

Л. И. БОГУСЛАВСКИЙ, Б. Т. ЛОЖКИН, Б. А. КИСЕЛЕВ

ГЕНЕРАЦИЯ ТЕМНОВОГО ПОТЕНЦИАЛА НА БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ, СОДЕРЖАЩИХ ХЛОРОФИЛЛ

(Представлено академиком А. Н. Фрумкиным 8 I 1975)

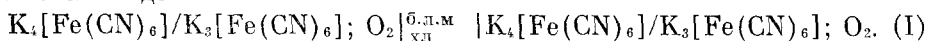
По современным представлениям, хлорофилл, осуществляющий в фотосинтезе реакции фотосенсибилизации, сам при этом претерпевает окислительно-восстановительные превращения⁽¹⁾. Эти превращения достаточно глубоко изучены для истинных растворов хлорофилла при реакциях фотохимического окисления или восстановления⁽²⁻³⁾. Однако в нативных условиях в реакционном центре фотосинтетического аппарата хлорофилл включен в мембрану тилакоидов. Реакции с участием хлорофилла в этих условиях изучены слабо. В этой связи представляет интерес проследить, как окислительно-восстановительная реакция, инициированная взаимодействием какой-либо редокс-пары с хлорофиллом, встроенным в бислойную липидную мембрану (б.л.м.), контролирует величину трансмембранного потенциала, и получить информацию о природе частиц, определяющих трансмембранный потенциал.

В настоящей работе исследованы трансмембранные потенциалы на б.л.м., модифицированных фотосинтетическими пигментами, в присутствии различных окислительно-восстановительных систем.

В качестве модифицирующих добавок использовались хлорофилл а и хлорофилл b, выделенные из крапивы и очищенные на колонке из сахарозы⁽⁴⁾.

Мембраны формировались из растворов лецитина с холестерином (отношение 20:15) в декане с добавкой хлорофилла. Соотношение липид — хлорофилл варьировалось от 10 до 20. В качестве фона использовался раствор 10^{-3} М КСl. Экспериментальная установка, описанная в работе⁽⁵⁾, позволяла измерять токи и потенциалы на высокоомных объектах. Растекание мембраны контролировалось измерением низкочастотного импеданса⁽⁵⁾. Были исследованы трансмембранные потенциалы на б.л.м., модифицированных фотосинтетическими пигментами, в присутствии окислительно-восстановительных систем: ферро-феррицианид; НАДФ⁺ — ферроцианид, НАД⁺ — ферроцианид.

На рис. 1 представлена концентрационная зависимость трансмембранного потенциала на б.л.м. в системе ферро-феррицианид. На осях абсцисс отложено отношение концентраций восстановленной и окисленной форм редокс-пары. Исследованная электрохимическая цепь может быть представлена в виде



Опыт ставился таким образом, что мембрана формировалась при симметричных условиях, когда отношение окисленной и восстановленной форм редокс-пары с двух сторон мембраны было одинаковым, а затем в одно из отделений ячейки добавлялся восстановитель или окислитель. Наклон кривой концентрационной зависимости трансмембранного потенциала составлял 58 мВ на десятикратное изменение соотношения окислителя и восстановителя. При добавлении в цепь (I) тетрахлортрифторбензимидазола — ТТФБ в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М, который делает б.л.м. селективной к протону⁽⁶⁾, наблюдается значительное увеличение трансмембранного

потенциала. Если в качестве фона, вместо раствора $10^{-3} M$ KCl, использовались растворы цитратно-фосфатного буфера ($2 \cdot 10^{-3} M$) pH 6,8 или трис-буфера ($2 \cdot 10^{-3} M$) pH 6,8, то генерации трансмембранного потенциала не наблюдалось. Контрольные опыты показали, что при создании десятикратного градиента KCl по одну сторону мембраны величина трансмембранного потенциала не превышала 5—7 мВ, т. е. мембрана в этих условиях слабо проницаема для ионов K^+ .

