

В. Г. МАСЛОВ

**ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ВЫЖИГАНИЯ ПРОВАЛОВ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ
ФОТОСИНТЕЗА**

Эффект выжигания провалов в неоднородно уширенных спектрах поглощения под действием монохроматического облучения при гелиевых температурах [1, 2], связанный с селективным фотопревращением поглощающих центров, позволяет определять однородные ширины оптических переходов. Одним из основных его применений является исследование времен молекулярных релаксаций [3, 4]. В настоящей работе методом выжигания провалов изучаются релаксации, связанные с первичными процессами преобразования энергии в фотосинтетических реакционных центрах (РЦ). Возможность его применения в данном случае обусловлена тем, что процесс первичного разделения зарядов как в фотосистеме I (ФС I), так и в фотосистеме II (ФС II) может осуществляться при сколь угодно низких температурах, причем необратимо. Первая попытка такого рода была сделана в [5], где исследовались спектральные изменения при монохроматическом облучении суспензии клеток хлореллы при 4,2 К в области поглощения первичного донора электрона в РЦ ФС I (P700). Был обнаружен провал, ширина которого соответствует времени релаксации не менее 12 пс, и приведен ряд фактов и соображений, косвенно свидетельствующих в пользу того, что этот провал обусловлен фотопревращением P700 в результате поглощения света именно этими центрами, а не антенным хлорофиллом. Однако низкое относительное содержание РЦ ФС I затрудняло наблюдение провалов и интерпретацию результатов, отчего все дальнейшие эксперименты выполнялись на специально подобранных мутантных штаммах хламидомонады с естественным обогащением РЦ ФС I или РЦ ФС II. Они были предоставлены нам сотрудниками БиНИИ ЛГУ А. С. Чунаевым и В. В. Тугариновым.

Первичные процессы в ФС I исследовали на штамме 516-3а, у которого отношение хлорофилл *a*/P700 составляет около 25, т. е. в 20 раз превышает относительное содержание В700 в диком типе [6]. Мы обнаружили два различающихся по ширине и форме типа провалов: один в области 695—702 нм (рис. 1,а) и другой — в области 686—696 нм (рис. 1,б). Чтобы получить представление о спектрах поглощения центров, ответственных за образование провалов, были исследованы зависимости максимальной (насыщенной) глубины провалов от длины волны выжигания («спектры выжигаемости»). Положение максимума (698 нм) и форма «спектра выжигаемости» провалов первого типа (рис. 1,в) указывают на то, что за выжигание ответственно фотопревращение P700. По ширине провала обнаружено, что время жизни возбужденного состояния в данном случае превышает 50 пс. Форма и «спектр выжигаемости» провалов второго типа (рис. 1,б,г) свидетельствуют о том, что они обусловлены коротковолновым электрохромным сдвигом энергетического перехода другого компонента РЦ ФС I, имеющего максимум поглощения у 693 нм. Этот компонент, вероятно, тож-

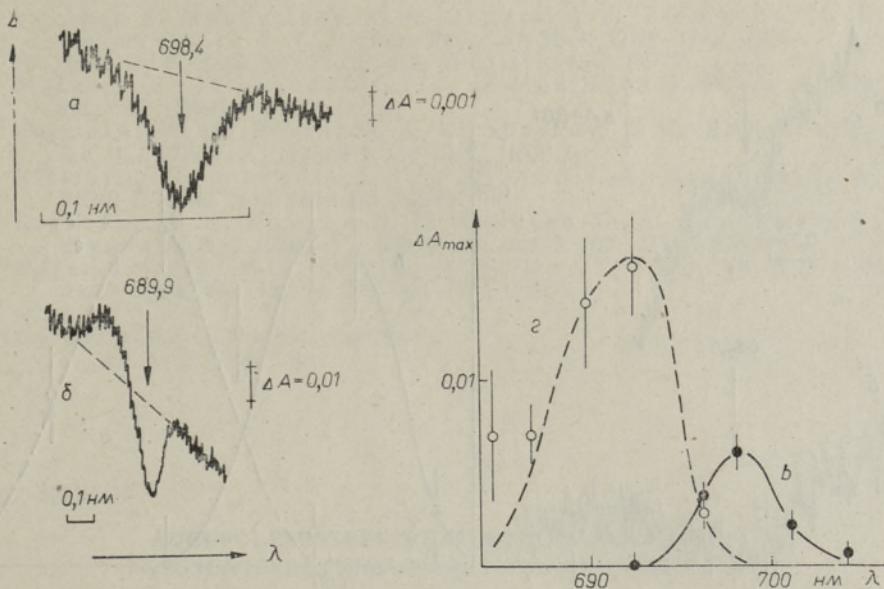


Рис. 1. Фрагменты спектров суспензий клеток *Chlamydomonas reinhardtii* 516-3а при 4,2 К после 8 мин облучения светом 698,4 нм (а) и после 20 мин облучения светом 689,9 нм (б); зависимости максимальной глубины провалов первого (в) и второго (г) типов от длины волны облучения. Полуширина (гауссова) аппаратной функции при выжигании и регистрации — 0,2 нм. Оптическая плотность на длине волны 673 нм составляла 2,1 (а, б) и 1,0 (в, г).

