

Ю. Е. ГИЛЛЕР, Л. Н. ЮХАНАНОВА, С. К. АБДУЛЛАЕВА

**О ПРИРОДЕ АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА,
ОБРАЗУЮЩИХСЯ В ИСКУССТВЕННОМ
ПИГМЕНТ-БЕЛКОВОМ КОМПЛЕКСЕ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 11 IV 1972)

Сейчас, когда представление о многообразии нативных форм хлорофилла и его аналогов в хлоропластах клеток высших растений и водорослей и хромофорах бактерий является общепризнанным, возникает необходимость анализа причин и условий возникновения различных по спектральным свойствам и функциональной роли в фотосинтезе форм пигментов.

Пигмент-пигментное взаимодействие, обусловленное различными видами агрегации молекул хлорофилла (¹⁻³), объясняет лишь сам факт существования *in vivo* его дискретных спектральных форм, условия же возникновения разных типов агрегатов создаются, по-видимому, пигмент-белковым взаимодействием и, в конечном итоге, состоянии белковой или белково-липидной матрицы нативного фитохромолипопротеидного комплекса. Проведенный недавно с этой точки зрения анализ молекулярной организации пигментной системы фотосинтезирующих бактерий обнаружил изменения спектральных свойств нативных форм бактериохлорофилла при конформационных перестройках носителей и выявил роль белков и липидов в конфигурации упаковок агрегированных форм пигмента (^{4, 5}).

Удобной моделью для изучения значения состояния белкового или белково-липидного носителя в образовании различных спектральных форм хлорофилла являются искусственные комплексы пигментов с белками или липопротеидами, в которых образуются формы пигмента, близкие по спектральным свойствам к нативным (^{6, 7}).

В настоящей работе приводятся данные о характере агрегированных форм хлорофилла, образующихся в искусственном пигмент-белковом комплексе, и об их изменениях под действием ацетона. Этот растворитель при концентрациях выше 50% вызывает изменения спектральных свойств хлорофилла, обусловленные изменениями пигмент-пигментного и пигмент-белкового взаимодействия, в хлоропластах (^{8, 9}), гомогенатах листьев (¹⁰) и квантозомах (¹¹), и приводит к «переупаковке» молекул бактериохлорофилла (предположительно, вследствие конформационных перестроек носителя) в хромофорах бактерий (⁵). При больших концентрациях ацетона происходит отрыв пигмента от носителя из-за денатурации последнего (^{5, 9}).

Объектом исследования служил искусственный водорастворимый комплекс спектрально чистого хлорофилла а с казеиновой кислотой, полученный ранее описанным способом (^{7, 12}). Концентрация пигмента в системе была $0,9 \cdot 10^{-4}$ мол/л (17,5% в расчете на белок).

Спектры поглощения комплекса были записаны на спектрофотометре СФ-10, спектры флуоресценции — на регистрирующем спектрофлуориметре (⁷) по общепринятой методике. Толщина слоя объекта при спектрофотометрии была 1 см, при спектрофлуориметрии 0,1 см.

При изучении действия ацетона спектральные параметры комплекса регистрировались сразу после добавления растворителя.

Положение максимумов полос (в м μ) поглощения и флуоресценции хлорофилла а в исследованном комплексе следующее:

Поглощение (20°)	675,	704,	748
Флуоресценция (—196°)	685,	742,	765, 785

Абсорбционная полоса с максимумом 675 м μ принадлежит, вероятно, слабоагрегированной форме пигмента — ассоциатам, обнаруживаемым в бинарной смеси этанол — вода (¹²) и наблюдаемым по спектрам второй производной в клетках высших растений и водорослей (¹⁴) и в комплексах из хлоропластов, разделенных электрофорезом на полиакриламидном геле (¹⁵).

Образующаяся в нашей модели агрегированная форма хлорофилла с максимумом поглощения 704 м μ (хл. 704) наблюдалась в концентрированном растворе в пиридине (¹⁶) и *in vivo* (⁹, ¹⁴, ¹⁶).

