

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Петровой Ирины Олеговны «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

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа И.О. Петровой связана с решением важной научно-практической задачи – исследованием пигмент-белкового комплекса фотосистемы 2 (ФС2), которая является одним из ключевых элементов фотосинтетического аппарата. Именно в ФС2 происходит фоторазложение воды с выделением молекулярного кислорода, который необходим для поддержания жизни на Земле, а также образование редокс-эквивалентов - электронов и протонов. Изученный Петровой И.О. вопрос, несомненно, является актуальным для понимания процессов преобразования энергии в первичных процессах фотосинтеза.

Научная новизна исследований и полученных результатов

Основные полученные автором результаты состоят в следующем.

1. Сопоставление экспериментальных данных, полученных с помощью измерения индукционных кривых флуоресценции хлорофилла в комплексах ФС2 с поврежденными и реконструированными КВК в растворе и липосомах из различных типов липидов привело диссертанта к выводу о том, что липидное окружение увеличивает стационарную скорость переноса электронов от марганцевого кластера к терминальному хинонному акцептору в комплексах ФС2. Автор предполагает, что это связано с оптимальной конформацией белков за счет определенного липидного окружения.

2. С использованием протеолипосом и с помощью прямого электрометрического метода впервые был исследован механизм генерации $\Delta\psi$, обусловленной переносом зарядов при S-переходах в фотоактивированных комплексах апо-КВК-ФС в ответ на единичные вспышки света. Сделан вывод, что в кинетике фотоэлектрического ответа помимо быстрой генерации мембранного потенциала, связанного с переносом электрона от редокс-активного тирозина на первичный стабильный акцептор, возникают дополнительные электрогенные фазы, которые обусловлены переходами $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$ и $S_4 \rightarrow S_0$, тогда как перенос протонов при переходах $S_0 \rightarrow S_1$ и $S_3 \rightarrow S_4$ является электрически нейтральной реакцией.

3. В фотоактивированных препаратах апо-КВК-ФС2 с реконструированной функцией Q_B в результате добавления децилпластохинона в среду измерения в ответ на вторую вспышку света было обнаружено наличие дополнительных электрогенных фаз, обусловленных протонированием дважды восстановленной формы Q_B и переходом $S_2 \rightarrow S_3$ кислород-выделяющего комплекса. Эта взаимосвязь, по мнению Петровой И.О., свидетельствует о сопряжении переноса зарядов на донорной и акцепторной стороне ФС2 в реконструированной системе.

Достоверность результатов и обоснованность выводов

Достоверность полученных данных обусловлена адекватным использованием современных биохимических и биофизических методов и не вызывает сомнений. Автором выполнен большой объем работы по изучению молекулярного механизма сопряженного переноса протонов и электронов в процессе фотоокисления воды и функционирования хинон-акцепторного участка ФС2. В процессе исследования использованы модельные системы, такие как реконструированные комплексы ФС2. На основе полученных результатов автор выдвинул вполне обоснованные предположения о механизме сопряженного переноса протонов и электронов при функционировании ФС2.

Достоверность данных и обоснованность выводов подтверждаются также представлением и обсуждением полученных результатов на многочисленных Российских и международных конференциях, а также публикациями в ведущих Российских и международных журналах.

Практическая значимость полученных результатов

Данные представленные в диссертации могут быть важны и в прикладном аспекте, так как помогут в решении проблемы создания преобразователей, имитирующих природные системы преобразования энергии солнечного излучения в энергию химических связей и в конечном итоге в электрическую энергию. Такие искусственные системы смогут использовать воду и солнечный свет, самые экологические и дешевые на нашей планете.

Содержание работы

Рецензируемая диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, литературного обзора, раздела с описанием материалов и методов, результатов

и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 128 страницах, включая рисунки и таблицы.

В *Литературном обзоре* описаны структура комплекса ФС2, структура марганцевого кластера, функционирование ФС2, в частности процесс окисления воды, фотоактивация фотосистемы 2. Сделан обзор механизмов переноса электрона на акцепторной и донорной стороне ФС2, а также рассмотрена роль липидов в ФС2.

