

УДК 581.132.144

МУЛЬТИКОМПОНЕНТНАЯ КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ И ТЕМНОВОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИСТЕМЫ I В ХЛОРОПЛАСТАХ ГОРОХА

С.М. КОЧУБЕЙ, Т.А. КАЗАНЦЕВ, В.В. ШЕВЧЕНКО, О.Ю. БОНДАРЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

Измерены кинетики окисления и темнового восстановления реакционных центров фотосистемы I, P700, в хлоропластах гороха. Редокс-превращения индуцировали синим светом высокой интенсивности, который возбуждал как фотосистему I, так и фотосистему II. При разложении кинетических кривых выявлены три компонента в окислении (0,30; 0,110; 0,210 с⁻¹) и четыре — в темновом восстановлении (0,033; 0,045; 0,070; 0,080 с⁻¹), вклады которых были различными. Показано, что характеристики компонентов изменялись после кратковременного прогрева хлоропластов при 25 °С. Сопоставление полученных результатов с литературными данными позволило предложить гипотезу о природе компонентов. Мультифазные редокс-кинетики P700 отнесены к трем типам комплексов фотосистемы I, расположенных в различных областях тилакоидной системы. Два из четырех компонентов темнового восстановления отнесены к циклическому электронному транспорту в комплексах фотосистемы I в областях тилакоидов, контактирующих со стромой, а именно, в интергранальных тилакоидах и маргинальных зонах гранальных тилакоидов. Два других компонента предположительно принадлежат к нециклическому электронному транспорту в комплексах фотосистемы I, расположенных в центральной и маргинальной областях гранальных тилакоидов.

Ключевые слова: мультикомпонентная кинетика P700, фотосистема I, тилакоид, хлоропласт.

Современные исследования редокс-превращений P700 посвящены в основном изучению особенностей кинетики темнового восстановления [9, 10, 13]. В подавляющем большинстве работ последних лет измерения проводят на листьях, редокс-превращения P700 индуцируют красным светом низкой интенсивности с длиной волны >720 нм, который воспринимается преимущественно ФС I. При этом темновое восстановление окисленных P700 обусловлено циклическим транспортом электронов вокруг ФС I [9, 10]. В этой кинетике обнаруживают два [9] или три [13] компонента. Причиной их появления считают возможное участие двух типов подвижных восстановленных акцепторов, которые могут передавать электроны в циклическую цепь [9, 10], либо процессы, происходящие в комплексах ФС I, расположенных в различных областях тилакоидной системы хлоропластов [13].

Кинетика окисления изучена слабо. Она приведена в работе [12] и проанализирована в работах [14, 15]. В работе [12] использовали хлоропласты. В специальном режиме измерений кинетику окисления P700 из-

меряли в работе [16] для субхлоропластных комплексов ФС I из различных линий арабидопсиса.

Два компонента в кинетике окисления наблюдали в работах [12, 14]. В первой из них специфику кинетики окисления не рассматривали, во второй мультифазность связывали с особенностями структурной организации акцепторной части ФС I в стыкованной и нестыкованной областях тилакоидов.

Задачей нашего исследования было детальное изучение кинетики окисления и темнового восстановления P700 в условиях, когда возбуждающий свет поглощается в обеих фотосистемах. При этом в кинетику окисления должны вносить вклад обе ветви электронного транспорта — циклическая и нециклическая. Согласно современным представлениям об организации ультраструктуры хлоропластов, комплексы ФС I располагаются в трех различных компартментах: в интергранальных тилакоидах, в маргинальной и вблизи центральной областей гранальных тилакоидов [5, 7]. Циклический транспорт осуществляется в ФС I интергранального расположения и маргинального в грани. В нециклическом потоке могут участвовать только комплексы ФС I, расположенные в центральной области гранального тилакоида.

Таким образом, попытаемся выявить вклад нециклического транспорта электронов в редокс-превращения P700 с учетом гетерогенности расположения комплексов ФС I в тилакоидах хлоропластов. Дополнительные возможности анализа дает рассмотрение изменений кинетики, вызванных кратковременным прогревом хлоропластов при сравнительно невысокой температуре (25 °С). Согласно литературным данным, такая обработка ускоряет кинетику темнового восстановления, обусловленную циклическим транспортом [2, 13]. Изменения должны наблюдаться и в компонентах, связанных с нециклическим транспортом, поскольку реокисление P700 из-за поступления электронов от ФС II в этих условиях замедляется [11].

