

На правах рукописи

Волгушева Алена Александровна

Влияние серного голодания на первичные процессы фотосинтеза и фотоиндуцированное образование водорода у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*

Специальность: 03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2007

Работа выполнена на кафедре биофизики Биологического факультета
Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Кренделева Татьяна Евгеньевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Балнокин Юрий Владимирович

доктор физико-математических наук, профессор
Кукушкин Александр Константинович

Ведущая организация:

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится 24 мая 2007 г. в 15 ч 30 мин на заседании Совета Д.501.001.96 в
Московском Государственном Университете по адресу: 119992, г. Москва, Ленинские Горы,
МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биофизики, Новая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан 23 апреля 2007 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
Доктор биологических наук,
профессор

Т.Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Способность микроводорослей к светозависимому образованию водорода (H_2) обнаружена более 60 лет назад (Gaffron, Rubin, 1942). Этот процесс связан с активностью гидрогеназ, восстанавливающих протоны до молекулярного водорода. Непосредственным донором электронов для гидрогеназной реакции в зеленых водорослях является ферредоксин, восстановленный фотосинтетической электронтранспортной цепью (ЭТЦ), а обязательным условием - отсутствие O_2 (Biochenko, Hoffmann, 1994), который даже при очень низких концентрациях ингибирует активность фермента (Ghirardi et al., 1997) и подавляет экспрессию ее генов (Harpe, Kaminski, 2002). Механизм выделения H_2 физиологически важен для клеток, он позволяет временно защитить клетку от фотоингибирования и поддержать в неблагоприятных условиях необходимый уровень АТФ (Melis, Harpe, 2001; Harpe et al., 2002; Цыганков, 2007).

В процессе светозависимого образования H_2 на свету микроводорослями важнейшую роль играет ФС2. С одной стороны она обеспечивает гидрогеназную реакцию электронами за счет разложения воды, с другой - выделяющийся O_2 ингибирует активность гидрогеназы. Таким образом возникает проблема разделения стадий выделения O_2 и образования H_2 . Эта проблема была решена при культивировании зеленых водорослей (*C. reinhardtii*) на постоянном свету в замкнутом культиваторе в условиях голодания по сере (Ghirardi et al., 2000; Melis et al., 2000). В процессе инкубации культуры *C. reinhardtii* в условиях серного голодания аэробные условия в культиваторе самопроизвольно сменяются анаэробными, что обусловлено, главным образом, падением скорости фотоокисления воды (образования O_2), в результате постепенной инактивации ФС2. Когда скорость образования кислорода становится ниже скорости дыхания, культура переходит в анаэробные условия с последующей активацией гидрогеназы и образованием H_2 .

Несмотря на то, что этот прием активно используется в биотехнологических целях (Biochenko et al., 2004; Цыганков, 2007), в понимании молекулярных механизмов и принципов регуляции процесса еще много белых пятен. Исследование функции ФС2 при серном голодании может обеспечить дополнительные сведения об изменениях механизмов первичных процессов фотосинтеза и роли ФС2 в регулировании образования H_2 . Но прежде чем изучать процессы, происходящие в клетках в культиваторе, надо понять, что происходит с голодающей по сере культурой в аэробных условиях, когда гидрогеназа неактивна. Одним из источников информации о функциональном состоянии первичных процессов фотосинтеза и активности ФС2 в частности, является флуоресценция хлорофилла *a* (ФХ *a*), зарегистрированная в

различных временных диапазонах (Krause, Weiss 1991; Strasser and Strasser, 1995; Shatz et al., 1998; Lazar, 2006).

Цели и задачи работы. Цель настоящей диссертационной работы состояла в исследовании влияния серного голодания на функциональную организацию первичных процессов фотосинтеза и изучение роли ФС2 в процессах, ведущих к фотообразованию H_2 клетками *C. reinhardtii*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

- Изучить особенности первичных процессов фотосинтеза у голодающей по сере микроводоросли *C. reinhardtii* в аэробных условиях, когда гидрогеназа неактивна.
- Провести анализ первичных процессов фотосинтеза культуры *C. reinhardtii* в замкнутом культиваторе на всех стадиях, предшествующих выделению водорода (аэробную, переход в анаэробноз, анаэробную), и на стадии выделения водорода.
- Используя сайт-специфичные мутанты *C. reinhardtii* D1-R323, исследовать влияние приводящих к уменьшению кислород-выделяющей активности повреждений ЭТЦ на донорной стороне ФС2 на светозависимое выделение H_2 в культиваторе.

Научная новизна. Впервые проведен анализ кинетики затухания флуоресценции, индуцированной пикосекундными лазерными импульсами, у голодающих по сере клеток *C. reinhardtii*. Изучение флуоресценции в разном временном диапазоне позволило показать, что увеличение интенсивности флуоресценции при серном голодании *C. reinhardtii* происходит за счет появления долгоживущих состояний Q_A^- (увеличение вклада медленной, рекомбинационной компоненты). Показано, что серное голодание приводит к перераспределению путей диссипации неиспользованной в фотосинтезе световой энергии: нарушаются процессы тепловой диссипации (нефотохимическое тушение, виолаксантиновый цикл). Обнаруженное нами увеличение выхода флуоресценции связано не с нарушениями взаимоотношений антенна - реакционный центр, а является результатом нарушения электронтранспортных процессов внутри пигмент-белкового комплекса (ПБК) ФС2. Кинетики световой индукции и темновой релаксации флуоресценции позволили выявить нарушения ЭТЦ в голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* не только на акцепторной, но и на донорной стороне ФС2.

Впервые было показано, что голодающая по сере культура *C. reinhardtii* в замкнутом культиваторе переходит в анаэробноз не только в результате уменьшения фотосинтеза, как считалось ранее, но и в результате увеличения скорости дыхания. Методом пикосекундной флуорометрии впервые было показано, что быстрая «скачкообразная» инактивация ФС2 (на фоне медленной) при переходе в анаэробноз связана с резким изменением редокс состояния

пула хинонов. На мутантах *C. reinhardtii* было показано, что светозависимое выделение H_2 клеткам снижается при нарушении электронного транспорта на донорной стороне ФС2. Мутант, лишенный способности разлагать воду, водорода не выделял.

Практическая значимость. Проведенное исследование структурно-функциональных изменений в клетках *C. reinhardtii* при серном голодании в аэробной фазе позволяет лучше понять механизмы, предшествующие образованию H_2 . Результаты, характеризующие функционирование фотосинтетического аппарата при серном голодании в культиваторе, важны для понимания роли ФС2 в процессе фотообразования водорода клетками водорослей *C. reinhardtii* и могут быть основой для разработки методов диагностики состояния культуры в биореакторе, а также для разработки биотехнологических приемов для увеличения выхода H_2 . Результаты работы могут быть полезными при построении моделей, прогнозирующих фотоиндуцированный выход водорода.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на XI и XII международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2005 и 2006» (Москва, 2004, 2005), XVIII Всероссийской конференции «Преобразование энергии света при фотосинтезе» (Пушино, 2005), Международной конференции «Фотосинтез в пост-геномную эру: структура и функции фотосистем» (Пушино, 2006), семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из них: 1 в реферируемом научном российском журнале (из списка ВАК), 1 в реферируемом зарубежном журнале, 1 в сборнике статей международной научной конференции, 5 в тезисах конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на ___ страницах, иллюстрирована ___ рисунками и ___ таблицами. Список литературы содержит ___ источника (из них ___ на английском языке).

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлась культура *Chlamydomonas reinhardtii* Dang c137+, выращенная фотогетеротрофно на трис-ацетат-фосфатной среде, рН 7.0 (Harris, 1989), при 25°C и освещенности $\approx 100 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Дополнительными объектами исследования служили мутанты *Chlamydomonas* у которых R323 на D1 белке заменен на гистидин, аспарат или лизин (D1-R323H, D1-R323D и D1-R323L). **Отмывание культуры от серы** производили путем трехкратного осаждения центрифугированием и ресуспендирования в среде без серы. В

экспериментах по выделению H_2 отмытые от серы клетки помещали в герметично закрытый культиватор и выращивали в течение 96 ч при постоянном перемешивании и освещенности ≈ 80 мкЕ $m^{-2} c^{-1}$. **РАМ-флуорометр** РАМ-2000 («Walz, Effelrich», Германия) использовали для оценки эффективности фотохимического преобразования энергии в ФС2 как в образцах адаптированных к темноте ($F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$), так и на постоянном свете ($\Delta F/F_m' = (F_m' - F_t)/F_m'$) (Sreiber et al., 1995), где F_o - выход флуоресценции в темноте, F_m - выход флуоресценции при насыщающей вспышке света, F_t - на постоянном свете, F_m' - при действии насыщающей вспышки на фоне постоянного света. Нефотохимическое тушение рассчитывали по формуле $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ (Bilger, Björkman, 1990). **Спектры поглощения и спектры испускания** ФХ регистрировали на спектрофотометрах Hitachi-557 и Hitachi-850 (Япония), соответственно. **Кинетики световой индукции** флуоресценции высокого разрешения регистрировали на РЕА-флуорометре (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK) при интенсивности света 1500 мкЕ $m^{-2} c^{-1}$. **ФХ в пико-наносекундном диапазоне** регистрировали с помощью созданного на кафедре биофизики импульсного флуорометра с пикосекундным лазером в качестве источника возбуждающего света ($\lambda = 532$ нм, длительность импульса 30 пс, вторая гармоника Nd:YAG лазера с частотой 1 Гц). **Изменения абсорбции P700⁺** измеряли по изменению поглощения ($\lambda = 830$ нм) с помощью флуорометра РАМ-101 (Walz, Effelrich, Германия) в присутствии 15 мкМ DCMU. **Скорости выделения кислорода и темнового дыхания** измеряли с помощью полярографической ячейки и электрода Кларка. **Регистрацию содержания растворенного O_2** проводили непосредственно в культиваторе с помощью кислородного электрода (МАРК-201, Россия). **Концентрацию H_2** в газовой фазе биореактора измеряли с помощью газового хроматографа ЛХМ-80 с катарометром. **Подсчет клеток** проводили с помощью камеры Горяева. **Содержание хлорофилла** определяли спектрофотометрически (Lichtenthaler, 1987), в этиловом спирте. **Содержание белка** определяли по методу Lowry (1951), **содержание крахмала** - по (Gfeller, Gibbs, 1984). **Содержание глюкозы** определяли с использованием системы глюкозооксидаза-пероксидаза (Barham, Trinder, 1972). **Каротиноидный состав** определяли методом жидкостной хроматографии (HPLC) (Solovchenko et al., 2001) на хроматографе Knauer К-501 (Германия) с детектором К-2501.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние серного голодания на первичные процессы фотосинтеза в аэробных условиях.