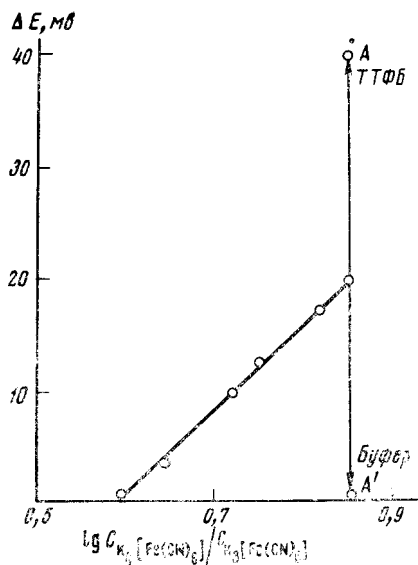


Рис. 1

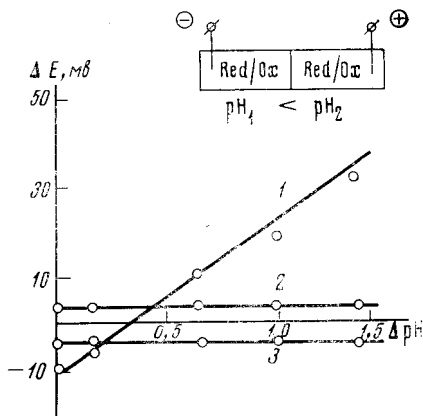
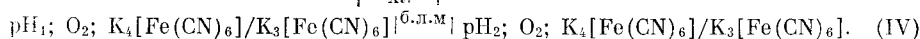
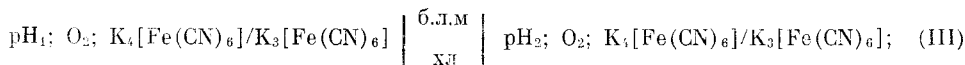
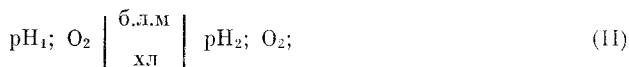


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость трансмембранного потенциала от соотношения концентраций ферро-феррицианида. Фон KCl $10^{-3} M$. Концентрация ТТФБ $2 \cdot 10^{-6} M$

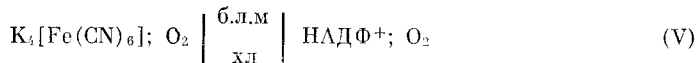
Рис. 2. Зависимость трансмембранного потенциала от градиента концентрации протонов в системе ферро-феррицианид (1). Знак потенциала положительный в части цепи с pH 7. Буфер цитратно-фосфатный. 2 — та же зависимость на мембране, модифицированной хлорофиллом в отсутствие редокс-системы. 3 — та же зависимость в присутствии редокс-системы на немодифицированной мембране

Были проведены также различные контрольные опыты в следующих электрохимических цепях:



Результаты этих опытов показали, что величина трансмембранного потенциала зависит от градиента pH только в присутствии компонентов редокс-пары (рис. 2, 1). Кроме того было показано, что мембрана, не содержащая фотосинтетических пигментов, практически непроницаема для протонов (кривые 2 и 3).

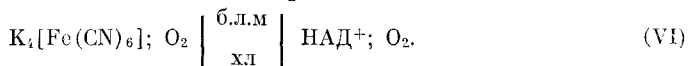
Зависимость трансмембранного потенциала от концентрации НАДФ⁺ в цепи V представлена на рис. 3 (кривая 1). Знак потенциала



был положительным в части цепи, содержащей ферроцианид. На этом же рисунке представлена концентрационная зависимость трансмембранного потенциала в цепи V без ферроцианида (кривая 2). При добавлении в обе последние цепи ТТФБ в концентрации $2 \cdot 10^{-6} M$ (точки А и В на кри-

вых 1 и 2) наблюдается увеличение трансмембранного потенциала. Если в качестве фона вместо раствора $10^{-3} M$ KCl использовали растворы цитратно-фосфатного буфера ($2 \cdot 10^{-3} M$) или трис-буфера ($2 \cdot 10^{-3} M$), то генерации трансмембранного потенциала не происходило (точки A' и B' на кривых 1 и 2).