Методика

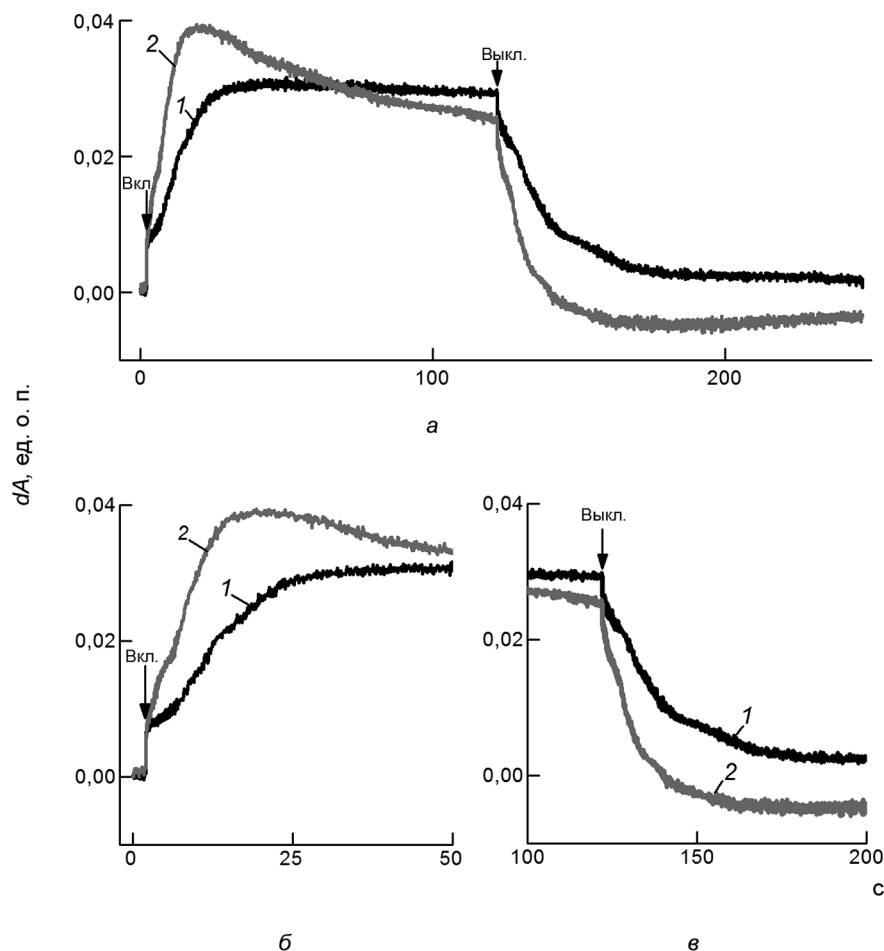
Хлоропласты выделяли из полностью сформированных листьев верхнего яруса 12-суточных растений гороха. Растения выращивали на вегетационной площадке в период с мая по сентябрь в естественных условиях. Хлоропласты выделяли, как описано нами ранее [3], в 50 мМ трициновом буфере (рН 7,6) с добавлением 0,4 М сахарозы, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ NaCl. Полученный осадок ресуспендировали в 10 мМ трициновом буфере (рН 7,6) с добавлением 0,1 М сахарозы, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ NaCl. Концентрацию хлорофилла в суспензии хлоропластов определяли спектрофотометрически в ацетоновом экстракте по Арнону [8].

Кинетику окисления и темнового восстановления P700 измеряли, как описано ранее [2]. Суспензию хлоропластов помещали в кювету размером 10 × 18 × 35 мм. Актиничную подсветку осуществляли монохроматическим синим светом ($\lambda = 440$ нм), максимальная интенсивность на поверхности кюветы равнялась 5 мВт/см² и была насыщающей. Измеряющий красный свет от светодиода был направлен перпендикулярно к актиничному лучу, проходил сквозь интерференционный светофильтр ($\lambda_{\text{макс}} = 700$ нм, полуширина — 2 нм). Освещенность на поверхности кюветы равнялась 2 мкВт/см². Оптическая плотность суспензии при длине волны 700 нм находилась в пределах 0,5—0,7. Минимальный шаг отбора информации в шкале времени — 10 мс.

