

В. А. ШУВАЛОВ, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

СВЯЗЬ ПЕРВОГО КОМПОНЕНТА ПОСЛЕСВЕЧЕНИЯ С ФОТОПЕРЕНОСОМ ЭЛЕКТРОНА В ХЛОРОПЛАСТАХ

В предшествующих работах ⁽¹⁾ нами было проведено феноменологическое исследование процесса послесвечения. В результате этого было выделено пять основных компонентов послесвечения.

В данной работе основное внимание было уделено изучению природы первого (миллисекундного) компонента послесвечения, время жизни которого мало зависит от температуры от -170 до 40° ⁽¹⁾.

Исследование послесвечения хлоропластов осуществлялось на импульсной флюороскопической установке, описанной ранее ⁽²⁾. Возбуждение производилось импульсами света с $\lambda \geq 630$ мμ и длительностью 10^{-6} сек., следующими друг за другом с частотой 50 гц. Регистрировалась кинетика затухания послесвечения, начиная с $4 \cdot 10^{-4}$ сек. после центра вспышки. Спектры возбуждения и излучения послесвечения измерялись с помощью монохроматора с разрешением 5 мμ. Опыты производились на хлоропластах гороха, консервированных замораживанием в сухом льду ⁽³⁾. Перед измерением хлоропласты разводились десятикратно дистиллированной водой и центрифугировались при 1000 g в течение 1 мин. для удаления крупных ассоциатов. Концентрация хлорофилла в опыте достигала 15 μг/мл. Измерение первого компонента послесвечения в основном производилось при -40° , что позволяло на несколько порядков уменьшить вклад секундных компонентов послесвечения, а также исследовать свечение в условиях блокирования энзиматических процессов.

Нами была предпринята попытка исследовать свечение при -40° в присутствии доноров и акцепторов электрона 2 фотосистемы с тем, чтобы попытаться установить связь свечения с актами переноса электрона в реакционном центре этой фотосистемы. В качестве акцепторов электрона использовали феррицианид ($\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$), $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot (\text{Fe}^{3+}\text{АК})$, *n*-бензохинон, 2,6-дихлорфенолиндифенол, а также метилвиологен. В качестве возможных доноров электрона — ионы двухвалентного марганца ⁽⁴⁾, гидросиламин, гидразин, аскорбат и восстановленный 2,6-дихлорфенолиндифенол.

Послесвечение хлоропластов при -40° усиливается в 10–20 раз в присутствии $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$ и $\text{Fe}^{3+}\text{АК}$, тогда как $\text{Fe}^{2+}\text{Ц}$ и $\text{Fe}^{2+}\text{АК}$ не влияли значительно на послесвечение (рис. 1). Добавление других акцепторов электрона не изменяло существенно контрольного уровня послесвечения. Одновременное добавление к хлоропластам $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$ и 3-[3,4-дихлорфенил]-1,1-диметилмочевины (ДХФМ) в концентрации 10^{-4} мол/л незначительно уменьшает интенсивность послесвечения. Кинетика затухания послесвечения характеризуется одним компонентом с $\tau \approx 6 \cdot 10^{-4}$ сек. Интенсивность свечения существенно не зависит от pH в районе 4,5 — 8,5. Можно было предположить, что возникающее послесвечение связано с обратимым переносом электрона на Fe^{3+} .

Существенное влияние на послесвечение оказывают также ионы Mn^{2+} . При добавлении MnCl_2 в концентрации 10^{-2} мол/л наблюдается резкий всплеск послесвечения в первый момент освещения, после чего стационарная интенсивность послесвечения быстро спадает к уровню, который превышает уровень свечения контрольных хлоропластов в 20 — 30 раз (рис. 1).

После периода темноты в несколько десятков секунд описанная кинетика повторяется. Действие ДХФМ в концентрации 10^{-4} мол/л приводит к почти полному подавлению наблюдаемого послесвечения. При pH 4,5 свечение во время освещения спадает до уровня свечения контрольных хлоропластов, что не наблюдается при pH 6,0 и 8,5. Кинетика затухания свечения имеет два компонента с $\tau \approx 10^{-3}$ и 0,1 сек. (рис. 1). Другие использованные доноры электрона не изменяли свечения контрольных хлоропластов.

