

На правах рукописи

Тюняткина Анна Анатольевна

**Электрогенные реакции в пигмент-белковом комплексе фотосистемы 2**

Специальность: 03.00.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2007

Работа выполнена в отделе биоэнергетики НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук  
Мамедов Махир Джафар оглы

Официальные оппоненты: доктор химических наук  
Надточенко Виктор Андреевич

доктор биологических наук  
Нокс Пётр Петрович

Ведущая организация: Институт фундаментальных проблем биологии  
РАН

Защита состоится «25» октября 2007 г. в 14 ч 00 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 «\_\_» сентября 2007 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного Совета  
доктор биологических наук,  
профессор

Т.Е. Кренделева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одной из основных проблем современного естествознания является изучение молекулярных механизмов фотосинтеза. Основным итогом фотохимической стадии преобразования энергии света при окисленном фотосинтезе является фотоперенос электронов от воды к НАДФ<sup>+</sup> за счет нециклического транспорта электронов при последовательном участии пигмент-белковых комплексов фотосистемы 2 (ФС 2), цитохромного *b<sub>6</sub>f* комплекса и фотосистемы 1, локализованных в тилакоидных мембранах цианобактерий, водорослей и высших растений. Фотосинтетическое окисление воды является важнейшим фундаментальным процессом, глобальный масштаб которого (при ярком солнечном свете ФС 2 окисляет около 100 молекул воды в секунду) и его значимость в круговороте веществ в природе трудно переоценить (Tommos, Babcock, 2000). Однако вследствие сложной организации и лабильности кислород-выделяющего комплекса (КВК) остается неясным молекулярный механизм функционирования его ключевых этапов.

Значительный прогресс в изучении комплекса ФС 2 был связан с проведением рентгеноструктурного анализа (РСА) кристаллов сердцевинных комплексов (СК) ФС 2 из двух термофильных цианобактерий *Thermosynechococcus elongatus* и *Thermosynechococcus vulcanus* с разрешением 3,8-3,0 Å (Kamiya and Shen, 2003; Ferreira et al. 2004; Loll et al. 2005). Комплекс ФС 2 представляет собой димер, каждый мономер которого содержит 19 отдельных белковых субъединиц (16 интегральных и 3 периферических) и 77 кофакторов. Хлорофилл-содержащие светособирающие антенные белки CP43 и CP47, входящие в состав СК ФС 2, передают энергию возбуждения к реакционному центру (РЦ), который состоит из двух псевдогомологических субъединиц D1 и D2 и содержит кофакторы, участвующие в электрон-транспортной цепи. В комплексе ФС 2 связаны воедино одноэлектронный процесс переноса электрона между первичным донором электрона P<sub>680</sub> и хинонным акцептором Q<sub>A</sub> с последующим восстановлением P<sub>680</sub><sup>+</sup> от редокс-активного аминокислотного остатка тирозина-161 (Y<sub>Z</sub>) D1-субъединицы, двухэлектронное восстановление вторичного хинона Q<sub>B</sub> ( $2 Q_B + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2 Q_B H_2$ ) и четырехэлектронное окисление молекулы воды ( $2 H_2O \rightarrow O_2 + 4e^- + 4 H^+$ ).

Одной из наиболее актуальных проблем в изучении функционирования этого ферментного комплекса является выяснение физико-химического механизма сопряжения переноса электронов и протонов в железо-хинонном акцепторном комплексе. Другой актуальной проблемой, имеющей большое значение для выяснения механизма фотоллиза воды, является изучение реакции переноса электрона на донорной стороне ФС 2. Исследования с помощью прямого электрометрического метода, проводимые на протеолипосомах, содержащих комплексы ФС 2, позволяют выявить кинетики и относительный вклад отдельных электрогенных реакций в суммарный электрогенез в ответ на единичные вспышки света. А сами протеолипосомы могут служить хорошей моделью для изучения механизмов внутрибелкового переноса заряда.

**Целью настоящей работы** явилось выяснение молекулярных механизмов образования трансмембранной разности электрических потенциалов ( $\Delta\Psi$ ), генерируемой комплексом ФС 2 в модельной системе с помощью прямого электрометрического метода. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. выделить препараты СК ФС 2 с активным и неактивным (лишенным марганцевого кластера (-Mn)) КВК с последующим включением их в липосомальную мембрану;
2. изучить образование мембранного потенциала, обусловленного переносом зарядов на акцепторном участке ФС 2 с активным КВК;
3. изучить образование мембранного потенциала, обусловленного переносом электронов в присутствии таких редокс-медиаторов, как N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД), 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ) и метиленовый синий (МС) в препаратах СК ФС 2 (-Mn).

**Научная новизна работы.** Показано, что протеолипосомы, содержащие препараты СК ФС 2, в которых КВК расположен вблизи наружной поверхности протеолипосомальной мембраны, являются удобной моделью для исследования механизма образования  $\Delta\Psi$  с помощью электрометрии.

В условиях реконструкции функции  $Q_B$  на акцепторном участке ФС 2 в ответ на вторую вспышку света было продемонстрировано наличие дополнительной электрогенной фазы, обусловленной протонированием дважды восстановленной

формы  $Q_B$ . Максимальная амплитуда данной фазы составляет  $\sim 11\%$  от быстрой фазы  $Y_Z^{OK}Q_A^-$ .

Установлено, что электрогенная реакция восстановления окисленного негемового железа, ( $Fe_{Ht}^{3+}$ ), наблюдаемая в ответ на первую вспышку света, обусловлена переносом протона из внешней водной фазы к неидентифицированному аминокислотному остатку X вблизи  $Fe_{Ht}$ .

Впервые на протеолипосомах, содержащих СК ФС 2, лишенные марганцевого кластера, было продемонстрировано наличие электрогенной стадии, обусловленной векторным переносом электрона от редокс-медиаторов (ТМФД и ДХФИФ) к редокс-активному тирозину  $Y_Z^{OK}$ . Эти данные свидетельствуют об электроизолированной локализации  $Y_Z$  внутри белкового гетеродимера D1/D2.

**Научно-практическая значимость работы.** Полученные в работе данные вносят вклад в решение фундаментальной проблемы изучения механизмов переноса зарядов в мембранных энергопреобразующих белках, а также могут являться основой для создания искусственных систем, преобразующих и запаасающих солнечную энергию, в том числе осуществляющих фотолиз воды с образованием водорода и кислорода. Кроме того, эти результаты могут найти применение при изучении светозависимого синтеза АТФ в системе бесклеточного синтеза белка и при тестировании эффективности гербицидов.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на IV съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), на 13<sup>ой</sup> Европейской биоэнергетической конференции (Пиза, Италия, 2004), на юбилейной конференции, посвященной 70-летию В.П. Скулачева «Российская Биоэнергетика: от молекул к клетке» (Москва, 2005), на Московском городском семинаре по биоэнергетике (2005, 2006, 2007), на 3<sup>ей</sup> и 4<sup>ой</sup> Всероссийских школах-симпозиумах «Динамика и структура в химии и биологии» (Черноголовка, 2005, 2006), на 14<sup>ой</sup> Европейской биоэнергетической конференции (Москва, 2006), на Международной конференции «Фотосинтез в пост-геномную эру: структура и функции фотосистем» (Пушино, 2006), на Международной конференции «Солнечная энергия и искусственный фотосинтез» (Лондон, Великобритания, 2007), а также на семинарах фотобиологического общества России и кафедры биофизики биологического факультета МГУ (Москва, 2007).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из них: 1 в реферируемом научном российском журнале (из списка ВАК), 1 в реферируемом зарубежном журнале и 7 в тезисах конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на \_\_\_\_ страницах текста и включает \_\_ таблицы и \_\_ рисунка. Список литературы содержит \_\_ источника (из них \_\_\_\_ на английском языке).

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве **объекта исследования** были использованы препараты СК ФС 2 с активным комплексом окисления воды (Ghanotakis et al., 1987), выделенные из листьев шпината. Выбор объекта, прежде всего, обусловлен тем, что данные препараты характеризуются минимальным субъединичным составом, сохраняющим способность к выделению кислорода. **Степень очистки** ферментного комплекса ФС 2 контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. **Скорость выделения кислорода** измеряли полярографически с использованием закрытого электрода Кларка. Препараты **СК ФС 2 (-Mn)** были получены путем инкубации образцов в присутствии 0,8 мМ Tris-HCl (pH 9,0) в течение 30 мин при комнатной температуре с последующей отмывкой и центрифугированием (Albrink et al., 2002). **Содержание марганца** в препаратах СК ФС 2 определяли с помощью пламенно-абсорбционного спектрометра ААС КВАНТ-2А (Россия). **Липосомы** были получены путем озвучивания суспензии азолектина (L- $\alpha$ -лецитин, тип II-S, Sigma) в среде, содержащей 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5) и 2% холат натрия с помощью дезинтегратора УЗДН-2Т до просветления. **Протеолипосомы** были приготовлены путем смешивания фосфолипидных везикул с препаратами СК ФС 2 в соотношении липид:белок 50:1 по весу. Удаление детергента осуществлялось на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной соответствующим буфером. Для **реконструкции вторичного хинонного акцептора Q<sub>B</sub>**, в раствор липида добавляли децил-пластохинон dPQ (2,3-диметил-5-децил-1,4-бензохинон). **Кинетику генерации  $\Delta\Psi$**  на мембранах протеолипосом, содержащих СК ФС 2 с активным КВК и СК ФС 2 (-Mn), регистрировали при помощи прямого электродметрического метода (Семенов и др.,

2004). Суть метода сводится к встраиванию замкнутых белково-липидных везикул в коллодиевую пленку (нитроцеллюлоза в амилацетате), пропитанную раствором фосфолипидов в декане и регистрации  $\Delta\Psi$  при помощи хлорсеребряных макроэлектродов, погруженных в раствор по обе стороны от искусственной липидной мембраны. Время разрешения измерительной системы составляет 0,1 мкс. В качестве **источника возбуждающего света** использовали вспышки неодимового YAG лазера (YG-481 Quantel, длина волны 532 нм, полуширина импульса 15 нс, энергия вспышки 30 мДж/см<sup>2</sup>). **Кинетический анализ сигналов** проводили с помощью пакета программ Pluk (разработан Я. Калайдзидис (Kalaidzidis et al., 1997), а также программы Origin 6.0 (Microcal, США).

