

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. Ломоносова

Физический факультет

На правах рукописи
УДК 577.3

Птушенко Василий Витальевич

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННОГО И ПРОТОННОГО ТРАНСПОРТА
В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ОКСИГЕННОГО ТИПА
С ПОМОЩЬЮ СПИНОВЫХ МЕТОК

03.00.02 – биофизика

03.00.16 – экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2006 г.

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор
Тихонов Александр Николаевич

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор Рууге Энно Куставич

кандидат биологических наук,
доцент Тимофеев Кирилл Николаевич

Ведущая организация: Институт Химической Физики РАН
им. Н.Н. Семенова

Защита диссертации состоится «27» апреля 2006 года в _____ часов на заседании диссертационного совета К 501.001.08 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, ГСП-2, г. Москва, Воробьевы горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Малая физическая аудитория .

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

Автореферат разослан _____ 2006 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета К 501.001.08.
кандидат физико-математических наук

Г.Б. Хомутов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Открытие электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) Евгением Константиновичем Завойским в 1944 г. (Альтшулер и др., 1944; Завойский, 1944–1945; Zavoisky, 1945–1946), дало науке новый мощный метод исследования, который благодаря пионерским работам Б. Коммонера (Commoner et al., 1954) и Л.А. Блюменфельда (Блюменфельд, 1957; Блюменфельд и Калмансон, 1957) вошел в биологию и в последние полвека является одним из основных биофизических методов исследования. Появившийся в 1960-х гг. благодаря работам А.Б. Неймана, Х. Мак-Коннела, А.Л. Бучаченко, А.Н. Кузнецова, Г.И. Лихтенштейна метод *спиновых зондов* (или *спиновых меток*), основанный на явлении ЭПР, сделал возможным исследование биологических систем на самых разных уровнях их структурной и функциональной организации.

Одной из наиболее актуальных задач современной биофизики является измерение рН среды в микрообъемах. В биоэнергетике точное измерение рН в микроскопических везикулах митохондрий или внутривезикулярных образований — тилакоидов — связано с разрешением двух принципиальных вопросов: а) какой механизм сопряжения — локальный или нелокальный — обеспечивает синтез АТФ в энергетических органеллах клетки, и б) какова относительная роль двух составляющих трансмембранного протонного потенциала в этом синтезе. Измерение рН с помощью рН-чувствительных спиновых меток уже более 20 лет используется в различных областях химии, биологии и медицины, однако в исследованиях процессов фотосинтеза рН-чувствительные спиновые метки до сих пор не получили должного применения. Измерение рН в микроскопических объемах тилакоидов, содержащих реакционноспособные компоненты электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), требует разработки специальных методов регистрации и обработки спектров ЭПР спиновых меток и подбора подходящих условий измерений (Trubitsin & Tikhonov, 2003; Tikhonov & Subczynski, 2005). В последние годы было синтезировано большое количество новых рН-чувствительных спиновых меток (Khrantsov et al., 2000; Kirilyuk et al., 2004, 2005; Voinov et al., 2005), обладающих широким спектром физико-химических свойств, что раскрывает широкие возможности для проведения подобных исследований. В связи с этим актуальной задачей для биофизики фотосинтеза является исследование свойств

новых рН-чувствительных спиновых меток и возможностей их применения для измерения внутритилакоидного рН в изолированных хлоропластах растений.

Большинство исследований фотосинтеза осуществляется на изолированных фотосинтетических системах: на отдельных изолированных фотосинтетических комплексах либо на препаратах изолированных тилакоидов (или на хлоропластах класса Б). Однако для изучения регуляции световых стадий фотосинтеза и взаимодействие между разными биохимическими системами фотосинтезирующей клетки необходимо исследование *интактных* фотосинтетических систем. Одной из наиболее удобных интактных фотосинтетических систем оксигенного типа являются клетки цианобактерий.

Примером другой интактной фотосинтетической системы оксигенного типа являются хлоропласты растений *in situ*, в живом листе. При этом исследование процессов электронного фотосинтетического транспорта в листьях древесных растений, произрастающих в открытом грунте на территории г. Москвы важно не только с точки зрения биофизики фотосинтеза, но имеет также практическую ценность (для охраны окружающей среды).

Цели и задачи работы

Основной целью данной работы является изучение электронного и протонного транспорта в фотосинтетических системах оксигенного типа, в особенности — интактных, а также исследование возможностей применения ряда имидазолиновых и имидазолидиновых кислород- и рН-чувствительных спиновых меток для изучения световых стадий фотосинтеза.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

- 1) изучить физико-химические и биологические свойства ряда новых имидазолиновых и имидазолидиновых спиновых меток, их взаимодействие с хлоропластами и цианобактериями, и разработать алгоритм измерения ΔpH и концентрации кислорода по фотоиндуцированным изменениям спектров ЭПР спиновых меток;
- 2) изучить (с использованием методов ингибиторного анализа, а также фотосинтетических и дыхательных мутантов цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Synechococcus* sp. PCC 7942), какие факторы контролируют электронный транспорт (ЭТ) в тилакоидных мембранах цианобактерий и какие фотосинтетические и дыхательные комплексы вносят основной вклад в

суммарный ЭТ на различных участках тилакоидных цепей транспорта электронов;

- 3) определить, какие показатели фотосинтеза наиболее чувствительны к загрязненности среды произрастания растений продуктами автомобильных выхлопов, изучить характер изменений этих параметров и выяснить, какие изменения в фотосинтетическом аппарате растений происходят под действием этого антропогенного фактора;
- 4) изучить механизмы влияния природного пигмента амарантина на процессы транспорта электронов в хлоропластах.

Научная новизна работы

Впервые получены сигналы ЭПР ряда имидазолиновых нитроксильных радикалов (ANT-1, ANT-3, ANT-4, ANT-5), локализованных во внутритилакоидном пространстве. Показано, что эти pH-чувствительные спиновые метки могут быть использованы для измерения ΔpH в хлоропластах.

Показано, что скорость оттока электронов от ФС 1 является существенным фактором регуляции электронного транспорта в клетках цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, причем в анаэробных условиях отток электронов от ФС 1 является лимитирующим звеном в работе фотосинтетической цепи переноса электронов. Показана корреляция между фотоиндуцированными процессами окисления P_{700} в ФС 1 и выделения кислорода в ФС 2. Установлено, что замедление скоростей дыхания (в темноте) и переноса электронов на участке между двумя фотосистемами (в условиях освещения) в клетках цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 обусловлено, в основном, концентрационной составляющей (ΔpH) протонного потенциала.

Определены «кинетические» параметры фотосинтетических процессов в листьях растений, измеряемые методом ЭПР и медленной индукции флуоресценции, чувствительные к условиям произрастания растений, включая неблагоприятные антропогенные факторы внешней среды.

Предложен механизм возможного участия беталаинового пигмента амарантина в реакциях транспорта электронов *in vitro*.

Практическая ценность

Полученные в диссертации данные о физико-химических и биологических свойствах исследованных имидазолиновых и имидазолидиновых спиновых меток могут быть использованы в разнообразных

физиологических, биофизических, физико-химических задачах с применением этих меток. Предложенная в диссертации полуэмпирическая модель, описывающая фотоиндуцированные изменения величины сигнала ЭПР метки, может быть в дальнейшем использована для экспресс-оценки свойств новых спиновых меток (эффективность взаимодействия с целью переноса электронов хлоропластов, стабильность радикальной формы, эффективность парамагнитного взаимодействия молекул метки с кислородом, как с "релаксационным" и "уширяющим" агентом, и т.п.).