Как в случае $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$, так и в случае MnCl_2 послесвечение имело спектр возбуждения, совпадающий со спектром поглощения хлорофилла в красной области спектра, а спектр излучения, совпадающий со спектром флуоресценции хлорофилла.

Было найдено также, что хлористые соли щелочноземельных металлов MgCl_2 , CaCl_2 , SrCl_2 индуцируют послесвечение, которое по интенсивности, кинетике затухания и чувствительности к действию ДХФМ тождественно свечению в присутствии MnCl_2 . Соли, обозначаемые нами MeCl_2 , можно рассматривать как фактор, влияющий на состояние мембраны (⁵, ⁶), окружающей реакционный центр. Было предположено, что если Fe^{3+} и MeCl_2 вызывают образование ион-радикалов хлорофилла реакционного центра (хл.р.ц.) противоположного знака, то можно ожидать при одновременном присутствии Fe^{3+} и MeCl_2 ингибирования накопления радикалов пигмента и уменьшения послесвечения.

Чтобы проверить это предположение, было изучено одновременное действие $\text{Fe}^{3+}\text{АК}$ и MnCl_2 на послесвечение хлоропластов при -40° . Оказалось, что одновременное присутствие агентов, вызывающих в отдельности резкое усиление послесвечения контрольных хлоропластов, приводит к почти полному подавлению послесвечения при -40° (рис. 1). Добавление в эту систему ДХФМ частично восстанавливает свечение, имеющее кинетику, которая наблюдается при добавлении $\text{Fe}^{3+}\text{АК}$. $\text{Fe}^{2+}\text{АК}$ не изменяет послесвечения, индуцируемого MnCl_2 (рис. 1).

Таким образом, полученные данные можно понять с точки зрения обратимого переноса электрона между хл.р.ц., акцептором электрона (Fe^{3+}) и донором электрона, который активируется в присутствии MeCl_2 . Существенно, что кинетика послесвечения в присутствии $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$ и MeCl_2 (рис. 1) соответствует кинетике исчезновения катион- и анион-радикалов хлорофилла в растворах, измеренной с помощью флеш-фотолиза (⁷).

Вместе с тем остается неясным вопрос о механизме активации донора электрона в присутствии MeCl_2 . В качестве подхода к решению этого вопроса было исследовано действие различных солей щелочноземельных металлов и Mn^{2+} , а также катионов других групп. Было найдено, что хлористые соли Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} вызывают активацию свечения, интенсивность которого, однако, в несколько раз меньше, чем в присутствии

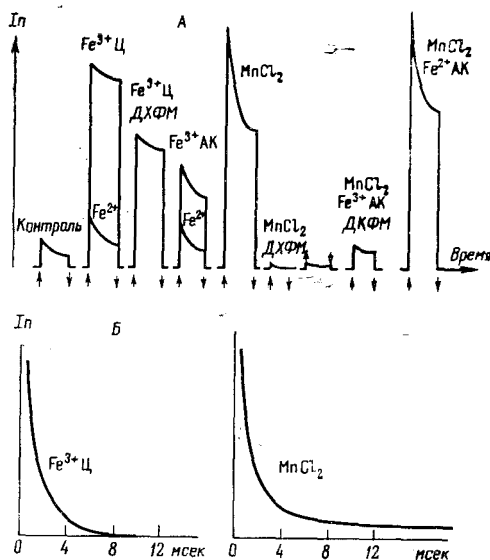


Рис. 1. Зависимость стационарной интенсивности (А) и кинетики затухания (Б) послесвечения хлоропластов при -40° от присутствия акцепторов и доноров электрона фотосистемы 2 (в опыте 7 на А одновременно присутствуют MnCl_2 и $\text{Fe}^{3+}\text{АК}$). Стрелки вверх — включение возбуждающего света, стрелки вниз — его выключение. Величина $\lambda_{\text{воз}} \geq 630$ мμ, $\lambda_{\text{изл}} \geq 670$ мμ. Концентрации: $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$ и $\text{Fe}^{3+}\text{АК}$ 10^{-4} М; MnCl_2 10^{-2} М. Время освещения в каждом опыте на А 50 сек.