Характеристика культуры.

Концентрация клеток в контрольных суспензиях удваивалась за первые сутки после отмыывания и перенесения на новую среду и далее незначительно нарастала. Содержание

хлорофилла (ХЛ) на клетку микроводорослей, а также отношение ХЛ a/b как в контрольных, так и в голодающих по сере клетках в течение 72 часов эксперимента варьировало слабо, что свидетельствует об отсутствии значительных изменений в соотношении содержащих ХЛ фотосинтетических ПБК. В тоже время голодающие клетки увеличивались в размерах, изменяли форму с эллипсовидной (контроль) на округлую, что согласуется с результатами проведенных ранее исследований (Zhang et al., 2002). Изучение жизнеспособности голодающих по сере клеток микроводорослей *C. reinhardtii* показало, что в течение всего эксперимента мертвые клетки в суспензиях отсутствовали.

Исследование состояния фотосинтетического аппарата с использованием модулированной флуорометрии (РАМ).

Величина Fv/Fm , которая характеризует максимальную эффективность фотохимического преобразования энергии в ФС2, при серном голодании существенно снижалась, в отличие от контроля. В голодающих по сере клетках в наших экспериментальных условиях величина Fv/Fm уменьшалась с 0,75 (0 ч) до 0,40 (72 ч). Это согласуется с данными (Wykoff et al., 1998), где показано существенное снижение количества активных реакционных центров и белка D1 РЦ ФС2 в клетках *C. reinhardtii* при серном голодании.

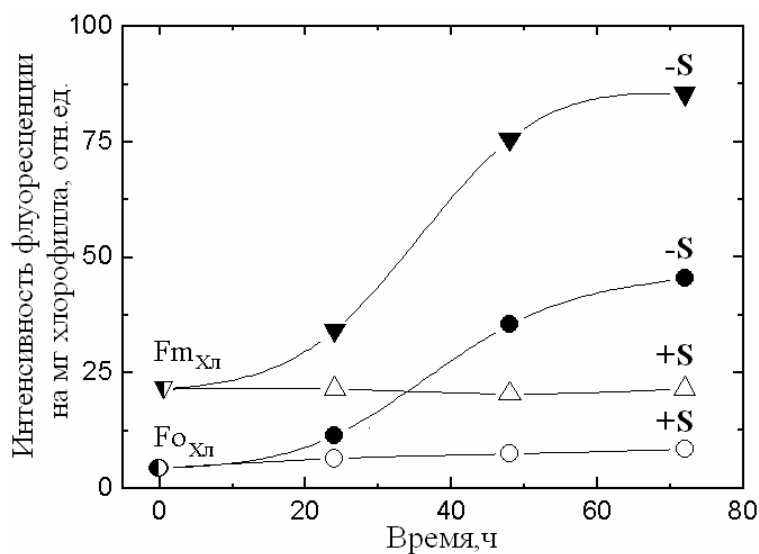


Рис.1. Изменения параметров флуоресценции Fo и Fm (на мг хлорофилла) клеток *C. reinhardtii* на полной среде (+S) и среде без серы (-S).

На рис. 1 приведены изменения интенсивности параметров ФХ (Fo и Fm) в расчете на мг ХЛ (обозначено как $Fo_{Хл}$ и $Fm_{Хл}$) адаптированных в течение 3 мин к темноте контрольных (+S) и голодающих (-S) по сере культур *C. reinhardtii*. У контрольных клеток, как видно из рисунка, интенсивность $Fo_{Хл}$ и $Fm_{Хл}$ за время эксперимента почти не изменяется. Обращает на себя внимание, значительное увеличение $Fo_{Хл}$ и $Fm_{Хл}$ у голодающей по сере культуры.

Увеличение выхода флуоресценции у голодающих клеток четко видно и при измерении спектральных характеристик суспензий водорослей, выравненных по содержанию ХЛ. Полученные спектры дополнительно выравнены по главному максимуму поглощения (683 нм). Как видно из рис. 2, в спектрах поглощения контрольной и голодающей культуры небольшие различия наблюдаются только в области поглощения каротиноидов: 440-460 нм. Интеграл под кривой ФХ в диапазоне 650-770 нм для

голодающих клеток, был почти в 3 раза выше значения, полученного для контрольных образцов, это хорошо согласуется с наблюдаемым увеличением выхода флуоресценции, полученным методом РАМ (рис. 1).

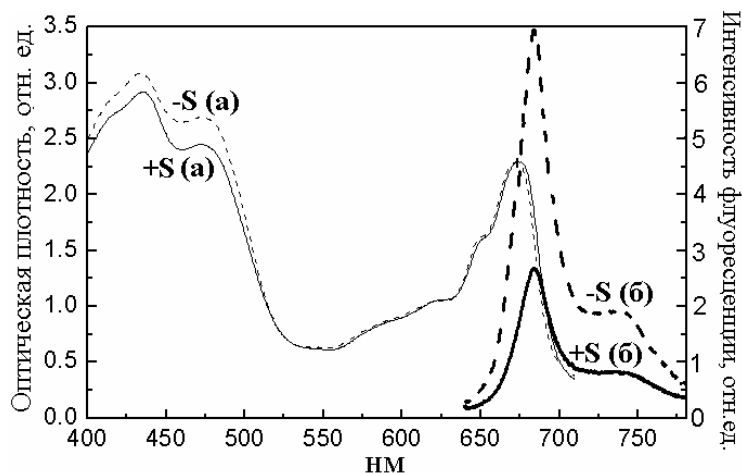


Рис. 2. Спектры поглощения (а) и спектры испускания ФХ (б) суспензий клеток *C. reinhardtii* через 48 ч инкубации на полной среде (+S) и среде без серы (-S).

Увеличение F_0 в данном случае могло бы быть следствием диссоциации части низкомолекулярных антенн от реакционных центров, вызванной частичной деструкцией ФС2 в условиях стресса (Briantais et al., 1996). Однако этим нельзя объяснить увеличение F_m .

Интенсивность ФХ пропорциональна количеству поглощенных квантов света и константе излучательной дезактивации энергии, и обратно пропорциональна сумме констант фотохимической и нефотохимической дезактивации энергии в ФС2 (Рубин, 2004). Параметр F_m характеризует интенсивность флуоресценции в условиях, когда центры ФС2 закрыты, т.е. квантовый выход фотохимической дезактивации возбуждения равен нулю. Поэтому увеличение F_m при недостатке серы может быть связано с уменьшением эффективности тепловой диссипации энергии в ФС2, либо с увеличением сечения поглощения света антенными комплексами этой фотосистемы, что нуждается в проверке.

Нефотохимическое тушение флуоресценции.

Проявлением тепловой диссипации энергии является нефотохимическое тушение (NPQ) и функционирование связанного с ним виолаксантинового цикла. Изучение световой индукции NPQ показало существенные различия между контрольными и голодающими культурами. В кинетике изменения NPQ выделяют три компонента (Müller et al., 2001): быструю q_E , связанную с ΔpH -зависимым ростом тепловой диссипации энергии возбуждения (главным образом в результате накопления антера- и зеаксантина); более медленную q_T , обусловленную перераспределением ССК2 между ФС2 и ФС1 (переходы между состояниями 1 и 2); и самую медленную q_I , отражающую тепловую диссипацию энергии в реакционных центрах ФС2 при

Каковы возможные причины увеличения выхода ФХ при серном голодании? Поскольку величина F_0 как правило, пропорциональна содержанию ХЛ в клетках, небольшое увеличение этого параметра у контроля можно объяснить увеличением количества клеток за время эксперимента. У голодающей культуры мы не наблюдали ни изменения концентрации клеток, ни содержания ХЛ в течение 72 часов эксперимента. Существенное увеличение

фотоингибировании. Характерные времена процессов тушения составляют несколько десятков секунд (qE) и минут (qT), в то время как компонента qI изменяется в течение часов.

На рис. 3 приведены кинетические кривые NPQ при разной интенсивности света. Кинетики световой индукции измеряли при действии постоянного света разной интенсивности (22 и 500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{c}^{-1}$) в течение 10 мин. Предварительно образцы помещали в темноту на 12 ч для исключения вклада qI в тушение флуоресценции. Перед измерением образцы продували аргоном, чтобы перевести фотосинтетический аппарат в состояние 2 и исключить вклад компоненты qT (Delepelaire, Wollman, 1985). Таким образом, регистрируемая нами кинетика NPQ соответствовала развитию qE компоненты.

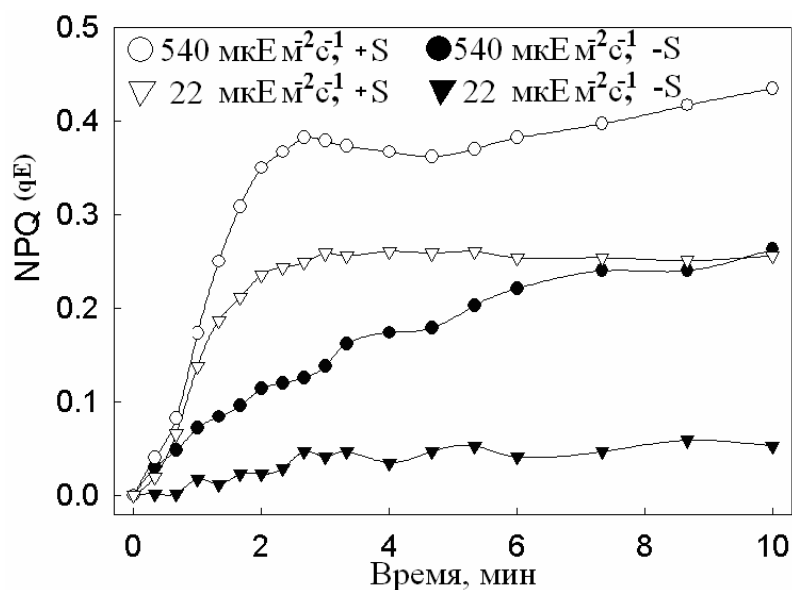


Рис.3. Кинетики индукции нефотохимического тушения флуоресценции клеток *C. reinhardtii* ($NPQ=(Fm-Fm')/Fm$), измеренные через 72 ч инкубации на полной среде (+S) и среде без серы (-S).