Полученные в диссертации данные об изменении биофизических показателей листьев растений, произрастающих вблизи транспортных магистралей, могут быть использованы при организации защитных зеленых насаждений (лесополос), для оценки их эффективности.

Апробация работы и публикации

Основные результаты диссертации были представлены на III Всероссийской научной конференции "Физические проблемы экологии (Физическая экология)" (Москва, 1997), на Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов-2001", секция "Физика" (Москва, 2001), на IV Международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пушино, 2001), на Международной конференции "Актуальные вопросы экологической физиологии растений в XXI веке" (Сыктывкар, 2001), на XXXV Ежегодном международном съезде "Annual International Meeting: Advanced Techniques and Applications of EPR" (Aberdeen, Scotland, UK, 2002), на Молодежной школке-конференции "Современные проблемы биохимической физики" (Москва, 2002), на V Международном съезде Европейской федерации ЭПР "Meeting of the European Federation of EPR Groups" (Lisbon, Portugal, 2003), на XIII Европейской биоэнергетической конференции ЕВЕС (Pisa, Italy, 2004).

По материалам диссертационной работы опубликовано 11 печатных работ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 290 стр., содержит 97 рис. и 3 табл. (в т.ч. 20 стр., 14 рис. в приложениях), список литературы содержит 146 библиографических ссылок. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы и трех приложений.

2. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели и основные задачи работы.

Глава I диссертации представляет собой обзор литературы, который состоит из двух частей. В первой части приведены современные данные о световых стадиях фотосинтеза и структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата цианобактерий и хлоропластов высших растений. Проведено сравнение электрон-транспортных цепей (ЭТЦ) хлоропластов и цианобактерий. Рассмотрены данные о взаимодействии фотосинтетической и дыхательной ЭТЦ в клетках цианобактерий и высших растений, о компонентном составе хлоропластной и цианобактериальных ЭТЦ, о соотношении активностей и локализации отдельных компонент, о пространственной организации фотосинтетического и дыхательного аппаратов. Особое внимание уделено анализу возможных путей электрона в ходе энергодонорных электрон-транспортных процессов (нециклический, псевдоциклический, "короткий" и "длинный" циклические пути) и механизмов регуляции электронного и протонного транспорта в цианобактериях и хлоропластах.

Вторая часть Главы I посвящена применениям кислород- и рН-чувствительных спиновых меток в исследованиях фотосинтеза. Проведено сравнение различных методов измерения рН внутри тилакоидов, основанных на применении спиновых меток.

Глава II посвящена описанию материалов и методов, использованных в диссертационной работе. Объектами исследования служили следующие фотосинтетические системы:

- изолированные хлоропласты бобов (*Vicia faba* L., сорт «Русские черные»), амаранта (*Amaranthus tricolor* L., сорт «Валентина») и шпината (*Spinacia oleracea* L., сорт «Стоик»);
- цианобактерии *Synechocystis* sp., strain PCC 6803, дикий тип и мутанты PSII-less (без ФС 2), OX-less (без терминальных окисдаз), SDH-less (без SDH), NDH-ABC-less (без NDH-1) и NDb-less (без NDH-2); *Synechococcus* sp., strain PCC 7942, дикий тип и мутант FTN2 (обладающий длинными клетками);
- листья бобов (*Vicia faba* L., сорт «Русские черные»), пшеницы (Пшеница мягкая, *Triticum aestivum* L.) и древесных растений нескольких видов (Клен платановидный, *Acer platanoides* L., Клен американский, *A. negundo* L., Рябина обыкновенная, *Sorbus aucuparia* L., Липа мелколистная, *Tilia cordata* L.).

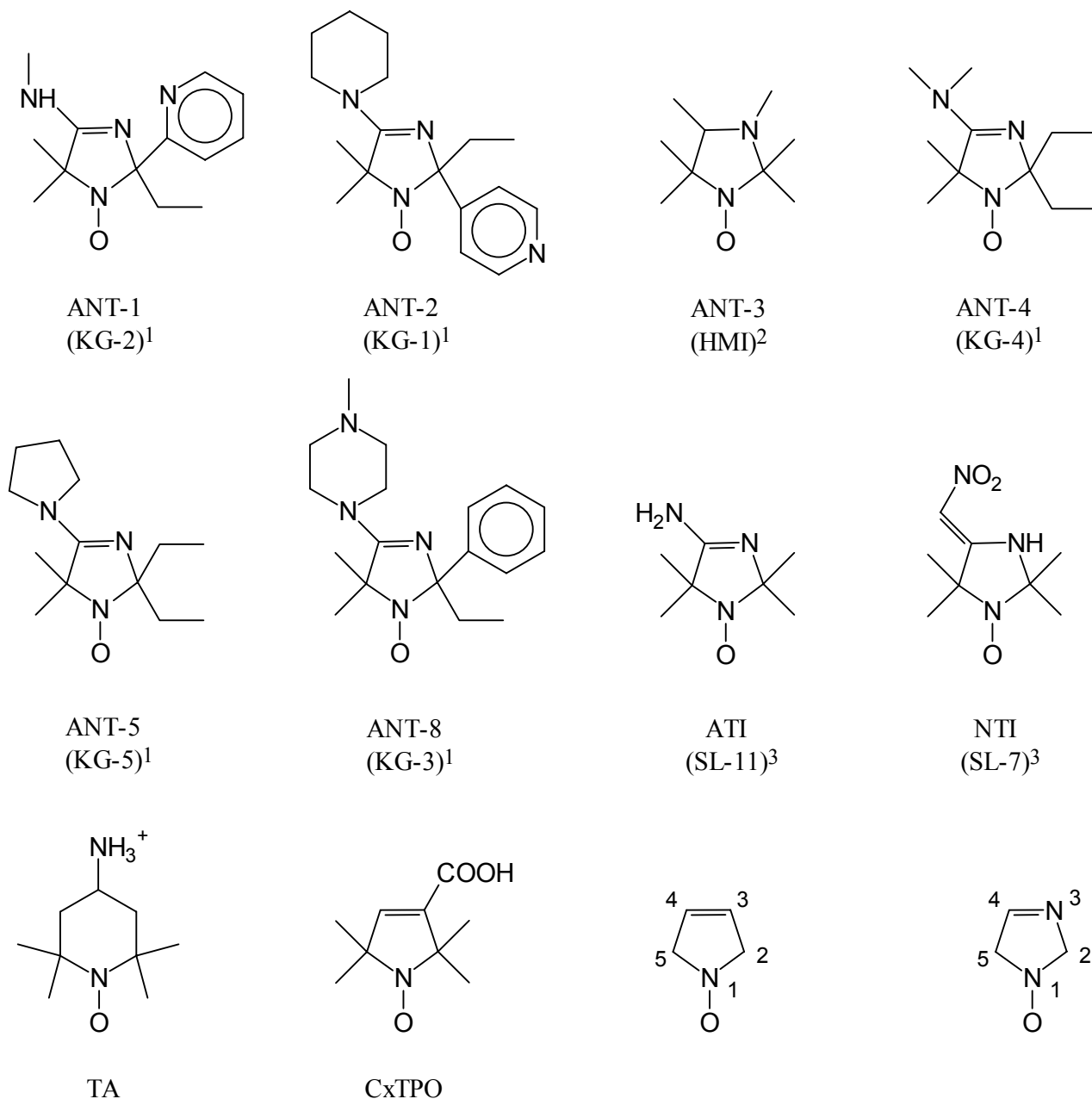


Рис. 1. Кислород- и pH-чувствительные нитроксильные радикалы. Обозначения введены в (Птушенко, 2002). В скобках приведены синонимы, встречающиеся в литературе: ¹ — (Tikhonov e.a., 2003), ² — (Foster e.a., 2003), ³ — (Khramtsov & Volodarsky, 1998).

