

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Ангал Тарас Корнелиевич

**Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата к недостатку
основных элементов минерального питания**

03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
А.Б.Рубин

Москва – 2018

Оглавление

Список сокращений	5
Введение. Общая характеристика работы	7
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1. Структурно-функциональная организация фотосинтетического аппарата в хлоропласте.....	13
1.2. Регуляция первичных процессов фотосинтеза.....	21
1.2.1. Пути генерации и утилизации АФК в хлоропласте.....	21
1.2.2. Быстрые и медленные механизмы регуляции.....	23
1.2.3. Альтернативные пути электронного транспорта, нефотохимическое тушение и переход состояний.....	25
1.3. Воздействие ключевых стрессовых факторов на фотосинтез.....	34
1.4. Метаболические процессы в клетке зеленой микроводоросли <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> в условиях дефицита элементов минерального питания.....	37
1.4.1. Особенности углеродного метаболизма.....	37
1.4.2. Влияние дефицита азота, серы и фосфора на основные метаболические пути.....	42
1.4.3. Анаэробный метаболизм и механизмы образования водорода в темноте и на свету.....	49
1.4.4. Фотообразование водорода в условиях минерального голодания.....	55
Глава 2. Материалы и методы исследований	60
2.1. Объекты и методы культивирования.....	60
2.1.1. Объекты исследования.....	60
2.1.2. Культивирование зеленых микроводорослей.....	60
2.1.3. Получение субклеточных препаратов.....	65
2.2. Измерительные методы.....	66
2.2.1. Определение ростовых параметров культуры, содержания пигментов, общего белка, крахмала и АТФ.....	66
2.2.2. Иммуноблоттинг.....	68
2.2.3. Анализ АФК и активности антиоксидантных систем.....	68
2.2.4. Определение скоростей фотосинтетического образования кислорода, электронного транспорта через ФСІ и 2, клеточного дыхания и хлородыхания.....	71
2.2.5. Газовая хроматография и определение гидрогеназной активности.....	72

2.2.6. Ингибиторный анализ	73
2.2.7. Измерение параметров ФХ методом амплитудно-импульсной модуляции.....	74
2.2.8. Регистрация и анализ кривых световой индукции ФХ.....	75
2.2.9. Измерение кинетических кривых реокисления Qa	79
2.2.10. Регистрация светоиндуцированных редокс переходов P_{700} в ФС1.....	80
2.2.11. Измерение кинетических кривых ФХ в фотобиореакторе.....	81
2.2.12. Измерение и анализ кривых затухания ФХ в наносекундном диапазоне...	84
2.2.13. Регистрация термолюминесценции.....	85
2.2.14. Измерение спектров испускания ФХ.....	86
2.2.15. Микроскопия.....	87
2.2.16. Определение среднеточечного редокс потенциала пары Qa/Qa^-	88
2.2.17. Оценка спектральных характеристик ФС1 и 2 методом 'Fo rise'.....	89
2.3. Анализ кинетических кривых роста/затухания ФХ и редокс переходов P_{700} с использованием Монте-Карло модели ППФ.....	92
2.3.1. Общая характеристика метода и модели.....	92
2.3.2. Моделирование реакций дезактивации энергии возбуждения.....	94
2.3.3. Моделирование реакций электронного транспорта.....	95
Глава 3. Распределение энергии и электронных потоков в хлоропласте <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> при дефиците серы.....	99
3.1. Окислительно-восстановительное равновесие в клетке и образование АФК...	99
3.2. Баланс между ФС1 и ФС2.....	106
3.3. Циклический транспорт электронов вокруг ФС1.....	109
3.4. Псевдоциклический транспорт электронов и хлордыхание.....	111
Глава 4. Функциональное состояние ФС2 в клетках <i>C. reinhardtii</i> в условиях недостатка серы.....	115
4.1. Пути инактивации ФС2.....	115
4.2. Нефотохимическое тушение.....	128
4.2.1. Диссипативные процессы в антенне ФС2.....	128
4.2.2. Модификации фотозащитного характера в центрах ФС2.....	133
Глава 5. Механизмы и роль фотообразования водорода голодающими клетками <i>C. reinhardtii</i>.....	140
5.1. Динамическая регуляция электронного транспорта в клетке на анаэробной стадии серного голодания.....	140

5.2. Взаимосвязь между фотопродукцией водорода и электрон-транспортными потоками в клетке.....	151
5.3. Исследование роли фотообразования водорода в качестве адаптационного механизма.....	156
Глава 6. Разработка подходов к оптимизации фотопродукции водорода голодающими клетками <i>C. reinhardtii</i>.....	163
6.1. Иммобилизация микроводорослей в альгинатных пленках.....	163
6.1.1 Особенности фотообразования водорода иммобилизованной культурой...	163
6.1.2. Влияние интенсивности и спектральных характеристик света.....	168
6.1.3. Начальный pH среды как фактор оптимизации.....	174
6.2. Исследование фотообразования водорода в условиях дефицита магния как альтернативы серному голоданию.....	177
Глава 7. Механизмы регуляции фотосинтеза в листьях фасоли обыкновенной (<i>Phaseolus vulgaris</i>) в условиях дефицита азота.....	184
7.1. Активность первичных процессов и редокс состояние фотосинтетической ЭТЦ.....	184
7.2. Распределение энергии возбуждения и электронных потоков в хлоропласте.....	190
7.3. Нефотохимическое тушение.....	196
Обсуждение результатов.....	203
Заключение.....	210
Выводы.....	211
Список литературы.....	213
Приложение А.....	246

Список сокращений

- ФСА – фотосинтетический аппарат
- ППФ – первичные процессы фотосинтеза
- ЭТЦ – электрон-транспортная цепь
- ФС, PS – фотосистема
- КВК, ОЕС – кислород-выделяющий комплекс
- ЛЭТ – линейный электронный транспорт
- ЦЭТ – циклический электронный транспорт вокруг ФС1
- ПБК – пигмент-белковый комплекс
- АФК – активные формы кислорода
- ФХ – флуоресценция хлорофилла
- Хл – хлорофилл
- NPQ – нефотохимическое тушение
- qE – энергозависимый компонент нефотохимического тушения
- qP – коэффициент фотохимического тушения
- ETR – скорость фотосинтетического электронного транспорта
- ОЛР – трехфазная кривая индукции флуоресценции хлорофилла
- ССК, LHC – светособирающий комплекс
- PsbA, PsbS – субъединицы A (D1 белок) и S фотосистемы 2
- PsaD – субъединица D фотосистемы 1
- Рубиско – рибулозобисфосфат-карбоксилаза-оксигеназа
- Цит, cyt – цитохром
- ПХ, PQ – пластохинон
- Пц, Pc – пластоцианин
- Фд, Fd – ферредоксин
- Фео, Pheo – феофитин
- P₆₈₀ – специальный пигмент реакционного центра фотосистемы 2
- P₇₀₀ – специальный пигмент реакционного центра фотосистемы 1
- Qa – первичный хинонный акцептор электронов в фотосистеме 2
- Qb – вторичный хинонный акцептор электронов в фотосистеме 2
- A₀ – первичный акцептор электронов в фотосистеме 1
- A₁ – вторичный акцептор электронов в фотосистеме 1

ФНР, FNR – ферредоксин-НАДФ редуктаза
НДГ, NDH – НАДН-дегидрогеназа
ФХР, FQR – ферредоксин-хинон редуктаза
PGR5 – proton gradient regulation 5
PGRL1 – proton gradient regulation-like1
СОХ – цитохром оксидаза
РТОХ – пластидная терминальная оксидаза
АОХ – альтернативная оксидаза
СОД, SOD – супероксиддисмутаза
Flv – флавопротеины
КоА – кофермент А
НАД(Ф) – никотинамидадениндинуклеотид(фосфат)
АТФ – аденозинтрифосфат
Гл – глюкоза
ПФПФ, PPFD – плотность фотосинтетического потока электронов
ФАР – фотосинтетически активная радиация
E_m – стандартный среднеточечный редокс потенциал
ТАР, ТАР-S, ТАР-Mg – трис-ацетат-фосфатная среда (полная, без серы, без магния)
Н₂DCFDA – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетат
ДАВ – 3,3 – диаминобензидин
ДСВQ – 2,6 – дихлор – 1, 4 - бензохинон
FeCy – феррицианид калия
DCMU – дихлорфенилдиметилмочевина, диурон
ДБТХ, DBMIB – дибромтимохинон
СГ – салицил гидроксамат
ФССР – карбонилцианид-р-трифторметоксифенил-гидразон
ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенол
РАМ – pulse amplitude modulation

ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Фотосинтез является уникальным процессом преобразования энергии фотонов в энергию химических связей органических соединений, который является основой существования большинства форм жизни на Земле. В неблагоприятных условиях среды нарушается баланс между поглощением и запасанием энергии в реакциях фотосинтеза, что способствует генерации активных форм кислорода (АФК) и развитию окислительного стресса, вызывающего повреждение компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) (Полесская 2007, Иванов и др. 2014). В ответ в клетках происходит активация многоуровневой системы регуляции фотосинтеза, направленной на нормализацию баланса между процессами поглощения света, фотосинтетического электронного транспорта, фиксации углерода и потребления продуктов фотосинтеза (Тихонов 1999, Рубин и Кренделева 2003, Бухов 2004, Кренделева и др. 2017).

Так называемые «медленные» механизмы регуляции связаны с экспрессией фотосинтетических генов на уровне транскрипции и трансляции, контролируя синтез белков антенных комплексов и центров ФС1 и 2, стрессовых белков и молекул антиоксидантов. Сигнальную роль в запуске этих процессов выполняют специфические мессенджеры в цепи трансдукции стрессового сигнала, в том числе сами молекулы АФК. В отличие от медленной регуляции, быстрые механизмы обусловлены рН- и редокс-зависимыми структурными и функциональными перестройками компонентов фотосинтетического аппарата (ФСА), при которых не требуется синтеза белка *de novo* и которые протекают в диапазоне от нескольких секунд до минут. Например, генерация градиента рН в тилакоидной мембране индуцирует процесс тепловой диссипации энергии в антенне ФС2 и снижает скорость электронного транспорта через цитохромный (цит) *b6/f* комплекс, а восстановление пластохинонового (ПХ) пула способствует перераспределению энергии между двумя типами фотосистем в пользу ФС1 (переход состояний). Важную регуляторную роль выполняют также механизмы переключения фотосинтетического электронного транспорта в хлоропласте с линейного пути, где конечным акцептором электронов является двуокись углерода, на пути, где конечным акцептором электронов служит молекулярный кислород, либо по замкнутые циклы вокруг ФС1 или 2. Зеленые микроводоросли обладают специфическими путями переноса электронов на кислород и протоны с участием железосодержащих флавопротеинов FlvA/B и фермента анаэробного метаболизма - гидрогеназы, соответственно.

Недостаток минерального питания относится к основным природным стрессовым факторам, который связан, прежде всего, с дефицитом азота, серы или фосфора, входящих в состав аминокислот, фотосинтетических пигментов, нуклеиновых кислот, коферментов, витаминов и других соединений (Epstein and Bloom 2005). Минеральный стресс играет особенно важную роль в жизнедеятельности фитопланктонных организмов, включая микроводоросли, значительная часть которых обитает в обедненных биогенными элементами районах Мирового океана (Moog et al. 2013). В биотехнологии зеленых микроводорослей минеральное голодание используется для стимуляции биосинтеза липидов (биотоплива), каротиноидов, в частности, астаксантина и для стимуляции продукции водорода на свету (Shurin et al. 2016, Solovchenko and Chekanov 2014, Solovchenko 2015, Antal 2015, 2018). В настоящее время достаточно хорошо изучены процессы регуляции ФСА при адаптации фототрофных организмов к действию высокой освещенности, неблагоприятных температур, осмотического шока, дегидратации и определенных загрязнителей. Однако имеющиеся в литературе данные по механизмам регуляции процессов фотосинтеза при минеральном голодании носят, в основном, фрагментарный или прикладной характер, и направлены, главным образом, на изучение стрессового воздействия дефицита азота на урожайность сельскохозяйственных культур и на выход целевых биотехнологических продуктов. Также остаётся неясным, какие основные стратегии используются растениями и водорослями для адаптации к минеральному стрессу. В связи с этим в настоящее время ощущается необходимость системных исследований структурно-функциональной реорганизации ФСА в условиях дефицита макроэлементов. Понимание фундаментальных механизмов метаболического отклика на минеральный стресс возможно в сравнительных исследованиях основных групп зеленых фототрофных организмов.

Особый интерес представляют пути адаптации зеленых микроводорослей к условиям минерального голодания, при которых происходит самопроизвольный переход культуры в анаэробные условия с последующим длительным образованием водорода на свету, обусловленным взаимодействием между первичными процессами фотосинтеза (ППФ) и гидрогеназой. Детальное исследование механизмов этого явления необходимо для понимания его адаптационной роли в природе и может быть использовано для промышленного получения молекулярного водорода в качестве экологически чистого топлива.

Цель и задачи исследования

Диссертационная работа связана с решением фундаментальной биофизической проблемы - выяснением физико-химических механизмов регуляции первичных процессов фотосинтеза при адаптации растительного организма к изменяющимся условиям окружающей среды. Основное направление работы заключается в сравнительном исследовании структурных и функциональных перестроек ФСА в ответ на недостаток важных элементов минерального питания в хлоропласте зеленых микроводорослей и высших растений. Особое внимание уделено изучению функциональной роли ФС2, механизмов фотозащиты и регуляции потоков энергии и электронов в хлоропласте.

В работе были поставлены следующие **основные задачи**:

1. В условиях дефицита серы выяснить особенности распределения энергии и потоков электронов, а также генерации АФК в хлоропласте водорослевой клетки, используя в качестве объекта модельную зеленую микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii*.
2. В голодающих клетках *C. reinhardtii* исследовать характер функциональной модификации ФС2, диссипативные процессы в антенне и центрах фотосистемы, электронный транспорт на донорной и акцепторной сторонах, а также особенности редокс состояния и редокс потенциалов хинонных акцепторов.
3. Исследовать механизмы адаптации ФСА высших растений к дефициту азота (на примере фасоли обыкновенной *Phaseolus vulgaris*).
4. Выяснить особенности регуляции ППФ, механизмы и адаптационную роль фотообразования водорода клетками *C. reinhardtii* на анаэробной стадии минерального голодания.
5. Разработать практические подходы и рекомендации по оптимизации фотопродукции водорода путем повышения стабильности компонентов ППФ.

Научная новизна

Впервые выявлены основные механизмы адаптации ФСА зеленых микроводорослей и высших растений к минеральному стрессу. Показано, что реорганизация ФСА в условиях дефицита макроэлементов обусловлена, в основном, нарушением баланса между световыми и темновыми реакциями фотосинтеза и снижением потребности организма в конечных продуктах фотосинтеза. У зеленых микроводорослей адаптационная стратегия в этих условиях состоит в снижении содержания основных компонентов ФСА и в модификации ФС2, включающей направленные изменения редокс потенциалов хинонных акцепторов Qa и Qb и механизмы стабилизации Qa в восстановленном состоянии. У высших растений главную роль играет регуляция

количества хлоропластов в клетках мезофилла листа и нефотохимическое тушение (NPQ). Общими для голодающих зеленых водорослей и высших растений являются механизмы редокс-зависимой регуляции ППФ.

Показано, что фотосинтетическое образование водорода зелеными микроводорослями на анаэробной стадии минерального голодания является адаптационным механизмом, повышающим фотозащитные свойства и жизнеспособность культуры. Выявлены механизмы редокс-зависимой регуляции ФС2 в голодающих микроводорослях, связанные с динамическими изменениями восстановительных условий в клетке в момент перехода культуры в анаэробные условия и на стадии фотопродукции водорода. Определен вклад основных электрон-транспортных потоков в хлоропласте, энергизации тилакоидных мембран и митохондриального дыхания в фотообразование водорода. Обнаружено, что ингибирование циклического электронного транспорта вокруг ФС1 (ЦЭТ) приводит к многократному росту выхода водорода.

Научная и практическая значимость работы

Полученные в работе результаты раскрывают физико-химические механизмы регуляции ППФ в хлоропласте в условиях нарушения баланса между поглощением и утилизацией световой энергии. Обоснована гипотеза о важной роли ППФ в формировании метаболического ответа на стрессовые воздействия, основной мишенью которых являются темновые процессы фотосинтеза.

Предложен ряд практических подходов к оптимизации фотообразования водорода. Показано, что при иммобилизации культуры зеленых микроводорослей в альгинатных пленках и замещении серного голодания на магниевое голодание значительно продлевается период фотообразования водорода. Показана возможность регулировать потоки энергии через ФС1 и ФС2 в водорослевой клетке при освещении разными длинами волн видимого света, что может быть использовано для оптимизации выхода целевых продуктов. В частности, обнаружено, что преимущественное поглощение света фотосистемой 1 оказывает положительное влияние как на стабильность ФСА, так и на продукцию водорода голодающей культурой.

Разработана Монте-Карло модель ППФ, позволяющая по экспериментальным кинетическим кривым ФХ и редокс переходам P700 определять параметры состояния ФСА клеток в условиях стресса. С помощью оригинальной установки проведены измерения кинетических кривых индукции и затухания флуоресценции хлорофилла (ФХ) непосредственно в закрытом культиваторе. Установка может быть использована для длительного непрерывного мониторинга культур микроводорослей в фотобиореакторах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Дефицит основных элементов минерального питания у зеленых микроводорослей и высших растений приводит к преимущественной инаktivации процесса фиксации углерода по сравнению с ППФ, сокращению ФСА и индукции фотозащитных, антиоксидантных и регуляторных механизмов, среди которых - диссипативные процессы в антенне и реакционных центрах ФС2, изменения каротиноидного состава, необратимый переход из состояния 1 в состояние 2 и активация альтернативных путей электронного транспорта.
2. Функциональная модификация ФС2 в голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* включает стабилизацию Qa в восстановленном состоянии, энергетическое разобщение между антенной и реакционными центрами, деструкцию КВК и направленные изменения редокс потенциалов Qa и Qb фотозащитного характера.
3. Фотообразование водорода зелеными микроводорослями в условиях минерального стресса повышает устойчивость ФСА и жизнеспособность культуры. Эти эффекты связаны с реактивацией фотосинтетического электронного транспорта, поддержкой гликолиза и путей аэробного метаболизма на анаэробной стадии голодания.
4. Иммобилизация клеток микроводорослей, магниевое голодание и преимущественное поглощение света фотосистемой 1 являются перспективными подходами для пролонгации продукции водорода зелеными микроводорослями. Выход водорода на анаэробной стадии минерального голодания определяется соотношением между остаточной активностью ФС2, процессами утилизации кислорода и деградации запасов крахмала в клетке, активностью ЦЭТ и энергизацией мембран.
5. Разработанная Монте-Карло модель ППФ позволяет анализировать экспериментальные кинетические кривые индукции и затухания ФХ, и редокс переходы P700, измеренные в разных экспериментальных условиях.

Личный вклад автора заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке цели и путей решения поставленных задач, разработке и выборе методов исследования, анализе экспериментальных данных, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы. Часть работ по теме диссертации выполнена совместно с сотрудниками каф. биофизики биологического факультета МГУ и при участии коллег из департамента биохимии университета Турку (Финляндия).

Апробация работы

Материалы диссертации были многократно представлены на научных семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ и департамента биохимии университета Турку (Финляндия), а также на следующих конференциях, конгрессах и симпозиумах: Международном конгрессе '17th congress of the European society for photobiology' (Пиза, Италия, 2017), международной конференции 'Photosynthetic electron and proton transport in plants and algae: operation, regulation and function' (Арнем, Нидерланды, 2016), отчетной конференции 'The centre of Excellence' (Наантали, Финляндия, 2016), международной конференции 'Photosynthesis research for sustainability' (Пушино, Россия, 2016), международной конференции 'Phototech-2015: Towards a photosynthesis-biobased economy' (Рим, Италия, 2015), V съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, Россия, 2015), международной конференции '1st International solar fuels conference' (Уппсала, Швеция, 2015), XXI Пушкинских чтениях по фотосинтезу (Пушино, Россия, 2015), международной научной конференции 'Photosynthesis research for sustainability' (Пушино, Россия, 2014), международной конференции 'Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий' (Калининград, Россия, 2014), международном симпозиуме 'Photosynthetic proteins for technological applications: biosensors and biochips' (Антверпен, Бельгия, 2013), девятнадцатой международной научной конференции 'Математика. Компьютер. Образование.' (Дубна, Россия, 2012), международном конгрессе 'Nordic photosynthesis congress' (Наантали, Финляндия, 2012), международной конференции '14th International symposium on phototrophic prokaryotes' (Порто, Португалия, 2012), XX Пушкинских чтениях по фотосинтезу (Пушино, Россия, 2012), международной конференции 'Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий' (Н. Новгород, Россия, 2011), VI съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, Россия, 2011), международном конгрессе 'Nordic photosynthesis congress' (Копенгаген, Дания, 2008), ежегодных семинарах 'Plant biophysics days: photosynthesis, plant function and environment' (Наантали, Финляндия, 2008, 2009, 2012), международной научной конференции 'Aquafluor: chlorophyll fluorescence in aquatic sciences' (Нове-Гради, Чехия, 2007), международном конгрессе 'Nordic photosynthesis congress' (Уппсала, Швеция, 2006), международной конференции 'Фотосинтез в пост-геномную эру: структура и функции фотосистем' (Пушино, Россия, 2006), Всероссийской конференции 'Преобразование энергии света при фотосинтезе' (Пушино, Россия, 2005), международной конференции 'Primary processes of photosynthesis in bacteria and photosystem II' (Пушино, Россия, 2002).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному консультанту профессору Андрею Борисовичу Рубину за неоценимую помощь в подготовке данной работы.

Автор искренне благодарит своего наставника профессора Татьяну Евгеньевну Кренделеву за всестороннюю поддержку и помощь в работе.

Автор благодарит Галину Павловну Кукарских, Алену Александровну Волгушеву, профессора Галину Юрьевну Ризниченко и других сотрудников кафедры биофизики биологического факультета МГУ за помощь и поддержку, а также ценные замечания по содержанию работы.

Публикации. У автора имеется 70 публикаций в рецензируемых научных изданиях, из них по теме диссертации - 26 научных статей в индексируемых базах данных Web of Science, SCOPUS, RSCI и 4 монографии.

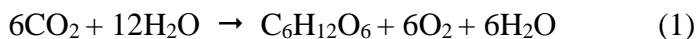
Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 252 страницах и содержит 85 рисунков и 14 таблиц. Диссертация включает 7 глав, в том числе обзор литературы, описание методов исследования и результаты работы, а также обсуждение результатов, заключение, выводы, список цитируемой литературы из 371 наименования и одно приложение.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Структурно-функциональная организация фотосинтетического аппарата в хлоропласте

Фотосинтез - основной процесс, определяющий специфику метаболизма фототрофных организмов, который протекает у высших растений и зеленых водорослей в специализированных органеллах – хлоропластах – при участии пигментов Хл *a* и *b*. Запасание энергии света в ППФ происходит в форме НАДФН и АТФ; энергия этих молекул затем используется в т.н. «темновых» процессах фотосинтеза, представленных реакциями цикла Кальвина, осуществляющими фиксацию двуокиси углерода и сопряженный синтез глюкозы (Кочубей 2001, Blankenship 2002, Nobel 2009). Основным донором электронов для фотосинтетической ЭТЦ является вода, окисление которой происходит в специализированном комплексе КВК. Общее уравнение фотосинтеза имеет следующий вид:

СВЕТ



Молекулы воды присутствуют с обеих сторон уравнения из-за их разного происхождения. Так, 6 молекул кислорода в правой части уравнения образуются при окислении 12 молекул воды в левой части, в то время как происхождение 6 молекул воды в правой части связано с восстановлением двуокиси углерода до глюкозы.

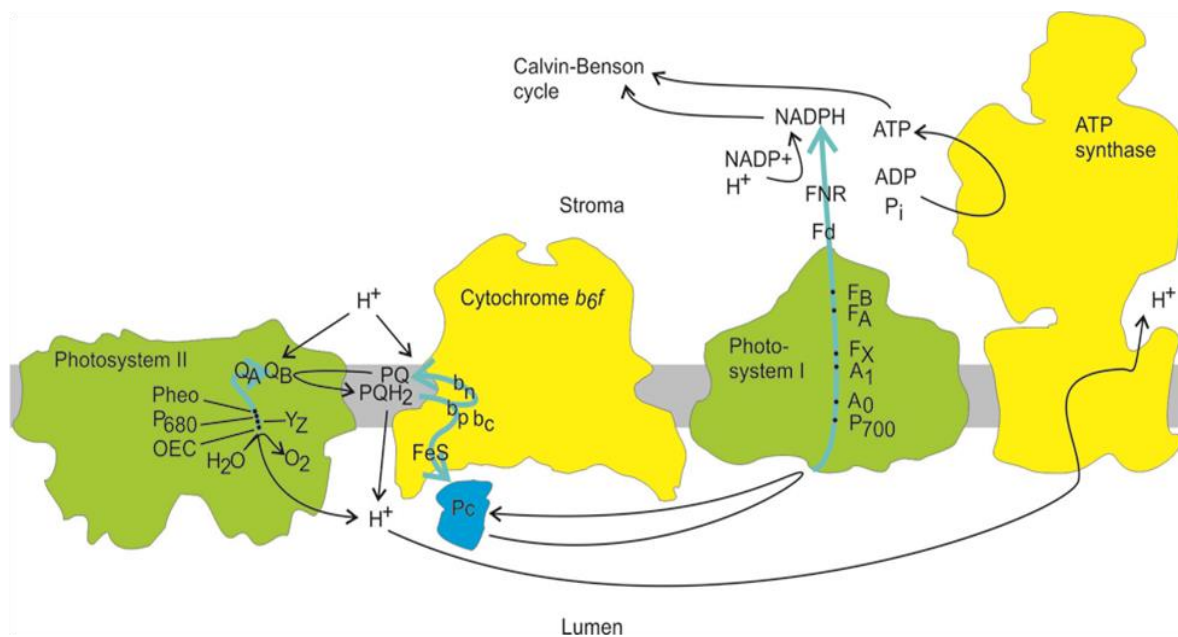


Рис. 1.1. Общая схема ППФ в хлоропласте (из Antal et al. 2013a). Пути транспортировки электронов показаны синими стрелками, а пути переноса протонов, редокс переходы пластохинона, пластоцианина, НАДФ и фосфорилирование АДФ отмечены черными стрелками.

В ФС2 электронный транспорт начинается с реакции восстановления Фео первичным донором электрона димером Хл *a* P₆₈₀ в синглетно возбужденном состоянии. Затем электрон переносится с Фео на первичный хинонный акцептор Q_a. Далее P₆₈₀⁺ окисляет тирозин Z (Y_Z), который, в свою очередь, получает электрон от марганцевого кластера в КВК. При накоплении в КВК четырех положительных зарядов происходит окисление двух молекул воды и образование молекулы кислорода. Одновременно с реакциями окисления КВК происходит восстановление вторичного хинонного акцептора Q_b на акцепторной стороне ФС2. В ФС1 первичный донор электрона димер Хл *a* P₇₀₀ в возбужденном состоянии восстанавливает первичный акцептор хлорофилл A₀, после чего происходит последовательный перенос электрона на филлохинон A₁ и далее на железо-серные кластеры F_x, F_A и F_B. Фд окисляет ФС1, а затем восстанавливает НАДФ⁺ с помощью фермента Фд-НАДФ редуктазы (ФНР). В условиях линейного электронного транспорта P₇₀₀⁺ восстанавливается за счет электронов, поступающих в цепь при окислении воды в ФС2. Дважды восстановленная и протонированная форма Q_b покидает место связывания в Q_b сайте ФС2 и переходит в ПХ пул, а окисленная форма ПХ связывается с ФС2. ПХН₂ связывается с Q_o сайтом цит *b₆f* комплекса, где окисляется до ПХ. При этом один из двух электронов переносится через железо-серный кластер белка Риске и цит *f* на мобильный Пц; последний восстанавливает P₇₀₀⁺ в ФС1. Другой электрон транспортируется на

гемы цит *b* и далее на молекулу ПХ, связанную с Q_i сайтом цит *b₆f*, осуществляя т.н. Q-цикл. Окисление молекул воды в КВК и процесс восстановления/окисления Пх сопровождаются протонированием люмена. Это создает протон-движущую силу, которая используется АТФ-синтазой для фосфорилирования АДФ.

Основным путем фотосинтетического электронного транспорта является линейный поток электронов (ЛЭТ) от воды до НАДФ⁺ и далее в цикл Кальвина с участием трех пигмент-белковых комплексов (ПБК) в тилакоидной мембране хлоропласта: ФС1 и 2, а также цит *b₆f* (рис. 1.1). Взаимодействие между этими комплексами обеспечивается подвижными переносчиками электронов: пластохинонами (ПХ), пластоцианином (Пц) и ферредоксином (Фд). Фотосинтетический транспорт электронов сопряжен с реакциями аккумуляции протонов в люменальной области тилакоидной мембраны, что приводит к формированию электрохимического градиента в мембране и, соответственно, протон-движущей силы, благодаря которой происходит фосфорилирование АДФ до АТФ при участии хлоропластной АТФ-синтазы - мультипротеинового комплекса в тилакоидной мембране. Сопряжённая работа фотосинтетической ЭТЦ и АТФ-синтазы носит название фотофосфорилирования.

За последнее десятилетие опубликовано много исчерпывающих обзоров, посвященных организации ФСА у высших растений и зеленых водорослей (Eberhard et al. 2008, Rochaix 2011, Yamori and Shikanai 2016). В частности, достигнуты значительные успехи в изучении атомарной структуры основных фотосинтетических комплексов: ФС2 (Umena et al. 2011, Suga et al. 2014), ФС1 (Amunts et al. 2007) и цит *b₆f* (Stroebel et al. 2003). Принципиальная организация ФСА почти одинакова для высших растений и зеленых водорослей. Фотосинтетический электронный транспорт происходит в соответствии с общепринятой Z-схемой (рис. 1.2), описывающей последовательность реакций ППФ в связи с величиной редокс потенциалов компонентов цепи (Govindjee et al. 2017). Низкий редокс потенциал свидетельствует о сильных восстановительных и слабых окислительных свойствах, а высокий редокс потенциал, наоборот, о сильных окислительных и слабых восстановительных свойствах. Перенос электронов осуществляется, в основном, от компонента цепи с более низким редокс потенциалом в паре окисленная/восстановленная форма к компоненту с более высоким редокс потенциалом. При этом константа скорости переноса электрона определяется разницей между редокс потенциалами этих компонентов, которая определяет свободную энергию реакции. Первичное фотохимическое преобразование энергии происходит в реакционных центрах фотосистем в специальных парах хлорофилла (Хл): P₇₀₀ в ФС1 и P₆₈₀ в ФС2, которые характеризуются высокой разницей потенциалов между возбужденным и окисленным состояниями, достигающими 1600 – 2000 мВ (Antal et al. 2013a). Поглощение фотонов

светособирающими комплексами фотосистем (ССК) приводит к переходу P_{700} и P_{680} в синглетное возбужденное состояние, в котором эти молекулы способны восстанавливать с практически 100% эффективностью первичные акцепторы электронов: Фео в ФС 2 и A_0 в ФС1. Стабилизация разделенных пар зарядов происходит при переносе электронов с первичных на вторичные акцепторы из-за значительного снижения энергии состояния. Редокс-потенциалы компонентов ФС1 и ФС2 сильно различаются. Первичное разделение зарядов в реакционном центре ФС2 приводит к образованию умеренного восстановителя Фео $^-$, и мощного окислителя P_{680}^+ , способного окислять воду, в то время как в ФС1 на свету образуется сильный восстановитель A_0^- и слабый окислитель P_{700}^+ . КВК представляет собой эффективный фермент, в котором окисление воды со значением стандартного среднеточечного редокс потенциала (E_m) в паре H_2O/O_2 около 890 – 840 мВ происходит при незначительном превышении редокс потенциала в паре P_{680}/P_{680}^+ (E_m около 1000 мВ). Величина редокс-потенциалов фотосинтетических переносчиков электронов зависит от экспериментальных условий, включая рН стромы и люмена, и варьирует среди различных фотосинтетических организмов.

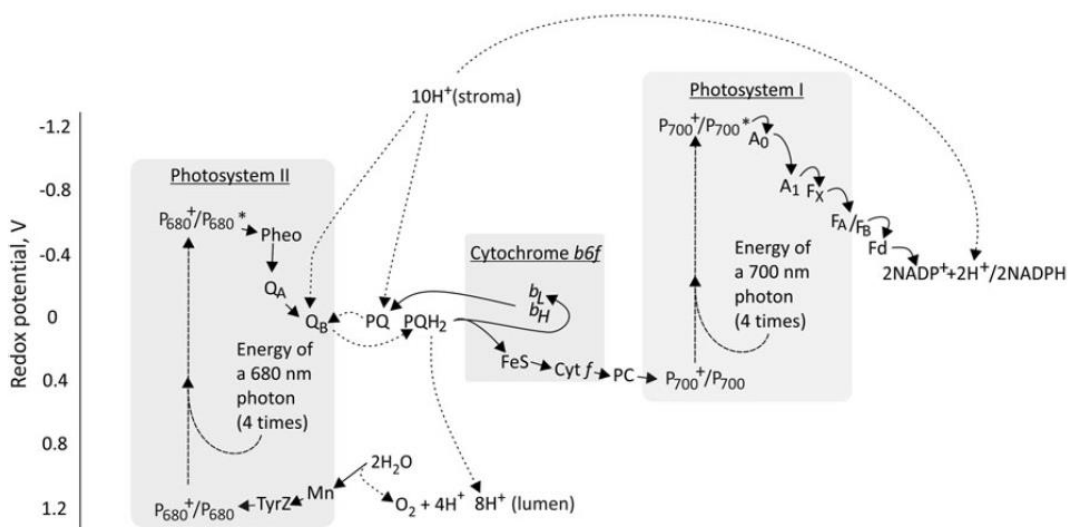


Рис. 1.2. 'Z схема' линейного электронного транспорта (из Antal et al. 2013a). По вертикальной оси приведена шкала редокс потенциалов.

Реакции перехода фотоактивных пигментов P_{680} в ФС2 и P_{700} в ФС1 в синглетное возбужденное состояние показаны штрихом, реакции переноса электронов – сплошной линией, а редокс переходы ПХ и реакции переноса протонов выделены пунктиром.

Кислород-выделяющая активность ФС2 лежит в основе наиболее распространенной оксигенной формы фотосинтеза. Каталитическим центром КВК в ФС2 является

марганцевый кластер (Mn_4CaO_5), осуществляющий окисление двух молекул воды после последовательного накопления четырех положительных зарядов. Редокс состояния Mn кластера обозначается по мере роста степени окисления как S_0 , S_1 , S_2 , S_3 и нестабильное состояние S_4 , которое завершается расщеплением воды (Kok et al. 1970). В последнее время был достигнут значительный прогресс в понимании структуры и каталитических свойств кофакторов КВК (Grundmeier and Dau 2012, Yano et al. 2015). В частности, показано, что ионы хлорида и кальция являются важными структурными и функциональными компонентами Mn-кластера, необходимыми для осуществления переходов между S-состояниями (Ferreira et al. 2004, van Gorkom and Yocum 2005), а ионы бикарбоната принимают участие в сборке комплекса и влияют на активность КВК (van Rensen and Klimov 2005).

ФС2 включает компоненты и обладает свойствами, напрямую не связанными с линейным электронным транспортом. Так, цит b_{559} является гетеродимерным редокс активным белком с гемом, расположенным между субъединицами белка. Этот компонент является существенным для функционирования ФС2, однако его роль и назначение до сих пор точно не выяснены. Предположительно, переходы между тремя возможными редокс состояниями гема регулируют циклический поток электронов вокруг ФС 2 и, таким образом, обеспечивают безопасную диссипацию энергии в ФС2 (Pospíšil 2011). ФС2 также проявляет карбоангидразную и слабую каталазную активность.

Важной особенностью фотосинтетического транспорта электронов через цит b_{6f} является Q-цикл, в ходе которого пластохинол (PQH_2) ($E_m PQ/PQH_2 = +82$ мВ) восстанавливает железо-серный центр белка Риске ($E_m = +290$ мВ), а также низкопотенциальный b -гем с E_m около -150 мВ (рис. 1.1, 1.2) (Breyton 2000). Очевидно, что экзергоническая ветвь электронного транспорта с трудом может обеспечивать энергией эндергоническую ветвь, поэтому протекание обеих реакций возможно только при быстром окислении железо-серного центра цит f . Перенос электрона по высокопотенциальному пути, включающему цит f и Пц, сопряжен с переносом электрона через гемы b типа и далее на молекулу ПХ, что предполагает высокую степень согласованности между этими процессами (Kramer and Crofts 1993). Основная роль Q-цикла состоит в увеличении соотношения между количеством протонов, перенесенных из стромы в люмен, и электронов, транспортируемых по цепи ЛЭТ, которое составляет 3 к 1 при активном Q-цикле и 2 к 1 без него. Таким образом, Q-цикл увеличивает отношение АТФ/НАДФН.

В отличие от ФС2, в которой транспорт электронов осуществляется по одной цепи редокс кофакторов, в ФС1 используются две параллельные цепи, локализованные в субъединицах PsaA (цепь А) и PsaB (цепь В) корового центра. Так, в электронный транспорт в ФС1 вовлечены по две молекулы Хл (A_{0A} и A_{0B}) и филлохинона (A_{1A} and A_{1B}). Изучение кинетики окисления филлохинона выявило энергетическую асимметрию между двумя электрон-транспортными ветвями в ФС1, обусловленную различиями между редокс потенциалами A_{1A} и A_{1B} , которые могут достигать 200 мВ в зависимости от методики выделения препаратов и методов определения (Srinivasan and Golbeck 2009).

Фотосинтетический электронный транспорт с ФС2 на цит *b₆f* осуществляется с помощью пула мобильных пластохинонов, содержащего от 3 до 6 молекул на одну ФС2 в зависимости от условий культивирования (Graan and Ort 1984, Kruk and Karpinski 2006). Кроме фотоактивного пула, пластохиноны присутствуют в пластоглобулах и оболочке хлоропластов (Kruk and Karpinski 2006). Редокс состояние фотоактивного пула в тилакоидной мембране зависит от соотношения потоков электронов через обе фотосистемы, которое регулируется как интенсивностью, так и спектральными характеристиками света. Сильный свет индуцирует восстановление ПХ пула, поскольку максимальная скорость электронного транспорта через ФС2 превышает скорость реакции окисления ПХН₂ цит *b₆f*; которая лимитирует ЛЭТ (Laisk et al. 2005). Освещение растений светом, поглощаемым преимущественно ФС2 (т.н. свет ФС2), приводит к быстрому восстановлению ПХ пула даже при низкой интенсивности, а светом ФС1 – к его окислению. Поскольку в хлоропласте ПХ пул является общим компонентом фотосинтетической и хлородыхательной ЭТЦ, то хлородыхание оказывает влияние на редокс состояние ПХ, в основном, в темноте. Экспериментальные данные указывают на то, что редокс состояние ПХ пула участвует в регуляции экспрессии хлоропластных и ядерных генов (Pfannschmidt et al. 2001, Oelze et al. 2012, Petrillo et al. 2014). Кроме того, восстановление и окисление ПХ пула индуцирует механизм перехода состояний, регулирующий электронные потоки через ФС1 и 2 (Murata 1969, Nawrocki et al. 2015). Таким образом, ПХ пул служит чувствительным сенсором световых и др. внешних условий, запускающим механизмы быстрой и медленной перестройки ФСА.

Пц является относительно небольшим (10 кДа) медьсодержащим белком, который осуществляет транспорт электронов с цит *b₆f* к ФС1, диффундируя в пространстве люмена. В зависимости от условий количество молекул Пц на одну ФС2 варьирует от 2 до 5 (Antal et al. 2013a). Атом меди в белке координируется четырьмя аминокислотными остатками и непосредственно не контактирует с белковым окружением. Вблизи редокс

центра находится гидрофобный участок, который, предположительно, обеспечивает взаимодействие со специфическими сайтами связывания в ФС1 и с цит *f* цитохромного комплекса. Благодаря достаточно высокому значению редокс потенциала ($E_m = + (340 - 390) \text{ мВ}$) Пц находится преимущественно в восстановленном состоянии в темноте.

Ферредоксин (Фд) представляет собой небольшой водорастворимый белок (~11 кДа) в строме хлоропласта, содержащий железосерный [2Fe-2S] кластер в качестве редокс активного кофактора. У высших растений количество молекул Фд на один центр ФС2 может варьировать от 2 до 6. В хлоропласте Фд участвует, в основном, в фотосинтетическом переносе электронов с ФС1 на НАДФ⁺ при участии ФНР. Этот процесс осуществляется последовательным переносом молекулой ферредоксина двух электронов с железо-серных кластеров ФС1 на ФНР, а затем на молекулу НАДФ⁺, которая является двухэлектронным акцептором. Фд также донирует электроны для других биохимических процессов, в том числе, участвующих в ассимиляции азота, серы, а также в тиоредоксиновой регуляции углеродного метаболизма (Rochaix 2011). Также вероятно то, что восстановленный Фд может донировать электрон на кислород с образованием супероксидного радикала (Ivanov et al. 2016). Обычно высшие растения и микроводоросли содержат несколько форм ФНР и Фд, которые могут избирательно включаться в различные метаболические пути (Mulo 2011, Hanke and Mulo 2013).

Основными пигментами в тилакоидной мембране хлоропласта являются Хл *a* и *b* и каротиноиды (Renger 2008). Хлорофиллы периферической и коровой антенны ФС1 и 2 выполняют основную функцию поглощения света, а хлорофиллы реакционных центров участвуют в фотохимическом преобразовании энергии, играют роль связующих звеньев между антенными Хл и специальными парами, а также участвуют в переносе электронов. Хл *a* содержится как в коровой, так и в периферической антенне, в то время как Хл *b* содержится только в периферической антенне ССК1 или 2. Энергетические уровни возбужденных состояний зависят от типа хлорофилла и его локального окружения. Снижение энергии первого синглетного возбужденного уровня в пигментах, прилегающих к реакционным центрам ФС1 и 2, обеспечивает направленный перенос возбуждения из периферической антенны к специальным парам P₆₈₀ и P₇₀₀. Кроме фотохимического пути энергия возбуждения в антенне может дезактивироваться с определенной вероятностью по излучательному пути с высвечиванием кванта флуоресценции хлорофилла с длиной волны около 700 и более нм, либо диссипировать в тепло. В силу особенности строения антенны ФС1 вероятность высвечивания ФХ в ней очень мала при комнатной температуре и почти вся наблюдаемая ФХ излучается Хл *a* в коровой антенне ФС2. В полностью

функциональном состоянии ФСА вероятность фотохимического пути дезактивации синглетного возбужденного состояния Хл составляет около 80%, тепловой диссипации – 15 - 20%, и 1-2% процента приходится на долю ФХ.

ПБК в хлоропласте также содержат каротиноиды, включая α и β каротин и его оксигенированные производные, называемые ксантофиллами: зеаксантин, антераксантин, виолаксантин, лютеин и неоксантин. Как и хлорофилл, ксантофиллы, включая лютеин, неоксантин и виолаксантин, участвуют в поглощении света и способны к передаче возбуждения на Хл, в основном, со второго синглетного уровня (Croce et al. 2001, Duffy et al. 2013). Важной функцией каротиноидов считается фотозащитное, связанное с предотвращением образования АФК, и антиоксидантное, связанное с утилизацией АФК, действие (Navaux and Niyogi 1999, Demmig-Adams et al. 2006). В частности, антераксантин и зеаксантин накапливаются на свету в результате деэпоксидации виолаксантина, способствуя утилизации избыточной энергии в антенне в результате тепловой диссипации возбужденных электронных состояний (Jahns and Holzwarth 2012). β - каротин, лютеин и неоксантин обладают как фотозащитными, так и антиоксидантными свойствами, участвуя в тушении синглетных и триплетных возбужденных состояний Хл и синглетного состояния кислорода (Trebst 2003, Dall'Osto et al. 2012, Jahns and Holzwarth 2012). Более того, каротиноиды, например, неоксантин, поддерживают структуру фотосинтетических комплексов (Paulsen 1999, Sözer 2011).

Важным свойством фотосинтеза является пространственная лабильность и гетерогенность его компонентов, что повышает адаптационные возможности в быстро изменяющихся условиях внешней среды. В частности, ЭТЦ фотосинтеза не соответствует какой-либо единой стабильной структуре в мембране тилакоида из-за латеральной гетерогенности мембраны и неравномерного распределения в ней ПБК. Хорошо известно, что тилакоидная мембрана в хлоропласте организована в виде гран и связывающих грани стромальных участков – ламелл, что обеспечивает неравномерное распределение основных ПБК и мобильных компонентов между разными компартментами (Staelin and van der Staay 1996, Anderson et al. 2008, Kouřil et al. 2012). Комплексы ФС2 локализованы, главным образом, в зоне гран, ФС1 и АТФ-синтаза находятся в ламеллах стромы и маргинальных частях гран, а комплексы цит *b₆/f* равномерно распределены по всей мембране. Такая организация фотосинтетической мембраны повышает эффективность ППФ и обеспечивает дополнительные возможности для регуляции электронного транспорта.

Среди основных компонентов ППФ комплексы ФС2 характеризуются наибольшей степенью гетерогенности в плане структурной и функциональной организации. В частности, комплексы ФС2 могут отличаться по размеру антенны (т.н. ФС2 α и β типа) и способности переносить электрон с Qa в ПХ пул (т.н. Qb-восстанавливающие и невосстанавливающие центры) (Melis and Homann 1975, Lavergne and Briantais 1996). Согласно современным представлениям, α тип представляет собой суперкомплекс, состоящий из двух центров ФС2 с общей периферической антенной ССК2 (Lavergne and Briantais 1996, Dekker and Boekema 2005). Внутри суперкомплекса центры ФС2 способны обмениваться энергией друг с другом (Joliot and Joliot 1964, Strasser 1978, Stirbet 2013). В отличие от α типа β тип представлен отдельной ФС2 без периферического комплекса, что приводит к снижению величины поперечного сечения поглощения на реакционный центр примерно в 2 раза. Хотя фотосистемы α - и β -типа не были выделены в виде отдельных фракций, изучение структурных и функциональных свойств фотосинтетических мембран позволяет предположить, что ФС2 β типа представляет собой определенные стадии сборки суперкомплекса при продвижении нефункциональных ФС2 из области ламелл в центральную область стекинга гран, в которой сосредоточены суперкомплексы (Danielsson et al. 2006). Суперкомплексы также могут формировать упорядоченные структуры в зоне стекинга, т.н. мегакомплексы, внутри которых вероятен обмен энергией между суперкомплексами из-за близкого расположения периферических антенн (Dekker and Boekema 2005).

1.2. Регуляция первичных процессов фотосинтеза

1.2.1. Пути генерации и утилизации АФК в хлоропласте

В естественном окружении растения и водоросли находятся в постоянно изменяющихся условиях среды, подвергаясь периодическому воздействию стрессовых абиотических и антропогенных факторов. Стрессовое воздействие на фотосинтез характеризуется, в первую очередь, нарушением баланса между поглощением света и использованием световой энергии в реакциях фотосинтеза, что приводит к образованию АФК в хлоропласте. Основными мишенями повреждающего действия АФК являются фотосистемы, а также липиды мембран (Полесская 2007, Иванов и др. 2014).

В хлоропласте генерация АФК происходит в комплексах ФС2 и ФС1 (Asada 2006). Известно, что триплетные возбужденные состояния Хл образуются в ФС2 в результате интерсистемной конверсии синглетного возбужденного состояния, а также при рекомбинации первично разделенных зарядов в паре $P_{680}^+Feo^-$ (Pospisil 2016).

Последующее взаимодействие молекулярного кислорода с триплетным состоянием Хл генерирует синглетный кислород ($^1\text{O}_2^*$), с активностью которого связывают окислительную деструкцию D1 белка ФС2 и др. компонентов ФСА, а также нарушение цикла репарации ФС2 (Keren et al. 1997, Krieger-Liszka 2005). Скорость рекомбинации первично разделенных зарядов и, соответственно, выход $^1\text{O}_2^*$ возрастают, когда акцепторная сторона ФС2 находится в восстановленном состоянии.

Электронный транспорт с кофакторов ФС1 на кислород приводит к образованию другой формы АФК – супероксидного анион радикала (O_2^-), который обладает умеренной окислительной активностью, но способен продуцировать более реактивные формы, в том числе, гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$). Последний характеризуется коротким временем жизни, но обладает очень высокой повреждающей способностью (Jakob and Heber 1996). Традиционно считалось, что образование O_2^- в ФС1 происходит, в основном, при взаимодействии кислорода с железо-серными кластерами Fa/Fb в стромальной части ФС1. К настоящему времени накоплено достаточно экспериментальных свидетельств того, что генерация супероксидного радикала может происходить также при взаимодействии кислорода с восстановленными формами ферредоксина, пластохинона и кофакторами A1 и/или Fx, локализованными в мембранной части ФС1 (Иванов 2008, Khorobrykh and Ivanov 2002, Borisova-Mubarakshina et al. 2012, Kozuleva et al. 2014, Ivanov et al. 2017). Предположительно, супероксидный радикал, образующийся внутри тилакоидной мембраны, восстанавливается до H_2O_2 при участии пластохинола в качестве донора электронов. Очевидно, что реакции восстановления кислорода конкурируют с ЛЭТ, поэтому рост выхода O_2^- связан, прежде всего, со снижением скорости фиксации CO_2 . Генерация АФК в ФС1 оказывает деструктивное воздействие на ФС1 и другие компоненты ФСА.

Детоксикация АФК в хлоропласте протекает с помощью ферментативных антиоксидантных систем, либо небелковых антиоксидантов. В частности, дезактивация синглетного кислорода происходит неэнзиматическим путем при участии α -токоферола, глутатиона и каротиноидов, обладающих антиоксидантными свойствами, например, β -каротина, лютеина и зеаксантина (Triantaphylidès and Navaux 2009). В отличие от синглетного кислорода, в детоксикации супероксидного радикала принимает участие комплекс ферментов, включающих супероксиддисмутазу, каталазу, пероксидазу и вспомогательные ферменты (Asada 1999). В условиях, когда генерация АФК в клетке превышает детоксикационные возможности организма, развивается окислительный стресс.

Кроме АФК деструкция фотосистем может быть связана с продолжительным пребыванием переносчиков электронов на акцепторной стороне ФС2 в восстановленном состоянии. В этих условиях становится возможным двойное восстановление Qa в ФС2, что приводит к высвобождению этого хинона с места ковалентного связывания с D2 белком и к последующей деструкции фотосистемы (Vass et al. 1992). Более того, условия, специфически инактивирующие КВК, такие как высокая температура и минеральный стресс, индуцируют аккумуляцию мощного окислителя - P_{680}^+ , что также может приводить к деструкции ФС2 по донорному механизму (Vass 2012). Необходимо отметить, что вышеупомянутые повреждения на донорной и/или акцепторной стороне ФС2 одновременно сопровождаются ростом диссипации энергии в реакционных центрах, направленной на снижение негативных последствий этих нарушений.

1.2.2. Быстрые и медленные механизмы регуляции

Совокупность процессов, протекающих в хлоропласте в диапазоне времен от пикосекунд до суток, представляет собой сложный механизм, для слаженного функционирования которого требуется система регуляции, обеспечивающая направленную структурную и функциональную перестройку ФСА с сохранением высокой эффективности процесса и гомеостаза. Система регуляции фотосинтеза включает адаптационные изменения на уровне организма, хлоропластов, тилакоидных мембран, а также отдельных компонентов ФСА (Тихонов 1999, Niyogi 2000, Peltier et al. 2010, Rochaix 2011). По своему характеру и функциональной направленности основные регуляторные механизмы в хлоропласте можно разделить на антиоксидантные, фотозащитные, а также те, которые управляют электронными и энергетическими потоками и регулируют ферментативную активность. Однако это разделение достаточно условное, поскольку отдельные регуляторные молекулы или системы могут обладать сразу несколькими функциями. В запуске регуляторных механизмов участвуют два основных показателя состояния фотосинтеза: транстилакоидный рН градиент и редокс состояние переносчиков электронов в тилакоидной мембране и строме хлоропласта. К основным рН-зависимым механизмам относится энергозависимый компонент qE нефотохимического тушения NPQ и фотосинтетический контроль электронного транспорта через цит *b₆f* комплекс, а с редокс состоянием ЭТЦ связаны переход состояний, тиоредоксиновая система и ПХ-зависимая редокс регуляция экспрессии генов (Tikhonov 2013, 2015). Поскольку генерация АФК также зависит от редокс состояния фотосинтетической ЭТЦ, то запускаемые пероксидом водорода сигнальные механизмы можно опосредованно отнести к редокс регуляции. Недавно было показано, что активность ключевого фермента

хлородыхательной цепи (РТОХ) находится под контролем транстилакоидного рН градиента (Krieger-Liszkay and Feilke 2015).

Механизмы регуляции первичных процессов фотосинтеза можно условно разделить на «медленные» и «быстрые» (Рубин и Кренделева 2003). Медленная регуляция включает модификацию структуры хлоропласта, количества и функциональных свойств фотосинтетических компонентов вследствие синтеза белков *de novo*. Этот тип регуляции обеспечивает способность организма адаптироваться к изменениям внешней среды путем управления экспрессией генов, содержанием и активностью ферментов или целых метаболических путей, однако эти изменения не закрепляются на генетическом уровне.

Генетический аппарат хлоропластов представлен кольцевой плазмидой, содержащей 100 – 120 генов, кодирующих основные компоненты ФСА. Однако некоторые компоненты ФСА, главным образом, белки антенных комплексов, кодируются в ядерном геноме и импортируются из цитозоля в хлоропласт при помощи специальных механизмов. Все это требует четкой координации между двумя генетическими компартментами и, следовательно, обмена информацией между хлоропластом и ядром. Накапливается все больше экспериментальных доказательств, подтверждающих существование такого контроля. Так, различные сигнальные пути обеспечивают контроль экспрессии генов в хлоропласте из ядра, а ретроградный контроль связан с рядом хлоропластных факторов, влияющих на экспрессию ядерных генов (Wobbe et al. 2008, Gollan et al. 2015).

Структурное ремоделирование антенны при высокой или низкой освещенности является важным адаптационным механизмом, в котором изменение способности поглощать свет является следствием изменения состава и организации субъединиц антенного комплекса. Этот процесс затрагивает, в основном, ФС2 и является результатом комплекса регуляторных процессов, влияющих на скорость транскрипции, трансляции и деградации белков - предшественников ССК2 (Drozak and Romanowska 2006, Eberhard et al. 2008). Большую роль в процессе перестройки антенны играет ретроградный сигнальный путь (Gollan et al. 2015). Так, пероксид водорода, образующийся при дисмутации супероксидного радикала в хлоропласте, выступает в качестве сигнальной молекулы, выполняющей роль молекулярного переключателя для активации механизмов экспрессии генов, кодирующих белки ССК и антиоксидантных систем (Shao et al. 2008, Borisova-Mubarakshina et al. 2012, Gollan et al. 2015, Ivanov et al. 2017). Кроме пероксида водорода, сигнальными функциями обладают компоненты фотосинтетической ЭТЦ, прежде всего, ПХ пул (Eberhard et al. 2008).

Кроме механизмов, связанных с экспрессией генов, в хлоропласте существуют процессы регуляции, обеспечивающие быстрые изменения свойств компонентов ФСА в секундном или минутном диапазоне без необходимости синтеза белка. Эти механизмы обеспечивают первичный ответ ФСА на быстро изменяющиеся условия среды и служат для поддержания оптимальной скорости фотосинтеза и редокс гомеостаза в клетке, а также для снижения скорости генерации АФК. Этот тип регуляции наиболее актуален при световой индукции фотосинтеза, а также в условиях переменной и избыточной освещенности. Среди наиболее важных ‘быстрых’ процессов можно отметить нефотохимическое тушение в антенне ФС2, переход состояний, фотосинтетический контроль, циклический электронный транспорт вокруг ФС1 и ФС2 и механизмы посттрансляционной модификации белков, в том числе при участии тиоредоксиновой системы (Finazzi et al. 2002, Peers et al. 2009, Shinopoulos and Brudvig 2012, Tikhonov 2015). Переключение фотосинтетического электронного транспорта с основного на альтернативные пути может также рассматриваться как ‘быстрый’ редокс зависимый регуляторный механизм, хотя активность альтернативных путей также зависит от экспрессии соответствующих генов.

Таким образом, растения и водоросли выработали сложную стратегию адаптации ФСА к изменяющимся внешним и внутренним факторам, которая обеспечивает гибкую регуляцию процессов фотосинтеза, позволяет эффективное использование поглощенной световой энергии и защищает растения от гибели в условиях стресса. Ниже подробнее рассмотрены альтернативные пути транспорта электронов в хлоропласте и ключевые механизмы ‘быстрой’ регуляции фотосинтеза.

1.2.3. Альтернативные пути электронного транспорта, нефотохимическое тушение и переход состояний

При снижении доступности CO_2 и других стрессовых воздействиях в хлоропластах усиливаются альтернативные пути транспорта электронов, что связано с переключением части основного фотосинтетического потока электронов с CO_2 на другие конечные акцепторы, в основном, на кислород, либо на циклический режим транспорта электронов. Рубиско - ключевой фермент цикла Кальвина, который, кроме карбоксилазной активности, обладает также функцией оксигеназы, роль которой возрастает при недостатке CO_2 . Оксигеназная активность Рубиско лежит в основе фотодыхания – важного механизма утилизации продуктов фотосинтеза (Takagi et al. 2016). У растений с С3-типом фотосинтеза на восстановление молекулярного кислорода может расходоваться до 20% фотосинтетических электронов. При высокой восстановленности

фотосинтетической ЭТЦ в хлоропластах растений могут активироваться и другие альтернативные потоки электронов на кислород на свету, т.н. циклы «вода-вода» при участии ферментов реакции Меллера и хлоропластной оксидазы (Asada 1999, Кувыкин и др. 2008, Curien et al. 2016).

Пластидная терминальная оксидаза (РТОХ) была выделена из листьев пестролистного вида *Arabidopsis thaliana*. Было показано, что у высших растений этот фермент принимает участие в синтезе каротиноидов и биогенезе хлоропласта. В последнем случае РТОХ функционирует как канал безопасной утилизации электронов на уровне ПХ пула на ранней стадии развития хлоропласта, когда содержание ФС1 находится на низком уровне (Okegawa et al. 2008). Эта оксидаза кодируется ядерными генами и по аминокислотной последовательности близка к митохондриальной альтернативной оксидазе (АОХ) (Kuntz 2004, Josse 2003). Согласно традиционным представлениям РТОХ взаимодействует с ПХ пулом со стороны стромы независимо от других компонентов мембраны, т.е. не формируя комплексы (Joët et al. 2002). В настоящее время РТОХ является одним из наиболее интересных для изучения компонентов ЭТЦ, чья транскрипционная, пост-транскрипционная и пост-трансляционная регуляция пока не достаточно изучены. Мнения относительно физиологической значимости РТОХ противоречивы, а экспериментальные данные с трудом поддаются обобщениям (Nawrocki et al. 2015). Так, в зеленеющих листьях *Arabidopsis thaliana* присутствие РТОХ строго необходимо в первые несколько часов превращения этиопласта в хлоропласт для предотвращения окислительной деструкции ФС2. Однако через 24 часа эта оксидаза уже не играет существенной роли в защите ФС2 от фотоповреждения (Okegawa et al. 2008). Существует мнение, согласно которому РТОХ не влияет на редокс состояние ПХ пула у высших растений при культивировании в благоприятных условиях, однако этот фермент может играть важную роль в стрессовых условиях, снижая электронное давление на акцепторной стороне ФС1 посредством окисления ПХ пула (Rosso et al. 2006). В отличие от высших растений, в зеленых водорослях РТОХ заметно влияет на редокс состояние ПХ пула даже в оптимальных условиях роста (Houille-Verness et al. 2011).

Кроме основного пути транспорта электронов на РТОХ, связанного с фотохимическим восстановлением ПХ пула, существуют пути, обусловленные нефотохимическим транспортом электронов. Одним из таких путей является псевдоциклический транспорт, обнаруженный в определенных условиях у некоторых экотипов зеленых водорослей (Cardol et al. 2011). Так, фотосинтетически восстановленный на свету НАДФ используется в качестве донора электронов в ПХ пул, а

РТОХ катализирует окисление ПХН_2 и сопряженное с этой реакцией безопасное восстановление кислорода до воды. Данный цикл поддерживает синтез АТФ за счет окисления НАДФН, что может играть важную роль в условиях стресса, когда снижается потребность организма в восстановителе, но сохраняется запрос на АТФ, необходимый для репарации белков.

Кроме указанных выше световых путей, РТОХ принимает участие в регуляции редокс состояния ПХ пула в темноте. В 1982 году было обнаружено восстановление ПХ в темноте (Benoun 1982), а вслед за этим была предложена оригинальная модель процесса, получившего название хлордыхание (Nixon 2000, Peltier and Cournac 2002, Kuntz et al. 2004). Согласно этой модели пул хинонов восстанавливается в темноте, в основном, от НАД(Ф)Н при участии фермента НДГ, встроенного в тилакоидную мембрану. В свою очередь, восстановление НАД⁺ в строме хлоропласта в темноте связано, в основном, с реакциями гликолиза. Восстановленный таким образом ПХ пул реокисляется при участии РТОХ. Наиболее общепринятыми к настоящему времени следует считать представления о РТОХ как о ферменте, обеспечивающем частичную утилизацию электронов при восстановлении ПХ пула как на свету, так и в темноте.

Циклическое фотофосфорилирование было открыто Арноном на препаратах изолированных хлоропластов высших растений; генерация АТФ в этих экспериментах не сопровождалась выделением кислорода и ингибировалась антимицином А (Arnon et al. 1954). Вопрос об участниках, механизмах и физиологической значимости ЦЭТ продолжает активно дискутироваться (Fan et al. 2016). Этот электронный поток возвращает электроны от акцепторов в строме: Фд и НАД(Ф) - в ПХ пул, генерируя АТФ за счет сопряженного трансмембранного переноса протонов при участии цит *b₆f* (Shikanai 2007, Rumeau et al. 2007, Yamamoto 2011, Tikhonov 2015). Электронный переносчик, обладающий свойствами ферредоксин-хинон редуктазы (ФХР), много лет оставался неизвестным, и высказывались разные соображения о том, каким образом может осуществляться взаимодействие между Фд и ПХ. Если суммировать самые общие современные представления о ЦЭТ, включая данные генетических исследований и протеомики, то уже не вызывает сомнения факт существования двух основных циклических потоков, возвращающих электроны от восстановленного Фд в ПХ пул. Первый путь, чувствительный к действию антимицина А, участвует в прямом переносе электронов с Фд в ПХ пул, которое происходит у растений при обязательном участии белков PGR5 и PGRL1 (Hertle et al. 2013, Labs et al. 2016). Ключевой реакцией второго

пути, не чувствительного к действию антимицина А, является перенос электронов с НАД(Ф)Н в ПХ пул при участии НДГ (Nishikawa et al. 2012, Yamori and Shikanai 2016).

К идентификации тилакоидного белка PGR5 привел генетический скрининг мутанта *Arabidopsis*, дефицитного по NPQ (Munekage et al. 2004). В мутантах без PGR5 скорость восстановления ПХ от Фд снижалась более чем вдвое по сравнению с диким типом. Однако само наличие ЦЭТ у мутантов без PGR5 свидетельствовало о том, что этот белок не исключительно необходимый фактор для функционирования цикла (Sugimoto et al. 2013). Ген *pgr1* был открыт на основании его соэкспрессии с другими фотосинтетическими генами. Мутанты, не содержащие этого гена, проявляли сходные особенности с мутантами без PGR5, в том числе низкую способность к индукции NPQ, более восстановленное состояние P_{700} на свету и снижение восстановления Пх от Фд в хлоропласте. Биохимические исследования показали, что именно комплекс PGR5/PGRL1 *in vitro* обладает ферредоксин-хинон-редуктазной активностью (Nandha et al. 2007, Dal Corso et al. 2008). Предположительно, PGRL1 в присутствии PGR5 акцептирует электроны от Фд и восстанавливает Пх (Dal Corso et al. 2008, Hertle et al. 2013). Вопрос о природе чувствительного к антимицину А пути ЦЭТ *in vivo* по-прежнему является дискуссионным, хотя накапливаются достаточно убедительные доказательства того, что ключевую роль играет именно PGRL1 (Hertle et al. 2013). В настоящее время отсутствует консенсус относительно того, переносится ли электрон из стромы в тилакоидную мембрану на уровне ПХ пула или на уровне цит *b₆f* комплекса.

Второй циклический поток электронов вокруг ФС1 осуществляется с участием хлоропластной НДГ и, видимо, отличается от первого по скорости и физиологическим функциям (Peng et al. 2008, Finazzi and Johnson 2016). Хлоропластный НДГ комплекс по структуре во многом идентичен митохондриальному комплексу II. Одной из его особенностей является способность образовывать суперкомплекс с ФС1 (Peng et al. 2009). Такой суперкомплекс необходим для стабилизации НДГ, особенно при высоких интенсивностях света, и облегчает переключение потока электронов с линейного в циклический режим *in vivo* (Shikanai 2007, Iwai et al. 2010, Johnson 2011). Аргументом в пользу включения НДГ в ЦЭТ является также обоюдная локализация НДГ с ФС1 в области стромальных мембран (Sazanov et al. 1996). В последние годы появились факты, указывающие на участие ФНР в ЦЭТ. ФНР распределена в хлоропласте вблизи поверхности стромальных тилакоидов, где находятся также ФС1, НДГ и *b₆f*-комплекс (Zhang et al. 2002). В растениях со сниженным содержанием ФНР доля циклического транспорта также всегда меньше (Rumeau et al. 2007). Предполагается, что в условиях,

которые оптимальны для ЛЭТ, большая часть ФНР участвует в формировании комплекса ФС1-Фд-ФНР, а в условиях ЦЭТ ФНР может образовывать комплекс с цит *b₆f*.

Фенотип двойных мутантов *Arabidopsis*, дефицитных и по PGR5 и по НДГ, сильно отличается от дикого типа, характеризуясь отставанием в развитии даже при оптимальных условиях роста, что подчеркивает важную роль ЦЭТ в жизнедеятельности растений (Yamory et al. 2016). Считается, что у высших растений основную фотозащитную функцию выполняет антимицин А чувствительный цикл. Однако мутанты без хлоропластной НДГ также обладают повышенной чувствительностью к стрессовым воздействиям, таким как высокая интенсивность света, низкая влажность и засуха (Horvath et al. 2000, Zhang and Sharkey 2009, Wang et al. 2006). Для ЦЭТ благоприятными условиями являются умеренная восстановленность ПХ пула и акцепторной стороны ФС1. Этот путь может играть важную роль на начальных стадиях индукции фотосинтеза, когда линейный транспорт электронов не возможен из-за неактивного состояния Рубиско. Основная физиологическая роль ЦЭТ состоит в регуляции соотношения АТФ и НАДФН в разных условиях роста, а также в активации фотозащитных механизмов, в том числе рН-зависимого NPQ и фотосинтетического контроля (Shikanai 2016, Shikanai and Yamamoto 2017).

Вопрос о механизмах переключения между линейным и циклическими путями является одной из наиболее актуальных проблем. Существуют разные модели, пытающиеся объяснить, как линейный и циклический пути могут функционировать одновременно (Eberhard et al. 2008). Две наиболее распространенные модели предполагают либо динамическую конкуренцию между этими путями на уровне ФС1, либо полное термодинамическое и кинетическое разделение потоков, которые локализованы внутри разных компартментов. Согласно первой, динамической модели, в стационарном состоянии фотосинтеза условия благоприятны для линейного потока, если поддерживается быстрое ре-окисление НАД(Ф)Н и восстановленного Фд за счет активности анаболических процессов. Наоборот, ЦЭТ превалирует, если фотосинтетическая цепь и переносчики электронов находятся в умеренно, либо сильно восстановленном состоянии (Breyton et al. 2006, Livingston et al. 2010). Согласно второй модели разделение комплексов между гранальными и стромальными компартментами образует диффузионный барьер, предотвращающий смешивание между линейным и циклическим транспортом (Finazzi and Johnson 2016, Yamory and Shikanai 2016).

Так называемая реакция Меллера представляет собой разновидность псевдоциклического транспорта электронов в хлоропласте, которая включает образование супероксидного радикала в ФС1 и пути его безопасного восстановления до воды

специфической антиоксидантной системой на свету (Asada 1999, 2006). В цепи детоксикации O_2^- первым этапом является дисмутация радикала хлоропластной супероксиддисмутазой (СОД), продуктами которой являются кислород и пероксид водорода. Основная часть образовавшегося пероксида водорода разлагается каталазой на O_2 и H_2O в специализированных органеллах – пероксисомах, либо восстанавливается до воды в хлоропласте при участии аскорбатпероксидазы, которая использует в качестве донора электронов аскорбат, окисляя его до монодегидроаскорбат радикала. Последний может восстанавливаться электронами от ФС1 при участии фермента монодегидроаскорбат-редуктазы, а также при участии системы глутатион/НАДФ. Данный псевдоциклический путь сопряжен с образованием АТФ в той же стехиометрии АТФ/ e^- , что и ЛЭТ. Очевидно, что реакция Меллера представляет собой безопасный путь утилизации высокоэнергетических электронов из фотосинтетической ЭТЦ при низкой скорости фиксации CO_2 из-за неактивного или малоактивного состояния цикла Кальвина или дефицита CO_2 .

Фотозащита ФС2 обеспечивается за счет регуляции диссипации энергии в процессах нефотохимического тушения в антенне или реакционном центре ФС2 (Бухов 2004, Joliot and Finazzi 2010, Tikhonov 2013, Horton 2014). Индукция NPQ включает последовательность из нескольких процессов, молекулярные механизмы которых продолжают оставаться предметом дискуссий. Традиционно в кинетике индукции и затухания NPQ выделяют три компонента: быстрый qE, связанный с ΔpH -зависимым ростом тепловой диссипации энергии возбуждения в антенне, промежуточный qT, обусловленный перераспределением ССК2 между ФС2 и ФС1 (переход состояний), и самый медленный qI, отражающий тепловую диссипацию энергии в реакционных центрах ФС2 при фотоингибировании. Характерные времена процессов тушения составляют секунды и минуты для qE и qT, в то время как изменения qI протекают значительно медленнее – от десятков минут до часов.

Быстрый энергизационный компонент тушения qE обусловлен, главным образом, pH -зависимой регуляцией ксантофиллового цикла и конформационных переходов PsbS субъединицы ФС2 (Johnson and Ruban 2011, Fan et al. 2015). В растениях и водорослях разных таксономических групп NPQ связывают с одним из трех ксантофилловых циклов, в которых каждый из полярных каротиноидов при снижении значения pH люмена химически трансформируется в менее полярный при участии дезоксидаз. При увеличении pH люмена происходит обратный процесс, катализируемый эпоксидазами. В хлоропластах растений и зеленых водорослей основной ксантофилловый цикл включает

превращение виолаксантина в фотопротекторный каротиноид зеаксантин, В добавок к этому циклу у некоторых семейств растений функционирует также специфический лютеинэпоксид-лютеиновый цикл, а у диатомовых и некоторых других групп водорослей ксантофилловый цикл представлен переходами между диатиноксантином и диатоксантином (Horton 2014).

