

Е. Н. МУХИЦ, Н. Ф. НЕЗНАЙКО, А. Я. ШКУРОПАТОВ,
Ю. М. СТОЛОВИЦКИЙ, В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ

**О ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОМ ХЛОРОФИЛЛОМ а
ВОССТАНОВЛЕНИИ ФЕРРЕДОКСИНА В ВОДНОМ БУФЕРНОМ
РАСТВОРЕ ДЕТЕРГЕНТА**

(Представлено академиком А. А. Баевым 10 XI 1974)

Железосодержащий белок — ферредоксин, согласно современным представлениям, является одним из возможных претендентов на роль первичного акцептора электрона в фотосистеме I высших растений. В связи с этим изучение фотохимического взаимодействия ферредоксина с хлорофиллом и его аналогами вызывает большой интерес. Известны данные по фотовосстановлению ферредоксина фрагментами хлоропластов и хроматофоров (см. обзор ⁽¹⁾). В ряде работ ⁽²⁻⁴⁾ было исследовано фотосенсибилизированное некоторыми порфиринами восстановление ферредоксина различными донорами электрона, такими как аскорбиновая кислота, диэритритол, глутатион. Наряду с этим проведено ^(5, 6) детальное исследование механизма фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления различными донорами электрона метилвиологена — красителя с близким к ферредоксину значением нормального окислительно-восстановительного потенциала.

Однако в настоящее время в литературе не известны данные по фотосенсибилизации реакций ферредоксина непосредственно хлорофиллом в модельных системах. Вместе с тем такого рода сведения важны при решении вопроса о первых стадиях механизма конверсии энергии света при фотосинтезе. Поэтому целью настоящей работы явилась попытка экспериментального обнаружения фотосенсибилизированного хлорофиллом восстановления ферредоксина в присутствии подходящего донора электронов.

Исследование проводили в буферном 0,5% растворе детергента тритон х-100 ⁽⁵⁾. В работе использовали 0,05 М раствор трис-НСI-буфера.

Хлорофилл а выделяли из листьев крапивы по методике, близкой к описанной в работе ⁽⁷⁾; чистоту пигмента контролировали спектрофотометрически. Солюбилизацию хлорофилла в 0,5% буферном растворе тритона х-100 осуществляли путем приливания концентрированного раствора пигмента в серном эфире (0,1 мл) к 2 мл раствора детергента в трис-буфере. Конечная концентрация хлорофилла а в наших экспериментах составляла обычно около 10^{-5} М.

Ферредоксин выделяли из листьев гороха (сорт «Превосходный») и очищали по методике, описанной в ⁽⁸⁾. Отношение оптических плотностей при λ 422 нм и λ 278 нм составляло для использованного в данной работе ферредоксина 0,58—0,62.

Реакционная среда общим объемом около 2 мл включала следующие компоненты: хлорофилл а 10^{-5} М; ферредоксин $5 \cdot 10^{-5}$ М; тритон х-100 0,5%. Интервал рН от 6 до 12,5. В качестве донора электронов был использован цистеин ($5 \cdot 10^{-3}$ М). Поскольку добавление такого донора электрона существенно изменяет рН среды, каждый раз после экспериментов определялась действительная величина рН раствора. О фотосенсибилизированном восстановлении ферредоксина судили по уменьшению его поглощения (в области 460—500 нм) при освещении реакционной смеси

красным светом. Измерения поглощения проводили на спектрофотометрах «Specord» UV VIS и «Hitachi» (модель 356). Растворы в кварцевых трубках Тунберга освещали светом лампы накаливания 400 вт (осветитель ЛЭТИ), отфильтрованным с помощью водного теплового фильтра (6 см) и стеклянного светофильтра КС-13 (или КС-11). При использовании спектрофотометра «Hitachi» освещение реакционной смеси производили непосредственно в кюветном отделении спектрофотометра и на диаграммной