Литературный обзор производит хорошее впечатление. Он сделан достаточно логично, соответствует поставленным целям, включает хорошо сделанные цветные рисунки, например, рисунки 1.4 и 1.6. Сделанное Петровой заключение и обзор в целом подводят читателя к необходимости проведения запланированных диссертантом исследований. В обзоре цитируется 147 научных статей, в том числе две статьи диссертанта в журнале «Биохимия».

В *Экспериментальной части* представлена информация об использованных в работе ядерных комплексах ФС2 с активным кислород-выделяющим комплексом (КВК) и лишенных марганец-содержащего кластера (апо-КВК), а также протеолипосомах, содержащих ядерные комплексы ФС2; описаны методики получения указанных комплексов и протеолипосом. Материал изложен достаточно четко и понятно и характеризует высокий методический уровень поставленных при выполнении диссертации экспериментов.

Диссертантом использованы современные методы, позволяющие проводить исследования молекулярного уровня организации и функционирования ФС2. Ключевым методом исследований являлся прямой электрометрический метод регистрации трансмембранной разности электрических потенциалов $\Delta\Psi$, который наряду с методом индукции флуоресценции хлорофилла и полярографическим методом регистрации скорости выделения кислорода позволил детально изучить электрогенные реакции переноса зарядов в фотоактивированных препаратах апо-КВК-ФС2.

Глава *Результаты и Обсуждение* состоит из следующих частей: 1) Характерные особенности ядерных комплексов ФС 2; 2) Ядерные комплексы ФС 2 с поврежденным и реконструированным КВК в растворе и в липосомах; 3) Электрогенные реакции, обусловленные S-переходами КВК, в протеолипосомах, содержащих фотоактивированные препараты апо-КВК-ФС 2 и 4) Электрогенные реакции, обусловленные переносом зарядов на хинон-акцепторном участке, в протеолипосомах, содержащих фотоактивированные препараты апо-КВК-ФС 2. В ней представлены оригинальные экспериментальные данные и их интерпретация.

Замечания по диссертационной работе в целом

1. Сказано, что время жизни фазы J–P, соответствующей переносу электрона на терминальный хинонный акцептор в фотоактивированных препаратах апо-КВК-ФС2 в растворе составляет около 320 мс, а в протеолипосомах – 20 мс или 9 мс в зависимости от природы липидов. Эти данные свидетельствуют о том, что липидное окружение стимулирует стационарную скорость переноса электронов от марганцевого кластера к терминальному акцептору пластохинону, что коррелирует с данными по измерению скорости выделения кислорода. В этом случае автору следовало бы упомянуть другую возможность. Не исключено, что снижение времени жизни есть следствие снижения емкости пластохинонового пула или снижения количества Q_B -восстанавливающих РЦ ФС2 в результате, возможно, изменения состояния белков ФС2 за счет изменения липидного окружения.

2. Почему на индукционных кривых отсутствует фаза I, которая во многих случаях присутствует в фотосинтезирующих объектах при возрастании флуоресценции от начальной O до максимальной интенсивности P?

3. Относительная скорость выделения кислорода (~ 1500 мкмоль O_2 Ч $мг^{-1}$ (Хл) Ч $ч^{-1}$) препаратами ФС2 с активным КВК в растворе и в протелипосомах принималась за 100%. Почему такая высокая скорость выделения кислорода?

4. В заключении написано, что: «В первом разделе экспериментальной части работы проведено сопоставление результатов, полученных с помощью измерения кинетики индукции флуоресценции хлорофилла в комплексах ФС2 с поврежденными и реконструированными КВК в растворе и липосомах из различных типов липидов. Полученные данные позволяют заключить, что липидное окружение увеличивает стационарную скорость переноса электронов от марганцевого кластера к терминальному хинонному акцептору в комплексах ФС2, что, вероятно, связано с оптимальной конформацией белка». Однако, возможно, что в липосомах снижено количество (емкость пула) молекул пластохинонов и, таким образом, происходит более быстрое нарастание индукционной кривой OJP.