Одним из остро обсуждаемых вопросов является проблема механизмов тушения энергии в антенне зеаксантином. Согласно одной точке зрения, зеаксантин действует фотофизически как тушитель энергии в антенном комплексе, а другой - играет непрямую роль, способствуя изменению конформации ССК2 и переходу периферической антенны в тушащее состояние (Ostroumov et al. 2014). Для эффективного нефотохимического тушения у высших растений необходимо также наличие S-субъединицы ФС2, кодируемой ядерным *psbS*-геном. PsbS белок относится к антенным белкам, но он не содержит пигментов и не обладает светособирающей функцией (Bonente et al. 2008, Kiss et al. 2008). Не вызывает сомнений, что PsbS белок играет ключевую роль в NPQ, хотя механизмы фотозащитного действия остаются до сих пор дискуссионными. Было показано, что у дефицитных по PsbS мутантов *Arabidopsis* NPQ сильно снижено, а свехэкспрессия *psbS* гена приводит к обратному эффекту. Замена близкого к люменальной поверхности остатка глутамата на PsbS белке существенно снижает образование qE, указывая на наличие сайта, чувствительного к изменению pH (Niyogy et al. 2004, Brooks et al. 2014). Были получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что увеличение уровня qE при росте содержания PsbS может происходить независимо от содержания зеаксантина, указывая на самостоятельную роль PsbS в NPQ. На основании работ с сайт-специфичными мутантами, не содержащими белка PsbS или, напротив, характеризующимися его сверхэкспрессией, была предложена модель, согласно которой PsbS влияет на связь между комплексом ФС2 и ССК2 в гранах, действуя, как pH-зависимый триггер конформационных изменений внутри суперкомплекса. Таким образом, сущность процесса нефотохимического тушения состоит в pH-зависимых изменениях каротиноидного состава и конформации PsbS белка, которые сдвигают динамическое равновесия между состояниями ССК, в которых энергия возбуждения доступна для фотосинтеза, и состояниями, в которых энергия рассеивается в тепло. Это означает, что механизм qE представляет собой специфический пример аллостерической регуляции, когда небольшие молекулы белковой или небелковой природы оказывают значительное влияние на скорость биохимического или биофизического процесса (Horton 2014).

Кроме рН-зависимого NPQ диссипация энергии может происходить в реакционных центрах ФС2 в результате тушения энергии возбуждения окисленной формой P_{680} (Bruce et al. 1997), циклического потока электронов при участии цитохрома b_{559} (Barber and de Las Rivas 1993) или прямой безопасной рекомбинации между Qa^- и P_{680}^+ (Krause 1988, Finazzi et al. 2004, Ivanov et al. 2008). Хорошо известно, что обратный перенос электрона с Qa^- на P_{680}^+ может происходить по трем разным путям. Два не прямых пути связаны с промежуточным восстановлением Фео, и один из этих путей приводит к образованию синглетной формы P_{680} , а другой – триплетной формы (рис. 1.3) (Kato et al. 2015). В последнем случае становится возможным образование синглетного кислорода вследствие взаимодействия между $^3Хл^*$ и молекулярным кислородом.

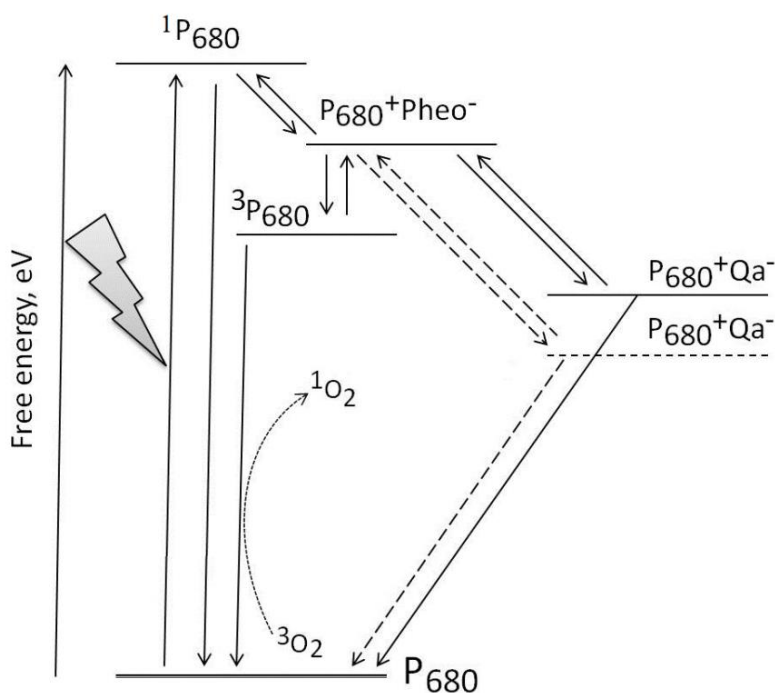


Рис. 1.3. Условная энергетическая схема переходов между разными состояниями акцепторной стороны ФС2 в основном (непрерывная линия) и высокопотенциальном (штрих) состоянии Qa^- .

Кроме того, рекомбинация в паре $P_{680}^+Qa^-$ может протекать по прямому пути туннелирования, обусловленному прохождением электронов через потенциальный барьер без образования возбужденных состояний P_{680} . Этот путь представляет собой механизм безопасной диссипации энергии разделенных зарядов. Очевидно, что соотношение между вероятностями разных путей рекомбинации в паре $P_{680}^+Qa^-$ зависит от разницы энергии между состояниями $P_{680}^+Фео^-$ и $P_{680}^+Qa^-$, которая, в свою очередь, определяется редокс

потенциалами Q_a и Q_b . Если энергетический зазор между Q_a и Q_b увеличивается, например, из-за перехода Q_a в высокопотенциальное состояние, то вероятность безопасного прямого пути возрастает в соответствии с термодинамикой процесса (Fufezan et al. 2007). До недавнего времени считалось, что в норме редокс потенциал Q_a составляет -30 - -80 мВ (Krieger 1995). Разработка более совершенных методов экстракции частиц ФС2 и определения величин среднеточечных редокс потенциалов позволили пересмотреть эти значения как для Q_a , так и для Q_b , которые составляют, согласно современным представлениям, -145 и +90 мВ, соответственно (Kato et al. 2015, Brinkert et al. 2016). На сегодняшний день известно, что редокс потенциал Q_a зависит от функционального состояния как донорной, так и акцепторной стороны ФС2. В частности, разрушение КВК приводит к значительному увеличению среднеточечного редокс потенциала в паре Q_a/Q_a^- на ~150 мВ, что приводит практически к ингибированию электронного транспорта с Q_a на Q_b и росту константы дезактивации Q_a^- по безопасному прямому пути (Krieger et al. 1995). На акцепторной стороне ФС2 между хинонами Q_a и Q_b расположен ион негемового железа Fe^{2+} , обеспечивающий редокс взаимодействие между хинонными переносчиками электронов, одним из лигандов которого является ион бикарбоната (Müh and Zouni 2013). Было показано, что высвобождение/связывание бикарбоната или его замещение другими лигандами влияет на скорость электронного транспорта на акцепторной стороне ФС2 (Petrouleas et al. 1994, Shevela et al. 2007). Недавно было обнаружено, что диссоциация бикарбоната приводит к повышению редокс потенциала Q_a примерно на 70 мВ; при этом наблюдается снижение генерации синглетного кислорода в ФС2 (Brinkert et al. 2016). Вероятность диссоциации бикарбоната возрастает, если Q_a находится в восстановленном состоянии (Brinkert et al. 2016).

Важную роль в процессах регуляции ППФ играет пул пластохинонов. Это связано с тем, что окисление пластохинола является «узким» местом фотосинтетического электронного транспорта. Именно в этом месте осуществляется рН-зависимая регуляция электронного потока, обусловленная 'фотосинтетическим' контролем со стороны сопрягающего механизма (Кукушкин и Тихонов 1988, Tikhonov 2013). От степени восстановленности ПХ пула, в свою очередь, зависит редокс-состояние других переносчиков электронов в фотосинтетической ЭТЦ. Одним из важных механизмов регуляции распределения световой энергии между фотосистемами 1 и 2 в связи с редокс состоянием ПХ является фосфорилирование антенных белков, индуцирующее изменения светового состояния (Tikkanen et al. 2011, Tikkanen and Aro 2012). Восстановление пула хинонов на свету активирует ССК2-протеинкиназу посредством взаимодействия восстановленного ПХ с Q_o -сайтом цит b_6f -комплекса (Vener et al. 1997, Zito et al. 1999).

Хотя детали этого процесса пока неизвестны, очевидно, что взаимодействие пластохинола с Q_o сайтом вызывает структурные изменения в ядре цитохромного комплекса (Hasan et al. 2013). После фосфорилирования комплексы ССК2, наименее прочно связанные с центрами ФС2, мигрируют из области стэкинга гран в области скопления ФС1, где происходит их встраивание в антенну ФС1. Таким образом, мембраны переходят из т.н. состояния 1, в котором ССК2 связаны с ФС2, в состояние 2, в котором часть ССК2 взаимодействует с ФС1. Образование ФС1-ССК1-ССК2-комплекса увеличивает поперечное сечение поглощения ФС1, что подтверждается биохимическими и микроскопическими исследованиями (Tikkanen and Aro 2012). Обратный переход в состояние 1 обусловлен активностью хлоропластной фосфатазы (PPH1/GAP38), которая катализирует дефосфорилирование ССК2, после чего антенный комплекс диффундирует обратно в область гран и связывается с ФС2, то есть осуществляется переход из состояния 2 в состояние 1. В отличие от киназы, активность фосфатазы не подвергается заметному редокс-контролю (Finazzi et al. 2002). Переход из состояния 1 в состояние 2 характеризуется временами порядка десятков секунд – нескольких минут, а обратный переход происходит значительно медленнее - за 15-20 мин (Бухов 2004). Редокс регуляция соотношения между фосфорилированием и дефосфорилированием мембран способствует поддержанию оптимального баланса распределения энергии между ФС1 и 2 в изменяющихся условиях.

1.3. Воздействие основных стрессовых факторов на фотосинтез

Свет является энергетическим субстратом фотосинтеза, а избыток энергии представляет опасность для любых естественных или искусственных механизмов, осуществляющих трансдукцию энергии, в том числе, для компонентов ФСА, ФС2 является наиболее чувствительным компонентом ФСА к высокому свету, и снижение ее активности на свету традиционно называют фотоингибированием (Krause 1988). Фотоингибирование происходит как в результате фотоокислительной деструкции белков реакционного центра, так и из-за нарушения всего цикла репарации ФС2. Деструкция центров ФС2 связана, в основном, с повреждением D1 белка. После фотоповреждения происходит репарация фотосистемы, в ходе которой происходит фосфорилирование белков реакционного центра, мономеризация и латеральная диффузия из области гран в область ламелл, частичная разборка фотосистемы, протеолитическая деградация поврежденного D1 белка, замена поврежденного D1 белка в реакционном центре, достройка ФС2 и миграция в область стэкинга гран (Tuustjärvi 2013). Фотодеструкция

ФС2 может протекать по донорному или акцепторному механизму (Vass 1992, 2012). Акцепторный механизм связан с восстановлением Qa на высоком свете, что стимулирует рекомбинацию зарядов в паре $P_{680}^+ \text{Фео}^-$, в результате которой с вероятностью около 30% образуется триплетная форма Хл, генерирующая синглетный кислород. Донорный механизм фотоингибирования обусловлен снижением активности КВК вследствие закисления люмена либо из-за прямого разрушения марганцевого кластера квантами света (Nakala et al. 1995). Это приводит к накоплению окисленного состояния P_{680} на свете, редокс потенциал которого позволяет окислять окружающие компоненты ФС2. Очевидно, что фотоингибирование также сопровождается снижением активности других компонентов ФСА, в том числе, ФС1, из-за генерации супероксидного радикала. Обычно фотоингибирование относят к действию высокого света, однако оно может наблюдаться и при умеренной освещенности на фоне других неблагоприятных факторов среды. Основным протекторным механизмом при фотоингибировании выступает NPQ.

Минеральное питание определяет рост и размножение наземных растений и является основным фактором, определяющим характер распределения фитопланктона в Мировом океане. Азот является основным элементом минерального питания, который востребован в наибольших количествах и зачастую является элементом, лимитирующим рост фотосинтезирующих организмов. Хорошо известно, что дефицит азота индуцирует снижение содержания Хл, скорости фотосинтеза, а также скорости роста растений или культур микроорганизмов (Evans and Terashima 1987, Marschner 1995). При этом фотосинтетический электронный транспорт сохраняет достаточно высокую активность (Terashima and Evans 1988; Sugiharto et al. 1990). При азотном голодании также нарушается углеродный баланс, о чем свидетельствует накопление значительных запасов крахмала в хлоропластах клеток листа (Kutik et al. 1995, Bondada and Syvertsen 2003).

Известно, что тепловой стресс оказывает значительное воздействие на свойства клеточных мембран, в том числе тилакоидов в хлоропласте (Salvucci and Crafts-Brandner 2004, Mathur et al. 2014, Johnová et al. 2016). Так, при тепловом шоке возрастают реакции перекисного окисления липидов, увеличивается текучесть мембран, изменяется их проницаемость. При действии высоких температур существенно повреждается темновая стадия фотосинтеза, в том числе снижается активность Рубиско, глюкозо-5-фосфатазы и фруктозо-6-фосфатазы. Высокая температура оказывает деструктивное воздействие на ППФ, ингибируя синтез некоторых хлоропластных белков, в том числе апопротеинов D1/D2 реакционного центра ФС2, α - и β - субъединиц АТФ-синтазы, цит *f* и *b559*, антенного белка CP47. Также нарушается биосинтез хлорофилла и активируется его

гидролиз хлорофиллазой. Высокая температура приводит к мономеризации ФС2, реструктуризации ССК2 и его частичной миграции в область ламелл. Среди компонентов ППФ наибольшей чувствительностью к тепловому шоку обладают реакционные центры ФС2, а основной мишенью повреждающего действия является КВК, разрушение которого связано с термоиндуцированным высвобождением двухвалентных катионов и ионов хлора, а также с нарушением целостности из-за потери внешних белков, в первую очередь – PsbO субъединицы ФС2 (Mathur et al. 2014).

Понижение температуры замедляет биохимические реакции, нарушая баланс между количеством поглощенной энергии и возможностью ее утилизации в анаболических процессах. Понижение температуры приводит к повреждению мембран, восстановлению фотосинтетической ЭТЦ и росту скорости образования АФК (Krause 1994, Yadav 2010, Åström et al. 1998, Stachula 2015). Основные фотозащитные и регуляторные механизмы, активирующиеся при понижении температуры, включают NPQ и альтернативные пути электронного транспорта, прежде всего ЦЭТ. При сезонной адаптации вечнозеленых растений к низким (отрицательным) температурам qE компонент NPQ теряет эффективность из-за ингибирования электронного транспорта и низкой энергизации мембран. Поэтому важное значение приобретают независимые от света (нерегулируемые) механизмы тушения, связанные с функциональной инактивацией центров ФС2, тушением в реакционных центрах и со структурной реорганизацией антенн. Эти механизмы включают агрегацию ССК2 при значительном накоплении зеаксантина, лютеина и PsbS белка (Ivanov et al. 2002, Ensminger et al. 2006). ЦЭТ и хлоропластное дыхание в условиях холодной адаптации определяют редокс-состояние ПХ пула и контролируют баланс между электронными потоками через ФС1 и 2 (Ensminger et al. 2006, Savitch et al. 2010). Особенная адаптационная стратегия, закрепленная на генетическом уровне, выработалась у некоторых толерантных к холоду высших растений в ответ на охлаждение. У них происходит изменение углеродного метаболизма за счет дополнительного синтеза Рубиско и ускорения цикла Кальвина, что приводит к реактивации ЛЭТ и снижению генерации АФК (Krause and Jahns 2003).

Растения постоянно подвергаются воздействию дефицита влаги в почве или атмосфере в течение их жизненного цикла. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что нехватка воды оказывает негативное влияние на рост и продуктивность растений, индуцируя многочисленные изменения биохимического и физиологического характера (Zargar et al. 2011). В частности, в этих условиях происходит перестройка углеродного и азотного метаболизма, снижение проводимости устьиц и

мезофилла листа, скорости транспирации, выцветание пигментов, уменьшение площади листа, сухого веса и относительного содержания воды. Фотосинтез является одним из наиболее чувствительных к обезвоживанию процессов (Chaves 1991). Негативное воздействие стресса на фотосинтез проявляется в виде снижения доступного CO₂ из-за ограничения газового обмена в листе, а также в виде инактивации важных компонентов ФСА, в основном, ферментов цикла Кальвина (Lawlor and Cornic 2002). Снижение доступности CO₂ и активности Рубиско приводит к генерации АФК и развитию окислительного стресса (Zlatev 2009). Исследования состояния ФС2 в растениях в условиях дефицита воды выявили повреждения КВК (Kawakami et al. 2009), которые могут индуцировать фотоингибирование по донорному механизму. Было показано, что большую роль в регуляции ППФ при обезвоживании играют NPQ, ЦЭТ и фотодыхание (Cousins et al. 2002, Lima Neto et al. 2017).

1.4. Метаболические процессы в клетке зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях дефицита элементов минерального питания

1.4.1. Особенности углеродного метаболизма

Одноклеточная зеленая микроводоросль *C. reinhardtii* представляет собой модельный организм для изучения метаболических процессов и механизмов регуляции в различных условиях культивирования (Harris 2001). В настоящее время использование новейших методов протеомики, геномики, транскриптомики и метаболомики позволили провести комплексные исследования хламидомонады, что делает эту водоросль привлекательным объектом для актуальных исследований, в том числе в русле изучения механизмов адаптации к действию абиотических стрессовых факторов (Aucoin et al. 2016, Rolland et al. 2009, Тоерел et al. 2011). Основные метаболические процессы у хламидомонады организованы сходным образом с высшими растениями, однако у микроводорослей присутствуют пути, характерные для бактериального метаболизма. В частности, большинство штаммов дикого типа *Chlamydomonas* могут расти как автотрофным образом, используя CO₂ в качестве единственного источника углерода, так и гетеротрофно, ассимилируя внеклеточный ацетат, либо миксотрофно. Также клетки этого организма способны адаптироваться к микроаэробным и анаэробным условиям как на свету, так и в темноте. В отличие от высших растений, ФСА в хлоропласте *C. reinhardtii* сохраняет полностью функциональное состояние при длительном темновом культивировании на среде с ацетатом (Spreitzer and Mets 1981).

Схема основных путей углеродного метаболизма в клетке *C. reinhardtii* показана на рис. 1.4. Центральную роль в этом процессе играет ацетил-КоА, который является субстратом для многих биохимических процессов, в том числе цикла Кребса, глиоксилатного цикла, биосинтеза липидов и путей ферментативного брожения (Johnson and Alric 2013, Mus et al. 2007). Основными источниками ацетил-КоА являются пируват – продукт гликолиза, и экзогенный ацетат. Глиоксилатный цикл осуществляет превращение ацетил-КоА в сукцинат, который может быть далее использован для синтеза углеводов в процессе глюконеогенеза, являющегося, по сути, обратным гликолизу процессом (Eastmond and Graham 2001). При автотрофном способе питания углеводы образуются в процессе фотосинтеза, в то время как в присутствии внешнего ацетата синтез крахмала осуществляется либо полностью, либо частично за счет реакций глюконеогенеза (Ball et al. 1990).

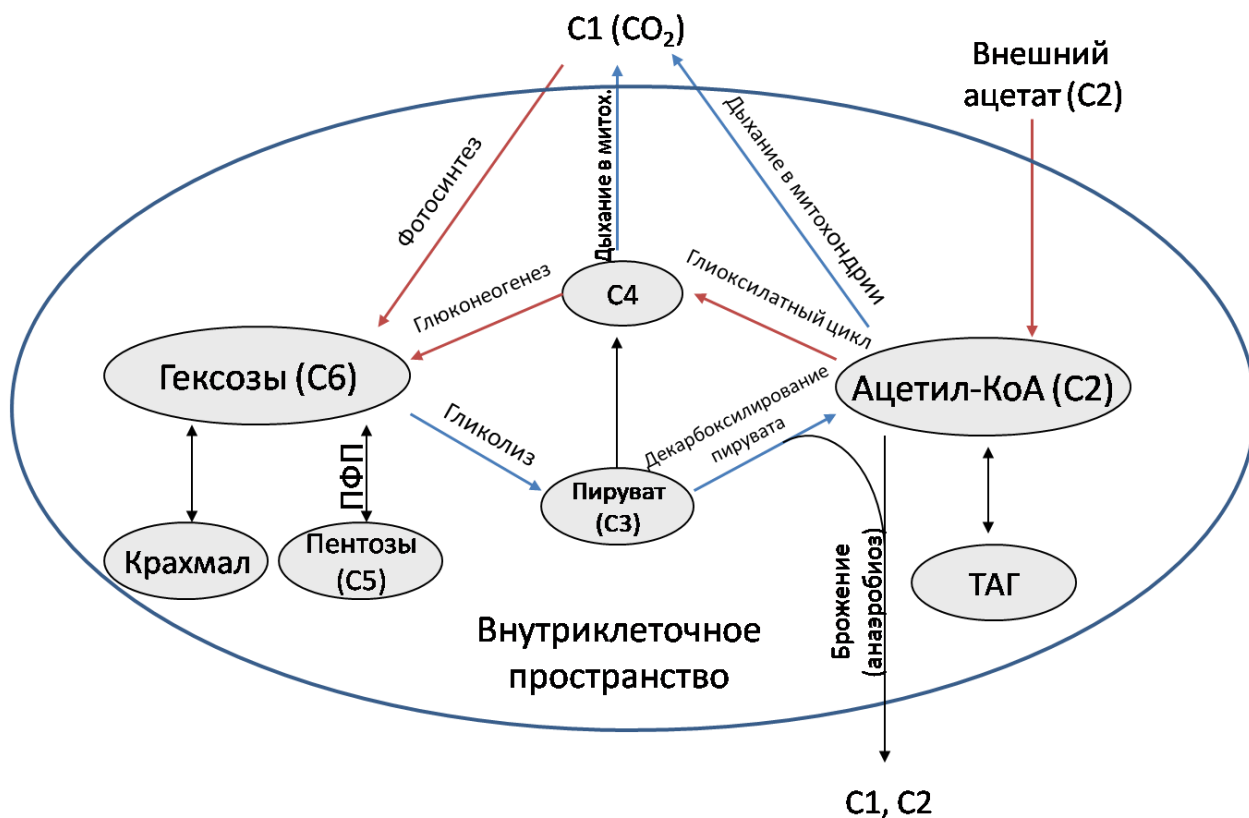


Рис. 1.4. Схема ключевых путей углеродного метаболизма в клетке *C. reinhardtii* (из Antal 2018).

Основные анаболические и катаболические пути отмечены красным и синим цветом, соответственно. ПФП – пентозофосфатный путь, ТАГ – триацилглицериды. Митохондриальное дыхание включает цикл Кребса и дыхательную ЭТЦ.

В условиях низкой освещенности или недостатка ацетата содержание АТФ в клетках водорослей снижается, поэтому возрастает скорость деградации углеводов в процессе гликолиза. Компоненты гликолиза в клетке *C. reinhardtii* локализованы, главным образом, в хлоропласте, осуществляя окисление глюкозы до пирувата, сопряженное с генерацией АТФ и НАДН. В аэробных условиях пируват превращается в ацетил-КоА при участии пируват дегидрогеназного комплекса, а ацетил-КоА вступает в цикл Кребса. Альтернативным гликолизу путем окисления глюкозы у хламидомонады является пентозофосфатный путь, в ходе которого происходит синтез пентоз и образование НАДФН. Метаболиты пентозофосфатного пути являются предшественниками синтеза нуклеотидов и вступают в реакции гликолиза (Kruger and von Schaewen 2003). Клетки *C. reinhardtii* обладают толерантностью к дефициту кислорода в окружающей среде благодаря активации разнообразных путей ферментативного брожения, поддерживающих гликолиз (Atteia et al. 2013, Mus et al. 2007).

Клетки водорослей содержат один хлоропласт. У хламидомонады хлоропласт вытянут вдоль поверхности клетки в форме бокала, что увеличивает площадь поглощения света. Тилакоидная мембрана у зеленых микроводорослей имеет менее выраженную гетерогенность, в том числе меньшее количество дисков в гране по сравнению с высшими растениями. Структурно-функциональная организация ФСА у зеленых микроводорослей близка к высшим растениям. Всего лишь несколько компонентов ППФ выявляют структурные отличия, включая антенные комплексы ССК2 и 1, а цитохром *c₆*, наряду с Пц, участвует в переносе электронов от цит *b₆f* к ФС1 (Drop et al. 2014, Gorman and Levine 1966).

При изменении условий окружающей среды в клетках *C. reinhardtii* активируются механизмы регуляции фотосинтетических процессов в клетке, которые имеют существенные отличия от таковых у высших растений. На рис. 1.5 приведена схема основных и альтернативных путей переноса электронов, образования АФК и отдельных регуляторных механизмов в хлоропласте зеленых микроводорослей. Как отмечалось в предыдущих разделах, у высших растений рН-зависимый компонент NPQ включает в себя взаимопревращения между каротиноидами ксантофиллового цикла и структурные изменения субъединицы PsbS ФС2. В то время как ксантофилловый цикл функционирует сходным образом в растениях и зеленых водорослях, белок PsbS играет, скорее всего, не самостоятельную, а вспомогательную роль в клетках *C. reinhardtii* (Finazzi et al. 2006, Tibiletti et al. 2016). У некоторых зеленых микроводорослей, в том числе у хламидомонады, для светоиндуцированного развития NPQ требуется рН-зависимая экспрессия специфических антенных пигмент-содержащих стрессовых белков семейства

LHCSR. В частности, большую роль в NPQ играет белок LHCSR3, протонирование аминокислотных остатков которого при подкислении люмена приводит к переключению ФС2 из режима светосбора в режим тепловой диссипации энергии.

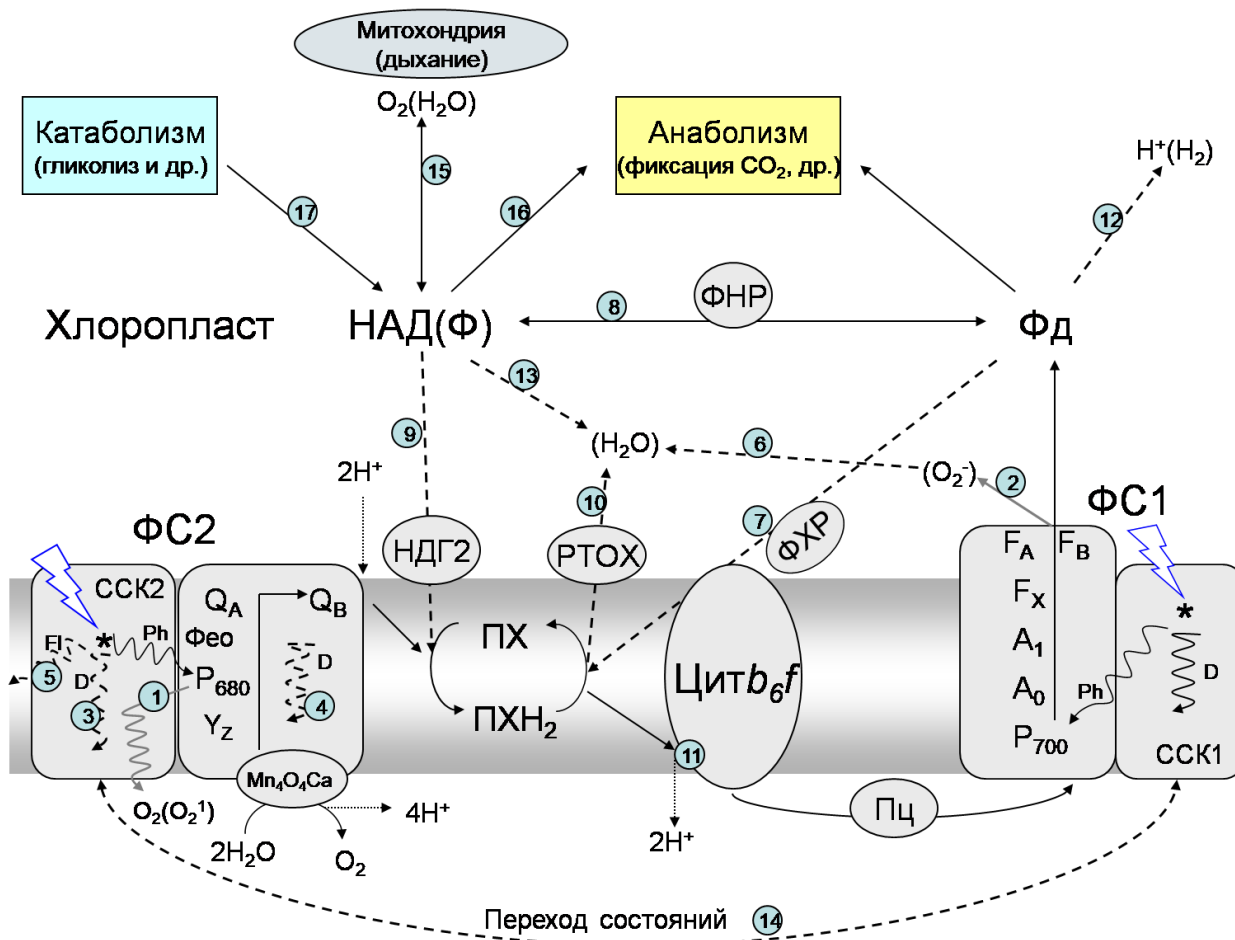


Рис. 1.5. Схема путей переноса электронов и протонов, образования АФК и диссипативных процессов в хлоропласте зеленых микроводорослей (из Antal 2018).

Основные пути дезактивации возбужденных состояний в ФС2 и переноса электронов обозначены сплошной линией, альтернативные пути электронного транспорта, регулируемая диссипация энергии, переход состояний и антиоксидантные механизмы – пунктиром, высвобождение и перенос протонов – точечным пунктиром. 1 и 2 – реакции образования синглетного кислорода и супероксидного радикала, соответственно; 3 и 4 – тепловая диссипация энергии в антенне и центрах ФС2; 5 – флуоресценция хлорофилла; 6 – реакции восстановления супероксидного радикала до пероксида водорода и воды при участии супероксиддисмутазы, каталазы и аскорбат пероксидазы; 7 – ЦЭТ при участии ФХР; 8, 9 – ЦЭТ при последовательном участии ФНР и НАД дегидрогеназы второго типа (НДГ2); 10 – окисление ПХ при участии РТОХ; 11 – рН-зависимая регуляция электронного транспорта через цит *b₆f* комплекс; 12 – восстановление протонов до молекулярного водорода гидрогеназой (анаэробная реакция); 13 – окисление НАД(Ф)Н при участии железосодержащих флавопротеинов А и В (FlvA/B); 14 – миграция ССК2 между ФС2 и 1 (переход состояний); 15 – обмен восстановителем между хлоропластом и митохондриями при участии малат-оксалоацетатного цикла; 16 – реакции окисления НАД(Ф)Н в реакциях цикла Кальвина и др. анаболических процессах в хлоропласте; 17 – генерация НАДН в гликолизе и др. катаболических процессах в хлоропласте.

Как отмечалось выше, переход состояний является механизмом, регулирующим баланс между потоками электронов через ФС2 и ФС1 (рис. 1.5). Известно, что у высших растений количество комплексов ССК2, вовлеченных в переход состояний, не превышает 20%, в то время как у зеленых микроводорослей этот показатель достигает 80% (Allen 1992, Delosme et al. 1996), что указывает на более важную роль этого процесса в адаптации к быстро меняющимся условиям освещенности. Так, было показано, что переход состояний участвует в качестве фотозащитного механизма в адаптации хламидомонады к условиям дефицита кислорода и АТФ (Cardol et al. 2009), а также в световой индукции фотосинтеза (Ghysels et al. 2013). Предположительно, фотозащитное действие перехода состояний в клетках *C. reinhardtii* обусловлено тем, что комплексы ССК2 в фосфорилированном состоянии (состояние 2) способны образовывать агрегаты в конфигурации, которая способствует диссипации энергии.

В условиях, когда снижается скорость ассимиляции CO_2 , происходит перераспределение электронов в хлоропласте по альтернативным путям, включая ЦЭТ и так называемые циклы "вода-вода". Как отмечалось выше, ЦЭТ может протекать по двум основным путям: при участии НДГ и ФХР (рис. 1.5). В клетке хламидомонады в первом цикле участвует НАДН дегидрогеназа второго типа (НДГ2), активность которой не сопряжена с протонированием люмена (Jans et al. 2008, Desplats et al. 2009). Ранее из *C. reinhardtii* был изолирован сложный комплекс, состоящий из ФС1, ССК1, ССК2, цит *b₆f*, ФНР и PGR1, который в выделенном виде осуществляет ЦЭТ (Iwai et al. 2010). Отсутствие PGR5 в этом комплексе указывает на то, что данный белок не является строго необходимым компонентом для ЦЭТ. Более того, антимицин А – ингибитор ФХР у высших растений, не влиял на скорость ЦЭТ в выделенном комплексе, свидетельствуя о различиях в организации ЦЭТ у высших растений и зеленых водорослей. Однако, изучение функционального состояния ЦЭТ *in vivo* в *pgr5* мутантах *C. reinhardtii* свидетельствует об участии PGR5 в цикле (Alric et al. 2014, Johnson et al. 2014). По-видимому, белок PGR5 не является обязательным компонентом циклического ферредоксин-хинон редуктазного пути у зеленых водорослей, но он влияет на скорость процесса. Ранее было выдвинуто предположение о том, что переход из состояния 1 в состояние 2 в клетках *C. reinhardtii* необходим для активации ЦЭТ (Finazzi et al. 2002). Более поздние исследования указывают на то, что переход состояний и переключение между ЛЭТ и ЦЭТ являются независимыми друг от друга процессами, но их регуляция зависит от редокс состояния ЭТЦ внутри хлоропласта сходным образом (Takahashi et al. 2013). У зеленых микроводорослей баланс между ЛЭТ и ЦЭТ управляется не только

редокс состоянием ЭТЦ, но и в зависимости от содержания АТФ. Активация ЦЭТ происходит в условиях дефицита кислорода, двуокиси углерода и при увеличении потребности в АТФ (Alric 2014, Johnson et al. 2014, Dang et al. 2014).

Как упоминалось выше, реакция Меллера представляет собой наиболее распространенный путь псевдоциклического электронного транспорта, включающий генерацию супероксидного радикала в ФС1 и его безопасное восстановление до воды с промежуточным образованием пероксида водорода (Asada 1999) (рис. 1.5). Было показано, что в клетках *C. reinhardtii* до 80% электронов, поступающих в фотосинтетическую цепь при окислении воды во время световой индукции фотосинтеза, могут быть использованы в реакции Меллера, а около 10 - 15% электронов утилизируется этим путем в условиях стационарного фотосинтеза (Badger et al. 2000, Franck and Houyoux 2008). Отличительной особенностью зеленых водорослей является дополнительный псевдоциклический путь бактериального типа, осуществляющий фотовосстановление кислорода до воды при участии железосодержащих флавопротеинов FlvA и FlvB, использующих в качестве субстрата НАДФН (рис. 1.5) (Peltier et al. 2010, Dang et al. 2014). Этот путь, как и реакция Меллера, играет фотозащитную роль, утилизируя избыток электронов на свету. Недавно было показано, что FlvA и FlvB участвуют в регуляции энергетического баланса в клетках *C. reinhardtii* при дефиците АТФ (Dang et al. 2014). В целом для *C. reinhardtii* характерно значительное поглощение кислорода в хлоропласте на свету (Liran et al. 2016).

У зеленых микроводорослей хлородыхание осуществляется при участии ферментов НДГ2 и РТОХ, расположенных на стромальной стороне тилакоидной мембраны (рис. 1.5). В хлоропласте *C. reinhardtii* были обнаружены две разновидности терминальной оксидазы: основная РТОХ2 и второстепенная РТОХ1 (Houille-Vernes et al. 2011). У высших растений РТОХ, главным образом, участвует в биосинтезе каротиноидов и биогенезе хлоропластов, в то время как у зеленых микроводорослей эти функции отсутствуют, а хлородыхание играет скорее фотозащитную роль. Так, мутанты *C. reinhardtii* без РТОХ характеризуются пониженной способностью адаптироваться к разным световым условиям по сравнению с диким типом, что может быть обусловлено нарушением перехода состояний, поскольку в клетках мутанта ПХ пул находится в постоянно восстановленном состоянии (Houille-Vernes et al. 2011). В целом, хлородыхание протекает более интенсивно в клетках микроводорослей по сравнению с высшими растениями, особенно в условиях гетеротрофного или миксотрофного типов питания.

1.4.2. Влияние дефицита азота, серы и фосфора на основные метаболические процессы

Дефицит азота, особенно в водной среде, является распространенным явлением, вызывающим значительные изменения в фенотипе водорослей, индуцируя хлороз и снижение пролиферации из-за существенного снижения синтеза белков (Cullen et al. 1992, Sakmak et al. 2012). В этих условиях быстро активируются системы ассимиляции внешних источников азота и рециркуляции азота из внутренних органических резервов, таких как хлорофилл, белки, РНК. Ассимиляция азота представляет собой сложный процесс, включающий синтез соответствующих ферментов и транспортеров, а также обеспечение этого процесса восстановительными эквивалентами и АТФ (Fernandez et al. 1998, Fernandez et al. 2009). У *C. reinhardtii* количество транскриптов почти всех генов, участвующих в ассимиляции азота из аммония, нитрата, нитрита, мочевины, пуринов, пиримидинов, полиаминов, аминокислот и белков значительно увеличивается в течение первого часа после падения содержания азота в среде. Последующий более медленный процесс адаптации к дефициту азота связан с реорганизацией метаболических потоков в голодающих клетках водорослей с целью поддержания физиологически релевантного соотношения N/C, энергетического баланса и редокс-гомеостаза, необходимых для сохранения жизнеспособности популяции клеток в долгосрочной перспективе.

Азотное голодание сопровождается частичной деградацией и подавлением синтеза цитоплазматических и хлоропластных рибосом в клетках *C. reinhardtii* (Wase et al. 2014, Park et al. 2015). Содержание рибосомальных белков и их транскриптов начинает снижаться вскоре после падения содержания азота в среде, уменьшаясь почти в два раза в течение двух-трех дней, что отчасти объясняется общим нарушением синтеза белка, который сам зависит от содержания рибосом. Снижение общего белка в голодающей клетке связано с нарушением биосинтеза аминокислот, процесса трансляции, а также с увеличением активности протеолитических белков (Park et al. 2015). Сравнительный протеомический анализ клеток *C. reinhardtii* показал, что при азотном голодании избирательно уменьшается содержание белков с высоким содержанием азота, в то время как белки с более низким или ниже среднего содержанием азота присутствуют в более значительном количестве (Park et al. 2015).

В голодающих по азоту клетках развиваются процессы хлороза и происходят существенные изменения метаболизма крахмала и липидов. Содержание Хл уменьшается более чем в 2 раза в течение суток инкубации без азота, что является в большей степени следствием нарушения синтеза пигмента, а не его деградации (Wase et al. 2014). Хлороз сопровождается снижением поперечного сечения поглощения антенных комплексов, тем самым снижая поглощение света и предотвращая образование АФК (Juergens et al. 2015). Общее снижение потребностей голодающих клеток в продуктах фотосинтеза

способствует накоплению крахмала и липидов, однако имеет место также регуляция метаболизма этих веществ. Так, в голодающих клетках возрастает экспрессия генов и содержание ферментов, связанных как с образованием крахмала из глюкозы, так и с обратным процессом разложения крахмала. В частности, было показано, что в течение первых 30 мин азотного голодания увеличивается содержание крахмал-синтазы 1, а через несколько часов возрастает экспрессия генов и содержание ферментов, участвующих в деградации крахмала, включая деветвящие ферменты (Park et al. 2015). Кроме полисахаридов, в голодающих клетках накапливаются моносахариды фруктоза и глюкоза, а также дисахарид трегалоза, состоящий из двух молекул глюкозы (Valledor et al. 2014), который, предположительно, является регулятором биосинтеза крахмала (Kolbe et al. 2005). Накопление липидов в голодающих клетках происходит в результате активации нескольких метаболических путей, вовлеченных прямым или косвенным образом в липогенез (Wase et al. 2014, Valledor et al. 2014). Так, следствием деградации накопленных запасов крахмала является рост содержания ацетил-КоА и НАД(Ф)Н, которые используются в качестве субстратов в биосинтезе липидов в голодающей клетке, в частности, триацилглицеридов. Также активируются такие ферменты, как пируваткарбоксилаза и АТФ-цитратлиаза, участвующие в липогенезе (Wase et al. 2014). Накопленный на ранней стадии голодания крахмал используется на более поздних стадиях в качестве источника энергии, в то время как изменения липидного метаболизма имеют важное значение для реорганизации структуры и стабилизации мембран.

Скорость темновых реакций фотосинтеза в клетках *C. reinhardtii* уменьшается на начальных этапах азотного голодания (до 3х дней) из-за снижения транскрипции и содержания основных ферментов цикла Кальвина (Juergens et al. 2015, Schmollinger et al. 2014). В отличие от высших растений, у которых дефицит азота не оказывает значительного воздействия на ППФ, у водорослей существенно снижается скорость фотосинтетического электронного транспорта (Antal et al. 2010, Miller et al. 2010, Wang et al. 2011). Голодание сопровождается снижением содержания основных белков ФС1, ФС2 и цит *b₆f*-комплекса, а также уменьшением транскрипции большинства генов, кодирующих белки реакционных центров, светособирающих комплексов и мобильных переносчиков электронов (Schmollinger et al. 2014, Miller et al. 2010, Blaby et al. 2013). При этом активность ФС2 и цит *b₆f* уменьшается в большей степени, чем активность ФС1 (Berges et al. 1996). Содержание белков хлоропластной АТФ-синтазы также снижается в голодающих по азоту клетках, указывая на нарушение фотофосфорилирования (Schmollinger et al. 2014). Общее снижение скорости фотосинтеза при азотном голодании играет, вероятно, положительную роль, предотвращая накопление АФК и способствуя

перераспределению азота, который высвобождается из хлорофилла, Рубиско и других фотосинтетических белков в пользу более важных молекул с точки зрения стратегии выживания.

У зеленых микроводорослей адаптация фотосинтеза к дефициту азота сопровождается активацией нескольких регуляторных механизмов. Было показано, что у голодающих по азоту клеток *C. reinhardtii* увеличивается количество транскриптов генов *LhcSR*, а также в два раза возрастает уровень зеаксантина (Juergens et al. 2015). Транскрипт гена *PsbS* не обнаруживается в клетках *C. reinhardtii* в нормальных условиях роста, однако присутствует при азотном голодании, указывая на возможную роль *PsbS* белка в NPQ (Miller et al. 2010). В голодающих клетках возрастает количество транскриптов и содержание таких белков как PGR5, PGRL1 и НДГ2, что способствует активации ЦЭТ и компенсирует падение АТФ из-за нарушения линейного потока электронов (Juergens et al. 2015, Schmollinger et al. 2014). Реорганизация ФСА в голодающих клетках также включает увеличение содержания ССК2 в антенне ФС1 в результате перехода в состояние 2, что увеличивает скорость ЦЭТ (Juergens et al. 2015). Важно отметить, что уровень АФК и содержание антиоксидантных белков, таких как аскорбат пероксидаза и супероксид дисмутаза, практически не изменяются в голодающих по азоту клетках *C. reinhardtii*, указывая на отсутствие сильного окислительного стресса (Juergens et al. 2015, Valledor et al. 2014).

В то время как общая фотосинтетическая активность клеток водорослей снижается в условиях азотного голодания, активность компонентов дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования увеличивается. В частности, возрастает содержание всех пяти дыхательных комплексов митохондрий, а также α , β и ϵ -субъединиц митохондриальной АТФ-синтазы (Wase et al. 2014, Juergens et al. 2015). Было показано, что транскрипция генов, кодирующих АОХ в клетках *C. reinhardtii*, сильно изменяется в условиях дефицита азота (Miller et al. 2010). Так, количество транскрипта основной оксидазы (АОХ1) увеличивается в 11 раз, в то время как для минорной оксидазы (АОХ2) наблюдается снижение транскрипции в 4 раза. Предположительно, рост экспрессии АОХ1 подавляет образование АФК в митохондриях и защищает компоненты дыхания от окислительного стресса (Mathy et al. 2010). У голодающих по азоту клеток *C. reinhardtii* уровень ферментов цикла Кребса увеличивается примерно в два раза (Wase et al. 2014, Valledor et al. 2014). Недавние исследования метаболизма показали, что уровни метаболитов цикла Кребса, таких как цитрат, α -кетоглутарат, сукцинат и малат, также увеличиваются, указывая на возникновение дисбаланса между реакциями внутри цикла (Wase et al. 2014).

Анаболические пути, участвующие в синтезе глюкозы из экзогенного ацетата в хлоропласте *C. reinhardtii*, значительно подавлены в условиях дефицита азота (Wase et al. 2014, Miller et al. 2010). В частности, активность ключевых ферментов глюконеогенеза, таких как карбоксикиназа фосфоенолпирувата и фруктозо-1,6-бисфосфатаза, а также ферментов глиоксилатного цикла, таких как цитратсинтаза и малатсинтаза, значительно снижается в голодающих по азоту клетках (Wase et al. 2014). С другой стороны, возрастает содержание некоторых ферментов гликолиза, включая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, фосфоглицерат мутазу и энолазу. Содержание пирувата и ацетил КоА возрастает с течением времени после удаления азота из среды, способствуя росту скоростей клеточного дыхания и синтеза липидов. В отличие от гликолиза, в окислительном пентозофосфатном пути происходит снижение содержания основных ферментов, таких как 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, транскетолаза, трансальдолаза и фруктозо-1,6-бисфосфатаза. Содержание промежуточных метаболитов этого пути, например, 6-фосфоглюконата значительно увеличивается, указывая на соответствующее снижение выхода конечного продукта - рибозо-5-фосфата, который является предшественником нуклеотидов в клетке (Wase et al. 2014).

Сложный процесс реорганизации метаболизма в клетках *C. reinhardtii* в условиях недостатка азота характеризуется быстрой и медленной фазами (Park et al. 2015). Во время быстрой фазы в течение нескольких часов происходит активация путей ассимиляции азота из внешних источников, а также перераспределение азота из рибосомальных белков, Рубиско и хлорофилла (Merchant and Helmann 2012). Эти процессы сопровождаются быстрым накоплением крахмала в результате транзитной активации глюконеогенеза и увеличения содержания крахмал-синтазы. Через 4 - 6 ч инкубации без азота метаболизм водорослей резко изменяется и начинается медленная фаза, связанная с накоплением триацилглицерида и других липидов (Park et al. 2015). Во время этой фазы внешний ацетат больше не используется для синтеза крахмала из-за инактивации глюконеогенеза, но используется для биосинтеза липидов через промежуточное образование ацетил-КоА. Деградация накопленных во время первой фазы голодания запасов крахмала обеспечивает дополнительный синтез ацетил-КоА, и, таким образом, происходит частичная конвертация углеводов в липиды. Во время медленной фазы значительно возрастают скорости гликолиза и митохондриального дыхания, а также ЦЭТ, направленные на обеспечение клетки энергией в условиях низкой активности ЛЭТ.

Таким образом, дефицит азота индуцирует многочисленные изменения азотного и углеродного метаболизма, а также энергетического баланса клетки. В частности, реакции ассимиляции азота, митохондриальное дыхание, окислительное и субстратное

фосфорилирование, цикл Кребса, гликолиз, синтез крахмала и липидов возрастают в голодающих клетках, в то время как цикл Кальвина, ППФ, особенно активность ФС2 и цит *b₆f*, фотофосфорилирование, глиоксилатный цикл, глюконеогенез, пентозофосфатный путь, синтез хлорофилла, синтез белков и РНК подавлены. Эти метаболические перестройки обеспечивают быстрое накопление органических включений и дальнейшую поддержку катаболических путей для обеспечения энергией голодающих клеток, переходящих в состояние покоя. Уменьшение ЛЭТ при азотном голодании компенсируется за счет активации альтернативных путей переноса электронов в хлоропласте, в том числе ЦЭТ и хлородыхания, которые поддерживают фотофосфорилирование и нефотохимическое тушение, а также снижают генерацию АФК.

Сера необходима для образования таких соединений как аминокислоты цистеин и метионин, глутатион, витамины, кофакторы биотин, тиамин, КоА и др., поэтому недостаток серы замедляет рост и снижает жизнеспособность фотосинтезирующих организмов (Lewandowska and Sirko 2008). Современные исследования воздействия дефицита серы на клетки зеленых микроводорослей связаны, в основном, с изучением феномена длительного фотообразования водорода (Antal et al. 2015). Недостаток серы вызывает, в целом, сходные метаболические изменения в клетках *C. reinhardtii* с теми, которые наблюдаются при азотном голодании. Так, дефицит серы, как и азота, приводит к снижению скорости деления клеток, подавлению анаболических процессов, дополнительной активации катаболических путей, накоплению крахмала и липидов (Melis et al. 2000, Zhang et al. 2002, Timmins et al. 2009). Быстрый метаболический ответ на этот стрессовый фактор включает синтез ферментов, участвующих в ассимиляции сульфата, снижение фотосинтетической активности и накопление крахмала (González-Ballester et al. 2010). Запасание крахмала сопряжено, как и при дефиците азота, с краткосрочной активацией глюконеогенеза и увеличением экспрессии генов крахмал-синтазы (Тоерел et al. 2013). Экспрессия генов ферментов, участвующих в деградации крахмала, таких как изоамилаза, альфа-амилаза и деветвящий фермент, увеличивается на более поздней стадии голодания (Тоерел et al. 2013). В голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* также накапливаются липиды (Timmins et al. 2009), однако в меньшей степени, чем при азотном голодании. Этот процесс обусловлен ростом экспрессии некоторых генов липидного синтеза, в том числе генов, кодирующих ацетил-КоА-синтазу и несколько неспецифических ацилтрансфераз (Тоерел et al. 2013). При серном голодании наблюдается увеличение экспрессии генов, кодирующих ферменты гликолиза и пентозофосфатного пути (González-Ballester et al. 2010, Тоерел et al. 2013).

Общее содержание белков в голодающих по сере клетках снижается в результате уменьшения биосинтеза аминокислот и количества рибосом (Melis et al. 2000, González-Ballester et al. 2010). Подобно азотному голоданию, при серном голодании заметна тенденция к замене белков с высоким содержанием серы на белки с низким содержанием серы (Takahashi et al. 2001, Bölling and Fiehn 1995). В частности, клеточная стенка хламидомонады состоит из сульфатированных гликопротеинов, которые замещаются в условиях дефицита серы на полипептиды с низким содержанием серы, высвобождая значительное количество серы для нужд метаболизма (Bölling and Fiehn 1995). Несмотря на то, что биосинтез хлорофилла замедляется при дефиците серы, общее содержание этого пигмента в хлоропласте снижается существенно меньше, чем при дефиците азота (Antal et al. 2006).

При инкубации *C. reinhardtii* без серы снижается экспрессия генов, кодирующих белки реакционных центров ФС2 и ФС1, ССК, цит *b₆f* и хлоропластной АТФ-синтазы (Schmollinger et al. 2014, Wykoff et al. 1998, Chen et al. 2010). Наиболее быстро снижается уровень Рубиско и D1-белка ФС2, а изменения содержания субъединиц цит *b₆f*, ФС1 и хлоропластной АТФ-синтазы происходят в течение более продолжительного периода. Серьезные изменения наблюдаются в структуре ССК2, которая кодируется у хламидомонады девятью генами LHCBM1-9 и содержит преимущественно белки LHCBM 1, 2 и 3. В голодающих по сере клетках снижается количество транскриптов белков LHCBM1-8, а содержание транскрипта и белка LHCBM9 возрастает, и данный белок становится основным структурным элементом ССК2 (Nguyen et al. 2008). Предположительно, такая замена компонентов ССК2 может быть частью фотозащитного механизма, который служит для эффективного рассеивания энергии и стабилизации антенного комплекса. Как и в случае с голодающими по азоту клетками, транскрипты, соответствующие полипептидам LHCSR, накапливаются при серном голодании (González-Ballester et al. 2010, Toepel et al. 2013), что также способствует защите ФС2. Адаптационная перестройка ФСА в ответ на дефицит серы включает в себя также переход из состояния 1 в состояние 2, активацию ЦЭТ и других альтернативных путей переноса электронов в хлоропластах (Antal et al. 2006, Кренделева и др. 2017). В то время как фотосинтетическая активность в голодающих клетках уменьшается, активность большинства ферментов дыхательной цепи в митохондриях изменяется незначительно (Melis et al. 2000, Antal et al. 2003). АОХ является исключением и имеет тенденцию к увеличению (Toepel et al. 2013). В отличие от азотной депривации, дефицит серы индуцирует активацию антиоксидантных систем, в том числе таких ферментов как аскорбат пероксидаза и СОД (Salbitaniet al. 2015). Необходимо отметить, что голодающие

по сере клетки *C. reinhardtii* накапливают значительное количество аскорбата, концентрация которого может достигать нескольких миллимолей (Nagy et al. 2016). Аскорбат участвует во многих окислительно-восстановительных реакциях в клетке, но чаще всего он действует как антиоксидант при детоксикации АФК.

Наряду с азотом и серой фосфор является необходимым элементом для большинства фундаментальных процессов в клетке, в том числе для окислительно-восстановительных реакций, синтеза нуклеиновых кислот, энергетического обеспечения, сигнальных путей и др. (Raghothama 1999). Исследования на клетках *C. reinhardtii* показали, что недостаток фосфора, как азота или серы, тормозит деление клеток, снижает общий уровень белков и индуцирует накопление крахмала и липидов (Wykoff et al. 1998, Chang 2005, Bajhaiya et al. 2016). Однако в случае с дефицитом фосфора необходимо больше времени, а именно, 5-7 дней для перехода клетки в голодающее состояние, которое характеризуется вышеназванными изменениями (Wykoff et al. 1998). Это происходит из-за присутствия в клетках достаточно большого количества внутренних запасов фосфатов, хранящихся, в основном, в виде пиррофосфатов и полифосфатов в вакуолях (Ruiz et al. 2001).

Адаптация клеток *C. reinhardtii* к дефициту фосфора включает быстрое увеличение фосфатазной активности, благодаря которой происходит высвобождение фосфатов из внутриклеточных резервов (Raghothama 1999, Quisel et al. 1996). Инактивация фотосинтеза обусловлена, в основном, снижением скорости темновых реакций и потерей части активных центров ФС2 (Wykoff et al. 1998, Brooks 1996). В условиях недостатка фосфора также снижается содержание транскриптов генов, ответственных за синтез некоторых субъединиц ФС1 и цит *b₆f*. Повышается уровень транскриптов генов, кодирующих белки LHCSR, AOX1 и PTOX1 (Moseley et al. 2006), которые играют фотозащитную роль. Несмотря на определенное сходство между адаптационными механизмами в клетках *C. reinhardtii*, индуцированными дефицитом азота, серы или фосфора, в последнем случае изменения транскрипции затрагивают значительно меньшее количество генов (Schmollinger et al. 2014).

1.4.3. Анаэробный метаболизм и механизмы образования водорода в темноте и на свету

Метаболизм большинства фототрофных организмов адаптирован к аэробным условиям. Тем не менее, гипоксия довольно широко распространена в некоторых водных и почвенных средах обитания микроводорослей и цианобактерий, хотя обычно носит временный характер. Дефицит кислорода может быть результатом действия ряда

факторов окружающей среды, в том числе недостаточной освещенности, ограниченной аэрации или высокой активности гетеротрофных микроорганизмов. Цветение водорослей или цианобактерий может также приводить к созданию анаэробных или микроаэробных условий даже в дневное время.

В естественных условиях микроводоросли наиболее часто переходят в анаэриоз в ночное время суток, В этих условиях клетки испытывают серьезный дефицит энергии из-за одновременного прекращения фото- и окислительного фосфорилирования. В темноте аэробный метаболизм позволяет эффективно генерировать энергию в процессе дыхания, когда происходит полное окисление молекулы глюкозы до двуокиси углерода и воды, сопровождающееся продукцией более 30 молекул АТФ. В то же время в анаэробных условиях дыхание невозможно, поэтому происходит неполное окисление глюкозы до пирувата, при котором образуется только 2 молекулы АТФ. Гликолиз сопровождается генерацией восстановительных эквивалентов в форме НАДН, которые должны быть окислены для поддержания процесса. Также необходимо метаболизировать пируват, который не может выводиться из клетки и накапливается при остановке дыхания. Таким образом, утилизация продуктов гликолиза является центральной проблемой анаэробного метаболизма в зеленых водорослях.

Хламидомонада широко распространена во влажных почвах, где она часто подвергается воздействию анаэробных условий, что объясняет наличие специальных путей бактериального типа, позволяющих адаптироваться к условиям дефицита кислорода. В течение последнего десятилетия *C. reinhardtii* интенсивно используется в качестве модельного организма для изучения механизмов адаптации к условиям анаэробного стресса. Последние результаты геномных, транскриптомных и биохимических исследований значительно улучшили понимание особенностей темнового анаэробного метаболизма у этого организма (Mus et al. 2007, Dubini et al. 2009, Terashima et al. 2010, Catalanotti et al. 2013, Noth et al. 2013, Subramanian et al. 2014). В целом, адаптационная стратегия *C. reinhardtii* в условиях дефицита кислорода включает реорганизацию основных метаболических потоков таким образом, чтобы поддерживать редокс гомеостаз и определенный уровень энергетического обеспечения в течение продолжительного времени (Yang et al. 2015).

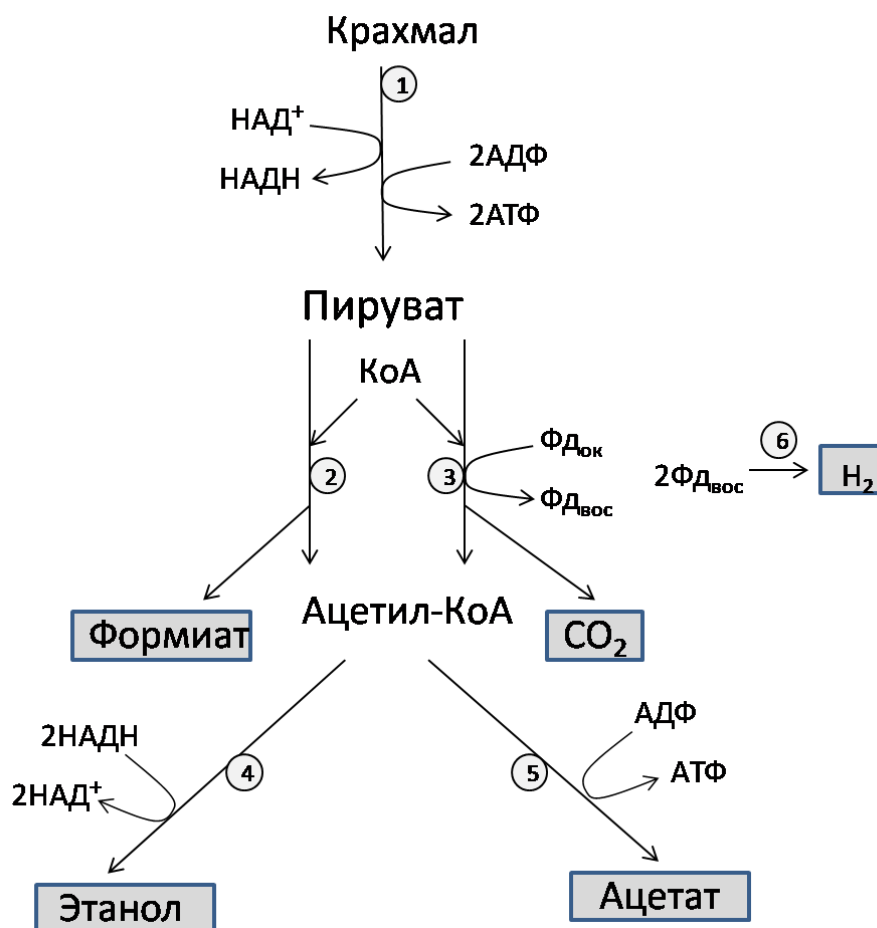


Рис. 1.6. Основные реакции ферментативного брожения в клетке *C. reinhardtii* (из Antal et al. 2015).

Конечные продукты показаны в рамке. 1 – расщепление крахмала до глюкозы и окисление глюкозы в гликолизе. Реакции 2 и 3 катализируются пируват-формиат лиазой и пируват-ferredоксин оксидоредуктазой, соответственно. В реакции 4 последовательно принимают участие ацетальдегиддегидрогеназа и алкогольдегидрогеназа. Реакция 5 катализируется последовательно фосфат-ацетилтрансферазой и ацетат киназой. В реакции 6 происходит образование водорода гидрогеназой, которая использует Фд, восстановленный в реакции 3, в качестве донора электронов.

Многие метаболические пути, включая гликолиз, глиоксилатный цикл, цикл Кребса, а также метаболизм аминокислот и крахмала значительно изменяются в клетках *C. reinhardtii* во время анаэробной инкубации в темноте. Так, снижение скорости цикла Кребса обусловлено отсутствием эффективного реокисления NADH в дыхательной цепи митохондрий. Поэтому метаболизация пирувата и ацетил-КоА не может проходить при участии цикла Кребса, и это может иметь серьезные последствия для жизнеспособности клетки. Для решения этой проблемы в клетках хламидомонады в анаэробных условиях

активируются разнообразные пути ферментативного брожения, позволяющие расщеплять пируват на более простые органические соединения, молекулярный водород и двуокись углерода, которые могут быть выведены из клетки (Atteia et al. 2013, Catalanotti et al. 2013, Yang et al. 2015). У *C. reinhardtii* разные пути брожения связаны с синтезом АТФ и/или окислением НАДН, что позволяет генерировать дополнительную энергию и утилизировать избыток восстановителя, то есть гибко регулировать баланс между энергетическим обеспечением и редокс состоянием переносчиков электронов (Atteia et al. 2013, Catalanotti et al. 2013) (рис. 1.6). Ферменты брожения в клетке *C. reinhardtii* участвуют в образовании этанола, формиата и CO₂ в качестве основных конечных продуктов, а такие вещества как глицерин, лактат, сукцинат и молекулярный водород образуются в меньших количествах.

У зеленых микроводорослей гидрогеназная реакция является частью анаэробного метаболизма и катализируется высокоэффективной хлоропластной FeFe-гидрогеназой, содержащей два атома железа в каталитическом центре (Цыганков 2014). Этот фермент осуществляет простую обратимую химическую реакцию восстановления протонов до молекулярного водорода: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ - равновесие в которой сильно сдвинуто вправо, поскольку донором электронов для этого типа гидрогеназ является сильный восстановитель Фд. Особенностью FeFe-гидрогеназ является высокая чувствительность к кислороду, который ингибирует каталитическую активность фермента, экспрессию генов и посттрансляционные модификации (Harpe and Kaminski 2002). Образование водорода в клетке *C. reinhardtii* в анаэробных условиях в темноте происходит при последовательном участии ферментов пируват-ферредоксин оксидоредуктазы и гидрогеназы (рис. 1.6). В результате активности первого фермента происходит окисление молекулы пирувата с образованием ацетил-КоА, CO₂ и двух восстановленных молекул Фд; последний служит донором электронов для гидрогеназы (Noth et al. 2013). Теоретически соотношение между количеством выделенного водорода и двуокиси углерода в этом пути должно быть 1:1. Однако де-факто выход водорода в темноте значительно ниже, чем выход CO₂, что указывает на конкуренцию за восстановленный Фд между гидрогеназой и другими ферментами в хлоропласте, такими как сульфит и нитрит редуктаза. Выделение водорода в темноте может быть также связано с активностью ФНР, которая катализирует перенос электрона между НАДФ и Фд (рис. 1.5). Равновесие в этой реакции сильно смещено в направлении от Фд к НАДФ из-за существенной разницы между редокс потенциалами Фд растительного типа (-400 – -450 мВ) и НАДФ (-350 мВ). Но если содержание НАДФН значительно превышает уровень восстановленного Фд, что может наблюдаться при анаэробной темновой инкубации, то возрастает скорость обратного переноса электронов.

В целом, выход водорода в темноте низкий и не имеет решающего значения для адаптации клетки к дефициту кислорода (Dubini et al. 2009). Так, было показано, что мутант *C. reinhardtii* без гидрогеназной активности HydEF характеризуется сдвигом равновесия между путями ферментативного брожения в темноте, однако это не влияет на общее физиологическое состояние клеток.

Выход водорода резко возрастает, когда адаптированную к темноте и анаэробным условиям культуру *C. reinhardtii* выставляют на свет (Gaffron and Rubin 1942, Cournac et al. 2002). Этот феномен, т.н. hydrogen burst, обусловлен индукцией фотосинтетического транспорта электронов и, как следствие, быстрым восстановлением Фд в строме при активном состоянии гидрогеназы. Как известно, ФНР и ферменты цикла Кальвина находятся в неактивном состоянии на начальной стадии индукции фотосинтеза (Michelet et al. 2013), а фотовосстановление кислорода в реакциях псевдоциклического транспорта электронов невозможно из-за дефицита кислорода. Эти факторы усиливают фотообразование водорода (рис. 1.5). Однако скорость выделения водорода достаточно быстро снижается после включения света из-за накопления кислорода, который ингибирует гидрогеназную реакцию, а также за счет активации ферментов цикла Кальвина.

Очевидно, что физиологическая роль гидрогеназы в зеленых микроводорослях может быть связана с утилизацией электронов на начальной стадии индукции фотосинтеза в клетках, адаптированных к анаэробным или микроаэробным условиям в темноте. Действительно, исследования роли гидрогеназной реакции в индукции фотосинтеза с использованием мутанта HydEF показали, что гидрогеназа способствует активации фотосинтеза после темновой анаэробной инкубации (Ghysels et al. 2013). Очевидно, что в начальный момент освещения фотосинтетическая ЭТЦ переходит в полностью восстановленное состояние из-за недоступности основных акцепторов электронов в строме хлоропласта: CO_2 и O_2 . Отток электронов из фотосинтетической ЭТЦ на протоны делает возможным фотообразование кислорода в ФС2 и постепенное переключение электронного транспорта в хлоропласте с пути 'вода-водород' на путь 'вода-вода', способствуя генерации транстилакоидного рН градиента, синтезу АТФ и активации темновых реакций фотосинтеза (Werdan et al. 1975). Очевидно, что при индукции фотосинтеза гидрогеназная реакция играет роль аналогичную циклам 'вода-вода' в аэробных условиях. Также было показано, что параллельно с гидрогеназной реакцией важную роль в индукции фотосинтеза в клетках *C. reinhardtii* в анаэробных условиях играет ЦЭТ (Ghysels et al. 2013). Предположительно, гидрогеназная активность и ЦЭТ

обеспечивают оптимальные значения рН в строме и необходимый баланс между АТФ и НАДФН на начальном этапе активации темновых реакций.

Кроме изучения возможной физиологической роли гидрогеназы, научный интерес также представляет разработка биотехнологических концепций и приемов для получения из водорослей на свету коммерчески обоснованных количеств водорода для использования в химической промышленности или в качестве 'зеленого' топлива в энергетике (Torzillo et al. 2014). Одним из критериев для оценки предложенных протоколов является возможность создания условий в клетке, прежде всего анаэробных, при которых становится возможной длительная фотопродукция водорода. Ранее было показано, что фотообразование водорода может продолжаться в течение нескольких недель при освещении клеток *C. reinhardtii*, культивируемых на среде с ацетатом, низкой интенсивностью света с ПФПФ около 10 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (Scoma et al. 2014). В этих условиях скорость фотообразования кислорода становится ниже уровня дыхания, учитывая, что компенсаторная точка фотосинтеза у этой водоросли соответствует значениям ПФПФ 30 – 70 в зависимости от условий культивирования. Вследствие этого в клетках образуется дефицит кислорода, что индуцирует гидрогеназную активность и фотообразование водорода в течение продолжительного периода. Большинство электронов для синтеза водорода изначально поступает из КВК, где происходит расщепление воды, указывая на определяющую роль пути 'вода-водород' в этом процессе. Образующийся при этом в ФС2 кислород эффективно утилизируется в процессах дыхания, а экзогенный ацетат служит основным донором электронов для дыхания. В этих условиях внутренние запасы крахмала в клетках незначительны, поэтому катаболизм углеводов оказывает слабое влияние на фотообразование водорода. Скорость фотообразования водорода таким путем незначительна.

Другой метод индукции длительного фотообразования водорода клетками *C. reinhardtii* был предложен Nagy с соавторами (2018). Его отличительной особенностью является субстратное лимитирование цикла Кальвина, отсутствие экзогенного ацетата, т.е. автотрофный тип питания, и высокая интенсивность света - 3000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Отсутствие CO_2 в газовой фазе фотореактора способствует переключению фотосинтетического электронного транспорта на функционирование в режиме цикла 'вода – вода', что приводит к снижению уровня кислорода в клетке. Дополнительно этому способствует высокая интенсивность света, при которой фотосинтетическая ЭТЦ почти полностью переходит в восстановленное состояние и происходит снижение скорости фотообразования кислорода в ФС2. Также в данной работе использовали простые катализаторы для удаления выделяемого культурой кислорода. Эти условия и приемы

приводят к значительному снижению уровня кислорода в клетке и активации гидрогеназной реакции. Фотообразование водорода по данному протоколу представляет собой ‘утечку’ электронов из фотосинтетической ЭТЦ при доминировании циклов ‘вода – вода’. Метод позволяет поддерживать достаточно высокую скорость продукции водорода в течение нескольких дней.

Наиболее изученным подходом для поддержания длительной фотопродукции водорода является депривация водорослевых клеток по основным элементам минерального питания (Antal et al. 2015). Так, дефицит макроэлементов, в основном, серы, широко используется в качестве метода, позволяющего регулировать скорость фотосинтеза и дыхания таким образом, что культура самопроизвольно переходит в анаэробные условия при умеренной или высокой интенсивности света в диапазоне 40-200 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. При этом инкубацию проводят в фотобиореакторах закрытого типа, в которых газовая фаза изолирована от внешней атмосферы. После самопроизвольного установления анаэробных условий в фотобиореакторе активируется гидрогеназа и начинается фотообразование водорода. Несмотря на то, что серное голодание рассматривается в качестве основного метода индукции продукции водорода на свету, в последнее время также исследовалась возможность использования методов депривации по азоту, фосфору, магнию и калию (Philipps et al. 2012, He et al. 2012, Vatyrova et al. 2012, 2015, Parazi et al. 2014, Volgusheva et al. 2015, 2017). Ниже рассмотрены особенности фотопродукции водорода в условиях серного, азотного и фосфорного голодания.

