

Г. П. БРИН, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТИЛВИОЛОГЕНА ГИДРАЗИНОМ; ФОТОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОМ И ХЛОРОПЛАСТАМИ

Реакции сенсibilизированного хлорофиллом восстановления виологенов могут служить простыми моделями I фотосистемы фотосинтеза; окислительно-восстановительные потенциалы метилвиологена и ферредоксина близки ( $E_0' = -0,44$  в). Мы исследовали реакции восстановления метилвиологена в органических растворителях (<sup>1-3</sup>) и в водных растворах детергентов (<sup>4, 5</sup>). Брюн и Сан-Пьетро (<sup>6</sup>) исследовали восстановление виологенов, фотосенсibilизированное хлорофиллином а в водном растворе. Мы наблюдали весьма эффективное восстановление метилвиологена в спиртовом растворе хлорофилла в присутствии фенилгидразина (<sup>4</sup>). Вернон и Шоу (<sup>7</sup>) показали, что хлоропласты в 0,8 М трис-буфере (рН 8) теряют способность к выделению кислорода, но могут восстанавливать феррицианид или 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИ) в присутствии ряда доноров электрона, в том числе производных гидразина (бензидин, семикарбазид), которые являются донорами электрона для II фотосистемы. Хис (<sup>8</sup>) описал использование гидразина как донора электрона II фотосистемы при восстановлении ДХФИ и НАДФ.

В настоящей работе исследовалась реакция фотосенсibilизированного восстановления метилвиологена с использованием солянокислого гидразина (нейтрализованного водным раствором NaOH до нужной величины рН) в качестве донора электрона. Мы сравнивали активность растворов хлорофилла и суспензии хлоропластов, предварительно консервированной в жидком азоте.

Растворы хлорофилла изучались в системе органический растворитель — вода при постепенном переходе от мономерных к агрегированным формам пигментов по мере увеличения количества воды в системе. В суспензию хлоропластов вводил возрастающее количество тех же органических растворителей до полного извлечения хлорофилла в раствор, т. е. при постепенном нарушении структуры хлоропластов и переходе от нативных агрегированных форм хлорофилла к мономерным формам. Эта процедура позволила выявить влияние степени нарушения структуры хлоропласта на реакцию; подобное исследование реакции Хилла при постепенном нарушении хлоропластов было описано нами ранее (<sup>9, 10</sup>).

Хлоропласты были выделены из проростков гороха и хранились в жидком азоте (<sup>11</sup>). Хлорофилл а + b получен обычным методом из листьев крапивы. Опыты вели в вакуумных трубках Тунберга, приспособленных для спектрофотометрических измерений. В трубку помещали раствор пигмента или суспензия хлоропластов, в головку трубки — раствор метилвиологена и солянокислого гидразина при заданном рН. После удаления воздуха вакуумным насосом раствор из головки приливали в трубку. Освещение производилось лампой накаливания через конденсор и красный светофильтр КС-10 (интенсивность света  $10^5$  эрг/см<sup>2</sup>·сек). О восстановлении метилвиологена судили по увеличению оптической плотности при 600 мμ.

Система хлоропласты — гидразин — метилвиологен. При освещении красным светом суспензия хлоропластов сенсibilизирует восстановление метилвиологена в присутствии гидразина. Реакция обна-

руживает характерную зависимость от pH (рис. 1A), максимум активности достигается при pH 8,5, в более кислых и более щелочных pH активность быстро падает. В контрольном опыте без гидразина восстановление метилвиологена в этих условиях было незначительным: за 10 мин. освещения  $\Delta D$  при 600 м $\mu$  обычно не превышало 0,03. Описанное ранее восстановление виологенов хлоропластами (<sup>12</sup>) требует присутствия каталазы и этанола для удаления кислорода из системы.

Была измерена зависимость скорости восстановления метилвиологена от времени освещения. При величине pH 8,5 и интенсивности света

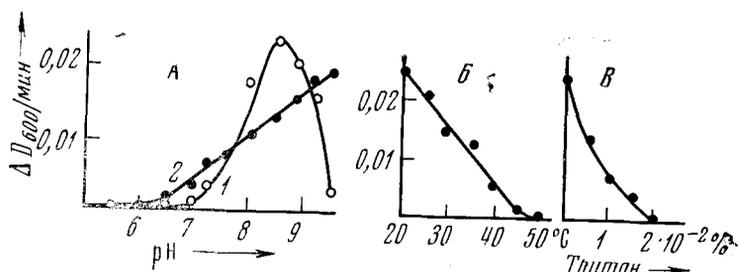


Рис. 1. Зависимость восстановления метилвиологена от pH (A), от предварительного нагревания хлоропластов (B) и от концентрации тритона X-100 (B'). В A реакции сенсбилизирована: 1 — хлоропластами (с эквивалентным содержанием  $4 \cdot 10^{-2}$  мг хлорофилла в 1 мл) и 2 — хлорофиллом ( $2 \cdot 10^{-2}$  мг в 1 мл). Условия опытов: в 5 мл раствора  $10^{-4}$  M метилвиологена и  $5 \cdot 10^{-4}$  M гидразина; интенсивность света  $4 \cdot 10^5$  эрг/см $^2$ ·сек

