

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи

Зобова Анастасия Валерьевна

**ПРОБЛЕМЫ ОПТИМИЗАЦИИ
СТРУКТУРЫ СВЕТОСОБИРАЮЩИХ СУПЕРАНТЕНН
ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ЗЕЛЕННЫХ БАКТЕРИЙ**

03.01.02-Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в отделе фотобиофизики
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители: доктор физико-математических наук
З.Г. Фетисова

кандидат биологических наук
А.С. Таисова

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор
Чернавский Дмитрий Сергеевич

доктор биологических наук, профессор
Карапетян Навасард Ваганович

Ведущая организация: Институт Фундаментальных Проблем Биологии РАН.

Защита состоится 25 ноября 2010 г. в 15 часов 30 минут на заседании Диссертационного совета Д.501.001.96 при Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет, кафедра биофизики, ауд. «Новая».

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

Автореферат разослан 22 октября 2010 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

кандидат биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вся биосфера Земли своим существованием прямо или косвенно обязана процессу фотосинтеза, в результате которого энергия света, поглощенного фотосинтезирующими организмами, запасается в виде энергии химических связей. Поэтому актуальность выяснения механизмов первичных стадий фотосинтеза и принципов структурно-функциональной организации фотосинтезирующего аппарата, ответственных за высокую эффективность первичных процессов конверсии энергии света в фотосинтезе, – очевидна.

Цель и задачи исследования. В соответствии с выдвинутой ранее концепцией (Фетисова, Фок, 1984), целью настоящего исследования являлся поиск принципов оптимизации структурно-функциональной организации природных светособирающих неоднородных суперантенн, сформированных однородными субантеннами, у двух семейств зеленых бактерий, *Chloroflexaceae* и *Oscillochloridaceae*. Задачами настоящего исследования являлись: (1) теоретический поиск принципов организации оптимальных светособирающих систем, моделирующих структуру и функционирование природных антенн; (2) целенаправленный экспериментальный поиск в природных антеннах структурных свойств, которые были теоретически предсказаны для оптимальных модельных систем.

Научная новизна и практическая значимость работы. В настоящей работе получены новые данные, подтверждающие выдвинутую ранее концепцию жесткой оптимизации структуры фотосинтезирующего аппарата по функциональному критерию. С использованием математического моделирования функционирования природных неоднородных суперантенн, состоящих из однородных субантенн, впервые показаны возможные способы оптимального сопряжения этих однородных субантенн, состоящие в (1) оптимизации взаимной ориентации векторов дипольных моментов Q_y -переходов пигментов соседних субантенн и (2) оптимизации спектрально гетерогенного состава субантенн. Экспериментально подтверждена найденная нами теоретически модель оптимальной ориентации диполей Q_y -переходов пигментов субантенны, сопрягающей хлоросомную и мембранную субантенны в суперантенне зеленых бактерий семейства *Chloroflexaceae*. Теоретически обосновано и экспериментально подтверждено существование дополнительной субантенны в суперантенне зеленых бактерий семейства *Oscillochloridaceae*. Результаты проведенного цикла теоретических и экспериментальных исследований важны с точки зрения как фундаментальных исследований, так и

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл; Б740, Б750, Б798, Б805, Б808, Б860, Б866 – БХл *c/a* -субантенны с указанными максимумами поглощения БХл *c/a* в ближней инфракрасной области; ФСЕ – фотосинтетическая единица; РЦ – реакционный центр.

проблемы создания оптимальных искусственных светопреобразующих систем.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на трех Международных конференциях: “Light Energy Conversion in Photosynthesis” (Puschino, 2008) ; The 3-rd Conference on Computational Molecular Biology” (Moscow, 2009); The 15th International Congress of Photosynthesis (China, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 2 в рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Объем работы составляет 130 страниц, в работе содержится 25 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 158 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Объекты исследований. Объектами исследований были фотосинтезирующие бактерии, представляющие два семейства зеленых аноксигенных фототрофных нитчатых бактерий, *Chloroflexaceae* и *Oscillochloridaceae*: термофильные бактерии *Chloroflexus* (*C.*) *aurantiacus*, штамм Ok-70-fl (коллекция Лейденского университета, Нидерланды) и мезофильные бактерии *Oscillochloris* (*O.*) *trichoides*, штамм DG-6 (№ 327 КМ МГУ).

Культивирование зеленых фототрофных бактерий *C. aurantiacus* и *O. trichoides*. Культуры *C. aurantiacus* выращивали в анаэробных условиях при 55°C на стандартной среде (Pierson, Castenholz, 1974) при интенсивности света ~500 Вт/м². Выращивание культур *O. trichoides* проводили в анаэробных условиях при 30°C на модифицированной среде (Kerpen et al., 1994) при интенсивности света 200-500 Вт/м².

Выделение хлоросом-мембранных комплексов *C. aurantiacus* и *O. trichoides*. Хлоросом-мембранные комплексы выделяли из клеток по методу Ma с соавт. (1996).

Выделение хлоросом *C. aurantiacus* и *O. trichoides*. Выделение хлоросом проводили в двух последовательных непрерывных градиентах концентрации сахарозы (55–20% и 45–15%) в присутствии тиоцианата натрия и аскорбата натрия, по модифицированной методике Gerola, Olson (1986).

Щелочная обработка изолированных хлоросом: селективное удаление БХл *a*-субантенны из хлоросом *C. aurantiacus* и *O. trichoides*. Щелочную обработку хлоросом проводили по методу Sakuragi et al. (1999): к суспензии хлоросом в 10 мМ фосфатном буфере с pH 7.0 добавляли 0,1 объема 10 М NaOH и 30 минут инкубировали при 40°C, после чего добавляли два объема 1,0 М фосфатного буфера с pH 6.0. Хлоросомы осаждали центрифугированием при 180000 g в течение 90 минут при 4°C.

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия: идентификация состава белков в хлоросомах *C. aurantiacus* и *O. trichoides*. Для высаждения белков хлоросомы обрабатывали ацетоном при -20°C . Белки собирали центрифугированием и солубилизировали в типовом буфере. Образцы прогревали при 100°C и наносили на гели, содержащие 16.5 и 4% акриламида в качестве разделяющего и концентрирующего гелей (Schagger, van Jagow, 1987).

Оптическая спектроскопия. Спектры поглощения (при 295К) и флуоресценции (при 295К и 77К) образцов измеряли на спектрофотометрах Hitachi-557 и Hitachi-850. Идентификацию пигментов в образцах проводили по методу Feick et al. (1982).

Дифференциальная абсорбционная спектроскопия с фемтосекундным разрешением. Дифференциальные (свет–темнота) поляризационные спектры поглощения хлоросом измеряли с помощью созданной в НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ лазерной системы, генерирующей линейно поляризованные импульсы с максимумом 800 нм (частота повторений 15 Гц), с полной шириной на полувысоте 15–40 нм и длительностью импульсов 50–100 фс. Угол между векторами поляризации возбуждающего и зондирующего лучей составлял либо 0° , либо 90° . Каждый спектр был получен путем усреднения 50000 измерений и состоял из ~ 400 точек. Типичные величины $\Delta A^{\text{макс}}$ составляли 10^{-5} – 10^{-4} OD. Оптическая плотность образцов составляла 0.5–1.0 в 1-мм кювете. Плотность энергии возбуждения $\approx 10^{12}$ фотонов/см² в импульсе. Измерения проводили при комнатной температуре.

Математическое моделирование миграции энергии по суперантенне зеленых бактерий. Основываясь на данных электронно-микроскопического анализа тонких срезов клеток *C.aurantiacus* (Oelze, Golecki, 1995) и *O. trichoides* (Taisova et al., 2002), позволивших оценить толщину базовых пластинок хлоросом (3-4 нм), исследованиях переноса энергии возбуждения между субантеннами *C.aurantiacus* и современных теоретических представлениях о природе этого процесса, перенос энергии между ними считали индуктивно-резонансным (Causgrove et. al., 1992, Savikhin et al., 1996, Yang, Fleming, 2002; Shibata et al., 2009). Для различных моделей суперантенн вычисляли эффективность этого процесса, в качестве меры которой рассматривали относительную величину времени t захвата 90% энергии возбуждения терминальной акцепторной субантенной мембраны при возбуждении олигомерной субантенны хлоросомы. Для расчетов времени t использовали метод матриц вероятностей (Fetisova et al., 1989).

Результаты и обсуждение

Первичные процессы фотосинтеза *in vivo* чрезвычайно эффективны благодаря жесткой оптимизации структуры фотосинтезирующего аппарата по функциональному критерию (Фетисова, Фок, 1984). Структура больших ФСЕ оптимизирована по многим

структурно-функциональным параметрам. Большинство структурных оптимизирующих факторов увеличивает скорость миграции энергии по антенне. Однако даже значительное увеличение этой скорости само по себе еще не обеспечивает столь же значительного увеличения скорости передачи энергии к РЦ. Эта задача решается *in vivo* с помощью одного из оптимизирующих факторов – спектральной гетерогенности антенны, которая является единственным способом создания направленного переноса энергии к РЦ. Однако, наличие неоднородных суперантенн, состоящих из нескольких однородных субантенн, ставит задачу оптимального сопряжения этих субантенн. В представленной работе эта задача решалась для зеленых фотосинтезирующих бактерий, обладающих самыми большими светособирающими антеннами.

