным выпадением в мембранах хлоропластов отдельных реакционных центров фотосистемы I.

Существенным обстоятельством является то, что при действии 2дДГ на клетки хлореллы в темноте в них, в отличие от световых вариантов, не происходит нарушений спектров низкотемпературной флуоресценции и F_{735} остается на исходном уровне. Это соответствует полученным ранее данным (^{1, 2}) о светозависимости репрессирующего действия 2дДГ на биосинтез хлоропласта. Обращает на себя внимание также то, что характер вызываемых 2дДГ спектральных изменений флуоресценции хлоропласта подобен тем, которые наблюдаются при подавлении синтеза белков и РНК в хлоропласте оргanelлспецифическими антибиотиками (¹⁵).

Полученные результаты указывают на то, что 2дДГ репрессирует, очевидно, синтез не только ферментов хлоропласта, но также и белковых ком-

понентов фотосинтетических мембран, в частности белков пигментбелковых комплексов, которые являются специфическими носителями нативных форм хлорофилла фотохимических систем хлоропласта.

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

Поступило
7 VIII 1978.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Щуцино Московской обл.

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Е. Семенов, В. П. Афанасьева, Физиол. раст., т. 19, № 5, 1074 (1972).
² В. Е. Семенов, В сб.: Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений, М., 1975, стр. 135. ³ В. Е. Семенов, Е. С. Купцова и др., В сб.: Матер. X Всесоюзн. рабочего совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов, Киев, 1978, стр. 112. ⁴ В. Е. Семенов, Т. И. Касаткина, Т. С. Рудова, Физиол. раст., т. 23, № 6, 1225 (1976). ⁵ М. Г. Владимирова, Физиол. раст., т. 23, № 6, 1180 (1976). ⁶ М. Г. Владимирова, В. Е. Семенов, In: Proc. of the XV Czechoslovak Conference on Electron Microscopy with International Participation, N. A., Praha, 1977, p. 237. ⁷ С. А. Price, Coll. Intern. CNRS, № 261, 473 (1977). ⁸ М. Г. Владимирова, В. Е. Семенов, Интенсивная культура одноклеточных водорослей, М., 1962. ⁹ Ф. Ф. Лурвин, В сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, М., 1965, стр. 96. ¹⁰ Фотохимические системы хлоропластов, Киев, 1975. ¹¹ F. Cho, R. Govindjee, Biochim. et biophys. acta, v. 216, № 1, 139 (1970). ¹² R. J. Strasser, W. L. Butler, Biochim. et biophys. acta, v. 462, № 2, 307 (1977). ¹³ Ф. Ф. Лурвин, Б. А. Гуляев, ДАН, т. 189, № 6, 1385 (1969). ¹⁴ Ф. Ф. Лурвин, В. А. Шувалов, А. А. Красновский, мл., ДАН, т. 168, № 5, 1195 (1966). ¹⁵ R. G. Hiller, T. B. G. Pilger, G. Sandra, Biochim. et biophys. acta, v. 460, № 3, 431 (1977).