



УДК 541.141.1

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ
ИЗ *RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES*
ПРИ ФИКСИРОВАННОЙ ГИДРАТАЦИИ ПРЕПАРАТОВ*

Нокс П. П., Кононенко А. А., Рубин А. Б.

*Биологический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

На фотосинтетических реакционных центрах (РЦ), выделенных при помощи додецилсульфата натрия из мембран бактериальных хромофоров, изучена кинетика темнового восстановления фотохимически окисленного димера бактериохлорофилла (Бхл)₂ эндогенными акцепторами электрона хинонной природы (Q₁, Q₂) в зависимости от степени гидратации препаратов. Обнаружено, что в пленках с содержанием воды < 20% происходит обратимое блокирование переноса электрона от фотовосстановленного первичного акцептора Q₁⁻ ко вторичным Q₂, а скорость рекомбинации ион-радикалов (Бхл)₂⁺ и Q₁⁻ обратимо возрастает. Понижение температуры высокоувлажненных пленок РЦ (20% H₂O) имитирует влияние дегидратации. В обезвоженных препаратах (≤ 10% H₂O) кинетика редокс-процессов Q₁⁻ → Q₂ и (Бхл)₂⁺ + Q₁⁻ не зависит от температуры в интервале от 20 до -180°. Полученные результаты объясняются в рамках конформационной модели стабилизации фотохимически разделенных зарядов в РЦ.

В последнее время экспериментально доказано, что начальные стадии фотосинтеза, заключающиеся в высокоэффективном переносе электрона против градиента термодинамического потенциала, осуществляются в так называемых фотосинтетических реакционных центрах [1]. Последние представляют собой входящие в состав мембран комплексы порфириновых пигментов и некоторых редокс-кофакторов со специфическими белками. В РЦ, выделенных при помощи детергентов из мембран хромофоров фотосинтезирующих бактерий рода *Rhodospseudomonas*, несколько белковых субъединиц общей молекулярной массой до 10⁵ а.е.м. несут следующие простетические группы, необходимые для проведения фотохимического акта: молекулы бактериохлорофилла, бактериофеофитина и убихинона; присутствуют также негемовое железо (Fe²⁺) и каротиноиды, не удаляемые детергентом [2].

Ранее на целых клетках [3] и изолированных мембранах хромофоров [4-7] различных пурпурных бактерий мы исследовали электрон-транспортные процессы, инициируемые РЦ, как функцию влажности образцов. Методы дифференциальной абсорбционной спектроскопии и ЭПР использовали для регистрации оксидоредукций переносчиков, а импульсный метод ЯМР-спиновое эхо — для оценки содержания и состояния воды.

* Сокращения: РЦ — фотосинтетические реакционные центры, (Бхл)₂ — димер бактериохлорофилла, Q — убихиноны, ДСН — додецилсульфат натрия.

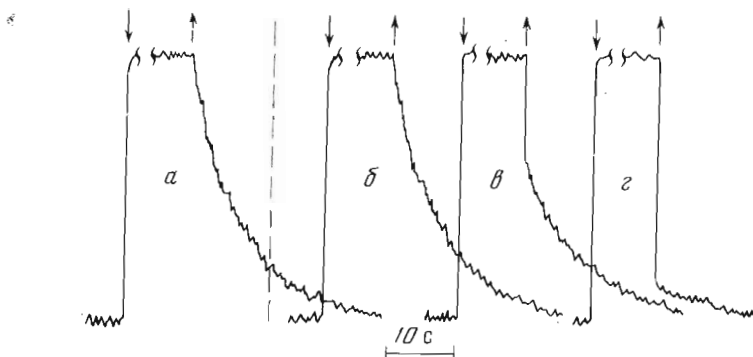


Рис. 1. Кинетика фотоиндуцированных превращений $(\text{Бхл})_2$ ($\lambda 870$ нм) в суспензии (а) и пленках (б-г) ДСН-РЦ из *Rps. sphaeroides*, инкубированных при относительной влажности 0,43 (б), 0,32 (в), 0,12 (г)