Зеленые фотосинтезирующие аноксигенные бактерии включают три семейства: *Chlorobiaceae* (зеленые серные бактерии) и два семейства зеленых нитчатых бактерий, *Chloroflexaceae* (Pierson, Castenholz, 1992; Trüper, Pfennig, 1992) и новое семейство *Oscillochloridaceae*, основанное в 2000 году (Kerpen et al., 2000). Светособирающая антенна ФСЕ этих бактерий содержит несколько субантенн, пути переноса энергии возбуждения между которыми представлены ниже в виде общих схем:

Chloroflexaceae : Бхл *c* Б740 → Бхл *a* Б798 → Бхл *a* Б808-866 → РЦ Р870 ;

Chlorobiaceae : Бхл *c/d/e* Б710-750 → Бхл *a* Б795 → Бхл *a* Б809 → Бхл *a* Б813 →
→ Бхл *a* Б836 → РЦ Р840 ;

Oscillochloridaceae : Бхл *c* Б750 → ? → Бхл *a* Б805-860 → РЦ Р870 .

В настоящей работе с помощью математического моделирования функционирования светособирающих суперантенн зеленых бактерий из двух семейств – *Chloroflexaceae* и *Oscillochloridaceae* – были рассмотрены возможные пути оптимизации этого процесса, предполагающие (1) оптимальное сопряжение ориентаций диполей Q_y -переходов пигментов соседних субантенн в суперантенне *S.aurantiacus* и (2) оптимальное сопряжение энергетических уровней соседних субантенн в суперантенне *O.trichoides*.

Поиск оптимального сопряжения субантенн в суперантенне фотосинтезирующих зеленых бактерий семейства *Chloroflexaceae*

Суперантенна *S.aurantiacus* локализована в трех субклеточных структурах :

- 1) хлоросомах, содержащих весь БХл *c* клетки в виде олигомерной субантенны (Б740),
- 2) базовой пластинке, содержащей мономерную БХл *a*-субантенну (Б798), и
- 3) цитоплазматической мембране, содержащей структурно связанные мономерные (Б808) и олигомерные (Б866) субъединицы БХл *a*-субантенны Б808-866 (Blankenship et al., 1995). Перенос энергии возбуждения по суперантенне *S.aurantiacus* осуществляется в соответствии с термодинамическим потенциалом, Б740→Б798→Б808→Б866, со 100% -ой эффективностью в физиологических условиях (van Dorssen, Amesz, 1988). Диполи Q_y -

переходов БХл c -кластеров субантенны Б740 взаимно параллельны и ориентированы вдоль длинной оси хлоросомы (Fetisova et al., 1988); диполи Q_y -переходов молекул субантенн Б808 и Б866 составляют с плоскостью мембраны углы соответственно $\sim 43^\circ$ и $\sim 8^\circ$ (Vasmel et al., 1986; Novoderezhkin et al., 1998; 1999). Для Б798 не существует однозначных данных об ориентации диполей Q_y -переходов БХл a этой промежуточной субантенны. В представленной работе проанализирован возможный путь оптимизации процесса переноса энергии Б740 \rightarrow Б798 \rightarrow Б808, состоящий в реализации оптимальной взаимной ориентации диполей Q_y -переходов пигментов трех указанных субантенн.

Модельные расчеты

Рассматривали только упорядоченные системы, так как оптимизировать можно только такие системы. В качестве исходной модели использована бесконечная трехмерная антенна (рис.1), обладающая трансляционной симметрией в направлении осей X и Y , с помощью которой она может быть получена из элементарных фрагментов, представляющих собой линейные «строительные блоки», параллельные оси Z и содержащие молекулы (или их кластеры) трех однородных субантенн – Б740, Б798 и Б808, причем последняя является терминальной акцепторной антенной, занимающей плоскость XY при $Z=0$. В верхней плоскости локализована часть субантенны Б740, являющаяся ближайшей к молекулам субантенны Б798. В соответствии с принятой моделью организации суперантенны зеленых бактерий (Scholes, 2010), мы предположили, что три субантенны локализованы в трех параллельных друг другу плоскостях. Длинная ось хлоросомы совпадает с направлением оси X на рис.1. Взаимная ориентация диполей Q_y -переходов молекул трех рассматриваемых субантенн (БХл c -олигомеров Б740 и молекул мономерных БХл a -субантенн Б798 и Б808) определяется углами α , β , $\Delta \equiv \alpha - \beta$ и φ (см. рис.1). Перенос энергии возбуждения между соседними субантеннами Б740 \rightarrow Б798 и Б798 \rightarrow Б808 считали индуктивно-резонансным (см. выше). В этом случае (Förster, 1948, 1965) вероятность передачи энергии электронного возбуждения в единицу времени от i -го узла решетки (донора) к j -му (акцептору), P_{ij} , зависит от расстояния R_{ij} между геометрическими центрами передающего и принимающего диполей (как R_{ij}^{-6}), их взаимной ориентации, т.е. ориентационного фактора k_{ij} (как k_{ij}^2), спектров поглощения и люминесценции донора и акцептора и параметров среды (показателя преломления среды на участке взаимодействия донорно-акцепторной пары, n_{ij}). Заметим, что величины показателей преломления среды n_{12} и n_{23} и расстояний R_{12} и R_{23} (см. рис.1) *in vivo* не известны. Однако, в наших расчетах абсолютные величины этих параметров не могут быть использованы принципиально, так как используемый метод матриц вероятностей, оперирующий величинами вероятностей P_{ij} , изменяющимися от 0 до 1, позволяет вычислять время лишь в некотором условном масштабе, который определяется не

абсолютными величинами P_{ij} , а лишь их соотношением, в частности, P_{12}/P_{21} и P_{12}/P_{23} . Поэтому мы провели широкое сканирование соотношения вероятностей P_{12}/P_{23} , достигающееся формальным четырехкратным изменением параметра $\gamma \equiv R_{12}/R_{23}$ (при $R_{13}=\text{const}$), вклад которого в изменения соотношений P_{12}/P_{23} рассматривали как суммарный эффект возможных вариаций всех неизвестных параметров *in vivo*. Расчеты проводились при $0.5 \leq \gamma \leq 2$.

В соответствии с выводами предыдущих работ (Кнох, 1977; Fetisova et al., 1989, 1992, 1996; Novoderezhkin et al., 2001), субантенну Б740 рассматривали как агрегат БХл с-кластеров (олигомеров) с сильной межмолекулярной связью в пределах каждого кластера и слабой связью между молекулами соседних кластеров. Поэтому каждый кластер рассматривали как единый передающий или принимающий диполь, что правомочно в пределе малого размера агрегата, т.е. при $N_{agr} < N_C$, где N_C – критический размер агрегата. Для агрегатов фотосинтетических пигментов $N_C \approx 5$ (Mukamel, 1995; Novoderezhkin et al., 1999). Наши расчеты проведены для агрегатов размером $N=4$ (Novoderezhkin et al., 2001; Valentin et al., 2002; Yakovlev et al., 2002). При моделировании спектров поглощения и флуоресценции субантенн использовали их природные спектры (Yakovlev et al., 2002; Yueyong et al., 2005). Для моделей, представленных на рис.1, вычисляли эффективность передачи энергии возбуждения Б740→Б798→Б808 при начальном возбуждении БХл с. В качестве меры этой эффективности рассматривали относительную величину времени (t) захвата 90% энергии возбуждения субантенной Б808, рассчитанного методом матриц вероятностей. Субантенну Б808 считали необратимой ловушкой (Vasmel et al., 1986).

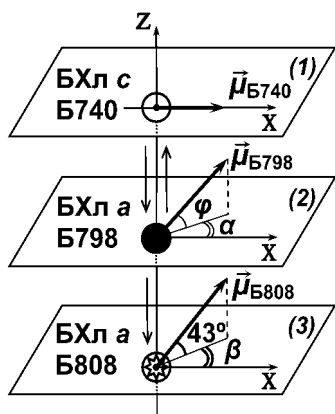


Рис. 1. «Строительный блок» модельной бесконечной трехмерной суперантенны, построенной из трех однородных субантенн: Б740, Б798 и Б808. Диполи Б740 – взаимно параллельны и ориентированы вдоль длинной оси хлоросомы (оси X). α – угол, образуемый проекцией вектора диполя Б798 на плоскость субантенны и осью X; φ – искомый угол наклона диполя Б798 к плоскости субантенны (мембраны); β – угол, образуемый проекцией вектора диполя Б808 на плоскость субантенны и осью X; диполь Б808 составляет с плоскостью мембраны $\sim 43^\circ$; $\alpha \in [0^\circ; 90^\circ]$; $\varphi \in (-90^\circ; 90^\circ)$; $\beta \in [0^\circ; 180^\circ]$.

Эффективностью функционирования моделей рис.1 можно активно управлять, варьируя взаимную ориентацию соседних диполей, т.е. величину ориентационного фактора, изменяющегося от 0 до 4 (Галанин, 1999). Ориентационные факторы k_{12}^2 и k_{23}^2 для процессов Б740→Б798 и Б798→Б808 в моделях рис.1, описываются уравнениями:

$$k_{12}^2 = (\cos \alpha \times \cos \varphi)^2 \quad \text{и} \quad k_{23}^2 = (\cos 43^\circ \times \cos \Delta \times \cos \varphi - 2 \sin 43^\circ \times \sin \varphi)^2 \quad (1),$$

в которых константы определяются известным углом наклона диполя Б808 к плоскости мембраны (43°); α – угол, образуемый проекцией вектора диполя Б798 на плоскость

субантенны и осью X ; угол $\Delta \equiv \alpha - \beta$ определяет взаимную ориентацию проекций векторов диполей Б798 и Б808 на плоскости субантенн ; угол φ определяет искомый угол наклона диполя Б798 к плоскости субантенны. В силу симметрии функций в уравнениях (1), расчеты времени переноса энергии $t(\alpha, \Delta, \varphi)$ проводили для $\Delta \in [0^\circ; 180^\circ]$; $\alpha \in [0^\circ; 90^\circ]$; $\varphi \in (-90^\circ; 90^\circ)$. Уравнения (1) определяют общее поведение функции $t(\alpha, \Delta, \varphi)$: для любой пары значений параметров α и Δ график функции $t(\varphi)$ должен иметь две ветви U-образной формы, каждая из которых имеет по две асимптоты, одну – общую для обеих ветвей, находящуюся в интервале $\varphi = \varphi_a \in [+28.2^\circ; -28.2^\circ]$, вторую – при $\varphi = \varphi_a = 90^\circ$ для одной ветви и $\varphi = \varphi_a = -90^\circ$ – для другой. Кроме того, прямая $\varphi = 0^\circ$ является осью зеркальной симметрии для графиков $t(\alpha, \Delta, \varphi)$ и $t(\alpha, 180^\circ - \Delta, -\varphi)$. Сказанное иллюстрирует рис.2, где для $\gamma = 0.5$ приведены два примера расчетной зависимости $t_{\text{Б740} \rightarrow \text{Б798} \rightarrow \text{Б808}}(\varphi)$ для двух пар параметров: $\alpha = 0^\circ, \Delta = 0^\circ$ и $\alpha = 0^\circ, \Delta = 180^\circ$.