На рис. 4 представлено изменение во времени потенциала цепи



Знак потенциала был положительным в части цепи, содержащей ферро-

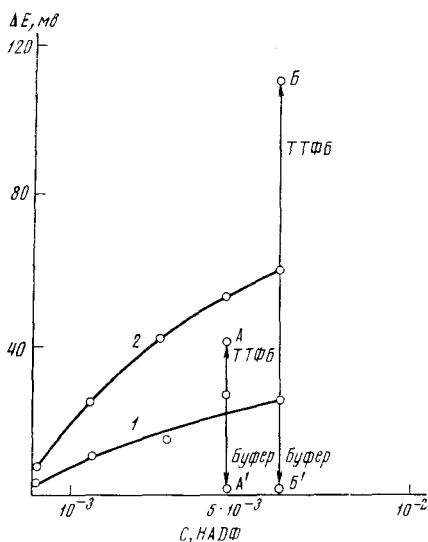


Рис. 3

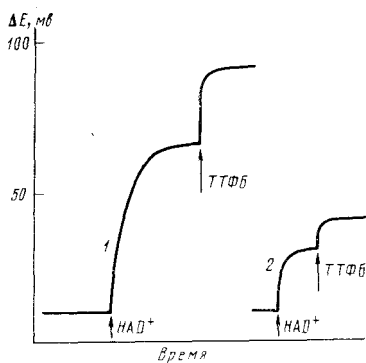


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость трансмембранного потенциала от концентрации НАДФ⁺ в системах НАДФ⁺ — O₂ (1), НАДФ⁺ — ферроцианид (2). Фон KCl $10^{-3} M$. Концентрация ТТФБ $2 \cdot 10^{-6} M$. Концентрация ферроцианида $7,5 \cdot 10^{-3} M$

Рис. 4. Генерация трансмембранного потенциала в системе ферроцианид — НАД⁺ (1) и в системе O₂ — НАД⁺ (2). Фон KCl $10^{-3} M$. Концентрация ферроцианида $7,5 \cdot 10^{-3} M$. Концентрация ТТФБ $2 \cdot 10^{-6} M$

цианид. При добавлении в цепь (VI) ТТФБ ($C=2 \cdot 10^{-6} M$) наблюдалось увеличение трансмембранного потенциала. Добавление цитратнофосфатного буфера в концентрации $2 \cdot 10^{-3} M$ приводило к снятию потенциала. В отсутствие ферроцианида в цепи (VI) также наблюдалась генерация потенциала, величина которого увеличивалась при добавлении ТТФБ ($C=2 \cdot 10^{-6} M$) (рис. 4, 2).

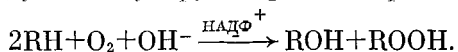
Хотя наклон кривой на рис. 1 составляет 58 мВ на десятикратное изменение соотношения восстановления и окислителя, более тщательное рассмотрение показывает, что б.л.м. с хлорофиллом не может быть уподоблена просто платиновому электроду. Действительно, если с помощью ТТФБ сделать мембрану чувствительной к градиенту протонов, то наблюдается дополнительный скачок потенциала (рис. 1, A), который указывает на существование в примембранном слое градиента протонов, направленного в сторону, противоположную электронному переносу. Можно полагать, что сама мембрана в присутствии окислительно-восстановительной системы и хлорофилла должна была бы обладать селективностью по отношению к протону. Как следует из рис. 2, мембрана действительно является чувствительной к градиенту протонов, но только в присутствии редокс-систем и хлорофилла.