Кинетику фотосинтетического транспорта электронов во всех исследуемых объектах изучали по фотоиндуцируемым изменениям величины сигнала ЭПР I от окисленных реакционных центров ФС 1 (P₇₀₀⁺). Для анализа работы ФС 2 и комплексов дыхательной ЭТЦ цианобактерий измеряли концентрацию кислорода в среде полярографическим методом и методом ЭПР с помощью кислород-чувствительной спиновой метки СхТРО (см. рис. 1). Для измерения внутритилакоидного pH в хлоропластах использовали pH-

чувствительные спиновые метки, приведенные на рис. 1. Спектры внутритилакоидной фракции молекул метки вычленили с помощью непроникающего через мембрану парамагнитного уширителя оксалата хрома (CrOx). Измерение скорости фосфорилирования в изолированных хлоропластах проводили рН-метрическим методом (по защелачиванию среды при синтезе АТФ). Целостность тилакоидных мембран хлоропластов проверяли по эффекту фотоиндуцированного уширения спиновой метки ГА, поглощаемой тилакоидами в ответ на закисление внутритилакоидного пространства. Целостность хлоропластной мембраны проверяли по фотоиндуцированному восстановлению феррицианида хлоропластами, которая также измерялась рН-метрически (по защелачиванию среды при восстановлении феррицианида).

Изложение результатов диссертационной работы составляет содержание последних трех глав (главы III–V) и построено следующим образом. **Глава III** носит "инструментальный" характер: она содержит подробное описание свойств кислород- и рН-чувствительных спиновых меток, анализ возможности их применения в исследованиях фотосинтеза и некоторые полученные с их помощью результаты, относящиеся к наиболее простым модельным фотосинтетическим системам — изолированным хлоропластам класса Б. **Глава IV** (и дополняющее ее **Приложение 3**) описывает исследования интактных фотосинтетических систем, в которых находят свое применение некоторые из исследованных в предыдущей главе спиновых меток. Каждому из исследуемых интактных фотосинтетических объектов — цианобактериям и листьям древесных растений — посвящен отдельный раздел главы. В первом разделе, посвященном цианобактериям, исследуются изменения их биофизических характеристик под действием контролируемого влияния на фотосинтетический аппарат (с использованием ряда мутантов и методов ингибиторного анализа). На полученные при этом результаты отчасти опирается содержание второго раздела, в котором описывается вторая интактная система — листья древесных растений, произрастающих в разных условиях городской среды обитания. Главная задача этого раздела — анализ состояния фотосинтетического аппарата этих растений на основании наблюдаемых изменений (под действием антропогенных влияний) их биофизических характеристик. Последняя **Глава V**, хотя и посвящена исследованиям, выполненным на изолированной системе (на изолированных хлоропластах класса Б), однако предметом исследований является взаимодействие фотосинтетического аппарата с природным пигментом

(амарантином), который, возможно, играет роль в регуляции фотосинтетических процессов *in vivo* в растениях порядка *Centrospermae* (Кононков, Гинс, 1997). Опишем теперь подробнее содержание каждой из глав III–V.

Глава III посвящена описанию результатов исследований свойств кислород- и рН-чувствительных спиновых меток и их взаимодействия с хлоропластами; глава содержит 7 разделов.

Раздел III.1 содержит описание физико-химических свойств рН-чувствительных спиновых меток, приведенных на рис.1. Приведены спектры меток в буферных водных растворах, зависимости параметров спектров ЭПР от рН и от концентраций меток. Исследовано влияние кислорода и некоторых солей на спектры ЭПР нитроксильных радикалов.

В **разделе III.2** описано взаимодействие рН-чувствительных спиновых меток с хлоропластами: окислительно-восстановительные превращения спиновых меток при взаимодействии с хлоропластной ЭТЦ, фотоиндуцированное поглощение молекул метки тилакоидами, фотоиндуцированное связывание и диссоциация молекул метки с тилакоидной мембраной. Показана связь между фотоиндуцированным поглощением, интенсивностью редокс-превращений и величиной pK_a метки. Показано, что метки АТI, NTI и ANT-3 не оказывают заметного разобщающего действия на тилакоидные мембраны в концентрациях, используемых для измерений внутритилакоидного рН (≤ 3 мМ).

Основные результаты, касающиеся кислород-зависимых изменений спектров ЭПР рН-чувствительных спиновых меток в хлоропластах, вынесены в отдельный **раздел III.3**. Основные исследования выполнены на метке ANT-3, для которой исследовано влияние разнообразных факторов на кинетику фотоиндуцированных изменений величины ее сигнала ЭПР в хлоропластах: влияние условий газообмена и активных форм кислорода, режима функционирования ЭТЦ, концентрации метки и содержания активно функционирующих ЭТЦ в суспензии. В результате было показано, что в условиях наших экспериментов главную роль в изменении спектра метки играют следующие факторы:

- 1) редокс-превращения молекул спиновой метки при их взаимодействии с ЭТЦ хлоропластов, приводящие к потере молекулами метки парамагнитных свойств;
- 2) влияние кислорода как парамагнитного уширителя спектра ЭПР при низких значениях мощности СВЧ ($P_{СВЧ} < 10$ мВт);

- 3) влияние кислорода как парамагнитного «релаксатора» при высоких значениях мощности СВЧ ($P_{СВЧ} > 10$ мВт);
- 4) концентрационно-зависимые изменения спектра метки, обусловленные фотоиндуцированным перераспределением молекул метки между компартаментами хлоропластов (поглощение молекул метки тилакоидами).