MnCl_2 и MgCl_2 ; CrCl_3 , CoCl_2 , ZnCl_2 , CuCl_2 не оказывали влияния на свечение или приводили к его ингибированию; наиболее сильным индуцирующим действием обладали хлористые соли Mn^{2+} и щелочноземельных металлов. Было найдено, что не существует строгой специфичности действия ионов указанной группы — в качестве катиона могут быть ионы Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , в качестве аниона — Cl^- , Br^- . Однако если сумма ионных радиусов использованных катионов и анионов меньше чем 2,5 Å (MgF_2 , BeCl_2) или больше 3,0 Å (MgI_2 , BaCl_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 , MnSO_4), наблюдается резкое уменьшение действия соли на послесвечения контрольных хлоропластов (рис. 2). Эти факты указывают на то, что для возникновения послесвечения необходимо присутствие не только иона щелочноземельного металла или Mn^{2+} , но и соответствующего однозарядного аниона так, чтобы сумма ионных радиусов лежала в интервале от 2,5 до 3,0 Å. Характерно, что в присутствии Fe^{3+}AK действие солей на послесвечение имеет ингибирующий характер, причем наблюдается та же закономерность суммы ионных радиусов (рис. 2).

Для проверки гипотезы об усилении потока электронов на Fe^{3+} в присутствии MeCl_2 было проведено измерение скорости восстановления $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$

по уменьшению максимума его поглощения при 420 мμ в присутствии хлоропластов и MeCl_2 при 20°. Было найдено в согласии с (8), что скорость восстановления $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$ контрольными

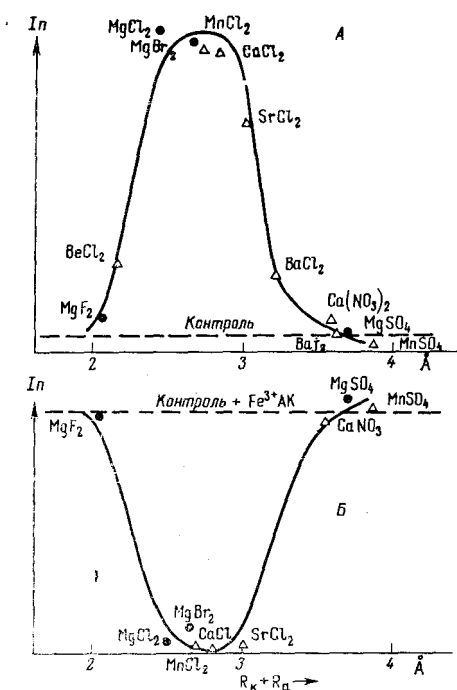


Рис. 2. Зависимость интенсивности послесвечения хлоропластов при -40° от суммы ионных радиусов катиона и аниона ($R_k + R_a$) в добавленных солях (10^{-2} M) для контроля (A) и контроля в присутствии Fe^{3+}AK (B)

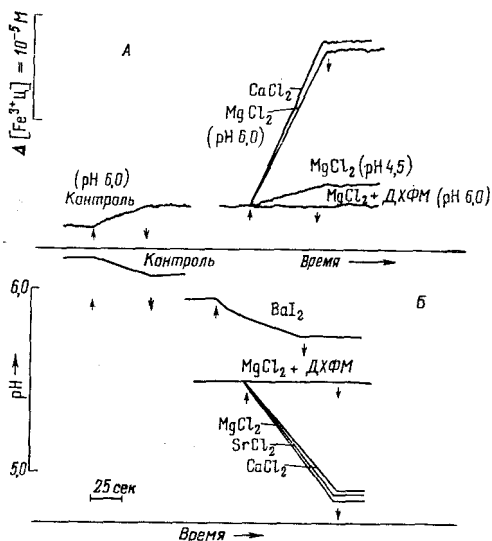
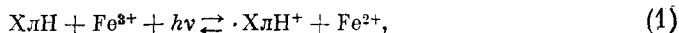