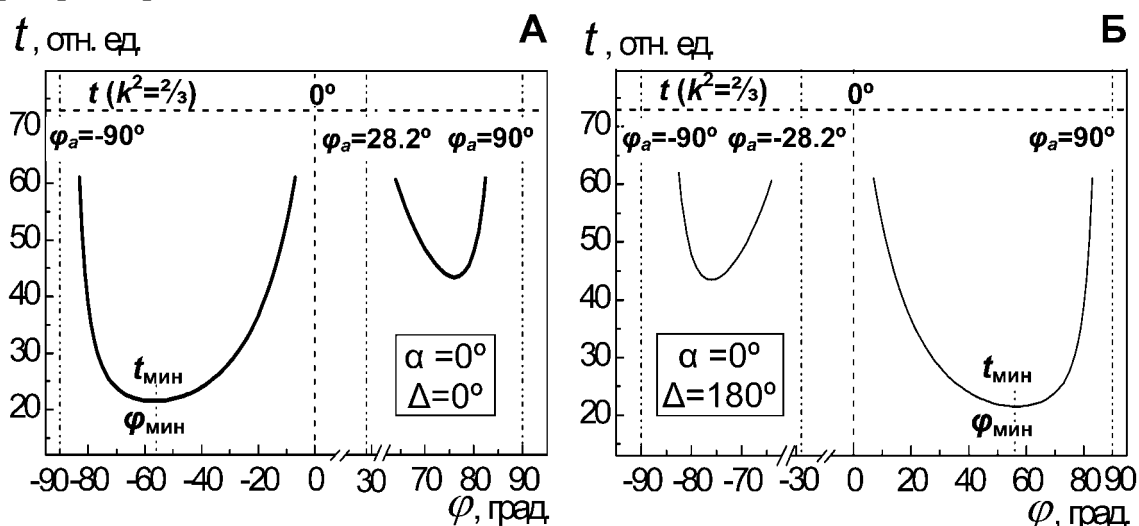


Рис. 2. Расчетные зависимости относительной величины времени t переноса энергии возбуждения Б740→Б798→Б808 в модели рис.1 от искомого угла φ для параметров $\alpha = 0^\circ, \Delta = 0^\circ$ (А) и $\alpha = 0^\circ, \Delta = 180^\circ$ (Б). Обозначения см. в тексте. Расчеты проведены при $\gamma = 0.5$. Горизонтальная пунктирная линия показывает относительную величину времени t_t переноса энергии возбуждения в той же модели при хаотичной ориентации диполей Б798 в трехмерном пространстве.

Минимальному времени переноса энергии Б740→Б798→Б808 соответствует главный экстремум расчетной зависимости $t(\alpha, \Delta, \varphi)$, $t_{\text{мин}}$, который определяет величину $\varphi_{\text{мин}}(\alpha, \Delta)$. В рассматриваемом случае $\varphi_{\text{мин}}(\alpha = 0^\circ, \Delta = 0^\circ/180^\circ) = \pm 56^\circ$, при этом время $t_{\text{мин}}$ – заметно меньше времени t_t , соответствующего тому же процессу переноса энергии при хаотической ориентации диполей Б798 в пространстве : $t_t / t_{\text{мин}} > 3$ (см. рис.2).

Для решения поставленной задачи были рассчитаны параметрические семейства зависимостей $t(\varphi)$ при всех возможных вариациях параметров α и Δ в заданных пределах при $0.5 \leq \gamma \leq 2$. В рассмотренных моделях максимальная скорость передачи энергии Б740→Б798→Б808, т.е. минимальное время этого процесса, $t_{\text{мин}}$, определяет соответствующее ему значение искомого угла $\varphi_{\text{мин}}$, т.е. угла наклона БХл a -диполей к плоскости

субантенны. Оптимальное значение $t_{\text{опт}}$ должно удовлетворять двум требованиям: $t_{\text{опт}} < t_r$ и $t_{\text{опт}}$ должно быть устойчивым к тепловому движению молекул. Мы полагали, что система устойчива, если значения $t_{\text{мин}}(\varphi_{\text{мин}})$ изменяются не более чем на 20% при колебаниях φ в пределах $\varphi = \varphi_{\text{мин}} \pm 10^\circ$. При этом эффективность описанной оптимизации структуры модельной суперантенны оценивалась соотношением времен $\eta \equiv t_r / t_{\text{опт}}$. Расчеты позволили определить устойчивую ориентацию диполей Q_y -переходов молекул БХл *a* Б798, минимизирующую время передачи энергии Б740→Б798→Б808, которая оказалась различной для трех предельных случаев кинетического сценария передачи энергии от Б740 к Б866, определяемых параметром γ . Для $\gamma = 1$: $\varphi_{\text{опт}} \in \pm [20^\circ; 32^\circ]$; $1.2 < \eta \leq 1.6$ при $\alpha \leq 30^\circ$ и $\Delta \leq 60^\circ$. Для $\gamma = 2$: $\varphi_{\text{опт}} \in \pm [0^\circ; 5^\circ]$; $1.3 < \eta \leq 1.6$ при $\alpha < 30^\circ$ и $\Delta \leq 45^\circ$. Для $\gamma = 0.5$: $\varphi_{\text{опт}} \in \pm [37^\circ; 70^\circ]$; $1.2 < \eta \leq 3.4$ при $\alpha \leq 75^\circ$ и любом значении Δ .

Эксперименты *in vivo* свидетельствуют о том, что лимитирующей стадией в переносе энергии Б740→Б798→Б808 является вторая стадия (для обзора см. Schmidt, Trissl, 1998), что в приведенных выше расчетах соответствует параметру $\gamma = 0.5$. Расчеты показали, что именно этот случай (в сравнении с двумя предыдущими) не имеет ограничения по Δ при максимальном диапазоне возможных значений α и обладает максимальными значениями η (см. также табл.1).

Таблица 1. Зависимости $\varphi_{\text{мин}}(\alpha, \Delta)$ и $\eta \equiv t_r / t_{\text{мин}}(\alpha, \Delta)$ при $\gamma=0.5$

Δ , град.	$\alpha = 0^\circ$		$\alpha = 30^\circ$		$\alpha = 45^\circ$		$\alpha = 75^\circ$	
	η	$\varphi_{\text{мин}}$, град.	η	$\varphi_{\text{мин}}$, град.	η	$\varphi_{\text{мин}}$, град.	η	$\varphi_{\text{мин}}$, град.
0	3.4	-56	3.3	-55	3.2	-53	2.1	-37
30	3.2	-59	3.1	-57	3.0	-55	1.9	-39
45	2.9	-61	2.9	-59	2.8	-57	1.8	-41
90	2.2	± 70	2.2	± 69	2.0	± 65	> 1.2	± 52

Анализ параметрических зависимостей $\eta(\alpha, \Delta, \varphi_{\text{опт}})$ при $\gamma=0.5$ в найденном диапазоне оптимальных значений $\varphi_{\text{опт}} \in [37^\circ; 70^\circ]$ показал, что середина найденного интервала значений $\varphi_{\text{опт}}$ обладает уникальным свойством, а именно : при $\varphi_{\text{опт}} \approx 54^\circ$, близкому к значению магического угла 54.7° , эффективность функционирования суперантенны $\eta(\alpha, \Delta, \varphi_{\text{опт}} = 54^\circ \pm 3^\circ)$ практически не отличается от показанной в табл.1 зависимости $\eta(\alpha, \Delta, \varphi_{\text{опт}} \in [37^\circ; 70^\circ])$. В этом случае ориентация БХл *a*-диполей Б798 в пространстве определяется фиксированным углом наклона этих диполей к плоскости субантенны Б798, т.е. углом $\varphi_{\text{опт}} \approx 54^\circ$ при любом из рассмотренных значений параметров α и Δ , что соответствует максимальной скорости процесса передачи энергии Б740→Б798→Б808, т.е. максимальным значениям $\eta \equiv t_r / t_{\text{опт}} = \eta(\alpha, \Delta, \varphi_{\text{опт}})$.