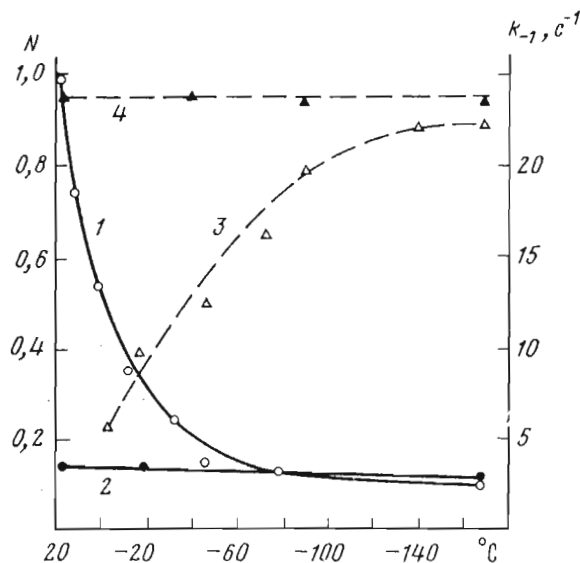


Рис. 2. Температурные зависимости эффективности реакции $Q_1^- \rightarrow Q_2$ (N) в относительных единицах (1, 2) и константы скорости рекомбинации Q_1^- и $(\text{Бхл})_2^+$, k_{-1} (3, 4) в пленках ДСН-РЦ из *Rps. sphaeroides* с содержанием воды 20% (1, 3) и 10% (2, 4)

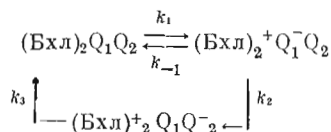
Представлялось необходимым продолжить такое исследование на более простых системах, сохраняющих характерную фотохимическую активность, каковыми являются препараты РЦ. Это и определило задачи настоящей работы.

В соответствии с нашими предшествующими исследованиями [8—11] и данными Слутена [12] в РЦ, выделенных с додецилсульфатом натрия (ДСН-РЦ), световая активация приводит к быстрому ($t_{1/2} \sim 200$ пс) переносу электрона от димера $(\text{Бхл})_2$ на убикинон Q_1 . Ион-радикальные продукты $(\text{Бхл})_2^+$ и Q_1^- стабильны в течение десятков миллисекунд, что достаточно для их использования в функциональных процессах (прямые окислоредукции, генерация электрического потенциала). На последующем этапе фотомобилизованный электрон переходит на вторичный акцептор, убикинон Q_2 , менее прочно связанный с белком РЦ по сравнению с акцептором Q_1 . При отсутствии экзогенных кофакторов в темноте происходит обращение этих реакций: быстрое восстановление $(\text{Бхл})_2^+$ убикиноном Q_1^- ($t_{1/2}$ 180—240 мс) и медленное восстановление $(\text{Бхл})_2^+$ убикино-

Характеристики фотоиндуцированных электрон-транспортных реакций пленок ДСН-РЦ из *Rps. sphaeroides* с различным содержанием воды

Относительная влажность (P/P_s)	Содержание воды в РЦ, %	N , отн. ед.	k_{-1} , c^{-1}	$k_3 \cdot 10^{-1}$, c^{-1}
0,90	20	1,0	—	2–2,5
0,55	20	1,0	—	2–2,5
0,43	20	1,0	—	2–2,5
0,33	16	0,6	7,7	2–2,5
0,23	12	0,4	14,3	2–2,5
0,12	10	0,15	22,2	2–2,5

ном Q_2^- ($t_{1/2}$ 4–6 с). Следовательно, фотоиндуцированный цикл электрон-транспортных актов в ДСН-РЦ можно представить следующей схемой:



На рис. 1 представлена кинетика темнового восстановления фотоокисленного $(\text{Бхл})_2$ в препаратах ДСН-РЦ, инкубированных при различной относительной влажности. В суспензии и пленках РЦ, выдержанных в интервале относительной влажности (P/P_s) от 0,9 до 0,43, наблюдается фотоиндуцированный перенос электрона через Q_1 на Q_2 , о чем свидетельствует медленное восстановление стационарно окисленного $(\text{Бхл})_2$. При дальнейшем понижении относительной влажности (от 0,43 до 0,32) медленный компонент восстановления $(\text{Бхл})_2^+$ убухиноном Q_2^- замещается быстрым восстановлением убухиноном Q_1^- . Это означает, что определенная вероятность, N , выноса электрона за пределы пары $(\text{Бхл})_2 - Q_1$, остающаяся постоянной в широком интервале внешней влажности, резко уменьшается по достижении некоторого порогового значения гидратации образца.

