



УДК 577.11

ОБ ИЗМЕНЕНИЯХ ФОСФОЛИПИДОВ МЕМБРАННОЙ СИСТЕМЫ ПЛАСТИД ПРИ ФОРМИРОВАНИИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СВЕТА*Молчанов М. И., Балаур Н. С., Трусова В. М.**Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР, Москва*

Изучен состав фосфолипидов мембранной системы пластид кукурузы на разных стадиях дифференцирования хлоропластов. Препараты мембран из пропластид обогащены фосфолипидами по сравнению с препаратами мембран из сформированных хлоропластов. Установлены изменения в содержании отдельных фосфолипидов во фракциях мембран пластид при дифференцировании хлоропластов. Выявлены значительные количества фосфатидной кислоты в препаратах мембран из пропластид. При фракционировании препаратов мембран из хлоропластов в градиенте сахаразы фракция мембраны, обогащенная ламеллами стромы, одновременно обогащается кардиолипином. Фосфатидилглицерин — наиболее характерная и стабильная составная часть тилакоидов гран.

Работы последних лет значительно расширили наши представления о химической природе и свойствах структурного протеида ламеллярной системы сформированных хлоропластов [1—4]. Сообщалось также об изменениях его свойств при развитии ламеллярной системы в зеленеющих пропластидах [4, 5]. В то же время имеется лишь небольшое число исследований, в которых изучали фосфолипиды пропластид, а также развивающихся и сформированных хлоропластов, хотя фосфолипиды являются важнейшим и наиболее лабильным компонентом внутренних мембран пластид, связанным со структурным протеидом мембран [6—10]. Все это побудило нас провести изучение содержания отдельных фосфолипидов в мембранной системе пластид в процессе превращения пропластид в сформированные хлоропласты.

Определению фосфолипидов в системе внутренних мембран пропластид и развивающихся хлоропластов предшествовало изучение морфогенеза пропластид в проростках различного возраста, а также хлоропластов, образованных из пропластид после непрерывного освещения этиолированных проростков в течение суток. В клетках 5-дневных этиолированных проростков наблюдается концентрация пузырьков в каком-либо месте пластиды (центр или края) и образуется прототип проламеллярного тела. Матрикс таких пластид электроннопрозрачный, в нем располагаются ряды пузырьков сравнительно большого диаметра (рис. 1, а). В 6-дневных с момента посадки проростках внутреннее пространство пластид почти полностью занято проламеллярным телом. Оно еще не имеет вид кристаллической решетки, скорее, трубочки, составляющие проламеллярное тело, имеют спиралевидную конфигурацию. Переплетение трубочек создает вид