Разложение кинетических кривых на экспоненциальные составляющие проводили, основываясь на кинетических уравнениях окисления P700 и затухания сигнала P700 после выключения актиничного света с использованием полулогарифмических анаморфозов соответствующих кинетических кривых. Расчеты проводили с использованием стандартного пакета ORIGIN 7.0. Коэффициент аппроксимации R^2 равнялся 0,90—0,96 в зависимости от количества точек на аппроксимируемом участке, доверительный интервал — 0,001.

Результаты и обсуждение

Кинетическая кривая редокс-превращений P700 при 4 °С представлена на рисунке (кривая 1), из которого видно, что кинетики окисления и темнового восстановления имеют сложный характер. Анализом компонентного состава выявлены три компонента в кинетике окисления и четыре — темнового восстановления с характеристическими константами, приведенными в табл. 1. Вклады всех трех компонентов в кинетике окисления, оцененные приближенно по точкам перегиба на кинетичес-



Кинетические кривые редокс-превращений P700 в хлоропластах гороха при 4 (1) и 25 °С (2):

a — полная кривая; *б* — окисление P700; *в* — темновое восстановление P700; Вкл. — включение актиничного света; Выкл. — выключение актиничного света

МУЛЬТИКОМПОНЕНТНАЯ КИНЕТИКА

ТАБЛИЦА 1. Влияние прогрева при 25 °С на временные константы (k) и вклады (A) компонентов в кинетику окисления реакционных центров фотосистемы I

Образец	Компонент					
	1		2		3	
	k, c^{-1}	$A, \%$	k, c^{-1}	$A, \%$	k, c^{-1}	$A, \%$
Контроль, 4 °С	0,030 ± 0,001	30	0,110 ± 0,002	37	0,210 ± 0,007	33
Прогрев, 25 °С	0,110 ± 0,001	40	0,260 ± 0,006	31	0,710 ± 0,040	29

ких кривых, приблизительно одинаковы. Аналогичный результат получен для компонентов 1 и 3 в кинетике темнового восстановления. Компонент 2 дает наибольший вклад (около 50 %), компонент 4 — наименьший (около 10 %) (табл. 2).

Прогрев при 25 °С вызывал заметные изменения (см. рисунок, кривая 2): приводил к ускорению как окисления, так и темнового восстановления. Согласно данным табл. 1, характеристическое время всех трех компонентов окисления ускоряется в 2,4—3,7 раза. Существенно увеличивается вклад компонента 1, а вклады компонентов 2 и 3 немного уменьшаются. В темновом восстановлении ускоряются компоненты 1 и 3, константа компонента 2 практически не изменяется, компонента 4 — немного уменьшается (см. табл. 2).

Вследствие ускорения окисления максимальный уровень сигнала P700 раньше достигается в прогретом образце. Значение его сдвига во временной шкале может служить усредненной мерой ускорения суммарной кинетики окисления. При рассмотрении этой характеристики для хлоропластов, выделенных из растений, выращенных в различные периоды сезона вегетации, время, соответствующее моменту достижения максимального сигнала, изменяется в 1,5—2 раза.

Прогрев вызывает специфические изменения формы кинетической кривой в области «плато»: после достижения максимума сигнал уменьшается, а затем выходит на постоянный уровень вплоть до выключения актиничного света (см. рисунок, кривая 2).

Темновое восстановление после прогрева при 25 °С ускоряется главным образом за счет значительного увеличения как скорости, так и вклада компонента 3 (см. рисунок, табл. 2). Скорости компонентов 2 и 4 почти не изменяются, хотя их вклады меняются значительно — более чем трехкратное уменьшение первого и почти трехкратное увеличение второго. В 2,5 раза также возрастает скорость компонента 1, хотя его вклад остается неизменным.

ТАБЛИЦА 2. Влияние прогрева при 25 °С на временные константы (k) и вклады (A) компонентов в кинетику темнового восстановления реакционных центров фотосистемы I

Образец	Компонент							
	1		2		3		4	
	k, c^{-1}	$A, \%$	k, c^{-1}	$A, \%$	k, c^{-1}	$A, \%$	k, c^{-1}	$A, \%$
Контроль, 4 °С	0,045 ± 0,001	21	0,070 ± 0,001	48	0,033 ± 0,002	23	0,080 ± 0,003	8
Прогрев, 25 °С	0,103 ± 0,003	20	0,060 ± 0,002	13	0,110 ± 0,002	43	0,086 ± 0,003	23

Анализ полученных данных позволяет судить о природе выявленных компонентов в мультифазной кинетике окисления и темнового восстановления P700. Три компонента в кинетике окисления предположительно можно отнести к трем известным типам ФС I, расположенным в различных областях тилакоидной системы [5, 7]. Их вклады почти одинаковы, а константы различаются в несколько раз (см. табл. 1). Каждая из них соответствует сумме констант прямой и обратной реакций в окислении P700. Очевидно, что константа прямой реакции имеет более высокое относительное значение, поскольку происходит накопление во времени окисленной формы P700.