1.4.4. Фотообразование водорода в условиях минерального голодания

Механизмы, лежащие в основе фотопродукции водорода голодающими по сере клетками *C. reinhardtii*, изучались с начала 2000-х годов, когда впервые был предложен соответствующий протокол (Melis et al. 2000). Согласно этому протоколу для получения голодающей по сере культуры сначала необходимо перенести клетки с полной среды (трис-ацетат-фосфатная среда, TAP) на среду без серы (TAP-S) путем последовательного осаждения и ресуспендирования клеток в новой среде, повторенных несколько раз. При этом начальная концентрация клеток в среде без серы может быть достаточно высокой и составлять 4-7 млн мл^{-1} , поскольку дефицит серы ингибирует рост культуры. Затем культуру помещают в фотобиореактор закрытого типа и инкубируют на умеренном или сильном свету с ПФПФ 40-300. В этих условиях зеленые микроводоросли проходят через несколько стадий. Начальная аэробная стадия характеризуется снижением скорости деления клеток, скорости фотосинтеза, а также интенсивным поглощением ацетата и

накоплением крахмала. Затем следует переход культуры в анаэробноз и активация путей анаэробного метаболизма, в том числе брожения и гидрогеназной реакции. На анаэробной стадии голодания культура продуцирует водород в течение 4-7 дней, и этот процесс сопровождается постепенной деградацией крахмала, после чего клетки погибают (Zhang et al. 2002). Необходимо отметить, что феномен фотообразования водорода в этих условиях является результатом синергического действия двух стрессовых факторов: дефицита серы и кислорода.

На аэробной стадии голодания основным источником углерода для синтеза крахмала является экзогенный ацетат, превращение которого в крахмал усиливается в результате транзитной активации глюконеогенеза (Тоерел et al. 2013). Кроме того, было высказано предположение о том, что углерод, высвобождающийся в результате деградации Рубиско, также может быть использован для синтеза углеводов (Melis 2007). Очевидно, что процесс инактивации ФС2 в голодающих клетках важен для самопроизвольного установления анаэробных условий в фотобиореакторе. Предположительно, одним из основных механизмов инактивации ФС2 является нарушение ресинтеза белка D1 в ФС2, которое приводит к замедлению цикла репарации ФС2 и, как следствие, к снижению содержания активных центров ФС2 (Wykoff et al. 1998). На ранней стадии инкубации *C. reinhardtii* без серы в закрытом фотобиореакторе накапливается выделяемый клетками кислород, способствуя генерации АФК и фотоингибированию (Tolstygina et al. 2009). Также было показано, что снижение активности ФС2 в условиях дефицита серы частично связано с накоплением в клетках аскорбата, который является альтернативным донором электронов для P_{680}^+ в ФС2 и может приводить к разрушению КВК (Nagy et al. 2016). В свою очередь, деструкция КВК способствует развитию фотоингибирования по донорному механизму. Следует отметить, что цит *b₆f* и ФС1 инактивируются в меньшей степени по сравнению с ФС2 (Zhang et al. 2002). В отличие от фотосинтеза, процессы инактивации транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий протекают значительно медленнее (Melis et al. 2000). Постепенная инактивация фотосинтетических реакций при сохранении достаточно высокой дыхательной активности является причиной самопроизвольного перехода культуры в анаэробноз, что происходит примерно через 24 ч от начала инкубации без серы (Melis et al. 2000; Zhang et al. 2002). Очевидно, что установление анаэробных условий в фотобиореакторе сопровождается резким увеличением содержания восстановителя в водорослевых клетках. В анаэробных условиях избыток восстановителя может быть частично утилизирован в реакциях ферментативного брожения и синтеза некоторых аминокислот. Дальнейшая регуляция внутриклеточного окислительно-

восстановительного баланса протекает при участии гидрогеназы, активация которой происходит сразу после перехода культуры в анаэробноз (Antal et al. 2003). Было показано, что три тесно взаимосвязанных процесса участвуют в регуляции окислительно-восстановительного и энергетического баланса в клетках *C. reinhardtii* в течение анаэробной фазы инкубации без серы: фотообразование водорода и кислорода в хлоропласте, утилизация кислорода и деградация крахмала (Hemschemeier et al. 2008). Несмотря на то, что фотообразование водорода связано, в основном, с активностью ФС2, которая служит первичным донором электронов для гидрогеназы, скорость процесса ограничена скоростью утилизации фотосинтетически образованного кислорода в клетке. Так, ранее было показано (Volgusheva et al. 2013), что повышенный выход водорода в голодающих по сере клетках мутанта *stm6* *C. reinhardtii* обусловлен способностью поддерживать высокую скорость электронного транспорта с ФС2 на гидрогеназу в анаэробной фазе голодания. Данный мутант характеризуется высокой скоростью митохондриального дыхания, что позволяет более эффективно утилизировать выделяемый кислород в клетке. Ассимиляция ацетата из среды подавляется во время анаэробной стадии инкубации без серы (Tsygankov et al. 2002). Поэтому катаболизм крахмала, накопленного во время аэробной стадии голодания, служит основным путем генерации восстановителя в форме НАДН, который затем используется в дыхании для утилизации выделенного кислорода. Необходимо отметить, что между хлоропластом и митохондриями в клетке *C. reinhardtii* существует редокс равновесие благодаря малат-оксалоацетатному шунту (рис. 1.5). Поэтому восстановитель, генерируемый в строме хлоропласта в процессе гликолиза, может перераспределяться в митохондрии и использоваться в дыхании. Скорость деградации крахмала в анаэробной фазе голодания является относительно низкой из-за ограничений, накладываемых медленным ферментативным метаболизмом (Melis and Harpe 2001, Zhang 2002).

Как было отмечено выше, дефицит азота вызывает более серьезные изменения метаболизма по сравнению с дефицитом серы, фосфора или любого другого макроэлемента. Ранее была исследована возможность фотоиндуцированного образования водорода голодающими по азоту клетками *C. reinhardtii* (Philipps et al. 2012). Для этого культуры переносили на среду без азота так же, как и в методе серной депривации, а затем инкубировали в закрытом культиваторе на постоянном свете. Было показано, что в этих условиях дефицит азота тоже индуцирует переход культуры в анаэробноз с последующим образованием водорода на свету, однако общий выход водорода при этом значительно ниже по сравнению с культурой, голодающей по сере. В частности, культуры в условиях дефицита азота характеризовались более поздним переходом в анаэробные условия (~ 72

ч), меньшей скоростью продукции водорода и более низкой активностью гидрогеназы. Высокая продолжительность аэробной стадии азотного голодания обусловлена относительно низкой скоростью инактивации ФС2 в клетке на свету. Стабильность ФС2 при азотном голодании может быть обусловлена целым рядом фотозащитных механизмов, в том числе значительным уменьшением антенны ФС2, активацией NPQ, ЦЭТ, ростом активности РТОХ и АОХ, как описано в предыдущих разделах. Особенностью азотного голодания является то, что скорость деградации крахмала, накопленного на аэробной стадии голодания, значительно снижена на анаэробной стадии по сравнению с серным голоданием (Philipps et al. 2012). Данная особенность может быть связана с неэффективным ферментативным брожением. Авторы данного исследования сделали вывод о том, что низкий выход водорода при дефиците азота связан, главным образом, с малоактивным состоянием гидрогеназы из-за присутствия кислорода и нарушением фотосинтетического транспорта электронов на уровне цит *b₆f*.

Также была исследована возможность фотообразования водорода в условиях дефицита фосфора культурами пресноводной *C. reinhardtii* и морской *Chlorella* sp (Batyrova et al. 2012, 2015). Морская вода характеризуется естественным низким содержанием фосфора и, по мнению авторов исследования, может служить в качестве среды культивирования морских микроводорослей для получения водорода. Перенесение клеток в высокой концентрации с полной среды на среду без фосфора не приводит к фотообразованию водорода, как в случае с серной или азотной депривацией. Это связано с наличием значительных внутриклеточных резервов фосфата, для исчерпания которых используют протокол разведения культуры (Laurinavichene et al. 2002), согласно которому обедненная фосфатом среда инокулируется небольшим количеством суспензии водорослей и культура увеличивает биомассу в течение нескольких дней за счет внутренних резервов фосфора, пока клетки не трансформируются в состояние голодания. Этот протокол использовался для обеднения клеток *C. reinhardtii* и *Chlorella* sp. фосфором, после чего культуры помещались в закрытый культиватор, где они переходили в анаэробноз и выделяли водород. Однако в случае фосфорного голодания все стадии, включая аэробную стадию и период фотообразования водорода в фотобиореакторе, были более продолжительными по сравнению с серным голоданием из-за более мягкого стрессового воздействия. Накопление крахмала и потребление ацетата происходило на аэробной стадии длительностью около 100 ч. После перехода в анаэробные условия обе культуры выделяли водород с относительно высокой скоростью, сравнимой с голодающими по сере культурами. Период фотопродукции водорода составлял около 100 часов у *C. reinhardtii* и 200 ч у *Chlorella*. В отличие от голодающих по сере культур, у

которых содержание крахмала снижается не более, чем на 30-50% за весь период выделения водорода, при фосфорном голодании в клетках деградирует почти весь накопленный крахмал, что можно интерпретировать как более высокую эффективность конвертации крахмала в водород. В целом, эффект дефицита фосфора на физиологические характеристики и процесс фотообразования водорода у зеленых водорослей схож с действием дефицита серы, однако стадии этого процесса значительно растянуты во времени.

Сравнительный анализ действия трех типов минерального стресса в качестве стимуляторов фотопродукции водорода позволяет сделать вывод о том, что азотное голодание в этом качестве значительно проигрывает серному голоданию, а фосфорное голодание сравнимо с серным голоданием по выходу водорода, однако требует более продолжительной инкубации.

Глава 2. Материалы и методы исследований

2.1. Объекты и методы культивирования

2.1.1. Объекты исследования

В качестве основного объекта для изучения молекулярных механизмов взаиморегуляции процессов фотосинтеза в условиях минерального стресса и фотообразования водорода использовали одноклеточную зеленую микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii*. В качестве основного штамма использовали *CC-124 (137C)*, а в отдельных экспериментах - мутанта HydEF (HydEF-1) без активной FeFe-гидрогеназы и соответствующий ему дикий тип *CC-425*, у которого отсутствует клеточная стенка и который является ауксотрофом по аргинину. Штаммы были получены из альгологической коллекции Chlamydomonas Resource Center (<https://www.chlamycollection.org>). Отдельные исследования проводили на зеленой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* из коллекции CCALA (<http://ccala.butbn.cas.cz>).

Для изучения механизмов адаптации ФСА высших растений к дефициту азота использовали модельный организм *Phaseolus vulgaris* (фасоль обыкновенная). Выбор данного объекта обусловлен хорошей способностью к росту в условиях гидропоники, позволяющей контролировать минеральный состав среды.

2.1.2. Культивирование зеленых микроводорослей и высших растений

Культуру *C. reinhardtii* растили фотогетеротрофно на трис-ацетат-фосфатной среде (TAP) (Harris 1989) при pH 7.0 или 7.5 до поздней логарифмической фазы роста, когда концентрация клеток достигала 5-6 млн кл мл⁻¹ для штамма *CC-124* и около 9 млн кл мл⁻¹ для более мелких штаммов HydEF и *CC-425*. Концентрация Хл в культурах на этой стадии составляла 10-15 мкг мл⁻¹. Культуры *Scenedesmus quadricauda* растили фотоавтотрофно на среде BG11 до значения оптической плотности при 730 нм (OD₇₃₀) 0.6. Культивирование проводили в конических колбах Эрленмейера объемом от 100 мл до 1 л на шейкере при скорости качания 100-120 оборотов мин⁻¹, температуре 24-26°C и на постоянном свете интенсивностью 100-150 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹.

Для получения голодающей по сере культуры *C. reinhardtii* сначала клетки переносили с полной среды TAP на свежую среду без серы (TAP-S, pH 7.7), в которой SO₄²⁻ замещали эквимолярным количеством Cl⁻. Для этого клетки осаждали

центрифугированием при 3000g в течение 5 мин и ресуспендировали в свежей среде ТАР-S. Для максимального удаления серы из среды процедуру осаждения/ресуспендирования повторяли 3 раза. Аналогичный протокол использовали также в отношении контрольной культуры, но при этом клетки переносили на свежую среду ТАР. Концентрация клеток в новой среде составляла около 4 млн мл⁻¹ для штамма 137С и около 8 млн мл⁻¹ для штаммов cc425 и HydEF, что соответствует концентрации Хл около 7 мкг мл⁻¹. После этого культуры инкубировали аэробно в конических колбах, либо в закрытых культиваторах или герметичных стеклянных флаконах в случае водородного эксперимента. Инкубацию без серы проводили при постоянном перемешивании культуры, температуре 24-26°C и при интенсивности света 40 или 80 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, если не указана другая. Длительность инкубации составляла от нескольких суток для суспензионных культур до нескольких недель для иммобилизованных клеток.

Голодающие по магнию культуры *C. reinhardtii* (137С) получали в соответствии с методом, разработанным (Volgusheva et al. 2015). Отличительным свойством указанного протокола по сравнению с протоколом серного голодания является наличие дополнительной стадии роста культуры без магния, которая предшествует перенесению клеток на свежую среду без магния. Такой расширенный протокол обусловлен наличием существенных запасов магния в водорослевой клетке и менее интенсивным расходом этого элемента по сравнению с азотом и серой. Дополнительная стадия роста культуры в условиях дефицита магния позволяет избавиться от внутриклеточных запасов магния. Как описано выше, похожий протокол использовали для получения голодающих по фосфору культур пресноводных и морских зеленых микроводорослей (Batyrova et al. 2012, 2015) (Глава 1.4.4). Согласно протоколу магниевого голодания сначала культуру клеток *C. reinhardtii* наращивали на среде ТАР в стандартных условиях. Затем разводили суспензию в 100 раз средой без магния (ТАР-Mg pH 7.7), в которой MgSO₄ замещен на Na₂SO₄, и растили культуру в колбах на шейкере в стандартных световых и температурных условиях в течение недели. После этого культуру переносили на свежую среду ТАР-Mg путем двукратной процедуры центрифугирования/ресуспендирования при конечной концентрации клеток около 4 млн мл⁻¹.

Для иммобилизации использовали клетки *C. reinhardtii* (137С), выросшие на полной среде ТАР (контроль), на среде ТАР-Mg или клетки сразу после перенесения с ТАР среды на среду ТАР-S. Иммобилизацию клеток *C. reinhardtii* в тонких альгинатных пленках проводили в стерильных условиях в соответствии с ранее разработанным протоколом (Kosourov and Seibert 2009) с модификациями. Сначала водорослевые клетки

осаждались при 3000g в течение 5 мин и смешивались с водой и стерильным раствором альгината натрия (Fluka, St. Louis, США) в соотношении 1 г сырого веса : 0.5 мл MQ H₂O : 1 мл 3% раствора альгината. Полученную густую клеточную суспензию равномерно распределяли по поверхности эластичной пленки (6 × 20 см), состоящей из антимоскитной сетки толщиной 0.2-0.4 мм, проклеенной с нижней стороны прозрачным канцелярским скотчем. Полимеризацию альгината проводили путем распыления 50 мМ раствора MgCl₂ из пульверизатора над поверхностью пленки в течение нескольких секунд, а затем полностью погружали пленку в раствор MgCl₂ и выдерживали несколько минут для закрепления эффекта. После этого пленку разрезали на полоски размером 4 × 1 см и помещали каждую полоску в отдельный стеклянный флакон как описано ниже. Начальное содержание Хл в полосках составляло 250±10 мг м⁻².

При исследовании влияния спектральных характеристик света на фотопroduкцию водорода в иммобилизованной культуре *C. reinhardtii* использовали светодиодные матрицы на основе четырех типов узкополосных светодиодов мощностью 3 Вт и источников питания к ним (LED Fedy, Китай). Спектры соответствующих светодиодов с максимумами при 435 (синий свет), 520 (зеленый), 660 и 690 (красный) нм показаны на рис. 2.1. Разные длины волн по разному поглощаются фотосинтетическими пигментами растений и водорослей (см. спектр поглощения суспензии *C. reinhardtii* на рис. 2.1). В частности, синий свет поглощается в большей степени, чем красный или зеленый свет. Поэтому освещение образцов синим светом с той же интенсивностью, что и красным или зеленым светом, приводит к более интенсивному фотосинтетическому электронному транспорту. Это препятствует сравнению именно спектральных эффектов на фотосинтез и сопряженные процессы. Для решения этой проблемы интенсивность света от каждого светодиодного источника выставлялась таким образом, чтобы количество поглощенного клетками света было одинаковым для всех типов источников света. Для этого измеряли поглощение света (absorptance) от каждого светодиодного источника в суспензии *C. reinhardtii* с помощью интегрирующей сферы (Labsphere, США). Сначала осаждали клетки (3000g, 5 мин) и ресуспендировали в свежей среде ТАР в концентрации, соответствующей OD₇₃₀=0.4. Затем добавляли 1 мл суспензии в кювету с длиной оптического пути 1 см и помещали кювету во входное отверстие сферы. В ходе измерения свет от светодиодного источника с ПФПФ 50 пропускали через кювету, а измерение интенсивности света на выходе из сферы проводили с использованием квантометра Li-250A (LiCor, США). Величина поглощения света была определена как относительная разница между измеренными значениями ПФПФ в чистой среде ТАР и в клеточной

суспензии (результаты поглощения для разных длин волн приведены на рис. 2.1). На основании данных измерений проводили расчеты значений интенсивности света при длительной инкубации иммобилизованных культур *C. reinhardtii*. Так, значения ПФПФ, при которых количество поглощенного клетками света было одинаковым для разных источников света, составили 30 для синего света, 71 для зеленого света, 45 для красного света (660 нм) и 40 для красного света (690 нм).

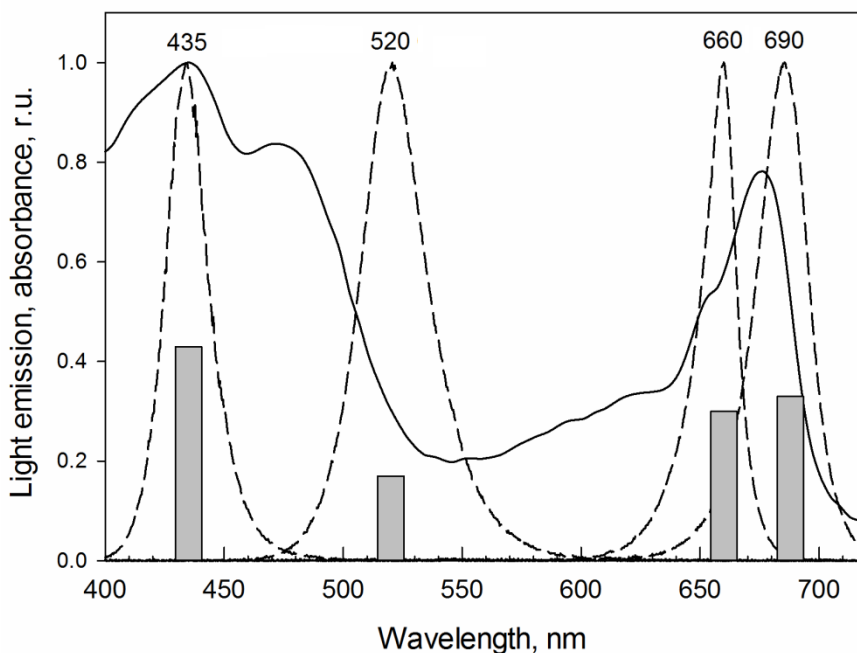


Рис 2.1. Спектральные характеристики синего, зеленого, красного (660 нм) и красного (690 нм) светодиодов с пиками излучения при 435, 520, 660 и 690 нм, соответственно (штриховая линия). Непрерывной линией показан спектр поглощения клеток *C. reinhardtii*, а столбиками – относительная величина поглощения соответствующего монохроматического света в суспензии *C. reinhardtii*.

В культиваторах закрытого типа отсутствует газообмен между газовой фазой культиватора и внешней средой, что позволяет поддерживать анаэробные или микроаэробные условия в культуре, необходимые, в частности, для индукции фотообразования водорода зелеными микроводорослями. В качестве закрытых культиваторов использовали либо трехгорлые стеклянные цилиндрические сосуды объемом 1.0 – 2.0 л, такие как Biogen (Witeg, Германия), либо стеклянные флаконы в зависимости от задач эксперимента. В трехгорлых сосудах культура перемешивалась за счет вращения магнита в нижней части, закрепленного на стержне с лопастями вдоль цилиндрической части сосуда. Через боковые горловины в культиватор вставляли

кислородный и/или редокс электроды, а также гибкую силиконовую трубку, соединенную одним концом с газовой фазой культиватора, а другим - со стеклянным шприцом ($V=15-20$ мл) без поршня для выравнивания давления между газовой фазой культиватора и атмосферой. Выводную трубку из культиватора плотно подсоединяли к отверстию для иглы в шприце и устанавливали шприц вертикально открытой (поршневой частью) вниз в сосуд с насыщенным раствором NaCl, который препятствует диффузии газов (Melis et al. 2000). После герметизации культиватора производили отвод части газа из газовой фазы так, чтобы шприц заполнился на 80% солевым раствором. Таким образом, перевернутый шприц предоставляет дополнительный объем к газовой фазе культиватора, который может варьировать в зависимости от давления, что позволяет примерно оценивать количество выделенного культурой водорода. Регистрацию содержания растворенного кислорода и температуры в культиваторах проводили в постоянном режиме с помощью кислородного электрода (МАРК-201, Россия), снабженного датчиком температуры и подсоединенного к компьютеру через контроллер.

При необходимости сравнивать действия нескольких факторов на характеристики культур и фотообразование водорода, а также в экспериментах с иммобилизованными клетками требовалось большое количество образцов, поэтому инкубацию проводили в цилиндрических стеклянных флаконах объемом 75 мл (\varnothing 40 мм) или 14 мл (\varnothing 22 мм), закрытых газонепроницаемыми силиконовыми пробками (Belco Glass Inc., США). Суспензионные культуры *C. reinhardtii* помещали во флаконы в количестве 3/4 от полного объема, после чего герметично закупоривали флаконы и инкубировали на боку в течение 72 и более часов на шейкере при 120 об мин⁻¹, температуре 24-26°C и постоянной освещенности от 40 до 100 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ в зависимости от задач эксперимента. В случае с иммобилизованной культурой альгинатные полоски с клетками *C. reinhardtii* помещались в 75 или 14 мл флаконы, содержащие 10 или 5 мл среды TAP, TAP-S или TAP-Mg. Затем герметично закупоривали флаконы и с помощью полых игл продували газовую фазу аргоном в течение 20 мин. После этого укладывали флаконы на бок так, чтобы полоски погрузились в среду стороной со скотчем вниз, и инкубировали в таких же условиях, что и суспензионные культуры.

Семена фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L. cv Saxa) помещали на неделю в насыщенный водой вермикулит при комнатной температуре на комнатном свете. Затем недельные проростки растений переносили на стандартную среду для гидропоники (Hoagland and Arnon 1950). Контрольные растения растили на полной среде, содержащей 12 mM NO₃⁻ и 1 mM NH₄⁺, а для получения голодающих по азоту растений использовали

среду, содержащую 1% от количества нитрата и аммония в полной среде, и недостающий нитрат замещали хлоридом. В обе среды дополнительно добавляли буфер Mes-KOH (pH 5.5) в конечной концентрации 2 мМ. В два пластиковых поддона, содержащих по 5 л полной или дефицитной по азоту среды, помещали по девять проростков фасоли в каждый. Замену сред в поддонах производили два раза в неделю. Растения культивировались в течение 14 дней в ростовой камере при температуре 22°C и интенсивности света 120 – 140 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ при световом режиме 16 ч свет/8 ч темнота. В ходе культивирования среды аэрировались в постоянном режиме с помощью компрессора и распылителей. В этих условиях не происходило формирования клубеньков с азотфиксирующими бактериями в корнях растений.

2.1.3. Получение субклеточных препаратов

Процедуры по выделению тилакоидных мембран из клеток *C. reinhardtii* (137C) проводили на низком свете или в темноте, а образцы держали на льду на всех стадиях процесса. Клетки осаждались центрифугированием при 3000g в течение 5 мин, ресуспендировались в буфере А (25 мМ Tris, pH 7.2, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂), снова осаждались и ресуспендировались. Затем суспензию клеток в пробирках помещали в ледяную баню и обрабатывали ультразвуком (22 кГц) на установке УЗДН-1 в течение 5 периодов по 20 с. Полученные клеточные экстракты очищались путем осаждения оставшихся целыми клеток и твердых включений (2000g, 4°C, 15 мин). В отдельных экспериментах использовали свежеприготовленные клеточные экстракты. Для осаждения тилакоидных мембран очищенные экстракты центрифугировались при 20000g, 4°C в течение 25 мин. Затем ресуспендировали полученный осадок в буфере В (25 мМ Tris, pH 7.2, 400 мМ сахароза, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂). Для очищения мембран процедуру центрифугирования повторяли дважды. Конечная концентрация тилакоидных мембран в буфере В составляла 0.5 мг Хл мл⁻¹. Полученные препараты быстро замораживались в жидком азоте и хранились при температуре -80°C. Перед измерениями оттаивали образцы на льду в темноте и разводили буфером В до необходимой концентрации.

Выделение тилакоидных мембран из листьев *P. vulgaris* проводили на низком свете или в темноте в соответствии с протоколом (Nakala et al. 2005) с изменениями. Сначала листья гомогенизировали блендером в изоосмотическом буфере, содержащем 40 мМ HEPES (pH 7.4), 0.3 М сорбитола, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 1 М бетаина и 1% по массе бычьего сывороточного альбумина. Полученный

гомогенат центрифугировали 5 мин при 1100g, сливали супернатант, а осадок ресуспендировали в буфере осмотического шока, содержащем 10 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM сорбитола и 10 mM MgCl₂. Процедуру центрифугирования повторяли два раза, после чего тилакоидные мембраны ресуспендировали в буфере хранения (10 mM HEPES (pH 7.4), 0.5 M сорбитола, 10 mM MgCl₂, 5 mM NaCl) в концентрации 2 мг Хл мл⁻¹, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C. Перед измерениями образцы тилакоидных мембран оттаивали на льду в темноте и разводили буфером ФС2 (40 mM HEPES-KOH, pH 7.6; 0.33 M сорбитола, 5 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 1 M бетаина, 1 mM KН₂РO₄, и 5 mM NH₂Cl) до нужной концентрации.

2.2. Измерительные методы

2.2.1. Определение ростовых параметров культуры, содержания пигментов, общего белка, крахмала и АТФ

Для подсчета клеток использовали камеру Горяева. Тестирование жизнеспособности популяции микроводорослей *C. reinhardtii* проводилось следующим образом. Сначала готовили реакционную смесь, содержащую красители феносафранин (0,025%) и метиленовый синий (0.025%), а также 10% этанола в 5 mM калиево-фосфатном буфере (Davies et al. 1996). Данная смесь избирательно проникает в мертвые клетки, окрашивая их в темно-сиреневый цвет. Клеточную суспензию смешивали с реакционной смесью в равных пропорциях и сразу вводили в камеру Горяева. После этого рассчитывали количество окрашенных (мертвых) и неокрашенных или слабоокрашенных (живых) клеток.

Для определения концентрации Хл *a* и *b* в суспензии микроводорослей отбирали 2 мл образца с клетками, осаждали клетки при 3000g в течение 5 мин, заливали осадок 2 мл 95% этанола, обрабатывали на вортексе 30 с и помещали в темноту на 1 ч при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали 5 мин при 8000g, переносили 1 мл супернатанта в кювету и определяли содержание Хл *a* и *b* спектрофотометрическим методом как описано в (Lichtenthaler 1987). Для экстракции Хл из препаратов тилакоидных мембран и клеточных экстрактов использовали 80% водный раствор ацетона по методике (Porra et al. 1989), а для экстракции Хл из листьев растений - диметилформамид (Inskoop and Bloom 1985).

Для определения пигментного состава (содержания ксантофиллов) в клетках микроводорослей сначала экстрагировали пигменты с использованием 90% ацетона.

Экстракты высушивали под вытяжкой, а затем растворяли в 300 мкл абсолютного ацетона. Содержание пигментов в полученных образцах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием установки Knauer K-501, снабженной УФ детектором K-2501 (Германия), либо хроматографа Agilent 1100, оборудованного колонкой C8 (Zorbax Eclipse XDB-C8, Agilent, США).

Для определения белка в микроводорослях сначала отбирали 2 мл суспензии клеток и осаждали клетки при 3000g в течение 5 мин. Затем ресуспендировали клетки в 0.2 мл 50 mM фосфатного буфера (pH 7.5), помещали в ледяную баню и обрабатывали ультразвуком (22 кГц) в течение пяти серий по 20 с. В полученные экстракты добавляли 1 мл 1% додецилсульфата натрия (SDS) в физиологическом растворе (580 мг NaCl в 100 мл) и перемешивали содержимое. Затем осаждали нерастворимую часть центрифугированием при 3000g в течение 5 мин, а супернатант использовали для определения содержания белка. У высших растений белок определяли в неразведенных препаратах первичных клеточных экстрактов. Определение концентрации белка проводили с помощью метода Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта (Lowry et al. 1951).

Крахмал в клетках микроводорослей определяли по методу, описанному ранее в (Gfeller and Gibbs 1984) с некоторыми изменениями. Сначала отбирали 2 мл клеточной суспензии и осаждали клетки центрифугированием при 3000g в течение 5 мин. Удаляли супернатант и заливали клетки 1 мл охлажденного абсолютного этанола, встряхивали и выдерживали 10 мин на льду. Затем центрифугировали образцы при 8000g и 4°C в течение 5 мин, осадок тщательно ресуспендировали в 1 мл охлажденного этанола с использованием вортекса и вновь центрифугировали. После этого ресуспендировали осадок в 1 мл 100 mM водного раствора ацетата натрия, pH которого был доведен до 4.5 ледяной уксусной кислотой. Затем два раза отмывали нерастворимую часть раствором ацетата натрия. После этого переносили полученную взвесь в стеклянные пробирки и выдерживали на водяной бане 10 мин при 100°C и 1 атмосфере. Затем охлаждали образцы, переносили в 2 мл пробирки, добавляли в каждую пробирку по 2 единицы амилоглюкозидазы (Sigma Aldrich) в 100 mM растворе ацетата натрия и оставляли на ночь в термостате при 55°C. Утром доводили уровень образцов до 2 мл раствором ацетата натрия и центрифугировали 5 мин при 8000g. После этого спектрофотометрически определяли содержание глюкозы в супернатанте с использованием стандартной системы глюкозооксидаза-пероксидаза (Barham and Trinder 1972).

Для экстракции АТФ из клеток микроводорослей использовали метод, описанный ранее в работе (Johnson et al. 2007). Сначала доводили концентрацию Хл в суспензии

клеток до 100 мкг мл^{-1} , а затем помещали 1 мл аликвоты суспензии в пробирки и охлаждали на льду. К охлажденным образцам добавляли 20 мкл 50% трихлоруксусной кислоты, с помощью вортекса интенсивно перемешивали смесь в течение 1 мин и быстро замораживали в жидком азоте. После заморозки образцы оттаивали на льду и центрифугировали при $11000g$ в течение 5 мин при 4°C . Супернатант разливали в пробирки и хранили при -80°C . Перед анализом АТФ оттаивали содержимое пробирок на льду, смешивали 10 мкл содержимого пробирок с 90 мкл 0.1 М трис-ацетатного буфера (рН 7.7) и определяли концентрацию АТФ люциферин-люциферазным методом с использованием лиофилизированного АТФ-реагента ЛЮМТЕК. Измерения проводили на люминометре ЛЮМ-1 (Люмтек, Россия).

2.2.2. Иммуноблоттинг

Образцы первичных клеточных экстрактов микроводорослей и листьев растений выравняли по общему содержанию белка. Затем белки разделяли в 14% SDS-PAGE без мочевины, переносили на поливинилиден-дифлуоридные мембраны (Millipore, Billerica, США) и фиксировали блоты с использованием реагента блокировщика (Bio-Rad, Hercules, США). Для визуализации результатов электрофореза использовали краситель Кумасси бриллиантовый синий (Bio-Rad). Иммуноанализ белков фотосинтетических и дыхательных комплексов проводили с помощью специфических антител против PsaD (ФС1), PsbA (ФС2), цит *f* (цит *b₆f*), СОХIIб (СОХII), Fe-СОД, ФНР и Рубиско (RbcL), заказанных в Agrisera (Швеция). В качестве вторичных антител использовали козы анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Zymed, США). Визуализацию мембранного блота проводили хемилюминесцентным методом с использованием кита (New England Biolabs, Ipswich, США). Уровень количества белка определялся денситометрическим методом с помощью Gene Tools (PerkinElmer, Waltham, США).

2.2.3. Анализ АФК и активности антиоксидантных систем

Анализ генерации АФК в клетках микроводорослей проводили с использованием флуорогенного индикатора 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин-диацетата (H_2DCFDA) (Sigma Aldrich). Это вещество проникает в клетку по механизму пассивной диффузии, где происходит отщепление ацетатных групп эстеразами, а образующийся в результате

дихлородигидрофлуоресцеин (H_2DCF) может вступать в реакцию с различными формами АФК, окисляясь до флуоресцирующей формы - дихлорофлуоресцеина (DCF) - с максимумом выхода флуоресценции при 520 нм. Таким образом, рост выхода флуоресценции на данной длине волны после световой инкубации обработанных клеток качественно отражает генерацию АФК в хлоропласте. Сначала клеточные суспензии в объеме 50 мл осаждались центрифугированием при 3000g в течение 5 мин, затем осадок ресуспендировали в таком же объеме 20 мМ трис-ацетатного буфера (pH 7.5). В суспензию добавляли 10 мкМ H_2DCFDA и инкубировали в полной темноте при комнатной температуре в течение 20 минут при постоянном перемешивании. Затем образцы отмывались от внеклеточного H_2DCFDA трис-ацетатным буфером путем трехкратного центрифугирования. После этого переносили клетки на среду TAP или TAP-S и инкубировали в 100 мл колбах в течение 20 минут при температуре 24°C в темноте, а затем в течение 30 мин на свету интенсивностью 100 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$. После этого с помощью спектрофотометра Fluorolog-3 (HORIBA Jobin Yvon Inc, Франция) измеряли интегральный выход флуоресценции в суспензии в диапазоне 517-527 нм при длине волны возбуждения 492 нм.

Для определения пероксида водорода в клетках микроводорослей использовали краситель 3,3 – диаминобензидин (DAB) (Sigma Aldrich), который является субстратом пероксидазы. В присутствии активной пероксидазы и пероксида водорода в клетке происходит окисление DAB, в ходе которого краситель меняет цвет на насыщенный красно-коричневый и окрашивает клетку. Сначала разливали суспензию клеток в количестве по 10 мл в 15 мл пробирки и добавляли по 1 мг DAB в каждую, закрывали пробирки и хорошо перемешивали содержимое. Затем образцы инкубировали на шейкере при температуре 24°C в темноте (контроль) или на свету интенсивностью 100 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$ в течение 30 мин. После этого осаждали клетки на стекловолоконных фильтрах (24 мм диаметр, величина пор 1.2 мкм, VWR). Для визуализации окрашивания клеток из них экстрагировались пигменты. Для этого погружали фильтры с осажденными клетками в 80% раствор этанола и выдерживали 10 мин при комнатной температуре в темноте, а затем высушивали.

Для определения общей антиоксидантной способности использовался метод восстановления железа (III) в водорастворимой фракции биологического образца. Метод основан на спектрофотометрическом определении образования комплекса между восстановленным железом (II) с 2,4,6-трипиредилтриазином по поглощению на длине волны 593 нм. Изначально метод был разработан для определения общей

антиоксидантной способности плазмы крови и модифицирован нами для измерений в очищенных клеточных экстрактах микроводорослей. Приготовление рабочих растворов и реакционной смеси, содержащей трипиредилтриазин, проводили в соответствии с прописями (Benzie and Strain 1996). К 3 мл реакционной смеси добавляли 50 мкл клеточных экстрактов с содержанием Хл 30 мкг мл⁻¹ и 350 мкл воды, выдерживали 10 мин в темноте при комнатной температуре и измеряли поглощение на длине волны 593 нм.

Определение активности каталазы проводилось по скорости разложения пероксида водорода, которую измеряли спектрофотометрически по изменению оптической плотности на длине волны 240 нм (Aebi 1984). Для этого разводили 200 мкл клеточного экстракта *C. reinhardtii* с содержанием Хл 30 мкг мл⁻¹ в 4.8 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.0) и разливали суспензию в две термостатируемые (37°C) кюветы спектрофотометра по 2 мл в каждую. Затем в кювету сравнения добавляли 1 мл калий-фосфатного буфера, а в опытный образец - 1 мл 30 мМ водного раствора перекиси водорода. Измерение величины OD₂₄₀ проводили через 10 и 20 секунд после добавления H₂O₂. Единица каталазной активности определялась как количество фермента, необходимого для разложения 1 мМ H₂O₂ в течение 1 мин. Расход H₂O₂ в присутствии каталазы вычисляли по изменению величины OD₂₄₀ с учетом коэффициента экстинкции (46.3 М⁻¹ см⁻¹) и нормировали на содержание белка в образце.

Активность супероксиддисмутазы в очищенных клеточных экстрактах *C. reinhardtii* определялась спектрофотометрически по торможению реакции окисления кверцитина в присутствии СОД (Костюк и др. 1990). Аутоокисление кверцитина в калий-фосфатном буфере при нейтральных и слабощелочных значениях рН ингибируется ЭДТА, а добавление в смесь кверцитина с ЭДТА тетраметилэтилендиамина (ТМЭДА) сдвигает рН до 10, индуцируя интенсивное аутоокисление кверцитина, которое сопровождается снижением поглощения при 406 нм. Данная реакция ингибируется в присутствии СОД. Аутоокисление кверцитина проводили при комнатной температуре в 15 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7.8), содержащем 15 мкМ кверцитина, 0.08 мМ ЭДТА и 4.3 мМ ТМЭДА. Для измерения активности СОД в кювету сравнения добавляли 1.55 мл 15 мМ калий-фосфатного буфера, 5 мкл 28 мМ ЭДТА, 50 мкл 48.5 мкМ кверцитина, а в опытный образец - 1.50 мл 15 мМ калий-фосфатного буфера, 5 мкл 28 мМ ЭДТА, 50 мкл 48.5 мкМ кверцитина и 50 мкл клеточного экстракта *C. reinhardtii*. Реакцию аутоокисления запускали добавлением в реакционную смесь 25 мкл 280 мМ ТМЭДА. Активность СОД рассчитывали по изменению оптической плотности при 406 нм и выражали в условных единицах активности на единицу содержания белка в анализируемом материале.

2.2.4. Определение скоростей фотосинтетического образования кислорода, электронного транспорта через ФС1 и 2, клеточного дыхания и хлордыхания

Для измерения скорости фотосинтетического выделения и темнового поглощения кислорода использовали кислородный электрод Кларка (установка Oxygraph Plus, Hansatech, Великобритания). Проба культуры микроводорослей объемом 1.0 мл с известной концентрацией Хл помещалась в термостатируемую ячейку с магнитной мешалкой при 25°C. Затем в темноте измеряли скорость поглощения кислорода, т.е. скорость клеточного дыхания. После этого добавляли NaHCO₃ в образец в конечной концентрации 5 mM, включали насыщающий свет от проектора с ПФПФ 1500 и измеряли скорость выделения кислорода на линейном участке. Затем определяли максимальную скорость фотосинтеза по разнице между скоростью светового выделения и темнового поглощения кислорода. Максимальная кислород-выделяющую активность ФС2 в клетках микроводорослей и тилакоидных мембранах растений оценивалась по скорости выделения кислорода на насыщающем свете в присутствии акцепторов электронов: 0.5 mM 2,6 – дихлоро – 1, 4 - бензохинона (DCBQ) и 0.5 mM феррицианида калия (FeCy). Скорость хлордыхания в темноте (активность РТОХ) в клетках микроводорослей определялась по скорости темнового поглощения кислорода в присутствии ингибиторов митохондриального дыхания: 2 μM миксатиазола и 0.9 mM СГ.

Максимальную скорость электронного транспорта через ФС2 определяли в препаратах тилакоидных мембран из микроводорослей и растений по скорости восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) на насыщающем свете. Для этого суспендировали тилакоиды в реакционной смеси объемом 2 мл, содержащей 25 mM Трис (рН 7.2), 400 mM сахарозы, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ и 50 мкМ ДХФИФ. Конечная концентрация Хл в смеси составляла 5 мкг мл⁻¹. Фотовосстановление ДХФИФ проводилось на насыщающем свете интенсивностью 1500 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ в течение 2 мин. Количество восстановленного ДХФИФ определялось спектрофотометрически по изменению поглощения на длине волны 600 нм с использованием коэффициент экстинкции 21 mM⁻¹ см⁻¹. Скорость нефотохимического восстановления ПХ пула (активность НДГ2) в препаратах тилакоидных мембран микроводорослей оценивалась по темновому восстановлению ДХФИФ в присутствии 0.5 mM НАДФН и 0.5 mM НАДН в течение 5 мин. Максимальная скорость электронного транспорта через ФС1 в препаратах тилакоидных мембран из листьев растений определялась по скорости поглощения кислорода на насыщающем свете в присутствии

100 мкМ восстановленного ДХФИФ (ДХФИФ·Н₂) и 10 мкМ метилвиологена (Curtis et al. 1975). Для определения скорости поглощения кислорода использовали кислородный электрод Кларка.

2.2.5. Газовая хроматография и определение гидрогеназной активности

Для измерения концентрации водорода, кислорода и азота в газовой фазе закрытого культиватора использовался, в основном, газовый хроматограф Газохром – 2000 (Хром, Россия) с использованием детектора теплопроводности и аргона в качестве несущего газа. Часть измерений проводилась на газовом хроматографе Clarus 500 (PerkinElmer Inc, США), также оборудованном детектором теплопроводности и использующим аргон в качестве несущего газа. Для анализа газа отбирали пробы по 200 мкл с использованием газонепроницаемого шприца Гамильтона (Hamilton, США) и вводили в колонку газового хроматографа. Содержание водорода в газовой фазе находили по формуле, отражающей зависимость между концентрацией водорода и характеристиками (амплитудой или площадью) водородного пика на хроматограмме. Для калибровки прибора по водороду использовали образцы газовой смеси с содержанием водорода в количестве 0,2, 1 и 3% от общего объема. Для калибровки прибора по кислороду и азоту использовались образцы воздуха.

Гидрогеназную активность определяли в лизате клеток *C. reinhardtii* как скорость темнового выделения водорода в присутствии восстановленного метилвиологена, который является эффективным донором электронов для FeFe-гидрогеназы (Zorin et al. 1996). Сначала в затемненные фольгой флаконы объемом 14 мл последовательно вносили 0,75 мл 50 мМ фосфатного буфера (рН 6,9), 0,25 мл 40 мМ метилвиологена и 0,2% (по объему) Тритона X100; последний использовался для разрушения клеток микроводорослей. Затем закрывали флаконы и продували аргоном в течение 20 мин в темноте. С помощью продутого аргоном стеклянного шприца герметично отбирали образец суспензии микроводорослей в объеме 1 мл и вводили, протыкая пробку иглой, во флакон с реакционной смесью. После этого дополнительно продували газовую фазу флакона аргоном в течение 5 мин для удаления остатков кислорода. Гидрогеназную реакцию инициировали путем добавления шприцом к содержимому флаконов 100 мкл 100 мМ раствора дитионита натрия, приготовленного с соблюдением анаэробных условий. После этого флаконы инкубировались на термостатируемом шейкере при скорости качания 120 об мин⁻¹ и 30°C в темноте. Через определённые промежутки времени газовым

шприцом отбирали 200 мкл пробы из газовой фазы и определяли в них содержание водорода при помощи газового хроматографа. Активность гидрогеназы рассчитывали на линейном участке роста содержания водорода во времени и выражали в мкмоль водорода на мг Хл в час.

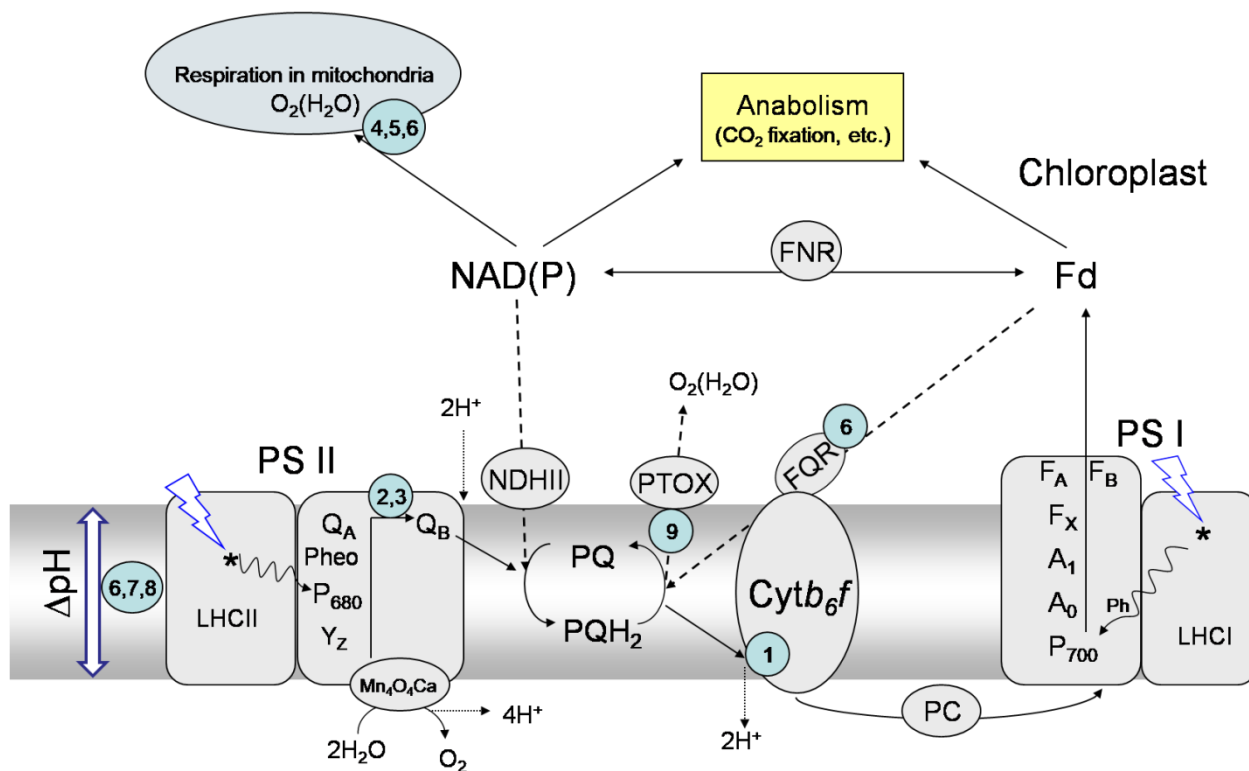


Рис. 2.2. Схема основных путей электронного транспорта в хлоропласте *C. reinhardtii* с указанием сайтов действия использованных в работе протонифоров и ингибиторов фотосинтеза и дыхания.

1 – ДБТХ, 2 – диурон, 3 – атразин, 4 – миксотиазол, 5 – СГ, 6 – антимицин А, 7 – FCCP, 8 – нигерицин, 9 – пропилгаллат.

2.2.6. Ингибиторный анализ

Для изучения путей электронного транспорта, связанных с фотообразованием водорода, в голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* использовали ингибиторный анализ. Для этого культуры микроводорослей инкубировали без серы 48 ч в закрытом 1.5 л культиваторе на свету интенсивностью $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. После инкубации разливали суспензию голодающих клеток в 14 мл стеклянные флаконы, закрывали газонепроницаемыми пробками и продували аргоном в темноте течение 20 мин. Затем выдерживали образцы в темноте на шейкере в течение 2х часов при комнатной

температуре, вновь продували аргоном для удаления водорода и остатков кислорода, и вводили шприцом растворы ингибиторов электронного транспорта и протонифоров в количестве менее 1% от объема суспензии во флаконе. После этого обработанные и контрольные образцы инкубировались 2 ч на шейкере при температуре 25°C и интенсивности света 40 мкмоль м⁻² с⁻¹, после чего проводились измерения содержания водорода в газовой фазе с использованием газового хроматографа. В работе были использованы следующие реагенты и их конечные концентрации: 6×10⁻⁶ М ДБТХ, 2×10⁻⁵ М диурина, 2×10⁻⁵ М атразина, 2×10⁻⁶ М миксотиазола, 9×10⁻⁴ М СГ, 4×10⁻⁶ М антимицина А, 8×10⁻⁷ FCCP, 10⁻⁷ М нигерицина и 10⁻³ М пропилгаллата. Мишени действия использованных реагентов в клетке *C. reinhardtii* показаны на рис. 2.2.

2.2.7. Измерение параметров ФХ методом амплитудно-импульсной модуляции

Измерения параметров ФХ в суспензиях микроводорослей, регистрация кривых индукции фотохимического и нефотохимического тушения, а также непрерывный мониторинг состояния культуры в закрытых сосудах проводились с помощью флуориметра PAM-2000 (Walz, Германия). Для измерения световых кривых электронного транспорта и световых кривых фотохимического и нефотохимического тушения в суспензиях микроводорослей использовали прибор WaterPAM (Walz, Германия). Параметры ФХ в листьях растений, включая индукционные и световые кривые, измерялись на флуориметре PAM-101 (Walz, Германия).

Для возбуждения ФХ в PAM флуориметрах используются слабые модулированные световые импульсы интенсивностью 0.1 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ и длительностью 3 мкс при основной частоте 600 Гц. В ходе экспериментов регистрировали следующие базовые параметры ФХ: 1) минимальный выход ФХ в адаптированных к темноте образцах (F_0); 2) максимальный выход ФХ в адаптированных к темноте образцах (F_m), измеряемый на фоне действия мощной насыщающей вспышки света с ПФПФ 1000-5000 и длительностью 0.8-1.0 с; 3) выход ФХ на постоянном (актиничном) свете (F_t); 4) максимальный выход флуоресценции на постоянном свете (F_m'); 5) минимальный выход ФХ в адаптированных к свету образцах (F_0'). Последний параметр определялся после выключения актиничного света и освещения образца 2 с импульсом дальнего красного света (>700 нм) для окисления Qa[•]. На основании этих базовых показателей определялись параметры ФХ, характеризующие функциональные свойства ППФ (Shreiber et al. 1995, 2004). Так, эффективность фотохимического преобразования энергии в ФС2 (фотохимическая

активность ФС2) рассчитывалась по формуле $Fv/Fm=(Fm-Fo)/Fm$ для адаптированных к темноте образцов и по формуле $\Delta F/Fm'=(Fm'-Ft)/Fm'$ для образцов на свету. Фотохимическое (qP) и нефотохимическое (NPQ) тушение определялись по формулам $(Fm'-Ft)/(Fm'-Fo')$ и $(Fm-Fm')/Fm'$, соответственно. Скорость фотосинтетического нециклического электронного транспорта (ETR) находилась по формуле: $ETR=Yield \times \Phi AP \times 0.5 \times ETR \text{ factor}$, где $Yield=\Delta F/Fm'$, $\Phi AP=ПФПФ$, фактор 0.5 учитывает тот факт, что около 50% всего поглощенного света приходится на ФС2, а ETR-фактор указывает на долю поглощенного образцом света.

Регистрацию темновых параметров ФХ (Fo , Fm , Fv/Fm), индукционных и световых кривых проводили на образцах, выдержанных в темноте 3-5 мин для релаксации быстрой фазы NPQ. Индукционные и световые кривые измеряли согласно стандартным процедурам приборов. При измерениях на РАМ2000 концентрация клеток микроводорослей составляла 5-6 млн кл мл⁻¹ и более, и суспензии постоянно перемешивались. При измерениях на WaterРАМ суспензии с концентрацией клеток 5-6 млн мл⁻¹ разводились в 1000 раз супернатантом, полученным из той же культуры. Затем адаптировали образцы к разведению в течение 30 мин на низком свету, после чего проводили измерения.

Прибор РАМ2000 использовался для проведения неинвазивных, то есть без отбора проб, измерений ФХ в герметично закрытых флаконах, в том числе в анаэробных условиях. Для этого помещали флаконы на 3 мин в темноту на шейкер, а затем измеряли параметры ФХ Fo , Fm и Fv/Fm , прижимая плотно к стеклу измерительный конец световода прибора. Для проведения длительного мониторинга состояния культуры в закрытом фотобиореакторе на постоянном свету световод прибора фиксировался вплотную к стенке сосуда, а затем включался режим автоматической регистрации и записи в компьютер параметров Fm' , Ft и $Yield$ с частотой 3, 6 или более измерений в час.

2.2.8. Регистрация и анализ кривых световой индукции ФХ

Кинетики световой индукции ФХ, измеренные при высокой интенсивности возбуждающего света и с высоким временным разрешением, представляют собой в логарифмическом масштабе времени трехэтапную кривую роста ФХ от минимального значения в адаптированных к темноте образцах (O , Fo) до максимального значения (P , Fm) через промежуточные точки перегиба J и I (рис. 2.3). В настоящей работе регистрация ОIР кривых проводилась в культурах микроводорослей *C. reinhardtii* с помощью приборов HandyPEA и MPEA2 (Hansatech, Великобритания). Рост ФХ индуцировался

красным светом ($\lambda=650$ нм) интенсивностью 2000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, если не указана другая интенсивность. Флуоресценция регистрировалась в области >700 нм с временным разрешением 10 мкс в течение первых 2 мс, 1 мс в интервале времени 2 мс – 1 с и 100 мс в интервале времени >1 с. Сигналы ФХ, измеренные в течение первых 40 мкс после включения света, исключались из кривой, поскольку в этой области возможны артефакты технического характера. За величину F_0 принимали сигнал ФХ через 50 мкс после включения возбуждающего света.

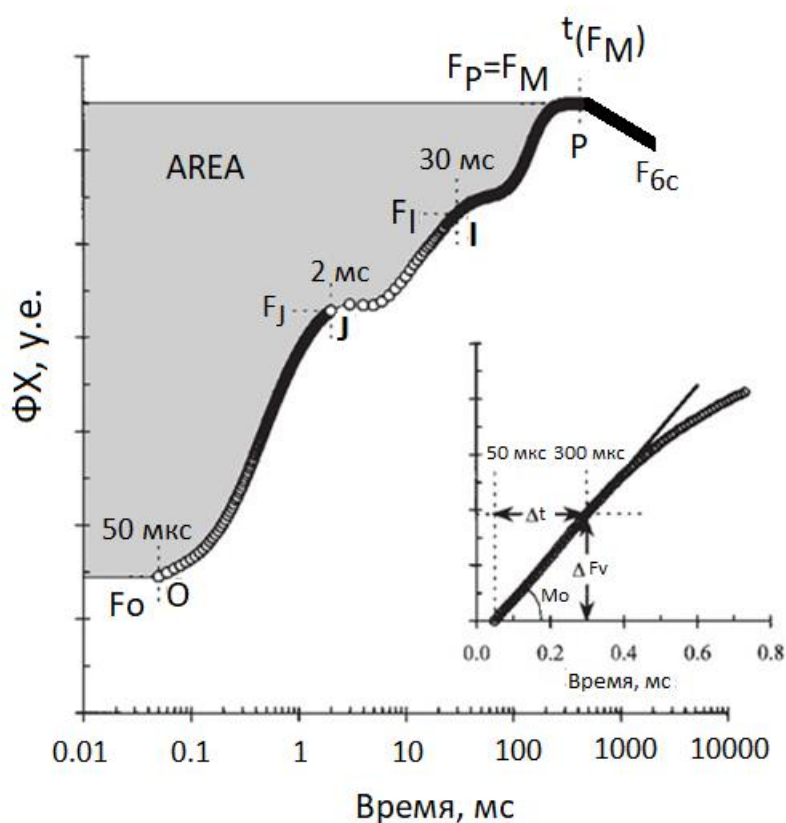


Рис. 2.3. ОЛР кривая и основные параметры кривой, используемые для расчета параметров ЛР теста.

Максимальный выход ФХ на ОЛР кривой (F_P) может быть достигнут при полном восстановлении переносчиков фотосинтетической ЭТЦ, что возможно только в условиях темновой инактивации ферментов цикла Кальвина. Поэтому перед измерениями ОЛР кривых образцы микроводорослей выдерживались как минимум 5 мин в темноте. Измерения в суспензиях клеток проводили на приборе HandyPEA, оборудованном кюветным отделением, при концентрации клеток $3-6$ млн мл^{-1} . Прибор MPEA2 разработан для одновременной регистрации световой индукции быстрой и замедленной ФХ, а также

светоиндуцированных редокс переходов P_{700} в ФС1 на листьях растений, поэтому измерения на микроводорослях проводились после предварительного осаждения клеток на стекловолоконных фильтрах с использованием вакуумного насоса и 5 мин инкубации в темноте.

Анализ функциональных характеристик ППФ по параметрам ОЛР кривой проводился с помощью так называемого ЛР-теста, основанного на теории энергетических потоков в тилакоидной мембране и позволяющего определять ряд феноменологических и биофизических, структурных и функциональных параметров ФС2 (Strasser et al. 2004). Эта теория сформулирована в общем виде и может быть применена к любому растительному или водорослевому организму. В таблице 2.1 приведены ключевые параметры ОЛР кривых (см. также рис. 2.3) и список отдельных параметров ЛР-теста, использованных в данной работе.

Таблица 2.1. Список параметров ОЛР кривой и отдельных параметров ЛР-теста, использованных в настоящей работе.

Параметры ОЛР кривой	
F_O	Интенсивность ФХ при 50 мкс. Минимальный выход ФХ
F_J	Интенсивность ФХ при 2 мс
F_I	Интенсивность ФХ при 30 мс
$F_P (=F_M)$	Интенсивность ФХ на пике Р. Максимальный выход ФХ
$F_{300\text{мкс}}$	Интенсивность флуоресценции при 300 мкс
$F_{6\text{с}}$	Интенсивность флуоресценции при 6 с
$t_{(FM)}$	Время (мс) достижения F_M
Area	Площадь между ОЛР кривой и уровнем F_M
Параметры ЛР-теста	
$F_V = F_M - F_O$	Максимальная переменная ФХ

$V_J=(F_J-F_O)/F_V$	Относительная амплитуда ОJ фазы
$M_O=4 \times (F_{300мс}-F_O)/F_V$	Аппроксимация начального наклона кривой
$S_M=(Area)/F_V$	Нормированная площадь над ОJIP кривой, отражающая количество восстановлений Qa за время $t_{(FM)}$
$TR_O/ABS = F_V/F_M$	Максимальная фотохимическая активность ФС2
$ET_O/TR_O = (1 - V_J)$	Вероятность переноса электрона с Qa ⁻ в ПХ пул
$ET_O/ABS= F_V/F_M \times (1-V_J)$	Квантовый выход электронного транспорта в ФС2
$q_E=(F_M-F_{6s})/F_V$	Способность к индукции энергозависимого компонента NPQ

Для высокого разрешения начальной стадии кривой индукции ФХ (< 1 мс) в клетках микроводорослей использовался флуориметр МЕГА-25, сконструированный на кафедре биофизики биологического факультета МГУ для работы с естественными концентрациями фитопланктона (Погосян и др. 2009). В этом приборе в качестве источников света используются два синих светодиода мощностью 700 мВт (LXHL PR02 Royal Blue 455 nm, Luxeon, Lumileds, США), а детектором сигнала служит фотоумножитель R7400U-20 (Hamamatsu, Япония), питание которого обеспечивается высоковольтным источником С4900-01 (Hamamatsu, Япония). Перед детектором установлен длинноволновой фильтр КС18, пропускающий волны длиннее 680 нм. В наших экспериментах рост ФХ в субмиллисекундном диапазоне в суспензии клеток *C. reinhardtii* индуцировался мощным световым импульсом интенсивностью 12000 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ длительностью 700 мкс. В процессе освещения прибор регистрировал сигнал ФХ через каждые 0.75 мкс, что обеспечивает высокое временное разрешение кинетической кривой. Поскольку прибор предназначен для работы с естественными концентрациями фитопланктона, то предварительно суспензии *C. reinhardtii*, содержащие 5-6 млн кл мл⁻¹, разводились в 200-300 раз средой и выдерживались на низком свете в течение 30 мин. Субмиллисекундную фазу индукции ФХ аппроксимировали функцией, содержащей сигмоидный и экспоненциальный компоненты (Joly and Carpentier 2009), которые отражают вклад центров ФС2 α и β типа, соответственно:

$$Fl(t)=A_{\alpha} \times (1-\exp(-t/\tau_{\alpha}))^c + A_{\beta} \times (1-\exp(-t/\tau_{\beta})) \quad (2)$$

где c – коэффициент сигмоидности.

2.2.9. Измерение кинетических кривых реокисления Qa^-

Кривые темновой релаксации ФХ во временном диапазоне от сотен микросекунд до секунд регистрировались на флуориметре FL3500 (PSI Instruments, Чехия) при выборе протокола измерения кинетики реокисления Qa^- . Прибор предназначен для проведения измерений ФХ в суспензиях водорослевых и цианобактериальных клеток, а также в суспензиях субклеточных фотосинтетических препаратов. Измерительная камера прибора оборудована кюветным отделением с возможностью перемешивания и термостатирования образцов. В наших экспериментах в измерительную кювету объемом 4 мл добавляли 1 мл суспензии водорослевых клеток с концентрацией Хл около 20 мкг мл⁻¹ или 1 мл суспензии тилакоидных мембран из листьев растений с концентрацией Хл 10 мкг мл⁻¹. Затем помещали кювету в измерительную камеру, выдерживали в темноте в течение 5 мин при постоянном перемешивании и температуре 24°C и включали измерение. Согласно протоколу измерения сначала образец освещается короткой насыщающей вспышкой света (20 мкс, $\lambda=630$ нм), индуцирующей однократное срабатывание центров ФС2 и восстановление Qa ; при этом Qb и ПХ пул остаются преимущественно в окисленном состоянии. Переход Qa в восстановленное состояние сопровождается ростом выхода ФХ. После этого зондируется изменение выхода ФХ в темноте от уровня, регистрируемого через 100 мкс после вспышки, до минимального уровня (F_0) через 60-100 с после вспышки. Зондирование выхода ФХ производится на разных временных интервалах путем возбуждения ФХ слабыми импульсами света (3 мкс, $\lambda=617$ нм). Измеренная кинетическая кривая темновой релаксации ФХ отражает пути ре-окисления Qa^- и содержит три – четыре экспоненциальных компонента (Vass et al. 1999). Кинетики затухания ФХ анализировались путем аппроксимации функцией, включающей три или четыре экспоненциальных компонента:

$$F(t) - F_0 = \sum (A_i \times \exp(-t/\tau_i)) \quad (3)$$

где t – временной масштаб кривой, варьирующий от 100 мкс до 100 с, $(F(t) - F_0)$ – величина переменной ФХ в момент времени t , i – номер соответствующего компонента, A_i и τ_i – амплитуда и время затухания соответствующего компонента.

2.2.10. Регистрация светоиндуцированных редокс переходов P_{700} в ФС1

Измерения редокс переходов первичного донора электронов P_{700} в ФС1 проводились с использованием приборов РАМ101 и МРЕА2 на суспензиях микроводорослей и спектрометра JTS-10 (Bio-Logic, Франция) на листьях растений. Оптические методы оценки редокс состояния P_{700} основаны на изменении световой абсорбции/пропускания/отражения на длинах волн 810-820 нм и 700-705 нм при переходе P_{700} в окисленную форму P_{700}^+ .

Для измерения кинетики светового окисления P_{700} и последующего темнового восстановления P_{700}^+ в клетках микроводорослей использовали прибор РАМ-101, оборудованный эмиттер-детекторным блоком ED-P700DW. Редокс состояние P_{700} в данном приборе оценивается по разности оптического пропускания препаратов на длинах волн 810 нм и 870 нм (сигнал ΔA_{810}). Дифференциальный двухволновый режим измерений снижает вклад абсорбционных изменений пластоцианина и других переносчиков электронов в детектируемый сигнал (Schreiber et al. 1988). Окисление P_{700} индуцировали белым светом интенсивностью 2000 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$, источником которого служила галогеновая лампа KL-1500 (Schott, Германия). Поскольку прибор адаптирован для проведения измерений на листьях, то предварительно клетки микроводорослей осаждались на стекловолоконных фильтрах. В работе использовали следующий экспериментальный протокол. Сначала обрабатывали суспензию с концентрацией клеток 5-6 млн $мл^{-1}$ диуроном в концентрации 20 мкМ для блокировки электронного транспорта с ФС2 на ФС1. Затем осаждали 2 мл суспензии на фильтре на низком свете и выдерживали 3 мин в темноте. После этого подводили измерительный конец световода прибора вплотную к поверхности фильтра с клетками и проводили измерение.

Для разрешения быстрой фазы (<10 мс) светоиндуцированного окисления P_{700} в клетках микроводорослей использовали прибор МРЕА2. Регистрация редокс состояния P_{700} в МРЕА2 осуществляется по фотоиндуцированному изменению отражения света на длине волны 820 нм с использованием принципа амплитудной модуляции. Регистрируемые в процессе световой индукции фотосинтеза изменения модулированного сигнала на длине волны 820 нм (MR) нормируются на начальный уровень (MR_0), измеренный через 0.7 мс после начала освещения.

Измерения редокс переходов P_{700} и Пц в хлоропластах листьев проводились на спектрометре JTS-10 (Joliot and Joliot 2005). Редокс переходы P_{700} в приборе оцениваются по изменению поглощения на длине волны 705 нм, а пластоцианина – на длине волны 735

нм. Перед измерениями листья адаптировались к темноте на влажной подложке в течение 2 ч, затем помещались в измерительную камеру прибора и освещались 20 с белым светом интенсивностью $200 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ для индукции линейного электронного транспорта. После этого выдерживали листья в темноте 20 с и проводили измерение. В ходе измерений для окисления P_{700} и Пц использовался мощный 6 с импульс дальнего красного света интенсивностью $2500 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ с максимумом при 720 нм, который избирательно возбуждает ФС1. После отключения импульса дальнего красного света производилось измерение темнового восстановления P_{700}^+ и Пц в течение 12 с.

2.2.11. Измерение кинетических кривых ФХ в фотобиореакторе

Разработка высокоэффективных фотобиореакторов, оборудованных автоматическими системами неинвазивного мониторинга физиологического состояния культуры в режиме реального времени, является актуальным направлением в биотехнологии микроводорослей. В связи с этим на кафедре биофизики биологического факультета МГУ был разработан и испытан флуориметр SMART, позволяющий проводить измерения кинетических кривых индукции (ОЛР) и темновой релаксации ФХ (кинетики реокисления Qa^-) непосредственно в закрытом фотобиореакторе (Antal, Konyukhov et al. 2018). Анализ кинетических кривых ФХ проводили с помощью метода спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (МЭА) на программном обеспечении ruPhotoSyn, которые также разработаны на кафедре биофизики (Плюснина и др. 2015).

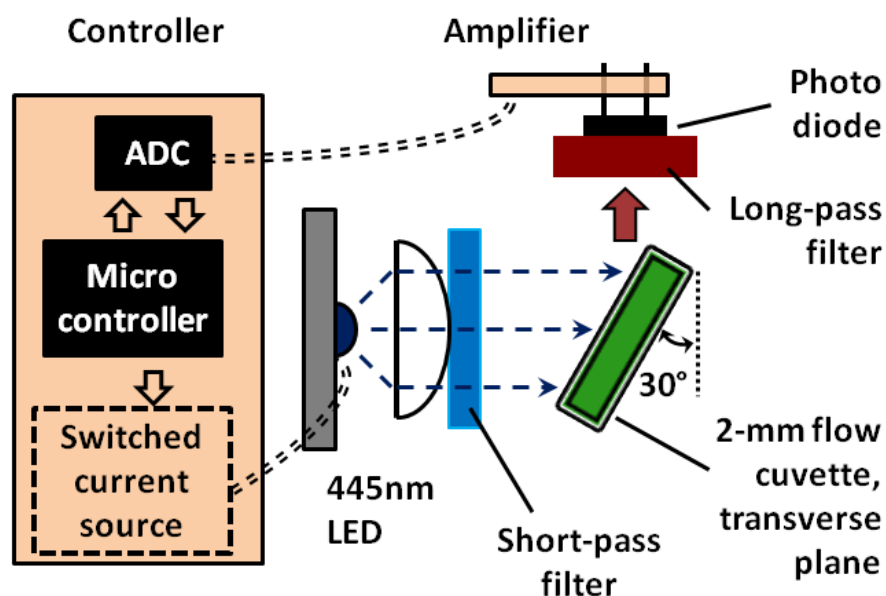


Рис. 2.4. Блок-схема флуориметра SMART (из Antal, Konyukhov et al. 2018).

Блок-схема прибора Smart показана на рис. 2.4. Измерительная камера флуориметра содержит источник света, детектор ФХ и проточную кювету, соединенную с фотобиореактором герметичным образом с помощью эластичных трубок. Синий светодиод с максимумом излучения при 445 нм генерирует как мощные насыщающие световые импульсы с ПФПФ 5000 продолжительностью от 250 мкс до 10 с, так и короткие импульсы продолжительностью 1.66 мкс. Дополнительно возбуждающий свет пропускается через коротковолновый фильтр SZS-22 с отсечением волн длиннее 560 нм. Образцы культуры автоматически поступают в стеклянную кювету, конструкция которой характеризуется коротким (2 мм) оптическим путем, что позволяет редуцировать эффекты затенения в плотной культуре и реабсорбцию ФХ. Сигнал флуоресценции детектируется фотодиодом BPW34 (Visha, США) после прохождения через длинноволновый светофильтр RG645, пропускающий фотоны длиннее 670 нм. Сигнал фотопотока направляется в трансимпедансный умножитель (2 МОм), а выходное напряжение поступает в 16 битный аналого-цифровой преобразователь и направляется в микроконтроллер (ATmega128, Atmel, США). При измерениях ОЖР кривых запись первой точки происходит через 1.66 мкс после начала освещения, и в течение первой миллисекунды измеряется 200 точек. При измерении кривой релаксации ФХ начальный рост ФХ индуцируется мощной вспышкой света, длительность которой составляет 250 мкс. Первая точка на кривой затухания ФХ измеряется через 56 мкс после вспышки, частота измерений составляет четыре точки на каждую декаду, а максимальная продолжительность измерения - 10 с. Прибор позволяет проводить достоверные измерения в широком диапазоне концентраций Хл от 0.01 до 100 мкг мл⁻¹, то есть с момента инокуляции до поздних стадий культивации. При каждом измерении образец поступает из культиватора в измерительную камеру прибора через подводящую трубку с помощью перистальтического насоса. Одновременно с этим отработанный образец выводится из камеры обратно в культиватор. Поступивший образец выдерживается в измерительной камере прибора в полной темноте в течение 3 мин, после чего производится либо измерение ОЖР кривой, либо кривой затухания, которые регистрируются поочередно. Оригинальное программное обеспечение позволяет управлять настройками и протоколами измерения с компьютера. Данные автоматически поступают с прибора в компьютер после каждого измерения, анализируются и выводятся на экран в виде графиков в режиме реального времени.