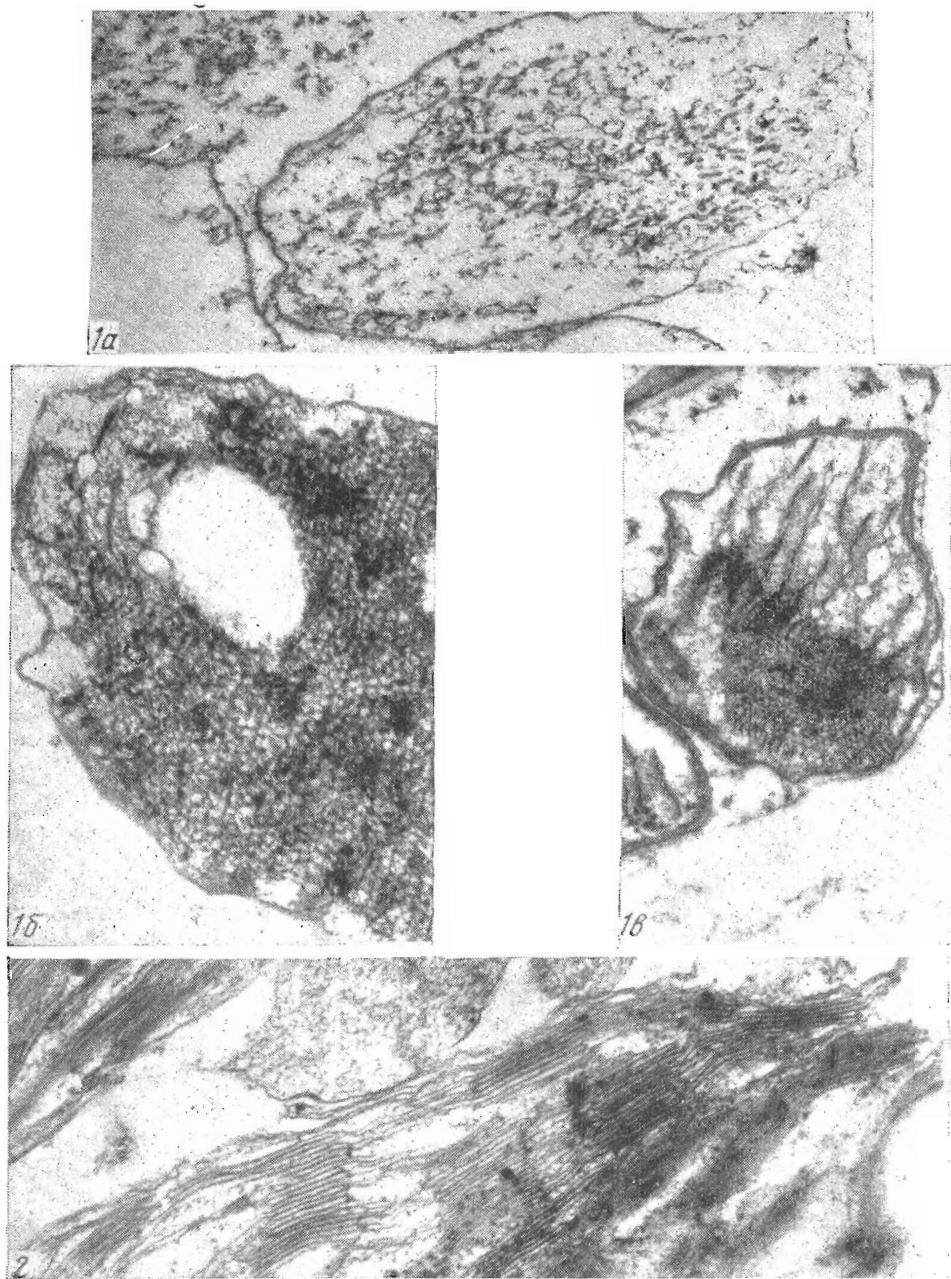


Рис. 1. Пропластиды проростков кукурузы $22,000 \times$: а, б и в — соответственно 5-, 6- и 8-дневные проростки

Рис. 2. Часть хлоропласта проростков кукурузы. $22,000 \times$. Растения освещали 30 ч

неправильной кристаллической решетки, от которой отходят ряды пузырьков (тилакоидов) различного диаметра (рис. 1, б). В последующие двое суток проращивание проростков в темноте приводит к распределению элементов проламеллярного тела таким образом, что оно принимает вид кристаллической решетки, для которой характерна гексагональная структура (рис. 1, в). Таким образом, в морфогенезе пропластид можно выделить 2 этапа: на 1-м этапе (6 сут) идет образование элементов проламеллярного тела, матрикс пластид просветлен (по-видимому, материал ма-

Таблица 1

Содержание фосфора фосфолипидов, связанных с ламеллярным белком, на разных стадиях дифференцировки хлоропластов, мкг/мг белка

Проростки	Номер опыта		
	1	2	3
Этиолированные	10,3	5,2	6,1
После освещения (24 ч)	4,2	3,3	5,0
Зеленые	2,3	1,7	3,4