Как видно из рис. 3 уровень NPQ при высокой интенсивности света у голодающей культуры существенно ниже, чем у контрольной. При низкой интенсивности света NPQ у голодающей культуры практически не развивается. Таким образом, у голодающей культуры отсутствует вклад быстрой ΔpH -зависимой компоненты qE , что свидетельствует о нарушении тепловой диссипации энергии, связанной с ксантофилловым циклом (Müller et al., 2001). Закисление внутритилакоидного пространства при активном электронном транспорте активирует деэпоксидазу виолаксантина, превращая его в антера- и зеаксантин, который является эффективным тушителем флуоресценции, что, соответственно, вызывает увеличение NPQ. Физический механизм тушения и передачи энергии связан с особенностями электронных уровней этих пигментов. Первое возбужденное синглетное состояние виолаксантина выше, а зеаксантина ниже энергетического уровня хлорофилла. Уменьшение ΔpH при любых нарушениях электронного транспорта активирует эпоксидазу зеаксантина, которая катализирует обратное превращение его в виолаксантин и цикл замыкается (Demmig-Adams, 1990).

Как видно из табл. 1, в контрольных клетках за 15 мин инкубации на свету интенсивностью 540 $\mu\text{E m}^{-2} \text{c}^{-1}$ содержание виолаксантина на моль ХЛ снижалось на 20%, концентрация тушителя флуоресценции зеаксантина увеличивалась. Несмотря на то, что в голодающих

Как видно из рис. 3 уровень NPQ при высокой интенсивности света у голодающей культуры существенно ниже, чем у контрольной. При низкой интенсивности света NPQ у голодающей культуры практически не развивается. Таким образом, у голодающей культуры отсутствует вклад быстрой ΔpH -зависимой компоненты qE , что свидетельствует о нарушении тепловой диссипации энергии, связанной с ксантофилловым циклом (Müller et al., 2001).

клетках каротиноидов (в частности, виолаксантина) больше, чем в контроле, его содержание под действием света не изменялось. Это указывает, что виолаксантиновый цикл не функционирует. Эти данные согласуются с результатами полученными ранее (Wykoff et al., 1998). Более высокое содержание каротиноидов, в частности лютеина и виолаксантина в голодающей по сере культуре может вызывать некоторое увеличение поглощения света антенной, но не может быть основной причиной столь сильного увеличения выхода ФХ. Это предполагает, существование других механизмов, приводящих к увеличению флуоресценции.

Таблица 1. Каротиноидный состав *C. reinhardtii*, определенный через 72 ч инкубации на полной среде (+S) и среде без серы (-S).

Клетки выращивали на свету $100 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и адаптировали к темноте в течение 12 ч. Образцы для определения каротиноидов брали до (Т) и после 15 мин экспозиции на сильном свету интенсивностью $540 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ (С). В- виолаксантин; А- антераксантин; З- зеаксантин.

Условия	В/Хл, ммоль/моль	А/Хл, ммоль/моль	З/Хл, ммоль/моль	(В+А+З)/Хл, ммоль/моль	Лютеин/Хл, ммоль/моль
+S/Т	82	6	3	90	81
+S/С	65	8	16	89	-
-S/Т	94	7	18	118	119
-S/С	98	6	18	122	-

Обратимые переходы ССК между ФС2 и ФС1.

Интенсивность ФХ зависит от количества квантов, поглощенных ФС2, которое может изменяться в результате перераспределения ССК между ФС2 и ФС1 (переходы между состояниями 1 и 2). В состоянии 1 (с высокой флуоресценцией) большая часть ССК находится вблизи ФС2. В состоянии 2 (с низкой флуоресценцией) часть ССК перемещается к ФС1. Этот процесс крайне важен для регуляции распределения энергии возбуждения между фотосистемами, особенно у одноклеточных водорослей, где в нем участвует до 80% ССК, имеющихся в клетке (Delosme et al., 1996). Представляло интерес изучить, в каком состоянии находится ФСА голодающих по сере клеток.

Механизм перехода в состояние 2 заключается в миграции определенной популяции ССК от ФС2 к ФС1 вследствие фосфорилирования полипептида ССК протеинкиназой, активность которой контролируется редокс состоянием переносчиков электронов в цепи между фотосистемами. Когда ЭТЦ между ФС окислена, киназа не активна. После восстановления переносчиков ЭТЦ (белок Риске и цит. f) происходят конформационные изменения в

макромолекуле цитохромного комплекса, что приводит к активации киназы. Активная киназа фосфорилирует треониновые остатки ССК, экспонированные в стромальное пространство хлоропласта (Forsberg, Allen, 2001). Фосфорилированный белок, получивший дополнительный заряд, вследствие электростатических взаимодействий выталкивается из зоны стекинга и перемещается латерально в нестыкованную часть мембраны, где локализована основная часть ПБК ФС1. Обратный переход ССК от ФС1 к ФС2 (состояние 1) происходит после дефосфорилирования ССК, катализируемого фосфатазой, и наблюдается в условиях, когда пул хинонов окисляется (Wollman, 2001).

В эксперименте переходы между состояниями можно индуцировать *in vitro*, изменяя редокс состояние пула хинонов. Так, например, действие высокой интенсивности света или анаэробные условия приводят к восстановлению переносчиков ЭТЦ между фотосистемами и переводят фотосинтетический аппарат в состояние 2 (Delepelair, Wollman, 1985). Обратный переход из состояния 2 в состояние 1 можно инициировать постоянным светом высокой интенсивности в присутствии DCMU, что вызывает окисление пластохинонового пула через ФС1 (Peltier, Schmidt, 1991), либо добавлением на свету DBMIB - ингибитора активности протеинкиназы (Finazzi et al., 2001).

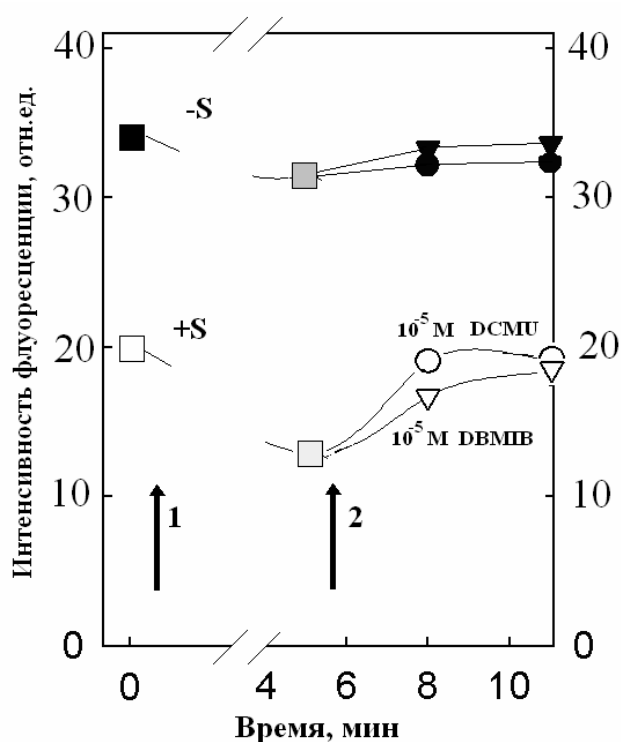


Рис.4 Изменения интенсивности флуоресценции хлорофилла, вызванные переходами между состояниями 1 и 2 в контрольных (+S) и голодающих по сере (-S) в течение 48 ч клетках *C. reinhardtii*.

Как видно из рис. 4, продувание аргоном (стрелочка 1) адаптированных к темноте суспензий микроводорослей *C. reinhardtii* (0 ч) снижало интенсивность ФХ контрольных клеток на 50%, а голодающих – только на 10%. Это позволяет предполагать, что в условиях серного голодания ФСА микроводорослей находится преимущественно в состоянии 2. Добавление (стрелочка 2) на свету 10^{-5} М DCMU (кружки) или 10^{-5} М DBMIB (треугольники) приводило к увеличению интенсивности ФХ суспензий контрольных клеток, в то время как у голодающих клеток изменений не происходило. Таким образом, ФСА голодающих по сере клеток, характеризующихся высоким выходом флуоресценции, тем не менее, находятся преимущественно в состоянии 2.

Индукционные кривые флуоресценции при высокой освещенности.

Для получения кинетик световой индукции флуоресценции с высоким временным разрешением был использован РЕА-флуорометр. В кинетике индукции флуоресценции ХЛ в ответ на свет высокой интенсивности, обычно наблюдается несколько компонент, т.н. О-Ј-І-Р переходы. Они связаны с поступательным снижением фотохимического тушения и развитием нефотохимического тушения флуоресценции в ФС2 (Lazar, 2006). Фаза О-Ј обусловлена светоиндуцированным восстановлением Q_A , тогда как фаза Ј-І-Р отражает, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного Q_A^- , обусловленное снижением его реокисления в результате восстановления Q_B и пула хинонов. Уровни О и Р на кинетической кривой соответствуют величине F_0 и F_m (Heredia, De Las Rivas, 2003; Strasser, 2004).

Как видно из рис. 5 А, увеличение F_0 (О) и F_m (Р) на кинетических кривых голодающих по сере клеток согласуется с представленными ранее результатами на рис. 1. На рис. 5 Б приведены эти же кинетические кривые, нормированные по уровню О, т.е. представленные в виде F/F_0 ($F = F_m - F_0$). Видно, что по мере голодания значительно изменялась форма кривой О-Ј-І-Р, у голодающей культуры не наблюдалось четкого перехода между фазами Ј-І и І-Р. Результаты проведенного ЈР-теста, которые позволяют производить количественный анализ О-Ј-І-Р кинетик (Strasser, Strasser, 1995), показали снижение вклада фотохимической фазы Ј-І-Р, что свидетельствует о нарушении потока электронов от ФС2 в пул хинонов (подробнее об этом в диссертации). Последнее указывает на появление Q_B -невосстанавливающих центров ФС2, неспособных восстанавливать пул хинонов. Об этом же свидетельствует увеличение времени достижения F_m с 215 (0 ч) до 366 мс (72 ч).

