

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ, Е. С. МИХАЙЛОВА

### АКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ФЛАВИНОВЫХ КОФЕРМЕНТОВ НА ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЕ ХЛОРОФИЛЛОМ ПРЕВРАЩЕНИЯ ЦИТОХРОМА С

В фотосинтезирующих организмах окислительно-восстановительное равновесие цитохромов изменяется под действием света, поглощенного хлорофиллом (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>); желательное изучение этого явления в более простых системах, так как взаимодействие возбужденного хлорофилла с цитохромами может быть связано с первичным преобразованием энергии света при фотосинтезе.

В предыдущих работах нашей лаборатории (<sup>3-6</sup>) была описана модельная система хлорофилл — цитохром, в которой под действием красного света, поглощенного хлорофиллом, наблюдалось фотосенсибилизированное восстановление цитохрома в анаэробных условиях и фотоокисление восстановленного цитохрома в присутствии кислорода воздуха.

Бернон и Шоу (<sup>7</sup>) нашли, что хлоропласты и хлорофилл в растворе детергентов фотосенсибилизируют восстановление цитохрома С; в присутствии экзогенных доноров водорода в опытах с хлоропластами флавимононуклеотид (ФМН) и феназинметасульфат (ФМС) активировали эту систему.

В данной работе описано активирование модельной системы хлорофилл — цитохром рядом флавиновых соединений: рибофлавином, флавиномононуклеотидом, флавинадениндинуклеотидом (ФАД); испытывались также витамины В<sub>1</sub> (тиамин) и В<sub>6</sub> (пиридоксин) и феназинметасульфат.

Активирующее действие флавиновых коферментов в данной реакции не является специфичным: например, менадион (2-метил, 1,4-нафтохинон) чрезвычайно сильно активирует сенсibilизированное восстановление и окисление цитохрома С в концентрациях до  $10^{-6}$  M, тогда как *p*-бензохинон и пиридиннуклеотиды в этих условиях были неактивны.

Обычная процедура опыта была следующей: в вакуумную трубку Тунберга, приспособленную для спектрофотометрических измерений, вводили раствор 2,3 мг цитохрома С («Reanal») в 3,5 мл фосфатного буфера 0,01 M рН 7,4. В случае применения детергента в головку трубки вводили 1 мл 5% раствора тритона X-100, 0,5 мл водного раствора флавиона и 0,25 мл спиртового раствора хлорофилла а ( $2 \cdot 10^{-4}$  M).

После откачивания воздуха раствор из головки приливали к раствору цитохрома в трубке, выдерживали 2 мин. в темноте, освещали 6 мин. конденсированным светом лампы накаливания 300 вт через красный светофильтр КС-13 при 20° (наибольшая интенсивность света  $10^3$  эрг/см<sup>2</sup>·сек.). Затем пускали воздух в трубку и снова освещали красным светом. В процессе опыта проводили измерения спектров поглощения на регистрирующем спектрофотометре СФ-14 и СФ-4а.

Система хлорофилл — цитохром без детергента обладает весьма малой активностью (<sup>3</sup>, <sup>4</sup>). Однако введение флавиновых коферментов приводит к увеличению эффекта. Например, реакция фотовосстановления ( $+\Delta D \cdot 1000$  при 550 мμ за 15 мин.) характеризуется следующими данными:

Без флавинов	20	Рибофлавин	90
ФАД	40	ФМН	90

Активность рибофлавина и ФМН в концентрации  $2,6 \cdot 10^{-5} M$  была приблизительно одинаковой, активность ФАД в этих условиях при той же концентрации была несколько ниже.

Система хлорофилл — цитохром в водном растворе тритона X-100 гораздо активнее, чем в водном растворе без детергента. Введение флавиновых коферментов приводит к еще большей активации сенсibilизированного восстановления и окисления. Активность рибофлавина, ФМН и ФАД в реакции фотовосстановления (+ $\Delta D$ ) цитохрома была близкой; активаци-

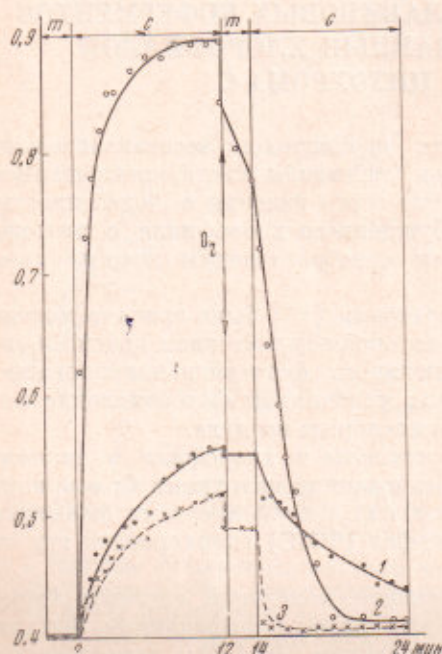


Рис. 1. Влияние рибофлавина и ФМС на фотовосстановление и фотоокисление цитохрома С, сенсibilизированное хлорофиллом в водной среде (1% тритона X-100) рН 7,4. 1 — хлорофилл + цитохром; 2 — то же + рибофлавин; 3 — то же (1) + ФМС.  $\tau$  — темнота,  $c$  — свет,  $\downarrow O_2$  — пуск воздуха