Таблица 2

Содержание фосфора фосфолипидов в различных препаратах мембран, % от суммы фосфора фосфолипидов

Источник получения мембран	Номер опыта	Фосфатидная кислота и кардиолипин	Фосфатидил-глицерин	Лецитин	Фосфатидил-инозит
Пропластиды	1	65,0	20,0	12,9	2,1
	2*	55,6	25,0	7,2	12,1
Хлоропласты (24 ч освещения проростков)	1	43,2	36,2	13,9	6,6
	2*	46,2	35,8	11,0	6,9
Сформированные хлоропласты	1	26,1	42,0	14,3	17,7
	2*	20,8	53,5	15,7	9,7

* Фосфолипиды разделяли методом двумерной ТСХ.

трикса идет на синтез мембран — элементов проламеллярного тела); на 2-м этапе (проростки старше 6 сут) заканчивается формирование элементов проламеллярного тела, занимающих почти весь объем пластид, и начинаются процессы, приводящие к их ориентации и формированию проламеллярного тела типа кристаллической решетки. Одновременно с этим уплотняется матрикс и обнаруживаются многочисленные рибосомы. После освещения этиолированных проростков в течение 24—30 ч пластиды имеют развитую ламеллярную систему, причем грани содержат до 15 и более тилакоидов (рис. 2). Дальнейшее непрерывное освещение этиолированных проростков нецелесообразно, так как при этом разрушается мембранная система хлоропластов [11].

Количество фосфолипидов в препаратах мембран зависит от стадии дифференциации хлоропластов. Оно максимально в пропластидах и минимально в сформированных хлоропластах (табл. 1). Уместно отметить, что на пропластиду приходится меньшее абсолютное содержание фосфолипидов, чем на хлоропласт (соответственно $0,19 \cdot 10^{-12}$ и $0,52 \cdot 10^{-12}$ г) [7].

В препаратах проламеллярной и ламеллярной систем пластид главную массу фосфолипидов составляют кислые фосфолипиды. Их содержание заметно изменяется при формировании ламеллярной системы хлоропластов (табл. 2). После разделения фракций фосфолипидов из препаратов мембран пропластид, дифференцирующихся хлоропластов и сформированных хлоропластов методом двумерной ТСХ (рис. 3) содержание кардиолипина и фосфатидной кислоты определяли отдельно. В табл. 2 (опыт 2) представлена их сумма. При двумерной ТСХ полярных липидов фосфор был обнаружен лишь в пятнах 1, 2, 5, 6 и 7, соответствующих фосфатидил-инозиту, фосфатидилхолину, фосфатидилглицерину, фосфатидной кислоте и кардиолипину. В пятнах 3, 4 и 10 найдены сульфолипид, а также

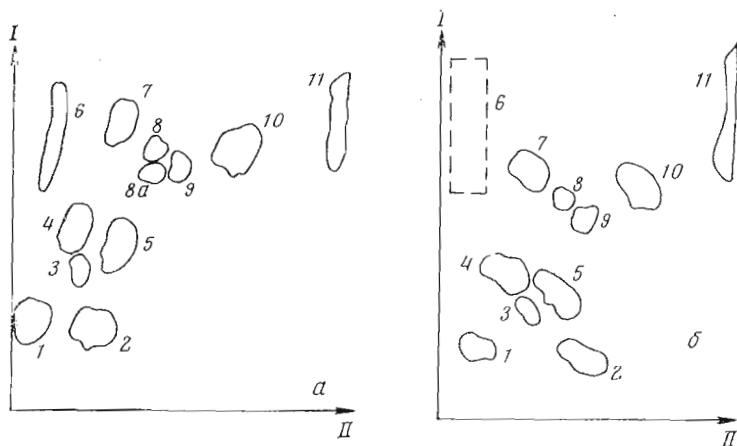


Рис. 3. Двумерная ТСХ полярных липидов из препаратов проламеллярной (а) и ламеллярной (б) систем пластид I направление — хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4); II направление — хлороформ — метанол — аммиак (14 : 6 : 1): 1 — фосфатидилнозит, 2 — фосфатидилхолин, 3 — сульфолипид, 4 — дигалактозилдиглицерид, 5 — фосфатидилглицерин, 6 — фосфатидная кислота, 7 — кардиолипин, 8, 8а, 9 — неидентифицированные липиды, 10 — моногалактозилдиглицерид, 11 — пигменты, нейтральные липиды