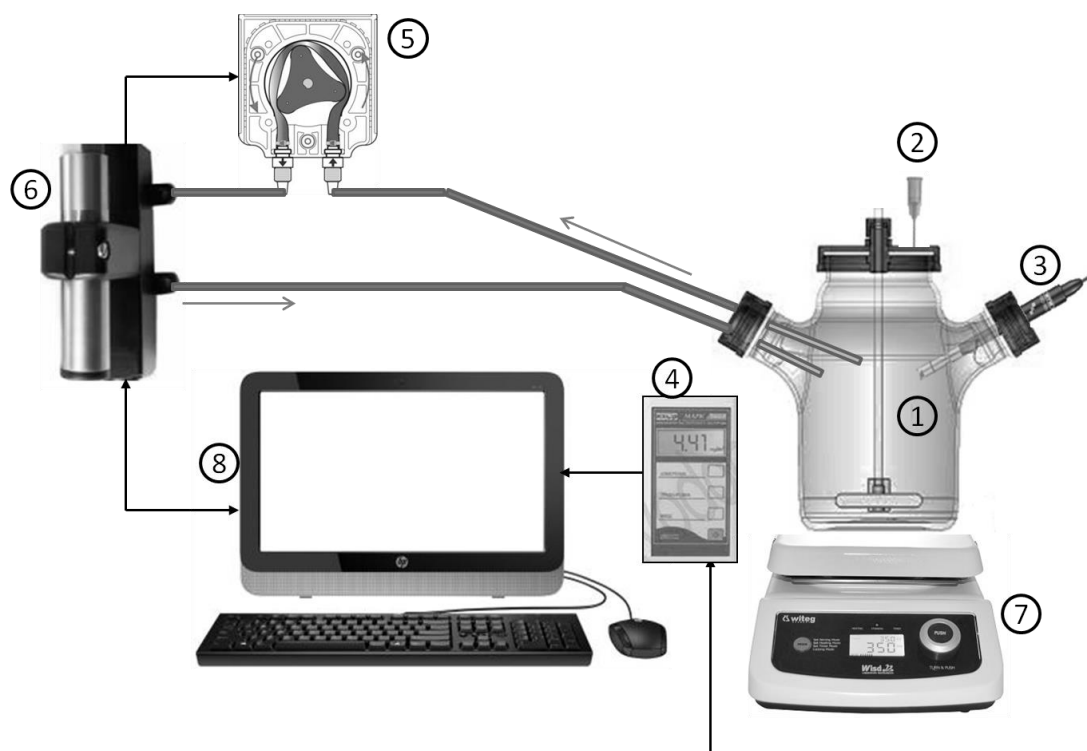


Рис. 2.5. Схема экспериментальной установки для измерения кривых ФХ и концентрации растворенного кислорода.

1 – трехгорлый культиватор; 2 – игла для выравнивания давления; 3 и 4 – кислородный электрод и его контроллер, соответственно; 5 – перистальтический насос; 6 – флуориметр SMART; 7 – магнитная мешалка; 8 – компьютер.

В данной работе флуориметр SMART использовался для исследования фотосинтетических характеристик культуры *C. reinhardtii* при инкубации без серы в закрытом культиваторе, когда культура самопроизвольно переходит в анаэробноз. На рис. 2.5 показано схематическое изображение экспериментальной установки для измерения кинетических кривых индукции и затухания ФХ и содержания O_2 в культиваторе. Один литр отмытой от серы культуры *C. reinhardtii* с концентрацией клеток 4 млн кл мл^{-1} помещался в трехгорлый культиватор Biogen (Witeg, Германия). Кислородный электрод (MARK302, VZOR, Россия) фиксировался в боковой горловине с помощью каучуковых прокладок и герметика. Электрод подсоединялся к управляющему контроллеру, а контроллер – к компьютеру. Входное и выходное отверстие кюветы в измерительной камере SMART герметично соединялось с культиватором через газо-светонепроницаемые гибкие трубки длиной 30 см и диаметром 3 мм. Концы трубок погружались в культуру через вторую боковую горловину культиватора, а отверстие горловины

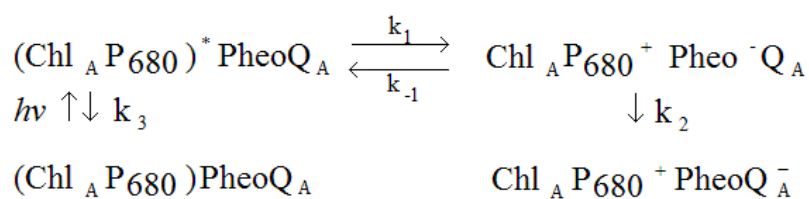
герметизировалось. Центральная горловина культиватора закрывалась герметичной крышкой с эластичной прокладкой. После этого подключали прибор к компьютеру. Культивация без серы проводилась на свету интенсивностью $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ при комнатной температуре ($22\text{-}24^\circ\text{C}$) и постоянном перемешивании в течение 96 ч. Периодически резиновую прокладку центральной крышки культиватора протыкали иглой для выравнивания давления между газовой фазой культиватора и атмосферой. После подсоединения устройств к компьютеру включался режим автоматического измерения кривых ФХ и данных по содержанию растворенного кислорода в культуре. Кривые ФХ регистрировались в автоматическом режиме с частотой раз в 3 мин в течение всего периода инкубации без серы. При измерении показателей кислородного электрода контроллер обеспечивал автоматическое поступление сигнала в компьютер каждые 30 с.

2.2.12. Измерение и анализ кривых затухания ФХ в наносекундном диапазоне

Для регистрации кинетики затухания ФХ в пико-наносекундном диапазоне использовали импульсный флуориметр, разработанный на кафедре биофизики биологического факультета МГУ (Paschenko et al. 2000). В приборе детектором служит электронно-оптическая камера с пикосекундным временным разрешением (Агат, СФЗ, Россия), соединенная с мультисканальным матричным детектором С7041 (Hamamatsu, Япония). Источником света является пикосекундный Nd : YAG-лазер с импульсной диодной накачкой и электрооптическим управлением генерацией с использованием активно-пассивной синхронизации мод, что позволяет генерировать импульсы длительностью 20 пс с энергией до 0.5 мДж и максимальной частотой 100 Гц.

Измерения проводились в суспензии микроводорослей с концентрацией клеток 5-6 млн мл^{-1} . В некоторых экспериментах искусственно восстанавливали Qa, для чего помещали водорослевые клетки в герметичную кювету и продували аргоном в течение 15 мин на низком свете. Для увеличения соотношения сигнал/шум регистрировали 20-40 кривых и усредняли их. Кинетические кривые затухания ФХ анализировались в трехэкспоненциальном приближении, допуская, что быстрый компонент отражает миграцию энергии из антенны в реакционный центр, средний - первичное разделение и рекомбинацию зарядов, а медленный компонент связан с антенными комплексами, у которых отсутствует энергетическое взаимодействие с центрами ФС2. Также в работе проводили симуляцию экспериментальных кривых с использованием модели обратимой радикальной пары Шатца (Shatz et al. 1988). Схема модели приведена на рис. 2.6 (из Volgusheva et al. 2007).

Open PS 2



Closed PS 2

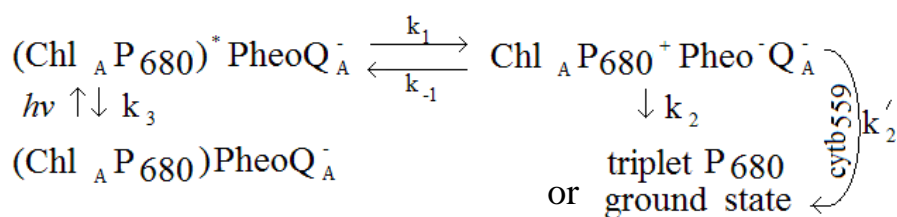


Рис. 2.6. Схема реакций в открытых и закрытых центрах ФС2 согласно модели Шатца (Shatz et al. 1988).

$(\text{Chl}_A \text{P}680)^*$ - равновесное состояние между возбуждением в антенне и $\text{P}680$; k_1 и k_{-1} – константы скоростей первичного разделения и рекомбинации зарядов с последующей генерацией синглетного возбужденного состояния $\text{P}680$; k_2 – константа скорости переноса электрона с Pheo^- на Q_A в открытом центре ФС2 или константа скорости рекомбинации зарядов в триплетное или основное состояние $\text{P}680$ в закрытом центре; k_3 – константа скорости нефотохимической дезактивации синглетного состояния Хл.

2.2.13. Регистрация термолюминесценции

Пики термолюминесценции ‘Q’ и ‘B’ регистрировались в суспензиях клеток микроводорослей и в препаратах тилакоидных мембран из листьев растений с использованием самодельного люминометра (Tuustjärvi et al. 2009). Сначала образцы с содержанием хлорофилла 15 мкг мл^{-1} выдерживались в темноте 5 мин в присутствии 20 мкМ диурона при измерении пика ‘Q’ или в темноте без ингибитора при измерении пика ‘B’. Затем клетки или мембраны осаждались на стекловолоконном фильтре (Wattman или VWR); фильтр помещался в светонепроницаемую измерительную камеру прибора, где образец замораживался при -10°C с помощью термоэлектрического преобразователя на основе элементов Пелтье. После этого освещали образец коротким (20 мкс) мощным световым импульсом, индуцирующим однократное срабатывание центров ФС2. При этом в замороженных образцах, обработанных диуроном, разделенные заряды стабилизируются, в основном, в состоянии ФС2 S_2Q_A^- , а в необработанных – в состоянии S_2Q_B^- (см. рис. 2.7). После этого включался нагрев образца со скоростью 1°C c^{-1} и

проводилось измерение сигнала люминесценции с помощью фотоумножителя. Нагрев образца приводит к появлению полос свечения в результате термоиндуцированного перехода из состояния S_2Qa^-Qb (пик 'Q') или S_2QaQb^- (пик 'B') в основное состояние S_1QaQb по непрямому излучательному пути. Температура T_m , при которой пик термолюминесценции достигает максимума, характеризует величину энергии активации соответствующей реакции рекомбинации. Как известно, термолюминесценция возникает в случае, если рекомбинация зарядов протекает через промежуточное восстановление Фео с последующим переносом электрона на P_{680}^+ и формированием синглетного состояния P_{680} (рис. 2.7). Прямая рекомбинация зарядов путем туннелирования электрона с Qa^- на P_{680}^+ , а также рекомбинация между P_{680}^+ и $Фео^-$ с образованием триплетного состояния $^3P_{680}$ конкурируют с упомянутым путем и, таким образом, тушат термолюминесценцию. Необходимо отметить, что рекомбинация зарядов в паре S_2Qa^- или S_2Qb^- является поэтапным процессом, включающим обратный перенос положительного заряда с КВК на P_{680} ($S_2P_{680} \rightarrow S_1P_{680}^+$) и последующее восстановление P_{680}^+ электроном с акцепторной стороны ФС2 (Tuustjärvi and Vass 2004, Маторин и Рубин 2014).

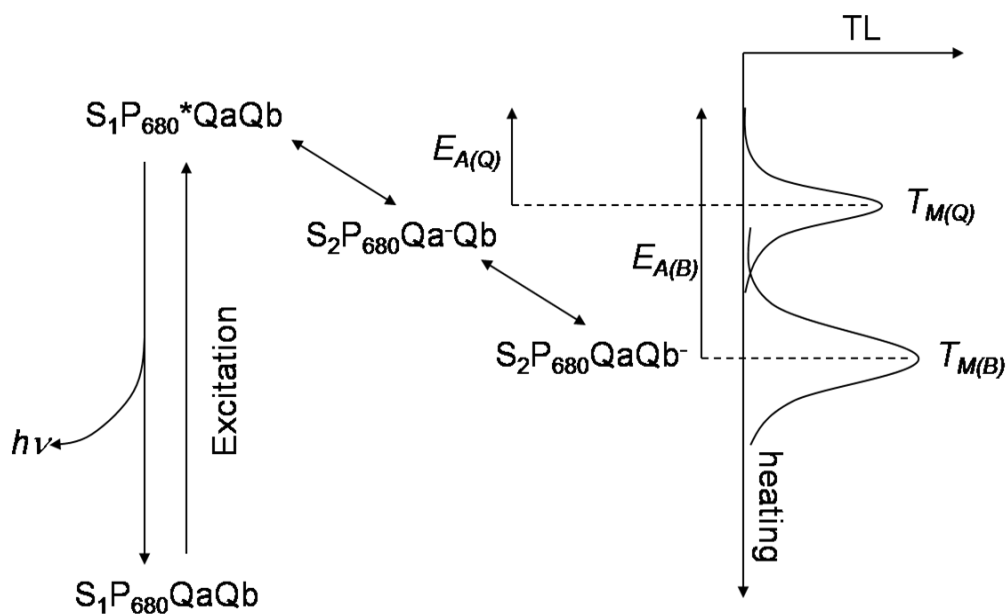


Рис. 2.7. Схематическое изображение механизма формирования пиков 'Q' и 'B' на кривых термолюминесценции.

2.2.14. Измерение спектров испускания ФХ

Низкотемпературные (77К) спектры испускания ФХ регистрировались на клеточных экстрактах из листьев растений и в клетках микроводорослей с использованием

спектрометра USB4000 (Ocean Optics, Eerbeek, Нидерланды) (схема установки приведена на рис. 2.8). Флуоресценция возбуждалась светом галогеновой лампы от стандартного проектора после прохождения через коротковолновый фильтр, пропускающий волны короче 500 нм (Corion, Newport Corp., США). Перед измерением образец суспензии клеток или клеточных экстрактов объемом 20 мкл и с содержанием Хл около 10 мкг мл⁻¹ помещался на дно 2 мл пробирки и замораживался в жидком азоте. У поверхности образца фиксировался измерительный конец световода, а другие концы были посажены к источнику света и спектрометру.

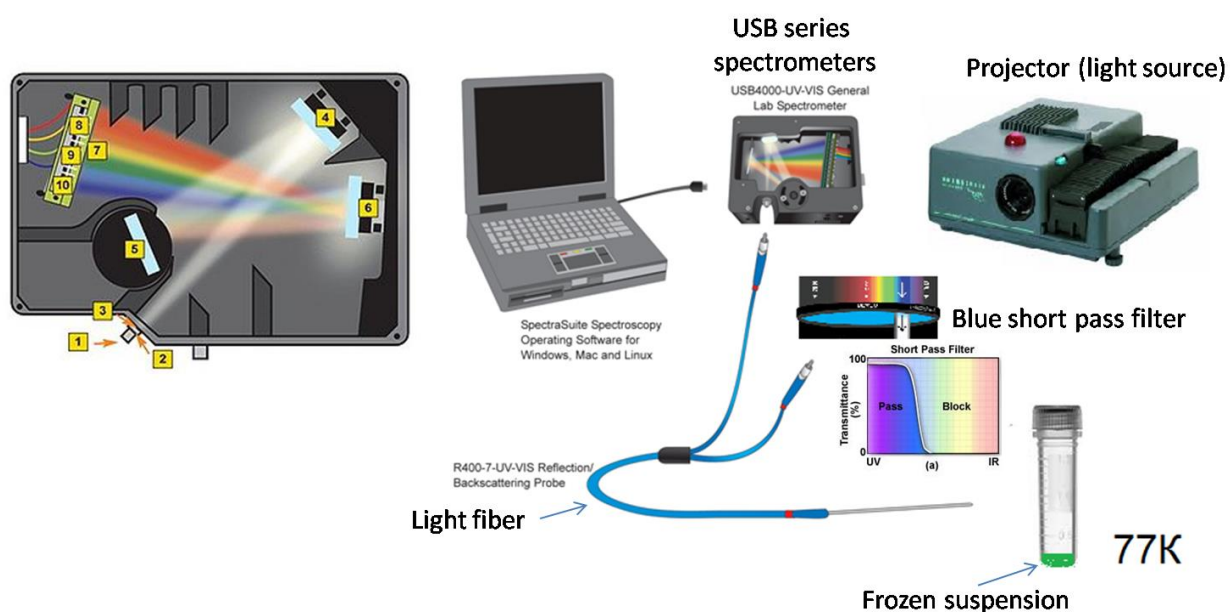


Рис. 2.8. Схематическое изображение принципа работы спектрометра USB4000 и установки для измерения низкотемпературных спектров испускания ФХ.

Измерения спектров поглощения и испускания ФХ при комнатной температуре проводились в суспензиях клеток микроводорослей с использованием спектрофотометров Hitachi-557 и Hitachi-850 (Япония), соответственно. Флуоресценция возбуждалась синим светом на длине волны 450 нм.

2.2.15. Микроскопия

Микрофотографии клеток мезофилла листа были получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM510 META (Zeiss, Германия) на объективе с водной иммерсией (20×/0.50). Визуализация хлоропластов проводилась по

автофлуоресценции Хл при возбуждении на длине волны 488 нм. Источником возбуждающего света служил аргоновый лазерный диод. Для регистрации изображения использовали длинноволновой фильтр с пропусканием волн длиннее 650 нм. Проекции снимков верхней части мезофилла листа обрабатывались с помощью программы Zeiss LSM Image Browser. Для определения морфологических характеристик клеток микроводорослей использовался моторизованный микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT (Zeiss, Германия) с программным обеспечением Axio Vision 4.2, оснащенный цифровой камерой AxioCam HRc.

2.2.16. Определение среднеточечного редокс потенциала пары Qa/Qa^-

Среднеточечный окислительно-восстановительный потенциал пары Qa/Qa^- в ФС2 определялся в препаратах тилакоидных мембран из клеток *C. reinhardtii* путем измерения темнового уровня ФХ (F_0) в ходе редокс титрования. Как известно, понижение редокс потенциала суспензии фотосинтетических мембран индуцирует восстановление Qa в ФС2, которое сопровождается ростом выхода F_0 (Krieger et al. 1995). В свою очередь, понижение редокс потенциала среды можно вызвать удалением кислорода и одновременным добавлением сильного восстановителя, такого как дитионит натрия. Для определения редокс потенциала пары Qa/Qa^- использовали установку, состоящую из измерительной термостатируемой ячейки объемом 4 мл и диаметром 1 см, установленной на магнитной мешалке, редокс электрода и флуориметра РАМ2000 (Walz, Германия) (схема измерительной камеры приведена на рис. 2.9). Над измерительной камерой закрепляли редокс электрод ЭРП-101 (Лаборкомплект, Россия) таким образом, чтобы измерительный конец электрода был погружен в суспензию мембран. Сбоку вплотную к ячейке с образцом подводили конец световода флуориметра. Измерительную камеру затеняли фольгой и герметизировали, затем вводили внутрь ячейки три полые иглы для продувки аргоном, выведения газа и для введения образца и редокс агента. Все измерения проводили при температуре 24°C. В начале эксперимента через иглу вводили в ячейку 2 мл суспензии тилакоидных мембран, разведенных в буфере ФС2 до концентрации 30 мкг Хл мл⁻¹, включали перемешивание и оставляли в темноте на 5 мин. Затем измеряли редокс потенциал среды (мВ) по показателям электрода и величину F_0 , соответствующую окислительным условиям. После этого начинали медленно продувать газовую фазу измерительной камеры аргоном через одну иглу и добавлять с помощью шприца через вторую иглу поэтапно, по 30 мкл раз в 30 секунд, 100 мМ раствор дитионита натрия,

приготовленный с соблюдением анаэробных условий. Показания редокс электрода и величины Fo фиксировались через 20 с после введения каждой порции дитионита. Измерения проводились до тех пор, пока выход Fo не достигал насыщения, свидетельствуя о переходе всех центров ФС2 в закрытое состояние с полностью восстановленным Qa. Затем строили зависимости Fo от значения редокс потенциала среды и определяли среднеточечный окислительно-восстановительный потенциал пары Qa/Qa^- как величину редокс потенциала среды, при которой выход ФХ возрастет на 50% от разницы между максимальным и минимальным значением.

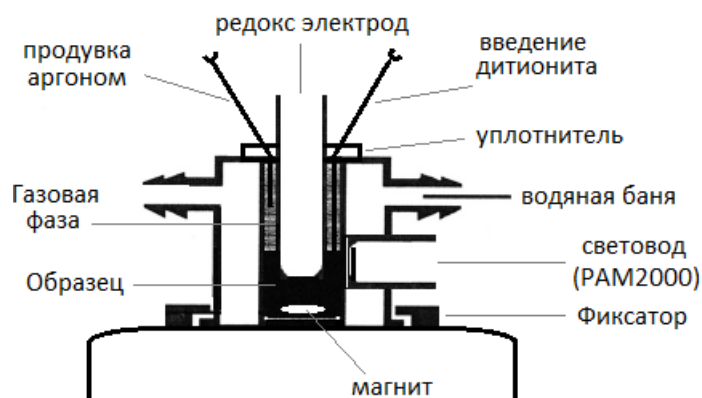


Рис. 2.9. Схема устройства измерительной камеры для редокс титрования Qa.

2.2.17. Оценка спектральных характеристик ФС1 и 2 методом 'Fo rise'

Для определения способности разных длин волн монохроматического света возбуждать преимущественно ФС1 (свет ФС1) или ФС2 (свет ФС2) нами был модифицирован т.н. метод 'Fo rise', который используется для оценки активности ЦЭТ (Shikanai et al. 1998). В основе метода 'Fo rise' лежит феномен последовательного роста и снижения выхода ФХ (Fo) с формированием максимума в течение примерно минуты после выключения актиничного света умеренной интенсивности, возбуждающего преимущественно ФС1. Сразу после отключения актиничного света ПХ пул находится в окисленном состоянии, в то время как переносчики электронов в строме находятся в восстановленном состоянии из-за мгновенной остановки цикла Кальвина и могут восстанавливать ПХ пул благодаря реакциям ЦЭТ. Таким образом, после выключения актиничного света происходит постепенное восстановление ПХ пула в условиях активного ЦЭТ, которое, по мере исчерпания восстановительных эквивалентов в строме, сменяется реокислением ПХ пула при участии РТОХ. Как известно, редокс состояние Qa на свету определяется балансом между транспортом электронов с донорной стороны ФС2

на Q_a и оттоком электронов с Q_a^- в ПХ пул. Если после выключения актиничного света освещать образцы слабым светом, способным индуцировать транспорт электронов с донорной стороны на Q_a , то восстановление ПХ пула будет приводить к снижению скорости реокисления Q_a^- , накоплению восстановленной формы Q_a и, соответственно, к росту выхода ФХ. В изначальном варианте метода для измерения транзитного роста F_o использовали модулированные измерительные импульсы света (РАМ), которые обладают слабым актиничным эффектом при высокой частоте модуляции. Мы модифицировали метод, адаптировав его для определения способности монохроматического света преимущественно возбуждать ФС1 или ФС2. Для этого сначала устранили актиничный эффект измерительного света, включая импульсы только в определенные промежутки времени после выключения актиничного света. Затем в качестве света, активирующего рост F_o , использовали постоянный монохроматический свет низкой интенсивности с ПФПФ 2.5 (активирующий свет), который включали после выключения актиничного света. Очевидно, что если в качестве активирующего света использовать свет ФС2, то эффект роста F_o усилится из-за увеличения скорости электронного транспорта на Q_a и снижения скорости реокисления ПХ при участии ФС1. Это приведет к формированию выраженного пика F_o после выключения актиничного света (см. пик F_o на рис. 2.10). И наоборот, использование света ФС1 уменьшает амплитуду и ширину пика F_o из-за снижения скорости восстановления Q_a и увеличения скорости реокисления ПХ при участии ФС1. Таким образом, измерение спектров действия пика F_o позволяет охарактеризовать способность той или иной волны видимого света возбуждать ФС1 или 2 и влиять, таким образом, на баланс электронного транспорта через обе фотосистемы.

Измерения ФХ проводились с помощью флуориметра РАМ-101 в соответствии протоколом, адаптированным для клеток микроводорослей. В качестве объекта использовали *Scenedesmus quadricauda*, поскольку феномен 'Fo rise' был наиболее отчетливо выражен у представителей рода *Scenedesmus*. Сначала выдерживали клетки *S. quadricauda* в течение 1 часа на комнатном свете при комнатной температуре, затем осаждали на стекловолоконных фильтрах. Содержание Хл на поверхности фильтра составляло 70-75 мг м⁻². После этого укладывали фильтр на влажную подложку стороной с клетками вверх и фиксировали измерительный конец световода на расстоянии 1 мм от поверхности фильтра. В соответствии с запрограммированным протоколом, сначала включался слабый измерительный свет (ML) с частотой 100 Гц, а через 20 с после этого подавался мощный импульс насыщающего света (SP) (ПФПФ 5000, 0.8 с), сразу после которого включался актиничный белый свет (AL) с ПФПФ 50 как показано на рис. 2.10. Через 180 с освещения подавался второй импульс SP. Насыщающие импульсы

необходимы для оценки нефотохимического тушения, которое может влиять на форму и амплитуду 'Fo rise'. Через 60 с после второй вспышки SP выключались AL и ML и включался монохроматический активирующий свет интенсивностью 2.5 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, спектральные характеристики которого определялись светофильтром HWHM с шириной полосы пропускания 10 нм (Corion, Newport Corp., США). Измерение уровня Fo на этой стадии происходило циклами включения ML на полсекунды через каждые 5 с. Для количественной оценки пика Fo данные по ФХ интегрировали в интервале времени 5-80 с и нормировали на уровень Ft, измеренный перед выключением актиничного света.

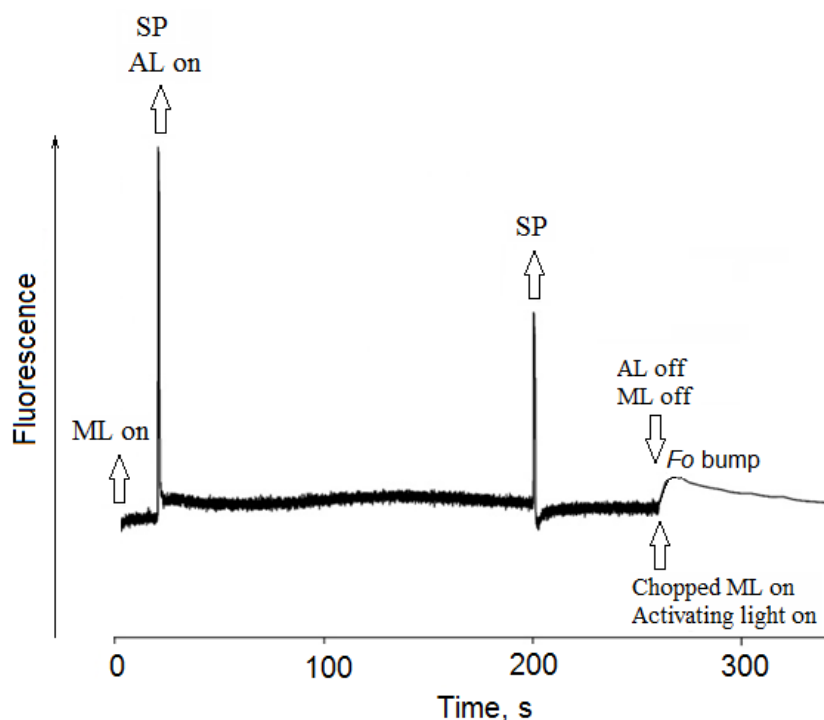


Рис. 2.10. Протокол измерения транзитного роста Fo после выключения актиничного света (Fo rise).

На рис. 2.11 приведены полученные на клетках *S. quadricauda* спектры действия 'Fo rise'. Отчетливо видны три максимума при 470-490 нм, 580 нм и 650-670 нм, которые характеризуют длины волн, возбуждающие преимущественно ФС2, и четыре минимума при 430-450 нм, 530 нм, 630 нм и 690 нм, соответствующие длинам волн, возбуждающим в большей степени ФС1.

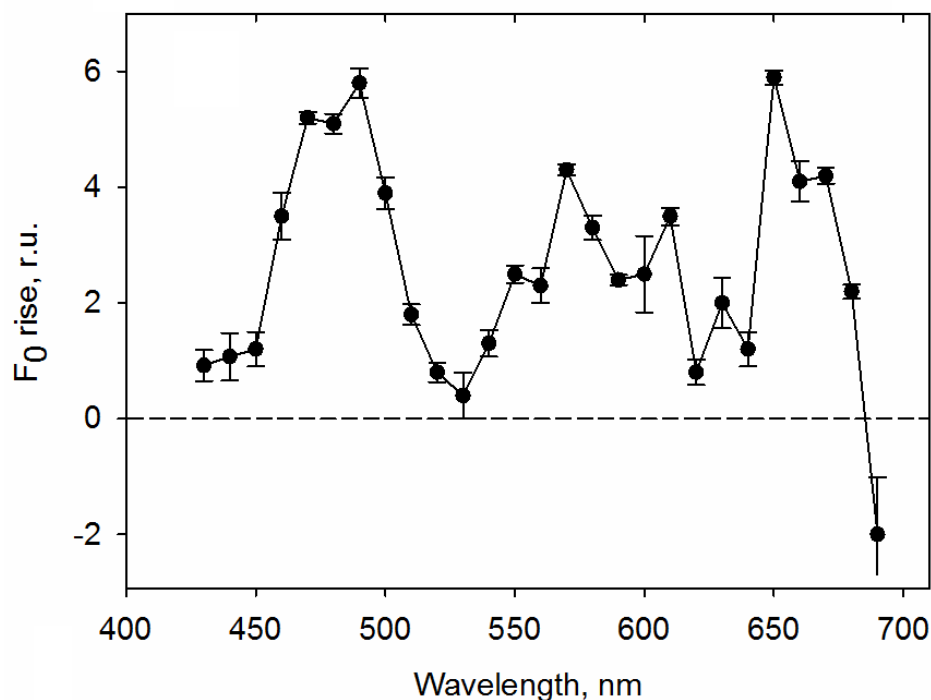


Рис. 2.11. Спектры действия ‘Fo rise’ в клетках зеленой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*.

2.3. Анализ кинетических кривых роста/затухания ФХ и редокс переходов P700 с использованием Монте-Карло модели ППФ

2.3.1. Общая характеристика метода и модели

В математическом методе Монте-Карло генерация случайных чисел используется для оценки вероятности реализации стохастических процессов, в том числе трансдукции энергии в фотосинтезе (Kroese et al. 2011). Применение этого подхода предполагает моделирование поведения каждого индивидуального элемента модели, такого как атом, молекула или макромолекулярный комплекс. В нашей работе метод Монте-Карло использовался для моделирования ППФ в широком диапазоне времен от пикосекунд до секунд и симуляции нескольких типов экспериментальных кривых (Antal et al. 2013b, Маслаков и др. 2016, Antal et al. 2018). При этом условия реализации вероятных состояний каждого компонента модели были изначально predeterminedены путем задания скоростей всех возможных реакций, протекающих при участии каждого отдельного элемента системы. В частности, константы скоростей поглощения фотонов, путей дезактивации синглетно-возбужденного состояния Хл, путей электронного транспорта внутри ПБК и между ПБК были заданы либо на основании опубликованных экспериментальных данных,

либо, исходя из разумных предположений, на основании результатов тестирования модели. В связи с этим модель относится к так называемому типу "rule-based" с определенными правилами поведения. В настоящей модели процесс моделирования разбит на короткие временные периоды (шаги модели), во время которых происходит расчет изменения системы при учете всех вероятных элементарных событий. Длительность шага модели определяется как величина обратно пропорциональная сумме констант скоростей всех реакций, протекание которых вероятно в текущем состоянии системы. Во время каждого такого шага рассчитывается количество испускаемых антенной ФС2 фотонов и количество P_{700} в окисленном состоянии, которые являются основными выходными данными модели. Последовательный расчет выходных данных в чередовании шагов модели дает в результате кинетическую кривую ФХ или редокс переходов P_{700} , которую можно сравнивать с экспериментальными кривыми.

Разработанная модель ППФ включает несколько миллионов отдельных фотосинтетических ЭТЦ, каждая из которых содержит 1 ФС2 α типа (суперкомплекс ФС2) или 1 ФС2 β типа, 6 молекул PQ, 1 цитохромный комплекс b_6/f , 2 молекулы Пц, 1 комплекс ФС1 и 6 молекул Фд. Данные соотношения между компонентами ЭТЦ основаны на экспериментальных данных (Antal et al. 2013a). Общая схема организации отдельной фотосинтетической ЭТЦ в модели показана на рис. 2.12. Величины констант скоростей реакций и других параметров модели приведены в таблице в Приложении А.

Разработанная модель ППФ базируется на следующих предположениях и новациях:

1. Предполагается, что тушителями ФХ, определяющими форму кинетических кривых ФХ, являются Qa, Пх и P_{680}^+ .
2. В модели учитывается структурная и функциональная гетерогенность компонентов фотосинтетической ЭТЦ. В частности, ФС2 представлена структурами α и β типа, Qв-восстанавливающими и невосстанавливающими центрами ФС2. В суперкомплексе допускается энергетическое взаимодействие между входящими в его состав центрами ФС2. Также заданы определенные соотношения между S состояниями КВК и между пустым и заполненным состояниями Qb-сайта в условиях темновой адаптации. ПХ пул представлен т.н. быстрым и медленным подпулами.
3. Впервые в модель ППФ включены в комплексе Q-цикл, ЦЭТ, реакции хлордыхания и реакция Меллера.
4. Впервые выход ФХ оценивается явным образом.
5. Впервые в модели учитываются сайты связывания ПХ, Пц и Фд с цитохромным комплексом b_6/f и ФС1.

6. Впервые модель была использована для симуляции четырех типов экспериментальных кинетических кривых: 1) светоиндуцированного роста ФХ (OJIP), 2) темнового затухания ФХ в наносекундном диапазоне, 3) темнового затухания ФХ в диапазоне от 100 микросекунд до 100 секунд, 4) светоиндуцированных изменений поглощения, связанных с редокс переходами P₇₀₀.

Необходимо отметить, что моделирование вышеописанной системы с использованием дифференциальных уравнений требует разработки 2-3 тысяч уравнений. Включение любого нового компонента в такую модель ведет к увеличению количества уравнений и к необходимости перестройки всей системы уравнений, что является трудоемким процессом. Метод Монте-Карло значительно облегчает процесс внесения изменений в модель при тестировании.

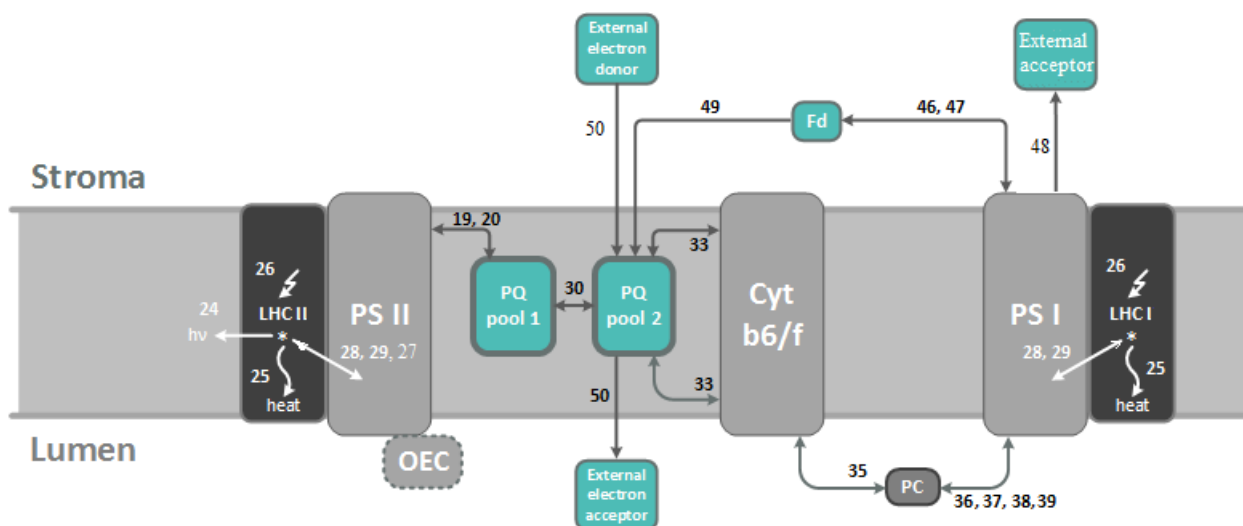


Рис. 2.12. Общая схема модели ППФ.

Реакции в антенных комплексах ФС1 и 2, электронный транспорт между ФС2, цит *b₆f* и ФС1, а также пути, связанные с хлородыханием, ЦЭТ и реакцией Меллера обозначены числами, которые указывают на номера соответствующих реакций в таблице из Приложения А.

2.3.2. Моделирование реакций дезактивации энергии возбуждения

Поскольку расчет ФХ явным образом является одной из основных характеристик представленной модели, то принципиально важным является моделирование взаимодействия между быстрыми процессами в антенне фотосистемы и более медленными реакциями электронного транспорта. Использование метода Монте-Карло позволяет решить эту задачу. Светособирающие комплексы ФС1 и 2 поглощают фотоны

со скоростью, определяемой в модели световой константой k_L . После того как ССК захватывает фотон, возникающее синглетное возбужденное состояние Хл может быть дезактивировано посредством фотохимического процесса, тепловой или излучательной (в ФС2) диссипации энергии. В нашей модели фотохимическое преобразование энергии возбужденного электронного состояния протекает в два этапа (рис. 2.12). На первом этапе электронное возбуждение переносится из ССК2 или 1 на специальные пары Хл P_{680} и P_{700} в реакционных центрах ФС2 и ФС1, соответственно. Эта реакция конкурирует с реакцией тепловой диссипации энергии в антенне ФС1 и 2, а также с реакцией испускания кванта флуоресценции в антенне ФС2. Если P_{680} или P_{700} находятся в нейтральном редокс состоянии и в основном электронном состоянии, то при передаче энергии они переходят в синглетное возбужденное состояние ($^1P^*$). В модели допускается, что этот процесс является обратимым, т.е. возбуждение может передаваться от специальных пар обратно в антенну. На втором этапе возбужденное состояние P_{680} или P_{700} приводит к первичному разделению зарядов с образованием пар $P_{680}^+Feo^-$ и $P_{700}^+Ao^-$, соответственно. Необходимо отметить, что в нашей модели константы скоростей первичного разделения и первичной рекомбинации зарядов зависят от редокс состояния Qa (табл. в Приложении А). Рекомбинация первично разделенных зарядов приводит, в основном, к формированию состояния $^1P^*$, после чего электронное возбуждение может снова переноситься в ССК, где оно может диссипировать тепловым или излучательным (в ФС2) образом.

В модели тепловая диссипация возбужденного электронного состояния происходит в антенне ФС1 и ФС2 или при переносе энергии из антенны на P_{680}^+ . Также в модели учитывается влияние редокс состояния ПХ пула на тепловую диссипацию энергии в ССК2. Так, допускается, что пластохинон в окисленном состоянии увеличивает вероятность тепловой диссипации энергии при взаимодействии с антенной ФС2 по неизвестному механизму (Vernotte et al. 1979). Флуоресценция испускается в антенне ФС2 и ее выход зависит, в основном, от редокс состояния Qa, которое влияет на обратный поток энергии из реакционного центра ФС2 в антенну благодаря модификации констант первичного разделения и рекомбинации зарядов. Также выход ФХ опосредованно зависит от вероятности тепловой диссипации энергии и, соответственно, от редокс состояния P_{680} и ПХ.

2.3.3. Моделирование реакций электронного транспорта

Поскольку источником ФХ является ФС2, то ее структура в модели представлена наиболее подробно (рис. 2.13). Каждый реакционный центр ФС2 связан с антенной (ССК2) и включает донорную часть, представленную КВК, тирозином Z (Yz) и

фотоактивным пигментом P₆₈₀, а также акцепторную часть, представленную Фео, первичным хиноном Qa и Qb-связывающим сайтом, который может содержать либо не содержать молекулу ПХ. КВК в модели может находиться в одном из 4х возможных редокс состояний: S₀, S₁, S₂ и S₃ (Kok et al. 1970). В модели также учитывается, что Qb-связывающий сайт может находиться в одном из четырех состояний: 1) без пластохинона, 2) с молекулой ПХ в окисленном состоянии (Qb); 3) с молекулой ПХ в полувосстановленном состоянии (Qb⁻), 4) с молекулой ПХ в полностью восстановленном и протонированном состоянии (QbH₂). При этом, наибольшей аффинностью к Qb-сайту обладает полностью окисленная форма ПХ, а наименьшей – полностью восстановленная.

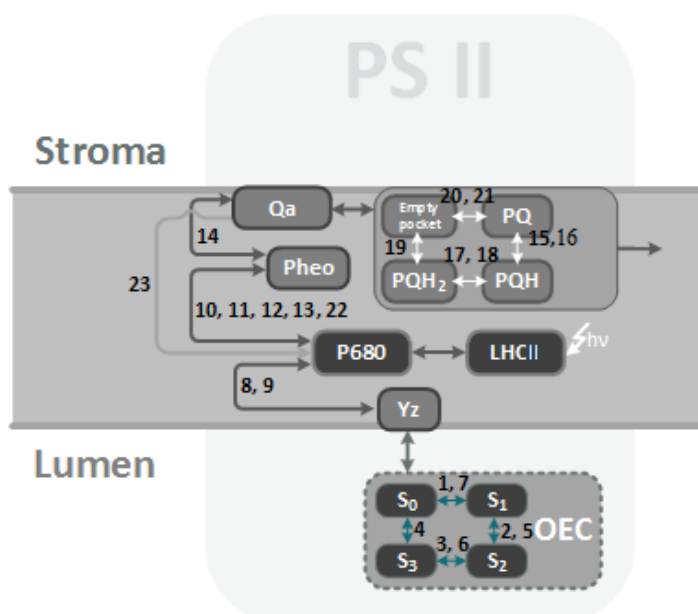


Рис. 2.13. Реакции электронного транспорта в ФС2.

Как известно, Q-цикл служит для переноса одного дополнительного протона из стромы в люмен на каждый электрон, перенесенный от ФС2 к ФС1 (Breyton 2000). Для реализации Q-цикла в модель были включены реакции переноса электронов от ПХН₂ на ПХ(ПХ⁻) внутри цит *b₆f* как показано на рис. 2.14. Для этого ввели сайты связывания ПХ с люминальной (Q_o) и стромальной (Q_i) стороны комплекса, а также гемы *b* типа. Q-цикл в модели функционирует по следующему механизму. Сначала ПХН₂ связывается с Q_o сайтом. Затем в момент времени, когда акцепторы электронов ПХ и Пц оказываются связанными с цит *b₆f* комплексом, происходит одновременное двухэлектронное окисление пластохинола. Один электрон переносится через железосерный кластер белка Риске к молекуле Пц, а другой электрон последовательно переносится на низко- и

высокопотенциальную форму гема *b* и далее - на связанную с Q_i сайтом молекулу ПХ или ПХ⁻.

ФС1 в модели состоит из антенны, первичного донора электронов P₇₀₀, первичного электронного акцептора хлорофилла A₀, в то время как остальные акцепторы электронов: A₁, Fx, Fa и Fb - объединены в общий пул, способный аккумулировать до 4х электронов (рис. 2.15). Сначала энергия возбуждения передается из антенны на P₇₀₀, а затем ¹P₇₀₀* восстанавливает A₀. После этого электрон переносится в пул акцепторов электронов, который может быть окислен ферредоксином - конечным переносчиком электронов в модели. Для этого окисленный Фд сначала садится на сайт связывания в ФС1 (Sétif et al. 2002), а после этого происходит перенос одного электрона из пула акцепторов на Фд с последующим высвобождением восстановленной формы Фд из сайта связывания. В модели предусмотрен также альтернативный механизм окисления ФС1 кислородом (Mehler et al. 1951). Люменальная сторона ФС1 содержит Пц связывающий сайт, с которым связывается восстановленный Пц, а затем восстанавливает P₇₀₀⁺ (Haehnel et al. 1980, Haehnel et al. 1989).

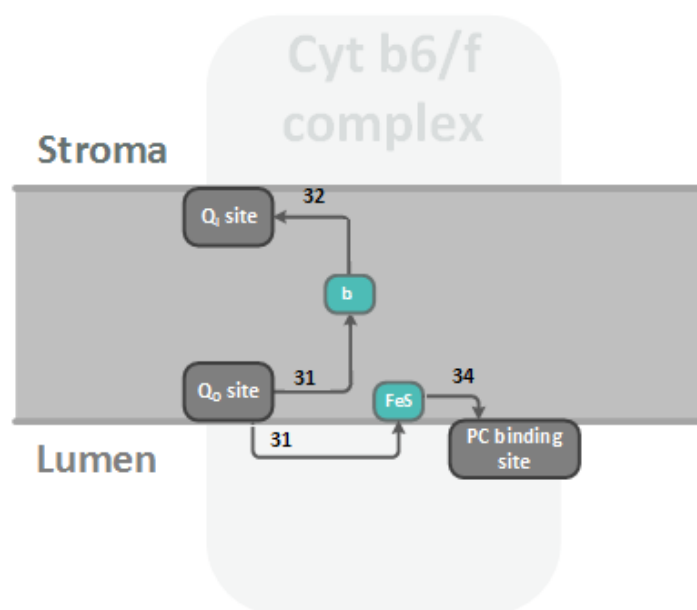


Рис. 2.14. Реакции электронного транспорта в цит комплексе *b₆f*.

Особенностью модели является разделение ПХ пула на два подпула, молекулы которых находятся либо вблизи ФС2 (пул 1), либо вблизи цит *b₆f* (пул 2) (рис. 2.12). Эти пулы способны обмениваться молекулами друг с другом со скоростью, которая лимитируется диффузией ПХ между ФС2 и цит *b₆f*. Данное предположение основывается на исследованиях Joliot and Joliot (1992), в которых было показано, что процесс фотовосстановления ПХ пула носит двухстадийный характер. На основании этого авторы

выдвинули гипотезу о существовании двух фракций ПХ пула: т.н. быстрого пула, локализованного в области стэкинга гран, и медленного пула в области ламелл. Пространственная гетерогенность фотосинтетических мембран – хорошо установленный факт. Так, известно, что область стэкинга гран обогащена ФС2, ФС1 находится в маргинальных областях гран и в ламеллах, в то время как цит *b₆f* равномерно распределен вдоль тилакоидной мембраны (Andersson and Anderson 1980). Мы допустили, что пул 1 (3 молекулы ПХ) находится в области гран и его молекулы могут быстро связываться с Q_B-сайтом ФС2. Вероятность взаимодействия пула 1 с цит *b₆f* в области ламелл лимитирована скоростью диффузии пластохинона из одного компартмента в другой, то есть скоростью обмена молекулами между двумя пулами в модели. Напротив, пул 2 (3 молекулы ПХ) быстро связывается с цит *b₆f* в области ламелл и медленно – с ФС2. В данной модели не учитываются состояния, когда цит *b₆f* расположен в одном компартменте с ФС2. Аналогичная гетерогенность может быть связана и с Пц, поскольку цит *b₆f* и ФС1 могут располагаться как в одном, так и в разных компартментах тилакоидной мембраны. В настоящей модели учитываются реакции ЦЭТ и хлородыхания, которые связаны с пулом 2 (рис. 2.12), поскольку оба пути локализованы в стромальной области мембран (Johnson 2011).

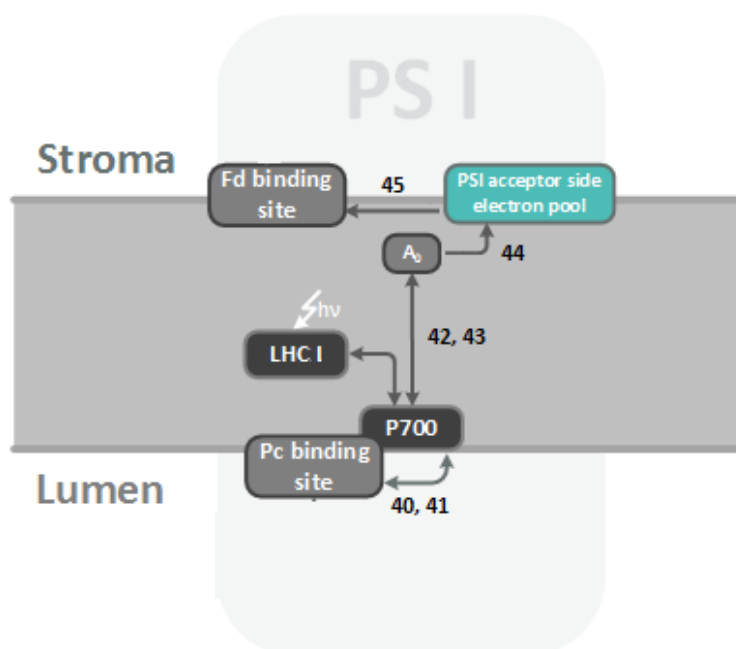


Рис. 2.15. Реакции электронного транспорта в ФС1.

Глава 3. Распределение энергии и электронных потоков в хлоропласте *Chlamydomonas reinhardtii* при дефиците серы

3.1. Окислительно-восстановительное равновесие в клетке и образование АФК

Индукцированные дефицитом серы метаболические изменения в водорослевых клетках связаны, в основном, с нарушением биосинтетических и регуляторных систем. В голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* замедляется общий синтез белков и, следовательно, снижается скорость многих анаболических путей, в том числе фотосинтеза, и нарушается клеточное деление как наиболее ресурсоемкий процесс (Antal 2018). Имеющиеся в литературе данные по изучению морфолого-культуральных и физиологических свойств голодающих по сере микроводорослей относятся, в основном, к условиям инкубации в замкнутом культиваторе или герметичных флаконах в связи с интересом к феномену фотопродукции водорода. В этих специфических условиях, рассмотренных подробно в Главах 5 и 6, культура переходит в анаэробные условия примерно через 24 ч голодания, что оказывает существенное влияние на метаболизм клеток из-за блокировки дыхания и активации путей ферментативного брожения. В данной главе приведены результаты исследования ростовых и физиологических характеристик в клетках *C. reinhardtii* в условиях длительной аэробной инкубации без серы.

В таблице 3.1 в сравнительном аспекте показаны изменения общих свойств культуры *C. reinhardtii* в контроле при стандартных условиях роста и при инкубации без серы в течение 72 часов. Из таблицы видно, что концентрация контрольных клеток удваивалась за первые сутки и продолжала возрастать, но уже с меньшей скоростью. На среде без серы концентрация клеток увеличивалась на 20% в течение первых суток и далее практически не изменялась, что является следствием нарушения клеточного цикла. Содержание белка на клетку слабо изменялось в контроле, однако этот показатель снижался примерно на 20% в течение 72 ч голодания. В то же время содержание Хл на клетку микроводорослей и отношение Хл *a/b* варьировало незначительно как в контрольной, так и в голодающей культуре, что указывает на отсутствие изменений размера антенны на реакционный центр. Содержание крахмала в контроле увеличивалось примерно на 20% в течение 72 ч, в то время как в условиях дефицита серы концентрация крахмала возрастала в 10 раз в течение первых суток, а затем постепенно снижалась. Голодающая культура также характеризовалась значительными морфологическими изменениями (рис. 3.1), прежде

всего увеличением размера клеток из-за нарушения клеточного деления и накопления включений крахмала в хлоропласте.

Таблица 3.1. Концентрация клеток, содержание Хл *a* и *b*, общего белка и крахмала в клетках *C. reinhardtii* на разных этапах инкубации на полной среде (100%S) и на среде без серы (0%S) в аэробных условиях. Приведены средние значения трех независимых измерений. Величина SD не превышала 10%.

Время, ч	Концентрация клеток, $\times 10^6$ мл ⁻¹		Хл (<i>a+b</i>), пг кл ⁻¹		Хл <i>a/b</i>		Общий белок, пг кл ⁻¹		Крахмал, пг кл ⁻¹	
	100%S	0%S	100%S	0%S	100%S	0%S	100%S	0%S	100%S	0%S
0	3.5	3.5	1.7	1.7	1.76	1.76	40	40	2.1	2.1
24	7.8	4.1	1.6	1.5	1.79	1.68	38	37	2.4	22.1
48	9.0	4.2	1.5	1.6	1.64	1.68	41	32	2.7	19.3
72	11.1	4.1	1.5	1.5	1.64	1.67	39	31	2.6	11.8

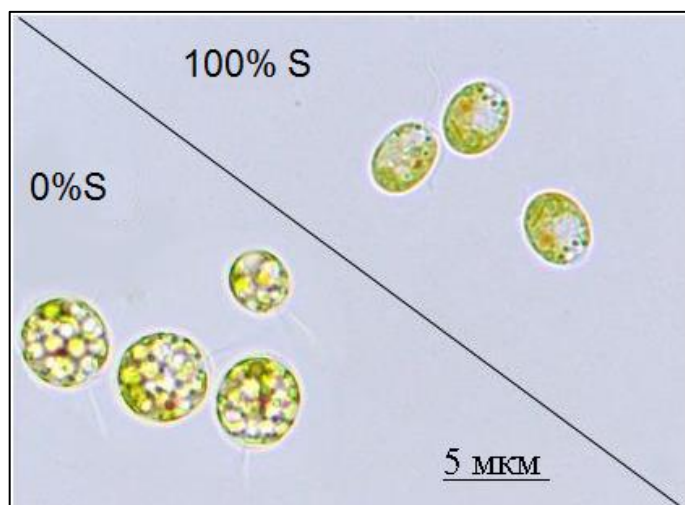


Рис. 3.1. Клетки *C. reinhardtii* в контрольном образце и через 48 ч инкубации без серы (0%S).

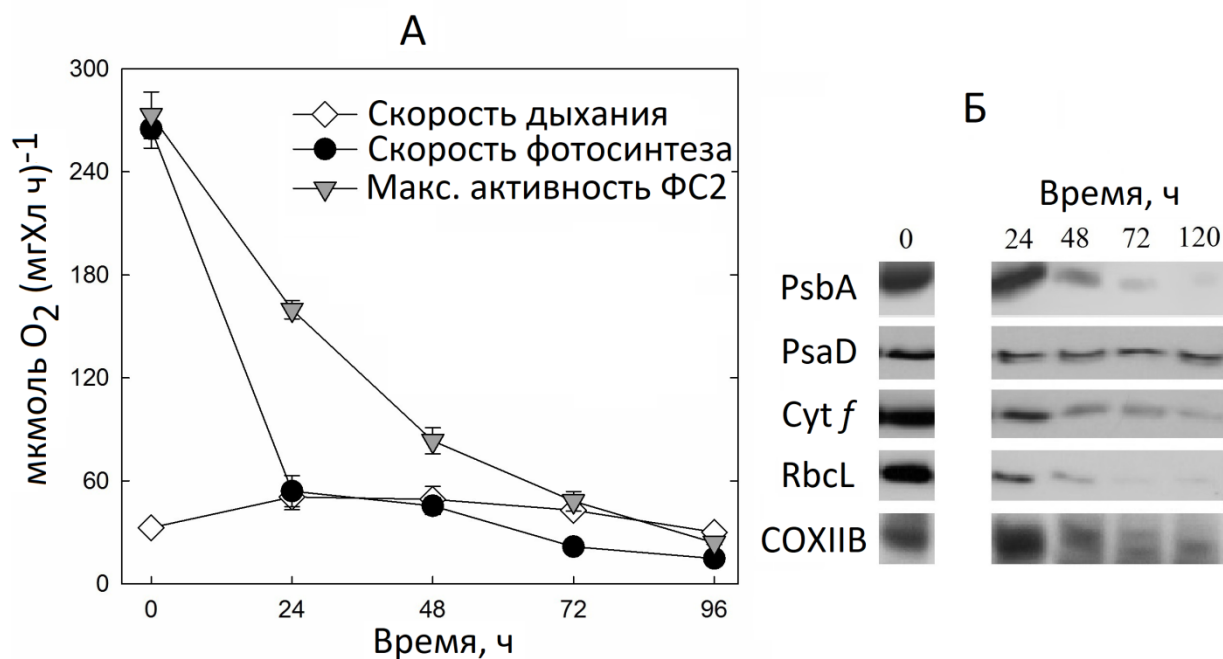


Рис. 3.2. А - Скорости дыхания, фотосинтеза и максимальная кислород-выделяющая активность ФС2, измеренные кислородным методом с помощью электрода Кларка. Б – Вестерн блот анализ белков PsbA, PsaD, цит *f*, RbcL и COXIIb,

Накопление крахмала в голодающих клетках обусловлено, в основном, транзиторной активацией синтеза глюкозы в процессе глюконеогенеза с использованием внешнего ацетата в качестве источника углерода (Тоерел et al. 2013). Нарушение деления клетки потенциально снижает метаболические потребности микроводорослей в продуктах фотосинтеза, что также вносит вклад в формирование запасов углеводов. В этих условиях ФСА становится избыточным и подвергается существенному сокращению уже в течение первых суток инкубации без серы (Melis et al. 2000, Zhang et al. 2002). В наших экспериментальных условиях дефицит серы индуцировал снижение скорости фотосинтеза, определенной кислородным методом, на 80% в течение 24 ч (рис. 3.2А). Поскольку скорость фотосинтеза на насыщающем свете лимитируется процессом ассимиляции CO₂, то полученный результат свидетельствует о существенном ингибировании темновых реакций. Это предположение согласуется с данными по содержанию Рубиско в голодающих клетках, которое значительно снижалось в течение первых суток инкубации (рис. 3.2Б, белок RbcL). При этом скорость снижения максимальной кислород-выделяющей активности ФС2 была в два раза меньше, чем скорости фотосинтеза, указывая на более высокую толерантность ФС2 к стрессу по

сравнению с реакциями ассимиляции CO₂. Содержание D1 белка (PsbA) и цитохрома *f* комплекса *b₆f* снижалось на 70-80% через 48 ч инкубации без серы, в то время как содержание белка PsaD ФС1 несколько падало в течение 24 ч, а затем практически не изменялось до 120 ч. (рис. 3.2Б), свидетельствуя о достаточно высокой стабильности ФС1 по сравнению с ФС2 и цит *b₆f* в условиях дефицита серы.

Таблица 3.2. Значения F_v/F_m , скоростей электронного транспорта через ФС1 и 2 и нефотохимического восстановления ДХФИФ в тилакоидных мембранах из клеток *S. reinhardtii* в контроле (0 ч.) и через 48 и 60 ч. инкубации без серы. Числа в скобках соответствуют процентам от начальной величины.

Время, ч	F_v/F_m	H ₂ O→ДХФИФ, мкмоль ДХФИФ мгХл ⁻¹ ч ⁻¹	ДХФИФН ₂ →МВ→O ₂ мкмоль O ₂ мгХл ⁻¹ ч ⁻¹	НАД(Ф)Н→ДХФИФ, мкмоль ДХФИФ мгХл ⁻¹ ч ⁻¹
0	0.67 (100%)	59.4±3.1 (100%)	110.3±8.6 (100%)	23.0±1.8 (100%)
48	0.42 (63%)	18.7±2.2 (31%)	89.7±3.5 (82%)	10.1±1.4 (44%)
60	0.37 (55%)	13.2±2.6 (22%)	87.2±7.3 (79%)	6.2±0.8 (27%)

В таблице 3.2 приведены результаты измерений параметра ФХ F_v/F_m , отражающего фотохимическую активность ФС2 в адаптированном к темноте состоянии, и скоростей электронного транспорта через ФС1 и ФС2 в тилакоидных мембранах, выделенных из клеток *S. reinhardtii* в контроле (0 ч) и на разных стадиях инкубации без серы. Скорости электронного транспорта через ФС1 и ФС2 определялись спектрофотометрически с использованием редокс медиатора ДХФИФ. Электронный транспорт через ФС1 оценивался по скорости восстановления кислорода в присутствии ДХФИФН₂ и метил виологена на насыщающем свете, а электронный транспорт через ФС2 - по скорости фотохимического восстановления ДХФИФ. Из приведенных в таблице данных видно, что величина F_v/F_m составляла 0.67 в контроле (0 ч), что несколько ниже, чем в интактных клетках (~0.74-0.76), вероятно, из-за частичной дестабилизации ППФ в препаратах мембран. В ходе эксперимента величина F_v/F_m снижалась на 37 и 45% через 48 и 60 ч инкубации без серы, соответственно. Наблюдаемые изменения были менее

существенными по сравнению со снижением максимальной кислород-выделяющей активности ФС2 (рис. 3.2), поскольку эти характеристики ФС2 не идентичны друг другу. Так, активность ФС2, определенная кислородным методом, характеризует электронный транспорт через ФС2 от воды до искусственного акцептора DCBQ и зависит от состояния донорной (КВК) и акцепторной стороны. В то же время параметр F_v/F_m отражает способность центров ФС2 к первичному разделению и стабилизации зарядов, то есть, фактически, к переносу электрона с P_{680} на Q_a и зависит в меньшей степени от состояния донорной и акцепторной стороны ФС2.

Показателем, наиболее полно характеризующим функциональное состояние ФС2 с учетом активности донорной и акцепторной части, является скорость электронного транспорта через ФС2 в присутствии ДХФИФ в качестве акцептора электронов. Как видно из таблицы, значения этого показателя снижались на 70-80% в течение 48 и 60 ч голодания, что согласуется с результатами измерения максимальной кислород-выделяющей активности ФС2 на рис. 3.2А. В то же время скорость электронного транспорта через ФС1 снижалась примерно на 20% через 60 ч инкубации, что соответствует данным по изменению содержания PsaD белка (рис. 3.2Б). Приведенные результаты свидетельствуют о том, что при длительной аэробной инкубации без серы в наибольшей степени страдают компоненты цикла Кальвина, в меньшей степени - комплексы ФС2 и цит *b₆f*, а ФС1 отличается высокой устойчивостью к стрессу. Аналогичные изменения наблюдаются при культивировании *C. reinhardtii* без серы в закрытом фотобиореакторе (Melis et al. 2000, Zhang et al. 2002).

Возникающий в голодающих клетках дисбаланс между световыми и темновыми процессами должен способствовать переходу переносчиков фотосинтетической ЭТЦ в более восстановленное состояние на свету и снижению скорости электронного транспорта. Для оценки этих характеристик измеряли следующие параметры ФХ: ETR и (1-qP). Параметр ETR (мкмоль электронов $m^{-2} c^{-1}$) характеризует плотность потока электронов в фотосинтетической ЭТЦ, который пропорционален величине Yield (Глава 2.2.7). Световые кривые ETR в клетках контрольных и голодающих 48 ч микроводорослей приведены на рис. 3.3А. Важными параметрами кривой являются максимальный уровень ETR (ETR_{max}), который соответствует световому насыщению фотосинтетического электронного транспорта, и интенсивность света, при которой кривая выходит на этот уровень. В контрольных клетках величина ETR_{max} достигала 34 мкмоль электронов $m^{-2} c^{-1}$, а интенсивность света, при которой происходил выход на максимум, составляла около 150 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$. В голодающих клетках величина ETR_{max} не превышала 7

мкмоль электронов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ при низкой и умеренной освещенности и была нулевой при более высоких интенсивностях света, свидетельствуя о полном восстановлении фотосинтетической ЭТЦ. Выход ETR на насыщение в голодающих клетках происходил при низкой интенсивности света – около 25 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

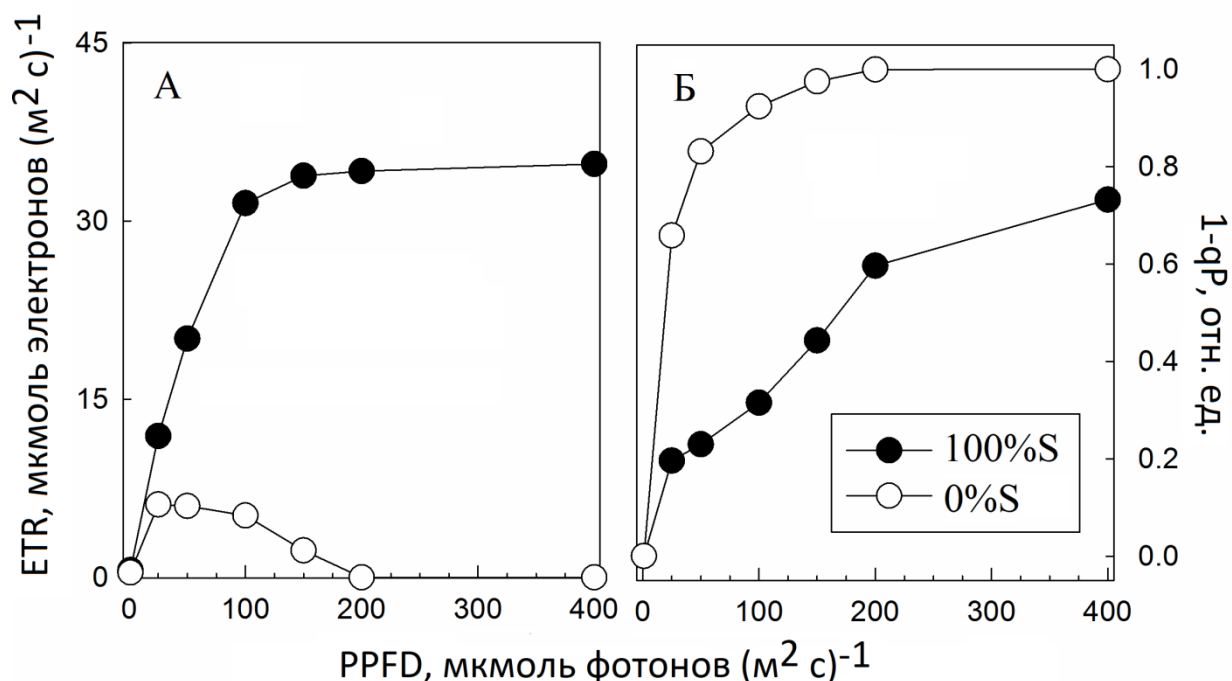


Рис. 3.3. Световые зависимости параметров ФХ ETR (А) и (1 – qP) (Б) в контрольных (100%S) и голодающих 48 ч по сере (0%S) клетках *C. reinhardtii*.

Параметр ФХ (1-qP), где qP - коэффициент фотохимического тушения ФХ, отражает долю центров ФС2 с восстановленным Qa на свету, т.е. фракцию закрытых центров ФС2. В контрольных клетках *C. reinhardtii* величина (1-qP) постепенно возрастала с увеличением интенсивности света, достигая значения 0.8 при ППФ 400 (рис. 3.3Б). В голодающих клетках величина (1-qP) достигала максимального возможного значения 1.0, которое соответствует полному переходу центров ФС2 в закрытое состояние, при интенсивности света примерно 150 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, при которой прекращался фотосинтетический электронный транспорт (ETR~0). Около 70% центров ФС2 в голодающих клетках переходили в закрытое состояние при интенсивности света всего 20 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Приведенные результаты подтверждают предположение о значительном восстановлении фотосинтетической ЭТЦ в голодающих клетках в результате преимущественного ингибирования темновых реакций фотосинтеза.

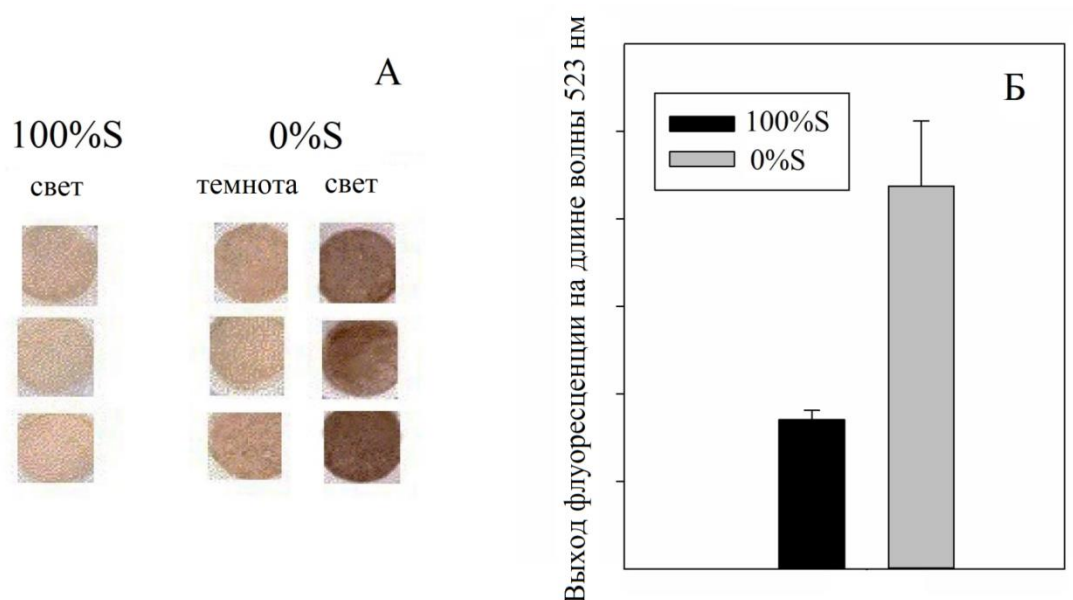


Рис. 3.4. Генерация АФК в контрольных и голодающих 48 ч. по сере клеток *C. reinhardtii*. Анализ проводили с использованием красителя DAB (А) и флуорогенного индикатора H₂DCFDA (Б).

Очевидно, что восстановление фотосинтетических переносчиков электронов должно способствовать генерации АФК. В случае, когда негативные внешние факторы нарушают баланс между процессами генерации и утилизации АФК в хлоропласте, развивается окислительный стресс (Asada 2006). Как упоминалось в предыдущих главах, в ФС2 образуется синглетный кислород, а в ФС1 - супероксидный радикал. Дисмутация супероксидного радикала при участии СОД приводит к формированию пероксида водорода, накопление которого в фотосинтезирующих клетках на свету является индикатором окислительного стресса. На рис. 3.4А приведены результаты анализа генерации пероксида водорода в контрольных и голодающих 48 ч клетках *C. reinhardtii* с использованием красителя DAB. В ходе эксперимента в суспензию клеток добавляли DAB, затем образцы освещали, осаждали на стекловолоконных фильтрах и обесцвечивали этанолом. Из рисунка видно, что контрольные образцы клеток, выдержанные на свету, и образцы голодающих клеток, выдержанные в темноте, не имели выраженного окраса после удаления пигментов. В то же время образцы голодающих клеток, выдержанные на свету в присутствии DAB, были окрашены в темно коричневый цвет, характерный для окисленной формы красителя, которая накапливается в присутствии пероксида водорода. Для оценки генерации широкого спектра АФК использовали флуорогенный реагент дихлорфлуоресцеин диацетат, который легко проникает в клетку, где окисляется при взаимодействии с различными видами АФК, превращаясь во флуоресцирующую форму –

дихлорфлуоресцеин. Сравнение между контрольными и голодающими 48 ч клетками *C. reinhardtii*, обработанными реагентом и выдержанными на свету, выявило значительное превышение величины флуоресценции (в 2.6 раза) в голодающих клетках по сравнению с контролем (рис. 3.4Б). Приведенные результаты указывают на развитие окислительного стресса в голодающих по сере клетках *C. reinhardtii*.