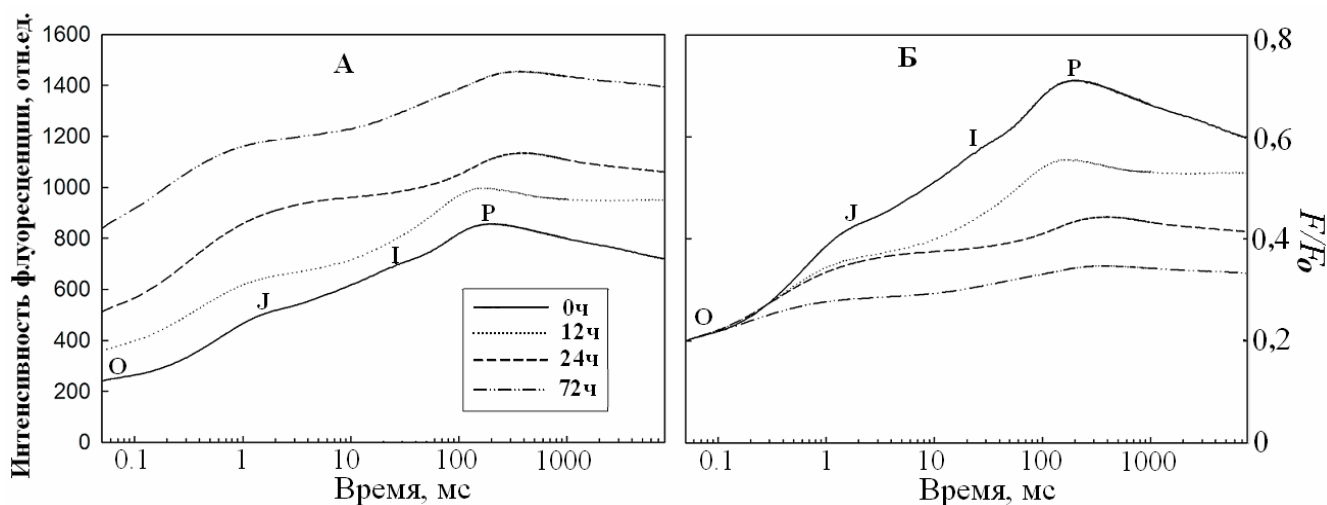


Рис.5. Влияние серного голодания на индукционные кинетики флуоресценции относительно контроля (0 ч), измеренные в клетках *C.reinhardtii*.

А - изменения интенсивности флуоресценции, нормированной по хлорофиллу, Б - по уровню О (F_0), значения флуоресценции представлены как F/F_0 . Переходы О-Ј-І-Р индуцировали актиничным светом интенсивностью $1500 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Измерения проводили после 3 мин инкубации клеток в темноте.

Как видно из рис. 6, при серном голодании скорость роста фазы O-J значительно увеличивалась по сравнению с контролем. Ранее отмечалось, что в условиях стресса, вызванного различными причинами (Lazar et al., 1997a, Ali et al., 2006), на кривых флуоресценции (примерно на 300 мкс) наблюдается резкий переход от фазы O-J к фазе J-I, с образованием «ступеньки» или даже дополнительного пика К (Strasser, 1997). Причины его появления не до конца ясны, однако его связывают с нарушениями на донорной стороне ФС2, в частности в функционировании кислород-выделяющего комплекса (КВК) (Strasser, 1997), вследствие увеличения редокс состояния Q_A (Krieger et al., 1995; Johnson et al., 1995). Этот пик не всегда можно определить визуально, но он четко проявляется, если от контроля отнять опыт (Schmitz et al., 2001). Как видно из рис.6, серное голодание приводит к появлению К-пика, что указывает на повреждение ЭТЦ на донорной стороне ФС2.

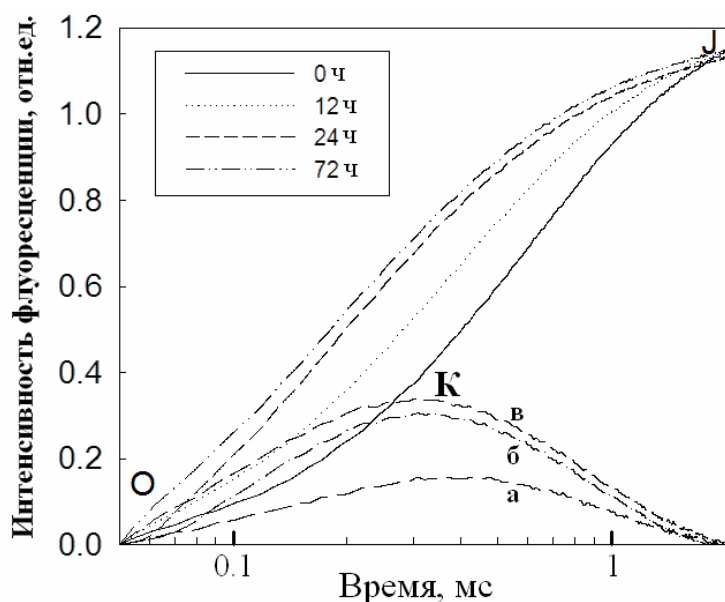


Рис.6. Начальная фаза (O-J) кинетики индукции флуоресценции измеренная в клетках *C.reinhardtii* при серном голодании. Кинетики нормированы по уровням O и J. Кривые а, б, в соответствующие 12, 48 и 72 ч голодания, являются разницей между экспериментальными кривыми и контролем.

снижении скорости этой реакции. Считают, что быстрая и средняя компонента релаксации Fv обусловлены реокислением ФС2 «быстрым» и «медленным» пулом хинонов, которые расположены в гранах и строме, соответственно (Joliot et al., 1992). Согласно нашим данным, амплитуда быстрой компоненты в голодающих клетках была в 1,5 раза ниже по сравнению с контролем, в то время как амплитуда средней компоненты возрастала в 2 раза. Это свидетельствует об уменьшении вклада гранального пула хинонов в окисление Q_B , видимо, вследствие фотоингибирования α -центров ФС2. Содержание Q_B -невозстанавливаемых β -

Об этом же можно судить и по кинетикам релаксации флуоресценции (Fv), измеренным методом РАМ. Известно, что кинетика темнового реокисления Q_A^- тесно связана с реокислением пула хинонов (Comeille et al., 1998).

Медленная компонента в кинетике релаксации Fv отражает рекомбинацию Q_A^- с S2-состоянием КВК (Cao, Govindjee, 1990). В клетках, голодающих по сере в течение 24 ч, амплитуда этой компоненты снижалась почти вдвое, а время жизни увеличивалось от 1570 до 2380 мс, что свидетельствует об уменьшении количества центров ФС2, способных осуществлять рекомбинацию зарядов между S_2 и Q_A^- , и о

центров ФС2 увеличивается при голодании, о чем свидетельствует увеличение амплитуды средней компоненты. Таким образом, в голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* электронный транспорт нарушен как с акцепторной, так и с донорной стороны ФС2.

Пико-наносекундная флуорометрия процессов преобразования энергии света в ФС2 в голодающей по сере культуре *C. reinhardtii*.

Для выяснения природы процессов и понимания механизмов, приводящих к увеличению выхода флуоресценции, нами были изучены изменения кинетик затухания флуоресценции, индуцированной пикосекундными лазерными импульсами у голодающих по сере клеток *C. reinhardtii*. Характерные времена и относительные амплитуды компонент кинетик затухания флуоресценции в пико-наносекундном диапазоне позволяют судить о процессах миграции энергии и переноса электрона в ПБК ФС2 и, таким образом, ответить на вопрос, какие именно этапы нарушаются при недостатке серы (Пащенко, 1990; 2000).

Нами были получены кинетики затухания флуоресценции культуры *C. reinhardtii* на разных стадиях голодания. Измерения проводили на клетках, адаптированных к темноте (3 мин) и после восстановления Q_A в РЦ ФС2 светом в присутствии 10 мкМ DCMU (закрытые РЦ ФС2). Кинетики анализировались в двухэкспоненциальном приближении, как описано (Shatz et al., 1988). Согласно этой модели быстрая компонента кинетики отражает процессы эквilibризации возбужденных состояний в антенне ФС2, миграции возбуждения к P680 и разделения зарядов $P680^*Feo \rightarrow P680^+Feo^-$. Медленная компонента обусловлена процессами прямого переноса электронов от Feo^- к Q_A и обратного с Q_A^- на Feo с последующим возбуждением P680 и излучательной диссипацией возбужденного состояния. В экспериментах с пикосекундным возбуждением флуоресценции в случае адаптированных к темноте клеток, значение площади под кривой затухания флуоресценции ($\varphi_o = \varphi_1 + \varphi_2$) соответствовало значению F_o , в образцах с закрытыми РЦ ($\varphi_m = \varphi_1 + \varphi_2$) соответствовало F_m .

У клеток *C. reinhardtii* при двухкомпонентном разложении кривая затухания флуоресценции в адаптированных к темноте контрольных клетках (0 ч) разлагается на 2 экспоненты с временами порядка 80 и 400 нс с относительными амплитудами порядка 80 и 20%, соответственно. В присутствии диурона, когда увеличивается количество Q_B -невосстанавливающих центров (РЦ закрыты), τ_1 изменяется незначительно, в то время как τ_2 возрастает почти вдвое. Соответственно, флуоресценция ($\varphi_1 + \varphi_2$) возрастает за счет медленной компоненты, главным образом из-за увеличения τ_2 .

Таблица 2. Изменения амплитуды (A) и времени (τ) быстрой (A_1, τ_1) и медленной (A_2, τ_2) компонент кинетик затухания флуоресценции клеток *C. reinhardtii* при инкубации на среде без серы.

