

С. В. ХАНГУЛОВ, М. Г. ГОЛЬДФЕЛЬД, Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД

## О МЕХАНИЗМЕ ФОТОПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В ХЛОРОПЛАСТАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком Н. Н. Семеновым 6 VI 1974)

Первичной стадией фотосинтеза высших растений является разделение зарядов, осуществляемое двумя фотохимическими реакционными центрами, различающимися по своей спектральной чувствительности. Следующая стадия процесса — темновой перенос электрона, который, как предполагают, имеет трансмембранную составляющую (<sup>1-3</sup>). В предыдущих работах (<sup>4, 5</sup>) была предпринята попытка исследовать кинетические закономерности переноса электрона в стационарном режиме освещения листьев и хлоропластов высших растений по изменениям концентрации окисленного пигмента P700 в реакционном центре фотосистемы I и был сделан вывод об изменении констант скорости переноса электрона между фотосистемами в зависимости от режима освещения и окислительного состояния компонентов цепи переноса электрона. В настоящей работе метод э.п.р. использован для наблюдения изменений состояния P700 в условиях импульсного освещения (вспышки белого света длительностью 10 мксек., с энергией  $\approx 16$  дж) или комбинированного импульсного и стационарного света  $\lambda$  710 нм. Хлоропласты бобов *Vicia faba* выделяли, как описано ранее (<sup>6</sup>), и дополнительно отмывали средой выделения (200 мМ сахараза, 50 мМ NaCl, 25 мМ трис-HCl, pH 7,8). Во всех опытах в суспензии хлоропластов (2–3 мг на 1 мл хлорофилла) вводили метилвиологен. Конечная концентрация метилвиологена была  $5 \cdot 10^{-4}$  М.

В предварительных опытах было замечено, что скорость спада сигнала э.п.р. I (P700<sup>+</sup>) после выключения света 710 нм насыщающей интенсивности по сигналу э.п.р. тем больше, чем выше интенсивность света (рис. 1а). Исходя из этого, мы предположили, что при освещении накапливается восстановленный продукт, концентрация которого к моменту выключения света тем выше, чем больше интенсивность света. Если сразу после выключения света  $\lambda$  710 нм образец освещали вспышкой белого света, то в кинетике спада сигнала появлялась быстрая компонента, не разрешаемая установкой, причем глубина этого быстрого спада существенно зависела от интенсивности постоянной подсветки  $\lambda$  710 нм (рис. 1а). Этот результат можно объяснить, если предположить, что электроны, генерируемые фотосистемой II под действием вспышки, «активируют» восстановленный продукт, накопленный за время стационарного освещения. Подбором интенсивности света  $\lambda$  710 нм или времени после его выключения (рис. 1б) можно добиться изменения отклика сигнала э.п.р. на вспышку и, в частности, полностью исключить влияние одиночной вспышки света на поведение сигнала. При этом оказалось, что две вспышки, поданные последовательно с интервалом 1 сек., дают эффект, существенно превышающий сумму эффектов от двух отдельных вспышек, поданных на образец с большим (около 50 сек.) интервалом между ними. Из этих данных можно заключить, что одиночная вспышка не приводит к восстановлению P700<sup>+</sup>, если стационарное освещение не обеспечило необходимой концентрации восстановленного продукта. Вторая вспышка приводит к качественно отличному отклику системы благодаря «активации» восстановленного про-

дукта, созданного первой вспышкой. На рис. 2 показан отклик системы на одну, две, три и четыре вспышки света.

В каждом опыте вспышки подавали с интервалом в 2 сек. при постоянной времени прибора 0,1 сек. Для стандартизации состояния хлоропластов суспензию предварительно освещали 3 мин. светом  $\lambda$  710 нм, после чего выдерживали столько же времени в темноте. Оказалось, что в этих условиях первая вспышка приводит к возникновению сигнала э.п.р. I, медленно (время полупревращения около 25 сек.) гнущего в темноте. Вторая вспышка частично подавляет сигнал (время спада было

