

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Института
химической физики имени А.А. Семенова»
Российской Академии наук, академик

_____ А.А. Берлин

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Петровой Ирины Олеговны на тему: «Электрогенные реакции переноса зарядов в ядерных комплексах фотосистемы 2 с разрушенными и реконструированными кислород-выделяющими комплексами», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Фотосинтез растений, водорослей и цианобактерий, т.е. организмов, способных при освещении окислять воду с образованием молекулярного кислорода, представляет собой весьма сложную совокупность реакций. Основным итогом фотохимической стадии преобразования энергии света является фотоперенос электронов от воды к НАДФ⁺ за счет нециклического транспорта электронов при последовательном участии пигмент белковых комплексов фотосистемы 2 (ФС 2), цитохромного b_6f комплекса и фотосистемы 1 (ФС 1). Пигмент-белковый комплекс ФС 2 является основным источником молекулярного кислорода атмосфера Земли и представляет собой многосубъединичную светозависимую вода-пластохинон оксидоредуктазу.

Актуальность

Сложность исследования комплекса ФС 2 обусловлена не только тем, что в нем сопряжены воедино одно- (перенос электрона от редокс-активного тирозина Y_Z к

первичному хинонному акцептору Q_A), двух- (двухэлектронное восстановление вторичного хинонного акцептора) и четырех – электронные/протонные (окисление молекулы воды) процессы, но и также тем, что кислород-выделяющий комплекс, локализованной на донорной стороне фермента, является исключительно лабильным участком в пределах ФС 2 при различных стрессовых условиях. При окислительном стрессе потеря ионов марганца часто также сопровождается экстракцией иона кальция, а также трех периферических белков КВК. В связи с этим изучение процесса реконструкции комплекса окисления воды в комплексах ФС 2 *in vitro*, несомненно, является актуальной задачей. Привлекательность этой работы заключается еще и в том, что процесс реконструкции КВК исследовался в протеолипосомах, содержащих комплексы с реконструированным марганцевым кластером, что представляет собой более нативные условия по сравнению с исследованиями ФС 2, проводимыми в растворе в присутствии детергента.

Основные научные результаты и их значимость

Мы согласны со сформулированными научными результатами. В качестве наиболее значимых хотелось бы выделить следующие:

1. Результаты, касающиеся изучения ядерных комплексов ФС 2 с поврежденными (апо-КВК-ФС 2) и реконструированными КВК с помощью регистрации кинетики индукции флуоресценции хлорофилла в растворе и в протеолипосомах, несомненно, являются важными. Привлекательность этой части работы заключается в том, что в ней проведено сопоставление данных по скорости переноса электронов от марганцевого кластера к терминальному хинонному акцептору в буферном растворе с детергентом и двух типах протеолипосом, а именно липосомах из фосфолипидов бобов сои (азолектин) и из тилакоидных липидов. При этом в последнем случае были использованы те же соотношения липидов, какие имеют место в нативных тилакоидных мембранах у оксигенных фотосинтетических организмов. Одним из наиболее ярких результатов этой части работы также является то, что в протеолипосомах из тилакоидных липидов наблюдается большая стимуляция как скорости переноса электронов от донора к акцептору, так и скорости выделения кислорода. Представляет интерес вывод, сделанный автором на основании этих результатов о том, что влияние липидов

обусловлено поддержанием оптимальной конформации комплекса ФС 2 для эффективного функционирования.

2. Изучение механизма генерации трансмембранной разности электрических потенциалов в марганец-реконструированных (фотоактивированных) комплексах апо-КВК-ФС 2 в ответ на серию единичных вспышек света показало наличие электрогенных реакций, обусловленных различными S-переходами КВК, а именно $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$, $S_4 \rightarrow S_0$, а также $S_0 \rightarrow S_1$. Вывод о том, что перенос только двух из четырех протонов, освобождаемых в результате каталитического окисления двух молекул воды, а именно при переходах сопряжен с образованием мембранного потенциала, несомненно, является важным и перспективным. Хотелось отметить, что до этих результатов природы реакции, обусловленные S-переходами, не были известны.
3. Результаты по изучению сопряжения реакции переноса зарядов на донорном и акцепторном участках в фотоактивированных образцах апо-КВК-ФС 2 путем измерения трансмембранной разности электрических потенциалов, несомненно, являются значимыми. Показано, что добавление децилпластохинона в среду измерения в качестве вторичного хинонного акцептора приводит к появлению дополнительных электрогенных фаз, обусловленных протонированием дважды восстановленной формы Q_B и переходом $S_2 \rightarrow S_3$ КВК. Этот результат впервые наглядно свидетельствует о возможности реконструкции сопряжения реакции переноса зарядов на донорном и акцепторном участках комплексов ФС 2, лишенных марганцевого кластера, *in vitro*.