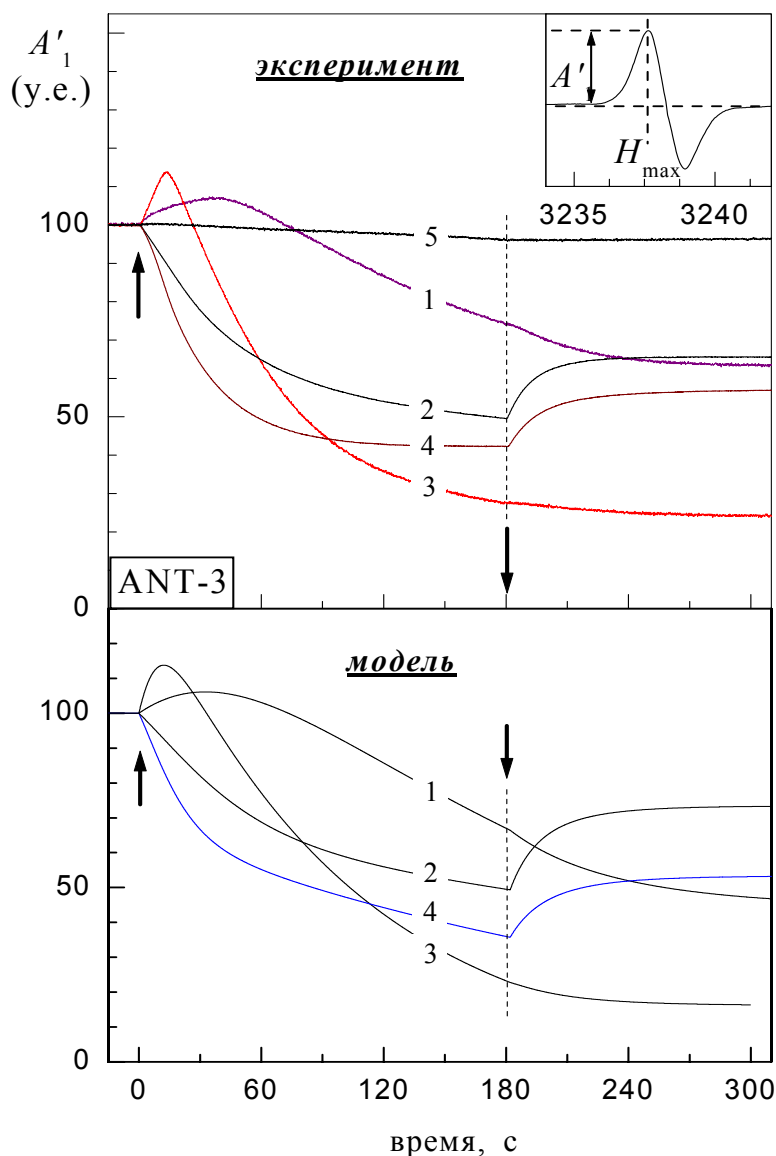


Рис. 2. Кинетика фотоиндуцированных изменений амплитуды (A'_1) низкополевой компоненты спектра ЭПР спиновой метки ANT-3 в хлоропластах: 1 — контроль, $P_{СВЧ} = 1$ мВт; 2 — контроль, $P_{СВЧ} = 100$ мВт; 3 — в присутствии NH_4Cl , $P_{СВЧ} = 1$ мВт; 4 — в присутствии NH_4Cl , $P_{СВЧ} = 100$ мВт; 5 — в присутствии каталазы, $P_{СВЧ} = 1$ мВт. Концентрация метки — 1 мМ, концентрация хлоропластов соответствует 1 мкМ R_{700} . Вертикальными стрелками показаны моменты включения и выключения белого света.

Вклад каждого из этих факторов в фотоиндуцированные изменения спектра спиновой метки различен для разных меток и определяется интенсивностью ее взаимодействия с ЭТЦ хлоропластов, степенью уширяющего и "релаксаторного" влияния кислорода при разных его концентрациях, а также трансмембранной разностью рН, скоростью переноса электронов по ЭТЦ и активностью хлоропластной каталазы. Для количественного определения перечисленных характеристик метки и ее взаимодействия с хлоропластами на основании наблюдаемых в эксперименте фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР метки, мы

разработали простую математическую полуэмпирическую модель, учитывающую влияние всех перечисленных выше факторов на величину сигнала ЭПР спиновой метки. Описанию этой модели и полученных с ее помощью результатов посвящен **раздел III.4**. Показано, что в хлоропластах класса Б, выделяемых по используемой нами методике, при освещении происходит уменьшение концентрации растворенного молекулярного кислорода (за счет неполного разложения перекиси водорода, образующейся в ходе псевдоциклического электронного транспорта) за характерное время ~ 50 – 100 с при концентрации хлоропластов, соответствующей ~ 1 мкМ P_{700} . В темноте наблюдается "регенерация" кислорода (по-видимому, за счет действия хлоропластной каталазы) с характерным временем ~ 50 – 100 с. Наилучшее соответствие модельных кривых экспериментальным достигается при величине $\Delta pH \sim 3$, причем характерное время образования ΔpH на свету составляет 4 – 7 с, а время рассеяния ΔpH в темноте — ~ 10 с. Добавление в суспензию разбавителя (NH_4Cl) ускоряет восстановление метки в 3 – 5 раз; примерно во столько же ускоряется и фотоиндуцированное поглощение кислорода. Типичные экспериментальные и модельные кинетические кривые для метки ANT-3 приведены на рис. 2.

В **разделе III.5** суммируются данные, полученные по физико-химическим свойствам исследованных нами спиновых меток (ANT-1, ANT-2, ANT-3, ANT-4, ANT-5, ANT-8, ATI, NTI) и их взаимодействию с хлоропластами, описанные в предыдущих разделах данной главы, и делаются выводы о возможности их применения для измерения pH внутри тилакоидов (pH_{in}). Так, pH-чувствительные спиновые метки ANT-1, ANT-2, ANT-3, ATI, обладающие значениями pK ниже $6,5$ – $7,0$, являются наиболее перспективными для измерений pH_{in} по эффекту pH-зависимого изменения формы спектра метки при ее протонировании/депротонировании. Спектры ЭПР этих меток наименее подвержены искажениям за счет быстрой потери молекулами метки ее парамагнитных свойств и/или эффекта концентрационного уширения при перераспределении метки внутри хлоропласта. Метки ANT-4, ANT-5, ANT-8, NTI, обладающие значениями $pK \geq 7$, имеют спектры ЭПР, которые могут заметно искажаться в результате концентрационного уширения и потери парамагнетизма. Тем не менее, для этих меток также наблюдаются фотоиндуцированные изменения их спектров в хлоропластах. Поглощение этих меток хлоропластами, когда их концентрация внутри тилакоидов возрастает не более, чем 10 раз, еще не сопровождается заметным искажением формы

спектра из-за эффекта концентрационного уширения. Таким образом, используя эти метки, можно измерять значения внутритилакоидного рН по рН-зависимым изменениям спектров ЭПР.

Применению изученных нами спиновых меток к измерениям рН внутри тилакоидов посвящен следующий **раздел III.6**. С использованием спиновых меток ANT-3, ANT-4 и ANT-5, в присутствии парамагнитного уширителя CrOx в среде в концентрациях 8–16 мМ, показано, что при освещении изолированных хлоропластов класса Б происходит закисление внутритилакоидного пространства; образующаяся при этом величина $\Delta\text{pH} \geq 2\text{--}2,5$. Спектры ЭПР внутритилакоидной фракции метки приведены на рис. 3.