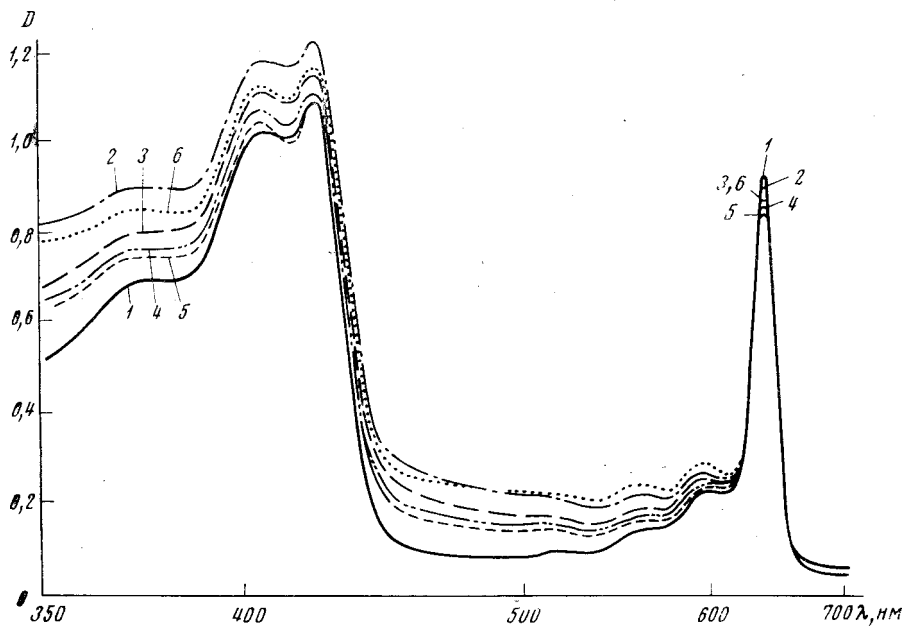


Рис. 1. Восстановление ферредоксина ($5 \cdot 10^{-5} M$) цистеином ($5 \cdot 10^{-3} M$), фотосенсибилизированное хлорофиллом а ($10^{-5} M$) в буферном растворе детергента тритон х-100 (трис-буфер, 0,5% тритон х-100, рН 9,3). 1 — спектр поглощения хлорофилла в растворе детергента тритон х-100; 2 — суммарный спектр смеси цистеин + хлорофилл + ферредоксин; 3–5 — изменения спектра 2 после 5, 15, 25 мин. освещения соответственно; 6 — окисление восстановленного белка кислородом в темноте

ленте автоматически фиксировали кинетику сенсибилизированной реакции при длине волны 465 нм. Реакцию исследовали в анаэробных условиях ($\sim 2 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст.).

На рис. 1, 1 приведен спектр поглощения хлорофилла а в буферном растворе детергента в вакууме в присутствии цистеина. Суммарный спектр тройной смеси после добавления (без нарушения вакуума) ферредоксина представлен на рис. 1, 2.

Освещение реакционной смеси красным светом вызывало быстрое уменьшение поглощения белка (рис. 1, 3). По мере увеличения времени освещения происходило дальнейшее уменьшение поглощения ферредоксина (рис. 1, 4, 5). Однако наибольшая скорость обесцвечивания наблюдалась в первые минуты освещения. Впуск воздуха в темноте в предварительно освещенную ячейку приводил к увеличению оптической плотности белка, обесцвеченного в результате фотореакции, до уровня, близкого к исходному (рис. 1, 6).

Наблюдаемое в данных условиях светоиндуцированное уменьшение поглощения белка обусловлено, по всей вероятности (²⁻⁴), фотосенсибилизированным хлорофиллом восстановлением ферредоксина цистеином. Как следует из рис. 1, в темноте восстановленный белок окисляется акцептором — кислородом воздуха (рис. 1, 6). Следует отметить, что реакция сенсибилизации сильно зависит от рН среды: при подщелачивании среды от

pH 8 до pH 11 количество восстановленного продукта существенно увеличивается. При pH меньше 8 фотовосстановления ферредоксина практически не наблюдалось.

Ряд экспериментальных данных, полученных в ходе исследования, свидетельствует о том, что оценка степени фотосенсибилизированного восстановления ферредоксина в некоторых случаях может осложняться процессами, не связанными с реакцией сенсибилизации. На это могут указывать, например, следующие наблюдения: а) небольшое темновое уменьшение поглощения ферредоксина в сильно щелочной области pH; б) темновое изменение соотношения пиков в синей полосе поглощения хлорофилла; в) светоландуцированное падение оптической плотности в красном максимуме спектра поглощения хлорофилла, где поглощение ферредоксина незначительно.