дигалактозил — и моногалактозилдиглицериды, в пятне 11 — пигменты и нейтральные липиды, пятна 8, 8а и 9 содержали неидентифицированные вещества. В пятнах 3, 4, 8, 8а, 9, 10 и 11 фосфор не удавалось определить аналитическими методами. Локализованная в пятне 6 (рис. 3, а) фосфатидная кислота была идентифицирована нами не только хроматографически, но и по продукту ее деацилирования (α -глицерофосфат) [12], а также по молярным соотношениям входящих в ее состав глицерина и фосфора (1,00 : 1,09). Содержание фосфатидной кислоты было значительным в пропластидах, в меньшем количестве оно наблюдалось в формирующихся хлоропластах и почти никогда ее не удавалось выделить в заметных количествах из сформированных хлоропластов. В опыте 2 (табл. 2) содержание фосфатидной кислоты в пропластидах составило 42,1% (кардиолипина — 13,5%), в дифференцирующихся хлоропластах, не содержащих морфологически элементов проламеллярного тела, — 27,1% (кардиолипина — 19,1%), а в сформированных хлоропластах — 4,5% (кардиолипина — 16,3%).

Чтобы выяснить, в какой из субфракций мембран сосредоточены фосфатидная кислота и кардиолипин, препараты мембран из пропластид и сформированных хлоропластов центрифугировали в градиенте сахарозы. Результаты анализа фосфолипидов показали, что оба вещества равномерно распределены в мембранах проламеллярной системы пропластид, тогда как в ламеллярной системе хлоропластов ими обогащены менее тяжелые компоненты (табл. 3).

Изучение деацилированных производных фракции фосфолипидов, выделенной нами ранее из липидной части лиопротендов пропластид кукурузы, позволило идентифицировать в ее составе фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилнозит, кардиолипин и фосфатидную кислоту [10]. При изучении общей фракции фосфолипидов, выделенной из фракций мембран пропластид и дифференцирующихся хлоропластов кукурузы (24 ч предварительного освещения этиолированных проростков), методом двумерной ТСХ нами были выявлены аналогичные вещества. Отсутствие фосфатидилметанола в трех различных образцах фосфолипидов (табл. 2, опыт 2) позволяет предполагать, что при экстракции фосфолипидов из препаратов проламеллярной и ламеллярной систем пластид в наших

Распределение фосфора кислых фосфолипидов во фракциях мембран из пропластид и хлоропластов, % от суммы фосфора кислых фосфолипидов

Фракция мембран	Пропластиды			Хлоропласты		
	фосфатидная кислота и кардиолипин	фосфатидил-глицерин	содержание фосфолипидов во фракции, %	фосфатидная кислота и кардиолипин	фосфатидил-глицерин	содержание фосфолипидов во фракции, %
Исходные мембраны	83,5	16,5	100	62,4	37,6	100
Интерфаза, % сахаразы						
13—20	} 81,3	} 18,7	6,4	80,8	19,2	3,6
20—30			17,2	58,3	44,7	13,2
30—50			76,7	55,7	44,3	83,2