$10^5$  эрг/см $^2$ ·сек через 4—6 мин. восстановление виологена прекращается. Зависимость скорости восстановления метилвиологена от интенсивности света показало насыщение при  $4 \cdot 10^5$  эрг/см $^2$ ·сек. Насыщающая концентрация гидразина  $5 \cdot 10^{-2}$  мол/л (при pH 8,5 и интенсивности света  $4 \cdot 10^5$  эрг/см $^2$ ·сек). Наибольшая интенсивность восстановления достигается при концентрации  $10^{-4}$  мол/л метилвиологена.

Исследование предварительного нагревания хлоропластов на скорость восстановления метилвиологена в присутствии гидразина показано на рис. 1B. Наблюдаются те же закономерности, что и при инактивации реакции Хилла. Эти данные согласуются с данными, приведенными в работе Вернона и Шоу (<sup>7</sup>).

Ингибитор активности II фотосистемы 3,4-дихлорфенил-1,1-диметилмочевина (диурон) при концентрации  $10^{-5}$  мол/л ингибирует реакцию Хилла и подавляет активность хлоропластов к восстановлению метилвиологена. При введении тритона X-100 ингибирование реакции Хилла и восстановления метилвиологена наблюдается при тех же концентрациях детергента (рис. 1B').

При постепенном введении органических растворителей в водную суспензию хлоропластов наблюдается нарушение естественного состояния хлорофилла — смещение максимума поглощения и флуоресценции в коротковолновую область спектра и подавление реакции Хилла (<sup>9, 10</sup>). Аналогичные закономерности наблюдались и при реакции восстановления метилвиологена; так, при введении 10% этилового спирта в суспензию хлоропластов наблюдается некоторая активация восстановления метилвиологена (подобное явление наблюдалось в случае реакции Хилла). Дальнейшее увеличение концентрации этанола (рис. 2A) ведет к резкому снижению активности, и при 30—50% этанола восстановление метилвиологена практически прекращается. После достижения 60% растворителя в суспензии хлоропластов, т. е. после извлечения хлорофилла

в раствор, наблюдается активное фотосенсибилизированное восстановление метилвиологена.

При введении метанола также наблюдается активация реакции при 10% растворителя, полное падение активности при 50% и резкое возрастание активности после достижения 60% метанола, т. е. при концентрации, соответствующей извлечению хлорофилла в раствор.

В случае диметилсульфоксида (ДМС) максимум активности наблюдается также при 10% растворителя, падение активности при 20—50% и извлечение хлорофилла в раствор с быстрым увеличением активности после достижения 60% растворителя (рис. 2А).

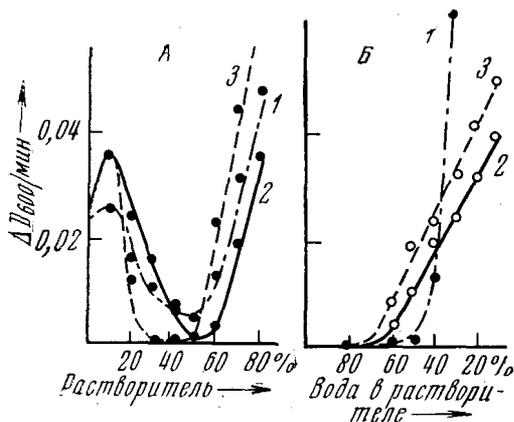


Рис. 2 Зависимость фотосенсибилизированного восстановления метилвиологена ( $10^{-4} M$ ) в присутствии солянокислого гидразина ( $5 \cdot 10^{-2} M$ ) от концентрации растворителей в суспензии хлоропластов (А) и от количества воды в растворе хлорофилла (В). Растворители: 1 — ДМС, 2 — метанол, 3 — этанол

Система хлорофилл — гидразин — метилвиологен. Сенсибилизированное хлорофиллом восстановление метилвиологена идет активно в спиртах и диметилсульфоксиде. Характер зависимости от величины рН отличается по сравнению с хлоропластами, где максимум лежит при рН 8,5; в растворе активность падает в кислых средах и растет в щелочных (рис. 1А). Зависимость скорости восстановления метилвиологена от концентрации хлорофилла в растворе, количества гидразина и концентрации метилвиологена близка к тем же закономерностям, что и в случае суспензии хлоропластов.

