

Р. М. БЕКИНА, А. Ф. ЛЕБЕДЕВА, Б. А. РУБИН

О СВЯЗИ ФОТООКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В ХЛОРОПЛАСТАХ С ФОТОСИСТЕМОЙ II

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 VI 1975)

Среди различных стимуляторов фотопоглощения O_2 в хлоропластах (реагентов Мелера) имеется группа физиологических метаболитов, представленных ферредоксином, аскорбатом, флавиномононуклеотидом (ФМН), витамином K_3 , рядом органических кислот и другими соединениями. Активация поглощения O_2 моно- и дикарбоновыми кислотами такими как малоновая, щавелевая и глиоксильная связана с глубоким, необратимым их окислением, сопровождающимся выделением CO_2 (¹⁻³). Исследование механизмов фотooksислительных превращений органических кислот в хлоропластах помимо выяснения связи обмена этого класса соединений со светом и отношения к фотодыханию, представляет существенный интерес с точки зрения понимания функциональной организации цепи фотосинтетического транспорта e^- и его регуляции O_2 . В изучении активационных механизмов фотопоглощения O_2 одним из важных является вопрос о локализации процесса в электротранспортной цепи. Ранее нами было показано, что к числу характерных особенностей функционирования системы с органическими кислотами относится независимость переноса e^- на O_2 от разобщения (⁴). Отсутствие действия разобщителей (NH_4Cl и CH_3NH_2) могло свидетельствовать о функционировании при этом нефосфорилирующего пути транспорта e^- или об отсутствии у электронного потока связи, по крайней мере, с местом сопряжения I.

Исследование вопроса о локализации реакции Мелера с органическими кислотами, предпринятое в настоящей работе, проводили по схеме, которая включала определение 1) активности поглощения O_2 в сравнении и в сочетании с другими реагентами Мелера, место действия которых известно, 2) влияния на этот процесс 2,5-дибром-3-метил-6-изопропил-*n*-бензохинона (ДБТХ), блокирующего перенос e^- на фотосистему I (ф.с.I), 3) влияния органических кислот на работу ф.с.I, 4) зависимости квантового выхода реакции с органическими кислотами от длины волны возбуждающего света и 5) связи фотooksисления органических кислот с фотофосфорилированием.

Опыты проводили с хлоропластами 10–14-дневных проростков гороха, полученными, как описано в работе (⁵). O_2 определяли амперометрически с закрытым платиновым электродом (⁶), фотофосфорилирование — по убыли неорганического фосфора (⁷). Освещение в этих опытах белым светом 15000 лк от лампы накаливания. Редоксизменения дихлорфенолиндифенола (ДХФИФ) регистрировали на одноклучевом дифференциальном спектрофотометре при 590 нм в процессе освещения. Интенсивность падающего света 10^5 эрг·см⁻²·сек⁻¹, измеряющего — менее 10 эрг·см⁻²·сек⁻¹. Измерение квантового выхода поглощения O_2 в реакции Мелера в зависимости от длины волны проводили с помощью монохроматора МДР-3. Источник освещения — ксеноновая лампа ДКСШ-1000. Интенсивность монохроматического света $6 \cdot 10^4$ эрг·см⁻²·сек⁻¹ со спектральной шириной щели 11 нм. Измерения проводили через каждые 10 нм на линейном участке световой

кривой процесса с суспензиями хлоропластов, полностью поглощающими падающий свет. Все опыты проводили при 20°.

Ферредоксин выделяли из 7-дневных проростков гороха в частично очищенном виде ⁽⁸⁾. Состав реакционных смесей: хлоропласты (хлорофилл 0,1 мг/мл), NaCl 350 мМ, MgCl 1,6 мМ, трис-HCl буфер 20 мМ pH 7,2, органические кислоты 10 мМ, метилвиологен 50 мкМ, эпинефрин 34 мкМ, ферредоксин 6,6 мкМ ДБТХ любезно предоставлен Г. П. Кукарских.

Таблица 1

Реакция Мелера с различными кофакторами при раздельном и совместном их действии

Соединение	Поглощение O ₂ , мкмол. на 1 мг хлорофилла в час			
	без кофактора	+метилвиологен	+эпинефрин	+ферредоксин
Малонат	7,3±0,6	10,5±0,3 17,1±0,6 (17,8)	9,6±0,7 13,9±0,8 (16,9)	9,4±0,6 15,2±1,4 (16,7)
Оксалат	6,3±0,2	15,7±0,4 (16,8)	16,5±1,6 (15,9)	15,1±0,3 (15,9)
Глиоксилат	7,3±0,4	16,9±0,3 (17,8)	15,1±0,3 (16,7)	14,4±0,5 (16,7)

Примечание. Данные приводятся без вычета эндогенного (без кофактора) поглощения O₂. В скобках величины, рассчитанные на основе активностей, наблюдаемых с каждым кофактором в отдельности.