В таблице приведены данные по эффективности (N) переноса электрона от Q_1^- на Q_2 в образцах с различным содержанием воды. Величину N считали пропорциональной вкладу медленного компонента в темновое восстановление $(\text{Бхл})_2^+$ от Q_2^- после достижения стационарного распределения электронов в системе на свету насыщающей интенсивности. Значению критической влажности 0,43 соответствует максимальная величина увлажнения препарата (около 20%), которая сохраняется практически неизменной при увеличении упругости водяных паров. Найденная величина вполне соответствует тому количеству воды (30–20%), которое, по разным оценкам, связывается различными белками и формирует первичную гидратную оболочку макромолекул [13]. Наблюдаемое снижение эффективности переноса электрона $Q_1^- \rightarrow Q_2$ при влажности ниже 0,43 может быть связано с торможением конформационной подвижности и структурными перестройками в пигмент-белковом комплексе РЦ при удалении гидратной воды. Подобный механизм контроля специфической активности ферментных белков в зависимости от степени их гидратации подробно рассмотрен на примере химоатрипсина [13].

Известно, что скорость рекомбинации $(\text{Бхл})_2^+$ и Q_1^- в РЦ является параметром, весьма чувствительным к структурному состоянию комплекса [6, 7, 14, 15]. Из таблицы видно, что константа рекомбинации этих фотопродуктов (величина, обратная времени полупревращения) действительно увеличивается, по крайней мере в 3–3,5 раза при обезвоживании препаратов в интервале относительной влажности ниже 0,43. Интересно, что константа скорости рекомбинации $(\text{Бхл})_2^+$ и Q_1^- , k_{-1} , и значение эф-

эффективности переноса электрона от Q_1^- на Q_2 , N , зарегистрированные при минимальной относительной влажности 0,12, близки к величинам этих параметров в высокоувлажненных пленках РЦ при криогенных температурах. Этот факт иллюстрируют результаты экспериментов, показанные на рис. 2. В препаратах, инкубированных при максимально высокой влажности 0,9, отчетливо прослеживается антибатный ход зависимости параметров N и k_- от температуры (рис. 2, 1, 3). Действительно, эффективность переноса электрона от Q_1^- на Q_2 резко падает в интервале от 20 до -50° , достигая некоторого уровня, который остается постоянным при дальнейшем понижении температуры до -170° , а константа рекомбинации Q_1^- с $(\text{Бхл})_2^+$ возрастает в интервале от -10 до -100° и также не изменяется далее. Рассматриваемые температурные профили для высокоувлажненных пленок близки к профилям, полученным для водных суспензий РЦ [6, 7]. Вместе с тем в пленках РЦ с низким содержанием воды (относительная влажность 0,12) параметры N и $t_{1/2}$ практически не зависят от температуры во всем изученном интервале (рис. 2, 2, 4).

Интересно, что в наших экспериментах на пленках РЦ не было обнаружено зависимости кинетики медленного взаимодействия $(\text{Бхл})_2^+$ и Q_2^- от степени гидратации (таблица) и температуры (рис. 2); полувремя данной реакции варьировало незначительно (в пределах 4–6 с). Необходимо особо подчеркнуть, что дегидратация или глубокое понижение температуры не вызывали заметных повреждений РЦ в пленках. Все описанные выше эффекты изменения функциональной активности были полностью обратимыми.

