

В. В. КЛИМОВ, И. Н. КРАХМАЛЕВА, В. А. ШУВАЛОВ,
Н. В. КАРАПЕТАН, член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ЗАВИСИМОСТЬ ВЫХОДА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ И ХРОМАТОФОРОВ ОТ СОСТОЯНИЯ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ

Фотоиндуцированное увеличение выхода флуоресценции хлорофилла фотосинтезирующих организмов связывают с временной потерей способности реакционных центров фотосистем использовать энергию возбуждения хлорофилла из-за накопления продуктов первичной фотореакции. В случае фотосистемы 2 растений увеличение выхода флуоресценции объясняется накоплением первичного акцептора электрона этой фотосистемы в восстановленном виде (¹, ²). Световые изменения флуоресценции (ΔF) пурпурных бактерий связывают с накоплением окисленного бактериохлорофилла (P870⁺) в реакционном центре (³⁻⁶). Обнаруженное нами увеличение выхода флуоресценции фотосистемы 1 вызвано, по-видимому, фотоокислением P700 (², ⁷). В настоящей работе мы попытались выяснить, является ли фотоокисление хлорофилла в реакционном центре фотосистемы бактерий и фотосистемы 1 растений единственной причиной увеличения выхода флуоресценции, или же оно может быть вызвано, как у фотосистемы 2 растений, еще и накоплением первичного акцептора электрона этих фотосистем в восстановленном виде.

Исследования проводили на фрагментах хлоропластов, обогащенных фотосистемой 1, и на изолированных хроматофорах бактерий *Rhodospirillum rubrum*. Легкие фрагменты хлоропластов получали по методике (⁸) с некоторыми изменениями. Хлоропласты гороха, суспендированные в 0,05 *M* трис-буфере (pH 8,0) при концентрации хлорофилла 0,5 мг/мл, обрабатывали в течение 50 мин. 1% дигитонином, а затем в течение 10 мин. 1% дигитонином и 0,1% тритоном X-100. Надосадочную жидкость после 30 мин. центрифугирования суспензии при 80 000 *g* центрифугировали 3,5 часа при 175 000 *g*, полученный осадок суспендировали в 0,05 *M* трис-буфере (pH 8,0). У выделенных фрагментов отношение хлорофиллов $a/b=4,95$, а P700/хлорофилл $a=1/150$. Скорость фотоокисления восстановленного 2,6-дихлорфенолиндифенола (ДХФИФ-Н₂) этими частями, измеряемая как в (²), но в присутствии пластоцианина, составляла 320 мкмол. на 1 мг хлорофилла в час. Для подавления функциональных проявлений примеси фотосистемы 2 фрагменты прогревали при 45° в течение 5 мин. Хроматофоры бактерий *R. rubrum*, полученные по методике (⁹), обрабатывали 0,1% тритоном X-100, что вело к исчезновению фотоиндуцированного увеличения поглощения при 900 нм, связываемого с возникновением трансмембранного потенциала (¹⁰). Фотоиндуцированные ΔD и ΔF измеряли на однолучевом дифференциальном спектрофотометре, аналогичном описанному ранее (¹¹). У фрагментов хлоропластов флуоресценцию $\lambda > 660$ нм возбуждали монохроматическим светом 480 нм (45 эрг·см⁻²·сек⁻¹), а у хроматофоров флуоресценцию $\lambda > 850$ нм — светом 590 нм (120 эрг·см⁻²·сек⁻¹). В качестве действующего использовали свет 700—1000 нм, 10⁵ эрг·см⁻²·сек⁻¹. При освещении фрагментов хлоропластов, обогащенных фотосистемой 1, в присутствии аскорбата натрия наблюдается обратимое увеличение выхода флуоресценции и уменьшение поглощения в красной области спектра (рис. 1, 1). Добавление 2·10⁻⁵ *M* диурона не влияло на величину и кинетику ΔF и ΔD . Световые ΔF и ΔD активировались при добавлении метилвиологена (экзогенного акцептора электронов для фотосистемы 1). Добавление ДХФИФ-Н₂ (эффективного экзогенного донора электронов для фотосистемы 1) ускоряло темновую