5. Рис. 3.3. Более правильно написать «индукционные кривые флуоресценции хлорофилла для интактных (1) и лишенных марганца (апо-КВК) (2) препаратов ядерных комплексов ФС 2» вместо «Переменная флюоресценция для интактных (1) и лишенных марганца (апо-КВК) (2) препаратов ядерных комплексов ФС2».

6. Рис. 3.6. диссертации (Рис. 8 автореферата). На Рис. 8 автореферата указано А и Б, а на том же Рис. 3.6 обозначения А и Б отсутствуют.

7. Добавление DCMU устраняет более медленную фазу, оставляя только более быструю (Рис. 8Б в автореферате). Однако, на рисунке видно, что не устраняет, а частично снимает эту фазу.

8. Иногда диссертант использует не совсем корректные выражения, например, «Увеличение амплитуды фазы J-P (стр. 81) или более высокая скорость фазы (стр. 82)».

9. Имеется некоторый разнобой в представлении ссылок. Так, ссылки 80 и 87 и ряд других начинаются с названия статьи, а не с фамилий авторов, как все остальные.

Заключение

Высказанные замечания не снижают общего благоприятного впечатления от работы И.О. Петровой. Диссертационная работа И.О. Петровой по объему, качеству выполнения, важности и актуальности полученных результатов полностью соответствует требованиям п.8 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 30 января 2002 г. № 74), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Считаю, что автором выполнено большое по объему и оригинальное по исполнению исследование, которое является законченной научно-квалификационной работой. Полагаю, что автор работы заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Автореферат правильно и адекватно отражает содержание диссертации. Основные научные результаты, излагаемые в диссертации, опубликованы.

Ведущий научный сотрудник
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института фундаментальных
проблем биологии Российской академии наук
доктор биологических наук

В.Д. Креславский

Подпись В.Д. Креславского заверяю,
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института фундаментальных
проблем биологии Российской академии наук
к.физ.-мат. наук

Н.Д. Гудков

Креславский Владимир Данилович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт фундаментальных
проблем биологии» Российской академии наук.

ОТЗЫВ официального оппонента на диссертационную работу Петровой Ирины Олеговны: «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

Диссертационная работа И.О. Петровой посвящена фундаментальной проблеме современной биологии – изучению механизмов функционирования фотосинтетического мембранного белкового комплекса – фотосистемы 2 (ФС 2). Этот комплекс, или «водорасщепляющий фермент», фактически является «машиной жизни», так как побочным продуктом происходящих в нём фотоиндуцированных окислительно-восстановительных реакций выступает молекулярный кислород, необходимый всем живым организмам для дыхания.

Данная работа сосредоточена на изучении механизмов переноса электрона и протона в кислород-выделяющем комплексе (КВК), - самом сложноорганизованном отсеке фотосистемы 2, ответственном за пошаговую генерацию окислительного потенциала тетракластером марганца и расщепление молекулы воды. Структурно-функциональные связи КВК ФС 2 таят ещё много тайн, разгадка которых позволит исследователям не только постичь фундаментальные основы биоэнергетических процессов фотосинтеза, но и приблизиться к решению научно-практических задач. Как известно, важнейшей проблемой человечества считается энергетическая безопасность; эта проблема включает в себя получение альтернативных источников энергии, таких как экологически чистое биотопливо.

Можно смело утверждать, что водорасщепляющий комплекс ФС 2 может в будущем стать Розеттским камнем искусственного фотосинтеза, с помощью которого можно будет получать неограниченные количества водорода и кислорода и использовать их в топливных элементах. Таким образом, данная диссертационная работа вносит непосредственный вклад в решение прикладных задач, стоящих перед учёными-фотосинтетиками.

