

Л. В. ДАВТЯН, М. Г. ГАСПАРЯН

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛАМИНА НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В ХЛОРОПЛАСТАХ

Изучалось влияние этаноламина на процесс биосинтеза белка в изолированных хлоропластах 14-дневных проростков гороха и кукурузы. Установлена активация включения меченых C^{14} -аминокислот в белки хлоропластов при воздействии этаноламином как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*.

Хлоропласты являются системой, обеспечивающей наряду с другими процессами и синтез белка. В последние годы стало известно, что в хлоропластах имеются сложные многокомпонентные системы, ответственные за осуществление процессов репликации, транскрипции и трансляции [13]. Тевари и Уилдман [13] показали наличие в них ДНК-зависимой РНК-полимеразы, активность которой в 30—40 раз превышала аналогичный показатель в ядрах.

За последнее время из хлоропластов выделены, очищены и идентифицированы такие компоненты белоксинтезирующей системы, как амино-ацил РНК-синтетаза, транспортная РНК, рибосомы, полирибосомы.

Мысль о способности пластид к белковому синтезу впервые была высказана в ранних работах Улриха [14], а исследование структуры их проведено Менке [10, 11, 12]. Андреевой, Плышевской [1], Декен-Гренсоном [17] были представлены косвенные доказательства, подтверждающие вышесказанное. Однако исчерпывающие данные о синтетических свойствах хлоропластов были получены позже [4], когда был выявлен в хлоропластах ряд ферментативных систем, участвующих в синтезе белка.

В дальнейшем исследованиями Молчанова [3] было показано, что на интенсивность включения C^{14} -аминокислот в белки влияет степень дифференциации хлоропластов.

Исследованиями Генскол, Гудивин, Чен и др. [5, 8] также установлено наличие в хлоропластах прорастающего гороха ферментов, активирующих аминокислоты, причем активность энзима оказалась максимальной в растворимой фракции хлоропластов листьев и в микросомальной фракции корешков. Удельная активность фермента в семедолях возрастала до 4-го дня прорастания, затем снижалась и не зависела от ингибиторов, гербицидов и протеазы. Авторы предполагают, что, очевидно, фермент синтезируется в процессе прорастания.

Таким образом, в хлоропластах обнаружены энзимы, активирующие аминокислоты за счет АТФ, образующейся в тех же структурах путем фотофосфорилирования; в них имеются также собственные рибосо-

мы, РНК и ДНК, что указывает на исключительную роль этих структур в биосинтезе белка [6, 9].

Наши исследования по изучению влияния этаноламина (ЭА) на включение C^{14} -аминокислот в белки были проведены на целых хлоропластах.

Материал и методика. Для выделения хлоропластов использовались ростки кукурузы сорта Краснодарская-5 и Массино, а также гороха сорта Мозговой-В-5 и Победитель. Одна часть семян до проращивания обрабатывалась водой (контроль), а другая—водным раствором этаноламина в стимулирующих концентрациях (опыты *in vivo*, в отличие от других серий, где этаноламин будет включаться непосредственно в реакционные смеси—*in vitro*).

10—12-дневные растения, выращенные из проросших семян в условиях водной культуры на питательной среде в оранжерее, срезались, и навески в определенном соотношении растирались в фарфоровой ступке на холоду с замороженным сахарозным трис-буфером (сахароза—0,5М, КСl— 10^{-2} М, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 10^{-2} М, трис (Англия)— 10^{-2} М, рН 7,6). Гомогенат отжимали через полотно. Фильтрат центрифугировали в течение 5 мин при $500 \times g$ для удаления дебриса (фрагменты клеток—клеточные оболочки, ядра, песок, неразрушенные клетки, крахмал и т. д.). Из супернатанта получали хлоропласты путем центрифугирования при $3000 \times g$ в течение 20 минут. Осадок хлоропластов промывали трижды холодной 0,5 М сахарозой центрифугированием в тех же условиях. Все операции по выделению хлоропластов проводились быстро и строго на холоду в условиях $1-3^\circ C$.