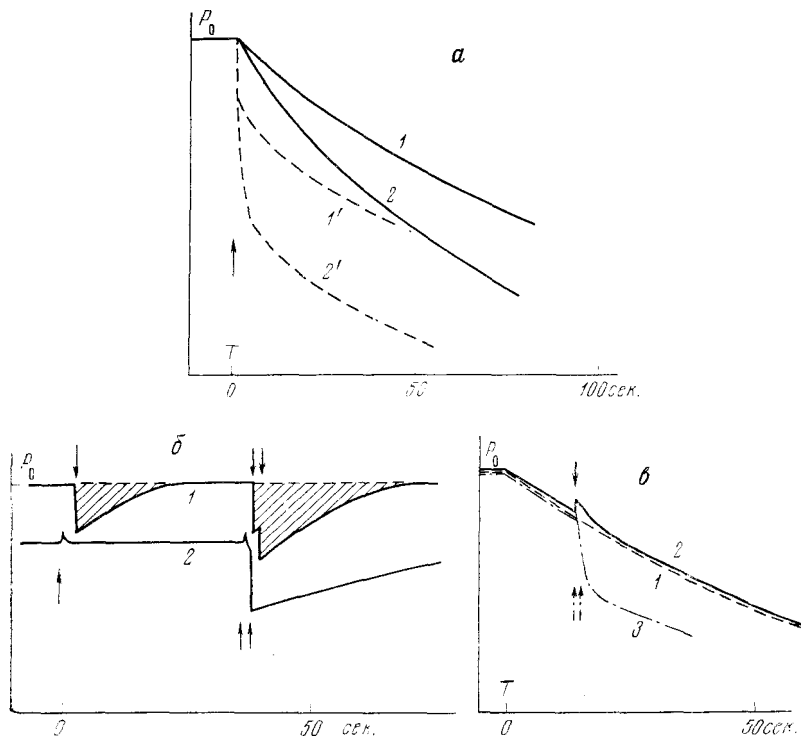


Рис. 1. Кинетика отклика сигнала э.п.р. П700+ ( $P_0$  — максимальная амплитуда сигнала): а — на выключение света  $\lambda$  710 нм различной интенсивности (1, 1' — 300 эрг·см<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>; 2, 2' — 850 эрг·см<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>) без вспышки (1, 2) и при наличии вспышки (1', 2') в момент выключения света; б — на вспышки, подаваемые на фоне непрерывного освещения (1 — 150 эрг·см<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>; 2 — 48 эрг·см<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>); в — на вспышки, подаваемые после частичного спада сигнала в темноте (1 — контроль, без вспышки, 2 — одна вспышка, 3 — две вспышки).  $I_{710}$  = 150 эрг·см<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>.  $T$  — момент выключения света. Стрелки — момент подачи вспышки, двойные стрелки означают пару вспышек, разделенных интервалом 1 сек.

меньше, чем разрешающее время прибора). третья вспышка вновь приводит к частичному окислению П700, четвертая — к его восстановлению. Таким образом, наблюдалась периодическая зависимость интенсивности сигнала э.п.р. I от числа вспышек с периодом в две вспышки. Эти колебания постепенно затухали.

Предлагаемая нами интерпретация обнаруженного эффекта основана на твердо установленном факте участия в переносе электрона в фотосинтетической цепи пластохинона. Гомологичное пластохинону соединение — коэнзим Q — играет существенную роль в переносе электрона в дыхательной цепи митохондрий. Характерно, что пластохинон и коэнзим Q в соответствующих мембранах находятся в большом избытке по отношению к другим компонентам и, судя по возможности обратимой экстракции, боль-

шая часть их молекул не фиксирована жестко в липопротеидных комплексах (<sup>7</sup>, <sup>8</sup>). Наблюдаемая зависимость отклика системы от четности числа вспышек, по-видимому, означает, что в цепи переноса электронов имеется двухэлектронное звено, т. е. такой компонент, который, принимая электроны от донора по одному, способен отдавать их акцептору только

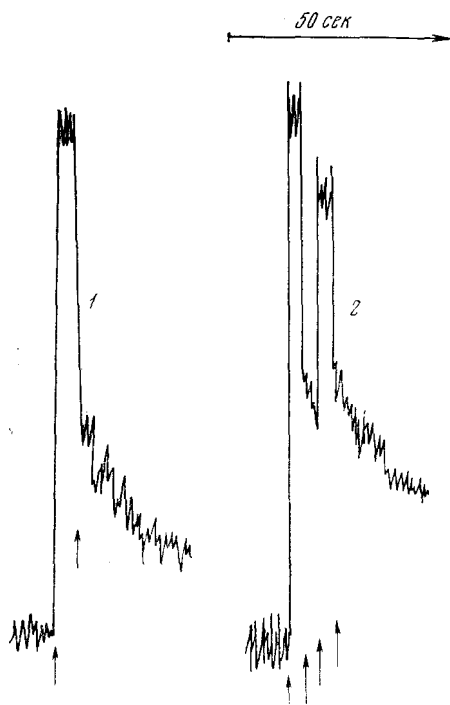


Рис. 2. Типичная запись кинетики изменения сигнала э.п.р. I в ответ на 2 (1) и на 4 (2) вспышки, следующие одна за другой с интервалом 2 сек.