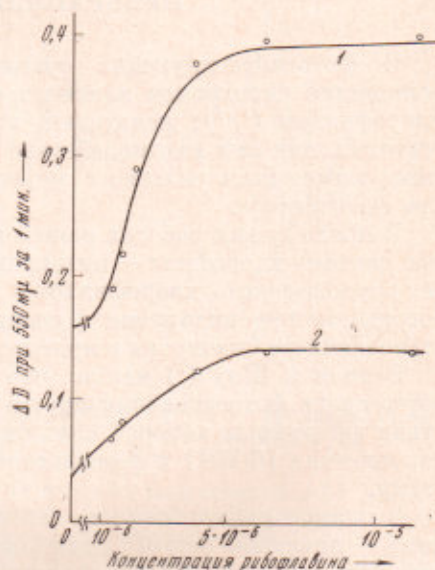


Рис. 2. Зависимость скорости сенсibilизированного хлорофиллом фотовосстановления (1) и фотоокисления (2) цитохрома С от концентрации рибофлавина (в водном растворе тритона X-100). Концентрация хлорофилла  $10^{-5} M$ , красный свет  $\lambda > 620 m\mu$ ,  $6 \cdot 10^4 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$ .

ция фотоокисления ( $-\Delta D$ ) была несколько больше в случае рибофлавина ( $\Delta D \cdot 1000$  при 550  $m\mu$  за 3 мин. освещения; см. также рис. 1):

Без флавинов	+115	- 30
Рибофлавин	+475	-275
ФМН	+470	-160
ФАД	+450	-120

Следует отметить, что флавиновые соединения и в темноте катализируют окисление кислородом восстановленного цитохрома, идущее, однако, с меньшей скоростью, чем при освещении.

Мы испытывали действие ФМС, который так же, как и флавины, является кофактором переноса электрона при фотофосфорилировании. В нашей системе ФМС ингибировал фотовосстановление цитохрома, но чрезвычайно сильно активировал фотоокисление восстановленного цитохрома. Использование в реакции других витаминов группы В, а именно В<sub>1</sub> и В<sub>6</sub>, привело к следующим результатам. Витамин В<sub>1</sub> в концентрации от  $10^{-6}$  до  $10^{-3} M$  практически не влияет на реакцию. Витамин В<sub>6</sub> начиная от концентрации  $10^{-4} M$  явно ингибирует фотосенсibilизированное восстановле-

ние цитохрома и активирует его окисление, т. е. действует подобно ФМС. Это действие витамина  $B_6$  следует приписать его способности к обратимым окислительно-восстановительным превращениям.

Зависимость скорости фотосенсибилизированного восстановления и окисления цитохрома от концентрации рибофлавина при постоянной интенсивности света и рН 7,4 показана на рис. 2. Насыщение эффекта наблюдалось при концентрации рибофлавина  $4-6 \cdot 10^{-6}$  M. Обычно опыты проводились при концентрации рибофлавина  $2,6 \cdot 10^{-5}$  M, т. е. в области насыщения.

Зависимость скорости реакции восстановления и окисления от интенсивности света, которую изменяли при помощи нейтральных светофильтров, показана на рис. 3. Скорость реакции приблизительно пропорциональна логарифму интенсивности света, что исключает двухквантовый механизм процесса.

Зависимость реакции от рН изучалась в пределах от 4 до 10 в опытах с рибофлавином. Максимум активности реакции фотовосстановления наблюдался при рН 7-9, а максимум активности фотоокисления при рН 6-7.

В работе Вернона<sup>(8)</sup> было показано, что рибофлавин при освещении в области собственного поглощения (максимум в сине-зеленой области спектра) способен к фотосенсибилизации окислительно-восстановительных превращений цитохрома С. В наших опытах реакция возбуждается красным светом, обычно через красные светофильтры КС-13 или КС-19. В области пропускания этих светофильтров рибофлавин не обладает поглощением. Однако в контрольных опытах, без хлорофилла, при освещении красным светом иногда наблюдался небольшой эффект фотосенсибилизации, обычно в 20-30 раз меньший, чем в присутствии хлорофилла. Опыты показали, что эффект обусловлен действием рассеянного дневного света, которое нельзя полностью исключить в данной процедуре фотохимического эксперимента.