3.2. Баланс между ФС1 и ФС2

Регуляция баланса между электронными потоками через ФС1 и 2 в хлоропласте осуществляется при участии быстрого редокс-зависимого механизма перехода состояний, а также медленных адаптационных процессов, регулирующих соотношение между двумя фотосистемами, размер и состав периферических антенных комплексов (Allen 1992, Delosme et al. 1996, Gollan et al. 2015). В условиях, когда пул ПХ преимущественно окислен, ССК2 находится в дефосфорилированном состоянии и энергетически связан с ФС2, что соответствует состоянию 1 с высоким выходом ФХ. При восстановлении пластохинонов часть ССК2 диссоциирует от ФС2 и может энергетически взаимодействовать с ФС1, либо образовывать агрегированные состояния. В этом случае фотосинтетические мембраны находятся в состоянии 2 с низким выходом ФХ. Снижение выхода ФХ при переходе из состояния 1 в состояние 2 обусловлено снижением поперечного сечения поглощения ФС2 в результате диссоциации ССК2. Очевидно, что серное голодание индуцирует переход из состояния 1 в состояние 2 в результате восстановления фотосинтетической ЭТЦ (Wykoff et al. 1998). Нами была исследована обратимость механизма перехода состояний в условиях серного голодания. Для этого в эксперименте сначала искусственно вызывали переход из начального промежуточного состояния в состояние 2 путем продувки образцов аргоном, поскольку анаэробные условия приводят к значительному восстановлению ПХ пула у микроводорослей. После этого индуцировали переход из состояния 2 в состояние 1, освещая образцы сильным светом с ПФПФ 500 в присутствии 10 мкМ диурана и одновременно барботируя образцы воздухом для максимального окисления ПХ пула. Переходы между состояниями 1 и 2 оценивали по изменению максимального выхода ФХ F_m , который не зависит, как F_o или F_t , от редокс состояния Q_a , поэтому лучше отражает изменения поперечного сечения поглощения ФС2.

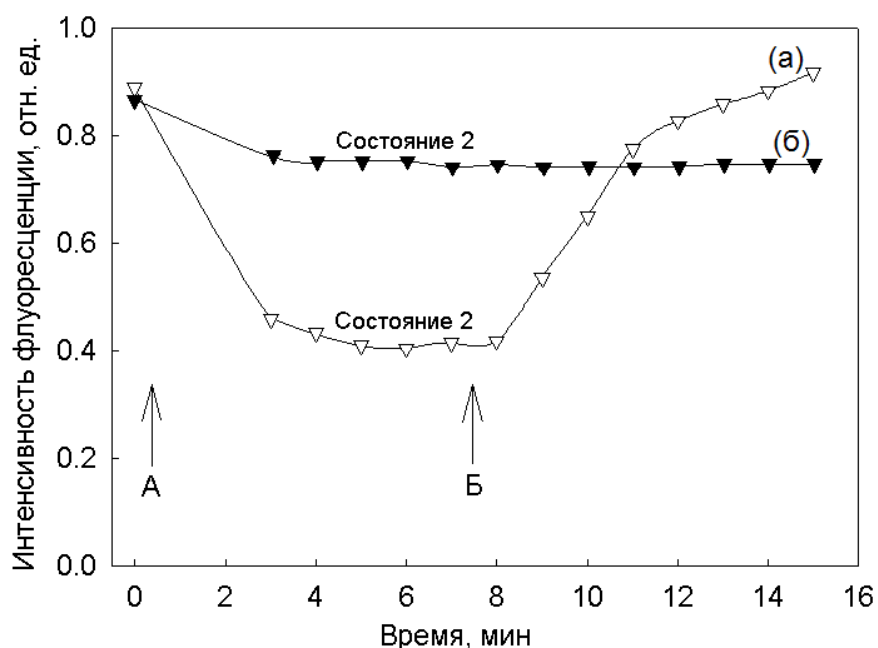


Рис. 3.5. Изменения выхода ФХ при искусственном изменении редокс состояния ПХ пула в контрольных (а) и голодающих 48 ч. по сере (б) клетках *C. reinhardtii*.

Стрелки А и Б отражают начало обработки образца с целью восстановления и окисления ПХ пула, соответственно. Интенсивность ФХ измеряли на приборе РАМ 2000.

На рис. 3.5 приведены изменения Fm при последовательном искусственном восстановлении и окислении ПХ пула в контрольных и голодающих 48 ч клетках *C. reinhardtii*. Образцы из контрольной культуры характеризовались высоким выходом ФХ в стандартных условиях роста. Анаэробные условия индуцировали двукратное снижение величины Fm в течение 3х мин, отражающее переход из состояния 1 в 2. Последующее освещение в присутствии диурона и барботирование клеток приводили к обратному росту ФХ до начального уровня в течение 4х мин, свидетельствуя о переходе в состояние 1. В отличие от контроля, голодающие клетки не выявили заметных изменений интенсивности ФХ в ходе последовательных процедур восстановления и окисления ПХ пула. Эти результаты указывают на нарушения редокс-зависимой регуляции перехода состояний, в результате которых состояние 2 становится необратимым. Вероятной причиной этих изменений могут быть структурные перестройки фотосинтетических мембран в условиях минерального голодания, в том числе, нарушение стэкинга мембран, которое может приводить к разобщению между ФС2 и ССК2.

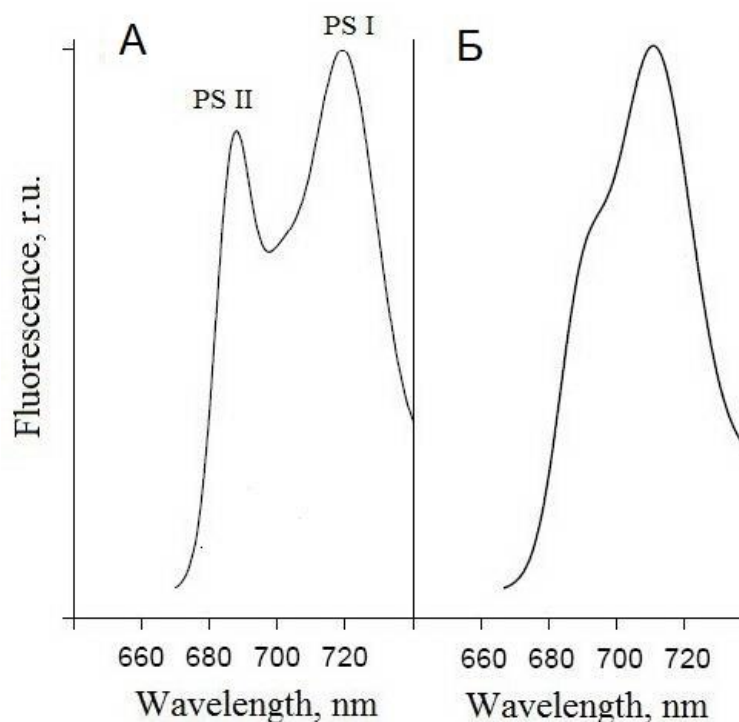


Рис. 3.6. Низкотемпературные спектры испускания ФХ, измеренные в контрольных (А) и голодающих 48 ч по сере (Б) клетках *C. reinhardtii*.

Хорошо известно, что более 90% ФХ при комнатной температуре излучается ФС2. Однако при температуре жидкого азота вклад двух типов фотосистем в ФХ становится соизмеримым. Низкотемпературный (77К) спектр испускания ФХ в растениях и зеленых водорослях обычно содержит два основных разделенных пика, связанных с ФС2 и ФС1, соответственно. Очевидно, что амплитуды этих пиков характеризуют поперечное сечение поглощения ФС1 и 2. На рис. 3.6 приведены низкотемпературные спектры испускания ФХ в контрольных и голодающих 48 ч по сере клетках *C. reinhardtii*. В контрольных клетках спектр выявил отдельные пики ФХ с максимумами на длинах волн 693 и 718 нм, которые относятся к ФС2 и ФС1, соответственно. При этом амплитуда пика ФС1 несколько превышала амплитуду пика ФС2. Спектр испускания ФХ голодающими клетками характеризовался снижением амплитуды пика ФС2 по отношению к пику ФС1 примерно на 30%, что приводило к увеличению перекрытия между двумя пиками и замещению отдельной полосы ФС2 плечом, примыкающим к доминирующему пику ФС1. Таким образом, голодающие клетки характеризовались значительным снижением поперечного сечения поглощения ФС2 по сравнению с ФС1. Это свидетельствует о перераспределении поглощенной энергии между двумя фотосистемами в пользу ФС1 в

результате перехода из состояния 1 в состояние 2, а также из-за снижения содержания ФС2 по отношению к ФС1 (рис. 3.2Б) в голодающих клетках.

3.3. Циклический транспорт электронов вокруг ФС1

ЦЭТ является наиболее важным альтернативным путем электронного транспорта в хлоропласте, в ходе которого электроны переносятся с железо-серных кластеров ФС1 на Фд (или далее на НАДФ+), а затем возвращаются в пул ПХ и на ФС1, замыкая цикл (с.с.). Согласно современным представлениям, ЦЭТ в зеленых микроводорослях является редокс-зависимым механизмом, активация которого обусловлена, главным образом, накоплением восстановителя в стромах хлоропласта (Rumeau et al. 2007, Tikhonov 2015). Стандартным подходом для оценки активности ЦЭТ является измерение кинетики светоиндуцированного окисления первичного донора электронов P_{700} в ФС1 (Schreiber et al. 1988). В адаптированных к темноте образцах P_{700} находится в нейтральном состоянии и переходит в стационарно окисленное состояние (P_{700}^+) на свету в отсутствие притока электронов от ФС2. Для окисления P_{700} при 'выключенном' состоянии ФС2 образцы из высших растений освещают дальним красным светом (710-740 нм), который возбуждает преимущественно ФС1. В отличие от растений, ФС1 зеленых водорослей плохо поглощает дальний красный свет, поэтому для окисления P_{700} водорослевые клетки сначала обрабатывают диуроном для блокировки ФС2, а затем освещают светом ФАР высокой интенсивности. В стандартных условиях роста, когда преобладает линейный транспорт электронов, освещение образца индуцирует полное окисление P_{700} в течение достаточно короткого периода времени: от нескольких десятков до нескольких сотен миллисекунд в зависимости от типа образца и интенсивности вспышки. В условиях преобладания ЦЭТ, например, при недостатке CO_2 или низкой активности цикла Кальвина, накопление P_{700}^+ на свету протекает медленней из-за одновременного восстановления P_{700}^+ электронами, вовлеченными в цикл. При этом снижается амплитуда изменения сигнала, указывая на неполное окисление P_{700} даже при длительном световом импульсе.

На рис. 3.7 приведены светоиндуцированные изменения сигнала ΔA_{810} , отражающие редокс переходы P_{700} в контрольных и голодающих 24 и 48 ч. по сере клетках *S. reinhardtii*, предварительно обработанных 10 мкМ диурона. Изменения в контрольных клетках (кривая 2) характеризовались быстрым начальным подъемом ΔA_{810} примерно на 30% от максимальной амплитуды и последующим снижением сигнала в течение примерно

100 мс. Эти изменения отражают частичное окисление P_{700} сразу после включения света и последующее восстановление P_{700}^+ электронами, донорами которых являются молекулы ПХ пула, находящиеся в восстановленном состоянии на момент начала измерения.

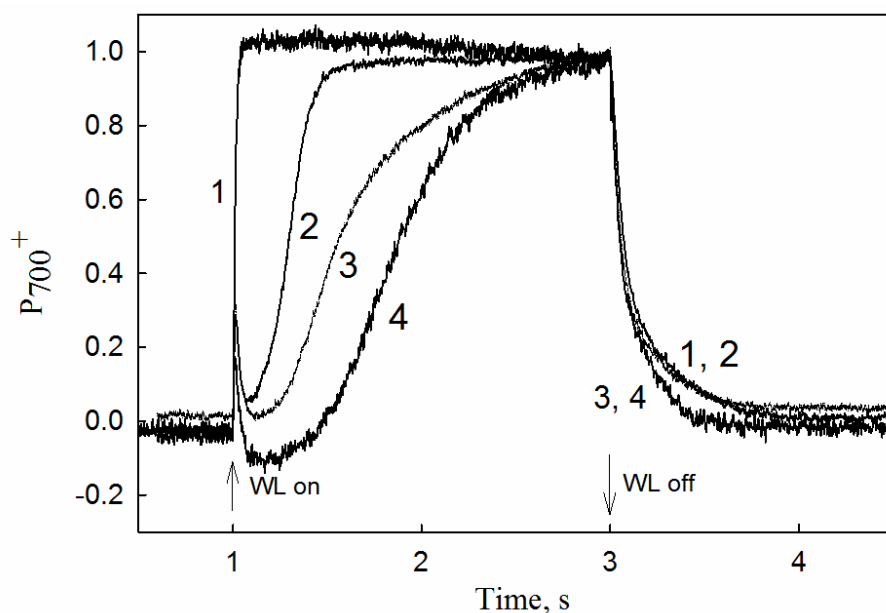


Рис. 3.7. Светоиндуцированные изменения сигнала ΔA_{810} (редокс состояния P_{700}) в контрольных клетках *S. reinhardtii* (кривые 1 и 2), через 24 ч. (кривая 3) и 48 ч. (кривая 4) инкубации без серы.

Кривую 1 измеряли в присутствии 0.5 мМ МВ для прерывания ЦЭТ. Кривые нормированы на разницу между начальным (темновым) и максимальным уровнем. Стрелками указаны моменты включения и выключения света. Измерения проводили на приборе РАМ101.

Транзиторное снижение ΔA_{810} сменялось основной фазой роста сигнала до выхода на стационарный (максимальный) уровень примерно через 500 мс освещения. Как известно, метил виологен эффективно окисляет ФС1 и, таким образом, прерывает ЦЭТ и снимает лимитирование электронного транспорта на акцепторной стороне ФС1. Добавление этого реагента к контрольным клеткам приводило к исчезновению промежуточных фаз в кинетике и быстрому подъему ΔA_{810} до максимального уровня в течение нескольких десятков миллисекунд. Обнаруженные отличия между кривыми 1 и 2 указывают на то, что в контрольных клетках при темновой адаптации ПХ пул находится в частично восстановленном состоянии, что приводит к появлению промежуточной фазы восстановления P_{700}^+ . Частичное восстановление ПХ пула в темноте характерно для *S. reinhardtii* в присутствии экзогенного ацетата. Серное голодание оказывало существенное

влияние на время начала основной фазы роста ΔA_{810} и время выхода сигнала на максимальный уровень, которые возрастали с увеличением периода инкубации без серы. Так, время начала основной фазы роста возрастало со 100 мс в контроле до ~200 мс через 24 ч инкубации без серы и до 400 мс через 48 ч. В голодающих клетках уровень сигнала ΔA_{810} выходил на максимум намного позже, чем в контроле – примерно через 2 с освещения. Наблюдаемые изменения в голодающих клетках свидетельствуют о высокой активаности ЦЭТ на свету и о значительном восстановлении ПХ пула в реакциях хлородыхания в темноте.

После выключения света происходит восстановление P_{700}^+ , в основном, за счет реакций транспорта электронов из ПХ пула. На редокс состояние ПХ пула после выключения света влияют продолжающиеся какое-то время в темноте реакции ЦЭТ, а также реакции хлородыхания. Как можно ожидать, темновое восстановление P_{700}^+ протекало быстрее в голодающих клетках по сравнению с контролем и образцами, обработанными МВ (рис. 3.7). Эти изменения отражают более высокую скорость переноса электронов из стромы в ПХ пул после выключения света в голодающих клетках.

3.4. Псевдоциклический транспорт электронов и хлородыхание

Кроме ЦЭТ к важным альтернативным путям электронного транспорта в хлоропласте относятся т.н. циклы ‘вода-вода’, осуществляющие безопасное восстановление кислорода до воды с использованием электронов из фотосинтетической ЭТЦ (Curien et al. 2016). В хлоропласте *C. reinhardtii* к этим реакциям относятся светоиндуцированные процессы псевдоциклического транспорта электронов, протекающие при участии ферментов реакции Меллера и флавопротеинов FlvA/B, а также реакции хлородыхания (рис. 1.5).

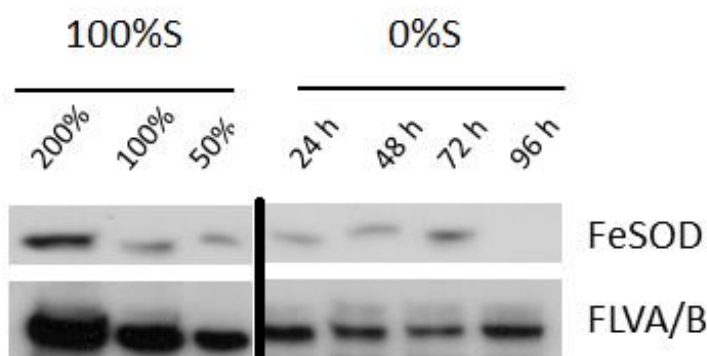


Рис. 3.8. Вестерн блот анализ активности Fe-COD и Flv A и B в хлоропласте *C. reinhardtii* в контроле и в условиях аэробной инкубации без серы.

Проведенное в работе исследование влияния дефицита серы на псевдоциклический транспорт электронов в клетках *C. reinhardtii* выявило снижение содержания белков СОД, FlvA и FlvB в голодающих клетках (рис. 3.8). В таблице 3.3 приведены данные по активности супероксиддисмутазы и каталазы в жидкой фазе клеточных экстрактов из контрольной и голодающей 24 и 72 ч культуры *C. reinhardtii*. Приведенные данные указывают на снижение активности обоих антиоксидантных ферментов на 40-50% при серном голодании, что согласуется с уменьшением содержания СОД в клетке. Общая антиоксидантная активность клеточных экстрактов также последовательно снижалась в ходе серного голодания. Эти результаты свидетельствуют о негативном воздействии минерального стресса на содержание отдельных компонентов псевдоциклических путей и антиоксидантную активность. При этом, имеющиеся литературные данные указывают на рост активности аскорбат пероксидазы и значительное увеличение концентрации аскорбата в голодающих по сере клетках водорослей (Salbitani et al. 2015, Nagy et al. 2016).

Таблица. 3.3. Активность СОД, каталазы и общая антиоксидантная активность (ОАА), определенные в общей растворимой фракции клеточных экстрактов, полученных из контрольной культуры *C. reinhardtii* (0 ч) и через 24 и 72 ч аэробной инкубации без серы. В скобках указаны значения в процентах от величины в контроле.

	СОД усл. ед. (мг белка) ⁻¹	Каталаза усл. ед. (мг белка) ⁻¹	ОАА мкмоль л ⁻¹
0 ч	2.03±0.65 (100)	40.2±6.3 (100)	323.5±29.7 (100)
24 ч	–	23.3±1.1 (58)	252.1±7.9 (77)
72 ч	1.03±0.35 (50)	24.1±8.6 (60)	180.7±17.8 (56)

Далее нами были проведены измерения активности ферментов хлордыхательной цепи - НДГ2 и РТОХ - на разных этапах инкубации *C. reinhardtii* без серы. Определение активности НДГ2 проводили в препаратах тилакоидных мембран по скорости темнового восстановления ДХФИФ в присутствии НАДН и НАДФН. Полученные результаты выявили значительное снижение активности НДГ2 в препаратах из голодающих по сере водорослей: на 56% через 48 ч и на 73% через 60 ч инкубации без серы (табл. 3.2). Относительную активность РТОХ в клетках *C. reinhardtii* определяли по скорости темнового поглощения кислорода в присутствии ингибиторов дыхательной цепи

митохондрий: миксотиазола, ингибирующего активность цитохрома *bc₁* (комплекс III), и СГ – ингибитора альтернативной оксидазы. При этом допускали, что скорость хлородыхания, т.е. скорость темнового поглощения кислорода в хлоропласте в присутствии вышеназванных ингибиторов отражает активность РТОХ. Так, ингибирование митохондриального дыхания в клетке должно приводить к перераспределению восстановителя из митохондрий в хлоропласт посредством малат-оксалоацетатного цикла. В результате этого возрастает концентрация восстановителя в строме, что приводит к субстратному насыщению реакции с участием РТОХ. На рис. 3.9 приведены результаты измерения активности РТОХ в клетках при инкубации без серы, которые выявили поступательный рост этого показателя с 26 в контроле до 38 мкмоль O₂ (мгХл ч)⁻¹ через 72 ч голодания.

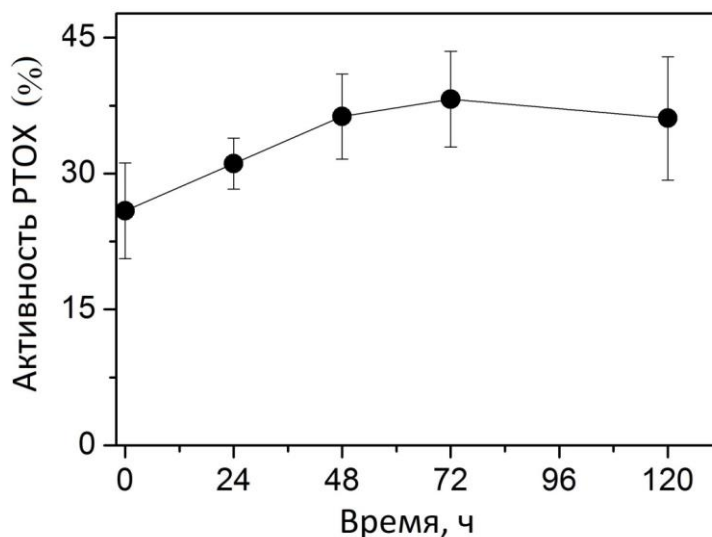


Рис. 3.9. Изменения активности РТОХ в клетках *C. reinhardtii* при серном голодании.

Несмотря на наблюдаемое снижение активности НДГ2 и одновременный рост активности РТОХ в голодающих клетках, уровень восстановленности ПХ пула возрастал в условиях дефицита серы, о чем косвенно свидетельствуют результаты измерений редокс переходов P_{700} (рис. 3.7). Для того, чтобы оценить соотношение между скоростями нефотохимического восстановления и окисления ПХ пула в условиях дефицита серы, мы провели измерения кривых темнового затухания ФХ после вспышки, полностью восстанавливающей ПХ пул (рис. 3.10). Для этого выдерживали образцы клеток *C. reinhardtii* 5 мин в темноте, затем освещали насыщающим светом в течение 2 с и

одновременно проводили регистрацию индукционной кривой ФХ, а после вспышки измеряли кривую темновой релаксации ФХ. Хорошо известно, что насыщающая вспышка длительностью 0.5 – 2.0 с индуцирует полное восстановление ПХ пула и, соответственно, полное закрытие центров ФС2 (Schreiber et al. 2004). Последующая темновая релаксация ФХ отражает обратный переход центров ФС2 в открытое состояние, кинетики которого определяется соотношением между реакциями темнового окисления и восстановления ПХ пула. Из рисунка видно, что скорость темнового затухания ФХ значительно снижалась в голодающих клетках, что свидетельствует об изменении баланса между процессами темнового окисления и восстановления ПХ пула в пользу последнего. Принимая во внимание тот факт, что активность РТОХ не снижалась, а возрастала в голодающих клетках, а активность НДГ2, наоборот, падала, то полученный результат указывает на значительный рост содержания восстановительных эквивалентов в строме хлоропласта.

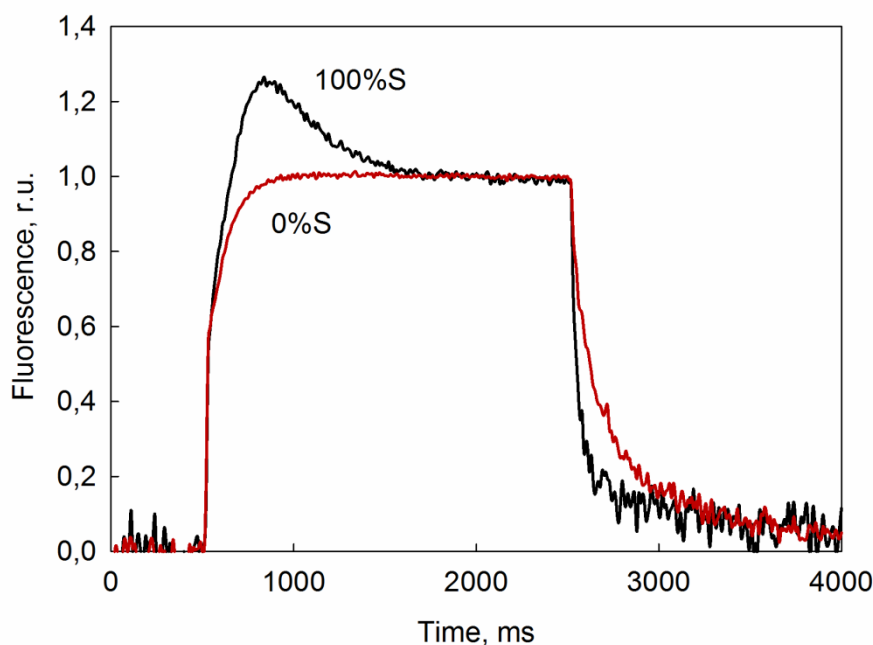


Рис. 3.10. Кинетические кривые роста и затухания ФХ, измеренные в контрольных (100%S) и голодающих 24 ч (0%S) клетках *C. reinhardtii* с помощью флуориметра РАМ 2000.

Кривые нормированы на амплитуду между выходом ФХ в темноте и через 2 с. после начала освещения.

Глава 4. Функциональное состояние ФС2 в клетках *C. reinhardtii* в условиях недостатка серы

4.1. Пути инактивации ФС2

Как показано в предыдущей главе, дефицит серы индуцирует снижение содержания интегральных белков и активности ФС2 в клетках *C. reinhardtii*. Очевидно, что эти изменения могут рассматриваться в качестве адаптационного механизма, направленного на снижение генерации АФК и окислительного стресса. В данной главе подробно исследовали особенности функционального состояния ФС2 в голодающих клетках в связи развитием деструктивных и протекторных механизмов.

Для подробной *in vivo* оценки ППФ в голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* измеряли и анализировали кинетические кривые световой индукции ФХ высокого разрешения (ОЛР кривые) на разных стадиях голодания (рис. 4.1). На ОЛР кривых в контрольной культуре (0 ч) отчетливо видны три фазы роста ФХ: ОJ (0-2 мс), JI (2-30 мс) и IP (20-200 мс), отражающие последовательное восстановление акцепторной стороны ФС2, пула ПХ и всей фотосинтетической ЭТЦ, соответственно (Schansker et al. 2005). Кривые в голодающих клетках характеризовались упрощенной двухфазной формой из-за отсутствия промежуточной фазы JI (рис. 4.1А). Из рисунка видно, что дефицит серы индуцировал значительный рост выхода ФХ, включая F_o (уровень О на кривой) и F_m (максимум Р на кривой), особенно после 24 ч инкубации. В частности, величина F_m возросла почти в два раза в течение 72 ч инкубации без серы. Подробнее феномен роста выхода ФХ будет рассмотрен далее в этой главе.

Амплитуда ОР на ОЛР кривой характеризует максимальную величину переменной ФХ (F_v), а нормированная амплитуда ОР отражает фотохимическую активность ФС2 в адаптированном к темноте состоянии - F_v/F_m . Снижение F_v/F_m в условиях стресса обусловлено накоплением центров ФС2, не способных к светоиндуцированному восстановлению Qa из-за нарушения структуры и функциональных свойств ФС2. Для удобства представления данных кривые на рис. 4.1Б нормировали не на максимальный, а на начальный уровень ФХ F_o . Из нормированных кривых видно, что дефицит серы индуцировал значительное снижение переменной ФХ.

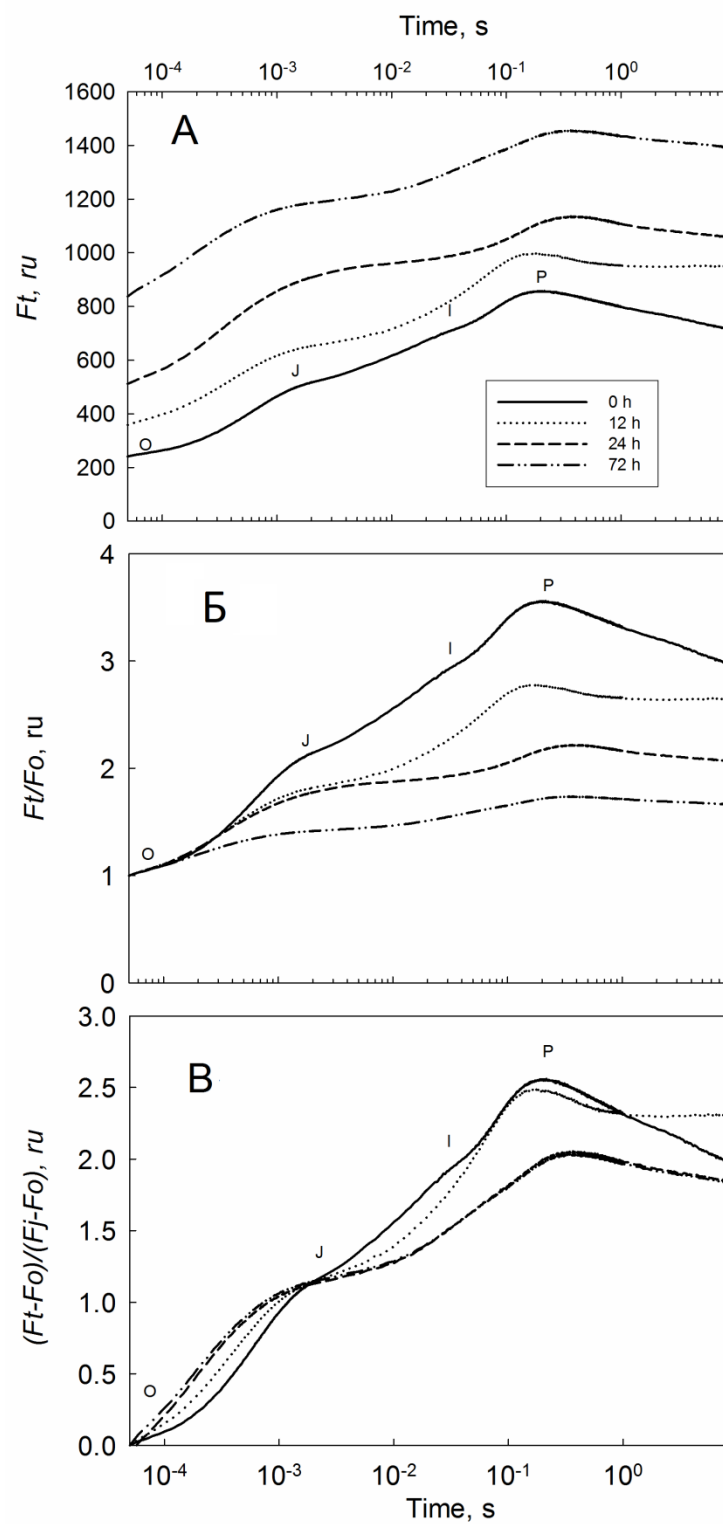


Рис. 4.1. Индукционные кривые ФХ (ОЖР) клеток *C. reinhardtii* в контроле (0 ч) и при инкубации без серы в течение 12, 24 и 72 ч.

А – оригинальные кривые, Б – кривые, нормированные на начальный выход ФХ F_o , В – кривые, нормированные на амплитуду фазы ОЖ. Измерения проводили на приборе HandyPEA при интенсивности возбуждающего света $2000 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Таблица 4.1. Параметры JIP теста, рассчитанные из индукционных кривых ФХ на рис. 4.1. Значения в скобках соответствуют процентам от величины в контроле (0 ч.).

Параметры	Длительность инкубации без серы, ч			
	0	12	24	72
JIP теста				
M_o	0.58(100)	0.82(141)	1.22(210)	1.4(241)
$1-V_j$	0.55(100)	0.54(98)	0.37(67)	0.40(72)
S_M	155(100)	148(95)	120(77)	118(76)
$\Phi_{Po} (F_v/F_m)$	0.72(100)	0.58(80)	0.46(65)	0.33(46)
$t_{(FM)}$	215(100)	177(82)	350(163)	366(170)
q_E	0.15(100)	0.05(33)	0.06(40)	0.04(27)

Для анализа OJIP кривых широко используется JIP тест (Strasser and Strasser 1995). В таблице 4.1 приведены значения некоторых параметров JIP теста, рассчитанные из кривых на рис. 4.1. Как видно из данных, дефицит серы приводил к снижению величины F_v/F_m на 35% и 54% через 24 ч и 72 ч, соответственно, что согласуется с результатами, полученным *in vitro* на препаратах тилакоидных мембран (табл. 3.2).

На рис. 4.1В приведены кривые, нормированные на амплитуду OJ. Из рисунка видно, что амплитуда фазы JP значительно снижалась в голодающих клетках. Относительный вклад фазы JP в переменную ФХ характеризует вероятность переноса электрона с Qa в ПХ пул и соответствует параметру JIP теста ($1-V_j$), величина которого снижалась примерно на 30% за 24 ч и слабо изменялась при более длительной инкубации без серы (табл. 4.1). Снижение амплитуды JP при действии стрессовых факторов отражает накопление т.н. Qb-невосстанавливающих центров ФС2 с заблокированным электронным транспортом между Qa и ПХ (Strasser et al. 2004). Такие центры способны к восстановлению Qa, то есть характеризуются нормальной величиной F_v/F_m , однако они не могут окислять воду и восстанавливать ПХ пул, как и центры, обработанные диуроном (Horton and Croze 1979, Henrysson and Sundby 1990). Другой параметр JIP теста – площадь

над OJР кривой, нормированная на амплитуду ОР (S_M). Величина этого параметра пропорциональна количеству срабатываний центров ФС2 на насыщающем свете до полного восстановления Qa. Параметр S_M так же, как и $(1-V_j)$, характеризует электронный транспорт на акцепторной стороне ФС2 и содержание Qb-невосстанавливающих центров. Приведенные в табл. 4.1 изменения величины S_M в голодающих клетках качественно соответствуют изменениям параметра $(1-V_j)$. Полученные результаты свидетельствуют о преимущественном накоплении Qb-невосстанавливающих центров в течение первых суток инкубации без серы.

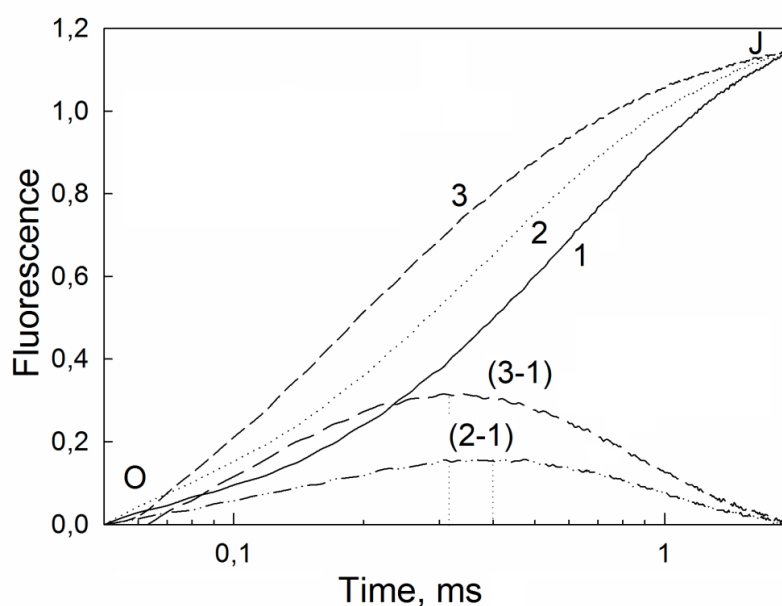


Рис. 4.2. Фаза OJ на OJР кривых, измеренных в суспензии *C. reinhardtii* в стандартных условиях роста (кривая 1), через 12 ч (кривая 2) и 24 ч (кривая 3) инкубации без серы.

Кривые нормированы на амплитуду OJ. Разностные кривые получены вычитанием контрольной кривой 1 из кривых 2 и 3, измеренных в голодающих клетках.

На рис. 4.1В также видно, что в голодающих клетках скорость начального подъема ФХ была выше, чем в контроле. Параметр JР теста M_0 является аппроксимацией начального наклона кривой. Величина M_0 возрастала в условиях дефицита серы в полтора раза через 12 ч инкубации и в 2 раза через 24 ч (табл. 4.1). Имеющиеся в литературе данные указывают на то, что эти изменения отражают появление центров ФС2 без КВК. Так известно, что индукционные кривые ФХ в образцах ФС2 без КВК характеризуются

быстрым подъемом ФХ до максимального значения примерно через 300 мкс освещения (т.н. пик К), затем интенсивность ФХ падает (Strasser 1997). При этом разница между кривыми, нормированными по амплитуде ОJ и измеренными в образцах, в которых часть ФС2 не содержит КВК и в образцах с полностью активным КВК, должна выявлять пик К. На рис. 4.2 приведены нормированные кинетики начального подъема ФХ (OJ), соответствующие кривым в контроле (0 ч) и через 12 и 24 ч инкубации без серы (рис. 4.1B), а также рассчитанные кривые, полученные вычитанием кривой в контроле из кривых, измеренных в голодающих клетках. Разностные кривые отчетливо выявили пик с максимумом около 300 мкс, свидетельствуя об аккумуляции центров ФС2 без КВК. Этот результат согласуется с имеющимися в литературе данными о разрушении КВК в голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* из-за избыточного накопления аскорбата (Nagy et al. 2016).

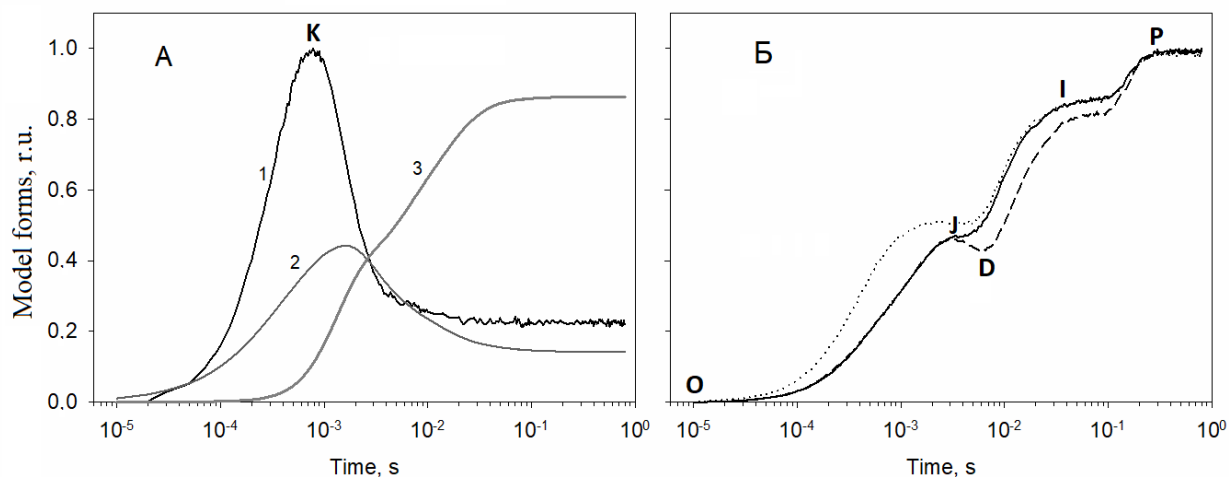


Рис. 4.3. Теоретические кривые световой индукции ФХ и редокс переходов Qa и P₆₈₀ при разной активности КВК, рассчитанные с использованием Монте-Карло модели ППФ.

А – изменения интенсивности ФХ (кривая 1), количества Qa⁻ (кривая 2) и содержания P₆₈₀⁺ (кривая 3) при полном отсутствии КВК в ФС2. Б – OJIP кривые при полностью функциональном состоянии КВК (сплошная линия), при отсутствии КВК у 50% ФС2 (точечная линия), и при снижении скорости разложения воды в КВК в 2 раза (тире). Кривые на рис. Б нормированы на амплитуду OP.

Для подтверждения ‘донорного’ механизма наблюдаемого роста M₀ мы изучили взаимосвязь между функциональным состоянием КВК и формой OJIP кривых с помощью разработанной модели ППФ (рис. 4.3). Полная инактивация КВК в модели приводила к появлению пика с максимумом около 600 мкс, соответствующего пику К на экспериментальных кривых (рис. 4.3А). На рисунке также приведены кинетики редокс переходов Qa и P₆₈₀, из которых следует, что положение пика К определяется, в основном,

изменениями редокс состояния Q_a . Так, начальный подъем ФХ до пика К отражает транзитное восстановление Q_a , после которого выход ФХ постепенно снижается из-за ре-окисления Q_a^- вторичным хинонным акцептором Q_b при отсутствии поступления новых электронов с КВК. Однако максимум восстановления Q_a на теоретической кривой приходился на время около 2х мс, что значительно позднее пика ФХ. Это объясняется влиянием тушения ФХ катионным радикалом P_{680}^+ , концентрация которого начинала возрастать с 200 мс. На рис. 4.3Б показаны симуляции ОЖР кривых для трех состояний модельной системы: 1) 100% ФС2 имеют полностью активный КВК; 2) 50% ФС2 имеют полностью активный КВК и 50% не имеют КВК; 3) 100% ФС2 имеют КВК, активность которого составляет 50% от максимальной, т.е. константа скорости лимитирующей реакции $S3 \rightarrow (S4) \rightarrow S0$ снижена в два раза. На рисунке видно, что введение в модель 50% центров ФС2 без КВК приводило к росту скорости начального подъема ФХ (ОJ) на нормированных кривых; данный эффект аналогичен наблюдаемому на экспериментальных кривых (рис. 4.1В). При снижении константы скорости окисления воды в КВК в два раза наблюдался другой эффект, а именно, транзитное снижение ФХ после перегиба J из-за накопления тушителя P_{680}^+ . Результаты моделирования указывают на накопление центров ФС2 без КВК в голодающих по сере клетках, а не на замедление скорости оборота КВК.

Время, за которое кривая выходит на максимум Р (t_{FM}), соответствует времени полного восстановления фотосинтетической ЭТЦ и характеризует скорость электронного транспорта на самом медленном участке цепи. В голодающих 48 и 72 ч клетках величина t_{FM} возросла более чем в 1.5 раза по сравнению с контролем (табл. 4.1), что отражает снижение активности ФС2, которая становится лимитирующим звеном фотосинтетического электронного транспорта в условиях дефицита серы.

Снижение фотохимической активности ФС2 (F_v/F_m) в условиях стресса может быть следствием различных модификаций ФС2, включая фотодеструкцию D1 белка, энергетическое разобщение между антенной и реакционным центром, стабилизацию редокс состояний P_{680}^+ и Q_a^- , др. Ранее были предложены основные механизмы деструкции ФС2 в условиях дефицита серы, включающие снижение скорости репарации D1 белка и ингибирование по донорному механизму в результате разрушения КВК (Nagy et al. 2016). Для дальнейшего выяснения механизмов инактивации ФС2 использовали метод пико- наносекундной лазерной флуорометрии, позволяющий охарактеризовать быстрые процессы фотохимического преобразования энергии. На рис. 4.4 показаны кривые затухания ФХ, а в таблице 4.2 – результаты мультиэкспоненциального анализа

этих кривых. Из рисунка видно, что ФХ, индуцированная лазерным импульсом пикосекундного временного диапазона, полностью затухала в течение 5-6 нс; при этом падение ФХ происходило медленнее в голодающих клетках по сравнению с контролем. Анализ кривых выявил наличие трех экспоненциальных компонентов, связанных с ФС2 (Hodges and Mova 1987). Быстрый компонент отражает миграцию энергии из антенны в реакционный центр, средний - первичное разделение и рекомбинацию зарядов, а происхождение медленного компонента связано с антенными комплексами, у которых отсутствует энергетическая связь с центрами ФС2. В контрольных клетках *C. reinhardtii* относительная амплитуда и время жизни быстрого экспоненциального компонента составили 55% и 134 пс, среднего – 42% и 0.9 нс, а медленного – всего 2.4% и около 3 нс, соответственно (табл. 4.2). Наблюдаемое на рисунке замедление затухания ФХ в голодающих клетках происходило, главным образом, в результате практически двукратного роста времени жизни среднего компонента, а также пятикратного роста амплитуды медленного компонента. Эти результаты свидетельствуют об изменении баланса между первичным разделением и рекомбинацией зарядов, а также об энергетическом разобщении между центрами и антенной ФС2 в голодающих клетках.

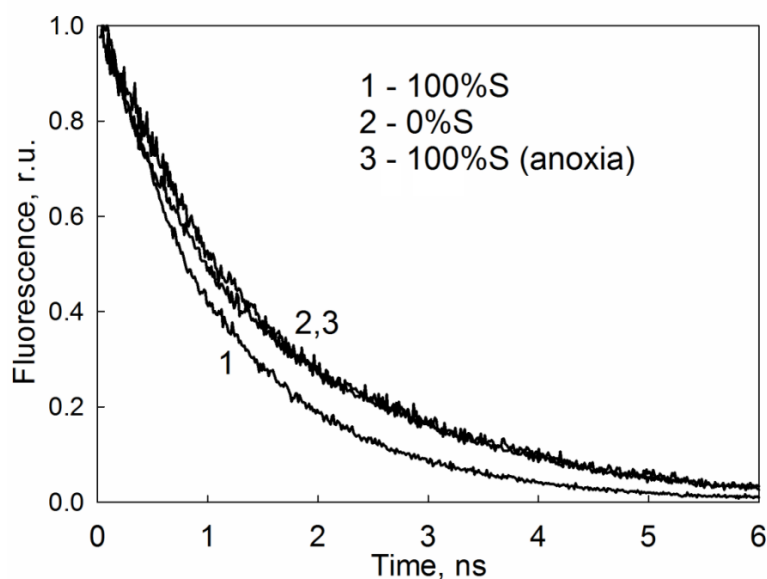


Рис. 4.4. Кинетики затухания ФХ в наносекундном диапазоне в контрольных клетках *C. reinhardtii* (кривая 1), через 48 ч инкубации без серы (кривая 2) и в условиях с искусственно восстановленным Qa (кривая 3).

Мы обнаружили, что краткосрочная анаэробная инкубация контрольных клеток приводит к аналогичному эффекту замедления спада ФХ на кинетических кривых (рис. 4.4).

Таблица. 4.2. Результаты мультиэкспоненциального анализа кривых затухания ФХ в наносекундном диапазоне в клетках *C. reinhardtii* в контроле (0 ч) и на разных стадиях инкубации без серы. Перед измерениями суспензии продувались воздухом (1) или аргоном (2) в течение 15 мин. Величина стандартного отклонения не превышала 10%.

Время		Быстрый компонент		Средний компонент		Медленный компонент	
		А, %	τ , пс	А, %	τ , пс	А, %	τ , пс
0	1	55.2	134	42.4	870	2.4	2884
	2	51.3	132	43.8	1448	4.8	2733
24 ч	1	50.1	135	47.7	995	2.2	2074
	2	55.1	132	39.4	1501	3.3	2783
48 ч	1	50.2	125	36.8	1006	13.0	2202
	2	51.5	133	38.1	1165	10.4	2618
72 ч	1	53.3	118	37.0	1421	9.7	3270
	2	47.4	131	41.0	1712	11.6	3040

Из результатов анализа кривых в табл. 4.2 видно, что снижение скорости затухания ФХ в анаэробных условиях также обусловлено ростом времени жизни среднего компонента как и при дефиците серы. Как известно, анаэробноз индуцирует восстановление ПХ пула в клетках микроводорослей, что, в свою очередь, вызывает переход части центров ФС2 в закрытое состояние в соответствии с редокс балансом между ПХ и Qa (Corneille et al. 1998). Наблюдаемое увеличение времени жизни среднего компонента при восстановлении Qa, вероятно, связано со сдвигом равновесия в реакции $P_{680}^*Feo \leftrightarrow P_{680}^+Feo^-$ влево из-за электростатического отталкивания между Feo^- и Qa^- или конформационных изменений. Таким образом, полученные результаты указывают на

возможный рост содержания центров ФС2 с восстановленным Qa в голодающих клетках. Необходимо отметить, что восстановленное состояние Qa в этих центрах является стабильным и сохраняется при темновой адаптации и принудительной аэрации образцов. Стабилизация Qa⁻ в голодающих клетках может быть обусловлена рядом причин, включая сильно восстановленное состояние ПХ пула на свету и в темноте, протонирование с образованием QaH и нарушение прямого переноса электрона с Qa на Qb.

Для оценки изменения констант первичного разделения и рекомбинации зарядов в ФС2 при серном голодании проводили моделирование экспериментальных кривых затухания ФХ с использованием модели Шатца (рис. 2.6) (Volgusheva et al. 2007). На схеме показаны реакции диссипации возбуждения в антенне ФС2 и быстрые реакции переноса электронов в открытом и закрытом состоянии центра ФС2. В модели при расчете констант скоростей первичного разделения (k_I) и рекомбинации (k_{-I}) зарядов предполагали, что константа k_2 равна 3.3 ns^{-1} в открытом центре ФС2, когда она характеризует перенос электрона с Фео на Qa (Bernanding et al. 1994), и 2.3 ns^{-1} в закрытом центре ФС2, когда она характеризует рекомбинацию зарядов в триплетное или основное состояние P₆₈₀ (Gibasiewicz et al. 2001). Константу скорости тепловой дезактивации синглетного возбужденного состояния Хл (k_3) принимали равной 1.0 ns^{-1} (Shatz et al. 1988). Результаты моделирования выявили преимущественное снижение константы скорости первичного разделения зарядов с 7.3 до 2.5 ns^{-1} , а также рост константы скорости рекомбинации зарядов с 2.9 до 5.7 ns^{-1} в клетках *C. reinhardtii* через 72 ч голодания по сере. Это согласуется с гипотезой о сдвиге равновесия между возбужденными состояниями Хл и первично разделенными зарядами в сторону возбужденных состояний Хл.

Вышеприведенные результаты свидетельствуют о том, что дополнительными механизмами инактивации ФС2 в условиях серного голодания являются стабилизация Qa в восстановленном состоянии и энергетическое разобщение между антенной и центрами ФС2. Механизм перехода центров ФС2 в стабильно закрытое состояние не охарактеризован в достаточной степени в литературе и является, по-видимому, характерной особенностью минерального голодания, гипоксии, а также высокотемпературной инкубации микроводорослей (Чемерис и др. 1996). Существование данного механизма в голодающих клетках нашло дальнейшее подтверждение при анализе кинетических кривых ФХ, индуцированных светом с ПФПФ 12000 и измеренных с высоким разрешением в субмиллисекундном диапазоне на флуориметре Mega-25. На рис. 4.5 приведены кривые, снятые в контроле и через 24 и 72 ч инкубации без серы. Кривая в

контроле достигала промежуточного максимального уровня, который соответствует уровню J на ОЛР кривой, примерно через 700 мкс освещения, в то время как кривые в голодающих клетках выходили на промежуточный максимум раньше - через 300-400 мкс освещения. Нормировка кривых на начальное значение F_0 выявила снижение максимального уровня ФХ в голодающих клетках по сравнению с контролем, что отражает снижение переменной ФХ (рис. 4.5А). На рис. 4.5Б приведены кривые, нормированные одновременно на F_0 и величину ФХ через 600 мкс освещения. Из рисунка видно, что скорость роста ФХ была выше в образцах из голодающей культуры по сравнению с контролем. Этот результат качественно похож на полученный для нормированных ОЛР кривых (рис. 4.1В). Между тем, есть существенные отличия между механизмами начального подъема ФХ при интенсивности вспышки 2000 мкмоль фотонов m^{-2} и 12000 мкмоль фотонов m^{-2} . Как известно, ОJ фаза на ОЛР кривой отражает частичное восстановление не только Qa, но и Qb, и на нее оказывает сильное влияние состояние донорной стороны ФС2 (Stirbet and Govindjee 2011). В отличие от этого, функциональное состояние акцепторной и донорной стороны ФС2 практически не влияет на начальную фазу роста ФХ при интенсивности вспышки 12000 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$. Так, обработка клеток диуроном и ингибитором КВК гидроксиламином практически не оказывала воздействия на параметры кривой.

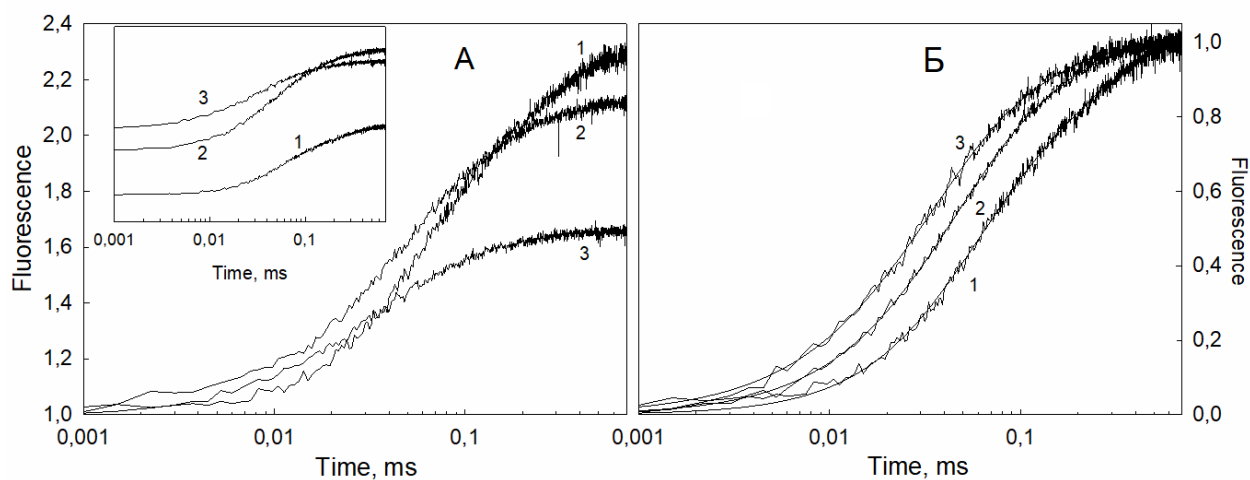


Рис. 4.5. Начальная фаза световой индукции ФХ в контрольной (кривая 1), голодающей 24 ч (кривая 2) и голодающей 72 ч (кривая 3) культуре *C. reinhardtii*.

Измерения проводили на приборе МЕГА-25 при интенсивности вспышки 12000 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$. Кривые нормированы на начальный выход ФХ через 1 мкс после начала измерения (А) и на величину амплитуды ФХ через 0.6 мс (Б). Оригинальные кривые приведены на вставке.

Анализ кривых индукции ФХ, приведенных на рис. 4.5, выявил наличие двух основных компонентов: быстрого сигмоидного и медленного экспоненциального (табл. 4.3). Сигмоидный компонент фитировали функцией вида $A_1(1-\exp(-t/\tau_1))^c$ как предложено ранее для ОI фазы ОIIP кривой, где параметр c является фактором сигмоидности (Joly and Carpentier 2009). Согласно классической интерпретации быстрый и медленный компоненты роста ФХ отражают вклад ФС2 α - и β -типа, соответственно (Melis and Nomann 1975). По современным представлениям первые представляют собой суперкомплексы, состоящие из двух ФС2, объединенных периферической антенной ССК2, а вторые относятся к одиночным фотосистемам без ССК2. Из-за отсутствия периферической антенны поперечное сечение поглощения ФС2 β типа в несколько раз ниже, чем ФС2 α типа. Сигмоидная форма кривой индукции ФХ в ФС2 α типа обусловлена наличием энергетического взаимодействия между центрами (Joliot and Joliot 1964), в первую очередь, внутри суперкомплекса, а также между близлежащими суперкомплексами.

Таблица 4.3. Результаты анализа начальной фазы роста ФХ на кривых, измеренных в культурах *C. reinhardtii* на разных стадиях инкубации без серы. Кривые приведены на рис. 4.5 и 4.6. При фитировании использовали функцию вида $(F(t) - F_0)/(F_{0.6ms} - F_0) = A_1(1-\exp(-t/\tau_1))^c + A_2(1-\exp(-t/\tau_2))$, где $F_{0.6ms}$ – выход ФХ на кривой через 0.6 мс освещения.

Время, ч	A ₁ , %	τ_1 , мс	c	A ₂ , %	τ_2 , мс
0	45.3	0.037	1.6	54.69	0.192
24	61.1	0.034	1.3	38.93	0.131
48	65.9	0.035	1.2	34.04	0.159
72ч	67.5	0.027	1.0	32.40	0.113
0 *	72.4	0.032	1.1	27.59	0.209

* – перед измерениями клетки инкубировались в анаэробных условиях для восстановления Qa

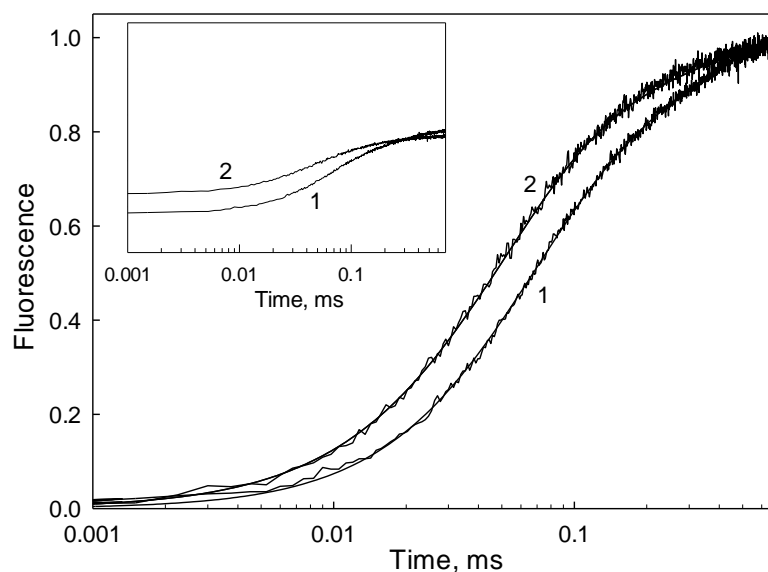


Рис. 4.6. Начальная фаза светоиндуцированного роста ФХ клеток *C. reinhardtii* в стандартных аэробных условиях (кривая 1) и через 15 мин адаптации к анаэробным условиям на низком свете (кривая 2).

Кривые нормированы на величину амплитуды ФХ через 0.6 мс от начала измерения. Оригинальные кривые приведены на вставке.

В контроле амплитуды быстрого и медленного компонентов составляли 45 и 55%, соответственно (табл. 4.3), указывая на значительное присутствие β ФС2 в водорослевых клетках. Несмотря на то, что фракции ФС2 α и β типа так и не были сепарированы и охарактеризованы в выделенном виде, можно предположить, что β комплексы предшествуют формированию полностью функциональных суперкомплексов в процессе синтеза или репарации ФС2 (Danielsson et al. 2006, Mamedov et al. 2008). У зеленых микроводорослей область гран в хлоропласте менее выражена, чем у высших растений, что может объяснять пониженное содержание ФС2 α типа по сравнению с высшими растениями. Из данных в таблице видно, что характеристическое время быстрого и медленного компонентов составляло в контроле 37 и 192 мкс, соответственно, а величина фактора сигмоидности – 1.6. Дефицит серы приводил к росту амплитуды и уменьшению времени быстрого компонента на 20% и 25%, соответственно, за 72 ч. Кроме того, значение фактора сигмоидности s снижалось до единицы, свидетельствуя об энергетическом разобщении между ФС2 α типа. Важно отметить, что сходные изменения, а именно, увеличение наклона подъема ФХ, рост амплитуды и уменьшение характеристического времени быстрого компонента, падение величины s наблюдались в контрольных водорослях при искусственном восстановлении Qa (см. рис. 4.6 и табл. 4.3).

Полученные результаты подтверждают высказанное нами предположение об аккумуляции состояний ФС2 с восстановленным Qa в голодающих клетках.

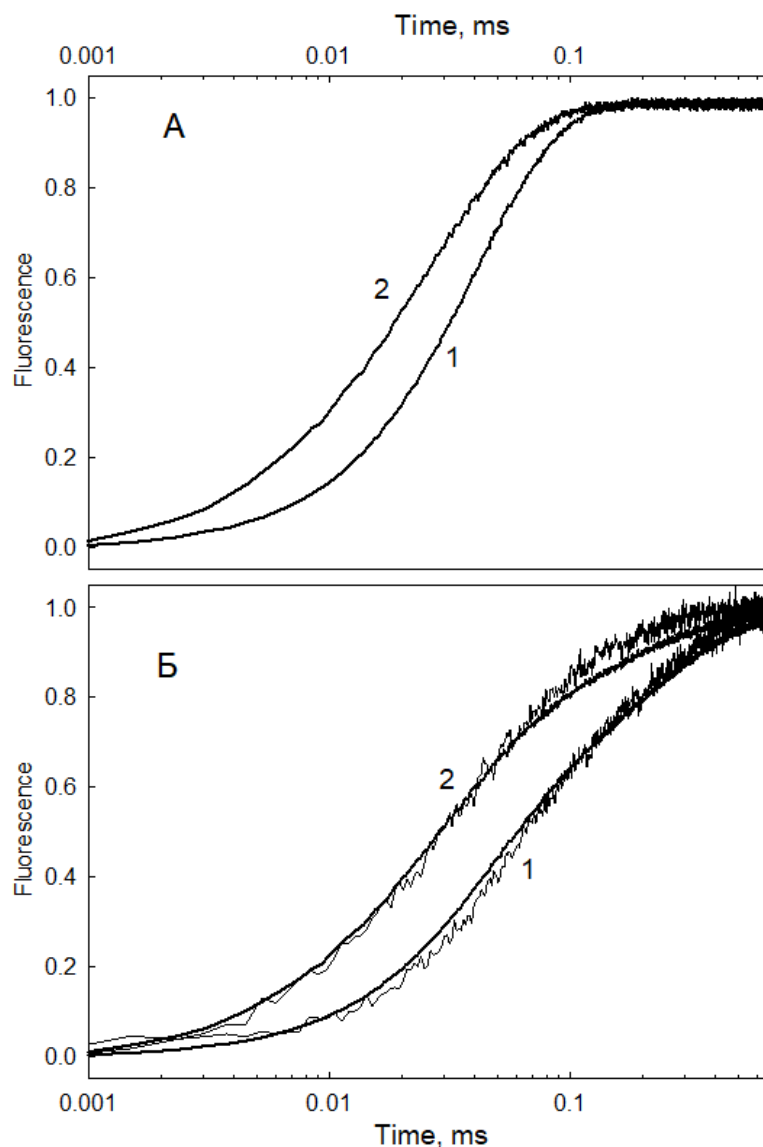


Рис. 4.7. Анализ начальной фазы роста ФХ с использованием Монте-Карло модели ППФ.

А – Моделирование кривой световой индукция ФХ в ФС2 α типа с двумя открытыми центрами ФС2 (кривая 1) и с одним открытым и одним закрытым центром (кривая 2). Б – Экспериментальные и рассчитанные кривые световой индукции ФХ, соответствующие контрольным (кривая 1) и голодающим 72 ч (кривая 2) клеткам *S. reinhardtii*. Экспериментальные кривые взяты из рис. 4.5.

Предположительно, механизмы наблюдаемых изменений на кривых индукции ФХ в условиях серного голодания или искусственного восстановления Qa могут быть связаны с появлением суперкомплексов ФС2 с одним открытым и одним закрытым центром. В этом случае можно ожидать увеличения скорости потока электронного возбуждения из антенны в открытый центр суперкомплекса благодаря дополнительному притоку

неиспользованной энергии из соседнего закрытого центра. При этом должна возрастать скорость светоиндуцированного восстановления Q_a и, соответственно, скорость начального подъема ФХ на кинетической кривой, а также снижаться величина фактора сигмоидности. Для проверки данного предположения в работе проводили моделирование кривых индукции ФХ с использованием Монте-Карло модели ППФ. В модели учитывали α и β типы ФС2 и вводили вероятность энергетического взаимодействия между центрами ФС2 в суперкомплексе. На рис. 4.7А показаны рассчитанные кривые световой индукции ФХ в суперкомплексах с двумя открытыми центрами (кривая 1) и с одним открытым и одним закрытым центром (кривая 2). Из рисунка видно, что в состоянии суперкомплекса с одним открытым и одним закрытым центром наблюдается увеличение скорости индукции ФХ. Очевидно, что в этом случае также происходит изменение формы кривой с сигмоидной (кривая 1) на экспоненциальную (кривая 2), поскольку сигмоидность указывает на обмен энергией между двумя открытыми центрами ФС2.

Механизмы относительного снижения вклада ФС2 β -типа в кинетику индукции ФХ при серном голодании и при искусственном восстановлении Q_a не очевидны. Возможно, что низкофункциональные ФС2 β -типа легче переходят в состояние со стабильно восстановленным Q_a , чем ФС2 α типа, например, из-за структурных особенностей. На рис. 4.7Б приведены результаты симуляции кривых индукции ФХ в контрольных (кривая 1) и голодающих 72 ч (кривая 2) клетках *S. reinhardtii*. Максимальное соответствие между экспериментальными и модельными кривыми было достигнуто, допуская, что через 72 ч инкубации без серы все суперкомплексы имеют один открытый и один закрытый центр ФС2.

4.2. Нефотохимическое тушение

4.2.1. Диссипативные процессы в антенне ФС2

Важным механизмом динамической регуляции потока энергии возбуждения в реакционный центр ФС2 является рН-зависимое нефотохимическое тушение. У зеленых микроводорослей этот механизм тушения связан, в основном, со светоиндуцированной экспрессией и протонированием белков семейства LHCSR и превращениями каротиноидов виолаксантинового цикла. Обычно адаптация фотосинтетического организма к стрессовым условиям сопровождается ростом NPQ как основного фотозащитного механизма (Brooks et al. 2014, Erickson et al. 2015).

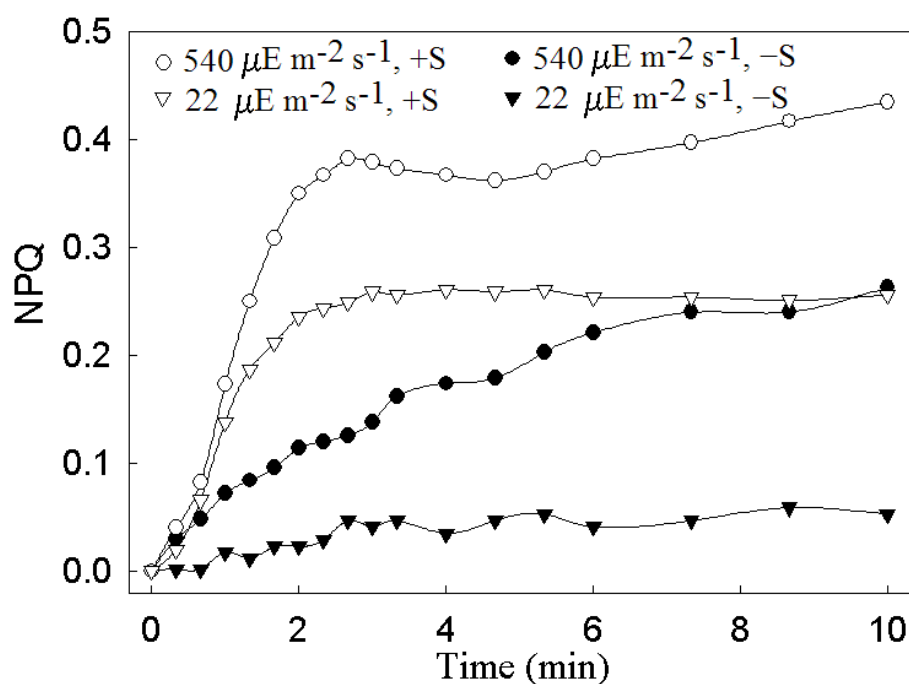


Рис. 4.8. Кривые световой индукции NPQ в контрольных (+S) и голодающих по сере 72 ч (-S) клетках *C. reinhardtii*.

NPQ индуцировали светом низкой и высокой интенсивности: 22 и 540 мкмоль фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, соответственно. Измерения проводили на приборе PAM2000.

На рис. 4.8 приведены кривые световой индукции NPQ при высокой и низкой интенсивности актиничного света, измеренные в контрольных и голодающих 72 ч по сере клетках *C. reinhardtii*. Из приведенных данных видно, что в голодающих клетках скорость роста и максимальный уровень NPQ не только не возрастали, но значительно снижались. Особенно это проявлялось при низкой интенсивности актиничного света, когда максимальный уровень NPQ в голодающих клетках составлял всего четверть от величины в контроле. Наблюдаемый отрицательный эффект стрессовых условий на NPQ может быть связан с нарушением механизма генерации транстилакоидного рН градиента вследствие значительного снижения фотосинтетического электронного транспорта и нарушения целостности тилакоидной мембраны. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты измерения световой индукции замедленной ФХ (ЗФ) в контрольных и голодающих 48 ч клетках, приведенные на рис. 4.9. Известно, что выход ЗФ модулируется электрическим потенциалом Ψ и рН градиентом в тилакоидной мембране, величина которых изменяется в процессе световой индукции фотосинтеза,

приводя к появлению двух последовательных фаз на кривой ЗФ (Маторин и др. 1978, Гольцев и др. 2014). Кривая индукции ЗФ в контрольных клетках характеризовалась Ψ -зависимой фазой 1 с максимумом при 1 мс и медленной рН-зависимой фазой 2 длительностью около 10 с. Как видно из рисунка, на кривых в голодающих клетках обе фазы были редуцированы практически до уровня в образцах, обработанных диуроном. Наблюдаемые изменения в голодающих клетках указывают на вероятную связь между нарушением NPQ и в целом низкой способностью генерировать ΔpH в тилакоидной мембране.