после полного (двукратного) восстановления. Среди компонентов фотосинтетической электронтранспортной цепи между двумя фотосистемами таких соединений не обнаружено. Очевидно, двухэлектронные свойства проявляются у него только в интактной мембранной системе. Из идентифицированных компонентов цепи переноса электрона только пластохинон способен проходить через промежуточную полуокисленную (полувосстановленную) форму. Причина наблюдаемой характерной зависимости отклика системы на вспышки, по нашему мнению, заключается в специфических особенностях гидрофильно-гидрофобного баланса молекул этого вещества в хинонной, гидрохинонной и семихинонной формах. В то время как незаряженные при физиологических pH молекулы пластохинона и пластогидрохинона хорошо растворимы в липидной фазе мембраны и свободно распространяются в ней по градиенту концентрации, семихинонные анион-радикалы пластохинона, хотя и не могут полностью выходить в водную фазу из-за наличия у них объемистой углеводородной цепи, должны сорбироваться на границе раздела между липидной и водной фазами мембраны. В исходных темновых хлоропластах практически весь пластохинон окислен. Первая вспышка света возбуждает фотосистему II. Первичный акцептор фотосистемы II передает один электрон пластохинону, превращая его в пластосемихинон. Последний закрепляется на границе раздела мембрана — вода и не обладает способностью проникать через липидный слой мембраны к реакционным центрам фотосистемы I. В результате первая вспышка создает сигнал э.п.р., длительно сохраняющийся в темноте, так как центры  $P700^+$  недоступны для восстановителя. Вторая вспышка генерирует еще один пластосемихинонный анион-радикал, который, рекомбинируя с первым, дает по реакции диспропорционирования  $2Q^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow Q + QH_2$  пару хинон — гидрохинон. Пластогидрохинон свободно диффундирует через липидную фазу к акцептору — центру  $P700^+$ , и сигнал подается. Такая ситуация реализуется, если перед первой вспышкой пластохинонный пул не содержал семихинонных радикалов на восстановительной стороне фотосистемы II. Если же перед первой вспышкой часть цепей переноса электрона содержала по одному семихинону (более одного анион-радикала пластосемихинона в пуле содержаться не может в силу реакции диспропорционирования), то вспышка индуцирует гибель сигнала э.п.р.  $P700^+$  вследствие рекомбинации новообразованных семихинонов с радикалами, возникшими ранее. В этом состоит смысл той «активации» восстановленного продукта, о которой говорилось

ранее. Таким образом, естественно объясняется зависимость влияния оди-  
нотной вспышки на сигнал э.п.р. от интенсивности предварительного ос-  
вещения системы светом 710 нм. Ввиду того что обнаруженная периодич-  
ность имеет простой физико-химический механизм, следовало ожидать,  
что она будет весьма устойчива к различным воздействиям. Действитель-  
но, оказалось, что картина качественно не меняется при старении хлоро-  
пластов (20 час. при 4—5°), варьировании концентрации хлористого маг-  
ния, хлористого натрия, сульфата натрия, в присутствии гидроксиламма.  
При введении дихлорфенилдиметилмочевины, блокирующей транспорт  
электронов между первичным акцептором фотосистемы II и пластохино-  
ном, вспышки индуцировали монотонное возрастание сигнала вплоть до  
его насыщения. Отметим, что, помимо быстрой гибели сигнала P700<sup>+</sup> под  
действием четного числа вспышек, имело место медленное восстановление  
и в отсутствие вспышек белого света в темноте. Можно предположить, что  
незначительная концентрация пластосемихиноновых радикалов обеспечи-  
вает это восстановление за счет рекомбинации семхинонов, принадле-  
жащих различным цепям фотопереноса. Если это предположение верно, то  
скорость спонтанного спада сигнала отражает степень «обобществления»  
молекул пластохинона между различными цепями. Естественно предпо-  
ложить, что воздействия, нарушающие морфологическую целостность  
мембран, «перемешивающие» их компоненты, могут делать более вероят-  
ной рекомбинацию семихиноновых радикалов, ранее принадлежавших раз-  
личным цепям переноса. Действительно, мягкая обработка хлоропластов  
ультразвуком, не устранявшая перенос электронов между фотосистема-  
ми I и II, приводила к утрате периодичности отклика сигнала э.п.р. на  
вспышки света.

Полученные результаты позволяют рассматривать пластосемихинон  
как направленный переносчик протонов с наружной стороны тилакоидной  
мембраны, где образуется протонированная форма пластогидрохинона, на  
внутреннюю ее сторону, где в результате окисления пластогидрохинона  
реакционными центрами фотосистемы I вновь образуется пластохинон  
и освобождаются два протона.

Институт химической физики  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
6 IV 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> H. T. Witt, Quart. Rev. Biophys., v. 4, 365 (1971). <sup>2</sup> А. Б. Рубин, Т. Е. Крепде-  
лева, Усп. совр. биол., т. 73, 364 (1972). <sup>3</sup> W. Junge, W. Ausländer, Biochim. et bio-  
phys. acta, v. 333, 59 (1973). <sup>4</sup> L. A. Blumenfeld, M. G. Goldfield et al., Photosyntheti-  
ca, v. 8, 21 (1974). <sup>5</sup> А. И. Цанин, М. Г. Гольдфельд, Биофизика, т. 19, № 6 (1974).  
<sup>6</sup> А. I. Tzapin, Ju. G. Molotkovsky et al., Europ. J. Biochem., v. 20, 248 (1971). <sup>7</sup> N.  
Bishop, Biochim. et biophys. acta, v. 27, 205 (1958). <sup>8</sup> L. Ernster, Europ. J. Biochem.,  
v. 9, 290 (1969).