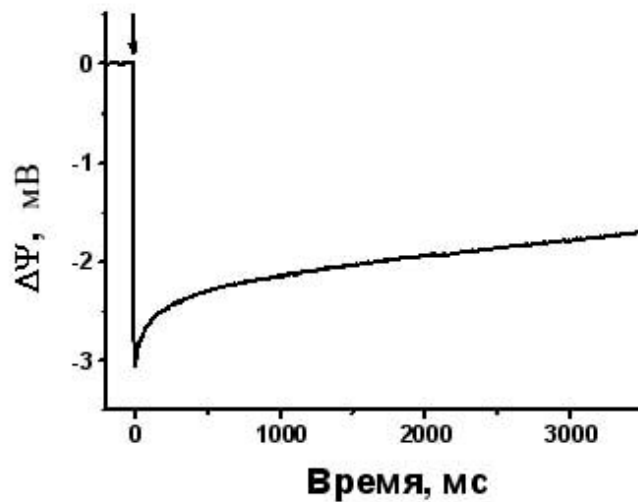
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разделение зарядов в ФС 2

На рис. 1 показан типичный электрический ответ протеолипосом, содержащих препараты СК ФС 2, индуцированный вспышкой лазера. Видно, что в ответ на вспышку света происходит быстрое нарастание электрического потенциала за время более короткое, чем временное разрешение измерительной установки (~0,1 мкс). Как было показано ранее (Мамедов, 1999), наблюдаемое быстрое образование  $\Delta\Psi$  обусловлено разделением зарядов между «специальной парой» молекул хлорофилла  $P_{680}$  и хинонным акцептором  $Q_A$  с последующим восстановлением фотоокисленного  $P_{680}^+$  от редокс-активного тирозина  $Y_Z$ . Судя по знаку фотоэлектрического ответа («минус» внутри протеолипосом), КВК расположен вблизи наружной поверхности протеолипосомальной мембраны. Отсутствие влияния непроникающего через мембрану восстановителя дитионита натрия на амплитуду фотоэлектрического ответа указывает на то, что в протеолипосомах СК ФС 2 практически полностью ориентированы акцепторным участком во внутрь везикулы. Такие протеолипосомы представляют собой удобную модель для исследования электрогенных реакций КВК, активность которого можно стабилизировать глицинбетаином.

Медленный спад фотоэлектрического ответа обусловлен переходом из состояния  $S_2Q_A^-$  в состояние  $S_1Q_A$  ( $S_2/S_1$  – состояния окисления марганцевого кластера КВК), для которого типичные времена жизни составляют порядка нескольких секунд при комнатной температуре (Rappaport et al., 2002). В протеолипосомах, содержащих препараты СК ФС 2 с неактивными КВК,

фотоэлектрический ответ имеет более быстрый спад (см. рис. 9) и определяется, в основном, рекомбинацией заряда между  $Q_A^-$  и  $Y_Z^{ок}$  в ответ на единичные вспышки света.



**Рис. 1.** Образование трансмембранной разности электрических потенциалов в протеолипосомах, содержащих СК ФС 2 с активным КВК. Среда инкубации содержала 20 мМ HEPES–NaOH (pH 7,0), 15 мМ NaCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Здесь и далее стрелкой указан момент лазерной вспышки.

Следует отметить, что в образцах с активным КВК в присутствии добавленного акцептора электронов 2,5-дихлор-*n*-бензохинона амплитуда быстрой кинетически неразрешаемой фазы  $\Delta\Psi$  в ответ на третью вспышку света оказалась на ~10% меньше, чем амплитуда в ответ на первую вспышку (не показано). Таким образом, в используемых препаратах протеолипосом в ~90% ФС 2 восстановление  $Y_Z^{ок}$  происходит за счет переноса электронов от КВК.

### Электрогенное восстановление вторичного хинонного акцептора $Q_B$

Одной из наиболее актуальных проблем в изучении функционирования комплексов ФС 2 является выяснение физико-химического механизма сопряжения процессов переноса электронов и протонов в хинонном акцепторном комплексе в ходе двухэлектронного каталитического цикла восстановления вторичного акцептора  $Q_B$ .

Ранее с помощью электрометрического метода на протеолипосомах, содержащих ФС 2 из шпината (Hook, Brzezinski, 1994) и из цианобактерий *Anacystis nidulans* (Mamedov et al., 1994) было продемонстрировано, что протонирование дважды восстановленной формы  $Q_B$  сопровождается появлением дополнительной



фазы в кинетике генерации  $\Delta\Psi$  с амплитудой  $\sim 5\%$  от фазы  $Y_Z^{OK}Q_A^-$ . Однако оставался неясным вопрос, почему электрогенная «хинонная» фаза в комплексах ФС 2 имеет значительно меньшую амплитуду, чем аналогичная фаза, наблюдаемая в хроматофорах и РЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий ( $\sim 20\%$  от  $P^+Q_A^-$ ) (Semenov, 1991; Shinkarev et al., 1993). Поэтому представлялось необходимым исследовать механизм генерации мембранного потенциала, обусловленный функционированием хинон-акцепторного комплекса в препаратах СК ФС 2 из шпината с активным КВК.

При выделении препаратов СК ФС 2 происходит экстракция  $Q_B$  (Ghanotakis et al., 1987). Однако, как было показано ранее, функция  $Q_B$  может быть в значительной степени восстановлена добавлением экзогенного хинона (Mamedov et al., 1999). Возможность реконструкции функции вторичного хинона  $Q_B$  в протеолипосомах, содержащих СК ФС 2, позволила нам с помощью прямого электрометрического метода изучить реакции переноса заряда на акцепторном участке. Известно, что пластохинон (PQ) и децил-пластохинон (dPQ) имеют близкие значения среднеточечных потенциалов ( $E_m$ ) и  $pK$ , но dPQ является более гидрофильным и имеет больший коэффициент распределения в системе вода–липид (Rich, Harper, 1990). Для реконструкции функции  $Q_B$  в декановый раствор фосфолипидов был добавлен dPQ ( $\sim 30$  мг/мл).

На рис. 2 показаны фотоэлектрические ответы, индуцированные первой (А) и второй (Б) лазерными вспышками, на адаптированных к темноте протеолипосомах, содержащих СК ФС 2 в условиях реконструкции переноса электрона от  $Q_A$  к  $Q_B$ . Быстрая фаза, наблюдаемая под действием как первой, так и второй вспышек света, соответствует разделению зарядов между  $P_{680}$  и  $Q_A$  с последующим восстановлением  $P_{680}^+$  от  $Y_Z^{OK}$  (Мамедов и др., 1999). Как видно на рис. 2Б в кинетике фотоэлектрического ответа на вторую вспышку появляется дополнительная электрогенная фаза. Разность между кинетическими кривыми фотоответов, индуцированных первой и второй вспышками, приведена на рис. 2В. Амплитуда данной электрогенной фазы максимальна при временном интервале между двумя вспышками до 5 с. При дальнейшем увеличении интервала амплитуда этой фазы снижается, и разница в амплитудах ответов на первую и вторую вспышки исчезает (данные не приведены). Максимальная амплитуда дополнительной фазы с

характерным временем  $\tau \sim 0,85$  мс при рН 7,3 составляет  $\sim 11\%$  от величины быстрой фазы фотоэлектрического ответа, обусловленной образованием  $Y_Z^{OK}Q_A^-$ . Эта фаза исчезает при добавлении 5 мкМ диурона, являющегося ингибитором переноса электрона от  $Q_A$  к  $Q_B$  (не показано).