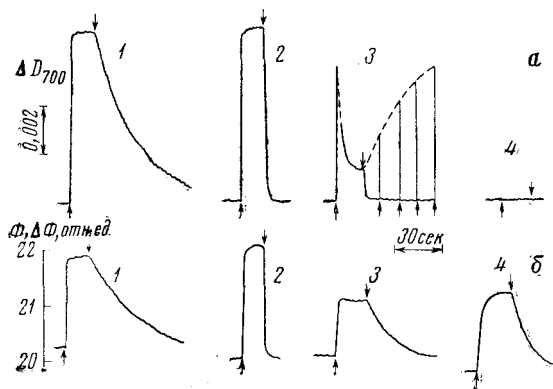


Рис. 1. Кинетика фотондуцированных ΔD_{700} (а) и $\Delta \Phi$ (б) фрагментов хлоропластов в присутствии: 1 — 10^{-3} М аскорбата натрия, 2 — 10^{-3} М аскорбата натрия и 10^{-5} М ДХФИФ, 3 — 1 мг/мл дитионита, 4 — 1 мг/мл дитионита и 10^{-5} М ФМС. Содержание хлорофилла в образце 13 мкг/мл

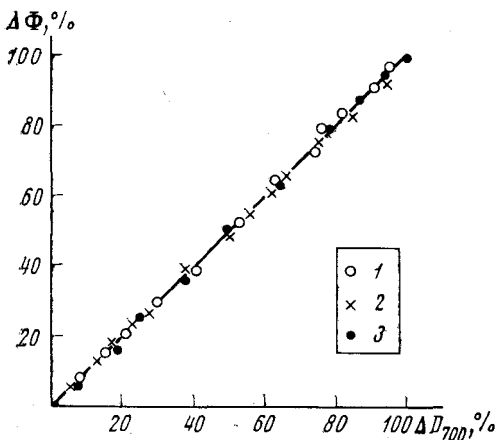


Рис. 2. Величина $\Delta \Phi$ как функция величины ΔD_{700} при освещении фрагментов хлоропластов светом разной интенсивности в присутствии: 1 — 10^{-3} М аскорбата натрия и 10^{-5} М ДХФИФ, свет $\lambda > 700$ нм, 2 — 10^{-3} М аскорбата натрия, 10^{-5} М ДХФИФ и 10^{-4} М метилвиологена, свет $\lambda > 700$ нм; 3 — 10^{-3} М аскорбата натрия и 10^{-5} М ДХФИФ, свет $\lambda > 720$ нм. Содержание хлорофилла 10 мкг/мл

релаксацию $\Delta \Phi$ и ΔD (рис. 1, 2). Спектр ΔD характеризовался максимумами при 700, 682 и 430 нм. Все это позволило наблюдаемые ΔD приписать фотоокислению П700, а $\Delta \Phi$ — увеличению выхода флуоресценции хлорофилла фотосистемы 1 вследствие фотоокисления П700.

Величина $\Delta \Phi$ линейно зависит от величины ΔD_{700} при различной интенсивности действующего света (рис. 2). Прямая зависимость между этими параметрами наблюдается: 1) с метилвиологеном и без него; 2) при освещении светом $\lambda > 700$ и $\lambda > 720$ нм; 3) при возбуждении флуоресценции фрагментов светом 480, 650 и 680 нм и при регистрации флуоресценции как с $\lambda > 660$, так и с $\lambda > 720$ нм.

В присутствии дитионита ΔD_{700} , достигнув в первый момент освещения максимального значения, быстро уменьшаются на свету до стационарного уровня (рис. 1а, 3). Световые $\Delta \Phi$ в этих условиях мало изменяются по величине, но в отличие от ΔD_{700} они значительно медленнее релаксируют в темноте (рис. 1б, 3), что особенно отчетливо проявляется при увеличении концентрации дитионита. Кроме того, кинетика темнового спада $\Delta \Phi$ в присутствии дитионита соответствует кинетике темновой регенерации световых

ΔD_{700} после их подавления при длительном освещении (рис. 1, 3). Это позволило нам предположить, что световое увеличение выхода флуоресценции фотосистемы 1 в присутствии дитионита вызвано фотовосстановлением первичного акцептора электронов этой фотосистемы.

Медленно релаксирующие в темноте $\Delta \Phi$ (рис. 1б, 4) наблюдаются и в случае добавления к фрагментам дитионита и феназинметасульфата (ФМС) (эффективного медиатора переноса электронов к П700⁺)⁽¹³⁾, когда световые ΔD_{700} не обнаруживаются совсем (рис. 1, 4). Действие дитионита на ΔD и $\Delta \Phi$ полностью устранялось после окисления его феррицианидом или в ходе азрации.