Автором работы были поставлены сложные задачи по изучению фотоиндуцированных реакций переноса электрона в препаратах «ядер» ФС 2 с дезактивированным и вновь реконструированным КВК, как в растворе, так и в искусственных липосомах. Варьирование липидного состава липосом позволило в дальнейшем дать характеристику влияния липидного окружения гидрофобных зон белковых субъединиц ФС 2 на кинетику процесса транспорта электрона между кофакторами.

Также была поставлена задача изучения сопряжения реакций переноса электрона и протона в комплексах ФС 2, встроенных в протеолипосомы, с помощью прямого электрометрического метода измерения генерации трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi$). Этот метод обладает огромной чувствительностью, что позволило провести серии экспериментов по выявлению

электрогенных стадий, соответствующих различным S-переходам КВК. Кроме того, прямой электрометрический метод впервые был применен для изучения электрогенеза, связанного с реакциями переноса электронов и протонов при переходах S-состояний в фотоактивированных комплексах (апо-КВК-ФС 2), встроенных в липосомы.

Автором был выполнен большой объем работы, включающий обнаружение электрогенных реакций при одноактном возбуждении комплексов ФС 2 короткой (15 нс) лазерной вспышкой, количественное определение их амплитуд и кинетических параметров. Были использованы как активные КВК, так и фотоактивированные комплексы (апо-КВК-ФС 2). Анализ полученных данных позволил идентифицировать электрогенные стадии переноса электрона, а также электрогенные реакции обратного переноса протона через мембрану при S-переходах в КВК, запускаемых одной или несколькими последовательными лазерными вспышками. В итоге было установлено, что некоторые S-переходы в адаптированных к темноте комплексах ФС 2 являются электронейтральными, также, как и выброс протона при переходе $S_0 \rightarrow S_1$.

Важной экспериментальной задачей, поставленной автором, стало исследование функционального сопряжения донорной и акцепторной стороны комплексов ФС 2 с поврежденными и реконструированными КВК. Так как использованные в экспериментах по измерению $\Delta\Psi$ комплексы ФС 2 не содержали вторичного хинонного акцептора Q_B , была реализована оригинальная идея по реконструкции функция Q_B путем добавления раствора децилпластохинона (dPQ) к препаратам ФС 2. В итоге, при анализе кинетики электрогенных реакций при переходе $S_2 \rightarrow S_3$ в фотоактивированных препаратах апо-КВК-ФС 2, была обнаружена дополнительная медленная электрогенная фаза с $t \sim 0,5$ мс, обоснованно приписанная реакции протонирования дважды восстановленного Q_B^{2-} . Все это позволило автору выдвинуть вполне логичное предположение о существовании сопряжения переноса зарядов на донорном и акцепторном участках ФС 2.

Рецензируемая диссертация построена по плану, традиционному для кандидатских диссертаций и состоит из «Введения», разделов «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», а также «Выводов» и «Списка литературы». Работа напечатана на 128 страницах, включая таблицы и рисунки. Приведённый в начале работы «Список сокращений» полностью отражает использованные в тексте аббревиатуры.

В «Обзоре литературы» автором работы кратко охарактеризованы первичные процессы фотосинтеза и отмечен огромный разброс в их кинетике.

Далее приводится подробное описание структуры фотосистемы 2 на базе современных представлений, основанных на данных рентгеноструктурного анализа и других прецизионных подходах. Приведено обсуждение механизмов функционирования комплекса ФС 2 и участия в нём разных кофакторов. Особое внимание уделено автором кислород-выделяющему комплексу (КВК) ФС 2.

Специальный раздел посвящен анализу функционирования S-системы, последовательные переходы в которой (вызываемые отдельными квантами, или отдельными лазерными вспышками в эксперименте) служат цели накопления окислительных эквивалентов, необходимых для расщепления молекулы воды. Представлена картина многолетних усилий исследователей, приведших к созданию модели реакционного цикла окисления воды марганцевым кластером.