φ_1 и φ_2 – вклад быстрой и медленной компонент во флуоресценцию, рассчитанный по формуле: $\varphi_1 = A_1 \cdot \tau_1$ и $\varphi_2 = A_2 \cdot \tau_2$ соответственно. φ_o, φ_m – относительный выход флуоресценции адаптированных к темноте клеток и клеток с закрытыми РЦ ФС2, соответственно.

Клетки, адаптированные к темноте								Клетки с закрытыми РЦ ФС2						
Время, ч	$A_1, \%$	$A_2, \%$	$\tau_1, \text{пс}$	$\tau_2, \text{пс}$	φ_1	φ_2	φ_o	$A_1, \%$	$A_2, \%$	$\tau_1, \text{пс}$	$\tau_2, \text{пс}$	φ_1	φ_2	φ_m
0	80	20	83	393	6972	7860	14832	75	25	95	781	7125	19525	26650
24	75	25	91	504	6825	12600	19425	73	27	94	844	6862	22788	29650
48	74	26	89	611	6586	15886	22472	70	30	96	836	6720	25080	31800
72	72	28	91	628	6552	17584	24136	71	29	98	840	6958	24360	31318

В адаптированных к темноте голодающих по сере клетках затухание флуоресценции замедляется из-за накопления Q_B -невосстанавливающих центров. Как видно из табл. 2, амплитуда (A) и характерное время (τ) быстрой компоненты (A_1, τ_1) изменялись от 84 до 75% и 83 до 91 пс, в первые 24 ч голодания и слабо изменялись в дальнейшем. Относительный выход флуоресценции за счет быстрой компоненты при серном голодании ($\varphi_1 = A_1 \cdot \tau_1$) изменялся незначительно. Некоторое увеличение τ_1 свидетельствует об уменьшении вероятности захвата энергии центрами ФС2, что может быть обусловлено большей восстановленностью Q_A при серном голодании. Следствием этого является снижение скорости первичного разделения зарядов. Анализ медленной компоненты кинетики затухания флуоресценции показал увеличение как A_2 так и значительное увеличение τ_2 , что также связано с накоплением Q_A^- . Вклад медленной компоненты ($\varphi_2 = A_2 \cdot \tau_2$) во флуоресценцию адаптированных к темноте клеток при голодании значительно возрастал в первую очередь в результате увеличения времени жизни (τ_2). В клетках с закрытыми РЦ ФС2 (табл. 2) при серном голодании вклад медленной компоненты во флуоресценцию (φ_2) также изменяется значительно сильнее по сравнению с вкладом быстрой компоненты (φ_1), и также в большей степени за счет увеличения времени жизни (τ_2).

Полученный из пико-наносекундной флуорометрии рост φ_o и φ_m при серном голодании согласуется с описанными выше данными по изменению параметров флуоресценции F_o и F_m , изученных другими методами (РАМ, РЕА). Существенное увеличение F_o в ходе серного

голодания связано с тем, что часть центров ФС2 поддерживается в закрытом состоянии. Это может быть связано с восстановлением пула хинонов электронами из стромы через процесс хлородыхания (Melis et al., 2000). Мы также полагаем, что восстановление пула хинонов при голодании приводит к появлению долгоживущих состояний Q_A^- , а также протонированных Q_AH_2 . Протонированный хинон QH_2 , имея слабое сродство к месту связывания на белке D1, может покинуть его, что сопровождается необратимым ингибированием и повреждением ФС2 (Vass, Styring, 1992).

Увеличение Fm в голодающих по сере клетках позволяет предположить, что при серном голодании отсутствует какой-то процесс, направленный на тушение флуоресценции в хлоропластах контрольных клеток. Таким процессом, например, может быть диссипативный цикл вокруг ФС2 с участием цит.b559. Этот цикл представляет собой обратный перенос электронов от восстановленных первичных акцепторов к окисленному пигменту РЦ P680⁺. Восстановление низкопотенциальной формы цит.b559 сопровождается переходом его в высокопотенциальную форму, которая может донировать электроны на P680⁺ через промежуточный ХЛ Z (Barber, De Las Rivas, 1993; Poulson, Samson, 1995). Таким образом, функционирование диссипативного цикла вокруг ФС2 может привести к повторному открытию центров ФС2 и, следовательно, к уменьшению истинной величины Fm . Показано, что в присутствии восстановителей эффективность работы цикла понижается (Lazar et al., 2005). В голодающих по сере клетках существует избыток восстановителей (Zhang et al., 2002), который может поддерживать цит.b559 в восстановленном состоянии. Это может быть причиной замедления диссипативного цикла и, следовательно, увеличения Fm в условиях серного голодания.

Влияние отсутствия серы в среде на первичные процессы фотосинтеза культуры

***C. reinhardtii* в замкнутом биореакторе.**

В замкнутом биореакторе при постоянном освещении голодающая по сере культура *C. reinhardtii* проходит 5 последовательных фаз: аэробную, стадию поглощения кислорода, анаэробноз, выделение H_2 и стадию деградации клеток (Kosourov et al., 2002). В наших экспериментах (рис. 7 А), фаза выделения кислорода длилась около 10 ч. В это время в культиваторе содержание O_2 повышалось за счет выделения его ФС2. Уменьшение скорости фотосинтеза и увеличение дыхания вследствие серного голодания является причиной снижения концентрации O_2 в культиваторе и перехода культуры в анаэробноз. Скорость выделения O_2 , измеренная с помощью электрода Кларка, за первые 24 ч голодания по сере уменьшалась вдвое (с 185 до 91,8 мкмоль/мг хл ч). В то же время скорость дыхания увеличивалась с 34 до 60 мкмоль/мг хл ч. Увеличение дыхания обусловлено, по-видимому, избытком субстрата. Об этом

свидетельствует увеличение скорости темнового восстановления Р700 (за первые 24 ч серного голодания полувремя увеличивалось с 8,2 до 0,4 с). Начало регистрируемого выделения H_2 было зафиксировано через 9 ч после установления анаэробных условий (рис. 7 А). Общий объем выделившегося газа за 60 ч составлял около 200 мл/л (рис. 7 А). Поскольку используемый нами в этом случае волюмометрический метод не позволяет определять газ, растворенный в жидкости, можно полагать, что процесс выделения водорода начинался раньше. Методом газовой хроматографии было показано, что к 80 ч серного голодания концентрация H_2 в газовом пространстве культиватора составляла около 6 ммол/л.

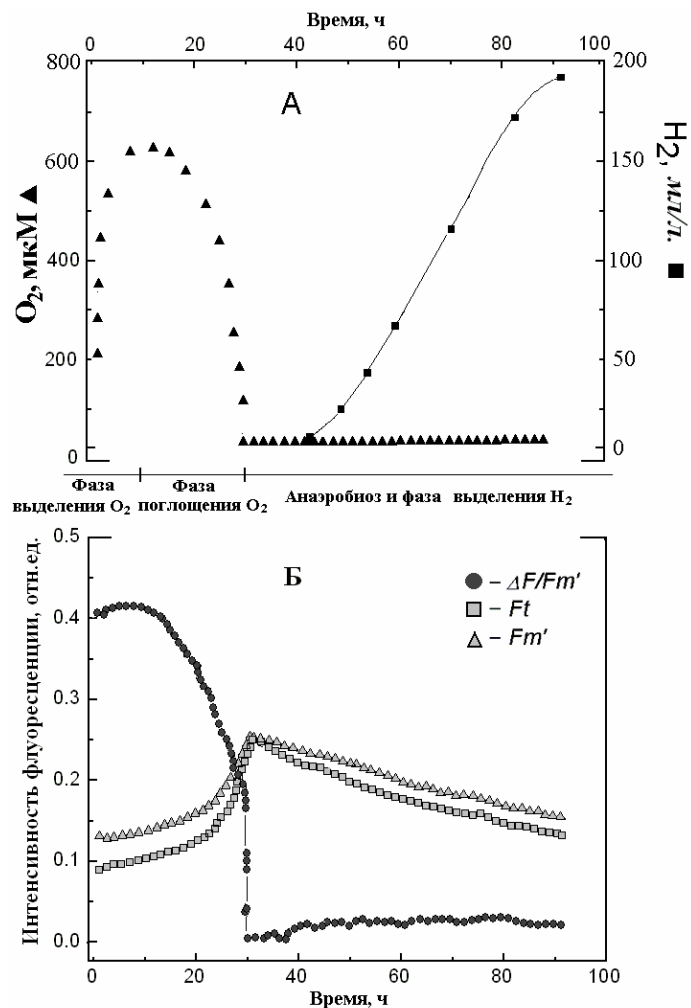


Рис.7. Динамика содержания O_2 , светозависимого выделения H_2 (А) и изменения параметров флуоресценции Ft , Fm' и $\Delta F/Fm'$ (Б) голодающей по сере культуры *S. reinhardtii* в замкнутом культиваторе в течение различных фаз.

величина $\Delta F/Fm'$ и, следовательно, активность ФС2 начинали возрастать, что указывает на участие ФС2 в донировании электронов к ФС1 и далее через ферредоксин к гидрогеназе (фаза выделения H_2). При этом наблюдали постепенное снижение как Ft так и Fm' , что иногда объясняют частичной деградацией клеток (Kosourov et al., 2005). Однако в наших

Регистрация параметров флуоресценции Хл *a* методом РАМ при постоянном освещении непосредственно в культиваторе позволяет выявить изменения активности ФС2 в клетках *S. reinhardtii* на всех стадиях голодания, предшествующих выделению водорода, и на стадии его выделения. Как видно из рис. 7 Б, при переходе культуры в стадию поглощения кислорода, а затем и в анаэробноз Ft и Fm' возрастали.

Увеличение Ft происходило быстрее, чем Fm' , поэтому наблюдаемое уменьшение $\Delta F/Fm'$ происходит главным образом за счет роста Ft . Как отмечалось ранее, на фоне медленного снижения величины $\Delta F/Fm'$ наблюдается быстрое падение этой величины в момент установления анаэробных условий, что свидетельствует о полной инактивации ФС2 (Antal et al., 2003). В наших экспериментах, мы также наблюдали быстрое (минуты) снижение величины $\Delta F/Fm'$ с 0,16 до нуля. Через 9 ч после установления анаэробных условий

экспериментах концентрация хлорофилла в течение всего эксперимента практически не изменялась. Проведенная нами микроскопия голодающих по сере клеток *C. reinhardtii* с помощью флуоресцентного микроскопа показала, что до 70 ч все клетки культуры остаются живыми. Количество флуоресцирующих клеток снижается на 10% только к 120 ч голодания.