Как уже отмечено, обратимые изменения структурно-функциональных характеристик РЦ при уменьшении степени гидратации и понижении температуры были изучены ранее [4–6] *in situ* на мембранах бактериальных хроматофоров. В этом случае также происходит ингибирование переноса электрона от Q_1^- на Q_2 в интервале значений внешней влажности от 0,3 до 0,1, что соответствует увлажнению образцов 18,3–11,5%. Кроме того, в том же интервале влажности отчетливо проявляется длинноволновый сдвиг максимума основной полосы поглощения $(\text{Бхл})_2$, положение которого определяется степенью перекрытия π -орбиталей порфириновых структур, составляющих этот димер. Однако сложность многокомпонентных образований, каковыми являются мембраны бактериальных хроматофоров, затрудняла возможность достаточно однозначной трактовки найденной величины критической гидратации. Результаты настоящей работы на изолированных РЦ полностью подтверждают прежние наблюдения на хроматофорах и позволяют дать более строгую количественную характеристику обнаруженным эффектам в терминах зависимости структурно-функциональных характеристик комплекса РЦ от первичной гидратации белковых компонентов. В этой связи следует отметить, что эксперименты, выполненные нами совместно с Г. М. Николаевым методом ЯМР-спиновое эхо на хроматофорах *R. rubrum*, показали, что резкое замедление скорости выноса электрона за пределы РЦ ($Q_1^- \rightarrow Q_2$) происходит при удалении из препаратов фракции воды, время спин-спиновой релаксации протонов которой имеет порядок десятых миллисекунды.

Специальными опытами с применением методов спиновых и гамма-резонансных меток и зондов на мембранах хроматофоров [16], а также на изолированных пигмент-белковых комплексах [17] установлено, что отмеченные изменения структурно-функциональных характеристик РЦ обусловлены обратимым торможением внутримолекулярной подвижности в этом комплексе при понижении степени гидратации и температуры. Принимая во внимание эти данные, а также результаты исследования поляризуемости препаратов РЦ в электрических полях порядка 10^4 В/см [18], можно заключить, что стабилизация первичных редокс-продуктов $(\text{Бхл})_2^+$ и Q_1^- , необходимая для их эффективного использования в функциональных реакциях, осуществляется за счет быстрых направленных и

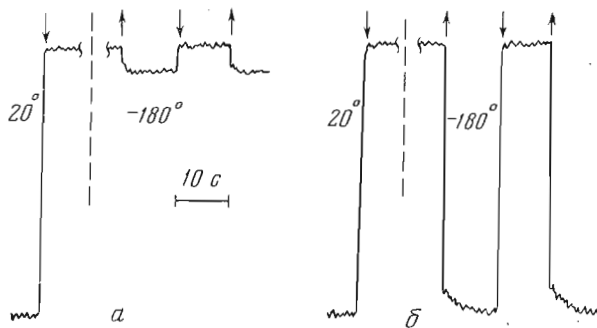


Рис. 3. Фотоиндуцированные окислительно-восстановительные превращения $(\text{Бхл})_2$ ($\lambda 870 \text{ нм}$) в пленках ДСН-РЦ из *Rps. sphaeroides*, охлажденных до -180° на действующем свете при содержании воды в препаратах 20% (а) и 10% (б)

обратимых конформационных переходов РЦ. Такие переходы индуцируются изменением электростатического поля в белке РЦ при фотохимическом разделении разноименных зарядов в паре $(\text{Бхл})_2^+ - \text{Q}_1^-$ и обеспечивают достижение позиции Q_1^- по отношению к Q_2 , необходимой для эффективного переноса электрона, препятствуя тем самым растрате энергии, запасенной в фотопродуктах.

В пользу подобного механизма стабилизации разделенных зарядов свидетельствуют результаты следующих экспериментов, проведенных на пленках РЦ с различным содержанием воды (рис. 3). Препараты активировали постоянным освещением и охлаждали на свету до -180° . В высокоувлажненных образцах (около 20% H_2O), подвергнутых такой процедуре (рис. 3, а), большая часть $(\text{Бхл})_2^+$ не восстанавливается в темноте при -180° . Об этом свидетельствуют также спектры оптического и ЭПР-поглощения адаптированных к свету РЦ при -180° , показывающие стабилизацию фотохимически активного димера в окисленном состоянии. Напротив, в пленках РЦ с малым содержанием воды (10%) низкотемпературная стабилизация $(\text{Бхл})_2^+$ не наблюдается. Фотореакция полностью обратима (рис. 3, б), и величина константы рекомбинации Q_1^- с $(\text{Бхл})_2^+$ в данных образцах при -180° не отличается от таковой для препаратов, охлажденных в темноте: $k_{-1} 22-25 \text{ с}^{-1}$.