Агрегаты хлорофилла а, ответственные за абсорбционную полосу с максимумом 740–750 м μ (хл. 748), обнаруженные в искусственных пигмент-белково-липидных комплексах (⁶, ¹²), идентифицированы как кристаллические образования (¹⁷). Такая форма пигмента наблюдалась ранее в концентрированных растворах, монослоях и пленках (²); в нативных системах подобные агрегаты хлорофилла отсутствуют (⁹, ¹⁴).

Наблюдаемый нами эмиссионный спектр хлорофилла а в комплексе при —196° (табл. 1) представляет собой результирующую полос флуоресценции имеющихся в системе форм пигмента. Положение отдельных полос спектра совпадает с таковым *in vivo* (¹⁸) и в модельных системах без носителя (²).

На рис. 1 приведены спектры поглощения хлорофилла в комплексе при различных концентрациях ацетона и динамика изменения при этом содержания в системе отдельных

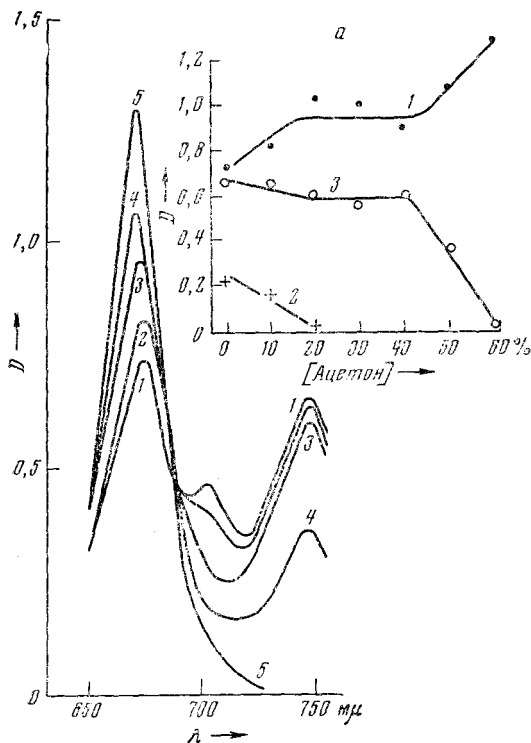


Рис. 1. Действие ацетона на спектр поглощения хлорофилла в комплексе. 1 — контроль; 2 — ацетон 10%, 3 — 20, 30 и 40%, 4 — 50%, 5 — 60%. а — динамика изменения оптической плотности в максимумах поглощения: 1 — 675–670 м μ , 2 — 704 м μ , 3 — 748 м μ

ных форм пигмента (рис. 1а). Как следует из этого рисунка, хл. 704 исчезает полностью уже при 20% ацетона, что указывает на слабую связь этой формы с носителем. Возможно, что эта связь носит адсорбционный характер. Присутствие этого типа агрегатов *in vivo* (⁹, ¹⁴, ¹⁶) делает вероятным предположение об адсорбционном механизме фиксации на липопротеидном носителе по крайней мере части хлорофилла (¹⁹).

Ацетон при концентрации 10–40% практически не оказывает влияния на содержание в комплексе хл. 748. В интервале концентраций 40–60% (когда происходит денатурация белка) эта форма исчезает. Связь разрушения хл. 748 с денатурационными изменениями носителя и его скаткообразный характер (рис. 1а), схожий с наблюдаемой ранее одной из на-

тивных форм бактериохлорофилла ⁽⁵⁾, указывает на связь структуры этого типа агрегатов с состоянием белка-носителя. Подтверждением этому служат данные о возможности вызвать образование хл. 748 в нативном комплексе обработкой горячими органическими растворителями ⁽²⁰⁾ и в искусственном комплексе — понижением pH ⁽¹²⁾, т. е. воздействиями, несомненно влияющими не только на пигмент-пигментное взаимодействие, но и на носитель.