Таким образом, проведенные расчеты показали, что в БХл *a*-субантенне Б798, состоящей из упорядоченных линейных цепочек БХл *a*-белковых комплексов [Oostergetel

et al., 2010] , искомая ориентация БХл a -диполей, определяемая найденным интервалом оптимальных углов наклона этих диполей к плоскости Б798 (мембраны), $\varphi_{\text{опт}} \in [37^\circ; 70^\circ]$, соответствует двум различным моделям их оптимальной упорядоченности : **(1)** В первой модели ориентация БХл a -диполей в пространстве строго определена переменным углом ($\varphi_{\text{опт}}$) наклона диполей к плоскости субантенны, который зависит от углов α и Δ : $\varphi_{\text{опт}} = \varphi_{\text{опт}}(\alpha, \Delta)$, причем $\varphi_{\text{опт}}$ изменяется в пределах ~ 30 -градусного интервала своих значений – $\varphi_{\text{опт}} \in [37^\circ; 70^\circ]$. Таким образом, эта модель описывает трехосное распределение ориентаций БХл a -диполей в пространстве. **(2)** Во второй модели ориентация БХл a -диполей в пространстве определяется одним параметром – фиксированным углом наклона этих диполей к плоскости мембраны, т.е. углом $\varphi_{\text{опт}} = 54^\circ \pm 3^\circ$ при любом из рассмотренных значений параметров α и Δ [Yakovlev et al., 2010]. Таким образом, вторая модель описывает одноосное распределение ориентаций БХл a -диполей, хаотично (т.е. – в среднем – изотропно) ориентированных вокруг нормали к плоскости Б798 с углом наклона к этой плоскости $\varphi_{\text{опт}} \approx 54^\circ$.

Таким образом, расчеты показали, что оптимальное сопряжение ориентаций векторов дипольных моментов Q_y -переходов пигментов светособирающих субантенн приводит к устойчивой минимизации времени переноса энергии между ними, что и обеспечивает высокую эффективность и стабильность функционирования всей суперантенны в целом. Это позволило определить круг моделей, соответствующих оптимальной ориентации диполей Q_y -переходов молекул БХл a -субантенны Б798 в суперантенне *S.aurantiacus*. Заметим, что все выводы сделаны для одиночной хлоросомы.

Недавно методом спектроскопии одиночной молекулы при 13 К было показано, что ориентация диполей излучательных переходов БХл a в хлоросоме *S.tepidum* имеет трехосный характер, а в хлоросоме *S.aurantiacus* – одноосный (Shibata et al., 2009). Это позволило предположить, что из двух предложенных нами моделей ориентации БХл a -диполей *in vivo* реализуется вторая модель, что и было исследовано экспериментально.

Экспериментальное исследование ориентации диполей Q_y -переходов молекул БХл a в субантенне Б798 зеленых бактерий *S.aurantiacus*

Для экспериментального исследования ориентационной упорядоченности векторов дипольных моментов Q_y -переходов БХл a субантенны Б798 *S.aurantiacus* использовали метод дифференциальной абсорбционной спектроскопии с фемтосекундным разрешением. Измерения проводили на изолированных хлоросомах *S.aurantiacus* при помощи лазерной системы, описанной ранее (Yakovlev et al. 2002). На рис.3 приведены дифференциальные (свет – темнота) анизотропные спектры поглощения БХл a Б798 изолированных хлоросом *S.aurantiacus* (верхняя панель), измеренные при комнатной температуре при прямом возбуждении Q_y -полосы БХл a Б798, с разной временной задержкой с точностью до 1 фс. Угол между векторами поляризации возбуждающего и

зондирующего лучей составлял 0° (параллельная составляющая спектров, A_{\parallel}) или 90° (перпендикулярная составляющая спектров, A_{\perp}). Соответствующее распределение значений параметра анизотропии сигнала $r(\lambda) = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + 2A_{\perp})$ по Q_y -полосе поглощения БХл a субантенны Б798, вычисленное из спектров, измеренных при разных временных задержках (от 200 фс до 100 пс), показано на нижней панели. Рис. 3 демонстрирует мономерную природу БХл a . Параметр анизотропии $r(\lambda) = \text{const}$ по всей Q_y -полосе поглощения БХл a субантенны Б798, а его значение изменяется от максимально возможного, $r = 0.4$ (при задержке 200 фс) до $r = 0.1$ (стационарное значение).

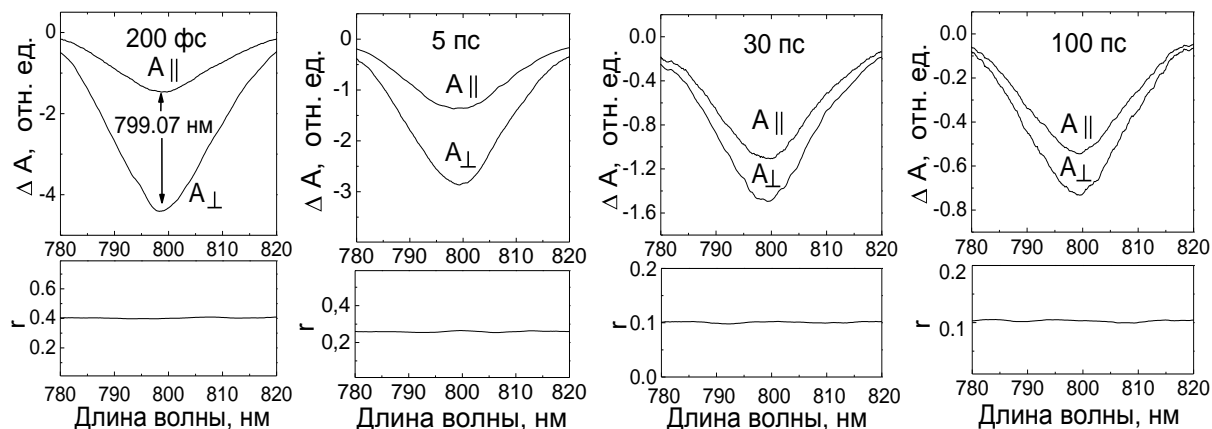


Рис. 3. Верхняя панель: Анизотропные дифференциальные (свет – темнота) спектры Q_y -полосы поглощения БХл a субантенны Б798 изолированных хлоросом *S.aurantiacus*, измеренные при комнатной температуре с разной временной задержкой (от 200 фс до 100 пс) при прямом возбуждении Q_y -полосы поглощения БХл a ($\lambda_{\text{возб.}} = 800$ нм). Нижняя панель: Распределение значений параметра анизотропии $r(\lambda) = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + 2A_{\perp})$ по Q_y -полосе поглощения БХл a , вычисленное для соответствующих спектров, приведенных на верхней панели. Значения $r(\lambda)$ получены усреднением 50000 спектров.

В теории поляризационной спектроскопии, развитой для анализа ориентации антенных пигментов пурпурных бактерий (Parson, 1999; Novoderezhkin, van Grondelle, 2002), выведено аналитическое выражение $r(\varphi)$ для зависимости стационарного значения параметра анизотропии (r) при одноосной ориентации диполей Q_y -переходов поглощения мономеров БХл a от угла (φ) наклона диполей к плоскости антенны при их хаотичной ориентации вокруг нормали к этой плоскости:

$$r(\varphi) = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + 2A_{\perp}) = 0.1 (3 \cos^2 \varphi - 2)^2$$

Эта теоретическая зависимость (рис.4) применима к анализу приведенных выше поляризационных дифференциальных спектров Q_y -полосы поглощения БХл a субантенны Б798 изолированных хлоросом *S.aurantiacus*, измеренных с целью экспериментальной проверки предложенной нами для этой субантенны модели оптимальной одноосной ориентации БХл a -диполей, хаотично (т.е. – в среднем – изотропно) ориентированных вокруг нормали к мембране с углом наклона к плоскости мембраны $\varphi_{\text{опт}} \approx 54^\circ$.

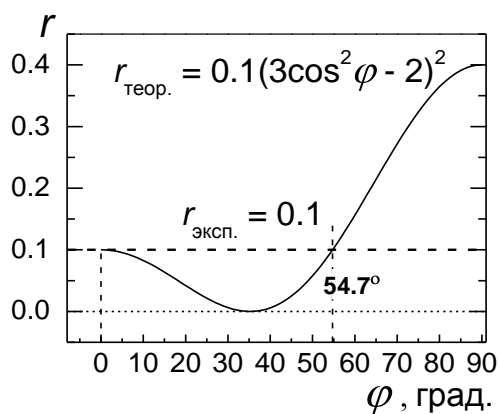


Рис. 4. Теоретическая зависимость (сплошная кривая) стационарного значения параметра анизотропии (r) от угла наклона (φ) векторов дипольных моментов Q_y -переходов БХл a субантенны Б798 к плоскости базовой пластинки (мембраны) при хаотичной (т.е. – в среднем – изотропной) ориентации этих диполей вокруг нормали к мембране. Экспериментальное значение $r_{\text{эксп.}}$ показано пунктирной прямой :

$$r_{\text{эксп.}} = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + 2A_{\perp}) = 0.1$$

Искомый угол φ , соответствующий экспериментальному значению $r = 0.1$, оказался равным магическому углу $\varphi = 54.7^\circ$ (см. рис.4), что хорошо согласуется с предсказанным теоретически в наших модельных расчетах оптимальным значением угла $\varphi_{\text{опт}} \approx 54^\circ$.

Таким образом, представленные результаты подтвердили концепцию жесткой оптимизации структуры фотосинтезирующего аппарата по функциональному критерию.

Поиск оптимального сопряжения субантенн в суперантенне фотосинтезирующих зеленых бактерий семейства *Oscillochloridaceae*

Светособирающая суперантенна *O.trichoides* локализована в отдельных субклеточных структурах - хлоросоме, содержащей олигомерную БХл c -субантенну Б750, и цитоплазматической мембране, содержащей БХл a -субантенну Б805-860, являющуюся, по-видимому, аналогом мембранной субантенны Б808-866 *S.aurantiacus*, что предполагает сходную топографию пигментов в мономерных (Б808 и Б805) и олигомерных (Б866 и Б860) компонентах этих мембранных субантенн (рис.5).