Таблица 2

Влияние ДБТХ на реакцию Мелера с различными кофакторами

Соединение	Поглощение O ₂ , мкмол. на 1 мг хлорофилла в час	
	исходное	с ДБТХ
Малонат	8,1±1,1	7,1±1,0 (12)
Оксалат	6,3±0,8	6,2±0,9 (2)
Глиоксилат	8,9±1,2	8,1±1,1 (9)
Метилвиологен	10,1±0,9	0 (100)
Антрахинон — сульфонат	7,3±0,3	1,2±0,2 (85)
Эпинефрин	10,6±1,2	1,5±0,6 (86)

Примечание. Антрахинонсульфонат 0,8 мМ, ДБТХ 0,1 мкМ. Обмен O₂ за счет кофакторной роли ДБТХ в этой концентрации был нулевым. В скобках ингибирование ДБТХ в % от исходного.

В табл. 1 представлены данные определения активностей поглощения O₂ с органическими кислотами при раздельном и совместном их действии с реагентами Мелера, функционирующими в ф.с.I. При сочетании с метилвиологеном или ферредоксином органические кислоты могли использовать O₂⁻ и H₂O₂ — продукты аутоокисления этих кофакторов, а с эпинефрином — конкурировать за O₂⁻ и таким образом увеличивать скорости поглощения O₂. Оказалось, что при одновременном присутствии органических кислот с одним из реагентов Мелера, функционирующим в ф.с.I, независимо от различий в механизме стимулируемого ими поглощения O₂, наблюдалось увеличение скоростей, которое соответствовало сумме активностей, проявляемых каждым из реагентов в отдельности. Обнаруженная аддитивность в действии органических кислот при сочетании с другими реагентами Мелера свидетельствовала о независимости и отсутствии при этом конкуренции в транспорте e⁻.

ДБТХ, отключающий перенос e⁻ к ф.с.I на уровне пластохинонов, практически полностью тормозил поглощение O₂ с реагентами, действующими в ф.с.I, но незначительно с исследованными органическими кислотами (табл. 2). Результаты опытов с применением ДБТХ можно рассматривать как одно из прямых доказательств связи реакции Мелера с органическими кислотами с ф.с.II.

Другим подтверждением этого вывода были результаты опытов по проверке влияния действия органических кислот на скорость окисления восстановленного ДХФИФ в ф.с.І. Фотоокисление ДХФИФ-Н₂ определяли в хлоропластах с заблокированной диуроном ф.с.ІІ и при освещении красным светом >700 нм (светофильтр КС-19). Органические кислоты, как видно из данных табл. 3, обеспечивали лишь 15% от скорости фотоокисления ДХФИФ-Н₂, обнаруживаемой в присутствии метилвиологена. При совместном действии органических кислот и метилвиологена скорость процесса определялась редокспревращениями одного метилвиологена.

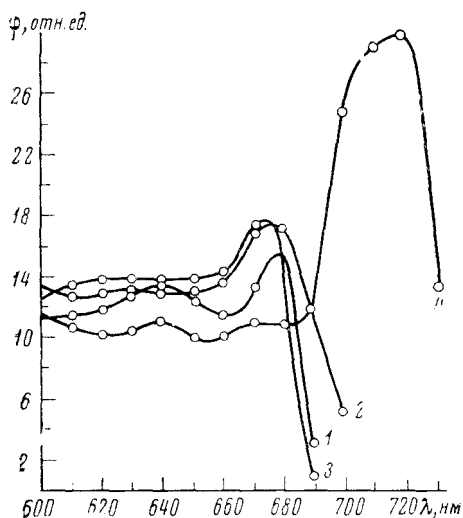


Рис. 1. Зависимость квантового выхода процесса поглощения кислорода с органическими кислотами и метилвиологеном от длины волны возбуждающего света. 1 — малонат, 2 — оксалат, 3 — глиоксилат, 4 — метилвиологен

ни является связь стимулируемого им электронного потока с фосфорилированием. Кофакторы типа метилвиологена индуцируют работу 2-х фотосистем, обеспечивая эффективное фотофосфорилирование с участием мест

Таблица 3

Влияние органических кислот и метилвиологена на окисление ДХФИФ-Н₂ в хлоропластах в фотосистеме І

Соединение	Окисление ДХФИФ-Н ₂ , мкмол. на 1 мг хлорофилла в час	
	исходное	с метилвиологеном
Без добавок	0	159±5,0
Малонат	22,5±2,5	140±4,5
Оксалат	23,5±3,0	142±4,0
Глиоксилат	23,5±3,0	152±7,0

Примечание. Содержание хлорофилла 0,03 мг/мл, ДХФИФ 0,25 мМ, аскорбат 0,25 мМ, диурон 50 мМ, метилвиологен 0,1 мМ.