дествен обнаруженному в [7] димеру (или, возможно, мономеру) хлорофилла а с максимумом 695 нм, предположительно, функционирующему как первичный акцептор электрона в РЦ ФС I. Время релаксации возбужденного состояния данного компонента, полученное из ширины провала, составляет $8,6 \pm 0,5$ пс. Эта величина, в предположении, что она определяется скоростью переноса энергии от рассматриваемого компонента РЦ на Р700, дает расстояние между ними около 20 Å.

Первичные процессы в ФС II изучали на штаммах 420/7 и N-154. У первого из них отношение хлорофилл а/Р680 составляет 50—70, у второго — около 200. Для образцов мутанта 420/7 с добавкой феррицианида наблюдали провалы двух типов: первый — в области 678—682 нм (рис. 2,а), а второй — в области 682—688 нм (рис. 2,б). «Спектры выжигаемости» показали, что за провалы первого типа (рис. 2,в) ответственные центры Р680, претерпевающие в результате переноса электрона длинноволновый электрохромный сдвиг, а провалы второго типа (рис. 2,г) обязаны, скорее всего, молекуле феофитина, входящей в состав РЦ ФС II и обычно функционирующей как первичный акцептор электрона [8]. В последнем случае элементарные акты при выжигании провала осуществляются, вероятно, в необычной последовательности: роль первичного донора электрона играет фотовозбужденная молекула феофитина, после чего происходит темновой перенос электрона от Р680 на катион-радикал феофитина, а затем, как обычно, — от вторичного донора на катион-радикал Р680. Образование провала здесь может быть обусловлено электрохромным сдвигом перехода молекулы феофитина. Определенные по ширинам провалов времена релаксаций возбужденных состояний составили $3,8 \pm 0,8$ пс для Р680 и $9,8 \pm 1,5$ пс для феофитина. На образцах штамма 420/7 с добавками дитионита наблюдались провалы, соответствующие только Р680. Отсутствие достоверных провалов в области поглощения феофитина обусловлено, по-видимому, тем, что в данных условиях вторичный акцептор

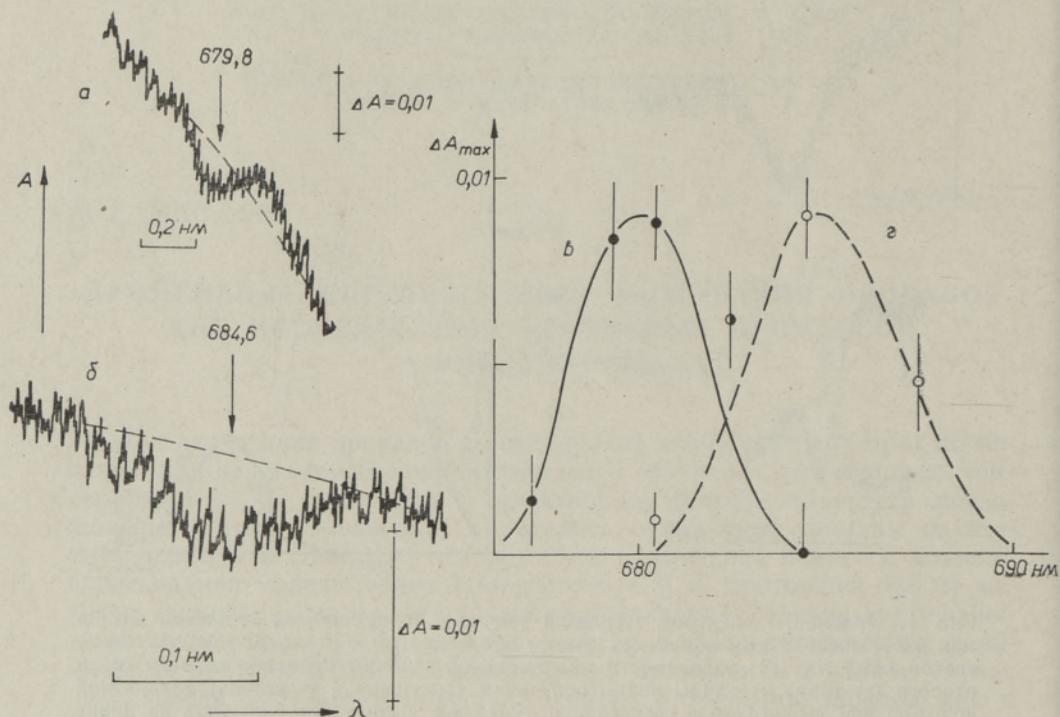


Рис. 2. Фрагменты спектров суспензий клеток *Chlamydomonas reinhardtii* 420/7 при 4,2 К в присутствии 50 мМ феррицианида после 40 мин облучения светом 679,8 нм (а) и 684,6 нм (б); зависимости максимальной глубины провалов обоих типов (в, г) от длины волны облучения. Полуширина аппаратной функции при выжигании и регистрации — 0,036 нм. Оптическая плотность на длине волны 672 нм составляла 1,1.

