

Б. Н. ИВАНОВ, Е. А. АКУЛОВА, Е. Н. МУЗАФАРОВ,
Р. Х. РУЗИЕВА, В. Л. ШМЕЛЕВА

**ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИН-ГЛЮКОЗИЛ-КУМАРАТА НА РЕАКЦИИ
ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТОВ В ПРИСУТСТВИИ
ВАЛИНОМИЦИНА**

(Представлено академиком А. И. Опариным 3 III 1975)

В предыдущих работах нашей лаборатории (¹, ²) было показано, что фенольные соединения листьев гороха, синтезируемые именно в хлоропластах (³), способны *in vitro* изменять течение ряда фотохимических реакций этих органелл. Кверцетин-глюкозил-кумарат (КвГК) — основной флавоноид гороха — также был исследован и охарактеризован как природный разобщитель фотофосфорилирования (ф.ф.) (⁴). Данная работа представляет дальнейшее исследование особенностей действия КвГК на реакции изолированных хлоропластов гороха. Поскольку использованным здесь методическим приемом было исследование совместного действия КвГК и валиномицина, в статье представлены результаты и рассмотрены возможные механизмы влияния этого антибиотика на электронный транспорт, ф.ф. и параметры протонного обмена изолированных хлоропластов.

Хлоропласты выделяли из двухнедельных проростков гороха (*Pisum sativum*) сорта Превосходный, выращенных в люминистате при 25° и освещенности 70 Вт/м². Методы выделения хлоропластов, определения скорости электронного транспорта и ф.ф., а также потенциометрических измерений описаны в работе (⁵). Константа скорости разложения протонного градиента (K_t) в опытах с феррицианидом (ФЦ) и с феназинметасульфатом (ФМС) рассчитывалась из кривой подкисления суспензии после выключения света, как описано в работе (⁶); количество поглощенных тилакоидами протонов ($H_{ст}$) в обоих случаях определялось как число протонов, выделившихся после выключения света в среду, изменение рН при этом переводили в количество эквивалентов H^+ титрованием суспензии 0,005 *M* раствором HCl.

Состав реакционной смеси в общем объеме 2 мл при определении скоростей фотофосфорилирования и электронного транспорта: 50 мМ трис-HCl-буфер (рН 7,8), 5 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 0,5 мМ АДФ и 5 мМ фосфат (в условиях фосфорилирования), хлоропласты, соответствующие 30 мкг хлорофилла. Состав реакционной смеси (2 мл) при определении параметров протонного обмена: 5 мМ трис-HCl-буфер (рН 7,6), 50 мМ KCl, хлоропласты, соответствующие 80 мкг хлорофилла. В обоих случаях использовались в соответствующих опытах 10^{-5} *M* ФМС или $5 \cdot 10^{-4}$ *M* $K_3Fe(CN)_6$.

При проведении всех экспериментов суспензия освещалась красным светом ($\lambda > 600$ нм) интенсивностью 80 Кэрг/см²·сек. КвГК выделяли из листьев гороха по методике, описанной в работе (⁷). Валиномицин получен из Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина. КвГК растворяли в воде, валиномицин в этиловом спирте.

Результаты представлены на рис. 1. Видно, что в опытах с феназинметасульфатом (ФМС) и с феррицианидом (ФЦ) КвГК в исследовавшемся диапазоне концентраций подавляет ф.ф., причем в процентном отношении в обоих случаях одинаково. Наряду с этим наблюдается уменьшение $H_{ст}$ и увеличение K_t . Подобное изменение ф.ф., K_t и $H_{ст}$ происходит как было показано в работе (⁸), под влиянием веществ, обладающих разобщающим

действием. Увеличение скорости электронного транспорта в опытах с ФЦ также указывает на разобщающий эффект КвГК. Валиномицин в отличие от КвГК по разному подавлял ф.ф. в опытах с ФМС и ФЦ. (на 20% и 55% соответственно), причем во втором случае заметно уменьшалась скорость электронного транспорта. Более сильное подавление валиномицином нециклического ф.ф. было найдено ранее и в работе (8). Уменьшение скорости электронного переноса несомненно сказывалось на общем уменьшении ф.ф.