Различия в характере реакций $(\text{Бхл})_2$ в адаптированных к свету препаратах с высокой и малой влажностью естественно связать с реализацией фотоиндуцированных температурно-зависимых конформационных переходов белка РЦ. При этой перестройке восстановленные акцепторы Q_1^- , Q_2^- могут оказаться «замороженными» в таком состоянии, что возвращение захваченных ими электронов димеру $(\text{Бхл})_2^+$ становится невозможным. Очевидно, такие конформационные изменения возможны лишь при определенной гидратации белка РЦ, обеспечивающей необходимую пластичность макромолекулярных компонентов, несущих активные реагенты.

Экспериментальная часть

РЦ выделяли, как описано ранее [8], из мембран хроматофоров фотосинтезирующих несерных бактерий *Rps. sphaeroides*, штамм 1760-1. Пленки РЦ получали путем высушивания определенного объема суспензии препарата на стеклянной подложке при комнатной температуре, атмосферном давлении и влажности в течение 1,5–2 ч. Длительная экспозиция на воздухе приводила к значительной инаktivации РЦ за счет необратимого окисления $(\text{Бхл})_2$, и поэтому высушивание проводили в токе азота. Сухие пленки РЦ имели такой же спектр поглощения, как и исходные

суспензии. Препараты с фиксированным содержанием воды готовили следующим образом. Пленки в герметизируемых оптических кюветах инкубировали при заданной относительной влажности [19] в течение 48 ч. Содержание воды в пленках определяли весовым методом путем высушивания их до постоянного веса при 105°.

Спектры поглощения измеряли на модифицированном спектрофотометре СФ-14 с рабочим диапазоном от 400 до 900 нм. Кинетику изменения спектров поглощения под действием постоянного или импульсного действующего света регистрировали, как описано в работе [20], на однолучевом дифференциальном спектрофотометре с низкотемпературной приставкой. Интенсивность постоянного действующего света (700—1100 нм) составляла 1 мДж·см⁻². Импульсным источником служила лампа ИСП-100 (750—1100 нм, длительность вспышки ~100 мкс).