На связь $\Delta \Phi$ хроматофоров пурпурных бактерий с фотоокислением П870 указывалось ранее⁽³⁻⁶⁾. В пользу этого свидетельствует тот факт, что релаксация как $\Delta \Phi$, так и ΔD_{885} после выключения света ускоряется

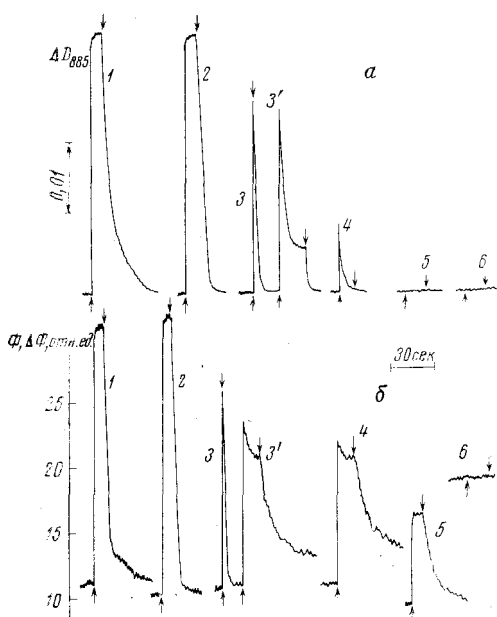


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика фотондучированных ΔD_{885} (а) и $\Delta \Phi$ (б) хромофоров *R. rubrum* без добавок (1) и в присутствии: 2 — $5 \cdot 10^{-5}$ М аскорбата натрия; 3 — $5 \cdot 10^{-5}$ М аскорбата натрия и 10^{-5} М ДХФИФ; 3' — то же при более длительном освещении; 4 — $5 \cdot 10^{-5}$ М аскорбата натрия и 10^{-5} М ДХФИФ в анаэробных условиях (после эвакуации воздуха); 5 — $5 \cdot 10^{-5}$ аскорбата натрия и 10^{-5} М ФМС в анаэробных условиях; 6 — 1 мг/мл дитионита в анаэробных условиях. Содержание бактериохлорофилла 9 мкг/мл

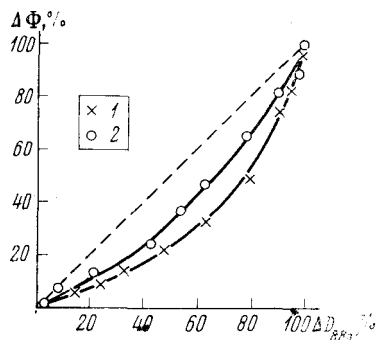


Рис. 4

Рис. 4. Величина $\Delta \Phi$ как функция величины ΔD_{885} при освещении светом 700–1000 нм различной интенсивности хромофоров *R. rubrum*: 1 — обработанных 0,1% тритоном X-100, 2 — без обработки тритоном. Содержание бактериохлорофилла 10 мкг/мл

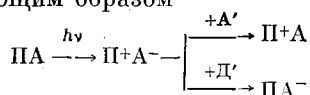
при добавлении доноров электрона (аскорбата натрия или ДХФИФ-Н₂) (рис. 3, 1–3). Кроме того, нам удалось показать, что окисление П870 феррицианидом в темноте сопровождается увеличением выхода темновой флуоресценции до уровня, равного сумме постоянной и переменной компонент флуоресценции. В отличие от $\Delta \Phi$ фотосистемы 1, световые $\Delta \Phi$ хромофоров *R. rubrum* характеризуются нелинейной зависимостью от доли П870⁺ (рис. 4). Эти данные согласуются с предположением о том, что миграция энергии в фотосинтетических единицах у пурпурных бактерий осуществляется по мультицентральному типу (^{3, 5, 6}), тогда как у фотосистемы 1 — по унитарному типу (^{2, 7}). В то же время, в работе (¹²) на основании анализа кинетики фотоокисления П700 было сделано предположение о мультицентральности фотосинтетических единиц фотосистемы 1.

Если ускорение темновой релаксации ΔD_{885} при добавлении ДХФИФ-Н₂ не зависит от продолжительности освещения, то релаксация $\Delta \Phi$ ускоряется только в случае кратковременной экспозиции хромофоров на свету (рис. 3, 3). После длительного освещения, сопровождающегося спадом ΔD и $\Delta \Phi$ от максимального к более низкому стационарному уровню, темновой спад $\Delta \Phi$, в отличие от ΔD_{885} , значительно замедляется (рис. 3б, 3). Следовательно, в этом случае световые $\Delta \Phi$ связаны уже не с накоплением П870⁺. Медленно релаксирующие в темноте световые $\Delta \Phi$ сохранялись и при добавлении ФМС-Н₂ или ДХФИФ-Н₂ в анаэробных условиях, когда световые ΔD_{885} полностью исчезали во время освещения или не наблюдались совсем (рис. 3, 4, 5). В присутствии дитионита не наблюдалось ни ΔD_{885} , ни $\Delta \Phi$, а темновая флуоресценция возрастала до уровня

меньшего, чем сумма постоянной и переменной компонент флуоресценции (рис. 3, 6).