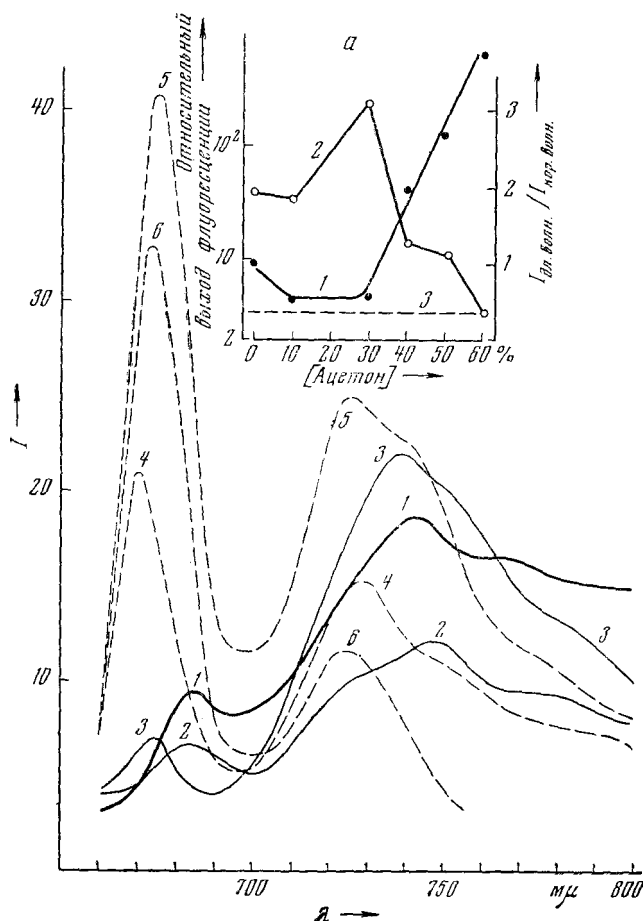


Рис. 2. Действие ацетона на спектр флуоресценции при -196° хлорофилла а в комплексе. 1 — контроль; 2 — ацетон 10%, 3 — 30%, 4 — 40% (масштаб изображения 1:2), 5 — 50% (1:3), 6 — 60% (1:20). а — изменения относительного выхода флуоресценции в максимуме 685—675 мμ (1) и отношения интенсивностей флуоресценции в максимумах 746—724 мμ и 685—675 мμ ($I_{\text{дл. волн}} / I_{\text{кор. волн}}$) (2)

Как следует из рис. 1, с повышением концентрации ацетона в системе главный максимум поглощения хлорофилла смещается в коротковолновую сторону (675 мμ → 670 мμ). Даже при концентрации ацетона 60%, т. е. при денатурации носителя, пигмент не переходит в раствор, аналогично тому, как это отмечалось ранее для хлоропластов ⁽⁹⁾. В этих же условиях пигмент-пигментное взаимодействие полностью прекращается, сохраняется лишь пигмент-белковое взаимодействие, которым объясняется наблюдаемое «красное смещение» главного максимума поглощения (670 мμ) в сравнении с его положением в ацетоновом растворе (665 мμ) ^(6, 7).

Дополнительную информацию об изменениях состояния хлорофилла в комплексе при воздействии ацетона несут спектры флуоресценции при

температуре жидкого азота (рис. 2). Как следует из этого рисунка, при концентрациях ацетона, больших 30%, идет дезагрегация пигмента: уменьшение интенсивности и, в конечном итоге, исчезновение длинноволновых максимумов и замена их полосой 723 мμ и резкое увеличение выхода флуоресценции в области коротковолнового максимума, как это наблюдалось ранее для гомогенатов листьев (¹⁰). При этом полное исчезновение агрегированной формы пигмента, ответственной за флуоресценцию в области 740–742 мμ (725–735 мμ (⁷)) происходит в интервале концентраций 50–60%, т. е. при денатурации носителя (отношение $I_{\text{дл. волн}} / I_{\text{кор. волн}}$ достигает уровня, характерного для растворов (²¹), рис. 2а).

При концентрациях ацетона, меньших 30%, вероятно, имеет место «переупаковка» молекул хлорофилла, подобная наблюдаемой в хроматофорах бактерий (³). Об этом свидетельствует некоторое снижение выхода флуоресценции в коротковолновом максимуме — явление, ранее отмеченное для хлоропластов при комнатной температуре (³), и увеличение отношения $I_{\text{дл. волн}} / I_{\text{кор. волн}}$, указывающее на уменьшение относительного содержания мономерных и слабо агрегированных форм пигмента (рис. 2а). Однако подобная «переупаковка» в искусственном комплексе не наблюдается столь явно, как в нативных комплексах хроматофоров бактерий (³). Поэтому изменения состояния хлорофилла такого типа не заметны в спектре поглощения, самая длинноволновая полоса которого в указанном интервале концентраций растворителя не меняется, а интенсивность полосы 675 мμ растет за счет дезагрегации формы хл. 704 (рис. 4).