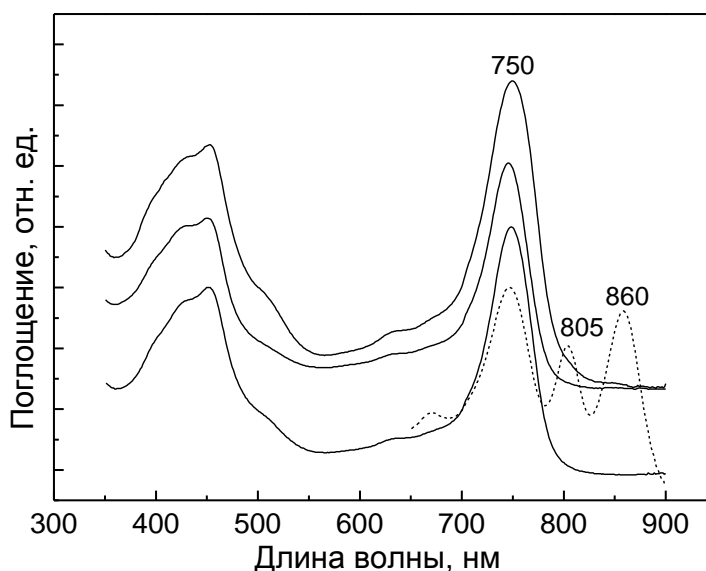


Рис. 5. Спектры поглощения (сверху вниз) интактных клеток *O.trichoides* и изолированных из них хлоросом-мембранных комплексов, хлоросом и мембранной фракции Б805-860, в которой полоса с пиком 750 нм обусловлена наличием остатков хлоросом. Пики 750 нм смещены по ординате друг относительно друга.

Электронно-микроскопический анализ тонких срезов клеток *O.trichoides* показал,

что хлоросомная и мембранная субантенны разделены четко видимой пластинчатой структурой толщиной 3–4 нм (рис.6), похожей по форме и толщине на базовую пластинку в зеленых бактериях двух других семейств, *Chloroflexaceae* и *Chlorobiaceae*, содержащую БХл *a*-субантенну, сопрягающую хлоросомную БХл *c/d/e*- и мембранную БХл *a*-субантенны (Frigaard, Bryant, 2006). Однако, в спектрах поглощения изолированных хлоросом *O.trichoides*, в отличие от хлоросом *Chloroflexaceae* и *Chlorobiaceae*, БХл *a*-компонент не наблюдается (рис.5). Косвенные данные свидетельствуют о наличии в выделенных хлоросомах *O.trichoides* следовых количеств БХл *a*, который, однако, может быть остаточным БХл *a* субантенны Б805-860 (рис.5). Это ставит проблему теоретического обоснования необходимости существования в суперантенне *O.trichoides* промежуточной БХл *a*-субантенны Бх для оптимизации переноса энергии от хлоросомной Б750 к мембранной Б805 субантенне (Зобова с соавт., 2010).

Модельные расчеты

В качестве исходной модели использовалась бесконечная трехмерная антенна, обладающая трансляционной симметрией вдоль осей *X* и *Y*, с помощью которой она может быть получена из линейных «строительных блоков», параллельных оси *Z* и содержащих молекулы (или молекулярные кластеры) двух (рис.7, слева) или трех (рис.7, справа) однородных субантенн, хлоросомной олигомерной БХл *c*-субантенны Б750, мономерной БХл *a*-субантенны Бх с переменным энергетическим положением $750 \text{ нм} < X < 805 \text{ нм}$ и мембранной мономерной антенны Б805. Б805 играет роль терминальной акцепторной субантенны, занимая плоскость *XY* при *Z*=0. Верхняя плоскость занята БХл *c*-кластером Б750, ближайшим к акцептору, Б805 или Бх. Субантенна Б750 рассматривалась как агрегат БХл *c*-кластеров с сильной связью внутри кластера и слабой - между соседними кластерами. Каждый кластер содержал *N*=5 молекул БХл *c*, что соответствует пределу малого агрегата (Novoderezhkin et al., 2001), и рассматривался как единая квантово-механическая система.

Расстояния между молекулами соседних субантенн рис.7 можно оценить, исходя из предположения, что гипотетическая субантенна Бх локализована в базовой пластинке, толщина которой *in vivo* не превышает 4 нм (рис.6), что в совокупности с критериями, использованными при описании переноса энергии между похожими субантеннами зеленых бактерий *S.aurantiacus*, позволяет предположить индуктивно-резонансный характер переноса энергии в обеих донорно-акцепторных парах (Yang and Fleming, 2002). В этом случае вероятность передачи энергии электронного возбуждения от *i*-го узла решетки (донора) к *j*-му (акцептору), P_{ij} , зависит от расстояния R_{ij} между геометрическими центрами передающего и принимающего диполей, их взаимной ориентации, определяемой ориентационным фактором k_{ij} , спектров поглощения и люминесценции донора и акцептора и параметров среды (показателя преломления среды

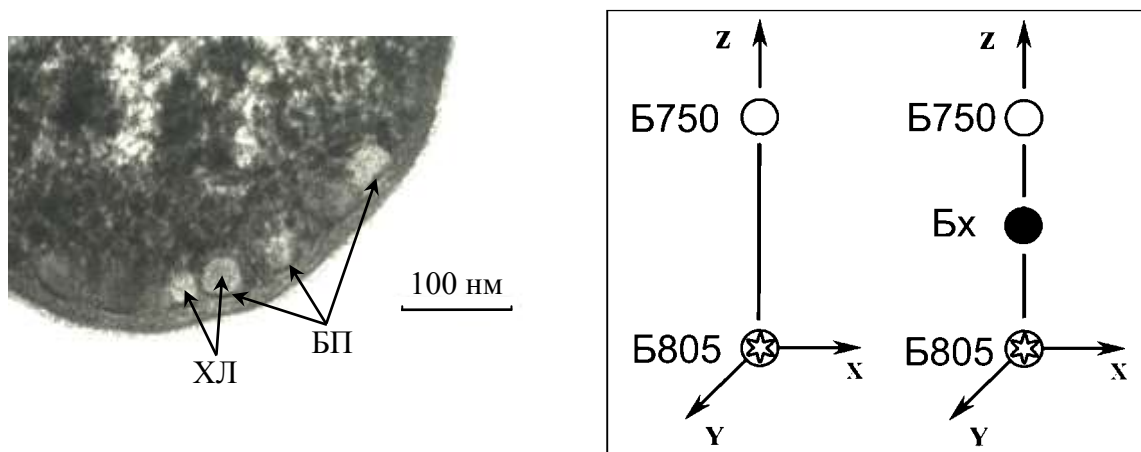


Рис. 6. Электронная микрофотография ультратонких срезов клеток *O. trichoides*. Обозначения: ХЛ – хлоросома; БП – базовая пластинка. Бар – 100 нм.

Рис. 7. Модели бесконечной трехмерной антенны, обладающей трансляционной симметрией в направлении осей X и Y , с помощью которой она может быть получена из элементарных фрагментов, представляющих собой линейные одномерные антенные «единичные строительные блоки», параллельные оси Z и содержащие молекулы (или молекулярные кластеры) двух (слева) или трех (справа) однородных субантенн: хлоросомной субантенны Б750, гипотетической субантенны Бх с переменным энергетическим положением $770 \text{ нм} < X < 805 \text{ нм}$ и мембранной субантенны Б805, играющей роль ловушки.

на участке взаимодействия донорно-акцепторной пары, n_{ij}) (Förster, 1965). Величины ориентационных факторов k_{12} и k_{23} , показателей преломления среды n_{12} и n_{23} и расстояний R_{12} и R_{23} (см. рис.7) для суперантенны *O. trichoides in vivo* не известны. Однако, в наших расчетах абсолютные величины этих параметров принципиально не могут быть использованы, так как метод матриц вероятностей оперирует величинами вероятностей P_{ij} , изменяющимися от 0 до 1, и позволяет вычислять время лишь в некотором условном масштабе, который определяется не абсолютными величинами P_{ij} , а их соотношением, в частности, P_{12}/P_{21} и P_{12}/P_{23} . Поэтому мы использовали широкое сканирование соотношения вероятностей P_{12}/P_{23} , достигающееся формальным четырехкратным изменением параметра $\gamma \equiv R_{12}/R_{23}$ (при постоянном R_{13}), вклад которого в изменения соотношения P_{12}/P_{23} рассматривался как возможный суммарный эффект вариаций всех неизвестных параметров *in vivo* (k , n и R). Все расчеты проводились для $0.5 \leq \gamma \leq 2$. Спектры нативных субантенн *O. trichoides* (рис.5 ; Taisova et al., 2002) моделировали спектры субантенн Б750 и Б805. Соответствующие спектры для субантенны Бх были выбраны исходя из предположения, что субантенна является мономерной, а ее спектральные характеристики подобны таковым для мономерной БХл α -субантенны Б798 зеленых бактерий *S. aurantiacus* (Taisova et al., 2002; Montaño et al., 2003). В качестве меры эффективности процессов Б750→Б805 и Б750→Бх→Б805 рассматривалась относительная величина времени (t) захвата 90% энергии возбуждения субантенной Б805, рассчитанного методом матриц вероятностей (Fetisova et al., 1989).