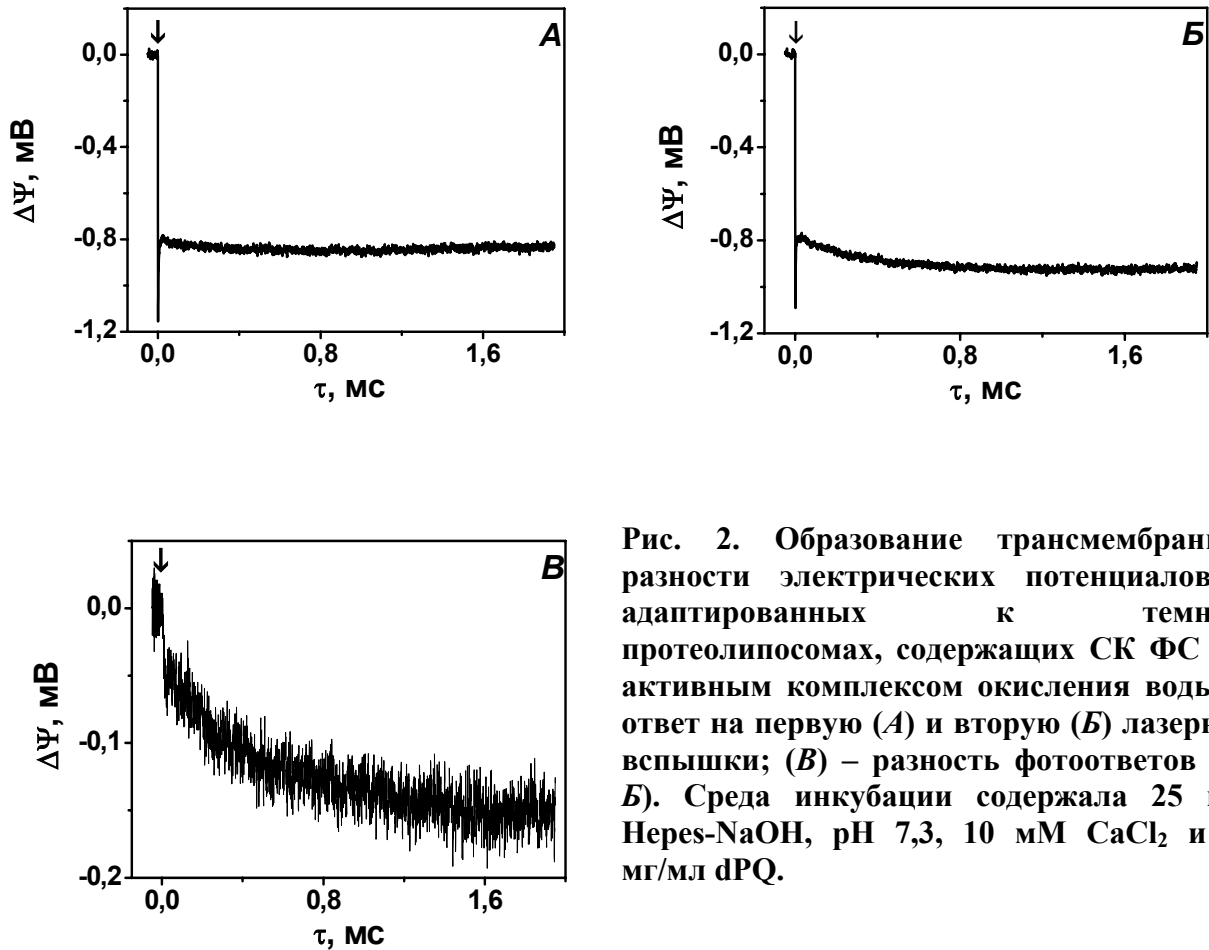


Рис. 2. Образование трансмембранной разности электрических потенциалов в адаптированных к темноте протеолипосомах, содержащих СК ФС 2 с активным комплексом окисления воды, в ответ на первую (А) и вторую (Б) лазерные вспышки; (Б) – разность фотоответов (А–Б). Среда инкубации содержала 25 мМ Hepes-NaOH, рН 7,3, 10 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 30 мг/мл dPQ.

На Рис. 3 представлена зависимость величины дополнительной электрогенной фазы от концентрации dPQ. По сравнению с хроматофорами фотосинтезирующих бактерий (Shinkarev et al., 1993) для полной реконструкции функции вторичного хинонного акцептора в ФС 2 необходима бóльшая концентрация хинона. Возможной причиной этого могут быть различные значения констант связывания убихинона-10 и dPQ с сайтом  $Q_B$  в бактериальных РЦ и РЦ ФС 2, соответственно. Максимальная амплитуда электрогенной «хинонной» фазы достигается при концентрации dPQ свыше 25 мг/мл.

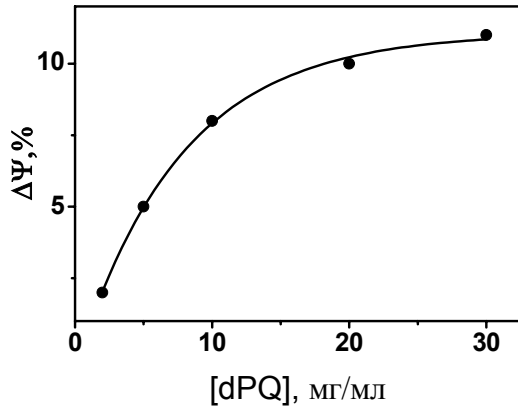


Рис. 3. Зависимость амплитуды электрогенной «хинонной» фазы от концентрации добавленного dPQ. Условия эксперимента как на рис. 2.

На Рис. 4А представлена зависимость амплитуды «хинонной» электрогенной фазы от pH. Амплитуда данной фазы составляет ~11% от амплитуды быстрой фазы, связанной с образованием  $Y_Z^{OK}Q_A^-$  в интервале pH от 6,0 до 8,1 и резко уменьшается при дальнейшем повышении pH. Такое изменение амплитуды может объясняться уменьшением константы равновесия суммарного процесса восстановления, протонирования и диссоциации хинона после второй вспышки света (Shinkarev, Wraight, 1993).

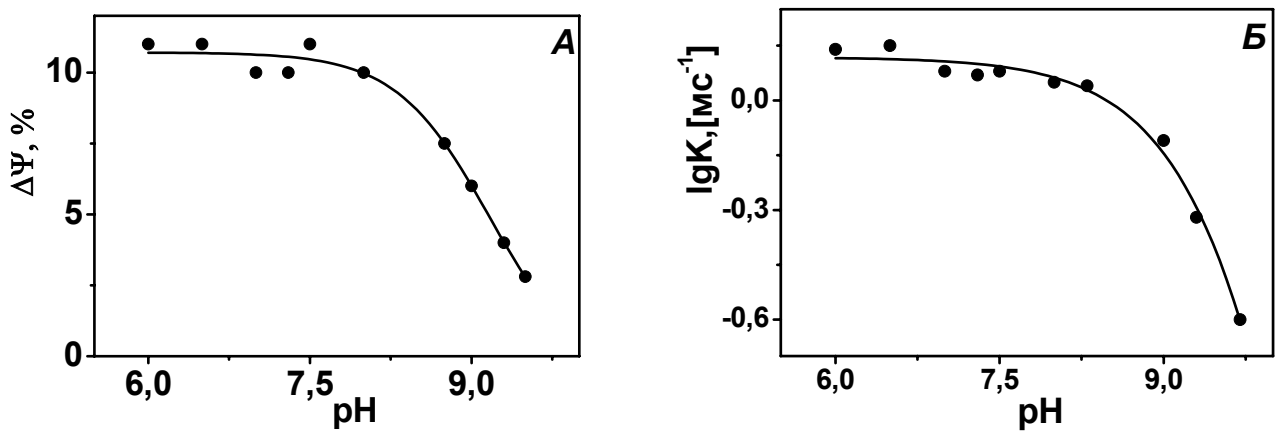


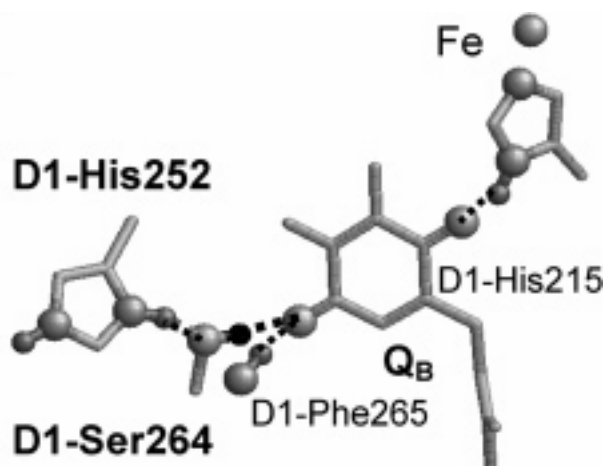
Рис. 4. Зависимость от pH амплитуды (А) и константы скорости ( $k = 1/\tau$ ) (Б) «хинонной» электрогенной фазы. Амплитуда представлена в процентах от амплитуды фазы, обусловленной образованием  $Y_Z^{OK}Q_A^-$ . Среда инкубации содержала 10 мМ  $CaCl_2$ , 30 мг/мл dPQ и соответствующий буфер со значением рК в области задаваемого pH.

Зависимость логарифма константы скорости ( $k=1/\tau$ ) электрогенного протонирования  $Q_B^{2-}$  от pH среды инкубации показана на Рис. 4Б. В интервале значений pH от 6,0 до 8,3 скорость реакции слабо зависит от pH, в то время как при дальнейшем повышении pH наблюдается ее значительное замедление. Появление такой зависимости в щелочных условиях свидетельствует о том, что при высоких

значениях pH лимитирующей стадией в образовании дополнительной фазы является перенос протона из водной фазы.