Подводя итоги всему сказанному выше, можно сделать заключение, что условия пигмент-пигментного взаимодействия (агрегация) молекул хлорофилла а в искусственном пигмент-белковом комплексе, так же как это было показано для бактериохлорофилла в хроматофорах (⁴, ⁵), зависят от состояния носителя. Этот результат в совокупности с ранее полученными данными о сходстве состояния пигментов в искусственных комплексах и *in vivo* (⁶, ⁷) и о влиянии белка на проявление спектральных свойств хлорофилла (²²) позволяет считать перспективным дальнейшее использование описываемой модели для изучения молекулярной организации пигментной системы хлоропластов.

Институт физиологии и биофизики растений
Академии наук ТаджССР
Душанбе

Поступило
17 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, В кн.: Механизм фотосинтеза, Тр. V Международн. биохимич. конгр. симп. VI, Изд. АН СССР, 1962, стр. 196; Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 41.
- ² Ф. Ф. Литвин, В кн. Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 96.
- ³ Б. А. Гуляев, Ф. Ф. Литвин, Биофизика, **12**, 845 (1967).
- ⁴ Ю. Е. Ерохин, Тез. докл. на симпозиумах II Всесоюзн. биохим. съезда, симп. X, Ташкент, 1969, стр. 278.
- ⁵ Ю. Е. Ерохин, О. А. Спирегуб, Мол. биол., **4**, 401, 541 (1970); **5**, 472 (1971).
- ⁶ Ю. Е. Гиллер, Биофизика, **13**, 1006 (1968).
- ⁷ Ю. Е. Гиллер, Г. В. Красичкова, Д. И. Сапожников, ДАН, **182**, 1230 (1968); Биофизика, **15**, 38 (1970).
- ⁸ Л. А. Тумерман, О. Ф. Борисова, А. Б. Рубин, Биофизика, **6**, 645 (1961).
- ⁹ J. B. Thomas, U. P. Van Der Wal, Biochim. et biophys. acta, **79**, 490 (1964); J. B. Thomas, W. F. L. Flight, *ibid.*, p. 500.
- ¹⁰ Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, Биофизика, **12**, 240 (1967).
- ¹¹ K. Sauer, R. B. Park, Biochim. et biophys. acta, **79**, 476 (1964).
- ¹² Ю. Е. Гиллер, Л. Н. Юхананова, Биохимия, **35**, 873 (1970).
- ¹³ Г. Н. Гуриневич, Т. И. Стрелкова, Биофизика, **13**, 782 (1968).
- ¹⁴ Ф. Ф. Литвин, Б. А. Гуляев, Биол. науки, № 2, 118 (1969); Б. А. Гуляев, Ф. Ф. Литвин, Биофизика, **15**, 670 (1970).
- ¹⁵ O. Machold, A. Meister, K. Adler, Photosynthetic, **5**, 160 (1971).
- ¹⁶ M. Brody, S. S. Brody, Biochim. et biophys. acta, **112**, 51 (1966).
- ¹⁷ E. Rabinowitch, E. E. Jacobs et al., Zs. Phys., **133**, 261 (1965).
- ¹⁸ J. C. Goedheer, Biochim. et biophys. acta, **88**, 304 (1964).
- ¹⁹ Л. И. Некрасов, Биофизика, **12**, 215 (1967).
- ²⁰ J. A. Lippincott, J. Aghion et al., Arch. of Biochem. and Biophys., **98**, 17 (1962); J. Aghion, Biochim. et biophys. acta, **66**, 212 (1963); J. Aghion, E. Porcile, Nature, **197**, 1110 (1963).
- ²¹ Е. Рабинович, Фотосинтез, **2**, ИЛ, 1953.
- ²² В. Д. Семгаевский, С. И. Лось, Г. Н. Лозовая, Биофизика, **16**, 1117 (1971).