Навеска хлоропластов тщательно суспендировалась в определенном объеме (6—8 мл) трис-буфера и вносилась в инкубационную среду для включения метки. Среда инкубации в контрольных вариантах содержала: C^{14} -аминокислоты (0,1 мл гидролизата белков хлореллы (ЧССР)—200 тыс. имп. в пробе, трис-буфер—0,1 мл, рН 7,4, хлоропласты—0,3 мл). В опытных вариантах в условиях *in vitro* вместо трис-буфера вносился раствор трис-буфера с этаноламином (1 мкг/мл и 10 мкг/мл); конечный объем среды во всех случаях—0,5 мл. Отдельно ставился контроль на адсорбцию. Инкубация велась при температуре $22-25^\circ$ в течение 1 часа, повторность вариантов—3-кратная. После инкубации белки осаждались CCl_3COOH , конечная концентрация ее для соблюдения полноты осаждения составляла строго 5% [2]. Суспензия после стояния на холоду в течение 1 часа центрифугировалась при 5000 об/мин, за 10 мин полученный осадок белка пятикратно отмывался 5% ТХУ. Далее осадок суспензировался в 0,2 N HCl при 70° в течение 20 мин (удаление крахмала) и снова выдерживался при 90° в течение 30 мин с 5% ТХУ (удаление нуклеиновых кислот). После последовательных отмывок спиртом (60°), спирт-эфир—хлороформенной смесью (2:2:1) и ацетоном осадок с сухими намеченными аминокислотами и 5% ТХУ оставлялся на ночь (для ускорения десорбции), трижды промывался 5% ТХУ, растворялся в 2% NaOH (или муравьиной кислоте) и переносился на латунные диски. Радиоактивность определялась на радиометре ПП-8 «Волна» с газспроточным счетчиком для измерения малых активностей и мягкого β -излучения СOT-25БФЛ.

Результаты и обсуждение. Данные по включению C^{14} -аминокислот в белки хлоропластов кукурузы и гороха представлены в таблице (приводятся данные по удельной радиоактивности в имп/мин/мг белка).

Судя по данным таблицы, наибольшая интенсивность включения C^{14} -аминокислот в белки наблюдается в опытах с добавлением этаноламина в инкубационную среду к интактным хлоропластам, т. е. в опытах *in vitro*. В опытах с предварительной обработкой семян (*in vivo*) она ниже, разница составляет 25—30%. В то же время в опытах *in vitro* бо-

Таблица
Влияние ЭА на включение C^{14} -аминокислот в белки хлоропластов кукурузы и гороха

Варианты	Статистические критерии	Кукуруза ($n_1 + n_2 - 2 = 4$)		Горох ($n_1 + n_2 - 2 = 4$)	
		in vitro	in vivo	in vitro	In vivo
		удельная радиоактивность, имп/мин/мг белка	удельная радиоактивность, имп/мин/кг белка	удельная радиоактивность, имп/мин/мг белка	удельная радиоактивность, имп/мин/мг белка
Контроль	$M \pm m$	117,1 ± 13,4	87,4 ± 7,85	175 ± 7,6	150,1 ± 13,8
Этаноламин, 10 мкг	$M_1 \pm m_1$	139,7 ± 13,6	—	275,2 ± 25,2	—
	t	1,183	—	3,805	—
	P	0,3	—	0,01	—
Этаноламин, 1 мкг	$M_2 \pm m_2$	159,2 ± 13,8	—	302 ± 14,7	—
	t	3,109	—	7,66	—
	P	0,05	—	0,01	—
Этаноламин, 10 мкг	$M_3 \pm m_3$	—	151,7 ± 12,1	—	191 ± 3,46
	t	—	4,46	—	2,362
	P	—	0,01	—	0,05

лее высокое включение метки в белки получено при концентрации этаноламина 1 мкг, чем при концентрации 10 мкг (разница—12—15%).

Предварительная обработка семян этаноламином (10 мкг и 1 мкг) статистически достоверно активизирует включение C^{14} -аминокислот в хлоропласты, выделенные из 10—14-дневных проростков как кукурузы, так и гороха. Активизация включения C^{14} -аминокислот в белки хлоропластов кукурузы в опытах *in vitro* при концентрации этаноламина 10 мкг составила 19% (139,7 имп/мин/мг при 117,1 имп/мин/мг в контроле), а при концентрации 1 мкг—на 35% (159,2 имп/мин/мг). При сравнении с аналогичным показателем у гороха эта разница соответственно оказалась равной 57 и 73% (302 имп/мин/мг при 175 имп/мин/мг в контроле).

Как эффект этаноламина, так и общий средний уровень удельной радиоактивности в хлоропластах проростков гороха значительно выше, чем у кукурузы (175 имп/мин/мг против 117,0 имп/мин/мг в интактных семенах и 302 имп/мин/мг против 159 имп/мин/мг при обработке этаноламином), что свидетельствует о более деятельной белоксинтезирующей системе в хлоропластах гороха, активно включающей метку аминокислот.