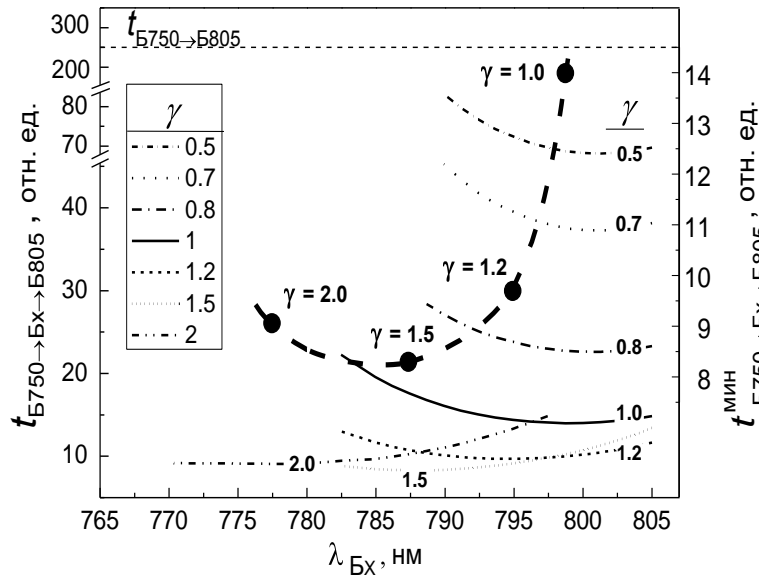


Рис. 8. Зависимости относительной величины времени переноса энергии $B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805$, $t_{B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805}$ (левая ордината, тонкие линии), и минимального времени этого процесса, $t_{B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805}^{\text{мин}}$ (правая ордината, жирная кривая), от энергетического положения (λ_{Bx}) промежуточной субантенны Bx ($770 \text{ нм} < \lambda_{Bx} < 805 \text{ нм}$) при $0.5 \leq \gamma \leq 2$. Пунктирная прямая $t_{B750 \rightarrow B805}$ соответствует времени прямого переноса энергии $B750 \rightarrow B805$.

На рис.8 показано параметрическое семейство кривых, каждая из которых представляет собой расчетную зависимость относительной величины времени (t) переноса энергии возбуждения $B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805$ от энергетического положения (λ_{Bx}) гипотетической субантенны Bx ($770 \text{ нм} < \lambda_{Bx} < 805 \text{ нм}$), т.е. $t_{B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805}(\lambda_{Bx})$ при различных значениях параметра γ . Пунктирная прямая соответствует времени прямого переноса энергии возбуждения от $B750$ к $B805$, $t_{B750 \rightarrow B805}$. Эффективность описанной оптимизации структуры модельной суперантенны по функциональному критерию оценивалась соотношением времен: $\eta \equiv t_{B750 \rightarrow B805} / t_{B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805}^{\text{мин}}$ (табл.2).

Таблица 2. Эффективность оптимизации структуры $\eta \equiv t_{B750 \rightarrow B805} / t_{B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805}^{\text{мин}}$ при $0.5 \leq \gamma \leq 2$

η	4	7	12	18	26	30	28
$\lambda_{Bx} (t_{B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805}^{\text{мин}}), \text{ нм}$	801	801	801	799	795	787	778
γ	0.5	0.7	0.8	1.0	1.2	1.5	2.0

Расчеты (см. рис.8 и табл.2) показали, что

- (1) время прямого переноса энергии возбуждения $t_{B750 \rightarrow B805}$ существенно больше (в 3–30 раз), чем время $t_{B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805}$ при наличии гипотетической промежуточной субантенны Bx с любым энергетическим положением λ_{Bx} в исследованном диапазоне, $770 \text{ нм} < \lambda_{Bx} < 805 \text{ нм}$;
- (2) каждая параметрическая кривая $t_{B750 \rightarrow Bx \rightarrow B805}(\lambda_{Bx})$ демонстрирует наличие устойчивого индивидуального минимума. Это означает, что при введении промежуточной субантенны Bx , при любом значении параметра $0.5 \leq \gamma \leq 2$, всегда найдется соответствующий интервал изменений λ_{Bx} ($770 \text{ нм} < \lambda_{Bx} < 805 \text{ нм}$), в котором можно

управлять эффективностью функционирования суперантенны Б750–Бх–Б805-860 путем вариации энергетического положения субантенны Бх ; (3) для каждой параметрической кривой $t_{Б750 \rightarrow Бх \rightarrow Б805}(\lambda_{Бх})$ значение $\lambda_{Бх}$, соответствующее минимальному времени этого процесса, зависит от параметра γ и варьирует в достаточно узком спектральном интервале – от ~800 до ~780 нм, т.е. в пределах ~20 нм, – при увеличении параметра γ соответственно от 0.5 до 2.0. Таким образом, увеличение γ отвечает за коротковолновый сдвиг $\lambda_{Бх}(t^{\text{мин}})$; (4) минимум каждой параметрической кривой $t^{\text{мин}}_{Б750 \rightarrow Бх \rightarrow Б805}(\lambda_{Бх})$ соответствует максимальному эффекту оптимизации структуры модельной суперантенны по функциональному критерию, $\eta = t_{Б750-Б805} / t^{\text{мин}}_{Б750-Бх-Б805}$, который зависит от параметра γ и варьирует от $\eta \approx 4$ (при $\gamma = 0.5$) до $\eta \approx 28$ (при $\gamma = 2.0$); (5) максимальный эффект оптимизации (η) путем введения промежуточной субантенны Бх при вариации γ от 0.5 до 2.0 достигается для $\gamma=1.5$ при $\lambda_{Бх} \approx 787$ нм и составляет $\eta \approx 30$. Интересно отметить, что значительный эффект оптимизации ($\eta = 18 \div 26$), близкий к своему верхнему пределу $\eta = 30$, достигается в довольно узком диапазоне значений $\gamma=1.0 \div 1.2$ при энергетическом положении субантенны Бх в диапазоне 795-799 нм, характерном для аналогичных субантенн двух других семейств зеленых бактерий.

Проведенные расчеты показали, что введение промежуточной субантенны Бх с энергетическим положением в интервале ~ (790–800) нм обеспечивает оптимальное сопряжение энергетических уровней хлоросомной и мембранной субантенн *O.trichoides*, Б750 и Б805, что приводит к устойчивой минимизации времени переноса энергии от Б750 к Б805, а, значит, и к уменьшению тривиальных энергетических потерь и, следовательно, к увеличению эффективности функционирования всей суперантенны в целом.

Таким образом, биологическая целесообразность существования в суперантенне *O.trichoides* промежуточной субантенны, сопрягающей хлоросомную БХл с-субантенну Б750 с мембранной БХл а-субантенной Б805-860, теоретически обоснована.

Экспериментальное доказательство существования
в хлоросоме зеленых бактерий *O.trichoides* БХл а-субантенны, сопрягающей
хлоросомную БХл с-субантенну Б750 с мембранной БХл а-субантенной Б805-860

Модельные расчеты показали, что наличие промежуточной субантенны БХл а с энергетическим положением в интервале ~ (790–800) нм обеспечивает оптимальное сопряжение энергетических уровней хлоросомной Б750 и мембранной Б805 субантенн *O. trichoides*, что свидетельствует о биологической целесообразности существования такой субантенны. Это позволило предположить, что обнаруженное ранее наличие в выделенных хлоросомах *O. trichoides* следовых количеств БХл а свидетельствует о существовании *in vivo* искомой БХл а-субантенны, локализованной в базовой пластинке хлоросомы *O. trichoides*.

Для доказательства этого положения была проведена единая серия экспериментов

на идентичных образцах хлоросом из пяти разных посевов культур клеток *O. trichoides* : (1) селективное удаление БХл *a*-компонентов из выделенных хлоросом (при сохранении интактности БХл *c*-субантенны Б750) – методом щелочной обработки изолированных хлоросом; (2) идентификация состава пигментов в изолированных хлоросомах – до и после селективного удаления БХл *a* – с помощью (а) спектрального анализа экстрактов пигментов хлоросом и (б) метода низкотемпературной флуоресцентной спектроскопии; (3) идентификация состава белков в хлоросомах *O. trichoides* и *C. aurantiacus* (в качестве контроля) – до и после селективного удаления БХл *a* – методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (Зобова с соавт., 2008).

Для селективного удаления БХл *a*-компонентов из выделенных хлоросом *O. trichoides* (и *C. aurantiacus* – для последующего контроля результатов) использовали метод щелочной обработки хлоросом, разработанный для хлоросом *C. aurantiacus* (Sakuragi et al., 1999).

На рис.9 представлены спектры поглощения нативных (сплошная линия) и подвергнутых щелочной обработке (пунктирная линия) хлоросом *O. trichoides* при комнатной температуре в трис-буфере (А) и в смеси ацетон-метанол (Б).

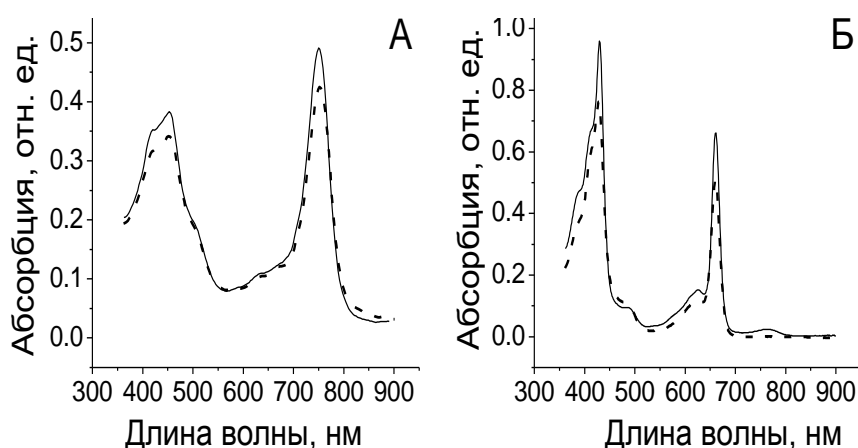


Рис. 9. Спектры поглощения нативных (сплошная линия) и подвергнутых щелочной обработке (пунктирная линия) хлоросом *O. trichoides*: (А) в 50 мМ трис-буфере (рН 8.0), (Б) в смеси ацетон-метанол (7:2).