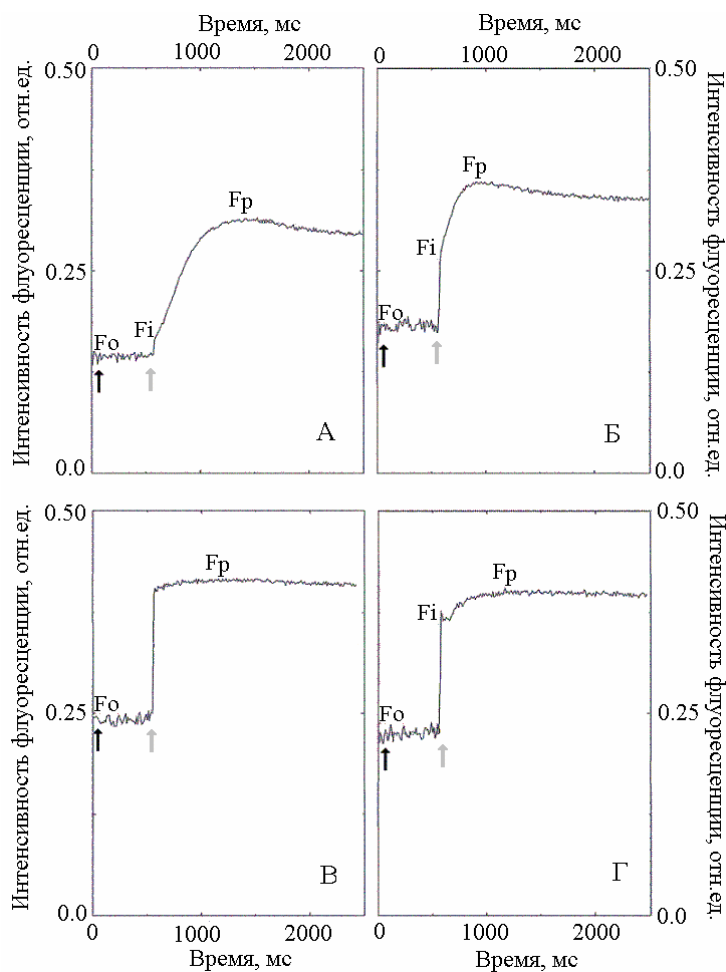


Рис.8. Кинетики световой индукции ФХ суспензии клеток *C. reinhardtii* отобранных из культиватора.

А - контроль, Б – 18 ч серного голодания (фаза поглощения кислорода), В – 32 ч серного голодания (анаэробные условия), Г – 62 ч серного голодания (фаза выделения водорода). Индукционные кривые измеряли после 2 мин адаптации клеток к темноте. Черной и серой стрелкой обозначены включения зондирующего и насыщающего фотосинтез света, соответственно.

счет начинающегося нефотохимического тушения. Время перехода от уровня F_i к F_p кривой флуоресценции определяется скоростью восстановления пластохинонового пула (Krause, Weis, 1991). Оно уменьшалось через 18 ч серного голодания от 1300 до 890 мс (рис. 8 А, Б), поскольку пул хинонов у голодающих клеток более восстановлен. В анаэробной фазе (рис. 8 В) кривая индукции флуоресценции имела только быструю компоненту, так как к этому времени

Нарушения активности ФС2 в фазе поглощения кислорода и небольшое ее восстановление в фазе выделения H_2 подтверждает анализ кинетических кривых индукции флуоресценции клеток *C. reinhardtii*, отобранных анаэробно из культиватора на разных стадиях голодания. В кинетике нарастания флуоресценции как правило, выделяют несколько компонент. Начальная, быстрая компонента (F_0-F_i) обусловлена наличием в ФС2 Q_B -невосстанавливающих центров, медленная (F_i-F_p) - Q_B -восстанавливающих. Максимальный уровень флуоресценции (F_p) определяется восстановленностью пула хинонов, снижение F_p связывают с окислением пула хинонов ФС1 и начинающимся развитием нефотохимического тушения (Lazar et al., 1999).

Как видно из рис. 8 Б, через 18 ч серного голодания значительно увеличивалась доля Q_B -невосстанавливающих центров по сравнению с контролем. У голодающей культуры пока еще, наблюдается снижение максимального уровня флуоресценции за

все центры становятся Q_B -невосстанавливающими. Отсутствие снижения уровня F_p указывает, что к этому времени нефотохимическое тушение отсутствует. В фазе выделения водорода (рис. 8 Г), в отличие от предыдущей фазы, мы наблюдали переход F_i - F_p , который указывает на появление Q_B -восстанавливающих центров. Это так же как и увеличение параметра $\Delta F/F_m'$ при выделении водорода, является результатом оттока электронов от ФС2 при включении гидрогеназной реакции.

Исследование флуоресценции ХЛ a у голодающей по сере культуры *C. reinhardtii* в замкнутом биореакторе в пико-наносекундном временном диапазоне.

Для выяснения природы процессов и понимания механизмов приводящих к быстрому падению $\Delta F/F_m'$ у голодающих по сере клеток *C. reinhardtii* при переходе в анаэробноз нами были изучены изменения кинетики затухания флуоресценции, индуцированные пикосекундными лазерными импульсами. На рис. 9 А приведена часть кривой (полученной методом РАМ), аналогичной той, которая описана на рис. 7 Б и захватывающая фазы от поглощения O_2 до выделения H_2 . По техническим причинам в данном эксперименте в отличие от рис. 7 Б измерения проводились через час, положение «быстрого скачка» точно не определено. Однако видно, что имеет место падение $\Delta F/F_m'$, а затем его увеличение, совпадающее с началом выделения H_2 (30-46 ч).

На образцах, взятых анаэробно из культиватора, после 2 мин адаптации к темноте были исследованы кинетики затухания флуоресценции в пико-наносекундном диапазоне. Как видно из рис. 9 Б, относительный выход флуоресценции быстрой компоненты ($\phi_1 = A_1 \cdot \tau_1$) при переходе в анаэробноз (24-29 ч) незначительно увеличивался. Увеличение ϕ_1 обусловлено увеличением времени жизни быстрой компоненты τ_1 (от 79 пс – 24 ч до 140 пс – 29 ч). Это свидетельствует об уменьшении вероятности захвата энергии центрами ФС2, что, возможно, обусловлено большей восстановленностью Q_A при серном голодании. При переходе из анаэробной фазы (29 ч) в фазу выделения H_2 (30-46 ч) величина ϕ_1 изменялась незначительно.

Относительный выход флуоресценции медленной компоненты ($\phi_2 = A_2 \cdot \tau_2$) при переходе в анаэробноз значительно возрастал. Анализ кинетики медленной компоненты затухания флуоресценции показал увеличение как A_2 (от 32% - 24 ч до 40% – 29 ч) так и значительное увеличение τ_2 (от 496 пс – 24 ч до 615 пс- 29 ч). Обращает на себя внимание тот факт, что падение параметра $\Delta F/F_m'$ (рис. 9 А) и возрастание ϕ_2 совпадают по времени.

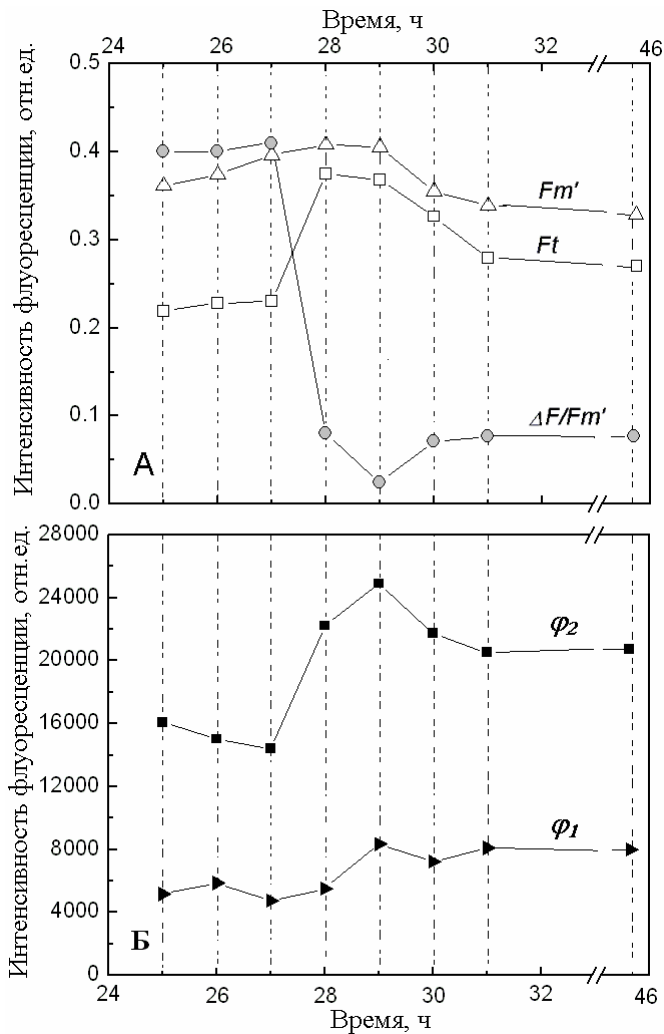


Рис.9. Изменение параметров флуоресценции голодающей по сере культуры *C. reinhardtii* на стадии поглощения O_2 и выделения H_2 , измеренные методом РАМ (А) и с помощью пико-наносекундной флуорометрии (Б).

Кроме того, кривая, отражающая изменения Φ_2 , фактически повторяет кривую отражающую изменения Ft во времени. Оба эти параметра отражают состояние пула хинонов. Таким образом, быстрое функциональное снижение фотохимической активности ФС2 сопровождается возрастанием вклада флуоресценции за счет медленной компоненты. Включение гидрогеназы, о чем свидетельствует увеличение $\Delta F/Fm'$, также отразилось на величине Φ_2 , вклад которой в фазе выделения водорода падает в результате уменьшения времени жизни τ_2 (от 615 пс – 29 ч до 537 пс – 46 ч).