Для комплексов ФС I, расположенных в центральной и маргинальной областях гранальных тилакоидов, преимущественный вклад в реакцию реокисления обеспечивает перенос электронов от ФС II, поскольку именно в этих областях тилакоидов реализуется нециклический электронный транспорт. Характер взаимодействия комплексов ФС I, расположенных вблизи центральной части гранального тилакоида и в его маргинальной области, с комплексами ФС II различный. Первые из них непосредственно контактируют с комплексами ФС II, вторые — пространственно отделены от них, и перенос электронов должен осуществляться с помощью мобильных переносчиков, перемещающихся в мембране. Соответственно и время восстановления окисленных P700, происходящего на свету, в период действия актиничной подсветки будет отличаться. Скорости прямых реакций также разные для этих двух типов комплексов ФС I, поскольку они пропорциональны размерам их светособирающих антенн [16], которые существенно неодинаковы [5, 7]. Вследствие указанных причин компоненты, выделяемые в кинетике окисления P700, должны отличаться, если они связаны с процессами, происходящими в разных типах гранальных комплексов ФС I.

Комплексы ФС I, расположенные в интергранальных тилакоидах, с ФС II прямо не взаимодействуют. Как предполагается в работах [9, 10, 14, 15], их восстанавливают восстановленные в нециклическом транспорте мобильные переносчики, которые могут перемещаться в строме, — восстановленный НАДФ или ферредоксин. Поэтому сравнительно небольшое количество этих веществ, которое может продуцироваться в выделенных нами хлоропластах класса В во время актиничной подсветки, должно обуславливать самую низкую обратную константу. Поскольку размер светособирающей антенны у этих комплексов ФС I наименьший [6], то и константа скорости прямой реакции будет самой малой. Как следует из данных табл. 1, минимальное значение константы скорости в окислении P700 соответствует компоненту 1. Поэтому, исходя из изложенного выше, именно его следует отнести к комплексам ФС I в интергранальных тилакоидах. Максимальная скорость обратной реакции характерна для комплексов ФС I, непосредственно контактирующих с комплексами ФС II в центральной части гранальных тилакоидов. Они, по нашим оценкам, имеют самый большой размер светособирающей антенны [5, 6]. Поэтому компонент 3 следует отнести к этим комплексам, а компонент 2 — к комплексам ФС I, расположенным в маргинальной области гранальных тилакоидов. Суммарный вклад компонентов 2 и 3 составляет 70 % (см. табл. 1), что согласуется с оценкой содержания комплексов ФС I в гранальных тилакоидах, полученной нами ранее при определении содержания белков ФС I в субхлоропластных фрагментах, представляющих собой целые грани [1].

Если исходить из представления о том, что в сигнал P700 делают вклад по меньшей мере три типа комплексов ФС I с различающейся локализацией в мембранах тилакоидов, то можно ожидать проявления не менее четырех компонентов в кинетике темнового восстановления. Для комплексов ФС I в интергранальных тилакоидах кинетика должна быть обусловлена только циклическим транспортом по механизму, предложенному в работах [9, 12, 14]. Для комплексов ФС I, расположенных на краевых участках гранальных тилакоидов, необходимы вклады циклического и нециклического транспорта, для расположенных на границе с центральной частью гранального тилакоида темновое восстановление может быть обусловлено только каким-либо механизмом, связанным с опосредованным действием нециклического транспорта. Действительно, после выключения актиничного света и прекращения фотохимического функционирования ФС II вклад нециклической цепи может быть обусловлен только процессами, связанными, например, с накоплением электронов на тех или иных участках этой цепи во время действия света и последующего переноса их на ФС I уже после его выключения. Итак, в кинетике темнового затухания можно ожидать наличия двух компонентов, связанных с циклическим транспортом, и двух, возможно различающихся, — с нециклическим.