электрона (Q) восстановлен и перенос электрона от феофитина на него невозможен.

Мутантный штамм N-154, судя по исследованным нами дифференциальным спектрам, не имеет молекулы феофитина в составе РЦ ФС II. У этого штамма наблюдалось выжигание провалов только одного типа и только в присутствии феррицианида. Исследование «спектра выжигаемости» показало, что провалы в данном случае обязаны центрам Р680. Время релаксаций возбужденного состояния последних, определенное по ширине провала, составило при этом 10 ± 2 нс.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что времена релаксаций возбужденных состояний первичных доноров электрона ФС I и ФС II существенно различаются между собой. В этом, по-видимому, проявляются различия в скоростях первичного переноса электрона в этих фотосистемах. К бактериальным РЦ, у которых время первичного фотопереноса электрона составляет единицы пикосекунд [9], оказываются ближе РЦ ФС II, а не РЦ ФС I. Аналогия между РЦ ФС II и бактериальными РЦ в организации системы акцепторов электрона уже отмечалась в [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Гороховский А. А., Каарли Р. К., Ребане Л. А., Письма в ЖЭТФ, 20, вып. 7, 474—479 (1974).
2. Kharlamov, B. M., Personov, R. I., Bykovskaya, L. A., Opt. commun., 12, № 2, 191—193 (1974).
3. De Vries, H., Wiersma, D. A., Phys. Rev. Lett., 36, № 2, 91—94 (1976).

4. Voelker, S., Macfarlane, R. M., Genack, A. Z., Trommsdorff, H. P., van der Waals, J. H., J. Chem. Phys., **67**, № 4, 1789—1765 (1977).
5. Маслов В. Г., Докл. АН СССР, **246**, № 6, 1511—1513 (1979).
6. Маслов В. Г., Чунаев А. С., Тугаринов В. В., Биофизика, **25**, вып. 5, 925—927 (1980).
7. Shuvalov, V. A., Klevanik, A. V., Sharkov, A. V., Kryukov, P. G., Ke, B., FEBS Lett., **107**, № 2, 313—316 (1979).
8. Klimov, V. V., Klevanik, A. V., Shuvalov, V. A., Krasnovsky, A. A., FEBS Lett., **82**, № 2, 183—186 (1977).
9. Клеваник А. В., Крюков П. Г., Матвеев Ю. А., Семчишен В. А., Шувалов В. А., Письма в ЖЭТФ, **32**, вып. 2, 107—111 (1980).
10. Fajer, J., Davis, M. S., Forman, A., Klimov, V. V., Dolan, E., Ke, B., J. Amer. Chem. Soc., **102**, № 23, 7143—7145 (1980).

Государственный оптический институт
им. С. И. Вавилова

V. G. MASLOV

AUGUPÖLETUSSPEKTROSKOPIA RAKENDAMINE FOTOSÜNTEESI PRIMAARPROTSESSIDE UURIMISEKS

Chlamydomonas reinhardtii mutanttüvede reaktsioonitsentrite fotosüsteemide (FS) I ja II primaarsete fotoprotsesside uurimiseks on rakendatud augu põletamist neeldumisspektritesse vedela heeliumi temperatuuril. Identifitseerimaks reaktsioonitsentrite komponente, mis põhjustavad augu teket, määrati augu maksimaalse sügavuse sõltuvus lainepikkusest. FS I-s johtus augu teke P700 fotoooksüdeerumisest ning reaktsioonitsentri komponendi (neeldumismaksimum 693 nm) elektrokromaatilisest nihkest. FS II-s leiti augu põletuse mehhanismid olevat seotud P680 ja feofütiini fotomuundumisega. Aukude laiusest on arvatud vastavad ergastusolekute relaksatsiooniajad.

V. G. MASLOV

APPLICATION OF HOLE-BURNING SPECTROSCOPY TO THE STUDY OF PRIMARY PROCESSES OF THE PHOTOSYNTHESIS

A hole-burning in absorption spectra at helium temperatures has been used for the study of primary photoprocesses in the reaction centers (RC) of photosystems I and II (PS I and PS II) of *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strains. In order to identify the RC components responsible for burning, the maximal hole depth as a function of the burning wavelength has been studied. In studies of PS I a hole has been detected evidently caused by the photooxidation of P700. The relaxation time of P700* evaluated from the hole width is longer than 50 ps. Another hole has been detected, for which the electrochromic shift of the RC component with its absorption maximum at 693 nm can be held responsible. In studies of PS II a hole has been observed corresponding to the photo-reaction of P680 (the excited state relaxation time being 3.8 ps). In the spectral region of 682—688 nm another hole has been found, which is tentatively related to the photo-reaction of pheophytin (primary electron acceptor in RC PS II) as a result of its own light absorption. The excited state relaxation time of pheophytin derived from the hole width is 9.8 ps.