Влияние активности ФС2 на выделение водорода на примере мутантов *C. reinhardtii* с нарушениями в D1-белке.

Использование мутантов *C. reinhardtii* с нарушениями донорной стороны ФС2 дает возможность подойти к изучению влияния активности ФС2 на выход H_2 без применения ингибиторов, действие которых как правило неспецифично. Были использованы мутанты водоросли *C. reinhardtii*, обладающие различной кислород-выделяющей активностью (Макарова и др., 2006) вследствие замещения аргинина на D1 белке в положении 323 (R323) на гистидин (H), аспартат (D) или глутамат (E). Поскольку аргинин 323 локализован на люменальном участке E-субъединицы D1-белка, принимает участие в обеспечении взаимодействия марганцевого кластера КВК с реакционным центром (Ke, 2001), его замена нарушает донирование электронов от воды. Как видно из табл. 3, нарушения в функционировании ФС2 у мутантов проявляются в снижении эффективности преобразования

энергии, что видно по уменьшению величины отношения Fv/Fm . Скорость выделения O_2 у мутантов по сравнению с контролем (pWT) снижалась: у R323H на 40%, R323D на 50% и у R323E на 80%.

Таблица 3. Характеристики культуры мутантов *C. reinhardtii* до удаления серы.

Объект	pWT	R323H	R323D	R323E
Fv/Fm , отн.ед.	0.74 ± 0.02	0.55 ± 0.09	0.34 ± 0.07	0.14 ± 0.10
O_2 , мкмоль $(\text{мг} \cdot \text{Хл})^{-1} \text{ч}^{-1}$	148 ± 21	92 ± 18	74 ± 15	30 ± 15

Для проведения опытов по выделению водорода культуры дикого типа и мутантов были отмыты от серы и помещены в замкнутый культиватор. Вследствие низкой кислород-выделяющей активности, все виды мутантов более быстро переходили в анаэробное состояние по сравнению с диким типом (табл. 4). Однако, у мутантов R323 (H, D) наблюдалось более позднее начало выделения и более низкий общий выход водорода. Культура мутанта R323E, характеризующегося самой низкой кислород-выделяющей активностью, переходила в анаэробное состояние в течение 6 ч, но не была способна к образованию H_2 .

Таблица 4. Характеристики культуры мутантов *C. reinhardtii* в замкнутом культиваторе на среде без серы.

Объект	pWT	R323H	R323D	R323E
Переход в анаэробное состояние, ч	35 ± 3	25 ± 4	12 ± 2	6 ± 2
Начало выделения H_2 , ч	40 ± 3	47 ± 4	60 ± 5	-
Выделено H_2 , мл/л	55 ± 10	20 ± 3	10 ± 2	0

Таким образом, несмотря на то, что время перехода в анаэробноз значительно сокращалось, выход H_2 уменьшался. Полученные данные подтверждают, что для светозависимого выделения водорода клеткам изначально (до удаления серы) необходима функционально активная ФС2.

Влияние добавления серы на параметры флуоресценции и выделение H_2 голодающей культурой *C. reinhardtii* в замкнутом биореакторе.

Поскольку выделение H_2 связано с активностью ФС2 (Antal et al., 2003), можно было предположить, что добавление небольшого количества серы в фазе выделения H_2 позволит частично реактивировать ФС2 за счет ресинтеза белка D1 (Kosourov et al., 2005) и тем самым

увеличить выход H_2 . Серу (до конечной концентрации 1 и 5 мкМ $MgSO_4$ в культиваторе) добавляли после 45 ч серного голодания в фазе выделения H_2 . Параметры флуоресценции измеряли методом РАМ непосредственно в культиваторе при постоянном освещении.

Как видно из рис.10, в контрольном культиваторе (А) к моменту выделения H_2 величина $\Delta F/Fm'$ незначительно возрастала в результате включения гидрогеназной реакции. В опытном культиваторе (Б) после добавления серы (5 мкМ $MgSO_4$ – конечная концентрация) величина $\Delta F/Fm'$ существенно увеличивалась, что свидетельствует о восстановлении активности ФС2. Через 10 ч мы наблюдали падение фотохимической активности ФС2, что скорее всего, связано с потреблением добавленной серы.

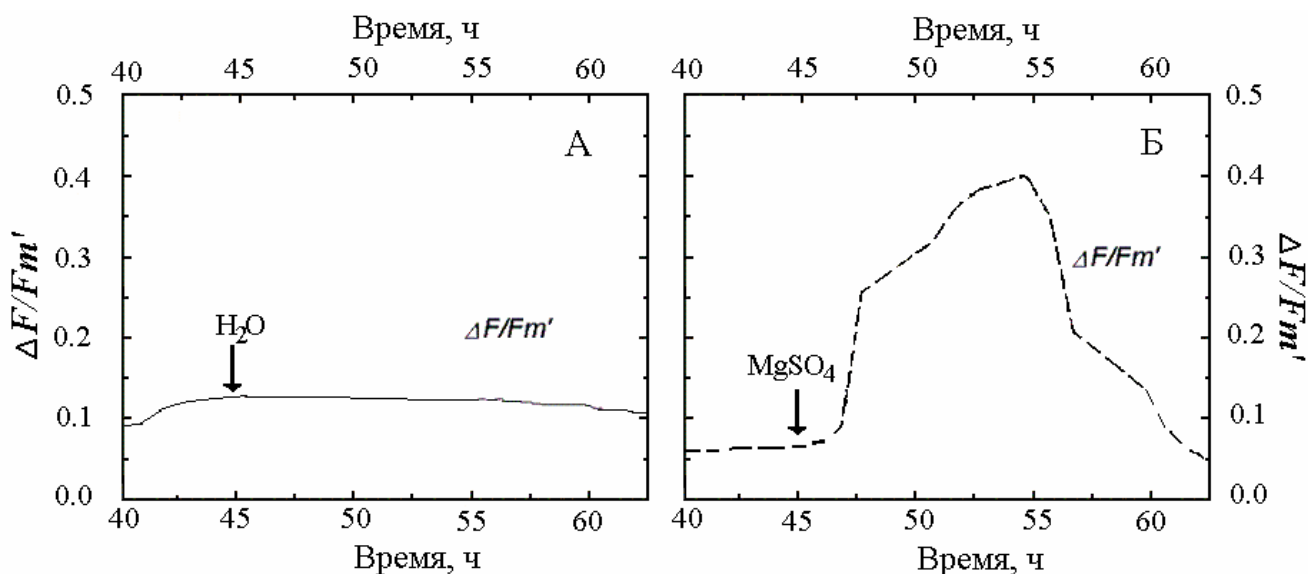


Рис.10. Действие добавления серы в фазе выделения H_2 на параметры флуоресценции голодающей культуры *C. reinhardtii*.

Стрелкой обозначено добавление 90 мкл дистиллированной воды в контрольную культуру (А) и столько же $MgSO_4$ до конечной концентрации 5 мкМ в опытную культуру (Б).

Изучение световой индукции флуоресценции показало, что через 8 ч после добавления серы, индукционная кривая становилась похожей на таковую в аэробной фазе (рис. 8 Б). Через 18 ч после добавления серы, когда фотохимическая активность ФС2 значительно снижалась, индукционная кривая становилась похожей на таковую в анаэробной фазе (рис. 8 В). Видимо, добавленный сульфат к этому времени был полностью израсходован и в культиваторе восстанавливался анаэробно.

Несмотря на то, что добавление серы позволило возобновить электронный поток от ФС2, количество выделенного H_2 , измеренного волюмометрическим методом, было меньше почти на 30%, чем в контроле. Уменьшение количества добавленного сульфата магния в 5 раз не приводило к изменению $\Delta F/Fm'$, однако количество выделенного H_2 по сравнению с контролем снижалось в меньшей степени. Таким образом, добавление серы на стадии выделения H_2

частично возобновляет электронный поток от ФС2, но не приводит к увеличению выхода H_2 . Так как анализатор растворенного в среде O_2 в обоих случаях не показал изменения его содержания в культиваторе, можно предполагать, что выделяющегося O_2 достаточно для инактивации гидрогеназы внутри клетки, но он сразу же расходуется при дыхании, а не выделяется в среду.

Заключение

Полученные результаты показывают, что при голодании культуры *C. reinhardtii* по сере происходит существенное нарушение активности ППФ, хотя содержание ХЛ и количество клеток в суспензии практически не изменяется. Феноменологическая схема организации ППФ в контрольных и голодающих клетках приведена на рис. 11. При голодании имеет место перераспределение между путями диссипации поглощенной световой энергии.

Фотохимическое тушение уменьшается вследствие нарушения электронного транспорта, вызванного повреждением части РЦ как с акцепторной (появление Q_b –невосстанавливающих центров), так и с донорной стороны, на что указывает появление К-пика и замедление темновой релаксации флуоресценции. Пул хинонов перевосстановлен в результате увеличения фонда альтернативных восстановителей и снижения скорости восстановления CO_2 (Zhang et al., 2002). Кроме того, в культиваторе при наступлении анаэробноза инактивируется альтернативная оксидаза.

Снижение эффективности электронного транспорта сопровождается снижением NPQ, главным образом за счет ΔpH -зависимой компоненты qE и нарушения работы виолаксантинового цикла. Эти данные указывают на нарушение процессов тепловой диссипации энергии. Излучательная диссипация, напротив повышается, о чем говорит увеличение выхода флуоресценции в расчете на единицу ХЛ, что показано нами впервые. При одинаковой амплитуде спектров абсорбции света суспензиями клеток выход флуоресценции в голодающих клетках превышал выход флуоресценции в контроле в 2 и более раза, несмотря на то, что ФСА находится в состоянии 2 с низкой флуоресценцией.