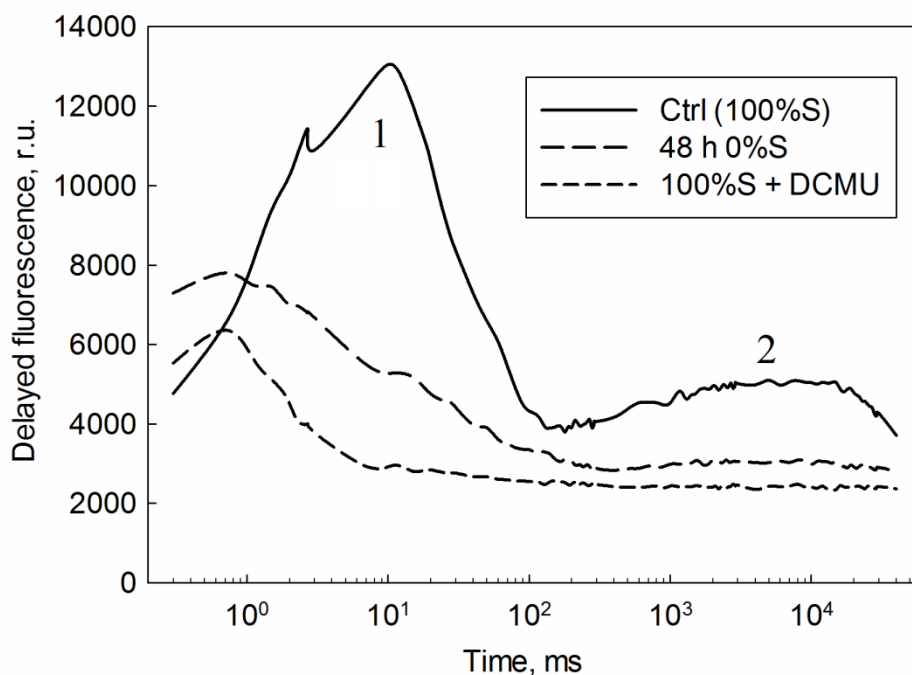


Рис. 4.9. Индукционные кривые замедленной ФХ, измеренные в контрольной культуре *C. reinhardtii* (100%S), через 48 ч инкубации без серы (0%S) и после обработки контрольных клеток 20 мкМ диуроном.

1 и 2 - Ψ и рН-зависимые пики, соответственно. Измерения проводили на приборе МРЕА2 при интенсивности возбуждающего света 2000 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹.

Также дефицит серы приводит к нарушению функционирования виолаксантинового цикла. В таблице 4.4 приведены нормированные на Хл данные по содержанию каротиноидов ксантофиллового цикла и лютеина в контрольных и голодающих 72 ч по сере клетках *C. reinhardtii* в условиях световой и темновой адаптации. Клетки *C. reinhardtii*, выращенные в стандартных условиях и адаптированные к темноте, характеризовались низким содержанием зеаксантина - около 3 ммоль (моль Хл *a*)⁻¹, которое возрастало на свету до 16 в результате рН-зависимой деэпоксидации

виолаксантина. Однако в голодающих клетках содержание зеаксантина было одинаково высоким в темноте и на свету и составляло 18 ммоль (моль Хл *a*)⁻¹, вероятно, из-за нарушения темновой эпоксидации зеаксантина. Подобное нерегулируемое светом накопление зеаксантина часто наблюдается при других стрессовых воздействиях, например, при адаптации хвойных растений к низким температурам (Софронова и др. 2014).

Таблица. 4.4. Содержание каротиноидов ксантофиллового цикла и лютеина в контроле (100%S) и голодающих по сере 72 ч (0%S) клетках *C. reinhardtii*. Перед измерениями клетки были адаптированы к темноте или свету интенсивностью 500 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹.

В - виолаксантин; А - антераксантин; З - зеаксантин; Лют - лютеин. Стандартное отклонение не превышало 5% при трех биологических повторностях.

	В/Хл <i>a</i> , ммоль моль ⁻¹	А/Хл <i>a</i> , ммоль моль ⁻¹	З/Хл <i>a</i> , ммоль моль ⁻¹	(В+А+З)/Хл <i>a</i> , ммоль моль ⁻¹	Лют/Хл <i>a</i> , ммоль моль ⁻¹
100%S (Темнота)	82	6	3	91	81
100%S (Свет)	65	8	16	89	81
0%S (Темнота)	94	6	18	118	119
0%S (Свет)	98	7	18	122	119

Несмотря на то, что световая индукция NPQ при серном голодании сильно подавлена, нерегулируемые светом диссипативные процессы в ФС2, по-видимому, возрастают в результате реорганизации структуры и состава антенных комплексов. В частности, дефицит серы приводил к увеличению содержания каротиноида лютеина, обладающего фотозащитным и антиоксидантным действием, на 45%, а также общего содержания каротиноидов виолаксантинового цикла на 30% (табл. 4.4). Согласно литературным данным, серное голодание стимулирует экспрессию белков LHCSR и PsbS (González-Ballester et al. 2010, Toepel et al. 2013), что способствует формированию

‘тушащей энергию’ конформации ФС2. Определенную фотозащитную роль может играть переход из состояния 1 в состояние 2 (Cardol et al. 2009).

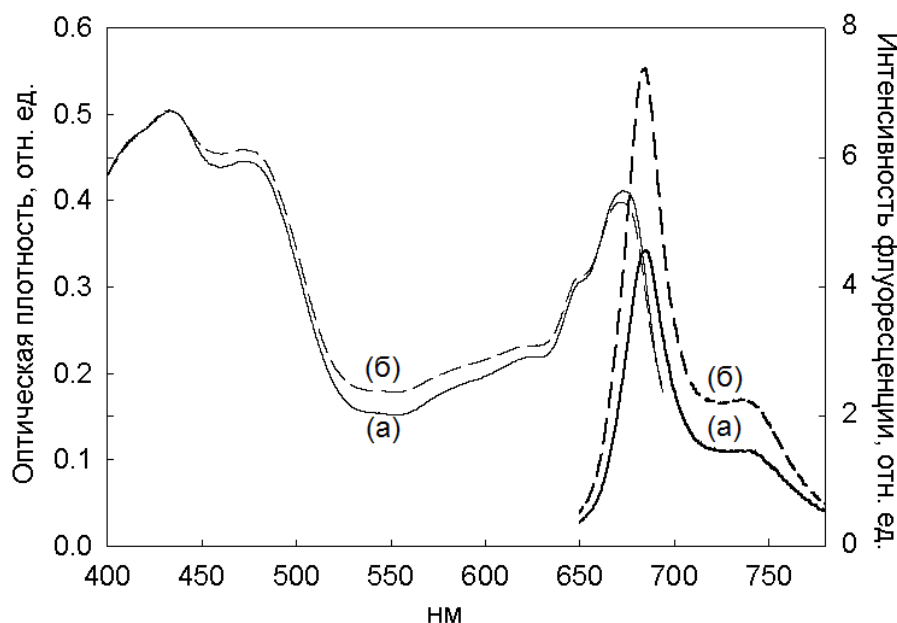


Рис. 4.10. Спектры поглощения и спектры испускания ФХ, измеренные в суспензиях клеток *C. reinhardtii* в контроле (а) и через 48 ч инкубации без серы (б).

Как упоминалось выше, при серном голодании наблюдается значительный рост выхода ФХ, что может рассматриваться как специфический механизм диссипации энергии в антенне ФС2. На рис. 4.10 приведены спектры поглощения и испускания ФХ, измеренные в суспензиях клеток *C. reinhardtii* в контроле и через 48 ч инкубации без серы. Предварительно суспензии клеток разводились свежей средой с целью выровнять спектры поглощения в обеих культурах по максимальному значению в коротковолновой области (440 нм). После этого измеряли спектры испускания ФХ, которые выявили значительное превышение сигнала в голодающих клетках по сравнению с контролем. Так, интегрирование спектра испускания ФХ от 660 до 770 нм показало увеличение площади под спектральной кривой в голодающих клетках в 2.2 раза по сравнению с контролем.

Далее мы исследовали динамику изменения параметров F_o и F_m , нормированных на Хл, при инкубации *C. reinhardtii* на полной среде и на среде без серы в течение 72 ч (рис. 4.11). Из рисунка видно, что выход ФХ на единицу Хл возрастал, в основном, в период с 24 до 48 ч инкубации без серы. Отношение F_m /Хл возрастало в 2.4 раза в течение 72 ч

голодания, что согласуется с данными на рис. 4.10. Необходимо отметить, что общее содержание Хл в клетках *C. reinhardtii* сохранялось достаточно стабильным при инкубации без серы (табл. 3.1), поэтому рост $Fm/Xл$ не являлся следствием обесцвечивания клеток или изменения их оптических свойств. Это предположение подтверждается сходной формой спектров поглощения контрольных и голодающих клеток (рис. 4.10). В отличие от Fo , изменения выхода Fm не зависят от соотношения открытых и закрытых ФС2 и свидетельствуют либо об изменении поперечного сечения поглощения ФС2, либо о снижении константы тепловой диссипации энергии, либо об увеличении константы скорости излучательной дезактивации энергии возбуждения. Наиболее вероятно, что в голодающих клетках возрастает константа излучательной дезактивации энергии в антенне ФС2, что может быть связано с перестройкой антенны ФС2 при адаптации к дефициту серы, в том числе, с изменением стехиометрии субъединиц ССК2 (Nguyen et al. 2008).

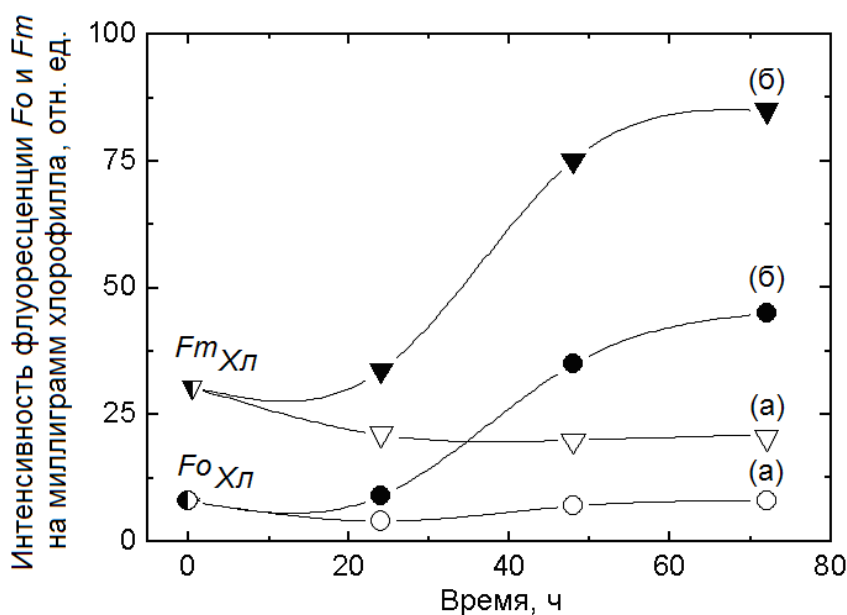


Рис. 4.11. Изменения относительного выхода ФХ при инкубации *C. reinhardtii* на стандартной среде (а) и на среде без серы (б).

Минимальный (круг) и максимальный (треугольник) выход ФХ нормировали на величину концентрации Хл.

4.2.2. Модификации фотозащитного характера в центрах ФС2

В настоящее время широкое признание получила гипотеза о фотозащитной роли изменений редокс потенциалов хинонных акцепторов электронов Qa и Qb в ФС2 (Rutherford and Krieger-Liszkay 2001, Fufezan et al. 2007, Ivanov et al. 2008). Согласно этой гипотезе, противоположные изменения свойств Qa и/или Qb способствуют безопасной диссипации энергии в реакционных центрах ФС2. Так, переход Qa в высокопотенциальную форму сопровождается снижением константы скорости обратного переноса электрона с Qa на Фео, что уменьшает вероятность образования триплетных состояний хлорофилла и синглетного кислорода (рис. 1.3). К настоящему времени определены основные механизмы, индуцирующие сдвиг редокс потенциала Qa в положительную область, среди которых - разрушение КВК и диссоциация бикарбонатного аниона с места связывания с негемовым железом на акцепторной стороне ФС2 (Johnson et al. 1995, Brinkert et al. 2016). Было высказано предположение о том, что аффинность бикарбоната к месту связывания в ФС2 возрастает при восстановленном состоянии Qa (Brinkert et al. 2016). Как показано в настоящей работе дефицит серы индуцирует деструкцию КВК и переход Qa в восстановленную форму, что должно оказывать влияние на редокс потенциал Qa.

Для качественной оценки изменений редокс потенциалов переносчиков электронов в ФС2 использовали метод термолюминесценции. На рис. 4.12 приведены кривые термолюминесценции, измеренные в контрольных и голодающих 48 ч по сере клетках *S. reinhardtii* без добавок (пик 'B') и в присутствии диурона (пик 'Q'). В контрольных клетках *S. reinhardtii* пик 'B' имел максимум при 35°C ($T_m(B)=35$), а пик 'Q' - при 11 °C ($T_m(Q)=11$). В голодающих 48 ч. водорослях величина $T_m(B)$ уменьшалась на 7°C, а $T_m(Q)$ возросла на 4°C, что указывает на увеличение барьера энергии активации рекомбинации зарядов в паре S_2Qa^- и на снижение этого показателя в паре S_2Qb^- . Важно отметить, что основные изменения значений $T_m(B)$ и $T_m(Q)$ происходили в течение 12 ч инкубации без серы, т.е. на начальной стадии голодания (см. вставку к рис. 4.12).

Изменения значений $T_m(Q)$ и $T_m(B)$ отражают изменения редокс потенциалов основных вовлеченных редокс кофакторов: Qa, Qb и Mn кластера (Ivanov et al. 2002, Vass 2003). Очевидно, что противоположно направленные изменения $T_m(Q)$ и $T_m(B)$ указывают на изменения редокс потенциалов Qa и Qb в результате перехода Qa в высокопотенциальную форму, а Qb – в низкопотенциальную форму. Действительно, если бы в основном изменялись свойства Mn кластера, то это приводило бы к смещению обоих пиков в одном направлении. Это согласуется с нашим выводом о том, что серное

голодание индуцирует полное разрушение КВК в отдельных центрах ФС2, но не влияет на скорости реакций в функциональных КВК.

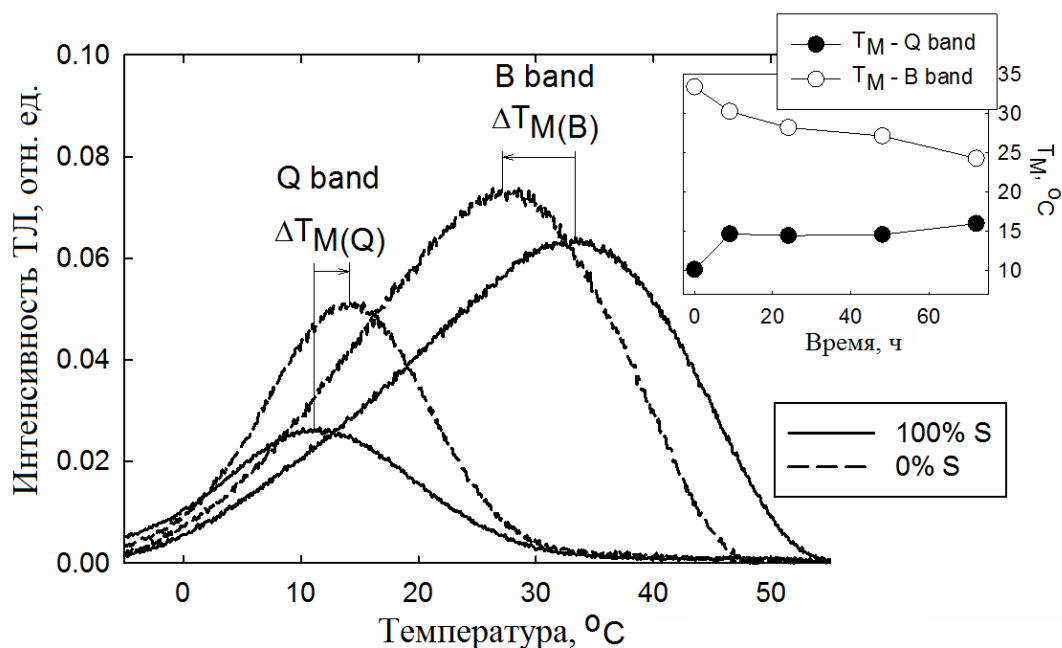


Рис. 4.12. Кривые термолюминесценции в контрольных (100%S) и голодающих 48 ч по сере (0%S) клетках *C. reinhardtii*, измеренные в присутствии диурана (пик 'Q') и без добавок (пик 'B'). На вставке показаны изменения величины T_M для пиков 'B' и 'Q' в ходе инкубации *C. reinhardtii* без серы.

Предположение о переходе Qa в высокопотенциальную форму подтвердилось прямыми измерениями средноточечного редокс потенциала в паре Qa/Qa^- , проведенными на препаратах тилакоидных мембран из клеток контрольной и голодающей 48 ч культуры *C. reinhardtii*. Для определения редокс потенциала Qa измеряли зависимость выхода ФХ (F_o) в препаратах мембран от редокс потенциала среды, который постепенно понижали от значений около 300 мВ, соответствующих окислительным условиям, до -300 мВ в восстановительных условиях путем титрования суспензии дитионитом и одновременной продувки аргоном. Результаты редокс титрования образцов из контрольной и голодающей культуры приведены на рис. 4.13. В препаратах из контрольных клеток увеличение выхода ФХ на 50% достигалось при значениях редокс потенциала среды около -50 мВ, что отражает величину средноточечного редокс потенциала в паре Qa/Qa^- . Полученное значение несколько ниже имеющихся в литературе данных (около -80 мВ), что может быть обусловлено свойствами препаратов мембран. У голодающих клеток выход ФХ достигал половины от максимума при значении редокс потенциала среды +40 мВ, что

свидетельствует об увеличении среднеточечного редокс потенциала в паре Qa/Qa⁻ на 90 мВ. Как упоминалось выше, наблюдаемые изменения редокс потенциала Qa могут быть обусловлены деструкцией КВК и нарушением связи бикарбонат иона с акцепторной частью ФС2. В частности, разрушение КВК приводит к росту редокс потенциала Qa примерно на 150 мВ, а потеря бикарбоната - на 40 мВ (Johnson et al. 1995, Brinkert et al. 2016). Очевидно, что величина редокс потенциала Qa в голодающих клетках отражает определенное соотношение между полностью функциональными центрами ФС2, центрами без КВК и центрами без связанного бикарбоната.

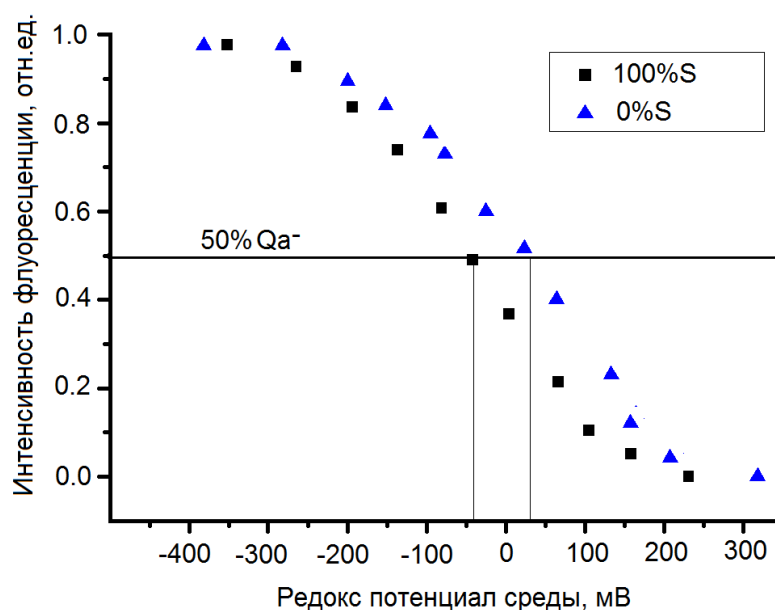


Рис. 4.13. Зависимость интенсивности ФХ в препаратах тилакоидных мембран из контрольных (100%S) и голодающих 48 ч (0%S) клеток *C. reinhardtii* от редокс потенциала среды.

Снижение энергетического зазора между значениями редокс потенциалов Qa и Qb в голодающих клетках должно приводить к уменьшению константы скорости переноса электрона с Qa на Qb и снижению константы скорости связывания ПХ с Qb-сайтом ФС2. Для оценки этих характеристик проводили измерения и анализ кинетических кривых темновой релаксации ФХ в диапазоне от десятков микросекунд до минуты. Такая кинетическая кривая отражает пути реокисления Qa и содержит три основных экспоненциальных компонента (Vass et al. 1999). Быстрый компонент с временем жизни τ от 200 до 500 мкс характеризует реакцию ре-окисления Qa⁻ акцептором Qb. Средний компонент с τ ~1-5 мс отражает реокисление Qa⁻ в ФС2, которая не содержит Qb на

момент начала измерения. В таких центрах перенос электрона с Qa на Qb лимитирован реакцией связывания свободного ПХ с Qb-сайтом в ФС2. Медленный компонент с временем жизни 1-10 с относится к Qb-невосстанавливающим центрам ФС2, в которых окисление Qa⁻ происходит благодаря реакции рекомбинации с S₂ или, в меньшей степени, с S₁ состояниями КВК. На рис. 4.14 приведены кинетические кривые темновой релаксации ФХ, измеренные в контрольных и голодающих 48 ч по сере клетках *C. reinhardtii*. На кривых отчетливо проявляются быстрая и медленная фазы, соответствующие окислению Qa⁻ в результате переноса электрона в ПХ пул и в результате рекомбинации с S₂ состоянием КВК, соответственно. Обе фазы характеризовались существенным увеличением времени жизни в голодающих клетках.

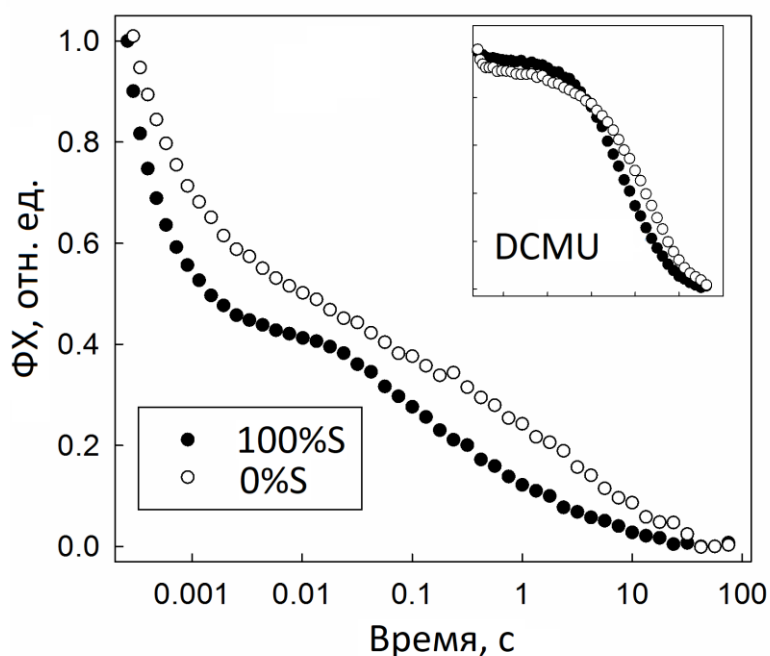


Рис. 4.14. Кинетические кривые затухания ФХ (кривые реокисления Qa⁻) клеток *C. reinhardtii* в контроле (100%S) и через 48 ч инкубации без серы (0%S). На вставке приведены кривые в образцах, обработанных 10 мкМ диурана. Измерения проводили с помощью флуориметра FL 3500.

Кривые затухания ФХ, измеренные в присутствии диурана, отражают реокисление Qa⁻ путем рекомбинации с положительным зарядом на донорной стороне ФС2. В контрольных клетках, обработанных диураном, кинетики затухания имели однофазный характер, соответствующий рекомбинации в паре S₂Qa⁻. Дефицит серы приводил к стабилизации состояния S₂Qa⁻, что проявлялось в виде увеличения времени жизни основной фазы на кинетической кривой. Кроме того, на кривой затухания ФХ в

голодающих клетках проявлялась новая фаза с временем жизни около 300 мкс, отражающая рекомбинацию зарядов между Qa^- и $TyrD^+$ в центрах ФС2 с разрушенным КВК (Allahverdieva et al. 2004). Появление быстрой фазы согласуется с представлением о разрушении КВК в условиях серного голодания.

Таблица. 4.5. Результаты мультиэкспоненциального анализа кривых затухания ФХ, приведенных на рис. 4.14.

	Быстрый компонент		Средний компонент		Дополнительный компонент		Медленный компонент	
	τ , мс	A, %	τ , мс	A, %	τ , мс	A, %	τ , с	A, %
100% S	0.13	51	1.05	18	120	18	3.76	13
0% S	0.28	40	5.9	19	290	18	8.76	23

Для получения более полной информации о путях реокисления Qa^- проводили мультиэкспоненциальный анализ кривых релаксации ФХ, который выявил четыре компонента (табл. 4.5). Вклад быстрого, среднего и медленного компонентов в контроле составил 51, 18 и 13%, а времена жизни – 130 мкс, 1.0 мс и 3.8 с, соответственно. Кроме этих основных компонентов в кинетике присутствовал также дополнительный компонент с временем жизни 120 мс и вкладом 18%, который наблюдается у зеленых водорослей и высших растений (Volgusheva et al. 2013, табл. 7.4), однако отсутствует у цианобактерий. Природа этого компонента остается неизвестной. Ранее было высказано предположение о связи этого компонента с редокс состоянием ПХ пула (Volgusheva et al. 2013). Дефицит серы приводил к росту времени жизни быстрого компонента более, чем в 2 раза, а среднего – практически в 6 раз, отражая снижение константы скорости переноса электрона с Qa на Qb и скорости связывания окисленного ПХ с Qb -сайтом в ФС2, соответственно. Такое значительное нарушение связывания ПХ с Qb -сайтом может быть обусловлено не только снижением константы скорости этого процесса, но и снижением содержания ПХ в окисленной форме в голодающих клетках. Полученный результат полностью согласуется с данными об изменениях редокс потенциалов Qa и Qb , которые

направлены на снижение скорости прямого транспорта электронов на акцепторной стороне ФС2 и уменьшение аффинности ПХ к Q_b сайту. Время жизни медленного компонента возросло в 2.3 раза в голодающих клетках по сравнению с контролем, что отражает стабилизацию состояния S₂Qa⁻, вероятно, также в результате перехода Qa в высокопотенциальную форму. Кроме изменения времени жизни, дефицит серы индуцировал рост амплитуды медленного компонента примерно на 10%, что указывает на увеличение концентрации Q_b-невосстанавливающих центров ФС2 и согласуется с ранее приведенными данными (табл. 4.1).

Глава 5. Механизмы и роль фотообразования водорода голодающими клетками *C. reinhardtii*

5.1. Динамическая регуляция электронного транспорта в клетке на анаэробной стадии серного голодания

Ранее было показано, что культивирование клеток *C. reinhardtii* без серы на постоянном свете в фотобиореакторе закрытого типа, в котором отсутствует газообмен с внешней средой, индуцирует самопроизвольный переход культуры в анаэробные условия и последующее выделение водорода в течение нескольких суток (Melis et al. 2000). Авторы исследования предположили основную роль процесса инактивации ФС2 в установлении анаэробных условий, а также ключевой вклад электронного транспорта через ФС1 в фотообразование водорода. С целью подробного изучения взаимоотношений между световыми реакциями фотосинтеза и фотопродукцией водорода в нашей работе проводили мониторинг основных параметров ФХ, ростовых характеристик культуры, содержания кислорода в среде и образования водорода в ходе инкубации культуры *C. reinhardtii* без серы в закрытом фотобиореакторе. Важно отметить, что параметры ФХ регистрировали с поверхности культиватора без отбора образцов, то есть, не оказывая воздействия на физиологическое состояние клеток. Для выявления общих трендов в динамике параметров ФХ и продукции водорода в разных экспериментах варьировали начальное содержание Хл и интенсивность света.

На рис. 5.1 показаны изменения параметров ФХ F_t , F_M' и $\Delta F/F_M'$, а также содержания Хл и скорости фотообразования водорода при начальной концентрации Хл 8 мкг мл⁻¹ и ПФПФ 100 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹. В этих условиях наблюдался линейный рост содержания Хл примерно на 40% в течение 2х суток инкубации без серы, отражая рост биомассы. На третьи сутки содержание Хл возрастало еще примерно на 10% и не изменялось в ходе дальнейшей инкубации. Параметры F_t и F_M' увеличивались за 48 ч. с 0.13 до 0.55 и с 0.47 до 0.81, соответственно. Благодаря преимущественному росту F_t по сравнению с F_M' происходило постепенное снижение отношения $\Delta F/F_M'$ более, чем в 2 раза: с 0.74 до 0.30 за 48 ч. После этого параметры ФХ претерпевали резкие изменения. Так, величина $\Delta F/F_M'$ падала с 0.3 до нуля в течение всего нескольких минут. Эти изменения сопровождалось снижением F_M' и быстрым транзиторным ростом F_t . Очевидно, что быстрое увеличение F_t отражает восстановление Q_a в ФС2. Таким образом, быстрое падение $\Delta F/F_M'$ обусловлено, скорее всего, инактивацией ФС2 в результате перехода центров из открытого в закрытое состояние на свету. После быстрого падения наблюдался

постепенный рост $\Delta F/F_M'$ с 0.00 до 0.12 в течение 24 ч, свидетельствуя о частичной реактивации ФС2. Стадия увеличения $\Delta F/F_M'$ совпадала по времени с инициацией выделения водорода и нарастанием скорости этого процесса до 2.5 мл ч⁻¹ в течение 30 ч после установления анаэробных условий. Таким образом, динамика скорости выделения водорода качественно совпадала с изменениями $\Delta F/F_M'$, указывая на вероятную связь между активностью ФС2 и фотообразованием водорода.

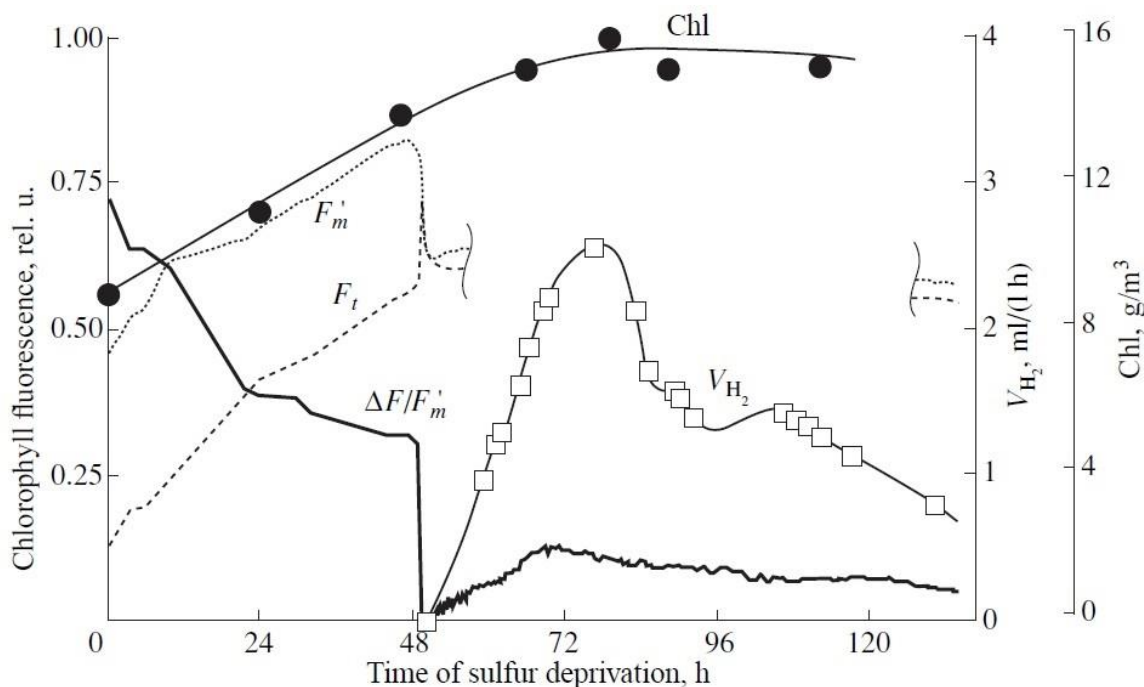


Рис. 5.1. Изменения параметров флуоресценции F_t , F_M' и $\Delta F/F_M'$, а также содержания Хл и скорости фотообразования водорода в культуре *C. reinhardtii* при инкубации без серы в фотобиореакторе закрытого типа.

Интенсивность света у поверхности фотореактора составляла 100 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, начальная концентрация Хл – 8 мкг мл⁻¹. Регистрацию параметров ФХ проводили с поверхности фотореактора с помощью флуориметра РАМ2000.

Предположительно, описанные выше быстрые изменения параметров ФХ после перехода культуры в анаэробные условия обусловлены восстановлением ПХ пула. Данное предположение нашло подтверждение в экспериментах по одновременному измерению параметров ФХ, содержания кислорода в среде и редокс потенциала среды в культиваторе при инкубации *C. reinhardtii* без серы (рис. 5.2). Характер изменений F_t , F_M' и $\Delta F/F_M'$

несколько отличался от представленного на рис. 5.1 в связи с различиями в экспериментальных условиях. Из рисунка 5.2 видно, что значения Ft и F_M' изменялись незначительно в течение 15 ч инкубации без серы, а затем происходили резкие изменения, характер которых совпадал с таковыми на рис. 5.1. Величина $\Delta F/F_M'$ несколько возросла в начале инкубации без серы с 0.50 до 0.58, а затем постепенно снижалась до 0.43 и быстро падала до 0.07 через 15 ч инкубации. Более низкое начальное значение $\Delta F/F_M'$ (около 0.5) по сравнению со значением на рис. 5.1 (0.74) объясняется более высокой интенсивностью актиничного света, которая влияет на величину Ft . После резкого падения величина $\Delta F/F_M'$ незначительно возросла и эти изменения сопровождались накоплением водорода в газовой фазе фотобиореактора (рис. 5.2 и 5.3). Измерения кислорода в среде выявили рост содержания этого газа с 130 до 630 мкМ в течение первых 10 ч, что обусловлено достаточно высокой фотосинтетической активностью клеток на начальной стадии голодания. Затем стадия накопления кислорода сменялась стадией поглощения, когда скорость фотообразования кислорода опустилась ниже уровня дыхания. Содержание кислорода в среде падало в ноль через 15 ч 45 мин инкубации без серы, после чего начиналась анаэробная стадия голодания. Сразу после перехода культуры в анаэробноз происходили резкие изменения параметров ФХ и быстрое снижение редокс потенциала среды (рис. 5.2 и 5.3).

Интересен тот факт, что величина $\Delta F/F_M'$ не претерпевала значительных изменений во время аэробной стадии инкубации без серы (рис. 5.2). Это свидетельствует о том, что причиной перехода культуры в анаэробноз может являться не столько снижение активности ФС2, как принято считать, сколько инактивация цикла Кальвина. Действительно, быстрое снижение скорости темновых реакций должно приводить к перенаправлению потока электронов в хлоропласте с основного конечного акцептора, которым является двуокись углерода, на кислород, способствуя утилизации последнего. Таким образом, реакции псевдоциклического электронного транспорта в хлоропласте могут играть основную роль в установлении анаэробных условий.

Перед переходом голодающей культуры в анаэробноз процесс ассимиляции CO_2 уже практически не функционирует, и кислород является единственным существенным акцептором электронов в клетке. Поэтому в момент времени, когда уровень кислорода в среде снижается до нуля, происходит полное восстановление электрон-транспортных цепей в клетке, в том числе ПХ пула. В результате этого блокируется электронный транспорт из ФС2 в ПХ пул и Q_a быстро переходит в восстановленное состояние на свету, что приводит к резкому росту уровня Ft сразу после полного исчерпания кислорода в

среде (рис. 5.1 и 5.2). Одновременное быстрое снижение выхода F_m' отражает, по-видимому, уменьшение поперечного сечения ФС2 в результате дополнительного фосфорилирования и диссоциации ССК2 при полном восстановлении ПХ пула.

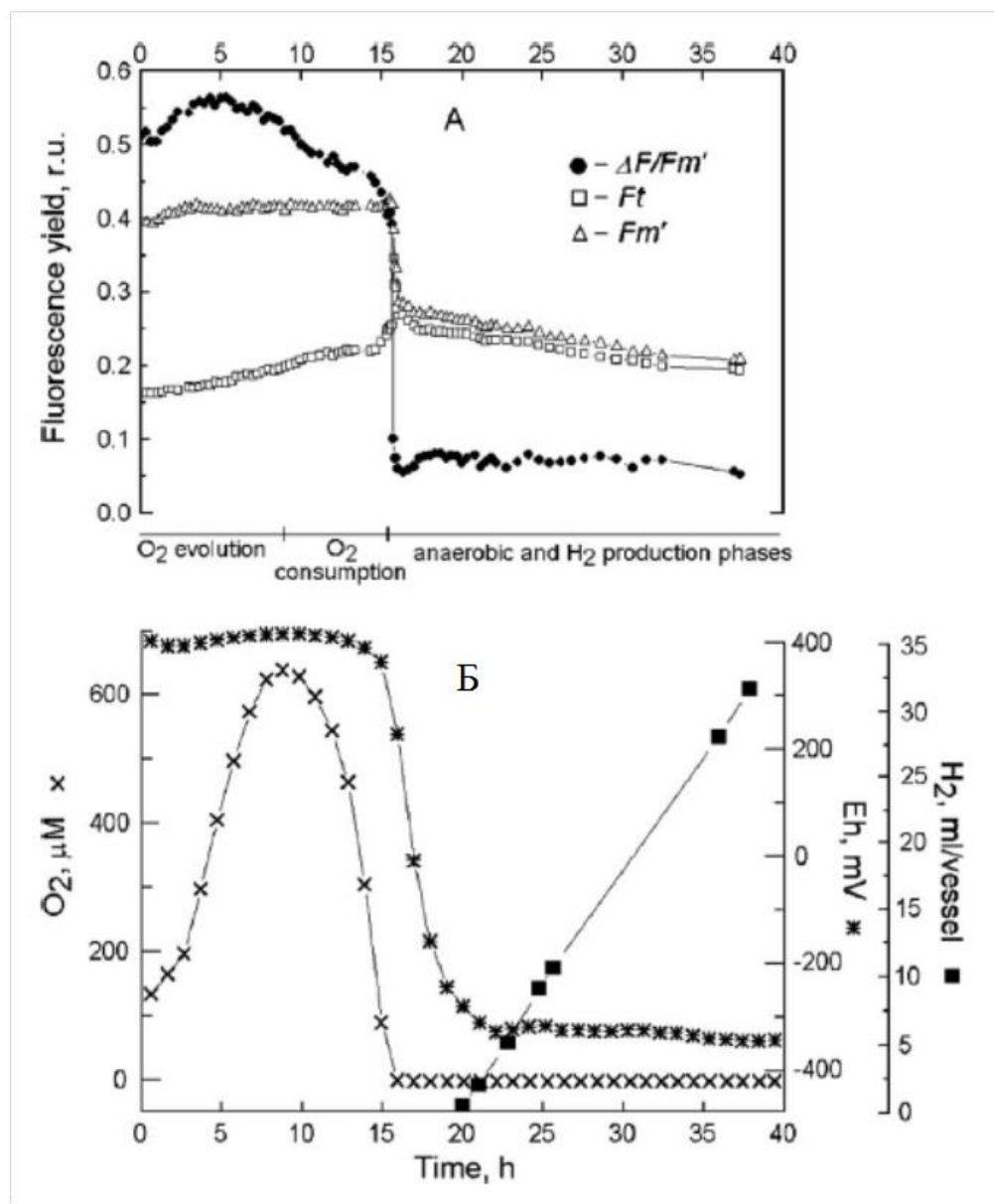


Рис. 5.2. Изменения параметров ФХ F_t , F_m' и $\Delta F/F_m'$ (А), количества выделенного H_2 , содержания растворенного O_2 и редокс потенциала среды (Б) в культуре *C. reinhardtii* при инкубации без серы в закрытом фотобиореакторе.

Интенсивность света у поверхности фотореактора составляла $250 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, начальная концентрация Хл – 12 мкг мл^{-1} .

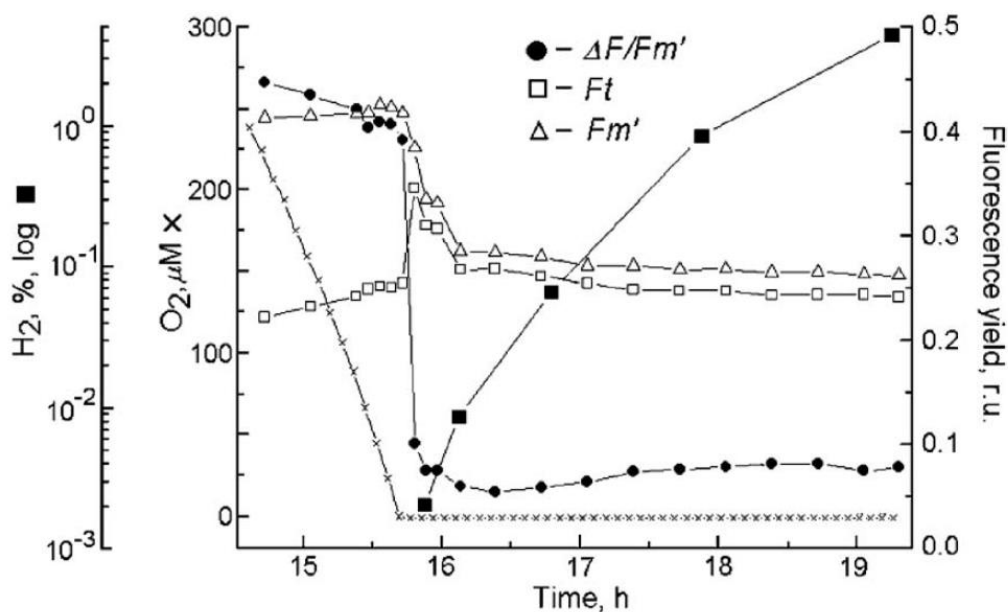


Рис. 5.3. Изменения параметров ФХ, содержания растворенного O₂ и выделенного H₂ при переходе культуры *C. reinhardtii* в анаэробные условия (детализация рис. 5.2). Динамика выделения водорода представлена в виде изменения процентной доли этого газа в газовой фазе фотобиореактора.

Вслед за установлением анаэробных условий активируется гидрогеназа и начинается выделение водорода (рис. 5.1, 5.2, 5.3). В наших экспериментальных условиях процесс выделения водорода сопровождался некоторым ростом величины $\Delta F/F_{M'}$. Эти результаты свидетельствуют о частичной реактивации ФС2 в результате обратного перехода из закрытого в открытое состояние. Очевидно, что эти изменения связаны с ре-окислением ПХ пула из-за частичного оттока электронов из фотосинтетической ЭТЦ на гидрогеназу. В пользу предположения о редокс зависимой регуляции активности ФС2 свидетельствуют данные по изменению величины $\Delta F/F_{M'}$ во время кратковременной аэрации анаэробной культуры в фотобиореакторе.

На рисунке 5.4 показаны изменения параметра $\Delta F/F_{M'}$ во время самопроизвольного перехода голодающей культуры в анаэробные условия и затем при аэрации культуры на анаэробной стадии. Переход культуры в анаэробноз сопровождался быстрым падением величины $\Delta F/F_{M'}$ с 0.5 до 0.1. Через 10 мин после этого аэрировали культуру в течение часа с использованием компрессора и распылителя. Продувка воздухом приводила к полному восстановлению величины $\Delta F/F_{M'}$ до исходного уровня. После прекращения

продувки величина $\Delta F/F_M'$ вновь быстро снижалась в результате поглощение кислорода из среды. На анаэробной стадии голодания величина $\Delta F/F_M'$ постепенно возрастала с 0.10 до 0.18, что отражает частичную реактивацию ФС2. Вторую аэрацию проводили через 48 ч после начала анаэробной стадии. Продувка воздухом сопровождалась ростом величины $\Delta F/F_M'$ с 0.17 до 0.39, что ниже уровня начала анаэробной стадии из-за частичной деструкции ФС2. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что изменения активности ФС2 при переходе культуры в анаэробноз являются обратимыми и регулируется, первую очередь, редокс состоянием ПХ пула в зависимости от содержания кислорода в среде.

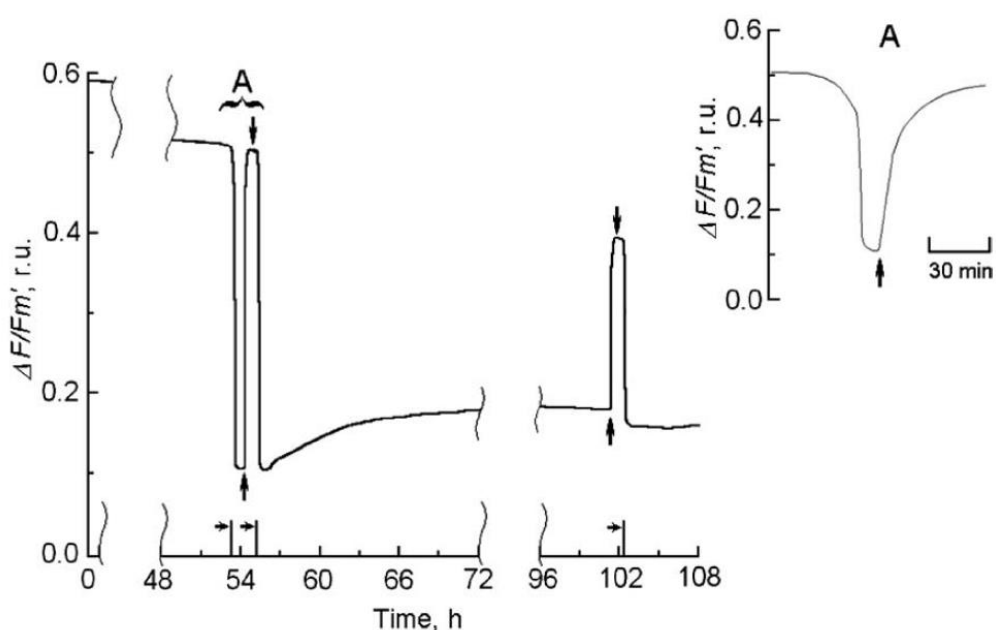


Рис. 5.4. Изменения величины $\Delta F/F_M'$ в голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* в закрытом фотобиореакторе при периодической аэрации культуры.

Время начала и завершения аэрации культуры обозначено стрелками 'вверх' и 'вниз'. Горизонтальные стрелки указывают время установления анаэробных условий. На вставке приведена детализация изменений параметра $\Delta F/F_M'$ в интервале А. Условия культивирования соответствуют эксперименту на рис. 5.1.

Кинетические кривые ФХ предоставляют существенно больше информации о функциональном состоянии ФСА, чем базовые параметры ФХ. Поэтому в нашей работе также регистрировали кривые индукции ФХ (ОЛР) и кривые затухания ФХ (кривые реокисления Qa^-) непосредственно в закрытом фотобиореакторе. Для измерения кривых использовали прибор Smart, сконструированный на кафедре биофизики биологического

факультета МГУ. Измерения проводили с интервалом 3 мин в течение 96 ч инкубации *S. reinhardtii* без серы. Параллельно с измерениями ФХ детектировали содержание растворенного кислорода внутри культиватора, что позволило определить точное время перехода культуры в анаэробные условия – через 46 ч после начала инкубации без серы.

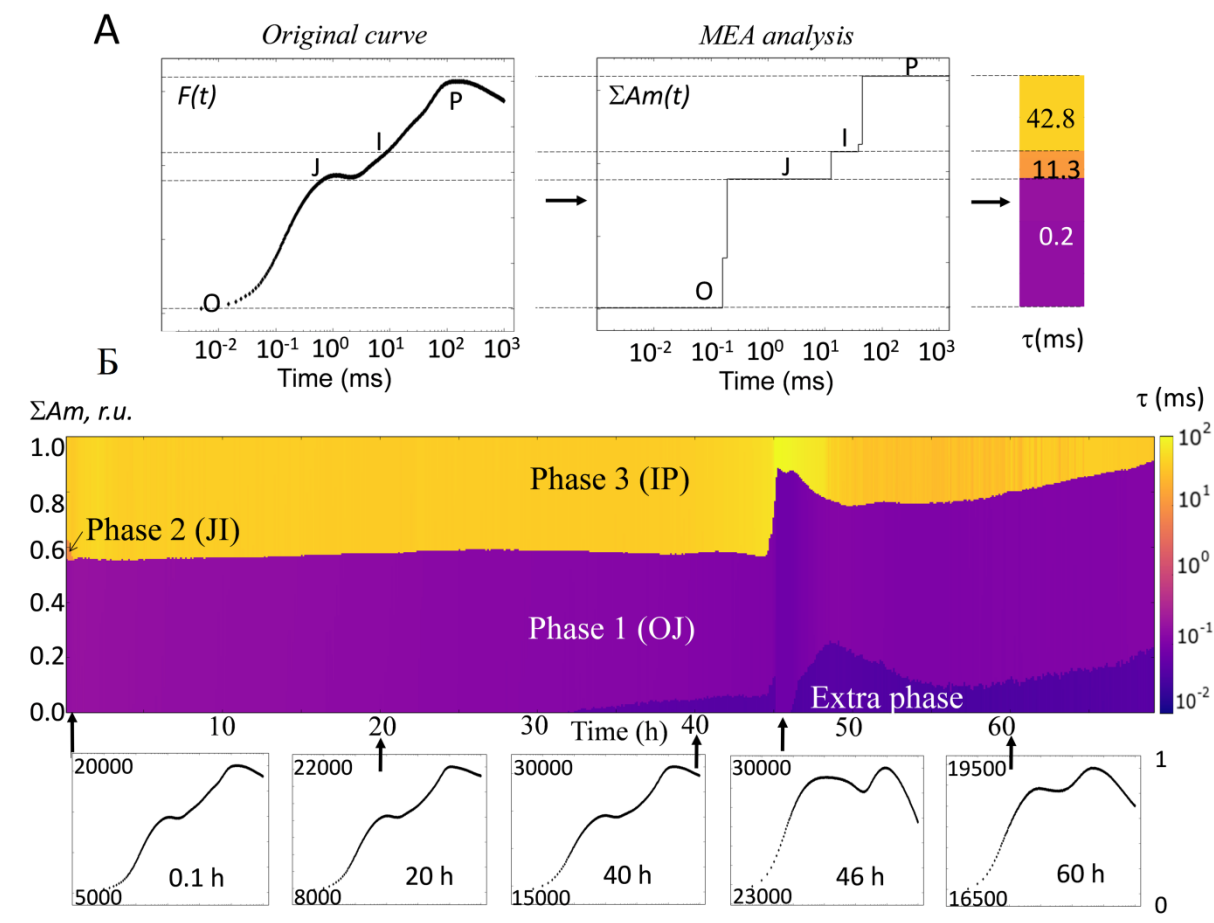


Рис. 5.5. А - Кривая световой индукции ФХ (ОЈР) в клетках *S. reinhardtii*, измеренная с помощью прибора Smart в закрытом фотобиореакторе через 6 мин инкубации без серы, а также результат мультиэкспоненциального анализа этой кривой с использованием программы MEA. Б - Изменения формы и компонентного состава ОЈР кривых в ходе 96 ч инкубации без серы в фотобиореакторе.

На рис. 5.5А приведена ОЈР кривая, измеренная в самом начале инкубации без серы, а также результат анализа этой кривой с использованием программы мультиэкспоненциальной аппроксимации MEA (Плюснина и др. 2015). Анализ кривой выявил три основных экспоненциальных компонента с временами жизни 0.2, 11.3 и 42.8 мс, которые соответствуют фазам 1 (ОЈ), 2 (ЈІ) и 3 (ІР), соответственно. Вклад среднего компонента (ЈІ) в максимальную амплитуду ОР составил около 10%, что ниже величины в

контроле примерно на 10% и отражает стрессовое состояние клеток после смены среды и условий культивирования.

Примеры ОЛР кривых, измеренных на разных стадиях инкубации без серы, показаны на рис. 5.5Б. Необходимо отметить, что амплитуда ОР была сильно подавлена во время анаэробной стадии инкубации, поэтому кривые показаны в индивидуальном диапазоне от минимального до максимального значения на кривой. Как видно из рисунка, форма ОЛР кривых слабо изменялась во время аэробной стадии, однако изменения становились значительными сразу после перехода культуры в анаэробноз. Так, кривые, измеренные в самом начале анаэробной стадии, характеризовались повышенной амплитудой ОJ, наличием впадины между уровнями J и P, и высокой скоростью тушения ФХ после пика P. Очевидно, что рост амплитуды ОJ обусловлен восстановленным состоянием ПХ пула в анаэробных условиях. Так, восстановленный ПХ должен препятствовать ре-окислению Qa^- , оказывая сходное с диуроном действие. Последующее за пиком J транзитное снижение уровня ФХ отражает частичное ре-окисление ПХ пула, связанное с электронным транспортом через ФС1. Тушение ФХ после пика P отражает начальную фазу индукции NPQ (Dau and Hansen 1990). Наблюдаемый на анаэробной стадии рост скорости тушения ФХ обусловлен, вероятно, дополнительной активацией ЦЭТ, что способствует развитию NPQ. На более поздней стадии инкубации в анаэробных условиях происходили обратные изменения формы ОЛР кривых, включая снижение амплитуды пика J и скорости тушения ФХ после пика P (рис. 5.5Б). Очевидно, что эти изменения отражают некоторое снижение уровня восстановленности переносчиков электронов в хлоропласте, наиболее вероятно, в результате активации гидрогеназы и реакций ферментативного брожения.

На рис. 5.5Б также приведена карта (heatmap) изменений кинетических параметров ОЛР кривой: характеристических времен и амплитуд экспоненциальных компонентов. Каждому экспоненциальному компоненту на такой карте соответствует своя цветовая полоса. Изменения цвета и ширины полосы во времени отражают динамические изменения времени жизни и вклада компонента в переменную ФХ. Как видно из рисунка, фаза 2 (J1) пропадала на раннем этапе инкубации без серы, что указывает на нарушение светоиндуцированного восстановления ПХ пула из-за снижения активности ФС2. Амплитуда фазы 1 (OJ) резко возрастала с 55 до 90% после перехода культуры в анаэробноз, затем снижалась на 15-20% в течение нескольких часов и вновь медленно возрастала. Важно отметить появление дополнительной быстрой фазы на ОЛР кривой с характеристическим временем около 50 мкс, которая проявлялась за несколько часов до

установления анаэробных условий. Вклад этой фазы быстро возрастал в анаэробных условиях, достигая максимального значения 25% через три часа после перехода культуры в анаэриоз, а затем снижался почти в 3 раза в течение нескольких часов и постепенно увеличивался при дальнейшей инкубации. Изменения амплитуды этой дополнительной фазы были схожи с динамикой амплитуды ОJ, свидетельствуя о том, что обе фазы контролируются в зависимости от редокс условий в клетке. Эта дополнительная фаза может быть связана с дезинтеграцией КВК и отражать вклад т.н. пика К в начальный подъем ФХ (OJ) (Глава 4.1).

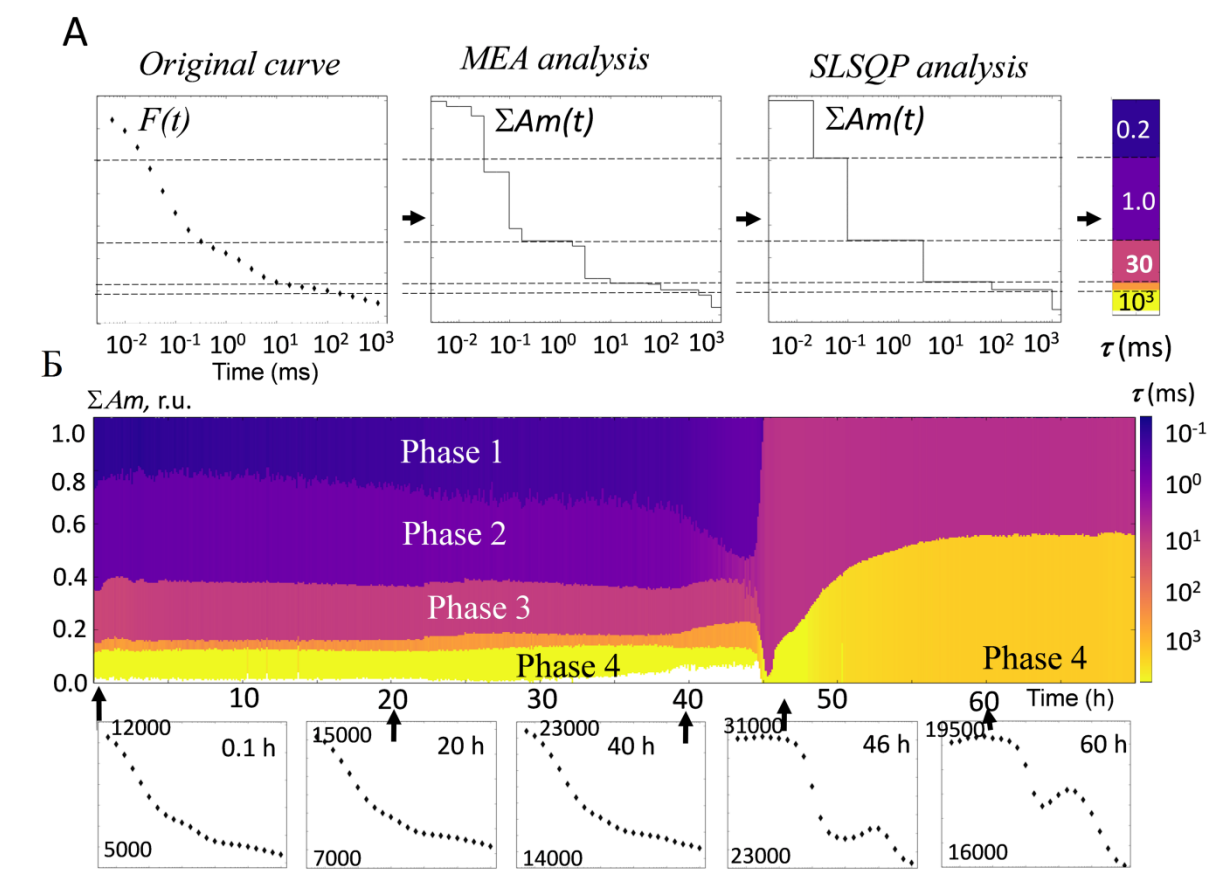


Рис. 5.6. А - Кривая темнового затухания ФХ (кинетика реокисления Qa^+) в клетках *C. reinhardtii*, измеренная с помощью прибора Smart в закрытом фотобиореакторе через 9 мин инкубации без серы, а также результат мультиэкспоненциального анализа этой кривой с использованием программ MEA и SLSQP. Б - Изменения формы и компонентного состава кривых затухания ФХ в ходе 96 ч инкубации без серы.

На рис. 5.6А показана кинетическая кривая затухания ФХ, измеренная в начале инкубации без серы, а также результаты анализа этой кривой с последовательным

использованием программ MEA и SLSQP. Анализ кривой выявил четыре основных компонента с временами жизни 0.2 (фаза 1), 1.0 (фаза 2) и 30 (фаза 3) мс, а также 10 с (фаза 4).

Как и в случае с OJIP кривой, форма кинетической кривой затухания не претерпевала существенных изменений в течение аэробного периода инкубации без серы (рис. 5.6Б). Времена жизни фаз 1 и 2 возрастали с 0.2 до 0.5 мс и с 1.0 до 2.7 мс, соответственно, в течение 46 ч, что согласуется с изменениями этих фаз при аэробной инкубации без серы (табл. 4.5). Некоторые количественные расхождения с данными в таблице 4.5 обусловлены разными условиями инкубации и особенностями измерения кривых затухания на разных приборах. Форма кривых затухания ФХ значительно изменялась при переходе культуры в анаэробные условия (рис. 5.6Б). В этот момент появлялась новая доминирующая фаза с временем жизни около 10 мс, амплитуда которой достигала 96% в начале анаэробной фазы. Из приведенной на рисунке тепловой карты видно, что время жизни фазы 2 постепенно возрастало с 1 мс до 6-8 мс перед переходом в анаэробноз, указывая на то, что новая фаза может иметь общее происхождение с фазой 2. Как известно, окисление Qa^- в фазе 2 лимитируется связыванием окисленной молекулы ПХ с Qb -сайтом ФС2. Очевидно, что в анаэробных условиях скорость этой реакции падает из-за дефицита окисленных молекул ПХ в пуле, что приводит к увеличению времени жизни этой фазы. Доминирование новой фазы в анаэробных условиях отражает тот факт, что окисление Qa^- в темноте лимитируется наличием окисленного пластохинона.

Во время анаэробной стадии серного голодания происходило постепенное увеличение амплитуды медленной фазы с 4-10% в начале до 60% в конце инкубации (рис. 5.6Б). При этом кинетика затухания ФХ приобретала форму волны, характеризуясь начальным снижением интенсивности ФХ до промежуточного минимума при 100 мс и последующим подъемом ФХ с формированием пика при 1 с (рис. 5.6Б). Аналогичный феномен 'волны' ранее наблюдали у цианобактерий, адаптированных к анаэробным условиям (Deák et al. 2014). Предположительно, появление пика на кривой затухания ФХ связано с транзиторным восстановлением ПХ пула и, соответственно, восстановлением Qa вследствие существующего редокс баланса между этими переносчиками электронов. В свою очередь, транзиторное восстановление ПХ пула обусловлено притоком восстановителя из стромы в реакциях ЦЭТ после выключения вспышки. Для проверки данного механизма использовали разработанную нами Монте-Карло модель ППФ. На рис. 5.7 приведены рассчитанные кривые затухания ФХ в условиях разной восстановленности ПХ пула, которые должны соответствовать аэробным (ПХ пул полностью окислен),

микроаэробным (ПХ пул восстановлен на 75%) и анаэробным (ПХ пул восстановлен на 100%) условиям. Волнообразный характер кинетики отчетливо проявлялся при начальных условиях, предполагающих полностью восстановленное состояние ПХ пула и высокую активность ЦЭТ в модели, которая задавалась в виде реакции переноса электрона с Фд в ПХ пул (см. Раздел 2.3). Как экспериментальные кривые в анаэробных условиях, модельные кривые при полностью восстановленном начальном состоянии ПХ пула выявили доминирующий компонент затухания с временем жизни около 10 мс, который был связан с частичным окислением ПХ пула и, соответственно, Qa в результате индуцированного вспышкой срабатывания ФС1. Затухание сменялось транзиторным ростом выхода ФХ, обусловленным восстановлением ПХ в реакциях ЦЭТ и последующим обратным электронным транспортом из ПХ пула на Qa, а также снижением тушения ФХ окисленной формой ПХ. Дальнейший спад выхода ФХ отражал реокисление Qa⁻ в результате рекомбинации с S₂ состоянием КВК.

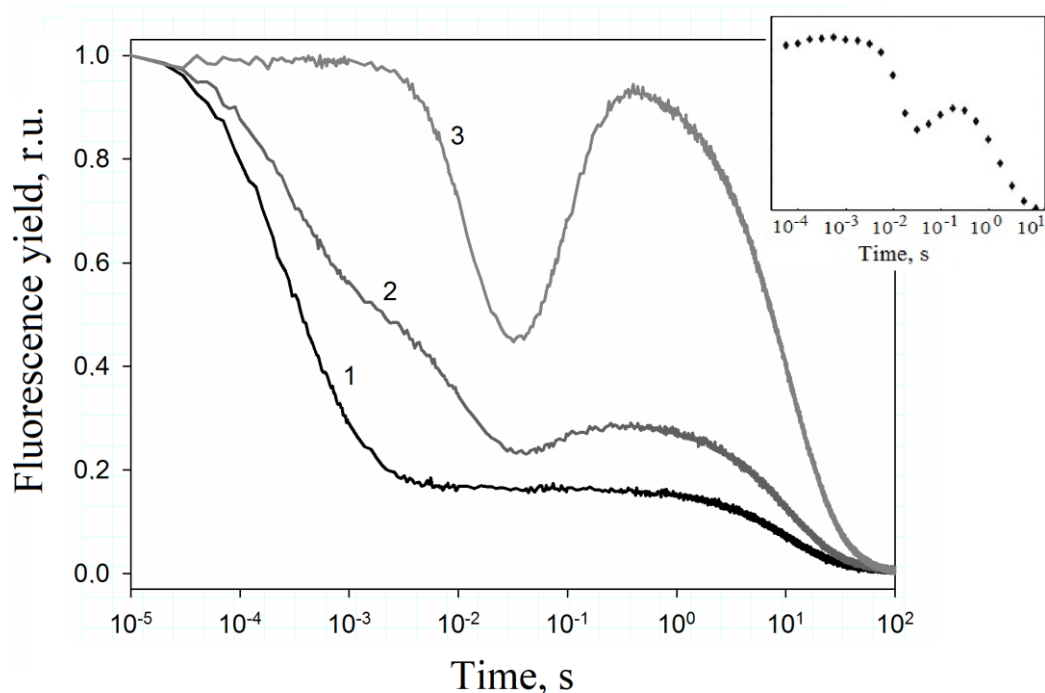


Рис. 5.7. Модельные кинетические кривые затухания ФХ при разном начальном редокс состоянии ПХ пула: полностью окисленное (кривая 1), восстановленное на 75% (кривая 2) и полностью восстановленное (кривая 3). На вставке приведена экспериментальная кривая, измеренная через 60 ч. инкубации без серы (рис. 5.6Б).

Представленные в настоящем разделе результаты указывают на сложную картину регуляции ППФ в момент перехода голодающей культуры в анаэробноз и при последующем фотообразовании водорода. Как было отмечено выше, основную роль в

этом процессе играет редокс состояние ПХ пула, которое контролирует активность ФС2 и переход между состояниями 1 и 2. Представленные данные свидетельствуют о дополнительной активации ЦЭТ на анаэробной стадии голодания, что оказывает серьезное влияние на характер кинетических кривых ФХ.

5.2. Взаимосвязь между фотопродукцией водорода и электрон-транспортными потоками в клетке

Для дальнейшего изучения механизмов фотообразования водорода голодающими по сере клетками *C. reinhardtii* использовали ингибиторный анализ. Как было показано выше, на анаэробной стадии голодания часть центров ФС2 реактивируется и может донировать электроны на гидрогеназу по цепи промежуточных переносчиков электронов. Действительно, в присутствии диурона или атразина, которые являются ингибиторами Qb связывающего сайта в ФС2, выход водорода в голодающих клетках снижается примерно на 70% по сравнению с необработанными клетками (рис. 5.7А), что соответствует литературным данным (Ghirardi et al. 2000, Kosourov et al. 2003). Из этого следует, что ФС2 играет основную роль в фотообразовании водорода (т.н. ФС2-зависимый путь). Нами показано, что ингибиторное действие диурона на продукцию водорода не связано с подавлением гидрогеназной активности. Наоборот, последняя несколько возрастает в обработанных клетках, очевидно, из-за снижения содержания кислорода в результате ингибирования ФС2 (рис. 5.7Б). Оставшиеся 30% продукции водорода в обработанных диуроном клетках обусловлены поступлением электронов в ПХ пул из стромы, в основном, от НАД(Ф)Н при активности НДГ2 (ФС2 - независимый путь продукции водорода) (Hemschemeier et al. 2008). Начальным донором электронов для этого пути выступает запасенный за время аэробной стадии голодания крахмал, деградация которого сопряжена с генерацией НАДН.

Известно, что искусственный хинон ДБТХ замещает пластохинол в месте его связывания с Q_o сайтом цит *b₆/f*, ингибируя транспорт электронов из ПХ пула на Пц. Добавление этого ингибитора в клеточную суспензию приводило к практически полному подавлению фотообразования водорода (рис. 5.8). Этот эффект свидетельствует о строгой необходимости фотосинтетического транспорта электронов на участке между ПХ пулом и Фд для фотопродукции водорода. Остаточное выделение водорода в обработанных ДБТХ клетках может быть связано с обратным восстановлением Фд от НАД(Ф)Н при высоком

содержании последнего. Также незначительная генерация водорода возможна в реакциях ферментативного брожения.

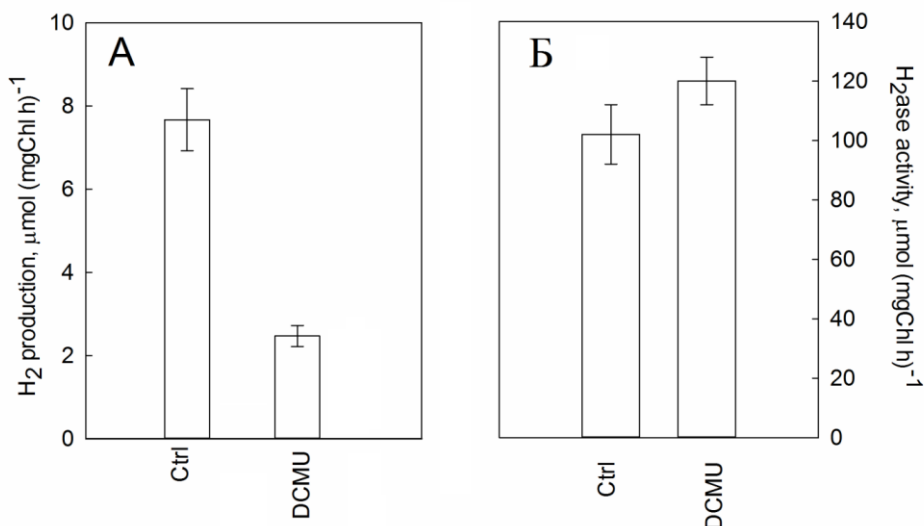


Рис. 5.7. Влияние диурона на скорость фотообразования водорода (А) и гидрогеназную активность (Б) в голодающих 48 ч. по сере клетках *C. reinhardtii*.

Измерения проводили после 3 ч. световой инкубации культур при ПФПФ 40 в герметичных стеклянных флаконах без добавок (контроль) или в присутствии 20 мкМ диурона.

Поскольку ФС2 сохраняет активность на анаэробной стадии инкубации без серы (рис. 5.1 и 5.2), то должны существовать механизмы, обеспечивающие быстрое удаление молекулярного кислорода, который ингибирует гидрогеназу. Очевидно, что значительную роль в этом процессе играет дыхание, скорость которого существенно не изменяется в условиях дефицита серы (рис. 3.2). Для изучения взаимосвязи между митохондриальным дыханием, фотосинтетическим электронным транспортом и гидрогеназной реакцией мы исследовали влияние разных ингибиторов дыхания на выход водорода. Как известно, антимицин А и миксотиазол являются блокаторами дыхательного комплекса III, а салицил гидроксамат (СГ) подавляет активность альтернативной оксидазы. На рис. 5.8 показано, что в образцах, обработанных миксотиазолом или миксотиазолом с СГ, наблюдалось краткосрочное увеличение продукции водорода на 30-40% по сравнению со значениями в контроле. Для оценки влияния ингибиторов избирательно на ФС 2 - независимый путь продукции водорода исследовали действие

этих же реагентов в присутствии диурона. В образцах, обработанных одновременно диуроном и миксотиазолом или диуроном, миксотиазолом и СГ выход водорода возрастал почти в 2 раза по сравнению с образцами, обработанными только диуроном (рис. 5.8). Из этого следует, что миксотиазол и СГ стимулируют, в основном, ФС2-независимый путь. Очевидно, что данный эффект обусловлен перенаправлением потока электронов из дыхательной цепи митохондрий в хлоропласт посредством малат-оксалоацетатного цикла, что приводит к увеличению содержания НАД(Ф)Н в хлоропласте и росту ФС2-независимой продукции водорода.