Таким образом, разность окислительно-восстановительных потенциалов водных растворов редокс-систем по обе стороны мембраны превращается в

градиенты рН в примембранных слоях. Дополнительное доказательство этого утверждения было получено в опыте, в котором в раствор, содержащий систему ферро-феррицианид (цепь (I)), был добавлен цитратно-фосфатный буфер в концентрации 10^{-2} М. В этих условиях не наблюдалось возникновения трансмембранного потенциала в цепи (I). Наблюдаемое исчезновение потенциала в цепи (I) связано именно с увеличением буферной силы раствора, а не с изменением его ионной силы, поскольку добавление в раствор 10^{-2} М КСl уменьшает потенциал на 5—7 мВ.

Представляло интерес использовать вместо ферроцианида в качестве акцептора НАДФ⁺, который действительно входит в состав цепи переноса электронов в фотосинтезе. Если с другой стороны был добавлен восстановитель — ферроцианид (цепь (V)), то наблюдаемый трансмембранный потенциал (кривая I) по крайней мере вдвое превышал тот, что наблюдается в цепи (V) в отсутствие ферроцианида. Это значит, что процесс, очевидно, идет гораздо интенсивнее, если вместе присутствуют окислитель и восстановитель. Применяя те же самые тесты, что и в случае окислительно-восстановительной системы ферро-феррицианид, мы можем убедиться в том, что протекание окислительно-восстановительных реакций по обе стороны мембраны приводит к градиенту рН в примембранном слое, который может быть снят увеличением буферной силы раствора.

Обсуждая теперь результаты опытов, представленных на рис. 1 и 3, можно прийти к выводу, что присутствие в растворах редокс-систем с различными окислительно-восстановительными потенциалами приводит к возникновению трансмембранного потенциала, природа которого связана с созданием градиента протонов в примембранном слое при возникновении протонной проницаемости в самой мембране. Это, скорее всего, указывает на определенную роль липидов в окислительно-восстановительных превращениях, имеющих место в цепях (I) — (V). Таким образом, окислительно-восстановительные процессы на мембране, содержащей хлорофилл, непременно должны включать превращения липидов в качестве промежуточного звена. Возникновение протонной проницаемости можно приписать образованию перекисей липидов. Известно, что в липидах в присутствии кислорода происходит реакции окисления по разветвленному механизму ⁽⁷⁾. Очевидно, что нуклеотиды, и в частности НАДФ⁺, сами по себе в присутствии кислорода воздуха стимулируют процесс образования перекиси:



На это указывает возникновение примембранного слоя в присутствии НАДФ⁺ в отсутствие восстановителя (цепь (V)). Для того чтобы проверить, насколько общим является полученный результат, был взят другой нуклеотид НАД⁺, не входящий в цепь переноса при фотосинтезе. Так же, как и на НАДФ⁺, НАД⁺ создает градиенты рН в примембранном слое (рис. 4, 2). В присутствии восстановителя — ферроцианида трансмембранный потенциал существенно увеличивается (рис. 4, 1). Существование градиента рН в примембранном слое прямо доказывается добавлением ТТФБ, поскольку возникает дополнительный скачок потенциала. Добавление буфера (точка А) снимает потенциал.

Институт электрохимии
Академии наук СССР
Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Москва

Поступило
2 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Б. Евстигнеев, Сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза, «Наука», 1965, стр. 67. ² А. А. Красновский, там же, стр. 26. ³ В. М. Кутюрин, там же, стр. 236. ⁴ Пигменты пластин зеленых растений и методика их исследований, «Наука», 1964. ⁵ А. В. Лебедев, Л. И. Богуславский, Биофизика, т. 16, 221 (1971). ⁶ А. Д. Измаилов, Л. И. Богуславский, Л. С. Ягузинский, ДАН, т. 216, 674 (1974). ⁷ Ю. А. Владимиров, А. Н. Арчаков, Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, «Наука», 1972, стр. 21.