Практическая ценность результатов

Полученные в работе результаты представляют огромный интерес для понимания механизма реконструкции кислород-выделяющего комплекса апо-КВК-ФС 2 *in vitro* и могут быть использованы для создания искусственных систем, способных преобразовывать солнечную энергию, в том числе осуществлять фотолиз воды с образованием водорода и кислорода. Материалы диссертации могут быть использованы в лекциях и семинарских занятиях по биохимии, биофизике и физиологии растений.

Новизна, обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Изложенные в работе результаты являются новыми. Автор имеет по теме исследования 10 печатных работ. Основные результаты диссертации опубликованы.

Диссертационное исследование опирается на анализ экспериментальных данных, полученных различными методами. Привлекается значительное количество публикаций – в списке цитируемой литературы 147 наименований.

Основная экспериментальная работа (выделение ядерных комплексов фотосистемы 2 и комплексов фотосистемы 2, лишенных марганца, приготовление протеолипосом, измерение кинетики индукции флуоресценции, измерение кинетики генерации трансмембранной разности потенциалов с помощью прямого электрометрического метода) выполнена автором самостоятельно.

Полученные в работе выводы хорошо согласуются с экспериментальными данными, а также с работами других исследователей. Всё это является подтверждением достоверности полученных результатов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Одним из перспективных подходов к созданию устройств, преобразующих энергию солнечного света является использование компонентов природного фотосинтетического аппарата – фотосистем, содержащих фотохимические реакционные центры. В связи с этим считаем, что результаты исследования механизма реконструкции комплекса окисления воды в фотоактивированных препаратах ФС 2 *in vitro* будут востребованы для практического использования при создании стабильных фотосинтетических систем для преобразования и запасания энергии света.

Общие замечания

Было бы целесообразным, если в главе “Обзор литературы” была бы представлена схема, показывающая основные пути и кинетики переноса электронов в комплексе ФС 2.

Остается открытым вопрос, почему автор не использовал протеолипосомы из тилакоидных липидов для исследования генерации мембранного потенциала, обусловленной S-переходами КВК, так как влияние этих липидов намного более значительно, чем влияние фосфолипидов.

Непонятно также, почему не удается получить осцилляции по скорости выделения кислорода в ответ на серию вспышек света.

Почему для удаления ионов марганца была использована обработка буфером Tris? Несомненно, существуют более мягкие обработки.

Акцепторная сторона комплекса ФС2 в протеолипосомах, судя по фотоэлектрическим ответам, находится вблизи внутренней стороны липосомальной мембраны. Как действует в этих условиях экзогенно добавленный диурон - ингибитор переноса электронов между первичным и вторичным хинонными акцепторами ?

Считаем целесообразным и необходимым продолжить работу по механизму реконструкции комплекса окисления воды *in vitro*. Прежде всего, рекомендуется исследовать роли периферических белков путем реконструкции их в препараты апо-КВК-ФС 2, инкрустированные в липосомы, путем измерения разности электрических потенциалов. Также чрезвычайно интересным было бы продолжить работу по исследованию электрогенных реакций, обусловленных переносом зарядов в хинон-акцепторном и кислород-выделяющем участках комплекса ФС 2 при реконструкции, по крайней мере, марганец-стабилизирующего 33 кДа-белка.

Заключение

Диссертация представляет собой фундаментальное научное исследование на актуальную тему. Новые научные результаты, полученные диссертантом имеют существенное значение как для науки, так и для практических приложений. Выводы и заключения достаточно обоснованы. Таким образом, работа отвечает всем требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Петрова Ирина Олеговна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсужден на семинаре отдела 0113.Института химической физики имени Н.Н. Семенова РАН 5 мая 2014 г., протокол №04/02 от 05.05.2014.

Главный научный сотрудник

Д.х.н., профессор

В.А. Надточенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической физики
им. Н.Н.Семенова Российской академии наук

Адрес ИХФ РАН:

119991 Москва, ул. Косыгина 4.

телефон для справок: (495)939-7200

факс: (495)651-2191.

Email: icp@chph.ras.ru