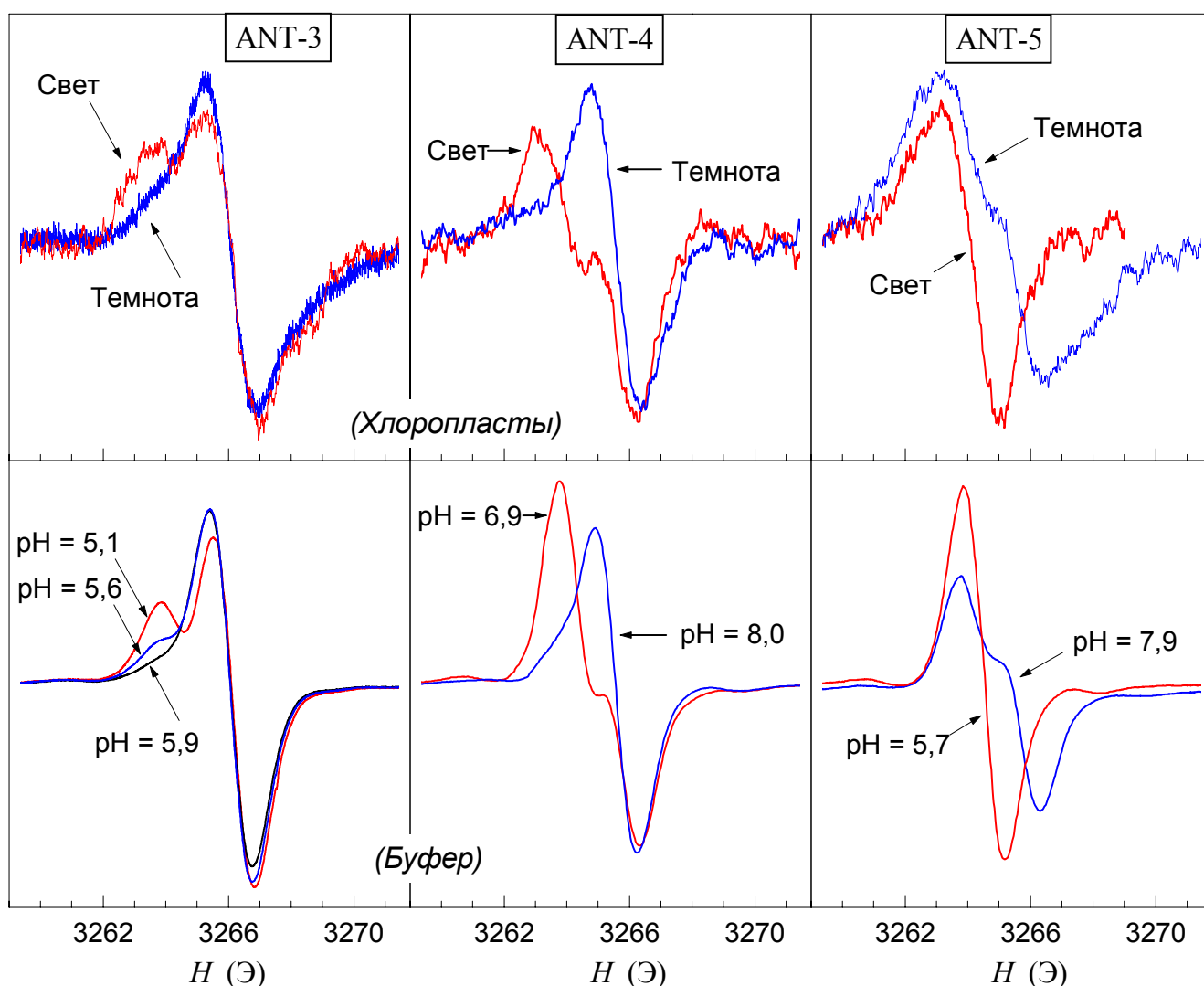


Рис.3. Спектры ЭПР спиновых меток ANT-3, ANT-4 и ANT-5: сверху — внутренний сигнал в хлоропластах, в темноте и при освещении (>15 с), в присутствии каталазы и метилвиологена; внизу — в буферных растворах при разных значениях рН. Концентрации меток — 1 мМ, концентрация хлоропластов соответствует ~ 5 мкМ P_{700} . Мощность СВЧ-излучения — 10 мВт.

Последний **раздел III.7** данной главы посвящен кислород-чувствительной спиновой метке СхТРО. Спектр ЭПР данной метки обладает суперсверхтонкой структурой (суперСТС), хорошо разрешенной в анаэробных условиях (см. рис. 4). Изучена зависимость формы спектра от концентрации кислорода и концентрации самой метки, выбраны параметры спектра, чувствительные к концентрации кислорода и построены калибровочные зависимости. Показано, что в изолированных хлоропластах $\geq 90\%$ кислорода, растворенного в среде, поглощается за время $\tau \approx 15$ с (при 1 мкМ Р_{700}). В темноте происходит "регенерация" молекулярного кислорода за время $\tau \leq 70\text{--}150$ с, что согласуется с данными, полученными при построении математической модели кинетики изменения величины сигнала ЭПР спиновых меток, описанной в разд. III.4.

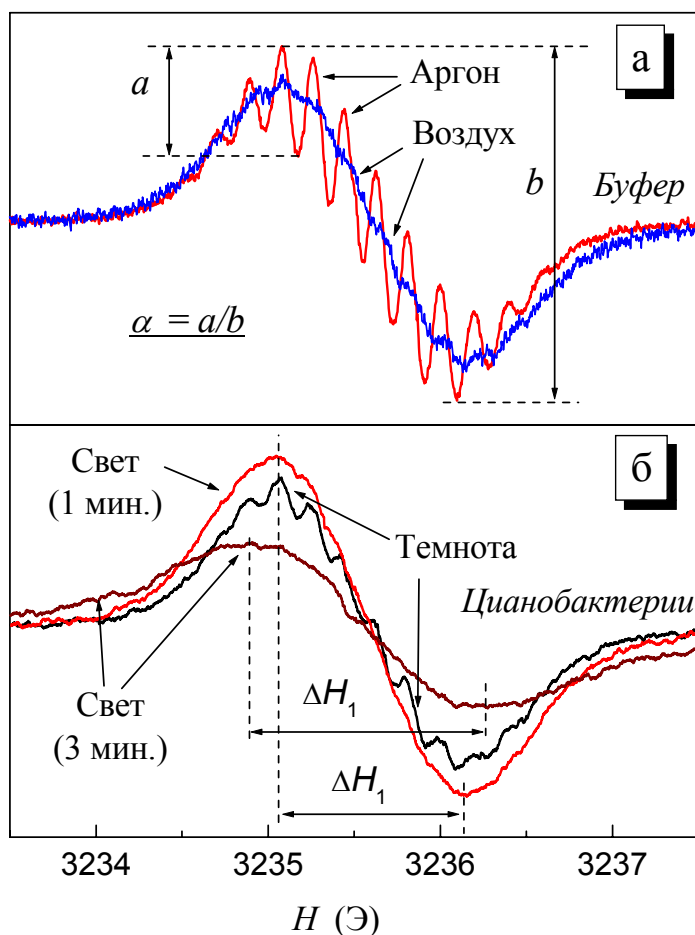


Рис. 4. Спектры ЭПР спиновой метки СхТРО: а — в буфере, в атмосфере аргона и в равновесии с воздухом; б — в суспензии цианобактерий *Synechocystis* sp. 6803, помещенной в газонепроницаемую кварцевую кювету, в темноте и на свету. Концентрация метки $0,1 \text{ мМ}$, амплитуда ВЧ-модуляции магнитного поля $H_m = 0,025 \text{ Гс}$.

Глава IV посвящена исследованиям фотосинтетического электронного транспорта в интактных фотосинтетических системах: в листьях древесных растений и в цианобактериях.

В разделе IV.1 описаны результаты исследований процессов фотосинтетического и дыхательного электронного и протонного транспорта, протекающих в тилакоидных мембранах цианобактерий. Наше внимание было сосредоточено, главным образом, на решении следующих вопросов:

- 1) какие факторы, в первую очередь, контролируют электронный транспорт (ЭТ) в тилакоидных мембранах цианобактерий?
- 2) Достигается ли при нормальной работе электрон-транспортных цепей (ЭТЦ) тилакоидной мембраны цианобактерий состояние дыхательного и/или фотосинтетического контроля? Если да, то какова величина коэффициента дыхательного (фотосинтетического) контроля?
- 3) Какой вклад вносят в трансмембранный протонный потенциал электрическая и концентрационная составляющие?
- 4) Какие комплексы вносят основной вклад в суммарный ЭТ на различных участках тилакоидных ЭТЦ (дегидрогеназы, ФС 2, оксидазы, ФС 1)?