Антимицин А оказывал существенно более сильный эффект на выход водорода по сравнению с комбинированным действием миксотиазола и СГ (рис. 5.8). Так, общий рост выхода водорода в присутствии этого ингибитора составлял 130%, в то время как совместная обработка миксотиазолом и СГ приводила к увеличению только на 40%. В отличие от миксотиазола и СГ, стимулирующее действие антимицина А не зависело от присутствия диурона, то есть данный ингибитор влиял в одинаковой степени на ФС2-зависимый и независимый пути. Эти результаты указывают на существование дополнительного сайта действия антимицина А, расположенного в фотосинтетической ЭТЦ между ПХ пулом и Фд, поскольку этот участок является общим для обоих путей продукции водорода.

Далее мы исследовали три возможных механизма действия антимицина А на фотосинтетический транспорт и, следовательно, на продукцию водорода: в качестве протонофора, возможного ингибитора хлоропластной оксидазы РТОХ и ингибитора ЦЭТ. Известно, что антимицин А обладает действием разобщителя в тилакоидной мембране (Drechsler et al. 1969). Генерация транстилакоидного рН градиента подавляет электронный транспорт через цит *b₆/f* (Tikhonov 2013), поэтому диссипация протонного градиента должна приводить к увеличению скорости фотосинтетического транспорта электронов, в том числе транспорта электронов на гидрогеназу. Действительно, обработка голодающих водорослей эффективным протонофором FCCP или антибиотиком нигерицином (К/Н обменник) приводила к росту фотообразования водорода примерно на 35-40% (рис. 5.8). Однако эти изменения были заметно ниже стимулирующего эффекта антимицина А. В присутствии диурона эффекты FCCP и нигерицина возрастали более чем в два раза, свидетельствуя о преимущественном действии протонофоров на ФС2-независимую продукцию водорода по неизвестному механизму.

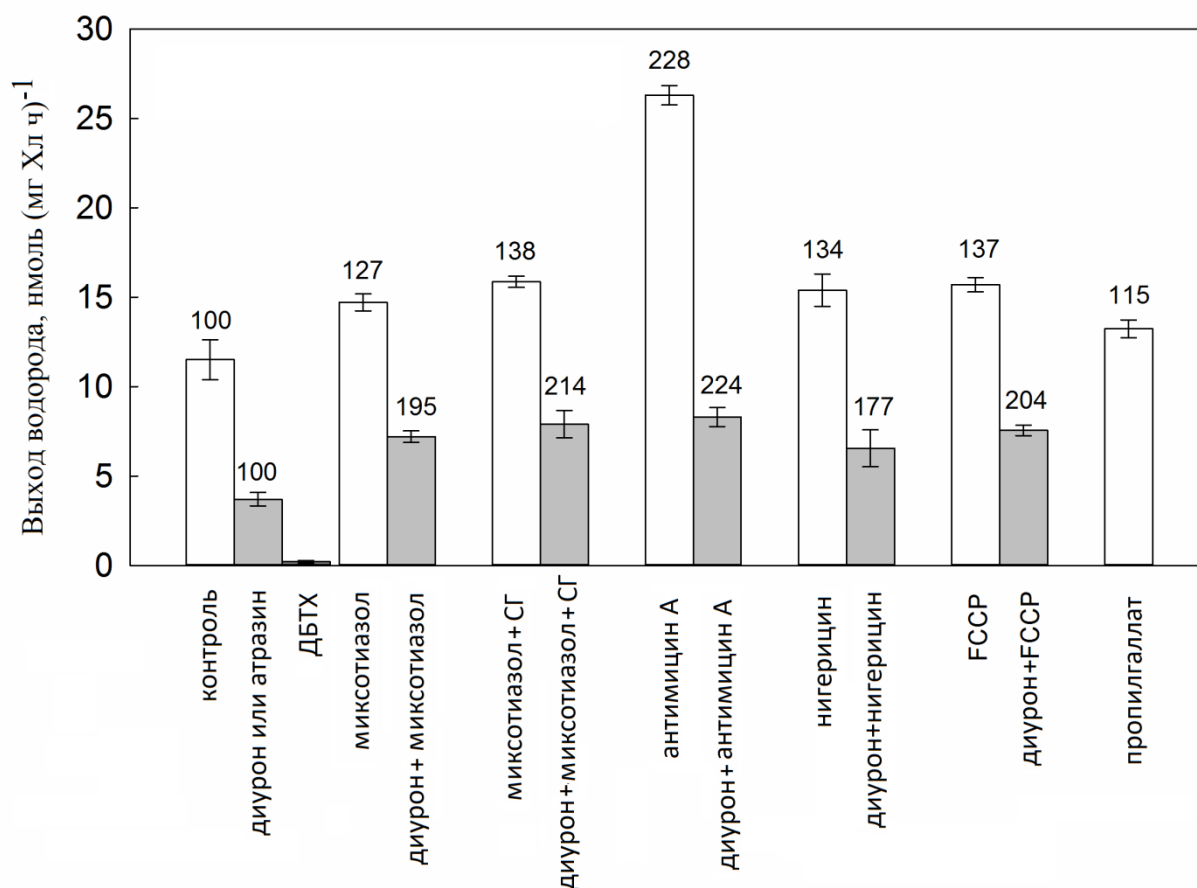


Рис. 5.8. Действие ингибиторов фотосинтетической и дыхательной ЭТЦ, а также протонофоров на скорость фотообразования водорода голодающими 48 ч по сере клетками *C. reinhardtii*.

Серым цветом отмечены эксперименты, в которых измерения проводили в присутствии 20 мкМ диурона. Над столбцами показаны изменения выхода водорода в процентах от значений в контроле (белые столбцы) или в образцах, обработанных диуроном (серые столбцы).

Приведенные на рис. 5.8 результаты свидетельствуют о том, что сильное стимулирующее действие антимидина А на продукцию водорода не может быть объяснено подавлением митохондриального дыхания или разобщительным действием, и, скорее всего, связано с ингибированием ЦЭТ, активность которого возрастает в голодающих клетках (рис. 3.7). Очевидно, что ЦЭТ может потенциально приводить к снижению продукции водорода, поскольку этот путь конкурирует с гидрогеназой за восстановленный Фд. Как известно, антимидин А широко применяется в качестве ингибитора ЦЭТ у высших растений, однако аналогичное действие у зеленых

микроводорослей является дискуссионным вопросом в силу особенностей организации ФСА (Antal et al. 2013c).

Для оценки действия антимицина А на ЦЭТ в клетках *C. reinhardtii* в нашей работе проводили измерения светоиндуцированных редокс переходов P_{700} в присутствии диурона аналогично измерениям, результаты которых приведены на рис. 3.7. На рис. 5.9 показаны кинетические кривые редокс переходов P_{700} в голодающих 48 ч клетках *C. reinhardtii* в контроле (кривая 1) и после обработки антимицином А (кривая 2). Из рисунка видно, что кинетика окисления P_{700} в контроле характеризовалась типичной для голодающих клеток быстрой, промежуточной и медленной фазой и выходила на насыщение примерно через 2 с освещения. Обработка клеток антибиотиком приводила к значительному росту максимального уровня P_{700}^+ за счет увеличения амплитуды быстрой фазы и утери промежуточной фазы. Данный эффект антимицина А можно интерпретировать как результат ингибирования ЦЭТ. Скорее всего, ЦЭТ является конкурентом гидрогеназы и активация этого пути сопровождается снижением выхода водорода. Этот вывод согласуется с результатами, полученными позднее в работе с мутантами *C. reinhardtii* по ЦЭТ (Tolleter et al. 2011).

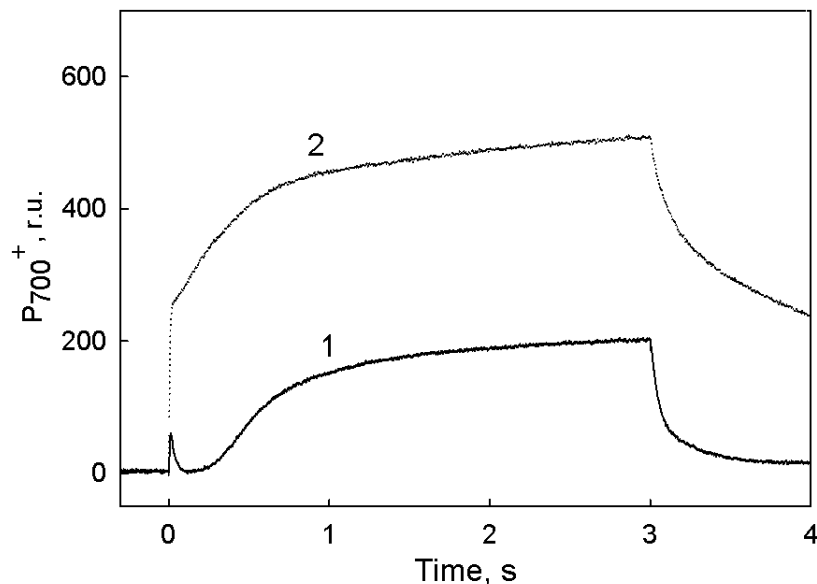


Рис. 5.9. Влияние антимицина А на светоиндуцированные изменения редокс состояния P_{700} в голодающих 48 ч по сере клетках *C. reinhardtii*.

Перед измерениями клетки обрабатывались 20 мкМ диурона в течение 5 мин в темноте (кривая 1) или диуроном и 10 мкМ антимицина А (кривая 2).

5.3. Исследование роли фотообразования водорода в качестве адаптационного механизма

К настоящему времени не существует экспериментальных данных, позволяющих оценить физиологическую значимость гидрогеназной реакции в условиях минерального стресса. В частности, отсутствует ясное понимание вклада процесса фотообразования водорода в обеспечение энергетических потребностей клетки, в поддержание фотозащитных процессов, внутриклеточного редокс и кислотно-щелочного гомеостаза, обеспечивающих жизнедеятельность клетки в условиях длительного действия стрессовых факторов. В рамках данной работы мы исследовали возможную физиологическую роль гидрогеназы в клетках *C. reinhardtii* в условиях минерального голодания. Для этого проводили сравнительный анализ жизнеспособности, некоторых ростовых и биохимических характеристик, а также параметров фотосинтеза в мутанте *C. reinhardtii* HydEF-1 без гидрогеназной активности и в соответствующем контрольном штамме cc425 при инкубации без серы в герметичных флаконах.

Жизнеспособность культуры определяли по соотношению между живыми и мертвыми клетками. На рис. 5.10 показаны изменения процентной доли мертвых клеток в штаммах cc425 и HydEF *C. reinhardtii* на разных стадиях инкубации без серы. Первое измерение (0 ч) проводили в контрольной культуре через 72 ч роста на среде TAP. В этих условиях содержание мертвых клеток в обоих штаммах составляло около 18%, что характерно для поздней логарифмической фазы роста. После переноса культуры на свежую среду TAP-S количество мертвых клеток снижалось до 7-8%, что объясняется потерей части мертвых клеток при центрифугировании суспензии и суспендировании в новой среде. Инкубация без серы в течение 24 ч практически не оказывала влияния на содержание мертвых клеток в обоих штаммах. Через 24 ч образцы продувались аргоном, чтобы синхронизировать начало анаэробной стадии голодания. В анаэробных условиях процент мертвых клеток в контрольном штамме не только не возрастал, но и несколько снижался за 48 часов инкубации. В то же время содержание мертвых клеток в мутанте значительно возрастало, достигая 25% за тот же период времени. Затем содержание мертвых клеток в обоих штаммах постепенно падало на поздней стадии голодания - между 72 и 96 ч. Это указывает на некоторый рост жизнеспособности культур, вероятно, в результате перехода клеток в состояние с низкой метаболической активностью (инцистирование).

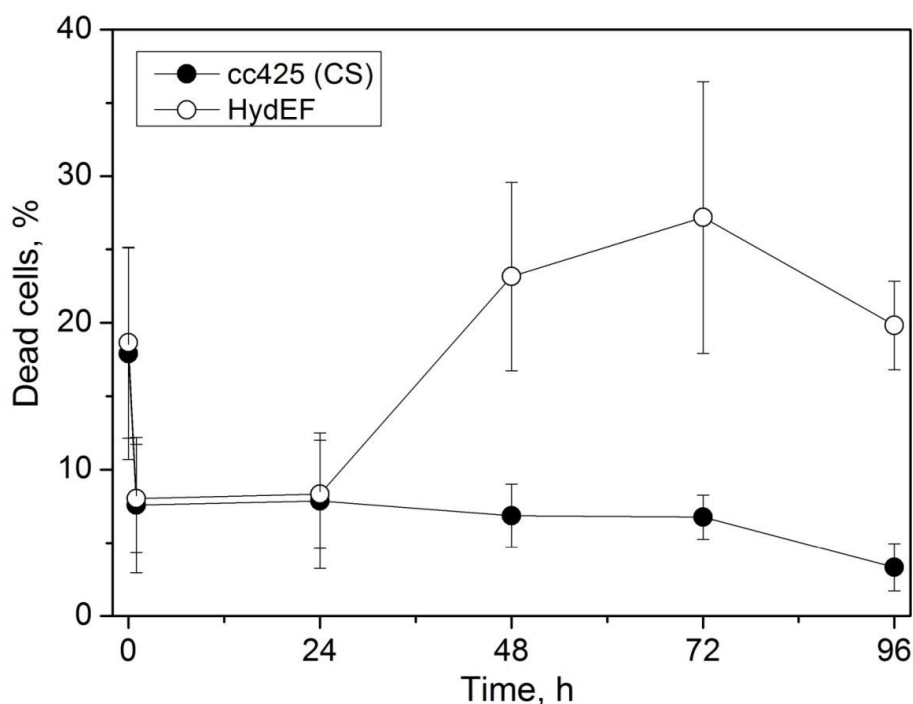


Рис. 5.10. Изменение доли мертвых клеток в культурах штаммов *C. reinhardtii* cc425 и HydEF при инкубации без серы.

Первое измерение проводили на среде TAP, а второе - через 1 ч после переноса клеток на среду TAP-S. Культуры инкубировали в герметично закрытых флаконах при интенсивности света $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Начальная концентрация Хл составляла 15 мкг мл^{-1} . Образцы продували аргоном через 24 ч инкубации для синхронизации перехода в анаэробноз.

Приведенные на рис. 5.10 результаты прямо указывают на снижении жизнеспособности голодающей культуры мутанта на анаэробной стадии голодания по сравнению с контрольным штаммом. Для выяснения причин этого мы исследовали изменения ростовых параметров культуры, а также содержания крахмала, активности ППФ и концентрации АТФ в клетках обоих штаммов при тех же условиях. На рис. 5.11 показаны изменения содержания Хл и крахмала. В контрольном штамме концентрация Хл возрастала с 15 до 38 мкг мл^{-1} в течение 24 ч (рис. 5.11А), что отражает рост культуры за счет использования внутренних запасов серы. После этого содержание Хл в контрольном штамме постепенно снижалось с 38 до 30 мкг мл^{-1} в конце периода инкубации. Культура мутанта характеризовалась, в целом, сходной динамикой Хл, однако начальный прирост Хл был ниже, чем в контрольном штамме. Так, концентрация Хл в мутанте возрастала с 15 до 29 мкг мл^{-1} в течение 24 ч инкубации без серы. Содержание крахмала на единицу Хл

в стандартных условиях роста (0 ч) не превышало 1-2 мг (мг Хл)⁻¹ (рис. 5.11Б). Дефицит серы индуцировал накопление крахмала, запасы которого возрастали в клетках обоих штаммов до 14-15 мг (мг Хл)⁻¹ в течение 24 ч. После этого накопление крахмала прекращалось и наблюдалось снижение его концентрации в результате гликолитической деградации. Так, запасы крахмала в клетках контрольного штамма падали с 15 до 6 мг (мг Хл)⁻¹ в течение 48 ч после установления анаэробных условий. В то же время содержание крахмала в клетках мутанта снижалось существенно медленнее - с 14 до 9 мг (мг Хл)⁻¹, указывая на замедление катаболизма углеводов.

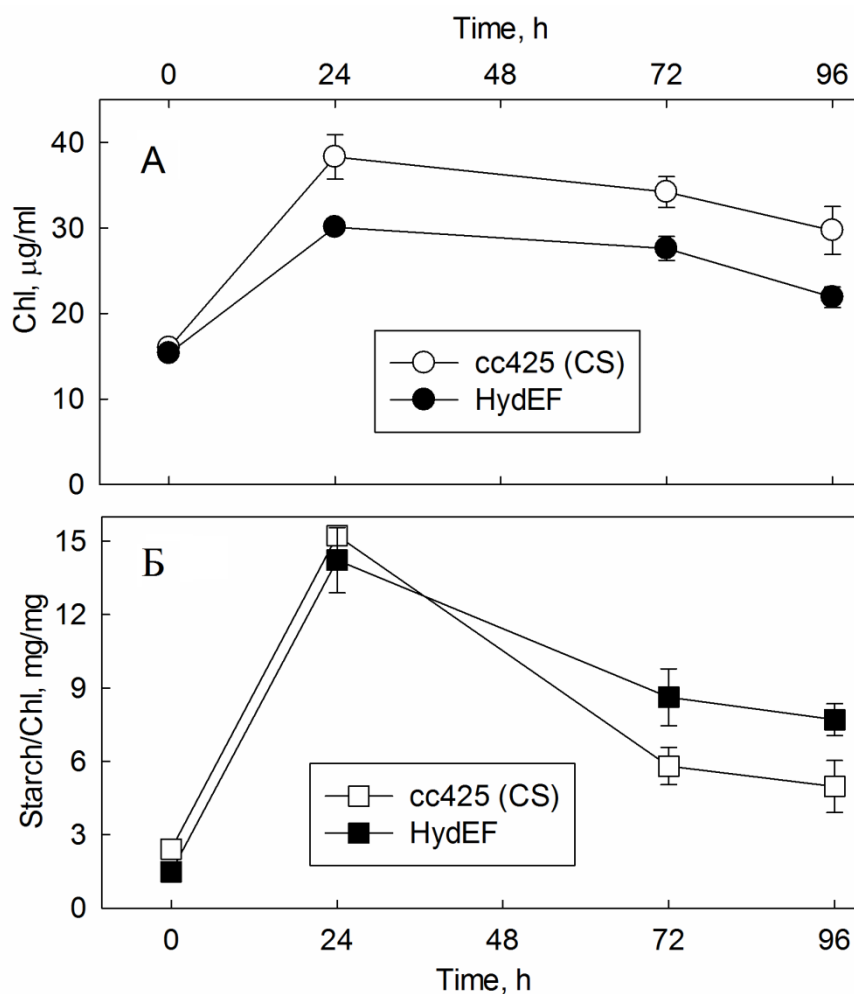


Рис. 5.11. Изменения содержания Хл (А) и крахмала (Б) в клетках *C. reinhardtii* контрольного штамма cc425 и мутанта HydEF при инкубации без серы. Содержание крахмала нормировали на Хл. Условия инкубации соответствуют эксперименту на рис. 5.10.

Как упоминалось выше, генерируемый в процессе гликолиза НАДН может использоваться в качестве донора электронов для ФС2-независимого пути образования водорода на свету, а также для утилизации кислорода, образование которого обусловлено

частичной реактивацией ФС2. Таким образом, превышение расхода крахмала в контрольном штамме по сравнению с мутантом на анаэробной стадии инкубации без серы может быть связано с дополнительным расходом НАДН, сопряженным с фотопродукцией водорода.

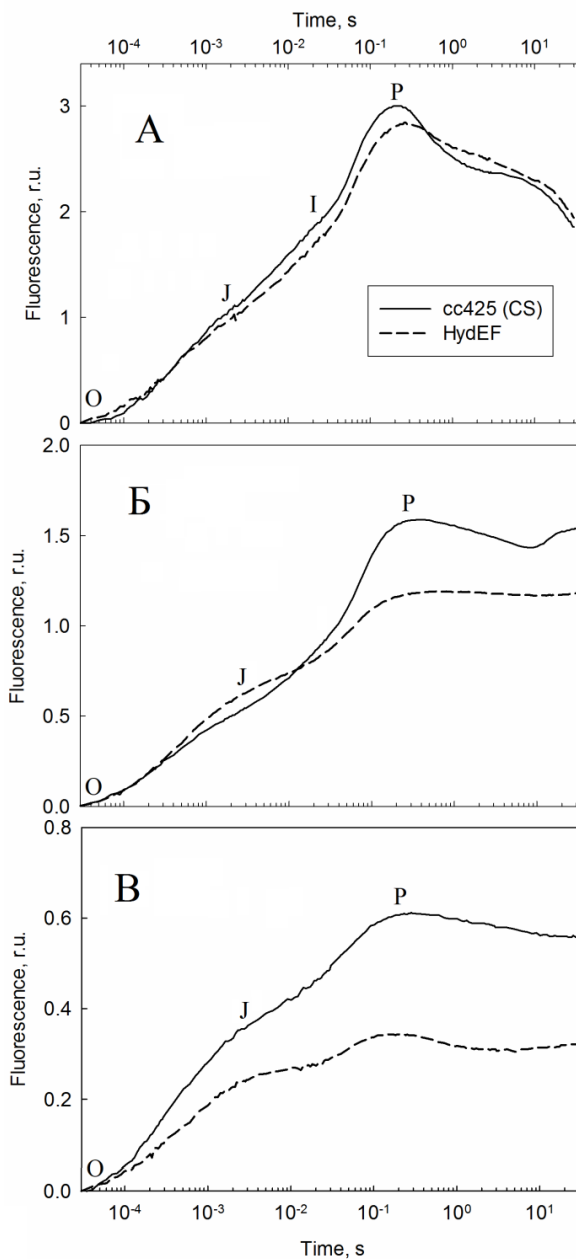


Рис. 5.12. OJIP кривые клеток дикого типа cc425 и мутанта HydEF *C. reinhardtii* в стандартных условиях роста (0 ч) (A), через 48 ч (Б) и 72 ч (В) инкубации без серы.

Условия инкубации соответствуют эксперименту на рис. 5.10. Перед измерениями образцы аэрировали 5 мин в темноте. Измерения проводили на приборе HandyPEA при интенсивности возбуждающего света 2000 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹.

Для исследования функционального состояния ППФ у обоих штаммов в условиях серного голодания проводили измерения ОЖР кривых (рис. 5.12). Для этого забирали образец из флакона-культиватора, аэрировали в темноте в течение 5 мин, затем регистрировали ФХ. Кривые индукции ФХ в стандартных условиях роста характеризовались типичной формой с тремя фазами ОJ, JI и IP (рис. 5.12А). В стандартных условиях практически отсутствовали различия между кривыми в контрольном штамме и мутанте. Амплитуда ОР ($=Fv/Fo$) достигала 3, что соответствует величине $Fv/Fm = 0.75$. Дефицит серы индуцировал описанные выше изменения на ОЖР кривых (рис. 4.1), но при этом проявились очевидные различия между двумя штаммами. Так, кривая в мутанте HydEF характеризовалась более низкой амплитудой ОР по сравнению с контрольным штаммом, свидетельствуя об ускоренной инактивации ФС2. Рассчитанные значения Fv/Fm в контрольном штамме и мутанте составили 0.64 и 0.55, соответственно, через 48 ч инкубации без серы. Более того, вклад фазы JIP в переменную ФХ был значительно ниже на кривой в мутанте по сравнению с контрольным штаммом, отражая более высокое содержание Qb - невосстанавливающих центров ФС2 в голодающих клетках без гидрогеназы. Через 72 ч инкубации без серы происходило дополнительное снижение величины Fv/Fm до 0.37 в клетках контрольного штамма и до 0.26 у мутанта. Из приведенных результатов очевидно, что ФС2 в клетках мутанта характеризуется меньшей стабильностью во время анаэробной стадии инкубации без серы по сравнению с контрольным штаммом, свидетельствуя о нарушении механизмов фотозащиты и/или репарации ФС2.

Одной из предполагаемых функций гидрогеназы может быть улучшение энергетического обеспечения клеток на анаэробной стадии серного голодания. Как упоминалось выше, переход голодающей культуры в анаэробноз индуцирует восстановление ЭТЦ в митохондриях и хлоропласте, снижая скорость сопряженного процесса фосфорилирования. Поскольку активация гидрогеназы в анаэробных условиях индуцирует частичное реокисление фотосинтетической ЭТЦ, то это может способствовать процессу фотофосфорилирования, а образование кислорода в ФС2 – процессу окислительного фосфорилирования. Для проверки этого предположения мы измеряли АТФ в клетках контрольного штамма и мутанта HydEF в ходе инкубации без серы в герметичных флаконах и нормировали содержание АТФ на единицу Хл (нмоль АТФ (мг Хл)⁻¹) (рис. 5.13). Из рисунка 5.13А видно, что отношение АТФ/Хл в стандартных условиях роста (0 ч) составляло 88 нмоль АТФ (мг Хл)⁻¹ в контрольном штамме и было на 30% выше в мутанте, где оно достигало 115 нмоль АТФ (мг Хл)⁻¹. Сравнение параметров

фотосинтеза и дыхания между контрольным штаммом и мутантом в стандартных условиях роста с использованием электрода Кларка выявило заметные отличия в скорости дыхания, но не в скорости фотосинтеза. Так, скорость дыхания была $40 \text{ мкмоль O}_2 (\text{мг Хл ч})^{-1}$ в контрольном штамме и $58 \text{ мкмоль O}_2 (\text{мг Хл ч})^{-1}$ в мутанте. Причины увеличения дыхания в клетках мутанта не известны, но эта особенность позволяет объяснить повышенный уровень содержания АТФ в стандартных условиях более высокой скоростью окислительного фосфорилирования.

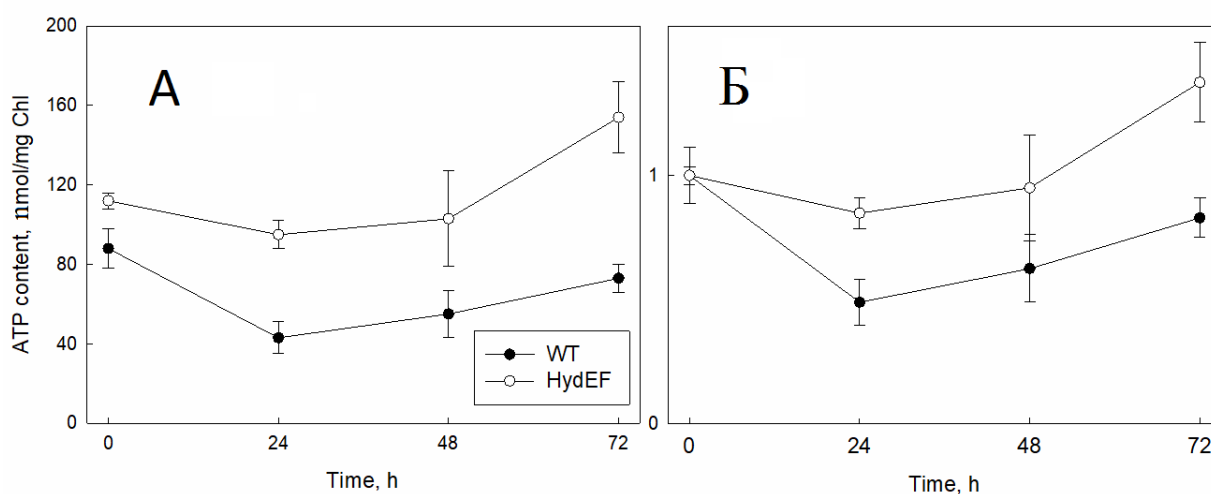


Рис. 5.13. Динамика содержания АТФ на единицу Хл в контрольном штамме и мутанте HydEF *C. reinhardtii* при инкубации без серы.

А – исходные кривые, Б – кривые нормированы на начальное значение (0 ч). Условия инкубации соответствуют эксперименту на рис. 5.10.

В ходе инкубации без серы содержание АТФ в контрольном штамме сначала снизилось с 88 до $41 \text{ нмоль АТФ (мг Хл)}^{-1}$ за 24 ч , а затем постепенно выросло до 70 через 72 ч (рис. 5.13А). Переход культуры в анаэробные условия произошел через 23 ч инкубации без серы. Динамика содержания АТФ в мутанте имела отличный характер. Так, снижение АТФ в мутанте через 24 ч инкубации без серы было незначительным (около 10%) от начального уровня, сменившись существенным ростом на более поздних этапах, когда содержание АТФ достигло $154 \text{ нмоль АТФ (мг Хл)}^{-1}$ через 72 ч . На рис. 5.13Б приведены динамики АТФ/Хл, нормированные на начальное значение в 0 ч . Из рисунка отчетливо видно, что содержание АТФ в условиях дефицита серы было существенно выше в клетках мутанта по сравнению с контрольным штаммом.

Приведенные на рис. 5.13 результаты выявили неожиданный характер динамики АТФ в голодающих клетках *C. reinhardtii*. Как известно, анаэробный метаболизм характеризуется примерно на порядок более низкой эффективностью преобразования энергии глюкозы в энергию АТФ по сравнению с аэробным метаболизмом. Это дает основания предполагать, что установление анаэробных условий в культуре должно приводить к резкому снижению уровня АТФ в водорослевых клетках. Действительно, уровень АТФ в клетках контрольного штамма снижался примерно в два раза через 24 ч. инкубации без серы сразу после перехода культуры в анаэробноз. Однако эти изменения нельзя назвать критическими. Наблюдаемый достаточно высокий уровень АТФ в анаэробных условиях на свету может быть частично связан с дополнительной активацией ЦЭТ в анаэробнозе, на что указывают приведенные выше в этой главе результаты. Кроме этого, потребление АТФ в клетке может снижаться на анаэробной стадии голодания из-за общей низкой метаболической активности и, соответственно, низкой скорости потребления АТФ. Соответственно, более высокое содержание АТФ в голодающих клетках мутанта можно объяснить более высокой скоростью ЦЭТ в отсутствие фотообразования водорода, поскольку эти процессы, как показано выше, являются антагонистами. Кроме этого, отсутствие гидрогеназной активности в клетках мутанта может снижать общую метаболическую активность и скорость потребления АТФ.

Из приведенных выше результатов становится очевидным, что голодающие по сере клетки контрольного штамма и мутанта не испытывают серьезного дефицита АТФ на анаэробной стадии инкубации без серы. Поэтому более высокая жизнеспособность и стабильность ФС2 в клетках контрольного штамма по сравнению с мутантом в условиях дефицита серы обусловлены не улучшением энергетического обеспечения метаболизма, а ролью гидрогеназы в поддержании благоприятного редокс и кислотно-щелочного гомеостаза в клетке. Необходимо учитывать, что процесс фотообразования водорода обеспечивает утилизацию не только избытка электронов, но и протонов в строении хлоропласта.

Глава 6. Разработка подходов к оптимизации фотопродукции водорода голодающими клетками *C. reinhardtii*

6.1. Иммобилизация микроводорослей в альгинатных пленках

6.1.1 Особенности механизмов фотообразования водорода иммобилизованной культурой

Продолжительность периода интенсивного выделения водорода голодающей по сере культурой *C. reinhardtii* составляет 5-6 дней, после чего клетки переходят в терминальную стадию, которая завершается гибелью культуры (Kosourov et al. 2002). Одним из возможных подходов к увеличению выхода водорода является снижение деструктивного воздействия стрессового фактора и стабилизация компонентов фотосинтетической ЭТЦ при сохранении механизмов продукции водорода. Иммобилизация клеток в биологически инертных материалах рассматривается как биотехнологический прием, который используется для сохранения биокаталитической активности и стабильности клеточных культур, а также позволяет переносить культуру из одной среды на другую, минуя трудоемкую стадию осаждения клеток, при которой существует опасность контаминации (Moreno-Garrido 2008, Васильева и др. 2016).

Альгинат (соль альгиновой кислоты) представляет собой нетоксичный природный полимер, получаемый из ламинарии и др. бурых водорослей, который широко применяется в пищевой промышленности, медицине, фармацевтике, косметологии. В частности, это вещество используется для иммобилизации ферментов, водорослевых и цианобактериальных клеток (Smidsrød and Skjak-Brik 1990). Мономеры альгинатов, например, альгинат натрия, содержат остатки маннуроновой и гулууроновой кислот, которые полимеризуются в воде в присутствии двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} и Mg^{2+} , сшивающих мономеры между собой, образуя гидрогель. Ранее была разработана методика иммобилизации водорослевых клеток в альгинатных пленках с целью оптимизации фотопродукции водорода в условиях серного голодания (Kosourov and Seibert 2009). Авторами метода было показано, что иммобилизованная голодающая по сере культура характеризуется более высокой эффективностью фотопродукции водорода по сравнению с суспензионной культурой и меньшей чувствительностью этого процесса к ингибиторному действию кислорода. Однако влияние иммобилизации на механизмы и продолжительность фотообразования водорода не было исследовано, хотя данный прием часто используется именно для стабилизации физиологических функций и увеличения длительности биотехнологического процесса в условиях стресса. В связи с этим мы

дополнительно исследовали особенности фотообразования водорода иммобилизованной голодающей по сере культурой *C. reinhardtii* и возможности оптимизации этого процесса.

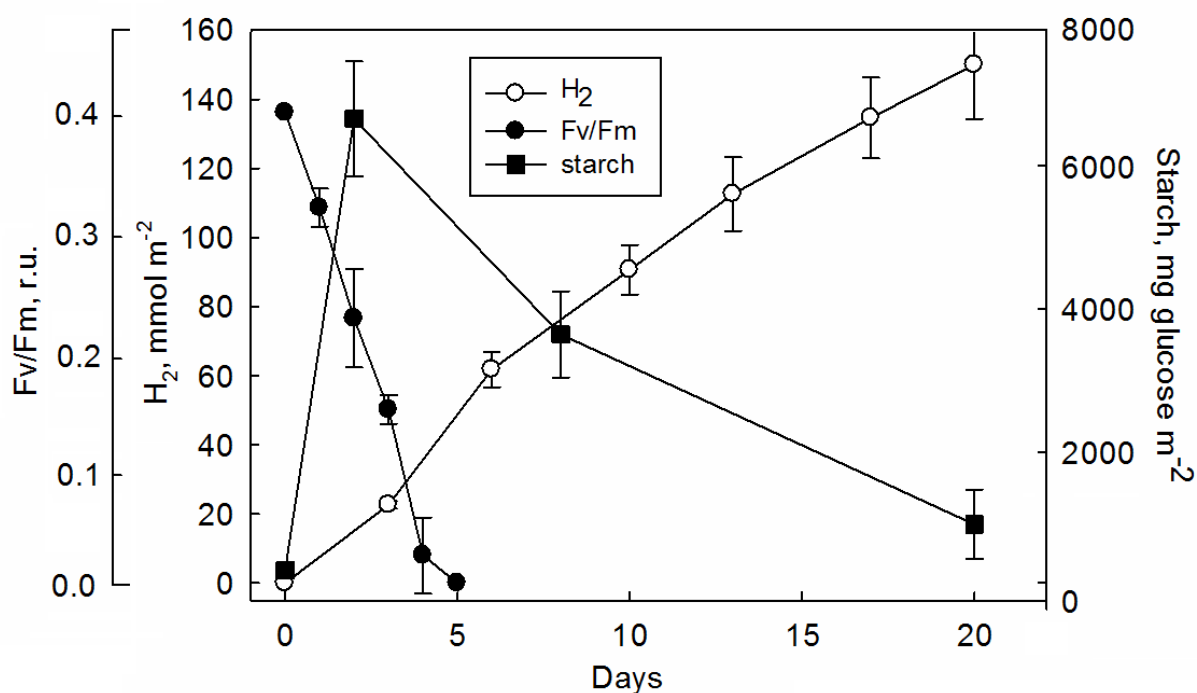


Рис. 6.1. Динамика фотообразования водорода, содержания крахмала и параметра Fv/Fm в иммобилизованной в альгинатных пленках культуре *C. reinhardtii* в ходе инкубации без серы.

Инкубацию проводили в герметично закрытых флаконах на постоянном белом свете с ПФПФ 40 при начальном рН среды 7.5.

На рис. 6.1 приведены данные по динамике содержания водорода в газовой фазе, крахмала в клетках и параметра Fv/Fm в иммобилизованной культуре в течение 20 дней инкубации без серы в герметичных стеклянных флаконах. В отличие от суспензионной культуры, которая самопроизвольно переходит в анаэробноз, иммобилизованную культуру необходимо продувать аргоном в самом начале инкубации без серы. Это связано с тем, что согласно протоколу иммобилизации альгинатные пленки погружаются в небольшой объем среды при большом объеме газовой фазы внутри стеклянного флакона. В этих условиях голодающие клетки не способны сами поглотить весь кислород.

Из рисунка 6.1 видно, что иммобилизация клеток в альгинате приводила к значительному увеличению продолжительности периода активного образования водорода практически до 3х недель по сравнению с несколькими сутками в суспензионной

культуре, свидетельствуя о значительном росте толерантности клеток к деструктивному воздействию стресса. Суммарное количество выделенного водорода за этот период составило 150 ммоль м^{-2} или $0.6 \text{ ммоль мг Хл}^{-1}$, что превышает примерно в 3 раза этот показатель в суспензионной культуре при сходных экспериментальных условиях (эксперименты на рис. 5.1 и 5.2). Скорость выделения водорода была максимальной в течение первой недели инкубации без серы, достигая $15 \text{ ммоль м}^{-2} \text{ сутки}^{-1}$, а затем постепенно снижалась. Накопление крахмала иммобилизованными клетками происходило медленнее по сравнению с клетками в суспензии. Так, содержание крахмала в иммобилизованных голодающих клетках достигало максимума на вторые-третьи сутки инкубации без серы, в то время как в суспензии – примерно через сутки (табл. 3.1). Количество запасенного крахмала было выше в иммобилизованных клетках, достигая 7000 мг м^{-2} через 3 суток инкубации, что составляло в пересчете на хлорофилл $21 \text{ мг Гл (мг Хл)}^{-1}$ по сравнению с величиной 13-14 в суспензионной культуре в наших экспериментальных условиях. После стадии накопления крахмала происходило постепенное снижение его запасов с 7000 мг м^{-2} до 1000 мг м^{-2} на 20е сутки эксперимента. Отличительной чертой иммобилизованной культуры был существенный расход крахмала, достигавший 85% в течение периода активного фотообразования водорода, в то время как в суспензионной культуре этот показатель обычно не превышает 20-50% (Melis et al. 2000, Zhang et al. 2002).

Характер изменений параметра Fv/Fm в иммобилизованной голодающей культуре также значительно отличался от наблюдаемого в суспензии. Так, величина Fv/Fm в клетках в альгинате постепенно снижалась от начального значения (0.4) до нуля в течение пяти дней и оставалась на этом уровне до конца эксперимента (рис 6.1). Достаточно низкое начальное значение Fv/Fm обусловлено продувкой образцов аргоном. Как подробно описано в предыдущей главе, в суспензионной культуре изменения Fv/Fm (или $\Delta F/Fm$) в ходе инкубации без серы носят более сложный характер (см. рис. 5.1 и 5.2) из-за быстрого редокс-зависимого механизма регуляции ФС2 при самопроизвольном переходе культуры в анаэробноз. В иммобилизованной культуре этот механизм регуляции отсутствует.

Приведенные на рис. 6.1 результаты свидетельствуют о том, что большая часть выделенного иммобилизованными клетками водорода не связана с активностью ФС2. Это указывает на преимущественный вклад ФС2-независимого пути в общий выход водорода, в то время как в суспензионной культуре основную роль играет ФС2-зависимый путь. С целью более подробного изучения роли ФС2-независимого пути в фотопродукции

водорода в иммобилизованной культуре мы исследовали действие диурона на выход водорода на разных стадиях серного голодания.

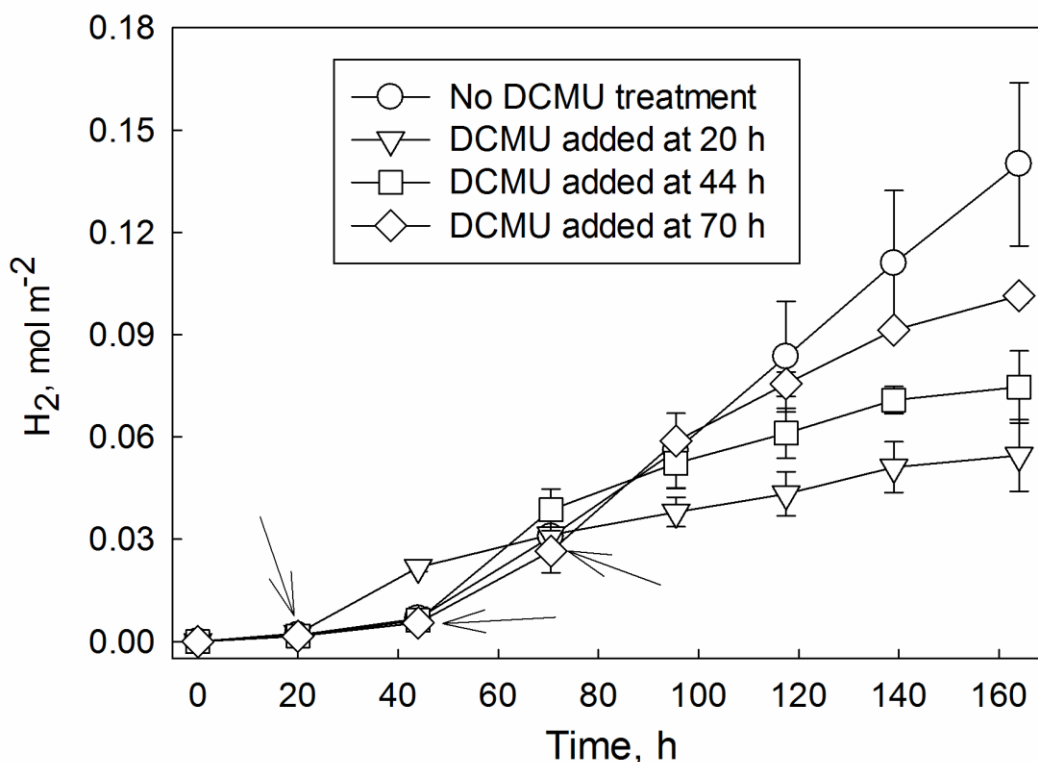


Рис. 6.2. Фотопродукция водорода в иммобилизованной культуре *C. reinhardtii* при инкубации без серы. Стрелками отмечено время добавления в среду 10 мкМ диурона.

Для этого добавляли диурон в среду через 20, 44 и 70 часов инкубации без серы и измеряли продукцию водорода примерно раз в сутки в течение семи суток (рис. 6.2). В контрольной, то есть необработанной диуроном культуре, скорость выделения водорода достигла максимального значения через двое суток инкубации без серы и оставалась на этом уровне до конца эксперимента, а общее количество выделенного за 7 суток водорода составило 140 ммоль м⁻². При введении диурона в среду через 20 ч после начала эксперимента наблюдался значительный транзитный рост количества выделенного водорода, который продолжался в течение суток (рис. 6.2). Однако этот краткосрочный стимулирующий эффект быстро сменялся более продолжительным ингибирующим действием на выделение водорода. Так, продукция водорода в обработанных клетках за весь период инкубации составила всего 50 ммоль м⁻², что на 65% ниже этого показателя в контрольной культуре. При обработке клеток диуроном через 44 ч серного голодания

стимулирующее действие на выделение водорода было менее выраженным по сравнению с обработкой через 20 ч, как было менее выраженным и последующее ингибиторное действие на продукцию водорода. В этом случае общая продукция водорода составила 70 ммоль м⁻², то есть около 50% от величины в необработанных клетках. При введении диурона через 70 ч от начала инкубации полностью пропал стимулирующий эффект на продукцию водорода, однако сохранялось незначительное ингибиторное действие.

Выраженный транзиторный стимулирующий эффект диурона на продукцию водорода на ранней стадии инкубации иммобилизованных клеток без серы объясняется тем, что скорость образования водорода на этой стадии лимитируется гидрогеназной активностью, которая частично подавлена из-за активного состояния ФС2. Ингибирование ФС2 диуроном приводит к снижению уровня кислорода в клетке, дополнительной активации гидрогеназы и, соответственно, к росту скорости фотопродукции водорода. Снижение стимулирующего действия диурона на продукцию водорода на более поздних этапах голодания связано со снижением активности ФС2. Следующее за стимулирующим эффектом ингибирующее действие диурона на фотопродукцию водорода обусловлено подавлением ФС2-зависимого пути образования водорода, а также, вероятно, процесса накопления крахмала голодающими клетками. Как упоминалось выше, содержание крахмала в иммобилизованной культуре возрастает медленнее, чем в суспензии, достигая максимума через 2-3 суток инкубации без серы. Поэтому обработка клеток диуроном на ранней стадии инкубации без серы нарушает процесс накопления крахмала. Как обсуждалось выше, деградация накопленных запасов крахмала обеспечивает восстановительными эквивалентами ФС2-независимый путь продукции водорода, поэтому недостаток крахмала приводит к снижению общего выхода водорода.

Таким образом, исследование действия диурона на фотообразование водорода в иммобилизованной голодающей культуре подтверждает предположение о снижении вклада ФС2-зависимого пути по сравнению с суспензией клеток. В целом, иммобилизация клеток в альгинатных пленках приводит к значительным изменениям характера и механизмов фотопродукции водорода, которая становится более продолжительной и менее зависимой от ФС2 в качестве начального донора электронов. Однако активность ФС2 играет важную роль на начальной стадии голодания (2-3 дня), обеспечивая аккумуляцию запасов крахмала в клетках. Выявленные различия механизмов фотообразования водорода в иммобилизованной и суспензионной культурах указывают на то, что оптимальные условия для этого процесса могут также отличаться. В связи с этим,

дальнейшие исследования были направлены на поиск путей оптимизации условий для фотопродукции водорода в иммобилизованных голодающих клетках *C. reinhardtii*.

6.1.2. Влияние интенсивности и спектральных характеристик света

Хорошо известно, что световые условия чрезвычайно важны для роста и продуктивности фотосинтезирующих организмов. Высокая освещенность может индуцировать фотоингибирование, особенно в стрессовых условиях, в то время как недостаток света лимитирует рост организма (Nishiyama et al. 2011, Tuystjärvi 2013). В экспериментах по фотообразованию водорода голодающими клетками микроводорослей световые условия принципиально важны для двух процессов: 1) переноса электрона из фотосинтетической ЭТЦ на гидрогеназу, и 2) выделения кислорода в ФС2, которое влияет на гидрогеназную активность и скорость фотоингибирования. Ранее было показано, что оптимальная величина интенсивности света для фотопродукции водорода в суспензионной голодающей по сере культуре *C. reinhardtii* составляет около 40 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (Laurinavichene et al. 2004). Столь умеренная освещенность является резонной из-за низкой скорости фотосинтетического электронного транспорта в голодающих клетках (рис. 3.3).

Для выявления оптимальной интенсивности света для фотопродукции водорода клетками иммобилизованной голодающей культуры проводились измерения содержания водорода в газовой фазе флаконов в ходе инкубации без серы в темноте и при интенсивностях света в диапазоне от 5 до 200 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (рис. 6.3). В темноте продукция водорода была незначительной и составляла около 10 ммоль м^{-2} за 17 суток. Как отмечалось ранее, выход водорода в темноте обусловлен, в основном, обратным переносом электронов с НАД(Ф)Н на Фд при участии ФНР. Освещение клеток низким светом с ПФПФ 5 приводило к четырехкратному увеличению выхода водорода по сравнению темновыми условиями, а дальнейшее увеличение ПФПФ с 5 до 80 - к последовательному росту как максимальной скорости выделения водорода, так и общего выхода водорода, который достигал 200 ммоль м^{-2} при ПФПФ 80. Из рисунка видно, что высокий выход водорода при ПФПФ 80 обусловлен высокой скоростью образования водорода с 3 по 10 сутки инкубации, после чего выделение водорода прекращалось. Очевидно, что снижение продукции водорода при ПФПФ ниже 80 обусловлено световым лимитированием фотосинтетического электронного транспорта.

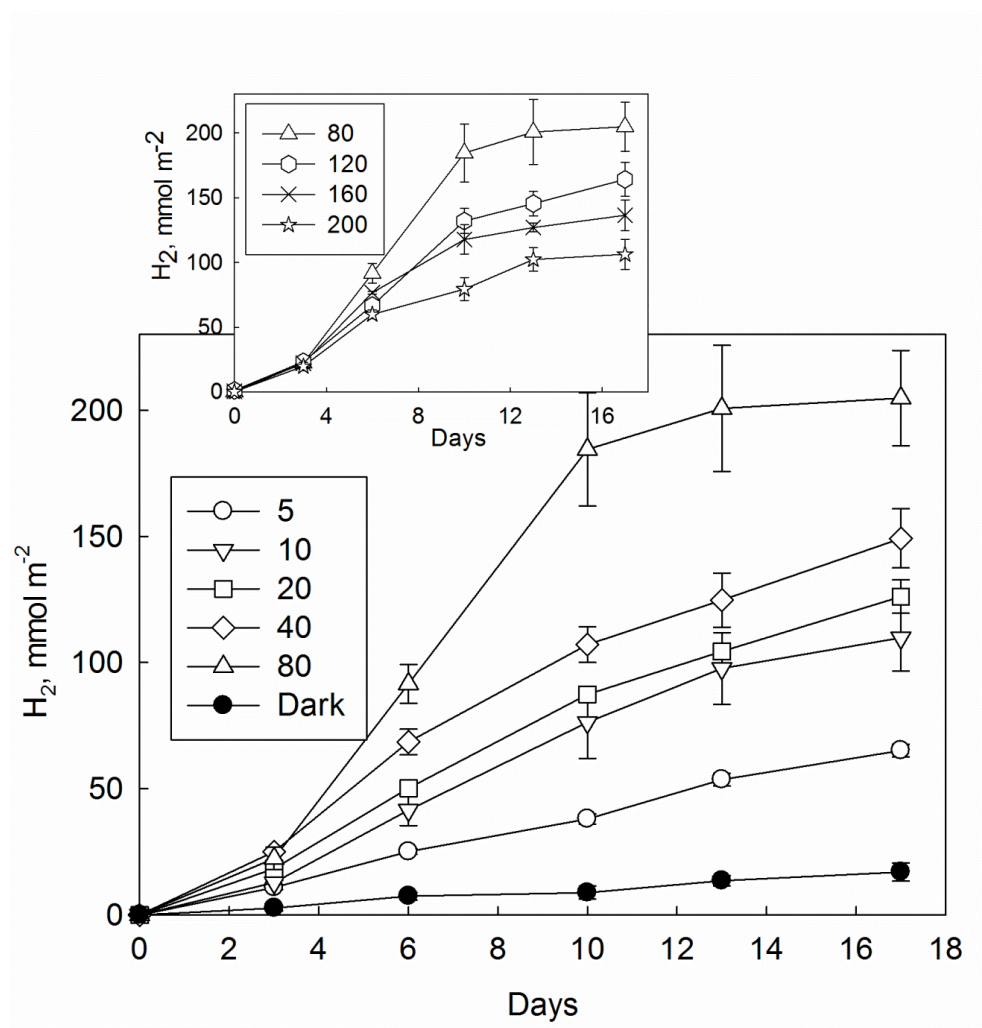


Рис. 6.3. Динамика фотообразования водорода в иммобилизованной культуре *C. reinhardtii* при инкубации без серы в темноте, на низком и умеренном свете с указанием величины ПФПФ. На вставке показана продукция водорода на высоком свете.

Экспериментальные условия, кроме световых, соответствуют указанным к рис. 6.1.

Увеличение интенсивности света с 80 до 120, 160 и 200 $\mu mol\ photons\ m^{-2}\ s^{-1}$ приводило к снижению выхода водорода примерно на 25, 35 и 50%, соответственно (см. вставку к рис. 6.3). Подобное негативное воздействие высокой интенсивности света обусловлено, наиболее вероятно, усилением фотодеструктивных процессов в голодающих водорослевых клетках. Таким образом, интенсивность света 80 $\mu mol\ photons\ m^{-2}\ s^{-1}$ может считаться оптимальной для фотообразования водорода голодающей иммобилизованной культурой при указанных экспериментальных условиях.

Характер спектрального распределения видимого света является важным фактором, влияющим на рост, продуктивность и адаптационные свойства фототрофных организмов

через специфические фоторецепторы и регуляторные механизмы, в том числе переход состояний (Franklin and Whitelam 2004, Dietzel et al. 2008). Недавно на примере высших растений было показано, что разные длины волн видимого спектра могут поглощаться преимущественно либо ФС2, либо ФС1 (Laisk et al. 2014). Переключение между светом ФС2 и ФС1 может представлять биотехнологический интерес в качестве механизма быстрой регуляции баланса между потоками электронов через обе фотосистемы с целью контроля, например, фотообразования кислорода и водорода на разных стадиях инкубации культуры. Ранее Hoshino с соавторами (2012, 2013) исследовали эффекты разных длин волн на фотопродукцию водорода клетками *C. reinhardtii* при инкубации в анаэробных условиях на полной среде и обнаружили, что освещение монохроматическим светом с максимумом при 692 нм (свет ФС1, Voichenko et al. 1998) значительно увеличивает продукцию водорода по сравнению с белым светом. Очевидно, что спектральные характеристики света могут влиять также на фотопродукцию водорода голодающими по сере клетками. Предположительно, освещение голодающей культуры светом ФС1 должно способствовать фотообразованию водорода за счет снижения скорости выделения кислорода в ФС2 и, соответственно, уменьшения фотоингибирования и роста активности гидрогеназы, а также в результате увеличения скорости потока электронов с ФС1 на гидрогеназу. В связи с этим нами было исследовано влияние разных источников монохроматического света на фотопродукцию водорода, активность ФС2 и содержание крахмала в клетках иммобилизованной голодающей по сере культуры *C. reinhardtii*.

В первую очередь был разработан метод определения спектра действия 'Fo rise' у высших растений и микроводорослей, и с его помощью выявлены узкие спектральные полосы в видимом диапазоне волн, соответствующие свету ФС1 или свету ФС2 в клетках зеленых микроводорослей (рис. 2.10 и 2.11). На основании этих данных были отобраны 4 типа монохроматических светодиодов с максимальным излучением при 435 нм (синий свет, свет ФС1), 520 нм (зеленый свет, свет ФС1), 660 нм (красный свет, свет ФС2) и 690 нм (красный свет, свет ФС1) (рис. 2.1). Необходимо отметить, что интенсивность света каждого из выбранных источников была выставлена с учетом коэффициента светового поглощения таким образом, чтобы количество поглощенного света было одинаковым при разных длинах волн.

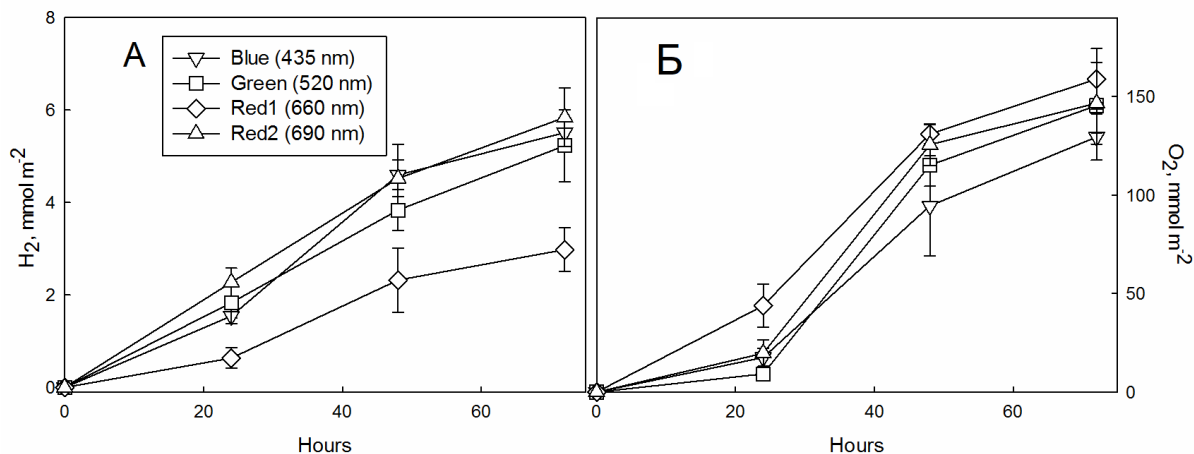


Рис. 6.4. Выделение водорода (А) и кислорода (Б) иммобилизованными клетками *C. reinhardtii* в ходе инкубации на полной среде ТАР в герметичных флаконах при освещении указанными волнами монохроматического света в режиме 18 ч свет/6 ч темнота.

Экспериментальные условия, кроме спектральных характеристик источников света, соответствуют указанным к рис. 6.1.

Сначала мы протестировали способность каждого из отобранных источников света индуцировать выделение водорода и кислорода клетками иммобилизованной культуры *C. reinhardtii* при инкубации на полной среде ТАР после продувки аргоном. Как упоминалось выше, свет ФС1 должен способствовать выделению водорода, а свет ФС2 – кислорода. В ходе эксперимента проводили периодические измерения содержания водорода и кислорода в газовой фазе флаконов (рис. 6.4). Для поддержания гидрогеназной активности в клетках в условиях инкубации на полной среде использовали циклический режим освещения: 18 ч свет/6 ч темнота. Такой режим обеспечивает восстановление гидрогеназной активности за время темного периода благодаря падению содержания кислорода в газовой фазе. Наибольшая скорость фотообразования водорода наблюдалась в течение первых 3 ч после темного периода, постепенно снижаясь до 20-30% от начального уровня к концу светового периода. Средняя скорость образования водорода в этих условиях была на порядок ниже, чем в условиях дефицита серы. При освещении образцов синим, зеленым и красным (690 нм) светом (светом ФС1) наблюдали сходную динамику продукции водорода, выход которого составлял около 5.5 ммоль м⁻² через 72 ч, В то же время количество водорода, выделенного при освещении красным (660 нм) светом, было в два раза ниже (рис. 6.4А). Напротив, скорость выделения кислорода была максимальной в образцах, освещенных красным (660 нм) светом, по сравнению с

остальными световыми условиями. Особенно заметной разница была в течение первых суток инкубации (рис. 6.4Б). При более длительной инкубации скорости выделения кислорода в разных световых условиях практически сравнились, вероятно, в результате медленной модификации ССК, направленной на восстановление энергетического паритета между ФС2 и ФС1. Приведенные результаты подтверждают предположение о том, что выбранные источники света ФС1 способствуют фотопродукции водорода, а свет ФС2 поддерживает выделение кислорода в клетках *C. reinhardtii*.

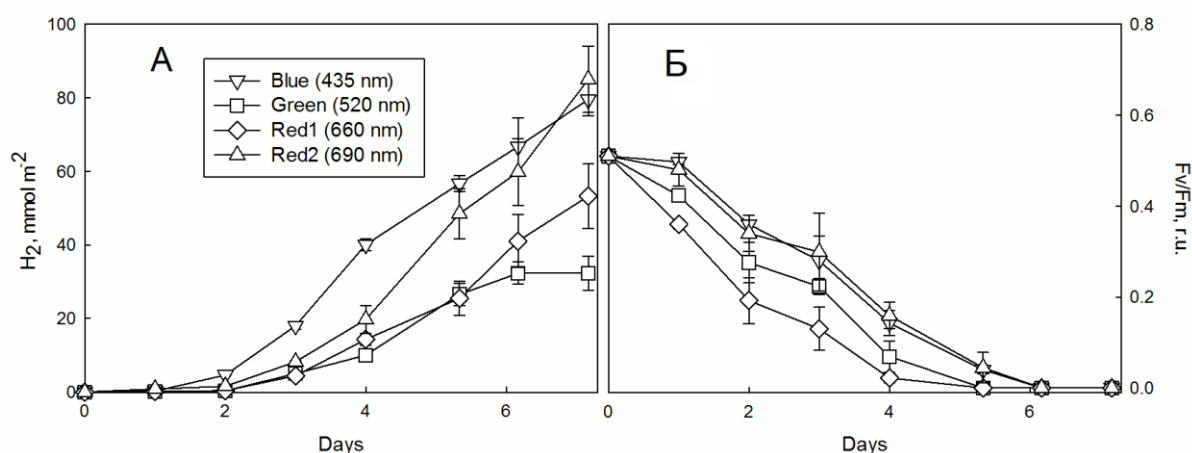


Рис. 6.5. Фотопродукция водорода (А) и изменения F_v/F_m (Б) в иммобилизованной культуре *C. reinhardtii* в ходе инкубации без серы в герметичных флаконах при постоянном освещении указанными волнами монохроматического света.

Экспериментальные условия, кроме спектральных характеристик источников света, соответствуют указанным к рис. 6.1.

На рис. 6.5А приведена динамика фотопродукции водорода иммобилизованной культурой *C. reinhardtii* в течение 8 дней инкубации без серы при освещении теми же источниками монохроматического света. Из рисунка видно, что при освещении синим или красным(690 нм) светом количество водорода, выделенного за весь период инкубации, было в 1.5-2.0 раза больше, чем при освещении красным(660 нм) или зеленым светом. Это было обусловлено более ранней инициацией и более высокой скоростью выделения газа. Наблюдаемые эффекты могут частично отражать специфическое воздействие разных длин волн на активность ФС2 на начальной стадии голодания, а также на процессы накопления/деградации крахмала. Действительно, динамика параметра F_v/F_m выявила

существенные вариации при разных условиях освещенности (рис. 6.5Б). Так, снижение величины F_v/F_m в ходе инкубации без серы происходила медленнее в образцах на синем и красном(690 нм) свете, с промежуточной скоростью на зеленом свете и наиболее быстро на красном(660 нм) свете. Разница в скорости инактивации ФС2 была максимальной в течение первых суток инкубации, что указывает на дестабилизацию ФС2 в результате фотоингибирования.

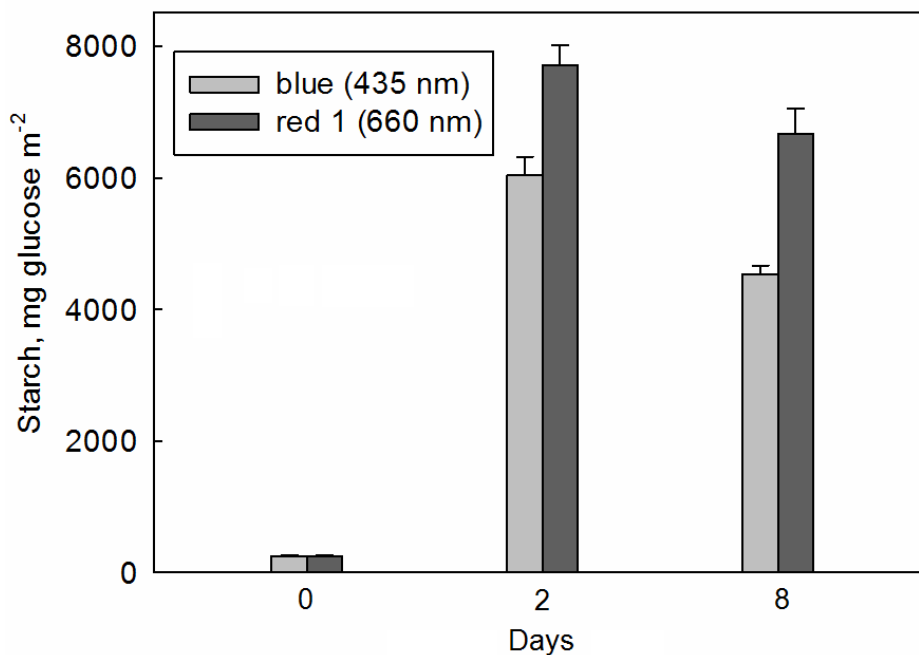


Рис. 6.6. Изменения содержания крахмала в иммобилизованных клетках *C. reinhardtii* в контроле (0) и через 2 и 8 суток инкубации без серы при постоянном освещении красным (660 нм) или синим (435 нм) монохроматическим светом.

Результаты на рис. 6.5 и 6.6 относятся к одному эксперименту.

Параллельно с выходом водорода и величиной F_v/F_m определялось содержание крахмала в клетках при освещении синим и красным(660 нм) источниками света (рис. 6.6). За двое суток инкубации без серы содержание крахмала возросло с 0.25 г м⁻² до 8 г м⁻² при освещении красным(660 нм) и до 6 г м⁻² при освещении синим светом. Последующая инкубация в течение 6 суток приводила к снижению внутриклеточных запасов крахмала примерно на 1.0 и 1.3 г м⁻² при освещении красным(660 нм) и синим светом, соответственно. Полученные результаты указывают на то, что свет ФС2 способствует накоплению крахмала на начальной стадии голодания, несмотря на ингибиторное

действие на ФС2. Однако скорость деградации углеводов, которая является важным фактором фотообразования водорода, была более высокой при освещении светом ФС1.

Полученные результаты однозначно свидетельствуют о стимулирующем действии света ФС1 на фотопродукцию водорода как в стандартных условиях, так и при действии минерального стресса. Увеличение выхода водорода при освещении светом ФС1 сопровождалось, в частности, снижением фотоингибирования и увеличением скорости деградации запасов крахмала. Механизмы снижения фотопродукции водорода при освещении клеток зеленым светом, который является светом ФС1, не ясны и, по-видимому, не имеют связи с фотосинтетическим электронным транспортом.

6.1.3. Начальный pH среды как фактор оптимизации

Кислотно-щелочной баланс среды является важным фактором, влияющим на рост и продуктивность микроводорослей. В частности, начальное значение pH среды оказывает существенное влияние на фотопродукцию водорода в суспензионной голодающей по сере культуре *C. reinhardtii*. Так, было показано, что оптимальные начальные значения pH среды находятся в диапазоне 7.3 – 7.7 в зависимости от условий культивирования (Kosourov et al. 2003; Jo et al. 2006). В нашей работе исследовали влияние начального pH среды на фотопродукцию водорода в иммобилизованной голодающей по сере культуре *C. reinhardtii*. Для этого альгинатные пленки с инкапсулированными клетками погружали в свежую среду TAP-S со значениями pH 6.5, 7.0, 7.5 или 8.0 и инкубировали на белом свете интенсивностью 40 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹. В ходе 48 ч. инкубации величина pH возрастала от начального уровня до ~8.0 и практически не изменялась до конца эксперимента (рис. 6.7). При инкубации иммобилизованной культуры в темноте величина pH среды практически не изменялась в течение 3-4 суток, свидетельствуя об основном вкладе реакций фотосинтеза в подщелачивание среды.

На рис. 6.8 приведены изменения продукции водорода и величины F_v/F_m в ходе инкубации иммобилизованной культуры *C. reinhardtii* без серы при разных начальных значениях pH. Количество выделенного водорода за весь период инкубации было минимальным при начальной величине pH 8.0, промежуточным при pH 7.5 и максимальным при pH 7.0 и 6.5. Продукция водорода снижалась при значениях pH среды ниже 6.5 или выше 8.0. Такие параметры фотопродукции водорода, как максимальная скорость и продолжительность были минимальными при начальном pH среды 8.0.

Снижение начального рН с 8.0 до 7.5 привело к увеличению продолжительности выделения водорода, а дальнейшее снижение до 7.0 и 6.5 - к росту максимальной скорости продукции водорода.

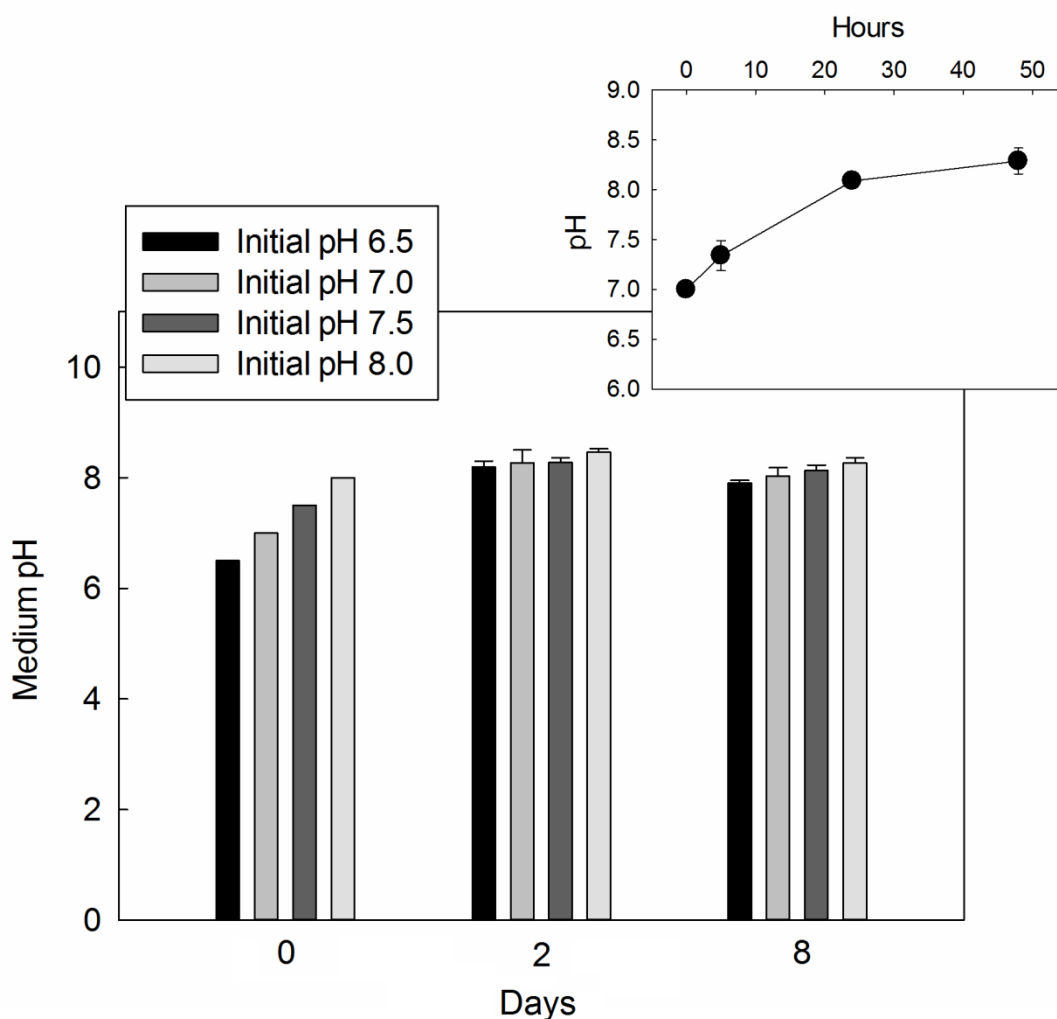


Рис. 6.7. Изменения рН среды при инкубации иммобилизованной культуры *C. reinhardtii* без серы в герметичных флаконах в условиях разной начальной величины рН. На вставке показаны изменения рН среды в течение 48 ч при начальном значении 7.0.