Для выяснения отмеченных выше причин спектральных изменений были поставлены следующие контрольные эксперименты.

Исследование спектров поглощения ферредоксина в растворе детергента в зависимости от pH показало, что в области pH больше 10,5 происходит небольшое темновое уменьшение поглощения белка. В то же время подщелачивание среды до pH 10 и выше является причиной и темновых изменений в спектре поглощения хлорофилла⁽⁵⁾. На рис. 2 приведены результаты контрольных опытов с буферными растворами детергента, содержащими компоненты реакционной смеси в различных комбинациях (при близких значениях pH).

Рис. 2. Кинетика изменений поглощения для λ 465 нм при освещении красным светом растворов: 1 - цистеин + хлорофилл + ферредоксин; 2 - цистеин + ферредоксин; 3 - цистеин + хлорофилл; 4 - хлорофилл + ферредоксин. C - включение света; T - выключение

На основании приведенных данных по влиянию pH на спектры поглощения белка и пигмента конечная величина pH смеси подбирались в пределах от 9 до 9,5 единиц. Измерения в этом случае производились на спектрофотометре «Hitachi», чувствительность которого можно менять в широких пределах. Были проведены 3 серии экспериментов; типичные результаты приведены на рис. 2.

Как следует из кривой 1 (рис. 2), освещение тройной системы цистеин + хлорофилл + ферредоксин приводит к четкому уменьшению поглощения белка (при λ 465 нм). Освещение смеси цистеин + ферредоксин без пигмента не влияет на поглощение ферредоксина (рис. 2, 2). Из кривой 3 (рис. 2) видно, что при освещении раствора цистеин + хлорофилл наблюдается не уменьшение, а даже некоторое увеличение поглощения в области 465 нм.

В данной работе нами не исследовалась детально природа последнего явления. Однако, учитывая тот факт, что спектральные изменения хлорофилла в смеси цистеин + хлорофилл заметно усиливались при впуске воздуха, можно предположить, что эти изменения обусловлены окислительно-восстановительными превращениями самого пигмента. В смеси хлорофилл + ферредоксин изменения поглощения (λ 465 нм) при освещении были незначительны (рис. 2, 4).

На основании проведенных экспериментов можно сделать следующее заключение. В тройной системе цистеин + хлорофилл а + ферредоксин в

буферном растворе 0,5% детергента тритон х-100 в вакууме происходит фотосенсибилизированный хлорофиллом перенос электрона от цистеина к белку. По всей вероятности, имеет место «химический» механизм сенсибилизации (9). Одновременно при освещении системы цистеин+хлорофилл а происходит небольшое увеличение поглощения хлорофилла в синне-зеленой области спектра. Следовательно, измеряемая экспериментально степень восстановления ферредоксина оказывается заниженной: в действительности восстановление проходит более глубоко.

Таким образом, основным результатом данной работы является обнаружение фотосенсибилизированного хлорофиллом а восстановления ферредоксина цистеином в водной, содержащей детергент, среде.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пуццино-на-Оке

Поступило
1 XI 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ *Е. Н. Мухин*, Усп. биол. хим., т. 12, 246 (1971). ² *R. I. Kassner, M. D. Kamen*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 58, 2445 (1967). ³ *R. I. Kassner*, Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 32, 782 (1968). ⁴ *K. K. Eisenstein, I. H. Wang*, J. Biol. Chem., v. 244, 1720. ⁵ *А. Н. Луганская, А. А. Красновский*, Мол. биол., т. 4, 848 (1970). ⁶ *В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова*, Биохимия, т. 37, 952 (1972). ⁷ *F. P. Zscheile, C. L. Comar*, Bot. Gaz., v. 102, 463 (1941). ⁸ *Е. Н. Мухин, В. К. Гинс*, Биохимия, т. 37, 1012 (1972). ⁹ *В. Б. Евстигнеев*, Биофизика, т. 8, 664 (1963).