Таким образом, чувствительность дополнительной электрогенной фазы к диурону, зависимость ее амплитуды от номера вспышки света, а также зависимость амплитуды и константы скорости от pH свидетельствуют о том, что наблюдаемая в ответ на вторую вспышку света фаза обусловлена протонированием дважды восстановленной формы  $Q_B$  в комплексах ФС 2. При этом реакция переноса электрона между хинонами  $Q_A^-$  и  $Q_B$  неэлектрогенна, хотя образование  $Q_B^-$  может быть сопряжено с такими электрогенными процессами как: (1) поглощение протонов аминокислотными остатками, расположенными вблизи поверхности белка РЦ; (2) перераспределение протонов внутри белка РЦ; (3) смещение заряженных аминокислотных остатков при конформационных изменениях в белке (Okamura et al., 2000). Полученные нами результаты показывают, что сайт связывания  $Q_B$  погружен вглубь гидрофобной фазы белка, и протонирование дважды восстановленного  $Q_B$  (~11% от  $Y_Z^{ок}Q_A^-$ ) сопряжено со связыванием  $H^+$ -ионов из наружной водной фазы.

В соответствии с моделью, описанной в работе (Xiong et al., 1996), гидрокарбонат, являющийся лигандом для негемового  $Fe^{2+}$  на акцепторном участке ФС 2, может выступать в качестве донора первого протона для  $Q_B^{2-}$  через интермедиат D1-H252, а молекула связанной воды, в свою очередь, может донировать второй протон на  $Q_B^{2-}$ .



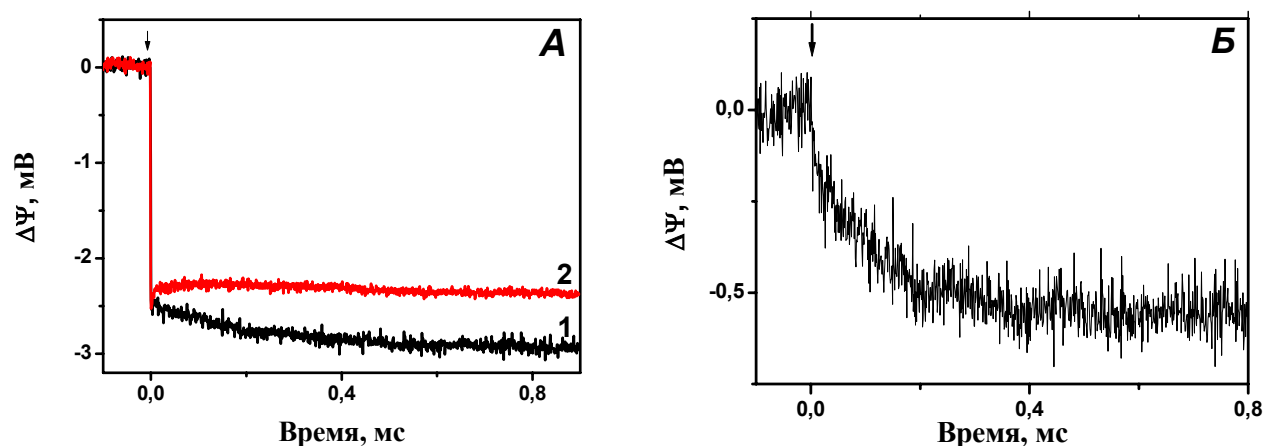
**Рис. 5. Гипотетические водородные связи в сайте связывания  $Q_B$  (Ishikita, Knapp, 2005).**

Согласно данным РСА, в комплексах ФС 2  $Q_B$  локализован в глубине полости белка и, в отличие от бактериальных фотосинтетических РЦ, окружен исключительно гидрофобными аминокислотными остатками (Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005).

Расположение ближайших аминокислотных остатков указывает на возможное участие His252 и Ser264 D1-субъединицы в реакции протонирования  $Q_B^{2-}$  (Рис. 5). В работе (Ishikita, Knapp, 2005) было предположено, что захват протона из внешней водной фазы происходит с участием His252, а Ser264 переносит протон к дистальному кислороду  $Q_B$ .

### **Связанный с протоном перенос электрона между первичным хинонным акцептором $Q_A^-$ и окисленным негемовым железом $Fe^{3+}$**

В комплексах ФС 2 семихиноны  $Q_A^-$  и  $Q_B^-$  находятся в магнитном взаимодействии с негемовым железом ( $Fe_{\text{Ht}}^{2+}$ ), локализованным между ними (Fufezan et al., 2005). Однако роль железа в переносе электрона между  $Q_A$  и  $Q_B$  не выяснена. В ФС 2 негемовое железо может окисляться в темноте в присутствии феррицианида калия (Diner, Petrouleas, 1987; Diner et al., 1991). В этих условиях в ответ на первую вспышку света восстановление  $Fe^{3+}$  от  $Q_A^-$  сопровождается захватом одного протона из внешней водной фазы (Bögershausen, Junge, 1995). При этом, как перенос электрона, так и транспорт протона в ФС 2 могут иметь либо электрогенный, либо неэлектрогенный характер. Измерения электрохромного сдвига полос поглощения каротиноидов при инкубации тилакоидов в присутствии феррицианида калия показали, что в ответ на первую вспышку света, помимо быстрой фазы, обусловленной образованием  $Y_Z^{ok}Q_A^-$ , в субмиллисекундном временном диапазоне появляется дополнительная электрогенная фаза (Naumann et al., 1995). На основании полученных данных был сделан вывод о том, что электрогенными реакциями являются как перенос электрона между  $Q_A^-$  и  $Fe^{3+}$ , так и захват протона из внешней водной фазы (Naumann et al., 1995). Однако это предположение требовало строгого экспериментального доказательства. Дополнительная генерация мембранного потенциала в ответ на первую вспышку света, обусловленная восстановлением негемового железа, была также продемонстрирована на протеолипосомах, содержащих комплексы ФС 2 (Mamedov et al., 2000). Нашей целью было выявить природу данной дополнительной электрогенной фазы, то есть установить обусловлена ли она переносом электрона на  $Fe^{3+}$  или протонированием близлежащего аминокислотного остатка. Для этого нами было изучено влияние замены  $H_2O$  на  $D_2O$  и температуры на кинетику электрогенной фазы, связанной с восстановлением  $Fe^{3+}$ .

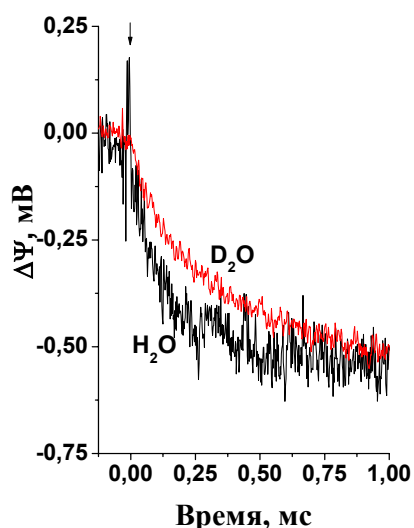


**Рис. 6.** Образование трансмембранной разности электрических потенциалов в адаптированных к темноте протеолипосомах, содержащих СК ФС 2 с активным КВК в ответ на первую (1) и вторую (2) лазерные вспышки (А); разность фотоответов (1–2) (Б). Среда инкубации содержала 20 мМ НЕРЕС-NaOH (рН 7,0), 10 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,4 М сахарозы и 1 М глицинбетаина. Интервал между вспышками 1 с.

На Рис. 6А показан электрический сигнал в ответ на первую (1) и вторую (2) лазерные вспышки в адаптированных к темноте СК ФС 2 в присутствии 2 мМ феррицианида калия внутри протеолипосом. В этих условиях  $Q_A^-$  восстанавливает  $Fe^{3+}$  между вспышками и стабилизируется в ответ на вторую вспышку света. В ответ на первую вспышку света в кинетике фотоэлектрического ответа помимо быстрой фазы, обусловленной образованием  $Y_Z^{OK}Q_A^-$ , появляется дополнительная электрогенная фаза в субмиллисекундном диапазоне (кривая 1), в то время как эта фаза отсутствует в ответ на вторую (кривая 2) и последующие (данные не приведены) вспышки света.