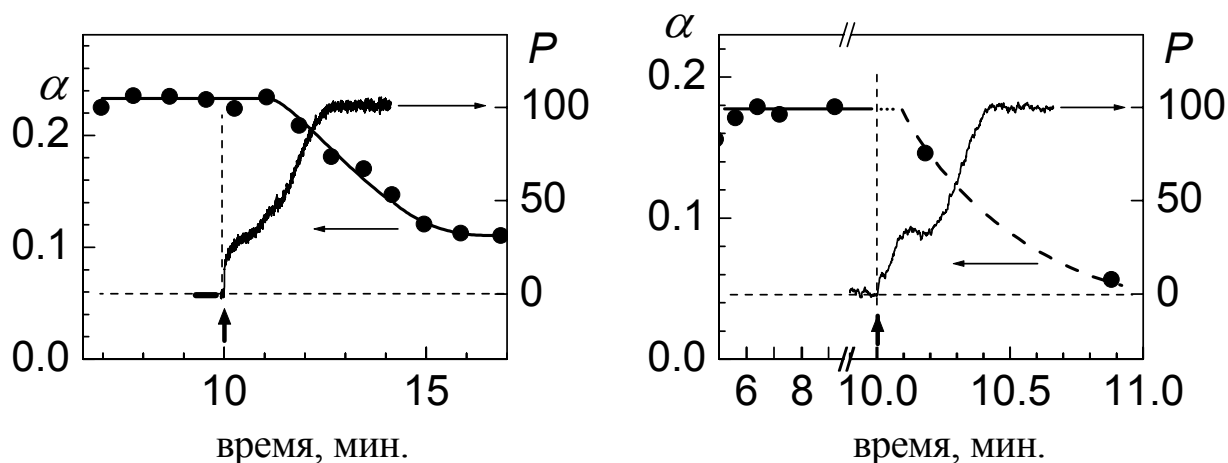


Рис. 5. Фотоиндуцированные изменения величины сигнала ЭПР I (P) и параметра α (см. определение на рис. 4) спектра ЭПР спиновой метки $SxTPO$, инкубируемой в суспензии цианобактерий *Synechocystis sp. 6803* (дикий тип): сверху — клетки, подвергавшиеся заморозке, с добавлением глицерина; внизу — клетки, не подвергавшиеся заморозке. Темновая адаптация — 10 мин. Момент включения света показан вертикальной стрелкой.

Основные исследования были выполнены на клетках цианобактерии *Synechocystis sp. PCC 6803* дикого типа, а также мутантных штаммов SDH^- , $NDH-ABC^-$, NDb^- , OX^- , $PS2^-$, не имеющих одного или нескольких компонентов дыхательной или фотосинтетической ЭТЦ (сукцинатдегидрогеназы, $NADH-$

дегидрогеназ 1 или 2, терминальных оксидаз или фотосистемы 2, соответственно). Было показано, что:

1) фотосинтетический электронный транспорт контролируется протонным потенциалом и скоростью оттока электронов на акцепторной стороне ФС 1; роль последнего фактора становится решающей в анаэробных условиях. При этом наблюдается корреляция между фотоиндуцированными процессами окисления P_{700} в ФС 1 и выделения кислорода в ФС 2 (рис. 5).

2) Коэффициенты дыхательного и фотосинтетического контроля (замедление электронного транспорта из-за образования трансмембранного протонного потенциала, измеренное в темноте и на свету, соответственно) составляют $\sim 2,0$ и $\sim 2,8$, соответственно (раздел IV.1.5) (см. рис. 6)

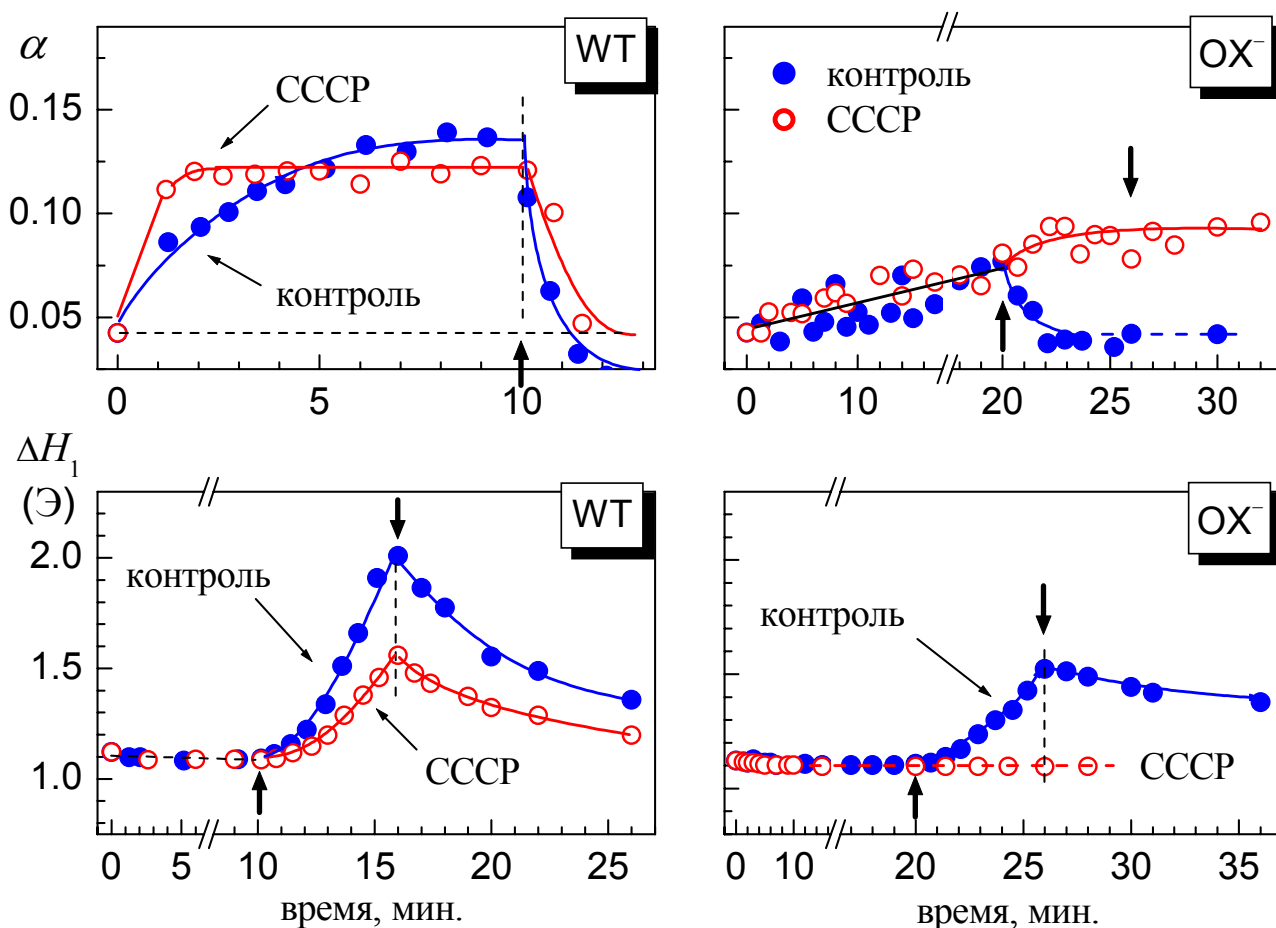


Рис. 6. Изменение параметров α и ΔH_1 (определения α и ΔH_1 см. на рис. 4) спектра ЭПР спиновой метки $SxTPO$, инкубируемой в суспензии цианобактерий *Synechocystis* sp. 6803, дикого типа (слева) и OX^- мутанта (справа), не подвергавшихся заморозке, в кварцевой кювете. Освещение белым светом — в течение 6 мин (моменты включения и выключения света показаны вертикальными стрелками). Концентрация CCCP — 80 мкМ.