Рис. 3. Фотореакции в хлоропластах при 20° в зависимости от присутствия MeCl_2 (10^{-2} M): фотовосстановление $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$ (A); фотовыделение H^+ в присутствии $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$ (B)

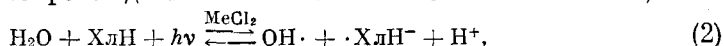
хлоропластами резко усиливается в присутствии MgCl_2 , CaCl_2 , SrCl_2 (рис. 3). Низкое значение pH уменьшает скорость реакции, которая полностью ингибируется ДХФМ ($5 \cdot 10^{-6}$ M). Тот же самый эффект наблюдается по фотовыделению H^+ из хлоропластов в присутствии $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$ и MeCl_2 (рис. 3). Восстановление $\text{Fe}^{3+}\text{Ц}$ и выделение H^+ происходит в стехиометрическом соотношении.

Эти факты подтверждают концепцию связи послесвечения с переносом электрона; стехиометрическое выделение H^+ свидетельствует скорее в пользу участия воды или гидроксильных ионов в качестве донора электронов.

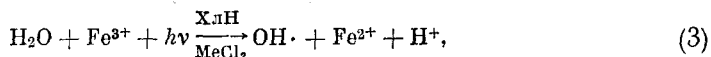
Таким образом, процесс переноса электрона при -40° , сопровождаемый послесвечением, можно представить в виде следующих гипотетических уравнений:



обратный процесс сопровождается послесвечением с $\tau \approx 6 \cdot 10^{-4}$ сек.;



обратный процесс сопровождается послесвечением с $\tau \approx 10^{-3}$ и 0,1 сек.;



процесс не приводит к накоплению радикалов хлорофилла и не сопровождается послесвечением.

Механизм действия $MeCl_2$ может быть понят с точки зрения влияния на состояние мембраны хлоропластов (⁵, ⁶). Однако имеются факты, указывающие на непосредственное взаимодействие $MeCl_2$ с хл.р.ц. Сюда относится известный факт окисления ионов марганца хлоропластами (⁴), а также обнаруженное в данной работе окисление ионов иода (KJ) до молекулярного иода, которое полностью блокировалось ДХФМ.

Мы попытались понять полученные в работе факты с помощью следующего представления. Хл.р.ц. погружен в мембрану, соединенную с окружающей средой марганцевыми каналами. Функция Me^{2+} , образующего плотную гидратную оболочку, заключается в переносе H_2O из внешней среды к хл.р.ц. с помощью образования координационных связей с кислородсодержащими группировками канала. Вслед за Me^{2+} в канал проникает Cl^- , который фиксируется в определенных ее полостях, вблизи хл.р.ц. Кислород молекулы ДХФМ, вероятно, образует водородную связь с атомами кислорода мембраны, а два ее атома хлора занимают полости мембраны, предназначенные для Cl^- , что блокирует реакцию переноса H_2O к хл.р.ц.

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

Поступило
27 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Шувалов, Ф. Ф. Литвин, Молекулярная биология, 3, 59 (1969).
- ² В. А. Шувалов, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 5, 698 (1971).
- ³ Р. М. Бекина, А. А. Красновский, Биохимия, 33, 178 (1968). ⁴ R. N. Kerten, P. J. G. Mann, Biochem. J., 61, 279 (1955). ⁵ Д. М. Островский, И. М. Цфасман, Н. С. Гельман, Биохимия, 34, 993 (1969). ⁶ W. Van Itersen, J. Opden Kamp, Bacteriol., 99, 304 (1969). ⁷ А. В. Карякин, А. К. Чибисов, Сборн. Элементарные фотопроцессы в молекулах, «Наука», 1966, стр. 296. ⁸ S. Isa-wa, R. L. Heath, G. Hind, Biochim. et biophys. acta, 180, 388 (1969).