Приведена характеристика функционирования акцепторной стороны ФС 2, упомянута роль липидного окружения в обеспечении эффективности процессов транспорта электрона.

Отдельным разделом автором приводится описание процесса фотоактивации комплекса ФС 2, как события, венчающего сборку белковых субъединиц, пигментов и других кофакторов в эффективно работающий ферментный комплекс. Подчеркнуты особенности фотоактивации ФС 2 в условиях *in vitro*, когда исследователь имеет дело с популяцией изолированных частиц ФС 2 в растворе или искусственной системе.

В заключение литобзора приводится анализ данных по изучению электрогенных стадий при переносе электрона и протона в функционирующем комплексе ФС 2.

В разделе «Материалы и методы» автором последовательно описаны использованные в работе препаративные процедуры, а именно: выделение и очистка ядерного комплекса ФС 2 с активным КВК, получение комплекса ФС 2, лишённого марганцевого кластера (апо-КВК-ФС 2), методика приготовления протеолипосом со встроенными ядерными комплексами ФС 2, а также протокол реконструкции, методом добавления в среду ионов марганца, кислород-выделяющей активности комплексов ФС2 и их фотореактивации.

Далее автор описывает экспериментальные методы, которые применялись при проведении экспериментов: измерение индукционных кривых флуоресценции хлорофилла, полярографический метод измерения скорости выделения кислорода с электродом Кларка, метод редокс-титрования первичного хинонного акцептора (Q_A).

Особое внимание в этом разделе уделено детальному разбору использованного в исследованиях прямого электрометрического метода регистрации трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi$). Удачной идеей является приведение принципиальной схемы прибора с указанием параметров возбуждающего лазера и входных сопротивлений компонентов электрической схемы, что делает возможным самостоятельный анализ и интерпретацию приведённых в диссертации экспериментальных результатов.

Хочется подчеркнуть, что методическая часть диссертации изложена четко и понятно, что дает представление о высоком научно-методическом уровне проведённых экспериментов.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены оригинальные экспериментальные данные, полученные автором, и их интерпретация.

Основные полученные автором результаты состоят в следующем.

1. В первом разделе экспериментальной части проведены интерпретация и анализ результатов, полученных с помощью измерения кинетики индукции флуоресценции хлорофилла в комплексах ФС 2 с поврежденными и реконструированными КВК. Было проведено сравнение относительных амплитуд и кинетики фаз индукции флуоресценции для комплексов ФС 2 в растворе и при включении их в липосомы, состоящие из различных типов липидов. Впервые продемонстрирована возможность реконструкции КВК ФС 2 ионами неорганического марганца, приводящей к частичному восстановлению индукционной кривой, а также выделения кислорода препаратами. Было установлено, что липидное окружение увеличивает стационарную скорость переноса электронов от марганцевого кластера к терминальному хинонному акцептору в комплексах ФС 2. Полученные данные позволяют заключить что, мембранные липиды, очевидно, способствуют оптимальной конформации белковых субъединиц, при этом важно не только наличие липидов, но и их качественный состав.

2. Во втором экспериментальном разделе с помощью прямого электрометрического метода на комплексах ядер ФС 2, встроенных в протеолипосомы, был исследован механизм генерации $\Delta\Psi$, обусловленный переносом зарядов при S-переходах в КВК в ответ на единичные вспышки света в фотоактивированных комплексах апо-КВК-ФС 2. Впервые было показано, что переходы $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$ и $S_4 \rightarrow S_0$ и $S_0 \rightarrow S_1$ в КВК сопряжены с образованием $\Delta\Psi$, в то время как переход $S_3 \rightarrow S_4$ является электрически нейтральной реакцией. Обнаружены также дополнительные медленные электрогенные процессы при переходах $S_2 \rightarrow S_3$ и $S_4 \rightarrow S_0$, связанные с переносом протонов в противоположном направлении – от марганцевого кластера или его ближайшего окружения в водную фазу.