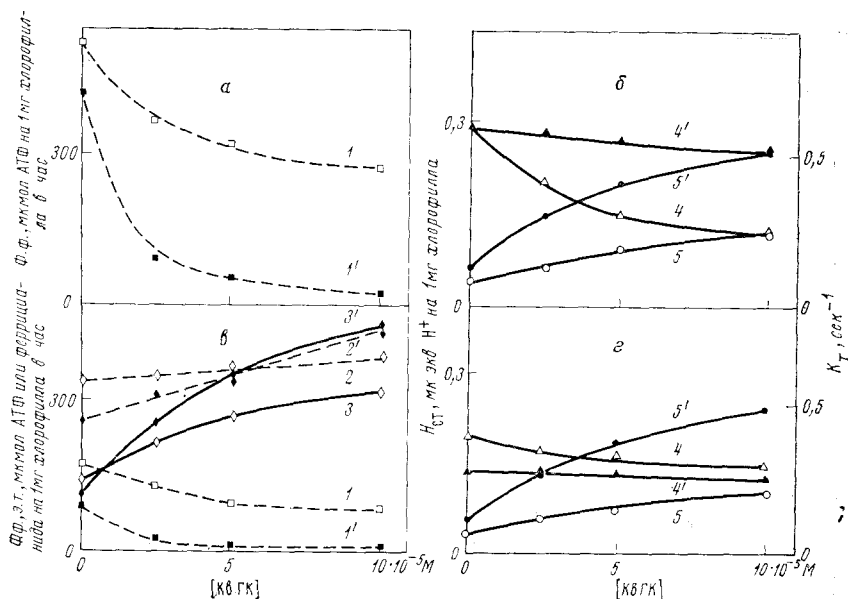


Рис. 1. Зависимость скорости фотофосфорилирования (а, в), скорости электронного транспорта — э.т. (б) и параметров протонного обмена (г) от концентрации КвГК при наличии и отсутствии в суспензии валиномицина. 1, 1' — скорость фосфорилирования; 2, 2', 3, 3' — скорость электронного транспорта в фосфорилирующих (2, 2') и нефосфорилирующих (3, 3'), условиях; 4, 4' — количество поглощаемых хлоропластами протонов; 5, 5' — константа скорости разложения протонного градиента; 1—5 — опыты без валиномицина, 1'—5' — в присутствии 10^{-6} M валиномицина

с ФЦ, однако падение $P/2e$ на 40% в этом случае указывает, что существует и прямое действие антибиотика на реакции сопряжения. Величина K_t при введении в суспензию валиномицина возросла, очевидно, в большой степени вследствие снятия потоком калия взаимодиффузионного потенциала, возникающего на мембране в момент выключения света (10). При нециклическом транспорте на 30% уменьшилась величина $H_{ст}$, тогда как в опытах с ФМС она не изменилась. Последний эффект был обнаружен в (11) для хлоропластов бобов. Добавление КвГК к суспензии хлоропластов на фоне валиномицина приводило к резкому снижению ф.ф., но в отличие от действия одного КвГК это не сопровождалось существенным уменьшением $H_{ст}$ (в случае ФЦ, после падения под действием валиномицина), т. е. валиномицин как бы предотвращал уменьшение $H_{ст}$ при увеличении концентрации КвГК. Величина K_t , напротив, в присутствии валиномицина и КвГК становилась очень большой. Электронный транспорт при увеличении концентрации КвГК рос быстрее и при концентрациях порядка $2 \cdot 10^{-5}$ M становился даже больше, чем без антибиотика. В условиях ф.ф. это превышение имело место при более высоких концентрациях флавоноида. На рис. 2 представлены зависимости ф.ф., K_t и $H_{ст}$, а для опытов с ФЦ и зависимость электронного транспорта от концентрации КвГК на фоне валиномицина, построенные таким образом, что за 100% приняты значения этих величин в присутствии одного валиномицина. Одинаковый характер изменения ф.ф.