Освещение хроматофоров *R. rubrum* и «легких» фрагментов хлоропластов в присутствии эффективных доноров электрона (в условиях как на рис. 1, 3, 4; рис. 3, 3—5) ведет к накоплению на свету акцепторов электрона этих фотосистем в восстановленном виде (¹³, ¹⁴). В этом случае скорость фотоокисления П870 и П700 становится меньше, чем скорость темнового восстановления П870⁺ и П700⁺, что проявляется в подавлении световых ΔD_{885} и ΔD_{700} (рис. 1а и 3а), а также фотоокисления цитохрома с у бактерий (¹⁵). Естественно предположить, что с обратимым фотовосстановлением акцептора электронов связаны и $\Delta\Phi$, медленно релаксирующие в темноте (рис. 1б, 3, 4; 3б, 3—5). Действительно, эти $\Delta\Phi$ не могут быть приписаны фотоокислению П870 и П700, поскольку они сохраняются в условиях, когда ΔD_{885} и ΔD_{700} не наблюдаются совсем. Кроме того, в отличие от ΔD , время темновой релаксации $\Delta\Phi$ возрастает при понижении окислительно-восстановительного потенциала среды.

Обозначив хлорофилл в реакционных центрах как П, а первичный акцептор электрона как А, реакции, происходящие в реакционных центрах, можно изобразить следующим образом



При наличии эффективных экзогенных или эндогенных вторичных акцепторов электрона (А') происходит накопление окисленного П (П⁺А), и флуоресцируют молекулы хлорофилла, ближайšie к П, так как энергия с них не может быть передана на П⁺. При введении же эффективного донора электрона (Д'), когда усиливается приток электронов на П⁺ и восстанавливаются вторичные акцепторы электрона, стабилизируется состояние ПА. В этих условиях, когда А восстановлен (ПА⁻), энергия возбуждения молекул П не может быть использована в фотохимической реакции и растрачивается ими в виде флуоресценции. Способность П пурпурных бактерий (П890) к флуоресценции в присутствии дитионита была показана ранее (⁵).

Понижение общего уровня флуоресценции хроматофоров *R. rubrum* при добавлении дитионита или в условиях проявления медленно релаксирующих $\Delta\Phi$ может свидетельствовать о более низком выходе флуоресценции П870 по сравнению с молекулами бактериохлорофилла-светосборщика.

Таким образом, фотоиндуцированное увеличение выхода флуоресценции фотосистемы 1 растений и фотосистемы пурпурных бактерий может быть связано не только с фотоокислением хлорофилла в реакционном центре, но и с фотовосстановлением первичного акцептора электронов, как в случае фотосистемы 2 растений.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
20 XII 1974

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

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. N. M. Duysens, H. E. Sneers, In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Tokyo, 1963, p. 353. ² N. V. Karapetyan, V. V. Klimov, A. A. Krasnovsky, Photosynthetica, v. 7, 330 (1973). ³ W. J. Vredenberg, L. N. M. Duysens, Nature, v. 197, 355 (1963). ⁴ И. В. Карапетян, И. Н. Кразмалева, А. А. Красновский, ДАН, т. 71, 1201 (1966). ⁵ R. K. Clayton, Photochem. Photobiol., v. 5, 679 (1966). ⁶ А. Ю. Борисов, ДАН, т. 173, 208 (1967). ⁷ И. В. Карапетян, В. В. Климов, А. А. Красновский, ДАН, т. 211, 729 (1973). ⁸ J. M. Anderson, N. K. Boardman, Biochim. et biophys. acta, v. 112, 403 (1966). ⁹ И. В. Карапетян, И. Н. Кразмалева, А. А. Красновский, Молек. биол., т. 6, 773 (1972). ¹⁰ Е. Л. Барский, В. Д. Самуилов, Биохимия, т. 37, 1005 (1972). ¹¹ И. В. Карапетян, Ф. Ф. Литеин, А. А. Красновский, Биофизика, т. 8, 191 (1963). ¹² А. Ю. Борисов, М. Д. Ильина, Молек. биол., т. 7, 212 (1973). ¹³ B. Ke, Biochim. et biophys. acta, v. 301, 1 (1974). ¹⁴ R. Govindjee, W. R. Smith, Govindjee, Photochem. Photobiol., v. 20, 191 (1974). ¹⁵ И. В. Карапетян, И. Н. Кразмалева, А. А. Красновский, Молек. биол., т. 7, 868 (1973).