Исходя из известного соотношения констант скоростей элементарных электрон-транспортных актов в ДСН-РЦ [9], для изучения кинетики переноса электрона в системе акцепторов Q₁, Q₂ препараты активировали постоянным светом в течение 1—2 мин, что достаточно для достижения стационарного распределения электронов, а затем анализировали кривые темнового восстановления стационарно окисленного (Бхл)₂ в полосе 870 нм. Относительный вклад быстрого и медленного компонентов в этот процесс учитывался с высокой точностью, поскольку характерные времена соответствующих реакций различались по крайней мере на порядок величины. Скорость рекомбинации фотопродуктов (Бхл)₂⁺ и Q₁⁻ определяли путем непосредственной регистрации кинетики темнового восстановления димера пигмента, окисленного единичным импульсом света.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feher G., Okamura M. (1976) in: Chlorophyll-Protein, Reaction Centres and Photosynthetic Membranes. Brookhaven Symp. in Biol., Brookhaven National Laboratory, vol. 28, pp. 183—194.
2. Clayton R. K., Rafferty C. N., Clayton B. J., Barouch J. (1978) in: Proc. of the Fourth Intern. Congress on Photosynthesis (Hall D., Coombs J., Goodwin T., eds), pp. 45—54, Biochem. Soc., London.
3. Кононенко А. А., Николаев Г. М., Тимофеев К. Н., Лукашев Е. П., Рубин А. Б., Чудина В. И., Осницкая Л. К. (1977) Изв. АН СССР. Сер. биол. н., 869—878.
4. Лукашев Е. П., Нокс П. П., Кононенко А. А., Венедиктов П. С., Рубин А. Б. (1975) Биол. науки, № 7, 48—55.
5. Нокс П. П., Кононенко А. А., Рубин А. Б. (1976) Вестн. Моск. ун-та. Биол., № 2, 62—66.
6. Нокс П. П., Кононенко А. А., Рубин А. Б. (1977) Молекулярн. биология, 11, 933—940.
7. Нокс П. П., Лукашев Е. П., Кононенко А. А., Венедиктов П. С., Рубин А. Б. (1977) Молекулярн. биология, 11, 1090—1099.
8. Нокс П. П., Адамова Н. П., Пащенко В. З., Тимофеев К. Н., Кононенко А. А., Рубин А. Б. (1976) Молекулярн. биология, 10, 641—651.
9. Чаморовский С. К., Нокс П. П., Ременников С. М., Кононенко А. А., Рубин А. Б. (1976) Биофизика, 21, 300—306.
10. Paschenko V. Z., Kononenko A. A., Protasov S. P., Rubin A. B., Rubin L. B., Uspenskaya N. Ya. (1977) Biochim. et biophys. acta, 461, 403—412.
11. Пащенко В. З., Кононенко А. А., Рубин А. Б., Рубин Л. Б. (1978) Биофизика, 23, 833—838.
12. Slooten L. (1972) Biochim. et biophys. acta, 256, 452—466.
13. Росляков В. Я., Хургин Ю. И. (1972) Биохимия, 37, 493—497.
14. Hales B. J. (1976) Biophys. J., 16, 471—480.
15. McElroy J. D., Mauzerall D. C., Feher G. (1974) Biochim. et biophys. acta, 333, 261—278.
16. Берг А. И., Нокс П. П., Кононенко А. А., Фролов Е. Н., Хрымова И. Н., Рубин А. Б., Лихтенштейн Г. И., Гольданский В. И., Парак Ф., Букл М., Мессбауэр Р. (1979) Молекулярн. биология, 13, 81—89.
17. Берг А. И., Нокс П. П., Кононенко А. А., Фролов Е. Н., Успенская Н. Я., Хрымова И. Н., Рубин А. Б., Лихтенштейн Г. И., Хидег К. (1979) Молекулярн. биология, 13, 468—475.
18. Borisevich G. P., Knox P. P., Kononenko A. A., Rubin A. B., Vozary E. (1978) Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung., 13, 67—72.
19. Winston P., Bates D. (1960) Ecology, 41, 232—237.

20. Верхотуров В. Н., Ковоненко А. А. (1974) в сб.: Современные методы исследования фотобиологических процессов (Рубин А. Б., ред.), с. 40-66, изд. МГУ.

Поступила в редакцию
31.VII.1978

**FUNCTIONAL ACTIVITY IN PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTRES FROM
RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES AT FIXED HYDRATION
LEVELS OF THE PREPARATIONS**

KNOX P. P., KONONENKO A. A., RUBIN A. B.

Biology Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The dark reduction kinetics of the photochemically oxidized bacteriochlorophyll dimer $(BChl)_2$ by endogenous electron acceptors of quinone nature (Q_1 , Q_2) were studied as a function of the hydration extent in the photosynthetic reaction centres (RC) isolated from bacterial chromatophore membranes. It was found that in the RC films with water content below 20% the reversible inhibition of an electron transfer from the photoreduced primary acceptor Q_1^- to the secondary one, Q_2 , took place with concomitant reversible increase in the recombination rate of ion-radicals $(BChl)_2^+$ and Q_1^- . Cooling of the preparations with high water content (20%) produced the effect similar to that of dehydration. In extensively dried preparations ($\leq 10\%$ H_2O), the kinetics of redox acts $Q_1^- \rightarrow Q_2$ and $(BChl)_2^+ \leftarrow Q_1^-$ were not depend on temperature over the range from 20° to -180° . The results obtained were interpreted in terms of the conformational model for stabilization of the photochemically separated electric charges in RC.