Дополнительная электрогенная фаза, индуцированная первой лазерной вспышкой, наблюдается после 10 мин темновой адаптации образца. Известно, что негемовое железо, локализованное на акцепторном участке, окисляется в минутном временном диапазоне (Renger et al., 1987). Разница между фотоответами на первую и вторую вспышки света показана на Рис. 6Б и характеризуется временем  $\sim 0,1$  мс при рН 7,0. Амплитуда дополнительной электрогенной фазы, обусловленная восстановлением негемового железа  $Fe^{3+}$  от  $Q_A^-$ , составляет  $\sim 20\%$  от амплитуды компоненты, соответствующей разделению зарядов  $Y_Z^{OK}Q_A^-$ . Несколько большее значение амплитуды аналогичной фазы наблюдалось в тилакоидах ( $\sim 30\%$ ) с помощью измерения электрохромного сдвига полос поглощения каротиноидов (Naumann et al., 1995). Такое расхождение, по-видимому, может объясняться различием в

используемых образцах и методах измерения. Добавление в среду инкубации диурана подавляет дополнительную фазу генерации  $\Delta\Psi$  в ответ на первую вспышку (не показано). Аналогичные результаты были получены на тилакоидах (Naumann et al., 1995; см. также Wraight, 1985). Отсутствие дополнительной электрогенной фазы в присутствии диурана может объясняться структурными изменениями вокруг  $Q_A$ , появление которых, вероятно, предотвращает связывание протонов белковым окружением (Naumann, Junge, 1994). Как упоминалось выше, восстановление окисленного негемового железа сопровождается захватом протона (Bögershausen, Junge, 1995). В этих условиях выброс протона на донорной стороне фермента в ответ на первую вспышку света блокируется (Renger et al., 1987). Кинетика дополнительной электрогенной фазы аппроксимируется одной экспонентой (рис. 6Б). Это указывает либо на сопоставимые значения скоростей электронного и протонного транспорта при фотоиндуцированном восстановлении  $Fe^{3+}$ , либо на незначительный вклад одной из этих компонент в общий электрогенез. Для выяснения природы субмиллисекундной электрогенной компоненты кинетика генерации  $\Delta\Psi$  изучалась в условиях изотопного замещения  $H_2O$  на  $D_2O$  (рис. 7).



**Рис. 7.** Влияние изотопного замещения  $H_2O$  на  $D_2O$  на дополнительную электрогенную фазу, обусловленную восстановлением окисленного негемового железа. Фотоэлектрические ответы нормированы по амплитуде быстрой электрогенной фазы.

При этом быстрая фаза, обусловленная разделением зарядов  $Y_Z^{OK}Q_A^-$ , не изменилась, а дополнительная электрогенная фаза замедлилась примерно в 2.5 раза. Подобные эффекты наблюдались для некоторых протон-зависимых этапов переноса заряда в КВК ФС 2 (Karge et al., 1997), бактериальных РЦ (Maroti, Wraight, 1997) и для цитохромоксидазы (Siletsky et al., 2004). Полученное значение изотопного

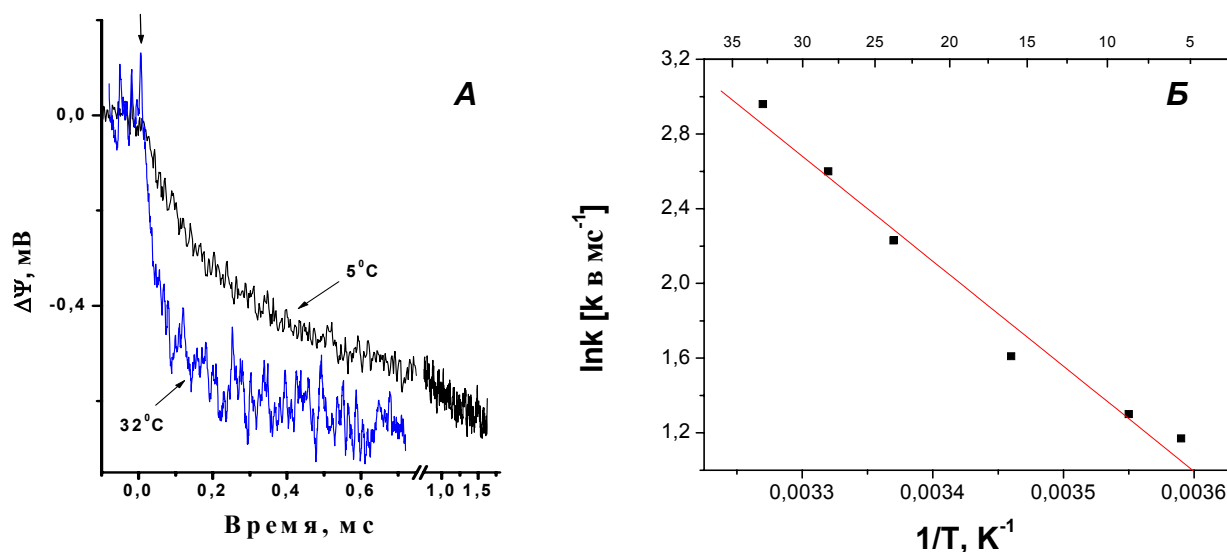
эффекта позволяет говорить о первичном изотопном эффекте, при котором протон напрямую участвует в скорость-лимитирующем этапе реакции (DeCoursey, Cherny, 1997). В случае вторичного изотопного эффекта, характеризующегося более низкими значениями (1,02–1,4), замена протона на дейтерон происходит на удалении от участка первичной реакции (Kirsch, 1977). Таким образом, полученные нами данные являются доказательством того, что субмиллисекундная электрогенная компонента определяется транспортом протона. Данные РСА препаратов СК ФС 2 показали, что  $Q_A$  и негемовое железо локализованы на одинаковой глубине по отношению к предполагаемой границе липидного бислоя (Ferreira et al., 2004). Таким образом, вкладом реакции переноса электрона в суммарный электрогенез можно пренебречь. Тем самым, можно предположить, что электрогенная фаза, сопровождающая восстановление  $Fe^{3+}$ , может быть объяснена векторным внутрибелковым транспортом протона к предполагаемому аминокислотному остатку вблизи негемового железа. Это предположение подтверждается также и наблюдавшейся зависимостью дополнительной электрогенной фазы от температуры. Кинетические кривые для дополнительной электрогенной фазы, приписываемые протон-зависимому электронному транспорту от  $Q_A^-$  к  $Fe^{3+}$  при  $5^{\circ}C$  и  $32^{\circ}C$ , показаны на Рис. 8А. Сопоставление этих кривых указывает на значительное замедление кинетики реакции при уменьшении температуры. Рис. 8Б показывает зависимость константы скорости субмиллисекундной компоненты при температуре ниже  $33^{\circ}C$  (pH 7,0) в координатах Аррениуса.

Энергия активации, определенная по наклону кривой, составляет  $\sim 47 \pm 3,5$  кДж/моль. Похожие значения энергии активации наблюдались для светозависимых и редокс-зависимых внутрибелковых перемещений протона (Tittor et al., 1989; Gupta et al., 1998; Siletsky et al., 2000). В то же время реакции транспорта электрона, не связанные с переносом протона, имеют значительно более низкое значение энергии активации.

По-видимому, высокая энергия активации, вызвана редокс-зависимыми или светозависимыми конформационными изменениями структуры белка, включающими изменение положения ключевых аминокислотных остатков. В результате этого происходит: (а) сдвиг(и) значений(-ия) рК групп(ы) акцепторов протонов вблизи негемового железа и/или (б) формирование внутрибелковой непрерывной сети (цепи)



водородных связей в протон-проводящих пути(ях), связывающих негемовое железо и строму.



**Рис. 8.** Кинетические кривые для дополнительной субмиллисекундной фазы при 5 и 32 °С (А). Фотоэлектрические ответы нормированы по амплитуде быстрой электрогенной фазы; температурная зависимость константы скорости дополнительной электрогенной фазы (Б). Энергия активации, определенная по наклону кривой, составляет  $\sim 47 \pm 3,5$  кДж/моль.

Следует отметить, что амплитуда электрогенной фазы, обусловленной протонированием  $Q_B^{2-}$  в ответ на вторую вспышку света, оказалась примерно в 2 раза меньше, чем амплитуда реакций переноса протона из внешней водной фазы к группе Х вблизи негемового железа. Одним из объяснений может являться наличие большой диэлектрической постоянной вблизи  $Q_B$ . Действительно, согласно данным РСА кристаллов препаратов СК ФС 2 из термофильных цианобактерий (Loll et al., 2005),  $Q_B$  находится в глубокой щели, вероятно, содержащей большое число молекулы воды.

Истинная роль негемового железа до сих пор точно не установлена. В физиологических условиях участие негемового железа в реакциях переноса зарядов на акцепторном участке комплексов ФС 2 имеет, вероятно, второстепенное значение из-за высоких скоростей доминирующих реакций - окисления воды до молекулярного кислорода и восстановления пластохинона до пластогидрохинона. Однако в условиях стресса, а именно, при нарушении работы КВК может иметь место альтернативный путь переноса электронов с участием негемового железа. Подавление КВК ведет к увеличению  $E_m$  пластохинона  $Q_A$  на 150-200 мВ и ингибированию переноса

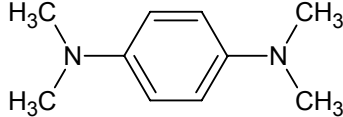
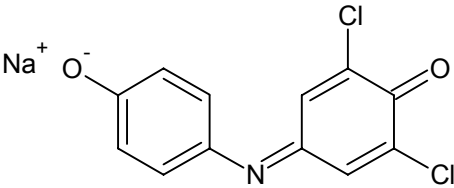
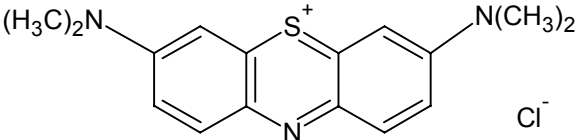
электронов от  $Q_A^-$  на  $Q_B$  (Krieger et al., 1995; Johnson et al., 1995). В результате возникает возможность переключения ФС 2 на одноэлектронный режим циклического переноса по схеме:  $P_{680} \rightarrow \text{Фео} \rightarrow Q_A \rightarrow \text{цит } b_{559} \rightarrow \text{хлорофилл } \text{Хл}_Z \rightarrow P_{680}$  (Kaminskaya et al., 2003). Промежуточным компонентом между  $Q_A$  и цит  $b_{559}$  могло бы быть  $\text{Fe}_{\text{Hr}}$ , участие которого, как показано в работе (Naumann et al., 1995) и в настоящей работе, ведет к увеличению электрогенной активности ФС 2.