Таблица 4

Фотофосфорилирование в присутствии органических кислот, ФМН и НАДФ при раздельном и совместном их действии

Соединение	Поглощение Р неорг., мкмол. на 1 мг хлорофилла в час		
	исходное	с ФМН	с НАДФ
Эндогенное	18,0	113,4	75,1
Малонат	15,1	138,6	72,4
Оксалат	12,0	115,6	69,0
Глиоксилат	13,5	114,9	72,0

Примечание. Содержание хлорофилла 0,05 мг/мл, АДФ 5 мМ, К₂НРО₄ 5 мМ, ФМН 0,34 мМ, НАДФ 0,34 мМ, трис-НСІ буфер рН 7,4.

сопряжения І и ІІ. С ДБТХ-кофактором переноса е⁻ у ф.с.ІІ наблюдается примерно половинная эффективность фосфорилирования благодаря наличию только одного места сопряжения (^{9, 10}). В реакции Мелера с каталазой и спиртом, функционирующей, как было показано нами, в ф.с.ІІ, абсолютные величины образования АТФ соответствуют эндогенному уровню, обеспечиваемого процессом без экзогенных кофакторов. Аналогично про-

цессу с этанолкаталазной ловушкой в реакции Мелера с тремя исследованными органическими кислотами величина наблюдаемых активностей фосфорилирования также не превышала эндогенных скоростей (табл. 4). В применяемых концентрациях малонат, оксалат и глиоксалат не обладали разобщающим действием и не влияли на процесс образования АТФ с другими кофакторами нециклического фотофосфорилирования — ФМН и НАДФ. Возможно, что органические кислоты обеспечивают функционирование ограниченного участка электротранспортной цепи у ф.с. II от H_2O до первичного акцептора Q , который, по данным Жиро и Гальмиша (¹¹), а также Джиквинта и соавт. (¹²) не включает места сопряжения.

На основе полученных в настоящей работе данных можно считать доказанным, что стимуляция фотопоглощения O_2 в хлоропластах такими органическими кислотами как малоновая, щавелевая и глиоксиловая и, соответственно, их фотоокислительные превращения осуществляются в фотосистеме II; вопрос о более точной локализации процесса в пределах фотосистемы II и о возможной связи его с сопряжением требует дополнительного выяснения.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
24 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. М. Бекина, Г. Г. Лысенко, Б. А. Рубин, Физиол. раст., т. 21, 468 (1974).
- ² J. Zelitch, Arch. Biochem. and Biophys., v. 150, 698 (1972). ³ E. F. Elstner, A. Neu-
pel, Zs. Naturforsch., B. 29c, 564 (1974). ⁴ Г. Г. Лысенко, Р. М. Бекина, Б. А. Ру-
бин, Научн. докл. высш. школы, Биол. науки, № 3, 64 (1975). ⁵ Р. М. Бекина,
Г. Г. Лысенко, С. Г. Юферова, Физиол. раст., т. 21, 238 (1974). ⁶ Г. С. Гришина,
Л. Н. Белл, Г. С. Букина, Физиол. раст., т. 13, 737 (1966). ⁷ М. Н. Кондрашова,
М. Н. Лесогорова, С. Э. Шноль, Биохимия, т. 30, 567 (1967). ⁸ P. Böger, C. Black,
A. San Pietro, Arch. Biochem. and Biophys., v. 115, 35 (1966). ⁹ J. M. I. Gould, S. Iza-
wa, Biochim. et biophys. acta, v. 314, 211 (1973). ¹⁰ J. M. Gould, S. Izawa, Europ.
J. Biochem., v. 37, 185 (1973). ¹¹ G. Girault, J. M. Galmiche, Biochim. et biophys.
acta, v. 333, 314 (1974). ¹² R. T. Giaquinta, R. A. Dilley, F. Z. Crane, Biochem.
Biophys. Res. Commun., v. 59, 985 (1974).