Из данных табл. 2 видно, что в кинетике темнового восстановления есть два компонента с низкими временными константами (1 и 3), которые значительно ускоряются после прогрева. Скорость двух других после прогрева практически не изменяется. В работах [9] и [13] все компоненты, обусловленные циклическим транспортом, ускорялись после прогрева, что, как полагают авторы, связано с увеличением скорости диффузии подвижных переносчиков электронов. Можно ожидать, что наблюдаемые нами компоненты 1 и 3 обусловлены циклическим транспортом, а 2 и 4, возможно, связаны с последствием нециклического.

Характер изменения вкладов компонентов темнового восстановления, вызываемый прогревом, различный. Вклад компонента 3 увеличивается в 1,9 раза, а вклад компонента 1 — остается неизменным, компонента 2 — уменьшается в 3,7 раза, компонента 4 — возрастает в 2,9 раза (см. табл. 2).

Эти данные можно попытаться объяснить с позиций обнаруженных нами ранее изменений в организации гранальных тилакоидов в ответ на действие повышенной температуры. В этом случае увеличивается площадь нестыкованной части и, соответственно, количество комплексов ФС I, пространственно разобщенных с комплексами ФС II [4, 6]. При этом уменьшается количество комплексов ФС I, расположенных в центральной части гранального тилакоида. Тогда увеличение вклада компонентов 3 и 4 после прогрева объяснимо в случае отнесения их к комплексам ФС I, расположенным в маргинальных областях. Аналогичным образом уменьшение вклада компонента 2 сопоставимо с уменьшением после прогрева количества комплексов, расположенных в центральной области. Поскольку прогрев существенно не влияет на ультраструктуру хлоропластов в области интергранальных тилакоидов, то практическая неизменность вклада компонента 1 должна указывать на его связь с комплексами ФС I, расположенными именно в этих тилакоидах.

С учетом сказанного выше можно заключить, что общая сумма комплексов ФС I, соответствующая гранальной локализации (компоненты 2, 3 и 4), составляет 79 %, интергранальной локализации — 21 %, что

приблизительно согласуется с приведенными выше оценками распределения комплексов ФС I между гранами и интергранальными тилакоидами, полученными на основании анализа констант скорости компонентов кинетики окисления.

Таким образом, обнаруженный нами компонентный состав кинетики окисления и темнового восстановления P700 в хлоропластах соответствует представлению о гетерогенной пространственной локализации комплексов ФС I в хлоропластах. Предложенную интерпретацию происхождения компонентов кинетики окисления и темнового восстановления P700 следует рассматривать как предварительную. При этом возникает ряд вопросов, требующих проведения дальнейших исследований, в частности выяснения механизма темнового восстановления P700, связанного с функционированием нециклического электронного транспорта, которому мы приписываем компоненты 2 и 4.

1. Кочубей С.М., Бондаренко О.Ю., Шевченко В.В. Новый тип субхлоропластных фрагментов, выделенных из хлоропластов гороха с помощью дигитонина // Биохимия. — 2007. — 72, № 9. — С. 1255—1261.
2. Кочубей С.М., Вовк А.И., Бондаренко О.Ю. и др. Гетерогенность тилакоидных мембран: исследование методом спинового зонда // Там же. — № 5. — С. 690—698.
3. Кочубей С.М. Организация фотосинтетического аппарата высших растений. — Киев: Альтерпрес, 2001. — 204 с.
4. Кочубей С.М. Особенности организации краевых участков гранальных тилакоидов гороха // Физиология растений. — 2001. — 48, № 3. — С. 392—399.
5. Кочубей С.М., Шевченко В.В., Бондаренко О.Ю. Особенности состояния комплексов фотосистемы I в центральной области гранальных тилакоидов гороха // Там же. — 2003. — 50, № 3. — С. 325—331.
6. Кочубей С.М., Шевченко В.В., Корнеев Д.Ю. Структурная организация и функциональные особенности световой фазы фотосинтеза. — Киев: Логос, 2007. — 176 с.
7. Albertsson P.-A. The structure and function of chloroplast photosynthetic membrane — a model for domain organization // Photosynth. Res. — 1995. — 46, N 1. — P. 141—149.
8. Arnon D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Poliphenoloxidase in *Beta vulgaris* // Plant Physiol. — 1949. — 24, N 1. — P. 1—15.
9. Bukhov G.N., Wiese C., Neimanis S., Heber U. Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: Leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport // Photosynth. Res. — 1999. — 59, N 1. — P. 81—93.
10. Cornic G., Bukhov G.N., Wiese C. et al. Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C₃ plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping // Planta. — 2000. — 210, N 3. — P. 468—477.
11. Havaux M., Greppin H., Strasser R. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light // Ibid. — 1991. — 186, N 1. — P. 88—98.
12. Ivanov B., Asada K., Edwards G.E. Analysis of donors of electrons to photosystem I and cyclic electron flow by redox kinetics of P700 in chloroplasts of isolated bundle sheath strands of maize // Photosynth. Res. — 2007. — 92, N 1. — P. 65—74.
13. Jin M.X., Yao Z.L., Mi H. Multi-phasic kinetics of P700+ dark re-reduction in *Nicotiana tabacum* // Photosynthetica. — 2001. — 39, N 3. — P. 419—425.
14. Joliot P., Joliot A. Cyclic electron flow in C₃ plants // Biochim. Biophys. Acta. — 2006. — 175, N 2. — P. 362—368.
15. Joliot P., Joliot A. Quantification of cyclic and linear flows in plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2005. — 102, N 6. — P. 4913—4918.
16. Klimmek F., Ganeteg U., Ihalainen J.A. et al. Structure of the higher plant light harvesting complex I: in vivo characterization and structural independence of the Lhca proteins // Biochemistry. — 2005. — 44, N 10. — P. 3065—3073.