### **Влияние редокс-медиаторов на светоиндуцированную генерацию мембранного потенциала в препаратах СК ФС 2, лишенных марганцевого кластера**

Наличие марганцевого кластера на донорной стороне ФС 2 предотвращает окисление экзогенных доноров электронов редокс-активным тирозином  $Y_Z$  и способствует высокой скорости электронного транспорта на участке  $Y_Z \rightarrow P_{680}^+$ . Удаление марганца обычно приводит к изменениям в белковом окружении вблизи  $Y_Z$ . Как следствие,  $Y_Z$  становится доступным действию экзогенных восстановителей, включая  $\text{Mn}^{2+}$  (Delrieu, 1995; Chroni, Ghanotakis, 2001). Образование трансмембранной разности электрических потенциалов, обусловленное восстановлением  $Y_Z^{\text{ок}}$   $\text{Mn}$ -кластером в ответ на первую вспышку света, было продемонстрировано на тилакоидах с помощью измерения электрохромного сдвига полос поглощения каротиноидов (Ghanotakis et al., 1987), а также электрометрически на протеолипосомах, содержащих ФС 2 с активным КВК (Naumann et al., 1997; Мамедов и др., 1999). При этом, поскольку редокс-активный  $Y_Z$  локализован в гидрофобной области белка, то можно предположить, что электрогенный характер восстановления  $Y_Z^{\text{ок}}$  не является специфичным для  $\text{Mn}^{2+}$  как донора электронов.

В настоящем разделе приведены результаты по исследованию влияния таких редокс-медиаторов, как  $N,N,N',N'$ -тетраметил-*n*-фенилендиамина (ТМФД), 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) и метиленового синего (МС) на кинетику фотоэлектрических ответов препаратов СК ФС 2, лишенных марганца (-Mn). Структура и значения среднеточечных потенциалов этих медиаторов представлены в Таблице 1.

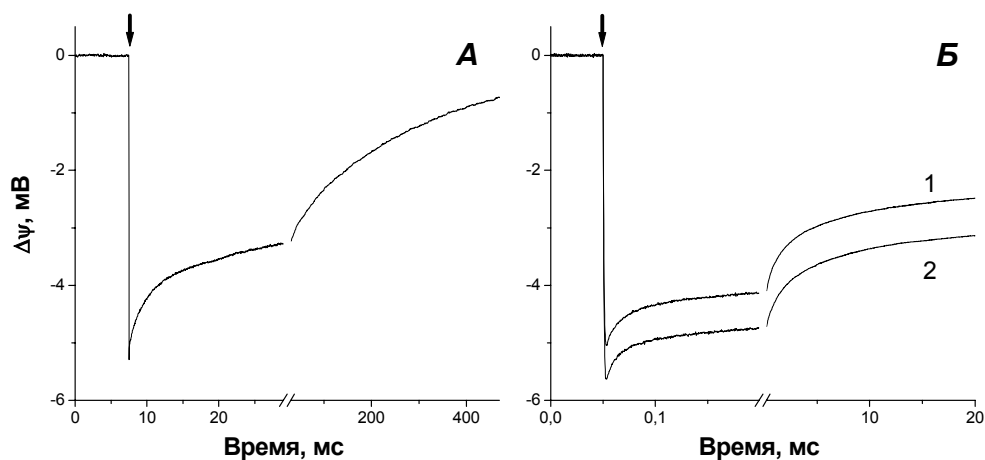
**Таблица 1. Структура и значения среднеточечных потенциалов использованных редокс-медиаторов.**

Редокс-медиатор	Структура	$E_m$ , мВ при pH 7.0
N,N,N',N'-тетраметил- <i>n</i> -фенилендиамин (ТМФД)		+260 мВ
2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ)		+217 мВ
Метиленовый синий (метилтионинхлорид)		+11 мВ

На Рис. 9А показан индуцированный лазерной вспышкой фотоэлектрический ответ протеолипосом, содержащих СК ФС 2 (-Mn). Как и в случае препаратов ФС 2 с активным КВК под действием светового импульса генерируется  $\Delta\Psi$  со знаком «минус» внутри протеолипосомальной мембраны и кинетикой более быстрой, чем временное разрешение установки. Препараты СК ФС 2 (-Mn) не содержат природных доноров электронов для окисленного  $Y_Z$ , а также вторичного хинонного акцептора  $Q_B$ , т.е. в этих образцах терминальным акцептором электронов является  $Q_A$  (Ghanotakis et al., 1987). Соответственно, в ответ на единичные вспышки света происходит разделение зарядов между  $P_{680}$  и  $Q_A$  с последующим восстановлением  $P_{680}^+$  от  $Y_Z$  (Pokorny et al., 1994; Naumann et al., 1997).

Кинетика спада фотоэлектрического ответа может быть аппроксимирована четырьмя экспоненциальными фазами с  $\tau \sim 14$  мкс (19%), 2,4 мс (18%), 20 мс (17%) и 275 мс (46%). Компоненты с  $\tau \sim 20$  и 275 мс, по-видимому, соответствуют реакции рекомбинации зарядов между  $Q_A^-$  и  $Y_Z^{OK}$ , компонента с  $\tau$  2,4 мс – реакции рекомбинации между  $Q_A^-$  и  $P_{680}^+$ , в то время как более быстрая компонента ( $\sim 14$  мкс), вероятно, обусловлена реакцией рекомбинации электрона от феофитина (Rappaport et

al., 2002). Добавление аскорбата натрия практически не влияет на кинетику фотоэлектрического ответа (рис. 9Б, кривая 2).



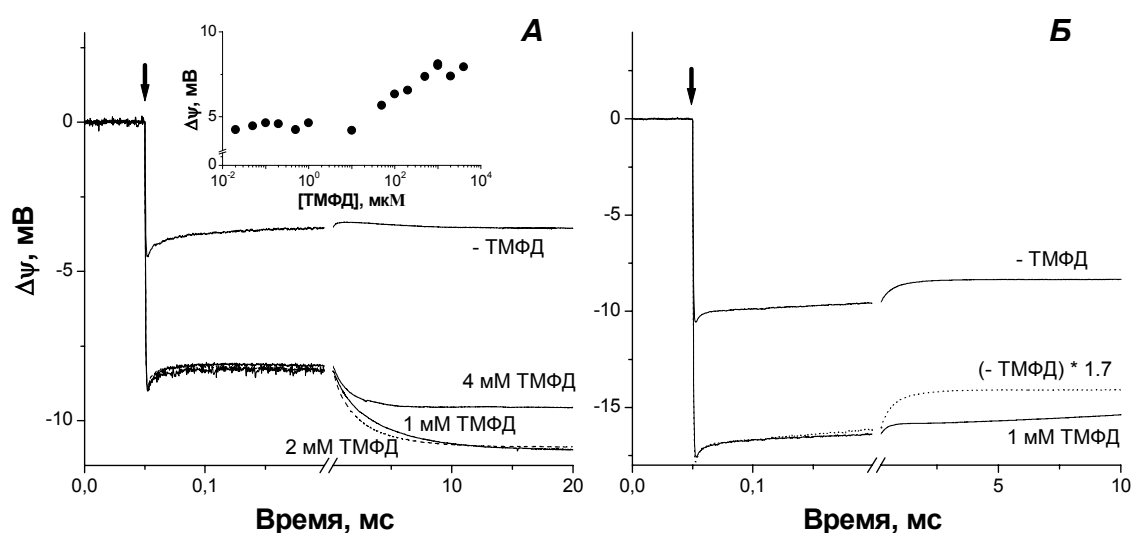
**Рис. 9.** Образование трансмембранной разности электрических потенциалов в протеолипосомах, содержащих СК ФС 2 (-Mn), в ответ на единичную лазерную вспышку. Среда инкубации: 20 mM HEPES-NaOH (pH 7,2), 10 mM NaCl, 0,3 M сахарозы. А - в отсутствие добавок; Б - в отсутствие (1) и в присутствии (2) 1 mM аскорбата натрия.

На рис. 10А продемонстрированы светоиндуцированные фотоэлектрические ответы, наблюдаемые в исследуемых образцах в отсутствие и в присутствии пары ТМФД/аскорбат натрия. Добавление 1 mM ТМФД приводит к существенному увеличению вклада кинетически-неразрешимой фазы и появлению дополнительной фазы нарастания мембранного потенциала. Относительный вклад дополнительной фазы нарастания составляет около ~30% от фазы  $Y_Z^{OK}Q_A^-$  при концентрации ТМФД порядка 1-2 mM, в то время как дальнейшее увеличение концентрации ТМФД приводит к уменьшению вклада миллисекундной фазы. Незначительное ускорение кинетики дополнительной фазы с увеличением концентрации ТМФД, вероятно, связано со слабым разобщающим эффектом радикальной формы ТМФД (Trebst, Reimer, 1973).. Наблюдаемая дополнительная генерация мембранного потенциала в миллисекундной шкале времени, вероятно, обусловлена векторным переносом электрона от редокс-медиатора к  $Y_Z^{OK}$ .