В спектре поглощения нативных хлоросом визуально присутствует только полоса поглощения БХл *c* с пиком ~ 750 нм (как об этом и было сказано ранее : см. рис.5). Поэтому и в спектре хлоросом, подвергнутых щелочной обработке, нельзя было ожидать появления полосы поглощения БХл *a* , что и демонстрирует рис.9А. Однако, эти эксперименты содержат важную информацию о том, что щелочная обработка не влияет на форму спектра поглощения хлоросомного БХл *c*.

Присутствие БХл *a* в хлоросомах *O. trichoides* визуализируется в спектре поглощения экстракта нативных хлоросом в смеси ацетон-метанол (рис.9Б), где в ближней инфракрасной области четко видны две полосы поглощения с пиками 663 и 769 нм соответственно мономерного БХл *c* и мономерного БХл *a* в этом растворителе. В

спектре же поглощения экстракта хлоросом, подвергнутых щелочной обработке, присутствует только полоса поглощения БХл *c* (с пиком 663 нм).

Таким образом, при щелочной обработке хлоросом *O.trichoides* происходит селективное удаление БХл *a* с сохранением интактности БХл *c*-субантенны Б750. Это свидетельствует о наличии в хлоросомах *O.trichoides* пространственно обособленных друг от друга БХл *c*- и БХл *a*-содержащих структур.

Приведенные данные о составе пигментов в изолированных хлоросомах *O.trichoides* – до и после их щелочной обработки – получили независимое подтверждение при использовании флуоресцентной спектроскопии. На рис.10 представлены спектры флуоресценции нативных и подвергнутых щелочной обработке хлоросом *O.trichoides* (в восстановительных условиях) при температурах 293К и 77К при возбуждении Q_y -полосы поглощения БХл *c* ($\lambda_{\text{возб}} = 720$ нм).

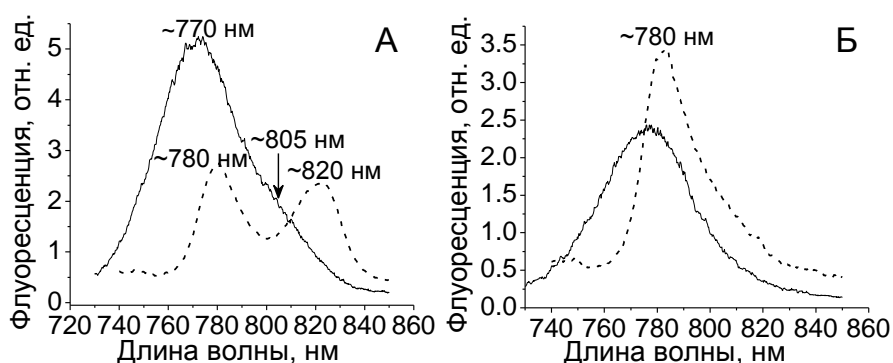


Рис. 10. Спектры флуоресценции нативных (А) и подвергнутых щелочной обработке (Б) хлоросом *O.trichoides* при температурах 295К (сплошные линии) и 77К (пунктирные линии).

В спектре флуоресценции нативных хлоросом при 293К (рис.10А, сплошная линия) наблюдается доминирующая полоса флуоресценции БХл *c* (с пиком ~ 770 нм) и на ее длинноволновом крыле – слабо выраженное плечо в области ~ 805 нм, принадлежащее флуоресценции БХл *a*, зарегистрированного в спектре поглощения экстракта нативных хлоросом (см. рис.9Б). При 77 К обе полосы флуоресценции нативных хлоросом – БХл *c* (с пиком ~780 нм) и БХл *a* (с пиком ~820 нм) – имеют равные амплитуды, немного сдвигаясь в длинноволновую сторону (рис.10А, пунктирная линия).

Однако, в спектрах флуоресценции хлоросом, подвергнутых щелочной обработке (рис.10Б), присутствует – как и ожидалось – лишь одна полоса с пиком ~780 нм, принадлежащая флуоресценции БХл *c* как при 293К (сплошная линия), так и при 77 К (пунктирная линия), что находится в полном соответствии с показанным выше (см. рис.9) избирательным удалением БХл *a* из хлоросом при их щелочной обработке.

Таким образом, наличие в спектрах флуоресценции нативных хлоросом полосы флуоресценции БХл *a* при возбуждении Q_y -полосы поглощения БХл *c* свидетельствует не только о наличии в хлоросомах *O.trichoides* БХл *a*-компонента, но и о переносе

энергии возбуждения от БХл *c* к БХл *a*, т.е. о функционировании БХл *a*-компонента в хлоросомах *O.trichoides* в качестве акцепторной субантенны. Заметим, что БХл *a*-компонент хлоросом *O.trichoides* и БХл *a* Б798 хлоросом *S.aurantiacus* демонстрируют почти идентичные параметры спектров их флуоресценции как при 293К (пик ~805 нм), так и при 77К (пик ~820 нм) (рис.10А; van Dorssen et al., 1986; Mairing et al., 1999).

Для представителей двух других семейств зеленых бактерий – *Chloroflexaceae* и *Chlorobiaceae* – известны как состав хлоросомных белков, так и места их локализации. Кроме того, известно, что в их хлоросомах БХл *a*-субантенна локализована в базовой пластинке хлоросомы и представляет собой комплекс БХл *a* с определенным белком. Отметим, что *S.aurantiacus* является к настоящему времени единственным объектом, из которого удалось выделить и подробно охарактеризовать БХл *a*-субантенну Б798 (Montaño et al., 2003). Это открыло возможность сравнительного анализа неизвестного белкового состава хлоросом *O.trichoides* с известным – в хлоросомах *S.aurantiacus*. Проведение такого анализа одновременно для нативных и подвергнутых щелочной обработке хлоросом *O.trichoides* и *S.aurantiacus* позволяет идентифицировать наличие или отсутствие связи БХл *a*-компонента хлоросом *O.trichoides* с каким-либо белком. С этой целью была проведена идентификация состава белков в нативных и подвергнутых щелочной обработке хлоросомах *O.trichoides* и *S.aurantiacus* методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (Zobova et al., 2008).

На рис.11 показаны электрофореграммы нативных и подвергнутых щелочной обработке хлоросом *S.aurantiacus* (А) и *O.trichoides* (Б).

В нативных хлоросомах *S.aurantiacus* (рис.11А, дорожка 2) четко выражено наличие трех полос, соответствующих трем основным белкам, обнаруженным ранее в хлоросомах *S.aurantiacus*: CsmA, CsmM, CsmN с молекулярными массами соответственно 5.7, 11 и 18 кДа (Sakuragi et al., 1999; Montaño et al., 2003). При этом было показано, что CsmA белок с молекулярной массой 5,7 кДа образует комплекс с БХл *a*, формирующий БХл *a*-субантенну Б798, локализованную в базовой пластинке хлоросомы *S.aurantiacus* (Montaño et al., 2003).

Электрофореграмма нативных хлоросом *O.trichoides* четко показывает, что три основные полосы, соответствующие трем основным белкам хлоросом *O.trichoides*, идентичны трем основным белкам хлоросом *S.aurantiacus* - CsmA, CsmM, CsmN с молекулярными массами соответственно 5.7, 11 и 18 кДа (рис.11Б, дорожка 2). Кроме того, были выявлены два минорных белка с молекулярными массами 9,5 и 21 кДа. Все пять белков хлоросом *O.trichoides* отчетливо видны как после окраски гелей Кумасси бриллиантовым синим (рис.11Б, дорожка 2), так и после окраски серебром (не показано).

Таким образом, состав основных белков (с молекулярными массами 5.7, 11 и 18 кДа) в нативных хлоросомах *S.aurantiacus* и *O.trichoides* одинаков, что позволило – по

аналогии с *C.aurantiacus* – предположить наличие комплекса БХл *a*-компонента хлоросом *O.trichoides* с хлоросомным белком CsmA (5.7 кДа). С целью проверки этого предположения был проведен сравнительный анализ белкового состава хлоросом *C.aurantiacus* и *O.trichoides*, подвергнутых щелочной обработке.

На рис.11А (дорожка 3) показан эффект щелочной обработки на основные белки хлоросом *C.aurantiacus*, а именно – селективное удаление из хлоросом одного из трех основных хлоросомных белков – белка CsmA (5.7 кДа), который в комплексе с БХл *a* образует хлоросомную субантенну Б798 (Montaño et al., 2003).

Как было показано выше, при щелочной обработке хлоросом *O.trichoides* происходит селективное удаление БХл *a* с сохранением интактности БХл *c*-субантенны Б750 (рис.9,10). Рис.11Б (дорожка 3) показывает, что щелочная обработка хлоросом *O.trichoides* (наряду с селективным удалением БХл *a*), приводит и к селективному удалению из хлоросом одного белка *O.trichoides* – CsmA (5.7 кДа) – и практически не оказывает влияния на остальные четыре белка.