3) Основной вклад в протонный потенциал, влияющий на скорость дыхания, вносит его концентрационная составляющая ΔpH (**раздел IV.1.5**).

4) Основной вклад (до 80%) в приток электронов в цепь переноса между двумя фотосистемами со стороны дыхательной цепи в темноте вносит SDH. В условиях освещения относительный вклад циклического транспорта электронов в суммарный поток электронов к P_{700}^+ составляет ~30-60% от полного потока электронов, включающего поток электронов от ФС 2. (**раздел IV.1.3**).

5) Основной вклад в электронный транспорт на участке ЭТЦ после PQ вносит ФС 1, вклад терминальных оксидаз тилакоидной мембраны в условиях освещения практически незаметен ($> 10\%$) (**раздел IV.1.4**).

6) Поглощение кислорода клеткой подавляется цианидом (20 мМ) на ~85%. Неспецифическое поглощение кислорода, сохраняющееся в отсутствие терминальных оксидаз, составляет менее 5% (**раздел IV.1.2**).

Раздел IV.2 посвящен исследованиям фотосинтетических характеристик древесных растений, произрастающих в естественных условиях в черте города. Поскольку, как известно, одной из главных экологических проблем города Москвы является обилие автотранспорта, нами для исследований были выбраны условия, в которых именно этот антропогенный фактор проявляется наиболее заметно: был исследован участок парка МГУ им. М.В.Ломоносова, примыкающий к двум оживленным транспортным магистралям. В нашем исследовании мы попытались ответить на три вопроса:

1) какие показатели фотосинтеза наиболее чувствительны к загрязненности среды произрастания растений продуктами автомобильных выхлопов;

2) какие изменения в фотосинтетическом аппарате растений происходят под действием этого антропогенного фактора;

3) на каких характерных расстояниях от источника загрязнения (дороги) проявляется его влияние в естественных (городских) условиях. Очевидно, последний вопрос имеет также большое практическое значение.

Работа включала измерения фотосинтетических характеристик листьев с применением трех разных биофизических методов: электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), медленной индукции флуоресценции (МИФ; совместно с В.А. Караваевым) и термолюминесценции (ТЛ; совместно с М.К. Солнцевым); регистрировали также спектры флуоресценции и содержание разных форм хлорофилла в исследуемых образцах. Измерения проводились на растениях нескольких видов (клен платановидный, *Acer platanoides* L., клен

американский, *A. negundo* L., рябина обыкновенная, *Sorbus aucuparia* L., липа мелколистная, *Tilia cordata* L.); бо́льшая часть результатов была получена на листьях Рябины обыкновенной. В результате этой работы было показано, что:

1) "кинетические" характеристики фотосинтетических процессов в листьях растений (времена фотоиндуцированного окисления P_{700} , тушения МИФ и т.п.) более чувствительны к условиям произрастания растений, чем "стационарные" показатели.

2) Для древесных растений, произрастающих в составе относительно густых посадок ("лес") вдоль автомобильной дороги, основные показатели фотосинтетической активности перестают заметно меняться при удалении от нее, начиная с 50–70 м (см. рис. 7). Это позволяет предположить, что характерная "глубина проникновения" автомобильных выхлопов в лесопосадки составляет около 50–70 м, и растения, произрастающие на бо́льших расстояниях от дороги, относительно слабо испытывают ее антропогенное воздействие.

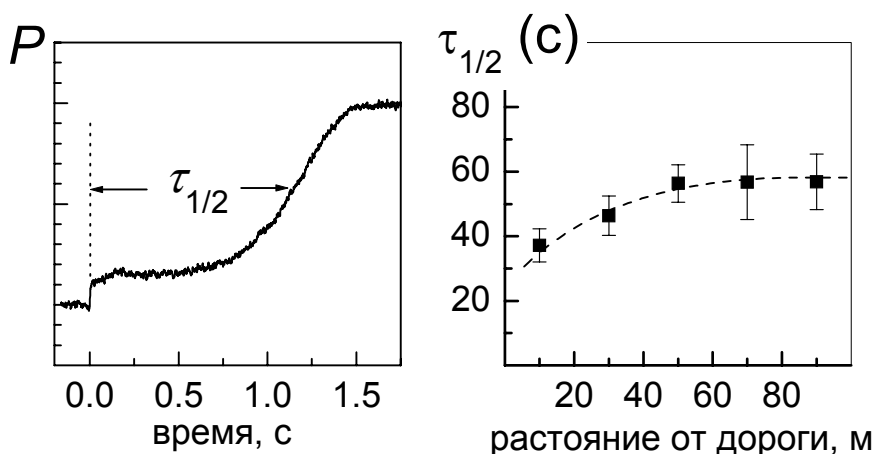


Рис. 7. Зависимость индукционного времени $\tau_{1/2}$ фотоиндуцированного окисления P_{700} листьев рябины от расстояния места произрастания растения от дороги.

Исследования, описанные в **Главе V**, выполнены на изолированной системе (хлоропластах класса Б). Предметом этих исследований является взаимодействие фотосинтетического аппарата с природным пигментом амарантином, который, возможно, играет роль в регуляции фотосинтетических процессов *in vivo* в растениях порядка *Centrospermae*, и, в частности, рода *Amaranthus*. Методом ЭПР были исследованы фотоиндуцированные окислительно-восстановительные превращения P_{700} в хлоропластах растений нескольких видов (бобов (*Vicia faba* L.), амаранта (*Amaranthus tricolor* L.) и шпината (*Spinacia oleracea* L.)) и участие в них амарантина, а также реакций

протонного транспорта в присутствии амарантина. В итоге было показано, что амарантин может взаимодействовать с ЭТЦ хлоропластов, восстанавливаясь за счет взаимодействия с ФС 2. Кроме того, в хлоропластах амаранта амарантин приводит к частичному восстановлению реакционных центров ФС 1. При этом амарантин практически не оказывает влияние на светозависимое образование трансмембранной разности рН.

Диссертация также содержит три приложения.

Приложение 1 содержит расчет распределения молекул спиновой метки в хлоропластах, возникающее при закислении внутритилакоидного пространства за счет работы фотосинтетической ЭТЦ. Результаты этого расчета используются для построения полуэмпирической модели фотоиндуцируемых изменений величины спектра ЭПР спиновой метки в хлоропластах, описанной в разделе III.4.

Приложение 2 представляет собой дополнение к разделу III.3 и содержит не включенные в него экспериментальные данные по фотоиндуцированным изменениям величины сигнала ЭПР всех исследованных в данной работе имидазолиновых и имидазолидиновых спиновых меток в хлоропластах.