(рис. 2а) и K_t и $H_{ст}$ (рис. 2б, в) в опытах с ФМС и ФЦ, наряду с одинаковым подавлением ф.ф., представленным на рис. 1а, в, вероятно, указывает на независимый от типа электронного транспорта механизм действия КвГК. Кроме того, на рис. 2б обращает на себя внимание параллельный ход кривых изменения электронного транспорта и K_t при увеличении концентрации КвГК.

Из полученных данных можно видеть, что действие КвГК на реакции изолированных хлоропластов носит специфический характер. Об этом,

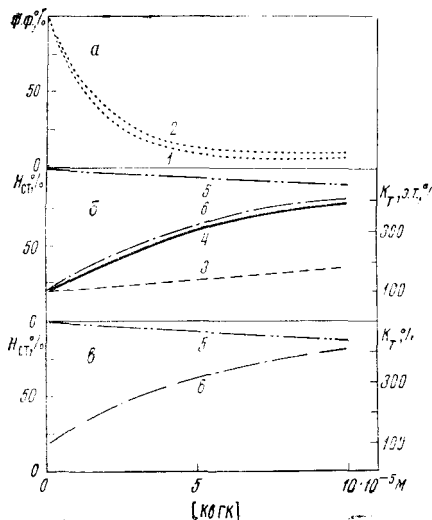


Рис. 2. Зависимость скорости фотофосфорилирования (а) в опытах с ФМС (1) и $K_3Fe(CN)_6$ (2), скорости электронного транспорта в фосфорилирующих (3) и нефосфорилирующих (4) условиях, $H_{ст}$ (5) и K_t (6) в опытах с $K_3Fe(CN)_6$ (б) и ФМС (в) от концентрации КвГК на фоне 10^{-6} М валиномицина. За 100% приняты значения указанных величин в присутствии одного валиномицина. Кривые построены на основании данных рис. 1

в частности, говорит отсутствие уменьшения $H_{ст}$ при полном подавлении ф.ф., когда в суспензии одновременно присутствуют КвГК и валиномицин. Дело в том, что результаты данной работы свидетельствуют о разобщающих свойствах КвГК и, более того, увеличение K_t с ростом концентрации флавоноида, особенно на фоне валиномицина, указывает на его протонофорные свойства. С другой стороны, по данным ряда работ (^{11, 12}), совместное действие валиномицина и такого протонофора, как 2,4-ДНФ, подавляет не только ф.ф., но ликвидирует и протонное поглощение. Такое противоречие ставит вопрос о месте и способе действия КвГК в тилакоидной мембране. На основании рис. 2 можно сделать вывод, что падение ф.ф. определяется ростом K_t . На рис. 1 также видно, что одинаковое падение ф.ф. в опытах с ФМС и ФЦ наблюдается при примерно одинаковом увеличении K_t в обоих случаях, и следует за уменьшением $H_{ст}$ только в опытах с ФМС. В нашей предыдущей работе было предположено, что КвГК в тилакоидной мембране действует прежде всего на СФ-фактор (⁹). Две недавние работы (^{14, 15}) несмотря на

противоречивость данных, могут рассматриваться как свидетельства взаимодействия кверцетина, основы скелета КвГК, с СФ-фактором хлоропластов. Принимая это во внимание и учитывая протонофорные свойства КвГК, мы предполагаем, что его действие заключается в акцептировании на уровне СФ-фактора протонов, долженствующих участвовать в синтезе АТФ, и направлении их по градиенту концентрации в обход узла сопряжения. Указанный механизм объясняет корреляцию между падением ф.ф. и ростом K_t .