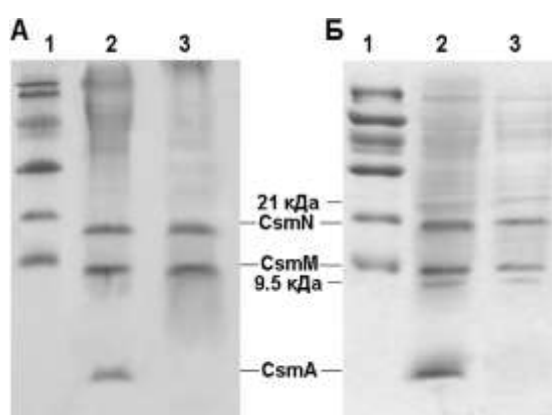


Рис. 11. Окрашенные Кумасси R-250 электрофореграммы нативных и подвергнутых щелочной обработке хлоросом *C.aurantiacus* (А) и *O.trichoides* (Б). А: дорожка 1 – белки-маркеры; дорожка 2 – нативные хлоросомы *C.aurantiacus*; дорожка 3 – обработанные щелочью хлоросомы *C.aurantiacus*. Б: дорожка 1 – белки-маркеры; дорожка 2 – нативные хлоросомы *O.trichoides*; дорожка 3 – обработанные щелочью хлоросомы *O.trichoides*. Образцы хлоросом *C.aurantiacus* содержали 3 мкг БХл *c*. Образцы хлоросом *O.trichoides* содержали 18-20 мкг БХл *c*.

Проведенные эксперименты продемонстрировали четкую корреляцию между CsmA белком (5.7 кДа) и хлоросомным БХл *a*-компонентом *O.trichoides*, поскольку одновременное селективное исчезновение из хлоросом и БХл *a*-компонента, и белка CsmA предполагается только в случае локализации обоих компонентов в периферийной структуре хлоросомы, т.е. вне БХл *c*-структуры, а, значит, внутри базовой пластинки хлоросомы (см. рис.6). Представленная серия экспериментов подтвердила выводы модельных расчетов (Зобова с соавт., 2010) о биологической целесообразности существования такой БХл *a*-субантенны в суперантенне *O. trichoides*.

Таким образом, был сделан однозначный вывод о том, что найденный в изолированных хлоросомах зеленых бактерий семейства *Oscillochloridaceae* минорный БХл *a*-компонент связан с белком с молекулярной массой 5.7 кДа и локализован в базовой пластинке, выполняя роль искомой БХл *a*-субантенны, осуществляющей оптимальное сопряжение хлоросомной БХл *c*-субантенны Б750 и мембранной БХл *a*-субантенны Б805-860 в суперантенне *O. trichoides*.

Заключение

Результаты проведенного цикла теоретических и экспериментальных исследований подтвердили концепцию жесткой оптимизации структуры фотосинтезирующего аппарата по функциональному критерию. Методология проведенных исследований, опирающаяся на эту концепцию, позволила впервые разработать оригинальные модели оптимального сопряжения однородных субантенн в неоднородных суперантеннах, ответственного за высокую эффективность функционирования всей суперантенны в целом.

Целенаправленный поиск в природных суперантеннах фотосинтезирующих зеленых бактерий теоретически предсказанных структурных факторов, оптимизирующих функционирование этих суперантенн, позволил

(1) впервые разработать модель ориентации диполей БХл *a*-субантенны Б798 базовой пластинки, оптимально сопрягающей экстрамембранную хлоросомную БХл *c*-субантенну Б740 с мембранной БХл *a*-субантенной Б808-866, непосредственно связанной с РЦ в ФСЕ *S.aurantiacus* из семейства *Chloroflexaceae*; и

(2) разработать модель оптимального спектрального сопряжения однородных субантенн в неоднородной суперантенне *O.trichoides* из семейства *Oscillochloridaceae*: впервые идентифицирован минорный БХл *a*-компонент Бх в суперантенне *O.trichoides* как пигмент-белковый комплекс, выполняющий роль промежуточной БХл *a*-субантенны, локализованной в базовой пластинке хлоросомы и оптимально сопрягающей экстрамембранную хлоросомную БХл *c*-субантенну Б750 с мембранной БХл *a*-субантенной Б805-860, непосредственно связанной с РЦ.

Сравнительный анализ БХл *a*-субантенн, локализованных в базовых пластинках хлоросом, принадлежащих различным семействам фотосинтезирующих зеленых бактерий, показал общность их структурно-функциональных характеристик. Таким образом, полученные данные (в совокупности с уже известными) показали, что светособирающая БХл *a*-субантенна базовой пластинки хлоросомы с энергетическим положением Q_y -полосы поглощения в диапазоне 795–800 нм служит универсальным интерфейсом между периферийной БХл *c/d/e*- и мембранной (или FMO) БХл *a*-субантеннами у представителей всех трех семейств фотосинтезирующих зеленых бактерий – *Chloroflexaceae*, *Oscillochloridaceae* и *Chlorobiaceae*, что демонстрирует универсальность основных принципов оптимизации структуры природных антенн. Эта универсальность – принципиальна с точки зрения стратегии эффективного функционирования суперантенн : основные принципы их организации, будучи оптимальными, сохраняются в ходе эволюции организмов, несмотря на то, что структура и размер субантенн значительно изменяются.

Выводы

1. Модельные расчеты для одиночной хлоросомы показали, что в суперантенне *S.aurantiacus* оптимальное сопряжение однородных субантенн Б740, Б798 и Б808, достигающееся оптимизацией неизвестной ориентации диполей Q_y -переходов БХл a субантенны Б798, приводит к устойчивой минимизации времени переноса энергии Б740→Б798→Б808. Полученные данные соответствуют теоретической модели оптимальной одноосной ориентации БХл a -диполей, хаотично ориентированных вокруг нормали к мембране с углом наклона к плоскости мембраны $\varphi_{\text{опт}} \approx 54^\circ$.

2. Найденная теоретически модель оптимальной ориентации диполей Q_y -переходов молекул мономерного БХл a субантенны Б798 в суперантенне *S.aurantiacus* экспериментально подтверждена методом дифференциальной поляризационной абсорбционной спектроскопии с фемтосекундным разрешением : векторы дипольных моментов Q_y -переходов БХл a субантенны Б798, хаотично ориентированные вокруг нормали к мембране, образуют с плоскостью мембраны магический угол $\varphi = 54,7^\circ$.

3. Анализ оптимальности спектрального сопряжения хлоросомной и мембранной субантенн в зеленых бактериях *O.trichoides* показал, что состав субантенн Б750–Б805 функционально не оптимален для прямого переноса энергии Б750 → Б805.

4. Получено однозначное теоретическое обоснование необходимости существования в суперантенне *O.trichoides* дополнительной субантенны (Бх) с промежуточным пространственным и энергетическим положением (770 нм <X < 805 нм) для оптимизации переноса энергии от хлоросомной Б750 к мембранной Б805-860 субантенне.

5. Экспериментально доказано, что найденный в хлоросомах зеленых бактерий *O.trichoides* минорный БХл a -компонент локализован в базовой пластинке хлоросомы, образует комплекс с CsmA-белком с молекулярной массой 5.7 кДа и выполняет роль искомой промежуточной субантенны с энергетическим положением ее Q_y -полосы поглощения в интервале $\sim(795\text{--}800)$ нм, обеспечивая оптимальное сопряжение энергетических уровней экстремембранной хлоросомной БХл c -субантенны Б750 и мембранной БХл a -субантенны Б805-860, непосредственно связанной с РЦ.

6. Представленные результаты подтвердили концепцию жесткой оптимизации структуры фотосинтезирующего аппарата по функциональному критерию.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. A. Zobova, A. Taisova, N. Fedorova, E. Lukashev, L. Baratova, Z. Fetisova. Optimal interfacing of subantennae as an efficient strategy for light harvesting in photosynthesis. Abstracts of International Conference “Light Energy Conversion in Photosynthesis”, Puschino, 2008, P1.2, p. 53.
2. А.В. Зобова, А.Г. Яковлев, А.С. Таисова, З.Г. Фетисова. Поиск оптимальной ориентационной упорядоченности диполей Q_Y -переходов молекул субантенн в суперантенне фотосинтезирующих зеленых бактерий. Модельные расчеты. Молекулярная биология, 2009, 43 (3) 464-482.
3. V.G. Popov, A.V. Zobova, A.S. Taisova, and Z.G. Fetisova. Search for an Optimal Interfacing Subantennae in Superantenna of Photosynthetic Green Bacteria. PROCEED. of the 4-th International Conference on Computational Molecular Biology, Moscow, 2009, pp. 93-95.
4. A.V. Zobova, A.G. Yakovlev, V.I. Novoderezhkin, A.S. Taisova, and Z.G. Fetisova. Mutual Orientation of Q_Y Transition Dipoles of Subantennae Pigments as a Structural Factor Optimizing the Photosynthetic Antenna Function. Theoretical and Experimental Studies. PROCEED. of the 4-th International Conference on Computational Molecular Biology, Moscow, 2009, pp. 87-89.
5. А. В. Зобова, А.С. Таисова и З. Г. Фетисова. Поиск оптимального сопряжения субантенн в суперантенне фотосинтезирующих зеленых бактерий семейства *Oscillochloridaceae*. Модельные расчеты. Доклады Академии Наук, 2010, 433 (1) 122-125.
6. Yakovlev A.G., Novoderezhkin V.I., Taisova A.S., Zobova A.V., and Fetisova Z.G. Optimal mutual orientational ordering of Q_Y transition dipoles of adjacent subantennae pigments in the superantenna of the photosynthetic green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. Theoretical and experimental studies. Abstracts of the 15th International Congress of Photosynthesis, China, 2010. PS3.11, pp. 48-49.
7. Taisova A.S., Zobova A.V., Lukashev E.P., Fedorova N.V., and Fetisova Z.G. CsmA protein is associated with BChl a in the baseplate subantenna of chlorosomes of the green photosynthetic bacterium *Oscillochloris trichoides* belonging to the family *Oscillochloridaceae*. Abstracts of the 15th International Congress of Photosynthesis, China, 2010. PS3.12, p. 49.