3. В третьей, заключительной части экспериментального раздела прямой электрометрический метод впервые был применён к исследованию функционального сопряжения донорной и акцепторной сторон фотоактивированного комплекса апо-КВК-ФС 2. В оригинальных экспериментах с использованием аналога вторичного хинонного акцептора Q_B - децилпластохинона (dPQ) было убедительно показано, что электрогенная реакция при переходе КВК $S_2 \rightarrow S_3$ сопряжена с электрогенным протонированием дважды восстановленного Q_B . Решающим доказательством данной гипотезы явился тот факт, что DCMU, ингибитор переноса электрона между Q_A и Q_B , при добавлении к препаратам фотоактивированного апо-КВК-ФС 2 устраняет фотоиндуцированную медленную электрогенную фазу с временем жизни $\tau \sim 0,5$ мс.

В заключение - несколько критических замечаний в адрес диссертационной работы И.О. Петровой. Хочу отметить, что данные замечания носят дискуссионный или технический характер и не могут рассматриваться в качестве серьезной критики.

1. В экспериментальном разделе по изучению индукции флуоресценции хлорофилла в комплексах ФС 2, встроенных в липосомы (ст. 81) не обсуждается

возможность процесса окисления липидов протеолипосом, что, особенно в случае тилакоидных липидов, могло бы повлиять на конечный результат.

2. В этой же части работы не приводятся сведения о различии в величине сопротивления мембран протеолипосом, приготовленных из тилакоидных липидов и азолектина. Возможно, величина электрического сопротивления искусственных липидных мембран оказывает влияние на кинетику электрогенных процессов в ассоциированных с ними комплексах ФС 2.

3. В разделе «Материалы и методы» (стр. 67, 69) приводятся значения облучённости в экспериментах по индукции флуоресценции, фотоактивации и полярографии как в энергетических единицах ($\text{Вт}/\text{м}^2$), так и в единицах плотности мощности квантовой энергии ($\mu\text{Е}/\text{м}^2\cdot\text{с}$). В современной литературе принято указывать интенсивность действующего света именно в квантовых единицах, к тому же - с обязательным указанием типа источника света, так как для исследования фотосинтеза имеет значение только область от 400 до 720 нм.

4. В спектре поглощения ФС 2 (рис. 3.2, стр. 75) максимумы поглощения в нм приведены с точностью в 5 знаков после запятой. Такую точность в определении длин волн не может обеспечить ни один серийный спектрофотометр. Точность приведённых данных должна соответствовать точности прибора или метода.

5. В списке сокращений термины DCMU и FTIR целесообразнее было бы привести в русском варианте сокращения (как другие подобные аббревиатуры), для обеспечения однообразия.

6. В разделе «Заключение» в основном приведено краткое содержание экспериментальной части. Хотелось бы, чтобы в конце диссертации автор произвёл итоговую оценку полученных экспериментальных данных, обсудил бы их значение для фундаментальной и прикладной науки, а также обозначил бы перспективы дальнейших исследований в данной области.

Высказанные замечания не снижают общего положительного впечатления от работы И.О. Петровой. Диссертационная работа И.О. Петровой по объёму, уровню выполнения, важности и актуальности полученных результатов полностью соответствует требованиям п. 8 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 30 января 2002 г. № 74), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автором выполнено большое по объёму и оригинальное по исполнению исследование, которое является законченной научно-квалификационной работой.

Автореферат диссертации правильно и полно отражает содержание последней. Основные научные результаты, излагаемые в диссертации, опубликованы в научных журналах, рекомендованных ВАК.

На основании вышеизложенного считаю, что автор работы заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности биофизика – 03.01.02.

Научный сотрудник
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биохимии имени А.Н. Баха Российской академии наук
кандидат биологических наук

К.В. Неверов

Подпись К.В. Неверова заверяю,
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института биохимии
имени А.Н. Баха Российской академии наук
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

Неверов Константин Викторович, кандидат биологических наук, научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии имени А.Н.
Баха» Российской академии наук.