Приложение 3 содержит экспериментальные данные, полученные при исследовании цианобактерий, не связанные непосредственно с вопросами, поставленными нами в разделе IV.1. В данном приложении описаны исследования фотосинтетического электронного и протонного транспорта в клетках "длинноклеточного" мутанта Ftn2 цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942. Приведены результаты измерений фотосинтетического трансмембранного градиента рН и кинетики электронного транспорта в клетках цианобактерий. По полученным результатам высказано предположение, что отток электронов от ФС 1 у Ftn2 не контролируется непосредственно кислородом (как это имеет место у *Synechocystis* 6803), а каким-либо другим акцептором (или регулятором), истощающимся в анаэробных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в тилакоидных мембранах интактных цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803, выращенных в автотрофных условиях, дыхание и фотосинтетический транспорт электронов контролируется протонным потенциалом. Замедление скоростей дыхания (в темноте) и переноса электронов на участке между двумя фотосистемами (в условиях освещения) обусловлено, в основном, концентрационной составляющей (ΔpH)

протонного потенциала. Коэффициенты дыхательного (k_R) и фотосинтетического (k_P) контроля равны $k_R = 2,0$ и $k_P = 2,8$.

2. Показано, что скорость оттока электронов от ФС 1 является существенным фактором регуляции электронного транспорта в клетках цианобактерий. В анаэробных условиях отток электронов от ФС1 является лимитирующим звеном в работе фотосинтетической цепи переноса электронов.
3. Измерены вклады дыхательной и фотосинтетической цепей переноса электронов в процессы электронного транспорта в тилакоидной мембране *Synechocystis* sp. PCC 6803.
 - Поток электронов на кислород через терминальные оксидазы (темновое дыхание) не превосходит 10% от общего потока электронов к P_{700}^+ в условиях освещения. Неспецифическое (цианид-резистентное) поглощение кислорода составляет не более 15% от общей скорости дыхания в темноте. Сукцинат-дегидрогеназа является основным донором электронов (до 80%), поступающих в пластохиноновый пул со стороны дыхательной цепи.
 - В условиях освещения непрерывным светом клеток дикого вида вклад циклического транспорта электронов в поток электронов к P_{700}^+ достигает ~30-60% от полного потока электронов, включающего приток электронов к P_{700}^+ от ФС 2.
4. Установлена взаимосвязь между физико-химическими свойствами ряда рН-чувствительных нитроксильных радикалов (спиновых меток) имидазолинового и имидазолидинового ряда и характером их взаимодействия с хлоропластами. Показано, что спиновые метки ANT-1, ANT-3, ANT-4, ANT-5 и АПІ могут быть использованы в качестве зондов для количественных измерений внутритилакоидного рН в хлоропластах.
5. Определены «кинетические» параметры фотосинтетических процессов в листьях растений, измеряемые методом ЭПР и медленной индукции флуоресценции, чувствительные к условиям произрастания растений, включая неблагоприятные антропогенные факторы внешней среды.
6. Показано, что беталаиновый пигмент амарантин взаимодействует с хлоропластами, восстанавливаясь за счет взаимодействия с ФС 2. В хлоропластах амаранта амарантин является донором электрона для ФС 1. При этом амарантин практически не влияет на светозависимое образование трансмембранной разности рН.

Благодарности

В заключение я хотел бы выразить глубокую благодарность своему научному руководителю, Александру Николаевичу Тихонову, за удивительную деликатность, терпение, постоянную заботу и внимание, за радость совместной работы с ним все эти одиннадцать лет. Я признателен всем, с кем мне довелось сотрудничать, всем, кто в той или иной форме оказывал мне помощь и поддержку, за обсуждения, советы, идеи, разнообразные хлопоты и просто за человеческое участие. Я благодарен за все своим верным друзьям и маме, без которых и этот труд сегодня был бы невыносим.

Основные результаты диссертации представлены в следующих публикациях.

1. Караваев В.А., Солнцев М.К., Полякова И.Б., Птушенко В.В., Трубицин Б.В., Юрина Т.П., Юрина Е.В., Тихонов А.Н. (2001) «Изменения медленной индукции флуоресценции листьев клена вблизи транспортных магистралей». // Биофизика, т.46, стр.381-382.
2. Птушенко В.В., Гинс М.С., Гинс В.К., Тихонов А.Н. (2002) «Взаимодействие амарантина с электротранспортной цепью хлоропластов». // Физиология растений, т.49, стр.656-662.
3. Trubitsin V.V., Ptushenko V.V., Koksharova O.A., Mamedov M.D., Vitukhnovskaya L.A., Grigor'ev I.A., Semenov A.Yu., Tikhonov A.N. (2005) «EPR study of electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Oxygen-dependent interrelations between photosynthetic and respiratory electron transport chains». // Biochim. Biophys. Acta, v. 1708, pp.238–249.
4. Солнцев М.К., Караваев В.А., Кузнецов А.М., Птушенко В.В., Трубицин Б.В., Францев В.В., Тихонов А.Н. (2001) «Изменения биофизических показателей листьев в зависимости от удаленности растений от транспортных магистралей». // Тезисы докладов “3-й Всероссийской научной конференции “Физические проблемы экологии (Физическая экология)”, Москва, 22-24 мая 2001 г., с.180.
5. Птушенко В.В. (2001) «Взаимодействие амарантина с электротранспортной цепью хлоропластов». // Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов-2001". Секция "Физика". Сборник тезисов. Москва, физический ф-т МГУ.

6. Птушенко В.В., Гинс М.С., Тихонов А.Н. (2001) «Участие амарантина в окислительно-восстановительных реакциях в изолированных хлоропластах». // Труды IV Международного симпозиума “Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования”, Из-во РУДН, Москва–Пушино, 20–24 июня 2001 г., стр.96-98.
7. Solntsev M.K., Karavaev V.A., Kuznetsov A.M., Ptushenko V.V., Trubitsin B.V., Frantsev V.V., Tikhonov A.N. (2001) «Biophysical characteristics of tree leaves near the urban highways». // Abstracts, International conference “Ecological physiology of plants: problems and possible solutions in the XXI century”. October 1-6, 2001, pp.113-114. (Солнцев М.К., Караваев В.А., Кузнецов А.М., Птушенко В.В., Трубицин Б.В., Францев В.В., Тихонов А.Н. «Биофизические показатели листьев древесных пород вблизи транспортных магистралей». – Материалы Международной конференции “Актуальные вопросы экологической физиологии растений в XXI веке” (Сыктывкар) – 1-6 октября 2001 г., стр. 113-114.)
8. Tikhonov A.N., Trubitsin B.V., Ptushenko V.V., Grigoriev I.A. (2002) «Proton transport in chloroplasts as studied with pH-sensitive spin labels». // Abstracts of 35th Annual International Meeting: Advanced Techniques and Applications of EPR, Aberdeen, Scotland, UK, p.L11.
9. Птушенко В.В. (2002) «Применение pH-чувствительных спиновых меток для исследования протонного транспорта в хлоропластах». // Материалы молодежной школы-конференции “Современные проблемы биохимической физики”, Москва, 2–9 декабря 2002 г., стр. 24.
10. Tikhonov A.N., Agafonov R.V., Grigor’ev I.A., Ikryannikova L.N., Kirilyuk I.A., Ptushenko V.V., Trubitsin B.V. (2003) «Imidazoline- and Imidazilidine Nitroxide Radicals as Probes for the Study of Bioenergetic Processes in Chloroplasts» // Abstracts of 5th Meeting of the European Federation of EPR Groups, Lisbon, Portugal, p.O28.
11. Tikhonov A.N., Trubitsin B.V., Agafonov R.V., Grigor’ev I.A., Kirilyuk I.A., Koksharova O.A., Ptushenko V.V., Mamedov M.D. (2004) «EPR study of Bioenergetic Processes in Oxygenic Photosynthetic Systems». // Abstracts of 13th European Bioenergetic Conference (EBEC), Pisa (Italy), v.13, p. 262.