Вставка к рис. 10А показывает, что амплитуда неразрешаемой фазы  $Y_Z^{OK}O_A^-$  практически не изменяется при добавлении ТМФД в концентрации до 10 мкМ, в то

время как дальнейшее увеличение концентрации ТМФД приводит к двукратному увеличению амплитуды быстрой фазы и насыщению при концентрации  $>2$  мМ.

Влияние окисленной формы ТМФД (в присутствии 2 мМ феррицианида калия) на кинетику фотоэлектрических ответов протеолипосом, содержащих СК ФС 2 (-Mn), показано на рис. 10Б. Добавление 1 мМ ТМФД приводит к увеличению амплитуды быстрой неразрешаемой фазы и существенному замедлению спада. Значительное увеличение кинетически-неразрешимой фазы в случае как окисленной, так и восстановленной форм ТМФД может объясняться существованием анионной семихинонной формы  $Q_A^-$  во фракции ФС 2 перед вспышкой, которая непосредственно окисляется окисленной формой ТМФД (Bukhov et al., 2003).

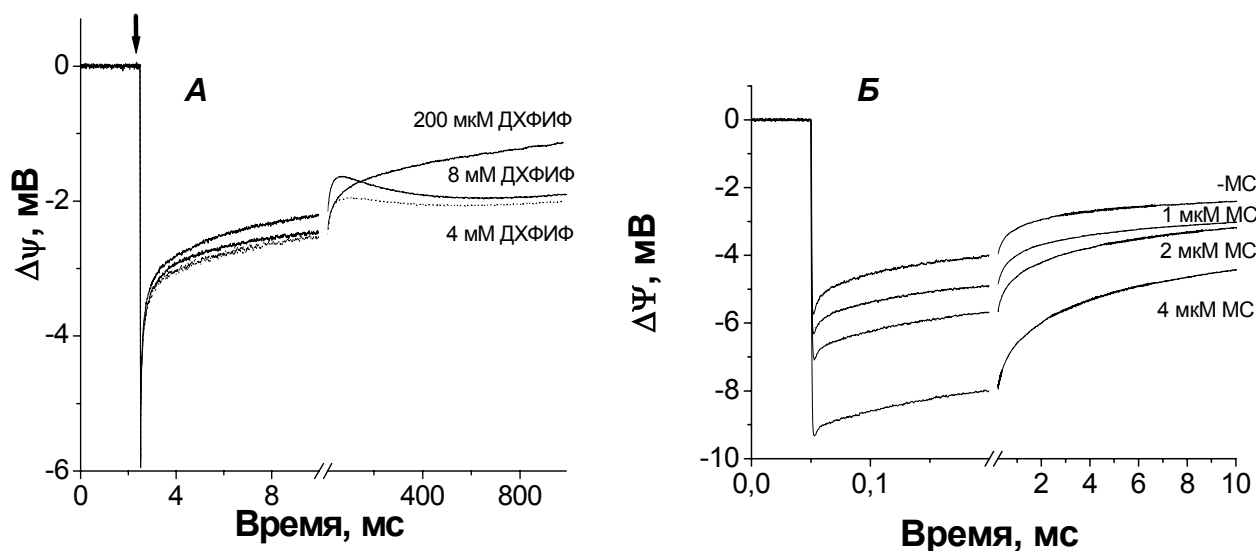


**Рис. 10.** Влияние восстановленной (А) и окисленной (Б) форм ТМФД на кинетику фотоэлектрического ответа. Вставка: зависимость амплитуды быстрой неразрешаемой компоненты от концентрации восстановленной формы ТМФД (логарифмическая шкала).

Средноточечный потенциал ( $E_m$ ) редокс-пары ТМФД/ТМФД<sup>+</sup> составляет +260 мВ при рН 7,0. В присутствии избытка аскорбата натрия ( $E_m = +80$  мВ) концентрация окисленной формы ТМФД примерно в 1000 раз меньше концентрации восстановленной формы. Таким образом, при добавлении в среду 1 мМ ТМФД, конечная концентрация окисленной формы ТМФД составит  $\sim 1$  мкМ. Эта концентрация сопоставима с концентрацией реакционных центров ФС 2 в образце. Таким образом, концентрация окисленной формы ТМФД при концентрации его восстановленной формы 1 мМ оказывается достаточной для равновесного

восстановления  $Q_A^-$  и переходу неактивной фракции  $P_{680}Q_A^-$  в активное состояние  $P_{680}Q_A$ .

Влияние другого липофильного медиатора, ДХФИФ на кинетику фотоэлектрических ответов показано на Рис. 11А.



**Рис. 11. Влияние ДХФИФ (А) и МС (Б) на кинетику фотоэлектрического ответа.**

Замедление кинетики спада фотоэлектрического ответа в присутствии ДХФИФ и избытка аскорбата натрия свидетельствует об эффективном взаимодействии между медиатором и окисленным  $Y_Z$ . При концентрации ДХФИФ 4  $\text{mM}$ , помимо замедления спада, в кинетике фотоэлектрического ответа наблюдается дополнительное медленное нарастание  $\Delta\Psi$ . Последнее, вероятно, обусловлено электрогенным восстановлением  $Y_Z^{\text{ок}}$ . Отсутствие быстрого нарастания генерации мембранного потенциала, а также меньшая эффективность ДХФИФ по сравнению ТМФД в качестве донора электрона для  $Y_Z^{\text{ок}}$  могут объясняться наличием отрицательного заряда у восстановленной формы ДХФИФ, предотвращая тем самым взаимодействие ДХФИФ с донорным участком ФС 2.

Нами было также изучено влияние акцептора электронов метиленового синего (МС) на кинетику генерации мембранного потенциала (рис. 11Б). Увеличение концентрации МС вплоть до 4  $\mu\text{M}$  приводит к увеличению амплитуды быстрой неразрешаемой фазы и замедлению спада фотоответа. Оба этих эффекта, вероятно, обусловлены окислением  $Q_A^-$  метиленовым синим (Misran et al., 1994). Отсутствие

дополнительной генерации  $\Delta\psi$  связано с тем, что МС не может служить донором электронов в наших экспериментальных условиях.

На основании результатов, полученных на препаратах ФС 2 с активным КВК и тилакоидах, суммарный электрогенез на донорном участке фермента, амплитуда которого составляет  $\sim 10,5\%$  в ФС 2 и  $\sim 16\%$  в тилакоидах (Naumann et al., 1997), может быть приписан: 1) транспорту электрона от Mn к  $Y_Z^{ок}$  и 2) транспорту протона от аминокислотного остатка X, расположенного вблизи Mn в люмен. Однако, поскольку расположение атома Mn, донирующего электрон на  $Y_Z^{ок}$  в ответ на первую вспышку света, и остатка X не известно, диэлектрически взвешенное расстояние между сайтом связывания Mn и  $Y_Z$  не может быть оценено. Кратчайшее расстояние между сайтом связывания атома  $Mn_2$  (наиболее удаленного от  $P_{680}$ ) и поверхностью раздела белок-вода в ФС 2 в отсутствие периферических белков составляет  $\sim 12 \text{ \AA}$ . Анализ профиля гидрофобности этого белкового участка выявил наличие значительного количества неполярных аминокислот. Поэтому транспорт электрона между поверхностью белок-вода и сайтом связывания Mn может вносить существенный вклад в электрогенез при переносе электрона от восстановленных форм ТМФД и ДХФИФ к  $Y_Z^{ок}$ .

На Рис. 12 показана предполагаемая схема расположения редокс-кофакторов ФС 2 в протеолипосомальной мембране. Согласно схеме окисленные формы ТМФД и МС способны окислять частично восстановленный  $Q_A^-$  в темноте и тем самым увеличивать число функционально активных (открытых) ( $P_{680}Q_A$ ) РЦ. Быстрая фаза нарастания  $\Delta\psi$  обусловлена разделением зарядов между  $P_{680}$  и  $Q_A$  с последующим восстановлением  $P_{680}^+$  от  $Y_Z$ , в то время как медленная фаза связана с электрогенным восстановлением  $Y_Z^{ок}$  от восстановленных форм ТМФД и ДХФИФ. Схема также показывает предполагаемую локализацию ХН-группы и Mn-кластера (который отсутствует в используемых образцах). Вертикальными серыми стрелками показаны возможные электрогенные стадии, обусловленные переносом электрона и протона в образцах ФС 2 с активным КВК.

Таким образом, полученные результаты дают основания полагать, что электрогенез, обусловленный донированием электронов к  $Y_Z^{ок}$  не является специфичным для  $Mn^{2+}$  как донора электронов, а наблюдаемые электрогенные реакции в присутствии редокс-медиаторов связаны с векторным переносом электрона между

поверхностью белок-вода и  $Y_Z^{OK}$ . Эти результаты свидетельствуют об электроизолированной локализации  $Y_Z$  внутри D1/D2 гетеродимера. Кроме того, вклад электрогенного восстановления  $Y_Z^{OK}$  редокс-медиаторами в суммарный электрогенез (по крайней мере, в препаратах ФС 2, лишенных Mn-кластера) больше, чем вклад реакций переноса электрона  $Mn \rightarrow Y_Z$  и последующего выброса протона (Naumann et al., 1997; Мамедов и др., 1999). Эти данные также свидетельствуют также об электроизолированной локализации марганца.