опытах не наблюдалось действие фосфолипазы D. Известно, что при экстракции фосфолипидов из гомогенатов растительных тканей или целых растительных клеток эта фосфолипаза может вызвать превращение части фосфолипидов в фосфатидилметанол [13]. Далее, обращает на себя внимание, что фосфатидная кислота присутствует в значительных количествах во фракции фосфолипидов из пропластид, в меньших — в дифференцирующихся хлоропластах и в небольших количествах — во фракции фосфолипидов из сформированных хлоропластов. Мало вероятно, чтобы фосфатидная кислота образовывалась в значительных количествах при экстракции фосфолипидов из пропластид в результате распада части фосфолипидов, но и не обнаруживалась в близких количествах при экстракции фосфолипидов из сформированных хлоропластов в аналогичных условиях. Скорее всего в пропластидах, мембранная система которых имеет меньшее содержание мембранного белка на единицу сухого веса мембраны, чем ламеллярная система сформированных хлоропластов, фосфатидная кислота имеется, как таковая, и может рассматриваться как резервное вещество или основной предшественник для синтеза кислых фосфолипидов пластид при дифференцировании хлоропластов.

Анализ распределения фосфора кислых фосфолипидов в субфракциях мембран из пропластид и хлоропластов кукурузы позволяет считать, что фосфатидилглицерин, кардиолипин и фосфатидная кислота равномерно распределены в морфологически различных частях проламеллярной системы пропластид и по-разному — в ламеллярной системе хлоропластов. В последнем случае фосфатидилглицерин является главным компонентом тилакоидов, тогда как менее тяжелые компоненты (по-видимому, фракция ламелл стромы) обогащены кардиолипином и фосфатидной кислотой.

Таким образом, при формировании ламеллярной системы хлоропластов под воздействием света в мембранах пластид резко уменьшается содержание фосфатидной кислоты и увеличивается содержание фосфатидилглицерина — наиболее характерной и стабильной составной части тилакоидов хлоропластов.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служили 5-, 6-дневные проростки кукурузы сорта Молдавацка оранжевая. Семена высаживали в ящики с почвой после 24 ч набухания в воде. Этиолированные проростки выращивали в темноте в камерах, находящихся в оранжевое. Пластиды различных стадий зеленения выделяли из этиолированных растений, которые освещали лампами ЛДЦ-30 (4500 люкс) в течение различного времени. Сформированные хлоропласты выделяли из зеленых проростков.

Пропластиды и хлоропласты изолировали из проростков по методу, описанному в работе [14]. Для получения препаратов мембран пластиды разрушали осмотически в среде, содержащей 0,02 М трис-НСI буфер (рН 7,6) и 0,001 М ЭДТА [14], суспензию освободили от неразрушенных частиц двукратным центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость, содержащую мембранную систему пластид, центрифугировали в течение 1 ч при 40 000 g (центрифуга ЦВР-1). Все операции проводили при 2—4°. Суммарная фракция мембран, полученная указанным выше способом, состояла в случае хлоропластов из ламеллярной системы, в случае пропластид — из пластидных «центров», а при разных стадиях развития пластид — из смеси обоих. Кроме того, в эти фракции попадала и внешняя мембрана пластид [7]. Для разделения препаратов мембран из пропластид и сформированных хлоропластов на субфракции исходные препараты мембран центрифугировали в роторе SW₂₅ при 24 000 об/мин (центрифуга VAC-60) в течение 1 ч в градиенте 20, 30, 50%-ной сахарозы, растворенной в 0,02 М трис-НСI буфере (рН 7,6) с 0,001 М ЭДТА.