Вопрос о способе действия валиномицина в случае изолированных хлоропластов в литературе пока не решен. Предположения, недавно сделанные в работе (¹⁶) о его двойном действии как ингибитора электронного транспорта и разобщителя, вероятно, не могут объяснить всех полученных к настоящему времени результатов (⁹), в том числе и представленных в данной статье. С другой стороны, относительно физико-химических основ действия валиномицина, нет, кажется, разногласий в том, что он увеличивает проницаемость тилакоидных мембран для ионов калия. Кроме того было показано (¹¹), что в концентрациях, подавляющих ф.ф., но не вызывающих уменьшения протонного поглощения (см. рис. 1), валиномицин в темноте обеспечивал связывание ионов калия кислотными группами

мембран в обмен на ионы водорода. На основании этих данных мы считаем основной причиной влияния этого антибиотика на реакции изолированных хлоропластов при концентрациях выше чем $5 \cdot 10^{-7}$ М экранирующее действие его комплексов с катионами на отрицательные заряды функциональных компонентов мембран, что не позволяет протонам вступать в реакции с последними. Ингибирование электронного транспорта (рис. 1), если справедливо наше предположение, должно, очевидно, осуществляться на уровне переносчиков, принимающих одновременно электрон и протон. Ингибирование ф.ф., не связанное с падением электронного транспорта, может происходить вследствие нарушения взаимодействия протонов с протон-акценторными группами соответствующих компонентов СФ-фактора. Различие во влиянии валиномицина на реакции хлоропластов в присутствии ФМС и ФЦ объясняется, очевидно, различием реакций электронно-протонного переноса, осуществляющихся в каждом случае.

Для объяснения отсутствия уменьшения протонного поглощения при полном подавлении ф.ф., и, вероятно, тесно связанного с этим факта корреляции между величиной K_T и скоростью электронного транспорта (рис. 2б) необходимо, на наш взгляд, детальное знание механизма сопряжения в хлоропластах и механизмов действия флавопироидов. Исследования в этом направлении будут продолжены.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
17 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. А. Акулова, Е. Н. Мухин, ДАН, т. 198, 956 (1974). ² Е. А. Акулова, Г. Д. Миронова и др., ДАН, т. 206, 4 (1972). ³ М. Н. Запрометов, С. В. Колонкова, ДАН, т. 176, 4303 (1967). ⁴ Е. А. Акулова, Е. Н. Музафаров и др., Биоорганическая химия, № 5 (1975). ⁵ Б. Н. Иванов, В. Л. Шмелева и др., ДАН, т. 217, 971 (1974). ⁶ Б. Н. Иванов, Е. Н. Музафаров, В сб.: Методы исследования фотосинтетического транспорта электрона, Пушино, 1974, стр. 69. ⁷ R. Turetskaya, V. Kefeli et al., Biol. plantarum, v. 10, 205 (1968). ⁸ B. Rumberg, E. Reinwald, H. S. Schröder, Naturwiss., B. 55, 77 (1968). ⁹ D. L. Keister, N. J. Minton, J. Bioenergetics, v. 1, 367 (1970). ¹⁰ H. Schröder, H. Muhle, B. Rumberg, II Intern. Congress Photosynthesis, 1971, p. 919. ¹¹ Ю. Г. Молотковский, В. С. Дзюбенко, ДАН, т. 204, 1272 (1972). ¹² S. I. D. Karlsh, M. Avron, FEBS Letters, v. 1, 1 (1968). ¹³ Ю. Г. Молотковский, В сб. Методы исследования фотосинтетического транспорта электрона, Пушино, 1974, стр. 57. ¹⁴ C. J. Arntzen, S. V. Falkenthal, S. Bobick, Plant Physiol., v. 53, 304 (1974). ¹⁵ D. R. Lang, E. Racker, Biochim. et biophys. acta, v. 303, 180 (1974). ¹⁶ A. Telfer, J. Barber, Biochim. et biophys. acta, v. 333, 343 (1974).