Увеличение F_o обычно связывают с нарушением структуры ПБК - отсоединением низкомолекулярной антенны (Briantais et al., 1996), однако этим нельзя объяснить увеличение F_m . Наблюдаемое нами увеличение содержания каротиноидов в голодающих клетках хотя и может несколько увеличить сечение поглощения, однако этого недостаточно, чтобы объяснить увеличение выхода флуоресценции более чем вдвое. Это заставляет предполагать, что при голодании нарушается какой-то процесс, снижающий флуоресценцию в контроле. Таким процессом может быть диссипативный цикл с участием цит. b559. Косвенные данные указывают, что в голодающих клетках создаются восстановительные условия, которые снижают

скорость функционирования этого цикла, конечно в дальнейшем необходимо получение прямых доказательств. Данные пико-наносекундной флуорометрии показывают, что флуоресценция увеличивается, главным образом, за счет вклада медленных рекомбинационных компонент. Мы полагаем, что восстановление пула хинонов при голодании приводит к появлению долгоживущих состояний Q_A^- , а также протонированных Q_AH_2 . Протонированный хинон QH_2 , имея слабое сродство к Q_A -связывающему сайту D2 белка реакционного центра ФС2, может покинуть его, что сопровождается необратимым ингибированием и повреждением ФС2 (Vass, Styring, 1992).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изменения функциональной активности ФС2 и редокс состояния переносчиков электронов играют ключевую роль в переключении фаз, предшествующих фотообразованию и в фазе образования H_2 в голодающих по сере клетках. Так, в аэробной стадии происходит снижение активности ФС2, а поскольку скорость дыхания возрастает, культура переходит в анаэробноз. Затем наблюдается быстрая (в течение минут) обратимая инактивация ФС2, обусловленная увеличением доли Q_B -невосстанавливающих центров ФС2. Активация гидрогеназы в анаэробных условиях увеличивает отток электронов из фотосинтетической ЭТЦ (Appel, Schulz, 1998; Цыганков, 2007), что приводит к реактивации части центров ФС2. Роль ФС2 в процессе фотообразования H_2 не ограничивается только непосредственным донированием электронов через ЭТЦ фотосинтеза для гидрогеназной реакции. Ее функционирование поддерживает линейный электронный транспорт, который обеспечивает восстановление пиридиннуклеотидов, фиксацию CO_2 , накопление крахмала и других метаболитов, входящих в пул альтернативных восстановителей. Наличие такого пула, способного поставлять электроны через пул хинонов и цитохромный комплекс на ФС1, видимо, не является достаточным условием для светозависимого выделения H_2 у *C. reinhardtii*, что подтверждено в экспериментах с мутантами. Возможно, что активирование ФС2 в фазе выделения H_2 существенно снижает циклический электронный транспорт вокруг ФС1, конкурирующий с гидрогеназной реакцией за электроны. Это предположение согласуется с данными по повышенной скорости выделения H_2 мутантом *C. reinhardtii* с нарушенным циклическим транспортом вокруг ФС1 (Kruse et al., 2005б).

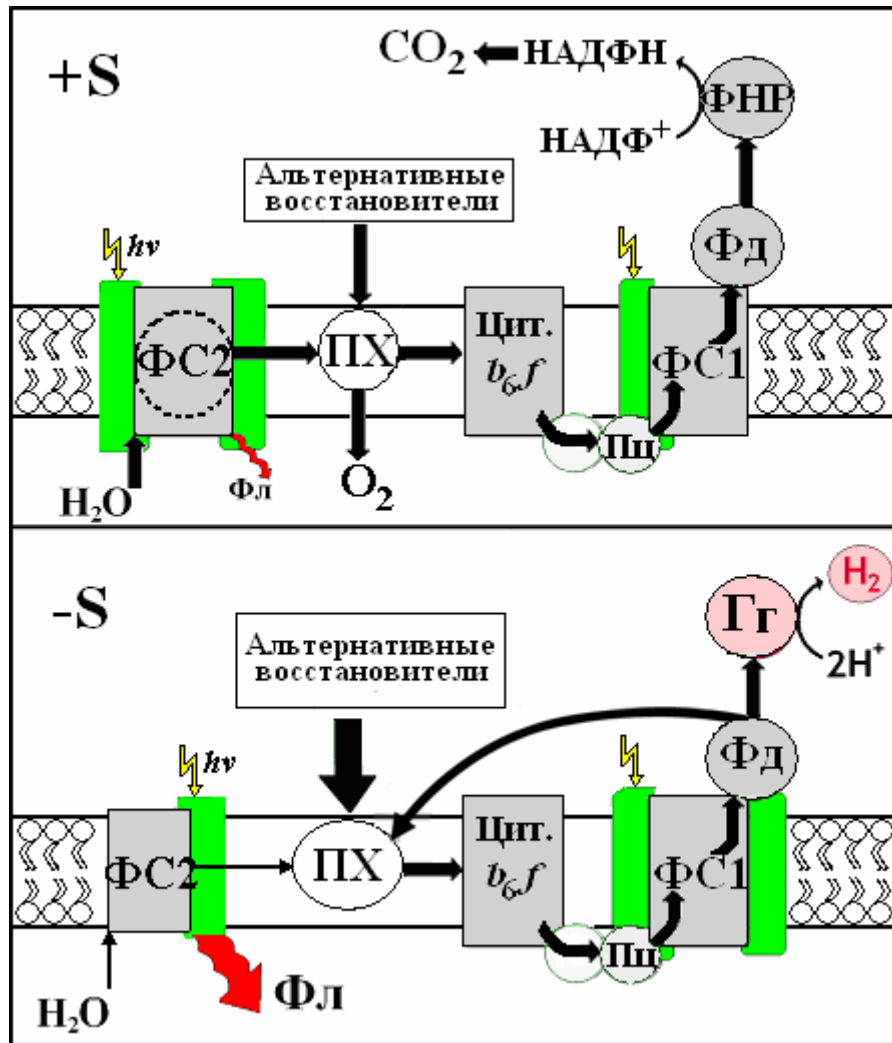


Рис. 11. Схема организации первичных процессов фотосинтеза в мембранах тилакоидов контрольной (+S) и голодающей по сере (-S) культуры зеленой микроводоросли *C. reinhardtii*.

Пунктирным кольцом обозначен возможный циклический поток электронов. Обозначения: ПХ - пул хинонов; цит. b_6/f - цитохромный b_6/f комплекс; ФД - ферредоксин; ФНР - ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктаза; ГГ - гидрогеназа;

Выводы

1. Изучение флуоресценции хлорофилла в разных временных диапазонах позволило показать увеличение выхода флуоресценции при серном голодании клеток *C. reinhardtii*. Серное голодание приводит к образованию закрытых центров ФС2 в результате появления долгоживущих состояний Q_A^- . Изучение кинетики затухания флуоресценции ХЛ *a* свидетельствует о том, что увеличение выхода флуоресценции связано не с изменениями взаимоотношений антенна-реакционный центр, а является следствием нарушения электротранспортных процессов.
2. Анализ кинетик индукции и затухания флуоресценции хлорофилла показал, что у голодающих по сере клеток *C. reinhardtii* увеличивается содержание Q_B -невозстанавливаемых центров, а также имеет место нарушение ЭТЦ на донорной стороне ФС2.
3. У голодающих по сере клеток *C. reinhardtii* значительно нарушаются процессы тепловой диссипации энергии, в частности обнаружено снижение компонента q_E нефотохимического тушения и нарушение функционирования виолаксантинового цикла.
4. Показано, что голодающая по сере культура *C. reinhardtii* в замкнутом культиваторе переходит в анаэробноз в результате не только снижения скорости фотосинтеза, но и увеличения скорости дыхания.
5. Быстрая инактивация ФС2 в замкнутом культиваторе при переходе в анаэробноз сопровождается ростом Ft , отражающей восстановленность пластохинонового пула. Как показано методом пико-наносекундной флуорометрии, это связано с увеличением вклада рекомбинационной компоненты (ϕ_2) флуоресценции.
6. При культивировании в замкнутом культиваторе мутантов *C. reinhardtii* (D1 – R323), характеризующихся пониженной скоростью выделения кислорода, показано, что время перехода в анаэробноз уменьшается, однако, выделение водорода наступает значительно позднее и его выход уменьшается. Таким образом, для светозависимого выделения водорода клеткам необходима функционально активная ФС2.

Список работ опубликованных по теме диссертации:

1. Волгушева А.А. Фотохимическая активность фотосистемы 2 голодающих по сере микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* в связи с выделением фотоводорода. Тезисы докладов XI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2004». М.: МАКС Пресс. 2004. С 24-25.
2. Макарова В.В., Косоуров С.Н., Ghirardi M., Seibert M., Волгушева А.А., Кукарских Г.П., Кренделева Т.Е. Фотовыделение водорода клетками мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* (D1-R323H, D, E) с разной активностью фотосистемы 2 // Сборник статей международной научной конференции "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем". Минск. Беларусь. 2004. Часть 1. С. 66-68.
3. Волгушева А.А. Влияние серного голодания на активность ФС2 в микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Тезисы докладов XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005». М.: МАКС Пресс. 2005. С. 51.
4. Волгушева А.А., Антал Т.К., Тусов В.Б. Серное голодание вызывает увеличение квантового выхода флуоресценции хлорофилла в *Chlamydomonas reinhardtii*. XVIII Пушкинские чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция «Преобразование энергии света при фотосинтезе». М.: НИА – Природа. 2005. С. 75-77.
5. Загидуллин В.Э., Волгушева А.А. Пико-наносекундная флуорометрия процессов преобразования энергии света в ФС2 *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях серного голодания. Тезисы докладов XIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». М.: МАКС Пресс. 2006. С. 92-93.
6. Антал Т.К., Волгушева А.А., Кукарских Г.П., Кренделева Т.Е., Тусов В.Б., Рубин А.Б. Исследование изменений параметров флуоресценции хлорофилла в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях серного голодания. // Биофизика. 2006. Т.51. Вып.2. С. 292-298.
7. Antal T. K., Volgusheva A.A., Kukarskih G. P., Bulychev A. A., Krendeleva T.E. and Rubin A. B. Effects of sulfur limitation on photosystem II functioning in *Chlamydomonas reinhardtii* as probed by chlorophyll a fluorescence. // Physiologia Plantarum. 2006. V. 128. P. 360–367.
8. Zagidullin V.E., Volgusheva A.A., Antal T.K., Korvatovsky B.N., Krendeleva T.E., Paschenko V.Z., Rubin A.B. Influence of the sulfur deprivation on the chlorophyll fluorescence kinetics properties of the *Chlamydomonas reinhardtii* cells.// International Meeting «Photosynthesis in the Post-Genomic Era: Structure and Function of Photosystems» М.: NIA-Nature. 2006. P. 221.