Для анализа фосфолипидов фракции мембран дважды экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2 : 1), экстракт центрифугировали, промывали водой и вновь центрифугировали [15], хлороформный слой упаривали в вакууме. Фосфолипиды отделяли от пигментов, нейтральных липидов, жирных кислот и основной массы гликолипидов на колонке с кремневой кислотой по методу, описанному ранее [16]. Разделение фосфолипидов проводили с помощью одномерной и двумерной ТСХ на пластинках с силикагелем («Kieselgel G», фирма «Merck», ФРГ). При одномерной ТСХ и в первом направлении при двумерной ТСХ использовали нейтральную систему растворителей хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4). Во втором направлении использовали систему растворителей хлороформ — метанол — аммиак (14 : 6 : 1) [17]. Фосфолипиды обнаруживали йодом, а аминокислотные эфиры фосфатидилглицерина — нингидрином. Содержание фосфора фосфолипидов в пробах, глицерина в образцах фосфатидной кислоты и белка определяли по методам, описанным соответственно в работах [18—20]. Материал для электронно-микроскопических исследований фиксировали 2%-ным раствором OsO₄ по методу, предложенному Паладе [21]. Остальные операции проводили по методу [11]. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме LKB-4400 и исследовали в электронном микроскопе JЭМВ-100.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boquet M., Juignery G., Duranton J. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 531—547.
2. Menke W., Schölzel E. (1971) Z. Naturforsch., 26, 378—379.
3. Menke W., Ruppel H.—G. (1971) Z. Naturforsch., 26, 825—831.
4. Молчанов М. И., Чигирев В. С. (1972) Докл. АН СССР, 204, 1485—1488.
5. Lürssen K. (1971) Z. Naturforsch., 26, 725—729.
6. Farineau Nicole (1968) Bull. Soc. Franc. Physiol. Veget., 14, 275—305.
7. Lürssen K. (1970) Z. Naturforsch., 25, 1113—1119.
8. Молчанов М. И. (1971) Докл. АН СССР, 199, 1196—1199.
9. Koenig F. (1971) Z. Naturforsch., 26, 1180—1187.
10. Молчанов М. И. (1972) Биохимия, 37, 775—780.
11. Молчанов М. И., Балаур Н. С., Безингер Э. Н. (1969) Докл. АН СССР, 187, 935—936.
12. Dawson R. M. C. (1954) Biochim. et biophys. acta, 14, 374—379.
13. Schantz R., Douce R., Duranton H. M. (1972) FEBS Letters, 20, 157—161.
14. Jacobson A. B. (1968) J. Cell. Biol., 38, 238—244.
15. Bligh E. G., Dyer W. J. (1959) Can. J. Biochem. a. Physiology, 37, 911—917.
16. Renkonen O., Bloch K. (1969) J. Biol. Chem. 224, 4899—4905.
17. Дятловицкая Э. В., Торховская Т. И., Бергельсон Л. Д. (1969) Биохимия, 34, 177—182.
18. Gerlach E., Deuticke B. (1963) Biochem. Z., 337, 477—479.
19. Renkonen O. (1962) Biochim. et biophys. acta, 56, 367—369.

20. Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
21. Бирюзова, В. И., Боровягин В. Л., Гилев В. П., Киселев Н. А., Тихоненко А. С., Ченцов Ю. С. (1963) В сб.: *Электронно-микроскопические методы исследования биологических объектов*, Изд. АН СССР, М.

Поступила в редакцию *
2.VIII.1974

THE CHANGES OF PHOSPHOLIPIDS IN THE MEMBRANE SYSTEM
OF PLASTIDS AT THE FORMATION OF CHLOROPLAST
ULTRASTRUCTURE UNDER THE ACTION OF LIGHT

MOLCHANOV M. I., BALAUR N. S., TRUSOVA V. M.

*A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The composition of phospholipids in maize plastids at different stages of differentiation of the chloroplast lamellar system was studied. Changes in the phospholipid composition of the membrane fractions of plastids were observed at all stages of chloroplast ultrastructure formation. The maximal level of phosphatidic acid was observed in the membrane fraction of proplastids. The centrifugation of chloroplast lamellar system in the sucrose gradient led to the increase of phosphatidylglycerol in the grana fraction and its decrease in the stroma lamellae fraction. Phosphatidylglycerol was found to be most abundant phospholipid component of grana thylakoids.

* Статья из портфеля редакции журнала «Биохимия», дата поступления 8.II.1974.