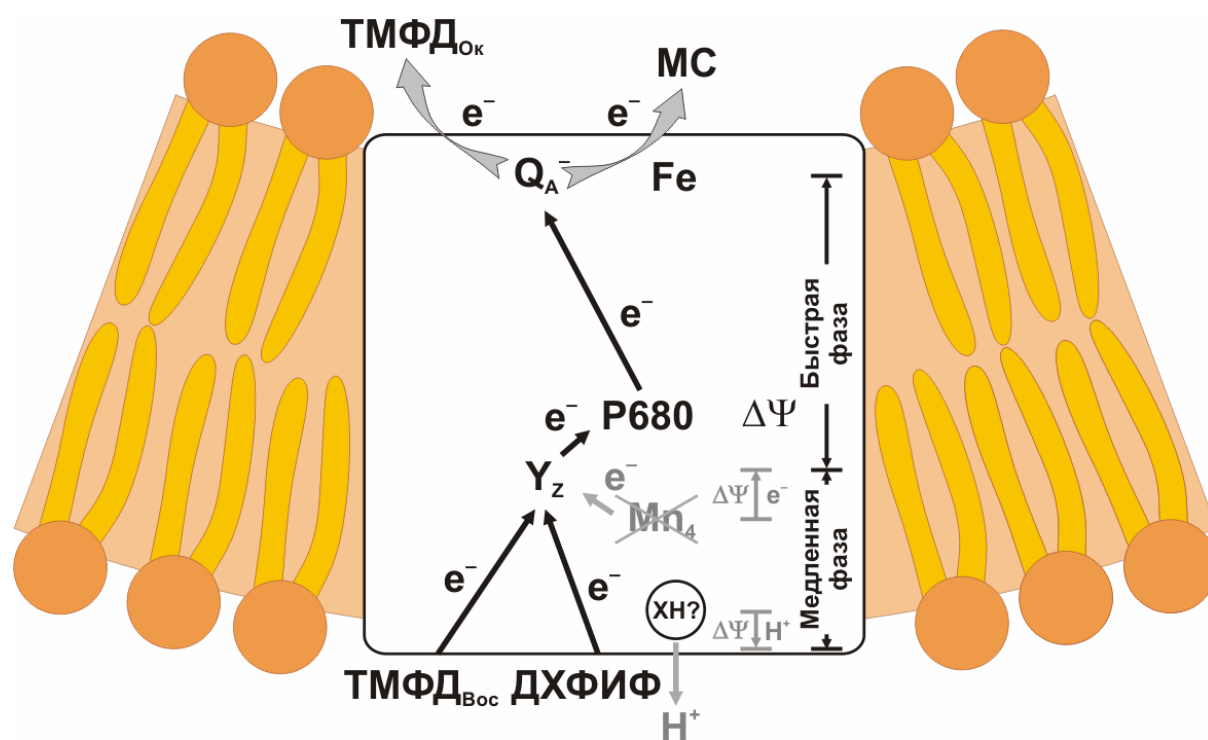


Рис. 12 Схема расположение редокс-кофакторов ФС 2 в протеолипосомальной мембране.



## ВЫВОДЫ

- 1) Сконструирована модельная система, представляющая собой протеолипосомы со встроенными сердцевинными комплексами фотосистемы 2 из шпината, в которых кислород-выделяющий комплекс расположен вблизи наружной поверхности протеолипосомальной мембраны и стабилизирован глицинбетаином. Продемонстрировано, что эта модельная система позволяет изучать природу и механизмы электрогенных реакций в фотосистеме 2 с помощью прямого электрометрического метода.
- 2) Показано, что в кинетике фотоэлектрического ответа на вторую вспышку света помимо быстрой фазы образования  $\Delta\Psi$ , обусловленной разделением зарядов между первичным донором  $P_{680}$  и первичным хинонным акцептором  $Q_A$  с последующим восстановлением  $P_{680}^+$  от редокс-активного тирозина  $Y_Z$  ( $Y_Z^{OK}Q_A^-$ ), наблюдается дополнительная электрогенная фаза, амплитуда которой составляет  $\sim 11\%$  ( $\tau \sim 850$  мкс при pH 7,5) от быстрой фазы  $Y_Z^{OK}Q_A^-$ . Чувствительность этой фазы к ингибитору переноса электрона между хинонными акцепторами  $Q_A$  и  $Q_B$  диурону, зависимость амплитуды и константы скорости от pH среды, а также зависимость амплитуды этой фазы от концентрации экзогенно добавленного децил-пластохинона свидетельствуют о том, что наблюдаемая фаза обусловлена протонированием дважды восстановленной формы  $Q_B$ :  $Q_A^-Q_B^- + 2 H^+ \rightarrow Q_AQ_BH_2$ .
- 3) Показано, что в условиях, когда негемовое железо ( $Fe_{нг}$ ) на акцепторном участке ФС 2 исходно окислено, в ответ на первую вспышку света наблюдается дополнительная электрогенная фаза, амплитуда которой составляет  $\sim 20\%$  ( $\tau \sim 120$  мкс при pH 7,2) от  $Y_Z^{OK}Q_A^-$ . Чувствительность данной фазы к диурону, а также влияние изотопного состава воды и температуры на ее кинетику свидетельствуют в пользу векторного переноса протона из внешней водной фазы к гипотетическому аминокислотному остатку X вблизи  $Fe_{нг}$ . Различие в амплитудах электрогенных реакций, обусловленных захватом протона группой X вблизи  $Fe_{нг}$  в ответ на первую вспышку и протонированием  $Q_B^{2-}$  в ответ на вторую вспышку, может быть обусловлено бóльшим значением диэлектрической постоянной вблизи сайта связывания  $Q_B$ .

- 4) На протеолипосомах, содержащих сердцевинные комплексы ФС 2, лишенные марганца, впервые было продемонстрировано появление дополнительной электрогенной стадии, обусловленной векторным переносом электрона от редокс-медиаторов N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамина (ТМФД) и 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) к редокс-активному тирозину  $Y_Z^{ок}$ . Полученные данные свидетельствуют о том, что  $Y_Z$  погружен в гидрофобную область D1/D2-гетеродимера, и таким образом является электроизолированным от водной фазы. Различие в амплитудах электрогенных реакций в сердцевинных комплексах ФС 2, лишенных марганцевого кластера, и нативных комплексах ФС 2 свидетельствует о том, что Mn-связывающий сайт локализован в белковом домене с относительно низким значением диэлектрической постоянной.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тюняткина А.А., Семенов А.Ю., Мамедов М.Д. Электрогенное протонирование вторичного хинонного акцептора в комплексах фотосистемы 2. // Сборник материалов IV съезда биофизиков России. - Воронеж, 2004.- Т. II. - С.470-471.
2. Mamedov M.D., Tyunyatkina A.A., Semenov A.Yu. Electrogenic proton transfer in the photosystem II core complexes. // 13<sup>th</sup> European bioenergetics conference. - Pisa. Italy., 2004. - P.259.
3. Тюняткина А.А., Семенов А.Ю., Мамедов М.Д. Электрогенез на акцепторной стороне в комплексе фотосистемы II. // XVIII Пуцинские чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция «Преобразование энергии света при фотосинтезе». - М.: НИА – Природа, 2005. - С.36.
4. Мамедов М.Д., Тюняткина А.А., Семенов А.Ю. Электрогенное протонирование вторичного хинонного акцептора Q<sub>B</sub> в комплексах фотосистемы II из шпината, включенных в липидные везикулы. // Биохимия. - 2005. - Т.70. - С.1639-1645.
5. Mamedov M.D., Tyunyatkina A.A., Siletsky S.A., Semenov A.Yu. Voltage changes involving photosystem II quinone-iron complex turnover. // Eur. Biophys. J. - 2006. - V.35. - P.647-654.
6. Tyunyatkina A.A., Kurashov V.N., Semenov A.Yu., Mamedov M.D. Electric potential difference generation involving oxygen-evolving photosystem II complex turnover. // International Meeting «Photosynthesis in the Post-Genomic Era: Structure and Function of Photosynthesis». - Moscow: NIA-Nature, 2006. - P.172.
7. Tyunyatkina A.A., Kurashov V.N., Gopta O.A., Semenov A.Yu., Mamedov M.D. Electrogenic reduction of tyrosine Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup> by exogenous reductants in photosystem II. // International Meeting «Photosynthesis in the Post-Genomic Era: Structure and Function of Photosynthesis». - Moscow: NIA-Nature, 2006. - P.185.
8. Tyunyatkina A.A., Siletsky S.A., Semenov A.Yu., Mamedov M.D. Electrogenicity due to quinone-iron complex turnover. // 14<sup>th</sup> European bioenergetics conference. - Moscow. Russia., - 2006. - P.245.
9. Semenov A.Yu., Gopta O.A., Kurashov V.N., Tyunyatkina A.A., Mamedov M.D. Effect of redox mediators on the flash-induced membrane potential generation in Mn-depleted photosystem II core particles. // A Satellite Meeting of the SEB 14<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis. – London: The Royal Society, 2007. - P.36.