При предварительной обработке семян этаноламином в оптимально стимулирующих концентрациях ($10^{-4}\%$) в опытах *in vivo* хлоропласты кукурузы включают C^{14} -аминокислоты в белки, активнее интактных на 50% (151,7 имп/мин/мг при 187,4 имп/мин/мг в контроле), а гороха (концентрация этаноламина $10^{-5}\%$)—на 27% (191 имп/мин/мг при 150 имп/мин/мг в контроле).

Таким образом, наилучший эффект этаноламина наблюдается в хлоропластах гороха в опытах *in vitro*, т. е. при непосредственном воздействии препарата на белоксинтезирующую систему. В хлоропластах же кукурузы этаноламин более эффективен в условиях *in vivo*, дающих возможность воздействовать также через иные пути как, например, через процесс формирования белоксинтезирующей системы и т. д. Аналогичная закономерность выявилась и при определении радиоактивности в имп за 3 мин. Интересно отметить, что содержание белка (по Лоури) в хлоропластах кукурузы составило: *in vitro*—0,67 мг, *in vivo*—0,707 мг; в хлоропластах гороха—соответственно 0,75 мг и 0,75 мг.

Полученные данные свидетельствуют о том, что белоксинтезирующий эффект этаноламина, очевидно, может быть обусловлен следующими обстоятельствами: непосредственным влиянием на конформацию компонентов белоксинтезирующей системы, и в первую очередь на РНК всех видов, либо опосредованным действием на мембраны, в которых упакованы рибосомы (через изменения фосфолипидного состава, ориентацию липидов), приводящим к лучшей «пригонке» нужных факторов, связанных с мембранами—ламеллами хлоропластов.

Немаловажен и тот факт, что хлоропласты синтезируют не только структурные, но и растворимые ферментативные белки. Поэтому усиление включения метки можно считать также результатом усиленного ресинтеза ферментативных белков, участвующих в процессе биосинтеза белка.

Ереванский зооветеринарный институт

Поступило 27.VI 1975 г.

Լ. Վ. ԴԱՎԹՅԱՆ, Մ. Դ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ

ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԸ ՔԼՈՐՈՊԼԱՍՏՆԵՐՈՒՄ ԵՎ
ԷԹԱՆՈԼԱՄԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՅԴ ՊՐՈՑԵՍՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

C^{14} —նշված ատոմներ պարունակող ամինաթթուների միջոցով ապացուցվել է նրանց ներգրավման ուժեղացումը եզրպտացորենի և սիսեռի կանաչ ծիլերից անջատված բլորոպլաստների սպիտակուցների բաղադրության մեջ: Բերված է բլորոպլաստների մեկուսացման և սպիտակուցների բիոսինթեզի ուսումնասիրության մեթոդի մանրամասն նկարագրությունը: Ամինաթթուների ներգրավման ուժեղացման հետ միասին նկատվել է նաև սպիտակուցի տեսակարար ռադիոակտիվության բարձրացում: Հաստատված է, որ էթանոլամինի ազդեցությունը ի հայտ է գալիս ինչպես սերմերի նախացանքային մշակման (*in vivo*), այնպես էլ ինկուբացիոն միջավայրում ավելացնելու դեպքում (*in vitro*):

Հողվածում քննարկվում է էթանոլամինի ազդեցության հնարավոր մեխանիզմները սպիտակուցի սինթեզման պրոցեսում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Андруева Г. Ф., Плышевская Е. Г. ДАН СССР, 87, 301, 1952.
2. Гофман Ю. Я., Саянова В. Биохимия, 30, 1—2, 1965.
3. Молчанов М. И. ДАН СССР, 5, 119—199, 1971.
4. Сисакян Н. М., Филиппович И. И. Биохимия, 22, 1—2, 376—389, 1957.
5. Chen P., Schultz C., Katchalski E. Nature New Biol., 231, 20, 69, 72, 1971.
6. Clark S. M. J. Biol. Chem., 233, 421, 1958.
7. Deken-Grenson M. Biochim. Biophys. Acta 14, 203, 1954.
8. Henshall J. D., Goodwin T. W. Phytochemistry 3, 6, 677, 691, 1964.
9. Marcus A. J. Biol. Chem. 254, 1328, 1959.
10. Menke W. H. S. Liet. Physiol. Chemie, 257, 1, 43 — 48, 1938.
11. Menke W., Jordan E. J. Naturforsch. 14b. 234 — 240, 1959.
12. Menke W. et al. Biochem. of Chloroplasts (Pd) AP Y. 1, 3, 1966.
13. Pewart K. K., Wildman S. G. Biochim et Biophys acta. 186, 3 8, 1969.
14. Ulrich H. Z. Botan. 16, 3, 1924.