Получено 23.07.2008

МУЛЬТИКОМПОНЕНТНА КІНЕТИКА ОКИСНЕННЯ ТА ТЕМНОВОГО
ВІДНОВЛЕННЯ РЕАКЦІЙНИХ ЦЕНТРІВ ФОТОСИСТЕМИ І У ХЛОРОПЛАСТАХ
ГОРОХУ

С.М. Кочубей, Т.А. Казанцев, В.В. Шевченко, О.Ю. Бондаренко

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Виміряно кінетики окиснення та темнового відновлення реакційних центрів фотосистеми І, P700, у хлоропластах гороху. Редокс-перетворення індукували синім світлом високої інтенсивності, яке збуджувало як фотосистему І, так і фотосистему ІІ. Під час розкладання кінетичних кривих виявлено три компоненти в окисненні (0,30; 0,110; 0,210 с⁻¹) і чотири — у темновому відновленні (0,033; 0,045; 0,070; 0,080 с⁻¹), внески яких були різними. Показано, що характеристики компонентів змінювалися після короткочасного прогріву хлоропластів за 25 °С. Порівняння отриманих результатів із літературними даними дало змогу запропонувати гіпотезу щодо природи компонентів. Мультифазні редокс-кінетики P700 віднесено до трьох типів комплексів фотосистеми І, що знаходяться в різних ділянках тилакоїдної системи. Два з чотирьох компонентів темнового відновлення віднесено до циклічного електронного транспорту в комплексах фотосистеми І у ділянках тилакоїдів, які контактують зі строною, а саме, в інтергранальних тилакоїдах і маргінальних зонах гранальних тилакоїдів. Два інші компоненти ймовірно належать до нециклічного електронного транспорту в комплексах фотосистеми І, розміщених у центральній і маргінальній ділянках гранальних тилакоїдів.

MULTI-COMPONENT KINETICS OF OXIDATION AND DARK REDUCTION IN
REACTION CENTERS OF PHOTOSYSTEM I IN PEA CHLOROPLASTS

S.M. Kochubey, T.A. Kazantsev, V.V. Shevchenko, O.Yu. Bondarenko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Kinetics of oxidation and dark reduction of Photosystem I reaction centers (P700) were measured in pea chloroplasts. Redox changes were induced by light of high intensity which was absorbed by both Photosystem I and Photosystem II. Deconvolution of kinetics traces revealed three components, 0.030, 0.110 and 0.210 s⁻¹, in oxidation and four components, 0.033, 0.045, 0.070 and 0.880 s⁻¹, in dark reduction. Amplitudes of the components were different. The component characteristics have been revealed to be changed after short-term heating of chloroplasts at 25 °C. Comparison of the results with literature data allowed to propose a hypothesis concerning origin of the components. Multi-phase redox kinetics P700 have been related to three Photosystem I complexes localized in various areas of thylakoid system. Two of four components in dark reduction were related to cyclic electron transport in Photosystem I complexes situated in the thylakoid areas contacting with stroma, just in intergranal thylakoids and margins of granal thylakoids. Other two components were proposed to belong to linear electron transport in Photosystem I complexes situated in grana-core and grana-margin regions.

Key words: multi-component kinetics of P700, Photosystem I, thylakoid, chloroplast.