Так, например, при стоянии системы рибофлавин — цитохром в растворе детергента в трубке Тунберга на дневном рассеянном свете пасмурным днем за 45 мин. оптическая плотность восстановленного цитохрома (при 550 м $\mu$ ) увеличивается на 0,4; в полной темноте изменений цитохрома не наблюдается.

В контрольной процедуре, имитирующей весь процесс проведения реакции на установке, но без включения действующего света, наблюдалось малое ( $\Delta D$  около 0,005) изменение цитохрома за счет влияния рассеянного дневного света. Окисление цитохрома идет и в темноте, но рассеянный свет ускоряет этот процесс.

Для того чтобы изучить влияние понижения температуры на скорость реакции, мы применяли систему, содержащую 75% глицерина. В этой среде спектрофотометрические измерения можно вести при  $-70^\circ$ , среда остается прозрачной. При  $-70^\circ$  в пределах точности измерений на спектрофотометре СФ-14 не удалось наблюдать фотосенсибилизированной реакции, тогда как при  $20^\circ$  реакция идет весьма активно. Эти данные указывают на наличие диффузионной стадии в механизме реакции. Если при низкой температуре имеет место быстрая обратимость первичных стадий, то примененная техника регистрации непригодна и требуются измерения при помощи дифференциальной или импульсной спектроскопии.

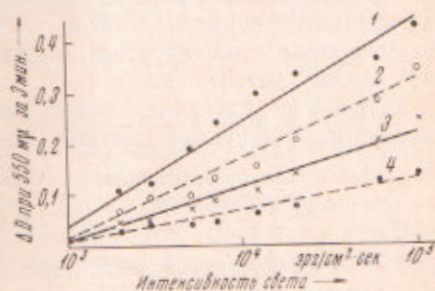
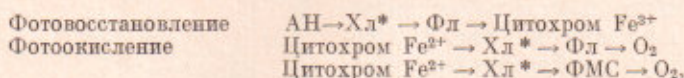


Рис. 3. Зависимость скорости фотовосстановления (1, 3) и фотоокисления (2, 4) цитохрома С, сенсибилизированного хлорофиллом, от интенсивности красного света (в водном растворе триптона X-100). 1, 2 — в присутствии рибофлавина; 3, 4 — без рибофлавина.

Возможен следующий механизм реакции. Опыты показывают, что флавины ускоряют как фотосенсибилизированное восстановление, так и окисление. Поэтому можно полагать, что флавиновые кофакторы включаются в качестве промежуточного переносчика электрона между звеньями хлорофилл — цитохром. Недавно описана<sup>(9)</sup> возможность образования комплекса хлорофилла с рибофлавином (с ФМН), с переносом электрона в этом комплексе под действием света, поглощенного хлорофиллом. Мы не смогли, однако, обнаружить полосы поглощения при 700 мμ в системе хлорофилл — рибофлавин в водном растворе детергента. Возможно, что в этих условиях стационарная концентрация комплекса очень мала из-за диссоциирующего действия детергента.

В свете результатов данной работы гипотетическую схему переноса электрона в изученной системе можно представить следующим образом:



где Хл\* — возбужденный светом хлорофилл, Фл — флавиновый кофермент, АН — донор водорода, ФМС — феназинметасульфат.

Положение промежуточного переносчика электрона — флавина в показанных на схеме звеньях модельной цепи переноса электрона требует дальнейшего исследования.

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

Поступило  
8 VI 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. Hill, *Adv. in Enzymol.*, **12**, 1 (1951). <sup>2</sup> H. Lundegardt, *Physiol. plantarum*, **7**, 375 (1954). <sup>3</sup> А. А. Красновский, *ДАН*, **103**, 288 (1955). <sup>4</sup> А. А. Красновский, К. К. Войновская, *Биофизика*, **1**, 120 (1956). <sup>5</sup> Г. П. Брин, А. А. Красновский, *Биохимия*, **22**, 776 (1957). <sup>6</sup> А. А. Красновский, Е. С. Михайлова, *ДАН*, **185**, 938 (1969). <sup>7</sup> L. P. Vernon, E. R. Shaw, *Biochemistry*, **4**, 132 (1965). <sup>8</sup> L. P. Vernon, *Biochim. et biophys. acta*, **36**, 177 (1959). <sup>9</sup> Shu-I-Tu, J. H. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 79 (1969).