При увеличении количества воды в органическом растворителе снижается активность хлорофилла. Так, добавление 65—70% воды к раствору хлорофилла в метаноле и этаноле приводит к практически полной потере активности (рис. 2В). Введение воды в раствор хлорофилла в ДМС резко снижает скорость реакции, и при 50% воды метилвиологен практически не восстанавливается. Таким образом, коллоидные агрегированные формы хлорофилла, образующиеся в системе вода — растворитель, не обладают измеримой активностью в изученной реакции.

В растворах активен «мономерный» растворенный хлорофилл; агрегация пигмента, происходящая при введении избытка воды в растворитель, приводит к постепенной инактивации системы. Возбужденный хлорофилл действует, перенося электрон от гидразина к виологену, что является частным случаем многочисленных окислительно-восстановительных реакций, фотосенсибилизированных хлорофиллом в растворах; особенность изученной реакции заключается в том, что она идет в восстановительных условиях, близких к потенциалу водородного электрода.

Сложнее обстоит дело при интерпретации механизма восстановления виологена в суспензии хлоропластов. Интактные хлоропласты обычно менее активны, чем растворы хлорофилла с той же концентрацией. Они активируются на 20—30% при введении 10% органического растворителя и инактивируются при 30—50% растворителя; далее происходит извлечение хлорофилла в раствор, где реакция идет так же, как в «мономер-

ных» растворах хлорофилла. Возможное объяснение активирующего действия малых количеств растворителя состоит в разобщении фотофосфорилирования, что было показано при действии малых концентраций детергентов на хлоропласты (13). Инактивация хлоропластов при 30—50% растворителя, т. е. в той области концентраций, где обычно инактивируется реакция Хилла, указывает на то, что это явление может быть связано с инактивацией организованной системы переноса электрона в хлоропластах.

Характер зависимости от pH резко отличает работу хлоропластов от работы растворенного хлорофилла; использованные ингибиторы кислород-выделяющей системы полностью инактивируют реакцию восстановления метилвиологена хлоропластами; температурная инактивация реакции соответствует инактивации реакции Хилла.

Как известно, фотосинтетический перенос электрона от воды к НАДФ осуществляется в системе двух фотохимических реакций. Нагревание, обработка растворителями, детергентами и трис-буфером при высокой концентрации нарушает звено цепи переноса электрона, ответственное за выделение кислорода. Метилвиологен является акцептором электрона, по потенциалу близким к ферредоксину, и может входить в цепь переноса электрона фотосистемы I. Однако то, что восстановление метилвиологена хлоропластами ингибируют нагревание, растворители, детергенты и диурон, указывает на участие фотосистемы II в этих реакциях. Поэтому в согласии с работами (7, 8) наиболее вероятно, что гидразин входит в систему переноса электрона вместо воды, в качестве электронодонорного компонента фотосистемы II.

Итак, описанные опыты показывают, что гидразин может служить донором электрона для фотовосстановления метилвиологена при использовании в качестве сенсibilизатора растворенного хлорофилла и суспензии хлоропластов.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
7 XII 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 163, 761 (1965). <sup>2</sup> Г. П. Брин, Сборн. Механизм дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, 1967, стр. 302. <sup>3</sup> Г. П. Брин, А. Н. Луганская, А. А. Красновский, ДАН, 174, 221 (1967). <sup>4</sup> А. А. Красновский, А. Н. Луганская, ДАН, 183, 1441 (1968). <sup>5</sup> А. Н. Луганская, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 4, 848 (1970). <sup>6</sup> D. Brunc, A. San-Pietro, Arch. Biochem. and Biophys., 141, 371 (1970). <sup>7</sup> L. P. Vernon, E. R. Shaw, Plant Physiol., 44, 1645 (1969). <sup>8</sup> R. L. Heath, Biochim. et biophys. acta, 245, 160 (1971). <sup>9</sup> А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 179, 726 (1968). <sup>10</sup> Г. П. Брин, А. А. Красновский, Л. Ф. Комарова, ДАН, 197, 222 (1971). <sup>11</sup> Р. М. Бекина, А. А. Красновский, Биохимия, 33, 478 (1968). <sup>12</sup> В. Кок, Н. Rurainski, O. Owens, Biochim. et biophys. acta, 109, 347 (1965). <sup>13</sup> L. P. Vernon, E. R. Shaw, Plant Physiol., 40, 1269 (1965).