Экспериментальные условия, кроме начальной величины рН, соответствуют указанным к рис. 6.1.

Начальные значения F_v/F_m также выявили отчетливую зависимость от рН среды (см. вставку к рис. 6.8). Так, начальные значения F_v/F_m были 0.47 при рН 7.5–8.0, 0.53 при рН 7.0 и 0.58 при рН 6.5. Выявленная разница между уровнями F_v/F_m сохранялась в течение 5 дней инкубации без серы, пока активность ФС2 не снизилась до нуля. Начальная величина рН среды также влияла на динамику содержания крахмала в культуре (рис. 6.9). Быстрее всего клетки аккумулировали крахмал при начальном рН 6.5, содержание которого возрастало от 190 мг м⁻² до 7700 мг м⁻² в течение 48 ч. Повышение

начального рН среды приводило к снижению максимального уровня накопленного крахмала, который падал с 7700 мг м⁻² при рН 6.5 до 5800 при рН 8.0. В течение последующих 6 дней инкубации уровень крахмала в клетках снижался на 40 и 60% от максимального значения при рН 6.5 и 8.0, соответственно. Однако скорость деградации крахмала, выраженная в абсолютных единицах, была примерно одинаковой в культурах при разных начальных значениях рН, составляя 3000 - 3200 мг м⁻² за 6 дней.

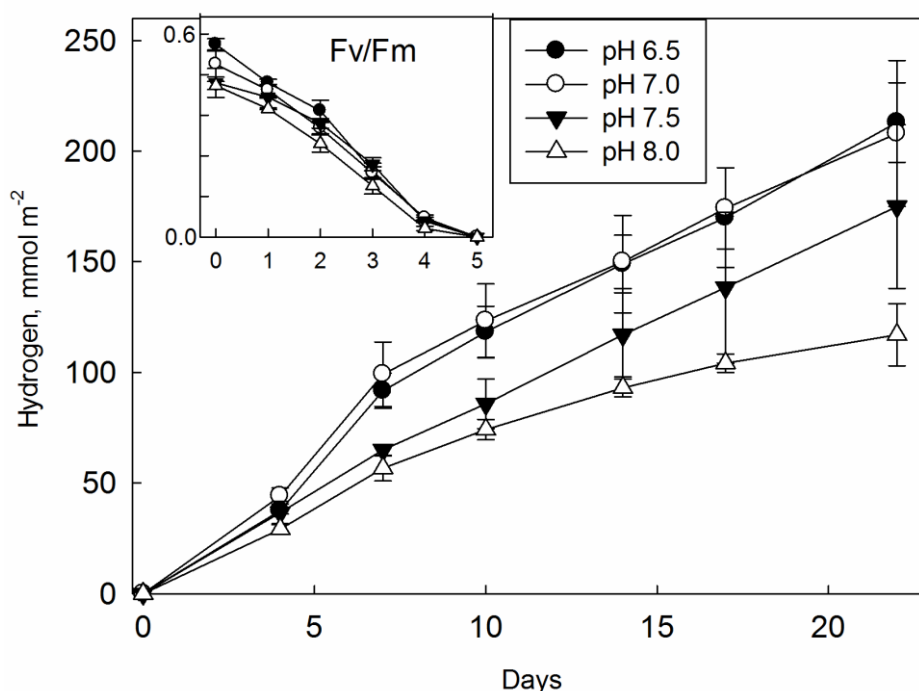


Рис. 6.8. Фотообразование водорода в иммобилизованной культуре *C. reinhardtii* при инкубации без серы в герметичных флаконах в условиях разной начальной величины рН среды. На вставке показаны изменения параметра F_v/F_m в зависимости от начальных значений рН.

Экспериментальные условия, кроме начальной величины рН среды, соответствуют указанным к рис. 6.1.

Таким образом, максимальный выход водорода в иммобилизованной голодающей культуре наблюдается при нейтральных и слабокислых значениях рН среды (6.5-7.0), что может быть следствием влияния на общее физиологическое состояние клеток, либо на физические свойства альгинатного геля. Так, известно, что увеличение рН среды до 7.5 и выше приводит к ухудшению качества альгинатного геля (Dainty et al. 1986), вызывая преждевременное высвобождение клеток. В наших экспериментах величина рН среды возрастала до значения 8.0 в течение двух дней световой инкубации, а повреждения

пленок наблюдались не ранее, чем через 10 дней. Поэтому более вероятно, что величина pH среды влияет на адаптационные процессы в клетках на начальной стадии серного голодания. В частности, фотохимическая активность ФС2 и количество накопленного крахмала на этой стадии были самыми высокими при pH 6.5, что может влиять на продукцию водорода.

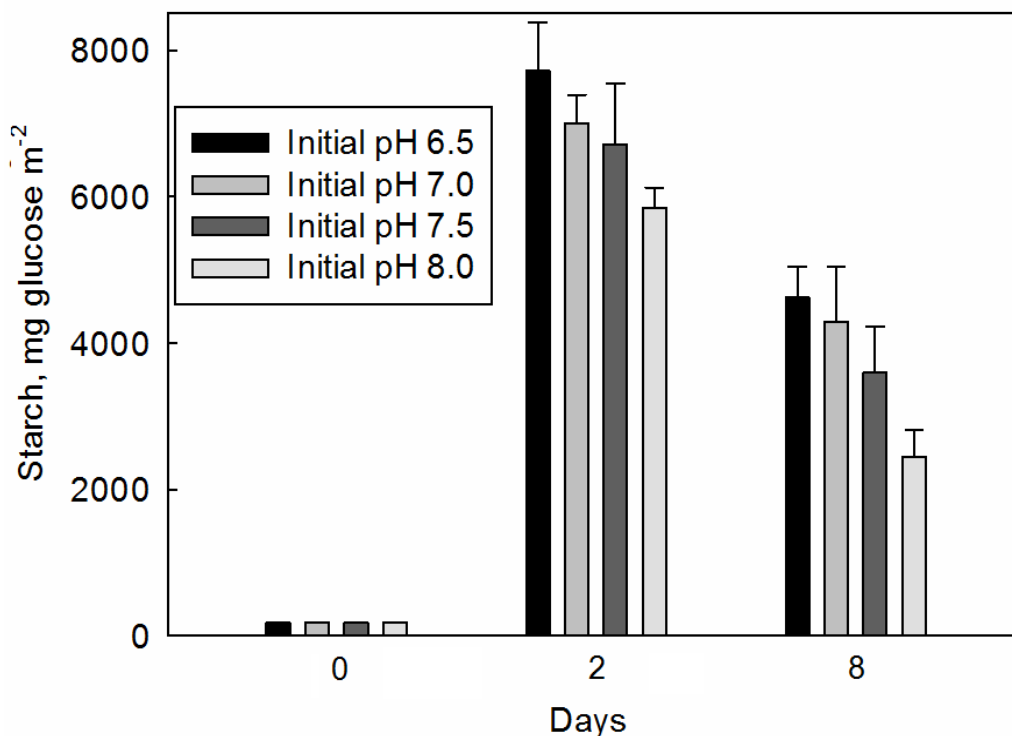


Рис. 6.9. Изменения содержания крахмала в иммобилизованных клетках *C. reinhardtii* при инкубации без серы при разных начальных значениях pH среды. Первое измерение (0 сутки) проводили через 2 ч после иммобилизации клеток. Результаты на рис. 6.8 и 6.9 получены в ходе одного эксперимента.

6.2. Исследование фотообразования водорода в условиях дефицита магния как альтернативы серному голоданию

Традиционно наиболее хорошо изучены механизмы фотопродукции водорода культурой *C. reinhardtii* в условиях недостатка серы. Также было показано, что дефицит азота, фосфора или магния может индуцировать переход суспензионной культуры в анаэробные условия с последующим продолжительным фотообразованием водорода (Philipps et al. 2012, He et al. 2012, Vatyrova et al. 2012, 2015, Volgusheva et al. 2015, 2017). В отличие от азота, фосфора и серы, магний не входит в состав аминокислот и нуклеотидов, поэтому его недостаток оказывает более мягкое воздействие. При этом

магний является ключевым элементом молекулы хлорофилла, и его дефицит приводит к снижению содержания хлорофилла (хлорозу) в клетках растений и водорослей (Volgusheva et al. 2015, Guoa et al. 2016). В результате хлороза снижается поперечное сечение поглощения на реакционный центр, что является одним из факторов, повышающих эффективность использования света в фотосинтезе в условиях плотной культуры микроводорослей в фотобиореактора. Более того, магний является кофактором Рубиско, и его дефицит в клетке снижает каталитическую активность фермента и, соответственно, скорость фиксации CO₂ (Andersson 2008). Как обсуждалось в предыдущей главе, инактивация Рубиско в голодающей по сере культуре является ключевым фактором самопроизвольного установления анаэробных условий в закрытом фотобиореакторе. Ранее было показано, что, в отличие от фосфорного и азотного голодания, которые не увеличивают выход водорода по сравнению с серным голоданием, дефицит магния повышает продукцию водорода (Volgusheva et al. 2015). В связи с этим особый интерес представляет изучение специфики механизмов фотообразования водорода голодающими по магнию клетками с целью выявления путей дальнейшей оптимизации процесса.

На рис. 6.10А представлены динамики содержания кислорода и водорода в образцах суспензионных культур *C. reinhardtii* при инкубации без серы или магния в герметичных флаконах. Необходимо отметить, что в случае с магниевым голоданием 0 ч по оси абсцисс соответствует пересеву культуры на свежую среду без магния после 7 суток роста без магния в аэробных условиях. Голодающая по магнию культура характеризовалась короткой аэробной фазой, более поздней инициацией выделения водорода и более высоким общим выходом водорода по сравнению с голодающими по сере клетками. Так, выход водорода составлял 1.3 и 2.2 ммоль H₂ (10⁶ кл)⁻¹ при серном и магниевом голодании, соответственно. Необходимость нормирования содержания водорода на количество клеток, а не на Хл, обусловлена частичным выцветанием пигмента в голодающей по магнию культуре. Наблюдаемый рост выхода водорода на 50-60% при магниевом голодании происходил, в основном, за счет увеличения периода активного выделения водорода с 5-6 суток при серном голодании до 10 суток при инкубации без магния.

Характер изменений параметра $\Delta F/F_m'$ значительно отличался в условиях дефицита магния по сравнению с дефицитом серы (рис. 6.10Б). В соответствии с результатами, приведенными в предыдущей главе, переход голодающей по сере культуры в анаэробные условия сопровождался быстрым снижением $\Delta F/F_m'$ с 0.4 до нуля и последующим незначительным ростом на стадии фотообразования водорода, отражающим редокс-

зависимую регуляцию ФС2. В отличие от этой динамики, быстрое снижение $\Delta F/Fm'$ при переходе голодающей по магнию культуры в анаэробноз было не полным - с 0.58 до 0.38, а затем происходило медленное уменьшение $\Delta F/Fm'$ до 0.10 в течение 8 суток. Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой остаточной активности ФС2 в голодающей по магнию культуре на стадии фотообразования водорода.

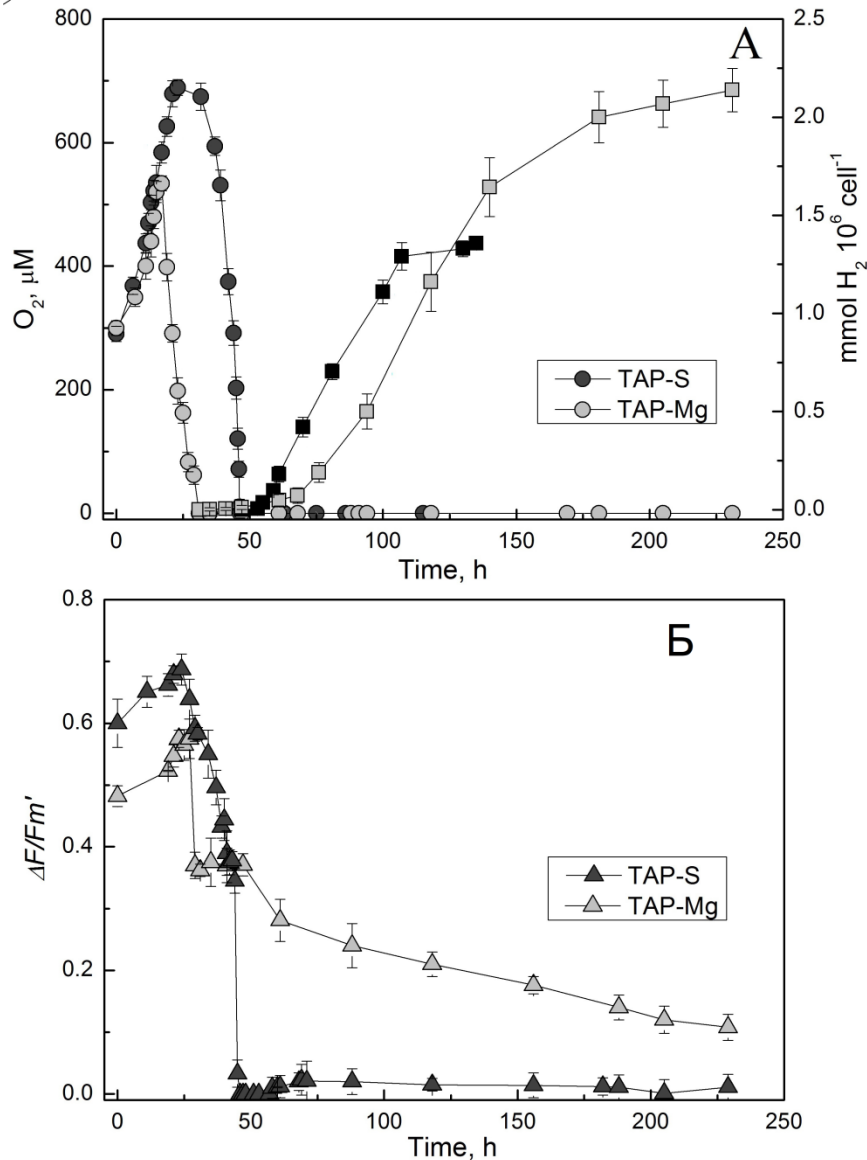


Рис. 6.10. Динамика выделения водорода и концентрации растворенного кислорода (А), а также параметра Fv/Fm' (Б) в суспензионной культуре *C. reinhardtii* при инкубации в герметичных флаконах без серы или магния на постоянном свете с ПФПФ 100.

Начальные значения концентрации клеток и рН среды были $4 \times 10^6 \text{ мл}^{-1}$ и 7.5, соответственно.

Далее были проведены сравнительные исследования фотопродукции водорода в иммобилизованной культуре *C. reinhardtii* при инкубации без магния или серы. Когда культуры инкубировали без серы или магния при интенсивности света 40 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, то скорость выделения водорода была одинаковой в течение 25 дней эксперимента (рис. 6.11). После этого выделение водорода прекращалось в голодающей по сере культуре, в то время как голодающие по магнию клетки продолжали выделять водород еще в течение 10 дней. Благодаря этому общий выход водорода в голодающей по магнию культуре возрастал на 30% по сравнению с серным голоданием. Динамики параметра $\Delta F/Fm'$ также выявили значительные различия между двумя типами минерального стресса. Начальное значение $\Delta F/Fm'$ в магниевом эксперименте было ниже, чем в эксперименте с серой, что обусловлено наличием предварительной стадии роста культуры без магния. Величина $\Delta F/Fm'$ в голодающих по сере клетках быстро снижалась с 0.7 до 0.07 в течение 7 дней, то есть на 90%, что с незначительными отличиями соответствует динамике на рис. 6.1. В отличие от этого, величина $\Delta F/Fm'$ в голодающей по магнию культуре снижалась всего на 10% (с 0.53 до 0.48) за тот же период времени.

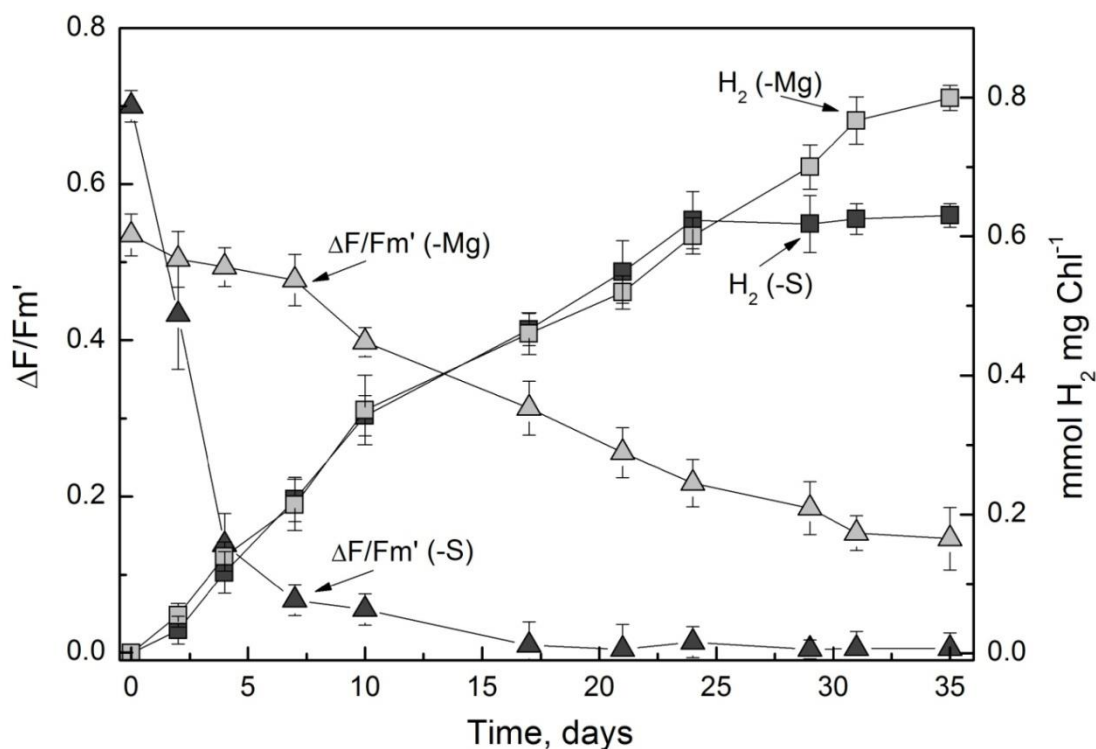


Рис. 6.11. Фотопродукция водорода и изменения параметра Fv/Fm при инкубации иммобилизованных клеток *C. reinhardtii* в герметичных флаконах на среде без серы (-S) или магния (-Mg) на постоянном свете с ПФПФ 40.

Приведенные на рис. 6.10 и 6.11 результаты свидетельствуют о том, что скорости фотопродукции водорода суспензионной и иммобилизованной культурами микроводорослей примерно одинаковы в условиях дефицита серы и магния, однако в последнем случае значительно увеличивается продолжительность периода активного выделения водорода. Отличительной особенностью магниевого голодания является достаточно высокая активность ФС2 на анаэробной стадии голодания. Этот факт свидетельствует о менее восстановленном состоянии редокс цепей в голодающих по магнию клетках, что, по-видимому, положительно влияет на общее физиологическое состояние клеток.

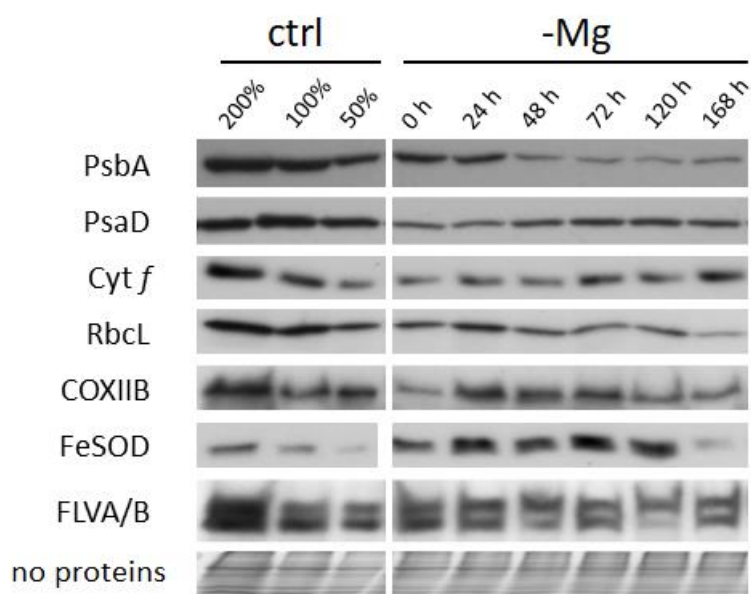


Рис. 6.12. Вестерн блот белков PsbA, PsaD, цит *f*, RbcL, COXIIb, Fe-COD и Flv A/B из клеток *C. reinhardtii* в стандартных условиях роста (ctrl) и на разных стадиях инкубации без магния (-Mg).

Экспериментальные условия соответствуют указанным к рис. 6.10.

Для более подробного исследования состояния ФСА в голодающих по магнию клетках измеряли содержание фотосинтетических и митохондриальных белков в ходе инкубации без магния (рис. 6.12). Из рисунка видно, что содержание белков основных фотосинтетических комплексов, включая ФС2 и цит *b_f* в тилакоидной мембране и Рубиско в строме хлоропласта, было более стабильным в условиях магниевого голодания по сравнению с серным (рис. 6.12 и 3.2). Как отмечалось выше, 0 ч на рис. 6.12 соответствует состоянию культуры после аэробного роста на среде без магния в течение

недели, поэтому содержание белков на этом этапе отличается от контрольного уровня. Так, содержание PsbA (D1) белка снижалось в 0 ч на 50% по сравнению с контролем, не изменялось в течение 24 ч, затем резко опускалось до 30% от контрольного значения в течение последующих 24 ч инкубации, и оставалось на этом уровне до конца эксперимента. В то же время в голодающих по сере клетках D1 белок практически отсутствовал через 72 ч инкубации (рис. 3.2). Содержание белков PsaD, *cyt f* и RbcL при дефиците магния несколько снижалось в 0 ч по сравнению с контролем, но затем постепенно возрастало и сохранялось на достаточно высоком уровне практически до конца эксперимента (рис. 6.12). Напротив, в условиях серного голодания только белки ФС1 сохраняли стабильность, в то время как содержание *cyt f* и RbcL снижалось до 20% от уровня в контроле всего за 48 ч инкубации (рис. 3.2). Несмотря на достаточно высокое присутствие Рубиско в голодающих по магнию клетках, каталитическая активность этого фермента была, скорее всего, низкой из-за дефицита иона магния в качестве кофактора. В пользу этого предположения свидетельствует факт произвольного перехода голодающих по магнию клеток в анаэробноз при достаточно высокой активности ФС2 (рис. 6.10), что возможно только в условиях инактивации цикла Кальвина. Содержание цитохром оксидазы (СОХ) в митохондриях, железосерных белков FlvA/B и Fe-СОД в хлоропласте было выше в клетках, голодающих по магнию, чем по сере (рис. 6.12, 3.2, 3.8). Измерение скорости темнового поглощения кислорода в присутствии ингибиторов митохондриального дыхания выявило превышение активности РТОХ в среднем на 30% в клетках в условиях магниевого голодания по сравнению с серным голоданием (рис. 6.13 и 3.9).

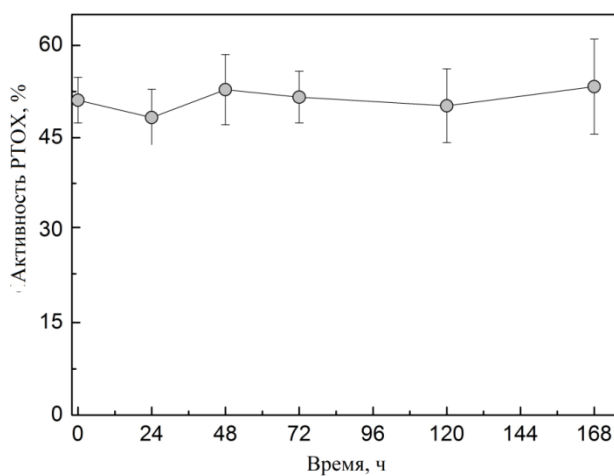


Рис. 6.13. Изменения активности РТОХ в клетках *C. reinhardtii* при магниевом голодании. Экспериментальные условия соответствуют указанным к рис. 6.10.

Таким образом, основной особенностью магниевого голодания является сохранение активности компонентов световых реакций фотосинтеза, в частности, ФС2 и цит *b₆f*, что,

вероятно, положительно влияет на продолжительность фотообразования водорода. Очевидно, что достаточно активное образование кислорода голодающими по магнию клетками в анаэробных условиях должно компенсироваться высокой скоростью его утилизации в процессах митохондриального и хлоропластного дыхания, а также в реакциях псевдоциклического транспорта электронов на свету. Факт того, что содержание FlvA/B и Fe-SOD в клетках было выше в условиях дефицита магния по сравнению с дефицитом серы, свидетельствует в пользу приоритетного участия псевдоциклических путей в эффективной утилизации кислорода в голодающей по магнию клетке. Повышенная генерация кислорода клетками в условиях дефицита магния может поддерживать реакции клеточного дыхания, улучшая адаптацию культуры к стрессовым условиям.

Глава 7. Механизмы регуляции фотосинтеза в листьях фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) в условиях дефицита азота

7.1. Активность первичных процессов и редокс состояние фотосинтетической ЭТЦ

Для понимания общих механизмов адаптации ФСА зеленых растений (Viridiplantae) к дефициту минерального питания необходимо провести сравнительные исследования между наиболее крупными входящими таксонами: зелеными водорослями (Chlorophyta) и высшими растениями (Embryophyta). В качестве объекта высших растений использовали фасоль обыкновенную (*Phaseolus vulgaris*) из-за хорошей способности к росту на жидкой среде.

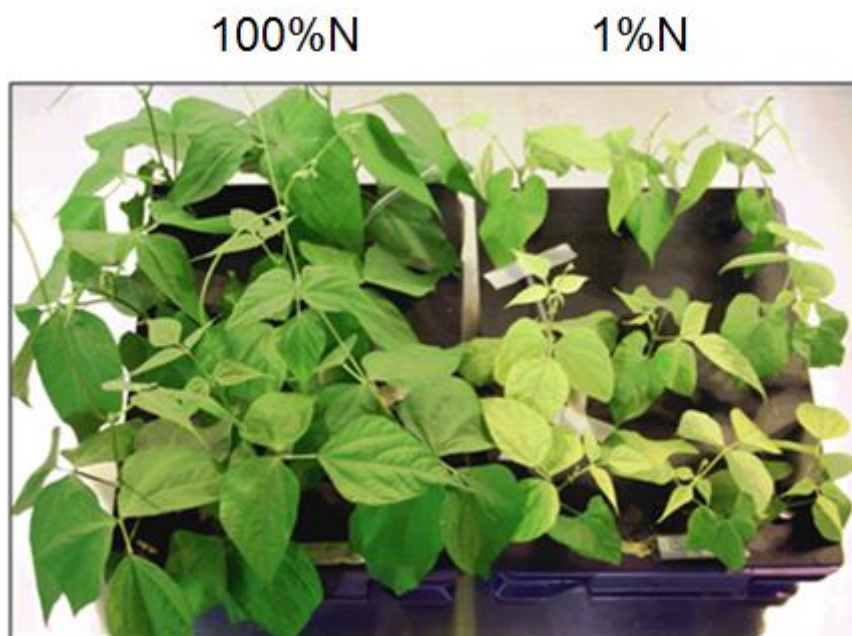


Рис. 7.1. Десятидневные проростки *P. vulgaris*, выращенные в условиях гидропоники на полной среде (100%N) и на среде с 1% от стандартного содержания азота (1%N).

Фасоль растили в течение 14 дней на полной среде (контрольные растения, 100%N) и на среде, содержащей 1% азота от стандартного количества (голодающие растения, 1%N). Дефицит азота приводил к снижению биомассы проростков фасоли почти в два раза по сравнению с контрольными растениями. Внешний вид 10 дневных проростков показан на рис. 7.1. Также азотное голодание сопровождалось хлорозом, так как содержание Хл составляло 22.6 мкг м⁻² в листьях контрольных растений и всего 11.3 мкг

м² в листьях голодающих растений (табл. 7.1). Выцветание хлорофилла, молекула которого содержит 4 атома азота, является типичными признаком азотного голодания (Marschner 1995). Однако соотношение Хл *a* к Хл *b* не претерпевало существенных изменений при голодании, составляя 3.3 в стандартных условиях роста и 3.1 при дефиците азота (табл. 7.1). Эти данные свидетельствуют об отсутствии значительных изменений в соотношении между периферическими и коровыми антенными комплексами. Дефицит азота также индуцировал снижение общего содержания белков на 13%, которое составляло 0.86 мг см⁻² в контроле и 0.76 мг см⁻² в голодающих растениях. Это связано, прежде всего, с недостатком азота для синтеза аминокислот, а также снижением содержания рибосом (Marschner 1995). Как и голодающие по сере микроводоросли, голодающие по азоту растения накапливали значительное количество крахмала в хлоропластах. Так, содержание крахмала в листьях голодающих растений достигало 2.00 мг см⁻², что примерно на порядок превышало величину в контрольных растениях – 0.19 мг см⁻² (табл. 7.1). Запасание углеводов в таких количествах свидетельствует о нарушении баланса между процессами образования и использования продуктов фотосинтеза.

Таблица 7.1. Содержание Хл, общего белка, крахмала и величина F_v/F_m в листьях контрольных и голодающих по азоту проростков *P. vulgaris*.

%N	Хл (<i>a+b</i>) мкг см ⁻²	Хл <i>a/b</i> мкг мкг ⁻¹	Белок, мг см ⁻²	Крахмал, мг см ⁻²	F_v/F_m
100%N	22.6±2.3	3.3±0.3	0.86±0.05	0.19±0.03	0.80±0.01
1%N	11.3±1.9	3.1±0.5	0.76±0.07	2.01±0.09	0.72±0.03

Несмотря на вышеописанные изменения ростовых и биохимических характеристик голодающей культуры, ППФ сохраняли высокую активность в условиях дефицита азота. Величина F_v/F_m , характеризующая фотохимическую активность ФС2, составляла 0.80 в листьях контрольных растений, снижаясь до 0.72 в условиях голодания (табл. 7.1). Однако наблюдаемое снижение F_v/F_m связано, скорее всего, с оптическими эффектами из-за низкого содержания хлорофилла, а не с изменением активности ФС2 *per se*. Это предположение подтвердилось при определении кислород-выделяющей активности ФС2

и скорости электронного транспорта через ФС2 в тилакоидных мембранах, изолированных из листьев контрольных и голодающих *P. vulgaris*. Так, максимальная активность ФС2 составила 260 и 288 мкмоль O₂ (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹ в стандартных условиях и при дефиците азота, соответственно (табл. 7.2), выявив незначительный рост в препаратах из голодающих растений. Измерения максимальных скоростей электронного транспорта через ФС1 и ФС2 в тилакоидных мембранах, проведенные с использованием ДХФИФН₂/ДХФИФ в качестве донора/акцептора электронов и метил виологена в качестве акцептора электронов, не выявили снижения активности в условиях голодания. Наоборот, как и в случае с кислород-выделяющей активностью ФС2, скорость электронного транспорта через ФС1 и ФС2 несколько возросла в препаратах из голодающих растений (табл. 7.2). Эти данные свидетельствуют о сохранении нормального баланса между процессами фотоокислительной деструкции и репарации ПБК в тилакоидной мембране в условиях азотного голодания.

Таблица 7.2. Максимальный электронный транспорт через ФС2 и ФС1 в тилакоидных мембранах из листьев контрольных и голодающих по азоту проростков *P. vulgaris*.

%N	H ₂ O→DCBQ мкмоль O ₂ (мг Хл) ⁻¹ ч ⁻¹	H ₂ O→ДХФИФ мкмоль ДХФИФ (мг Хл) ⁻¹ ч ⁻¹	ДХФИФН ₂ →MV мкмоль O ₂ (мг Хл) ⁻¹ ч ⁻¹
100%N	260±11	129±16	284±6
1%N	288±8	137±11	305±8

Из приведенных выше результатов становится очевидным, что наблюдаемое выцветание хлорофилла в листьях голодающих растений не связано с деструкцией фотосинтетических комплексов, а отражает либо снижение площади тилакоидных мембран в хлоропласте, либо снижение количества хлоропластов в клетке. Для оценки размера и количества хлоропластов в клетках паренхимы листа использовали флуоресцентный конфокальный микроскоп. Сравнение листьев из контрольных и голодающих побегов выявило многократное снижение количества хлоропластов в клетках листьев голодающих растений (рис. 7.2). При этом размер хлоропластов возрос в

условиях голодания, по-видимому, в результате накопления значительных запасов крахмала и нарушения деления. Таким образом, обесцвечивание листьев голодающих растений обусловлено, главным образом, снижением содержания хлоропластов в клетках из-за нарушения хлоропластного деления. Соответственно, снижалось общее количество фотосинтетических структур в клетке, однако структурно-функциональная организация ППФ в отдельном хлоропласте не претерпевала существенных изменений. Полученные результаты свидетельствуют о стабильно активном состоянии фотосинтетических процессов в тилакоидной мембране голодающих по азоту растений, в то время как серное голодание у микроводорослей вызывает инактивацию практически всех компонентов фотосинтетической ЭТЦ.

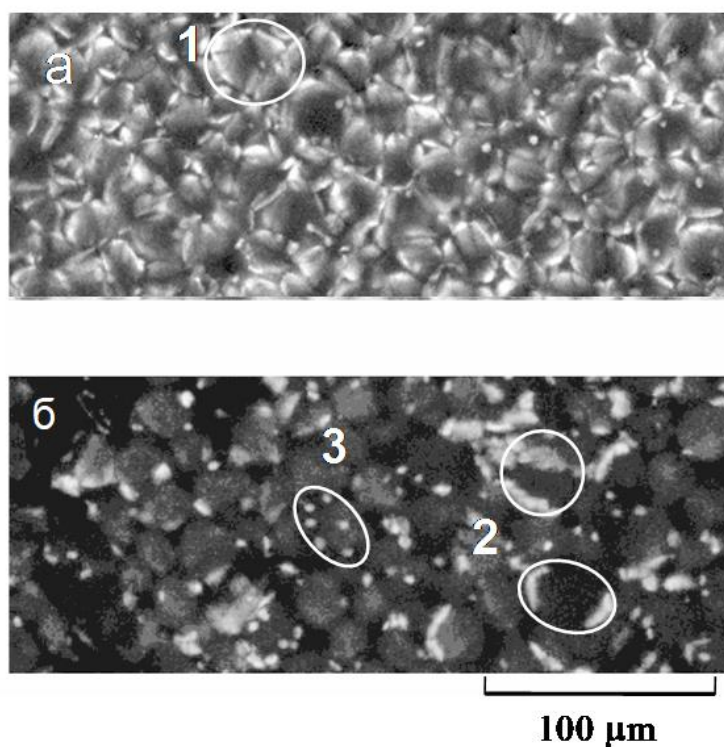


Рис. 7.2. Микрофотографии клеток мезофилла с адаксиальной стороны листа в контрольных (100%N) (а) и голодающих (1%N) (б) проростках *P. vulgaris*.

1 и 2 – видны скопления хлоропластов по краям клетки; 3 - клетка с отдельными крупными хлоропластами. Изображения получены с помощью конфокального микроскопа в режиме измерения ФХ.

Для оценки баланса между световыми и темновыми реакциями фотосинтеза в листьях контрольных и голодающих растений оценивали соотношения между основными

компонентами ФСА и световые зависимости параметров ETR и (1-qP). Измерение содержания белков D1 (PsbA), RbcL и ФНР выявили снижение количества Рубиско на 50% и ФНР на 70% в общем белковом пуле в листьях голодающих растений по сравнению с контролем (рис. 7.3). При этом содержание D1 белка не изменялось в условиях дефицита азота, что согласуется с данными по высокой кислород-выделяющей активности ФС2 (табл. 7.2). Поскольку общее содержание белков в листьях голодающих растений снижалось только на 13% по сравнению с контролем, то столь значительное уменьшение содержания Рубиско и ФНР отражает специфическую регуляцию этих ферментов в условиях дефицита азота. Из представленных в табл. 7.2 и на рис. 7.3 результатов явствует, что компоненты фотосинтетической ЭТЦ в тилакоидной мембране сохраняют высокое содержание и активность в условиях минерального голодания, в то время как фотосинтетические ферменты в строме хлоропласта подвергаются сокращению.

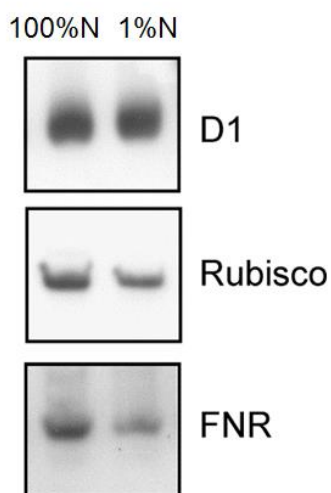


Рис. 7.3. Вестерн блот анализ белков D1 (PsbA), Рубиско (RbcL) и ФНР в экстрактах из листьев контрольных (100%N) и голодающих (1%N) проростков *P. vulgaris*.

Как было показано в Главе 3 на примере микроводорослей, нарушение баланса между световой и темновой стадией фотосинтеза в условиях дефицита минерального питания приводит к значительному восстановлению переносчиков электронов фотосинтетической ЭТЦ на свету и, следовательно, к снижению скорости электронного транспорта (рис. 3.3). Предположительно, дефицит азота в растениях должен также приводить к аналогичному эффекту из-за снижения содержания ключевых фотосинтетических ферментов в строме хлоропласта. На рис. 7.4А и Б показаны световые зависимости параметров ФХ ETR и (1-qP), соответственно, измеренные в листьях *P. vulgaris* в стандартных условиях и при дефиците азота.

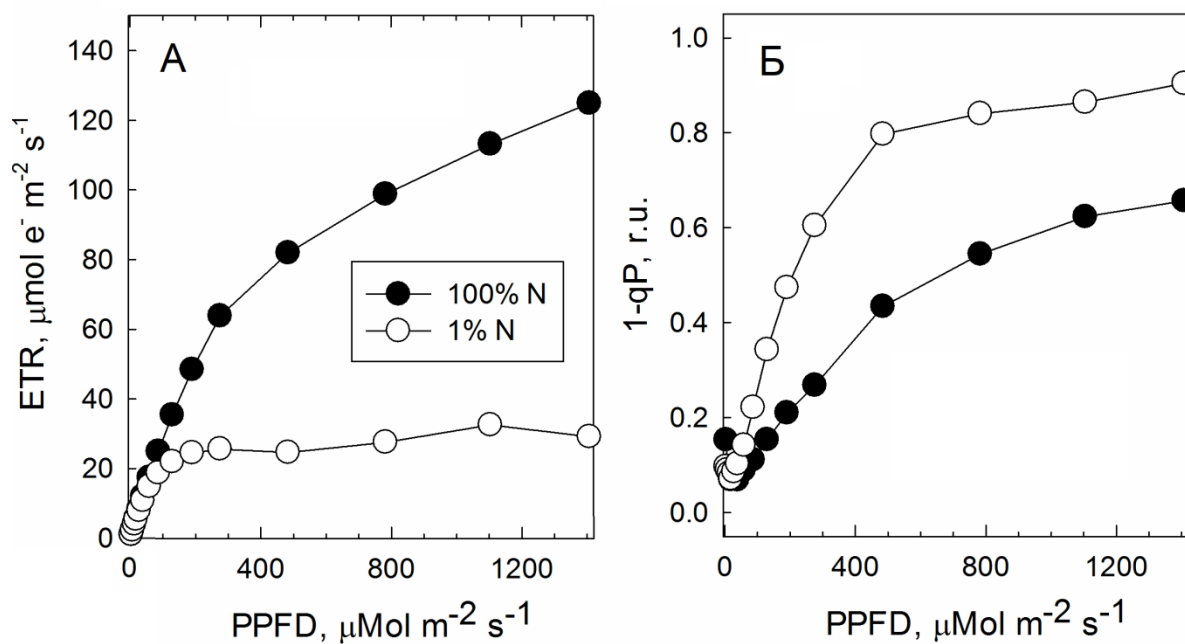


Рис. 7.4. Световые зависимости ETR (А) и (1 – qP) (Б) в листьях контрольных и голодающих по азоту проростков *P. vulgaris*.

Измерения проводили с использованием прибора РАМ-101.

Световая кривая электронного транспорта в контрольных растениях характеризовалась фазой линейного подъема от 0 до 65 мкмоль электронов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ при увеличении интенсивности света от 0 до 300 мкмоль фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. На этом участке отсутствует световое лимитирование электронного транспорта, поэтому наклон кривой характеризует эффективность ППФ. Дальнейшее увеличение интенсивности света с 300 до 1400 мкмоль фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ сопровождалось снижением скорости нарастания параметра ETR, величина которого составила 125 мкмоль электронов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ при ППФ 1400. При этом световая кривая не достигала уровня насыщения, что указывает на высокую активность темновых реакций фотосинтеза, а также, возможно, на включение альтернативных путей утилизации электронов в хлоропласте. В голодающих растениях световая кривая ETR характеризовалась быстрым начальным подъемом в диапазоне ППФ 0-100, наклон которого совпадал с таковым на кривой в контрольных растениях, свидетельствуя о сохранении высокой эффективности ППФ. Однако, в отличие от кривой в контроле, величина ETR в голодающих растениях достигала насыщения при интенсивности света всего 150 мкмоль фотонов $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Максимальное значение ETR в

голодающих растениях составило около 30 мкмоль электронов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, то есть примерно 25% от уровня в контрольных растениях, отражая существенное снижение максимальной скорости фотосинтетического электронного транспорта *in vivo*.

Световые зависимости параметра $(1-qP)$, измеренные в контрольных растениях, характеризовались постепенным ростом от минимального значения до уровня насыщения 0.6 при ПФПФ 1200 (рис. 7.4Б). На кривых в голодающих растениях величина $(1-qP)$ насыщалась при значениях ПФПФ около 500, достигая величины 0.9. Значения параметра $(1-qP)$ в световом интервале 120-140 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, который соответствует световым условиям в ростовой камере, были примерно в два раза выше в голодающих растениях по сравнению с контролем, отражая существенно более восстановленное состояние фотосинтетической ЭТЦ. В целом, наблюдаемые изменения параметров ETR и $(1-qP)$ в голодающих растениях были менее драматичными, чем таковые в голодающих микроводорослях.

7.2. Распределение энергии возбуждения и электронных потоков в хлоропласте

Нарушение редокс баланса в клетке и сопутствующее восстановление переносчиков электронов в тилакоидной мембране могут приводить к повышенной генерации АФК на свету и окислительному стрессу, как наблюдалось в голодающих по сере клетках *S. reinhardtii* (рис. 3.4). Проведенный нами анализ содержания пероксида водорода в листьях с использованием красителя DAB не выявил накопления данного метаболита в голодающих растениях в диапазоне ПФПФ 100-500. Этот результат указывает на роль механизмов регуляции фотосинтеза в нормализации баланса между световыми и темновыми реакциями и предотвращении окислительного стресса. Поэтому мы исследовали редокс-зависимые регуляторные механизмы в хлоропласте голодающих растений: переход состояний и распределение электронных потоков между основным и альтернативными путями.

На рис. 7.5 показаны низкотемпературные (77К) спектры испускания ФХ, измеренные в замороженных листовых экстрактах из контрольной и голодающей по азоту фасоли. Спектр в области красного и дальнего красного света был представлен двумя пиками ФХ с максимумом при 733 нм (пик ФС1) и при 685 нм (пик ФС2). На рис. 7.5А приведены результаты измерения спектров выхода ФХ в экстрактах из растений, адаптированных к темноте в течение 2 ч.

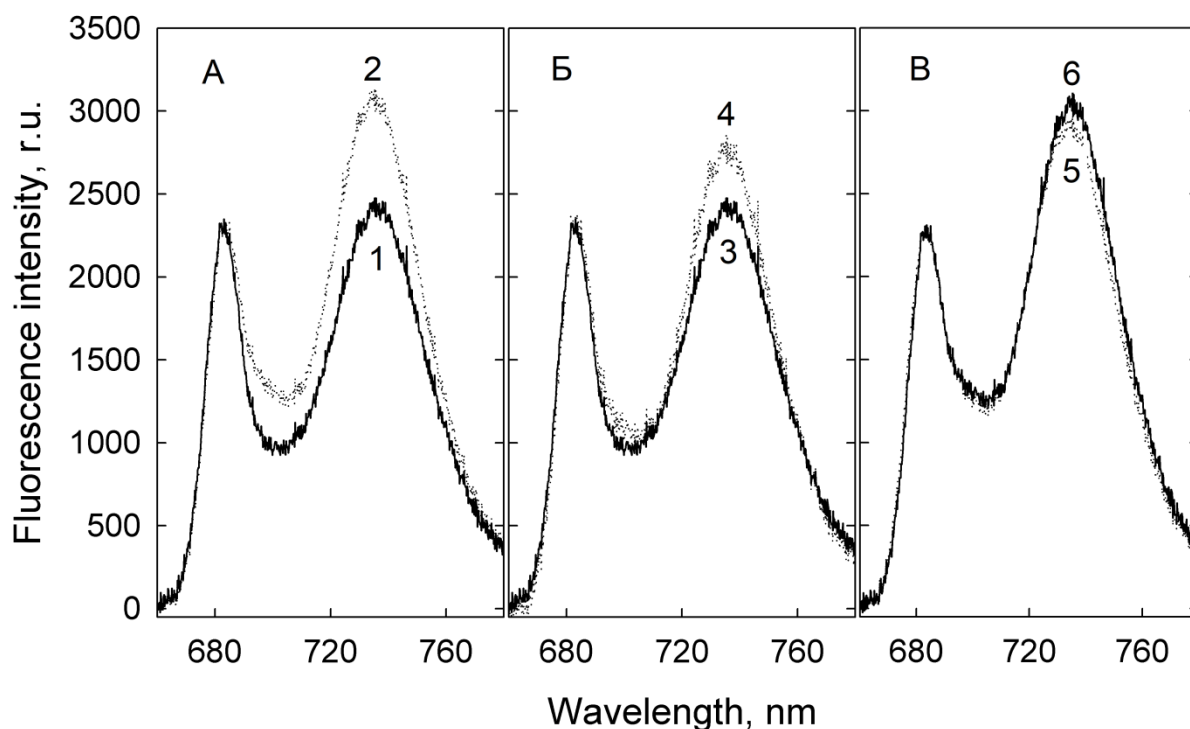


Рис. 7.5. Низкотемпературные (77К) спектры испускания ФХ в экстрактах листьев *P. vulgaris*.

А - растения выращивали 10 дней на полной среде (кривая 1) и на среде с 1% азота (кривая 2). Б - растения выращивали на полной среде и перед получением экстрактов освещали 15 мин дальним красным светом 720 нм (кривая 3) или красным светом 680 нм (кривая 4). В - растения выращивали на среде с 1% азота и также освещали 15 мин дальним красным светом (кривая 5) или красным светом (кривая 6).

На спектрах в контрольных образцах пики ФС1 и ФС2 имели примерно одинаковую амплитуду, в то время как спектры в условиях дефицита азота характеризовались превышением амплитуды пика ФС1 над пиком ФС2 на 25-30%. Принимая во внимание тот факт, что содержание ФС1 по отношению к ФС2 не изменялось в условиях дефицита азота, о чем свидетельствуют данные по активности ФС1 и ФС2 в табл. 7.2, полученный результат указывает на увеличение размера светособирающей антенны ФС1 относительно ФС2 в результате перехода из состояния 1 в состояние 2. На рис. 7.5Б показаны спектры ФХ в листовых экстрактах из контрольных растений, которые искусственно переводили в состояние 1 (кривая 3) или состояние 2 (кривая 4). Состояние 1 было индуцировано освещением листа дальним красным светом (светом ФС1), который способствует окислению ПХ пула, а состояние 2 - красным светом (светом ФС2), который приводит к восстановлению ПХ пула. Из рисунка видно, что переход из состояния 1 в состояние 2 в контроле сопровождался ростом амплитуды пика ФС1 примерно на 15%. Спектры ФХ,

измеренные в экстрактах из голодающих растений после освещенных дальним красным (кривая 5) или красным (кривая 6) светом, приведены на рис. 7.5В. В отличие от контроля, аналогичная световая обработка голодающих растений практически не влияла на соотношение между амплитудами пиков ФС1 и 2, указывая на низкую способность к переходу состояний. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что фотосинтетические мембраны в хлоропластах контрольных и голодающих растений находятся в состоянии 1 и 2, соответственно, и что в голодающих растениях нарушается механизм обратного перехода из состояния 2 в состояние 1. Необратимый переход в состояние 2 наблюдался также в клетках *C. reinhardtii* при инкубации на среде без серы (рис. 3.5). Необратимость процесса может быть обусловлена структурными изменениями тилакоидных мембран.

Далее мы исследовали альтернативные пути электронного транспорта в хлоропластах голодающих растений, переключение на которые может компенсировать редуцированный линейный транспорт. Для оценки ЦЭТ проводили измерения редокс переходов P_{700} в ФС1 и Пц⁻, индуцированных дальним красным светом в адаптированных к темноте листьях контрольных и голодающих растений (рис. 7.6). Как упоминалось ранее, в случае высокой активности ЦЭТ накопление P_{700}^+ на свету происходит более медленно по сравнению с линейным электронным транспортом из-за восстановления P_{700}^+ электронами, поступающими в ПХ пул от восстановленного Фд или НАД(Ф)Н. В контрольных листьях кинетика окисления P_{700} характеризовалась быстрым однофазным подъемом, выходящим на уровень насыщения примерно через 1.5-2.0 с после включения дальнего красного света (рис. 7.6А). Окисление P_{700} в листьях голодающих растений протекало значительно медленнее и не выходило на уровень насыщения в течение всего периода освещения. Такой характер кинетической кривой свидетельствует об активном состоянии ЦЭТ в условиях дефицита азота. Необходимо отметить, что эффект снижения скорости окисления P_{700} на свету может быть обусловлен лимитированием окисления ФС1 из-за частично восстановленного состояния акцепторов электронов в строме хлоропласта и/или обнаруженного нами снижения содержания ФНР (рис. 7.3). В свою очередь, лимитирование окисления ФС1 должно способствовать переключению потока электронов из линейного в циклический режим.

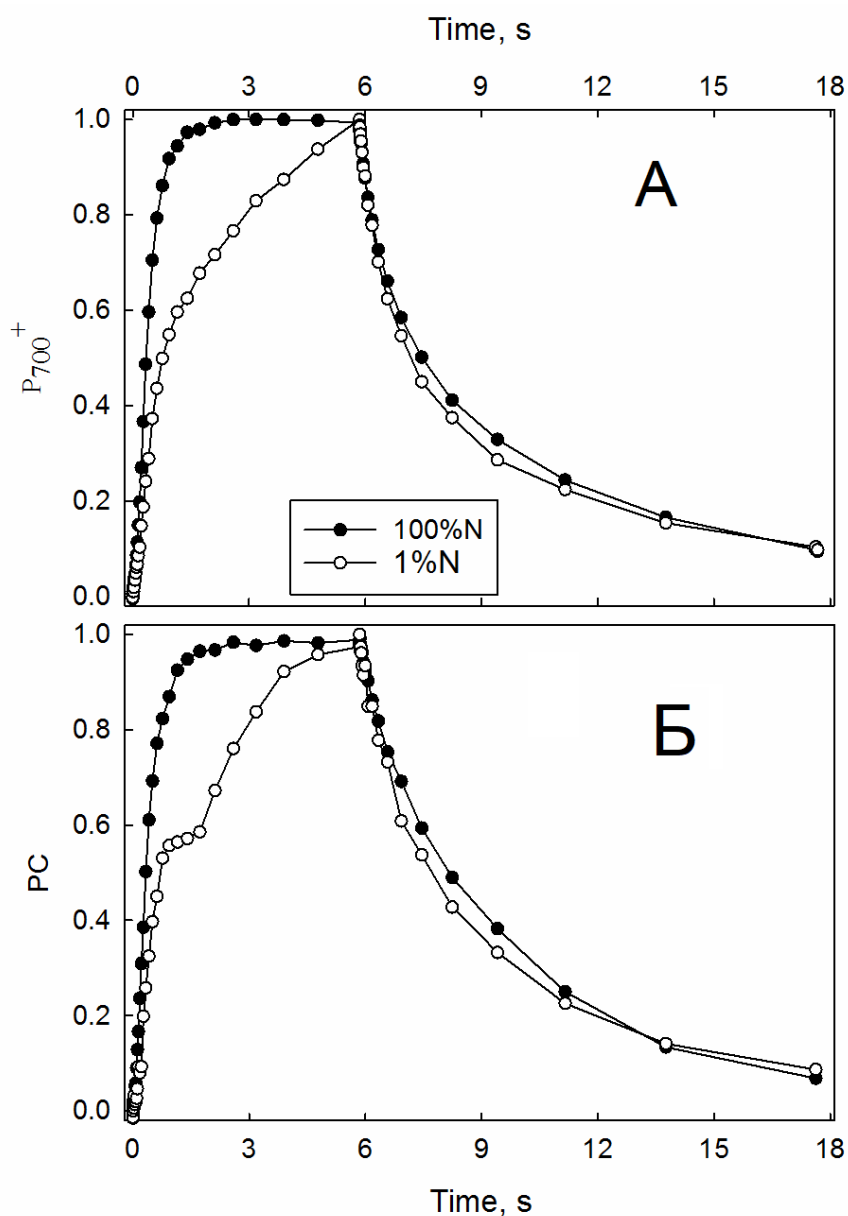


Рис. 7.6. Светоиндуцированные редокс переходы P_{700}^+ (А) и Pc^- (Б) в листьях проростков *P. vulgaris*, выращенных на полной среде (100%N) и в условиях дефицита азота (1%N).

Измерения проводили при помощи спектрометра JTS-10.

Последующее за светоиндуцированным окислением P_{700} восстановление P_{700}^+ в темноте протекало несколько быстрее в голодающих растениях, что отражает увеличение потока электронов из стромы в ПХ пул в темноте. На рис. 7.6Б приведены также кривые светоиндуцированных редокс переходов Pc^- в контроле и в условиях дефицита азота, которые выявили сходные изменения с кривыми P_{700} .

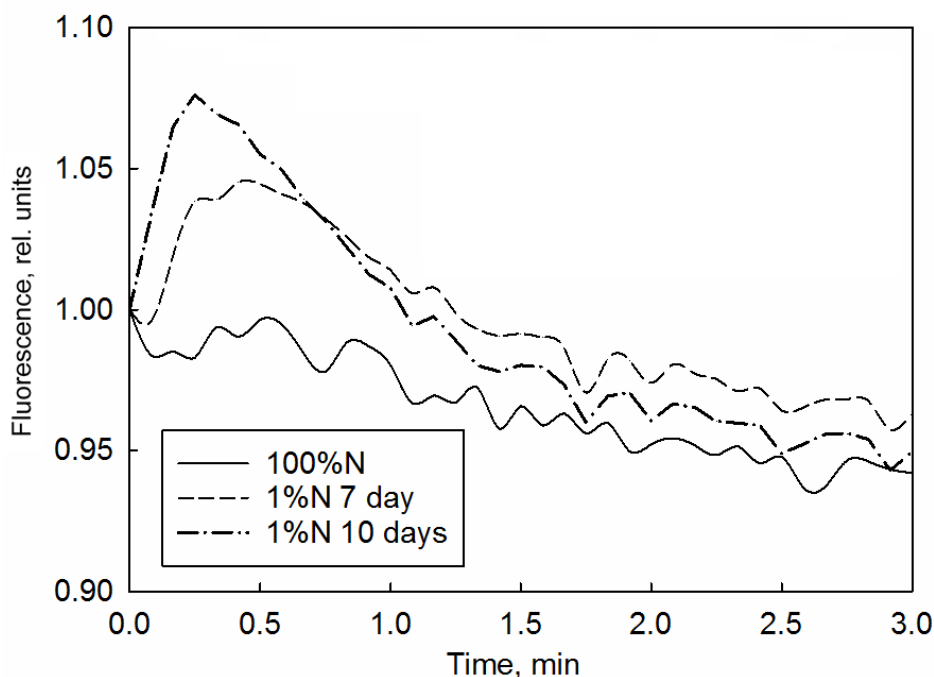


Рис. 7.7. Изменения темнового выхода ФХ (F_o) после выключения актиничного света в листьях проростков *P. vulgaris*, выращенных на полной среде (100%N, 10 дней) и в условиях дефицита азота (1%N, 7 и 10 дней).

Измерения проводили на приборе РАМ-101.

Альтернативным подходом для оценки активности ЦЭТ является классический протокол метода ‘ F_o rise’, позволяющий регистрировать изменения темнового выхода ФХ (F_o) сразу после выключения актиничного света (Shikanai et al. 1998). Согласно этому протоколу, после выключения актиничного света производятся измерения F_o с помощью слабых зондирующих световых импульсов, обладающих незначительным актиничным эффектом при стандартной для приборов РАМ частоте модуляции 600 Гц. В случае низкой активности реакций ЦЭТ пул ПХ остается в окисленном состоянии после выключения актиничного света, а величина F_o – на низком уровне. При высокой активности ЦЭТ происходит восстановление ПХ пула за счет продолжающихся в темноте реакций ЦЭТ, что приводит к росту F_o . Таким образом, при активном ЦЭТ наблюдается транзиторный рост уровня F_o в течение нескольких секунд после выключения света, а затем, по мере исчерпания восстановительных эквивалентов в строме хлоропласта, происходит снижение F_o .

На рис. 7.7 приведены изменения величины F_o после выключения актиничного света в листьях контрольных и голодающих по азоту *P. vulgaris*. Из рисунка видно, что в

контрольных листьях величина F_o постепенно снижалась от нормированного значения 1.00, зафиксированного сразу после выключения актиничного света, до 0.95 через 3 мин темновой инкубации без формирования промежуточного пика. Напротив, изменения F_o в листьях голодающих растений выявили пик с максимумом через 20-30 с после выключения света. При этом амплитуда пика возрастала в зависимости от длительности культивирования растения в условиях азотного дефицита. Так, амплитуда пика F_o в листьях 7-дневных голодающих проростков фасоли составила примерно 1.04, а у 10-дневных растений – 1.07. Приведенные на рис. 7.6 и 7.7 экспериментальные результаты подтверждают предположение об активности реакций ЦЭТ в *P. vulgaris* в условиях азотного голодания.

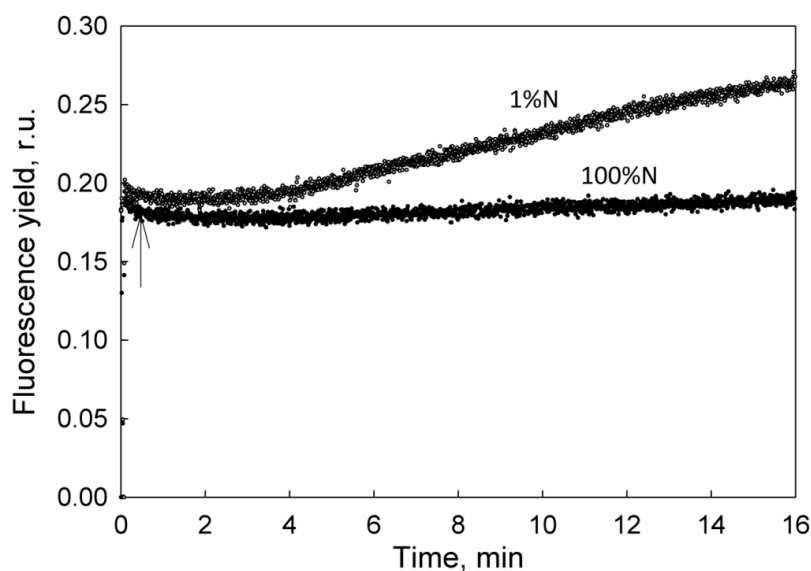


Рис. 7.8. Изменения интенсивности минимальной ФХ (F_o) в листьях контрольных и голодающих растений *P. vulgaris* при темновой инкубации в анаэробных условиях. Начало анаэробной инкубации отмечено стрелкой.

Измерения проводили с использованием прибора РАМ-101.

У высших растений хлородыхательная цепь представлена реакциями нефотохимического восстановления пластохинонов при участии НАДН дегидрогеназы и реакцией окисления ПХ кислородом при каталитической активности РТОХ (Nixon 2000). Для оценки нефотохимического пути восстановления ПХ проводили измерения параметра F_o в листьях контрольных и голодающих растений в темноте в аэробных и анаэробных условиях. Когда листья инкубировались в аэробных условиях, то выход F_o практически не изменялся в контрольных и голодающих образцах в течение 1 ч пребывания в темноте, отражая преимущественно окисленное состояние ПХ пула. Далее этот эксперимент

повторяли в анаэробных условиях. Для этого образцы продували азотом в течение эксперимента и, таким образом, ингибировали реакцию ре-окисления ПХ пула с участием РТОХ. В контрольных растениях величина F_o практически не изменялась в течение 15 мин. темновой инкубации в анаэробных условиях, в то время как в листьях голодающих растений ФХ возрастала более чем на 30% за тот же период времени (рис. 7.8). Аэрация образцов из голодающих растений приводила к быстрому снижению F_o до начального уровня. Полученные результаты свидетельствуют об интенсификации процесса нефотохимического восстановления ПХ пула в условиях азотного голодания, что также наблюдается в клетках голодающих по сере микроводорослей. Механизм этого явления обусловлен, вероятно, повышенным содержанием НАД(Ф)Н в строме хлоропласта в темноте из-за деградации накопленных запасов крахмала.

7.3. Нефотохимическое тушение

У высших растений энергозависимый компонент NPQ играет ключевую роль при адаптации к стрессовым воздействиям (Бухов 2004, Horton 2014). На рис. 7.9 показаны индукционные кривые параметра флуоресценции хлорофилла NPQ в листьях контрольных и голодающих по азоту растений. В обоих образцах величина NPQ быстро возрастала от 0 до 1.7 в течение 1.5 мин после включения света интенсивностью 300 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. После этого значения NPQ в контроле практически не изменялись до конца эксперимента, в то время как в листьях голодающих растений NPQ продолжало возрастать и достигало значения 2.5 на пятой минуте освещения, а затем практически не изменялось. Наблюдаемый рост NPQ отражает генерацию транстилакоидного pH градиента, который контролирует величину тепловой диссипации энергии в антенне ФС2. Начальный подъем NPQ был одинаковым в контрольных и голодающих образцах, свидетельствуя о том, что скорость генерации pH градиента на свету не изменяется в условиях азотного голодания по сравнению с контролем. Более высокий уровень NPQ в голодающих растениях обусловлен, по-видимому, способностью к генерации более высокого pH градиента в результате активации ЦЭТ (Suorsa et al. 2016).

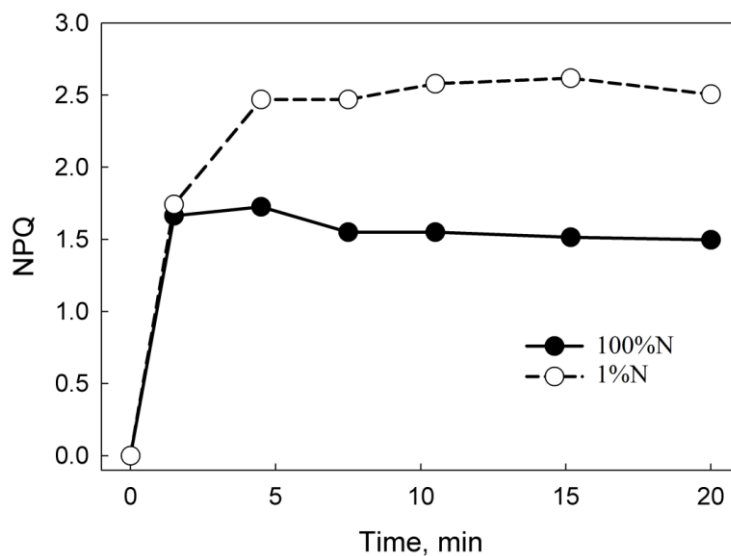


Рис. 7.9 Динамика световой индукции NPQ в листьях контрольных (100% N) и голодающих по азоту (1% N) побегов *P. vulgaris*.

Измерения проводили с помощью прибора PAM-101.

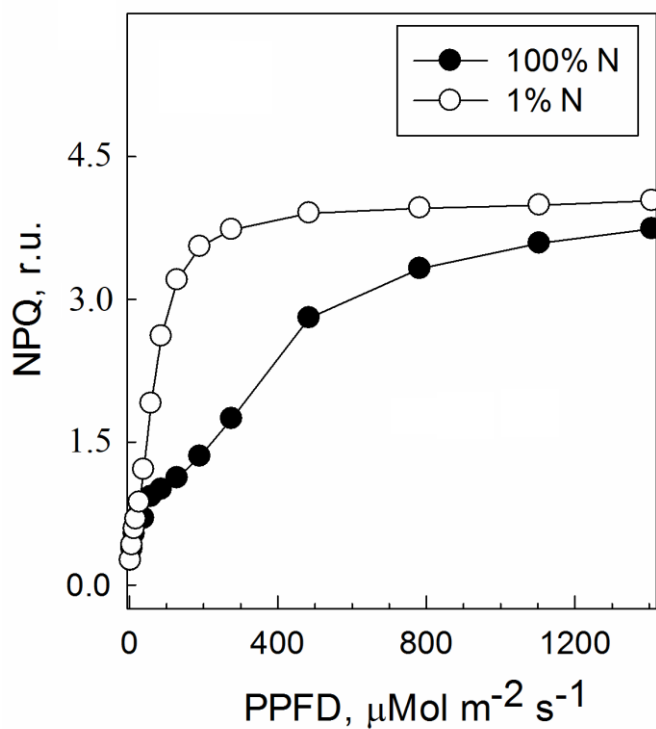


Рис. 7.10. Световые зависимости NPQ, измеренные на листьях *P. vulgaris* в контрольных (100%N) и голодающих по азоту (1%N) растений.

Измерения проводили с использованием прибора PAM-101.

Для получения более полной информации о развитии нефотохимического тушения в антенне ФС2 мы дополнительно измеряли световые зависимости NPQ в листьях контрольных и голодающих по азоту проростков фасоли (рис. 7.10). Как видно из рисунка, голодающие растения характеризовались более высокими значениями NPQ по сравнению с контролем в широком интервале интенсивности света: от 80 до 800 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹. Наибольшая разница в значениях NPQ наблюдалась в интервале ПФПФ от 100 до 400, который соответствует естественным вариациям в умеренных широтах. Внутри этого светового интервала значения NPQ в голодающих растениях превышали соответствующие значения в контроле примерно в два раза. Таким образом дефицит азота индуцирует значительное увеличение рН-зависимой тепловой диссипации энергии в антенне ФС2 голодающих растений. Эти результаты кардинально отличаются от полученных на голодающих по сере зеленых микроводорослях, у которых заметно снижается способность к световой генерации NPQ (Глава 4.2.1.).

Таблица. 7.3. Содержание основных ксантофиллов на единицу Хл *a* (ммоль (моль Хл *a*)⁻¹) и уровень дезоксидации каротиноидов ксантофиллового цикла в контрольных и голодающих проростках *P. vulgaris*.

В – виолаксантин, А – антераксантин, З – зеаксантин, Н – неоксантин, Л – лютеин. Величина стандартного отклонения не превышала 10%.

А	В/Хл <i>a</i>	А/Хл <i>a</i>	З/Хл <i>a</i>	Н/Хл <i>a</i>	Л/Хл <i>a</i>	(В+А+З)/Хл <i>a</i>	(А+З)/ (В+А+З)
100%N	16	2	5	22	103	23	0.30
1%N	17	2	9	23	110	28	0.39

Наиболее изученным механизмом NPQ является рН-зависимая регуляция состава каротиноидов ксантофиллового цикла (Navaux and Niyogi 1999, Jahns and Holzwarth 2012). В таблице 7.3 приведены данные по содержанию основных ксантофиллов на единицу Хл *a*, а также уровни дезоксидации каротиноидов ксантофиллового цикла в листьях контрольных и голодающих по азоту растений, адаптированных к освещению в ростовой

камере. Из приведенных данных видно, что содержание виолаксантина и антраксантина было примерно одинаковым в листьях контрольных и голодающих растений, составляя 16-17 и 2 ммоль (моль Хл a)⁻¹, соответственно. Однако содержание основного фотозащитного каротиноида зеаксантина было почти в два раза выше в условиях дефицита азота, составляя 9 ммоль (моль Хл a)⁻¹ по сравнению с 5 в стандартных условиях. Накопление зеаксантина в голодающих растениях может быть обусловлено генерацией более высокого транстилакоидного рН градиента на свету. В целом, дефицит азота индуцировал увеличение общего пула каротиноидов ксантофиллового цикла с 23 до 28 ммоль (моль Хл a)⁻¹. Кроме зеаксантина в листьях голодающих растений возрастало содержание лютеина со 103 до 110 ммоль (моль Хл a)⁻¹ (табл. 7.3), который играет важную фотозащитную и антиоксидантную роль (Jahns and Holzwarth 2012).

Далее мы исследовали вероятные фотозащитные механизмы в реакционных центрах ФС2 голодающих растений, которые могут быть связаны с изменениями редокс потенциалов хинонных акцепторов в ФС2 (Ivanov et al. 2008). Для оценки изменений редокс потенциалов КВК, Qa и Qb в ФС2 использовали метод термолюминесценции, как описано применительно к микроводорослям в Главе 4. Как и у зеленых водорослей, у высших растений высокотемпературный пик 'B' термолюминесценции обычно имеет максимум при 30–40°C и связан с рекомбинацией зарядов в состоянии S₂Qb⁻, а низкотемпературный пик 'Q' с максимумом при 10–20°C наблюдается в присутствии диурона и соответствует рекомбинации между S₂ состоянием КВК и Qa⁻ (Tuystjarvi and Vass 2004). В препаратах тилакоидных мембран, изолированных из листьев контрольных растений, максимум полосы 'B' наблюдался при 40°C, а полосы 'Q' - при 15°C (рис. 7.11). В образцах из голодающих растений положение пика 'Q' практически не отличалось от такового в контроле, в то время как пик 'B' был смещен на 7°C в сторону понижения температуры. Эти данные свидетельствуют о том, что дефицит азота индуцирует отрицательный сдвиг редокс потенциала Qb, в то время как редокс потенциалы Qa и КВК не претерпевают изменений. Моделирование кривых термолюминесценции выявило снижение среднеточечного редокс потенциала в паре Qb/Qb⁻ на 65 мВ по сравнению с величиной в контроле (Antal et al. 2010).

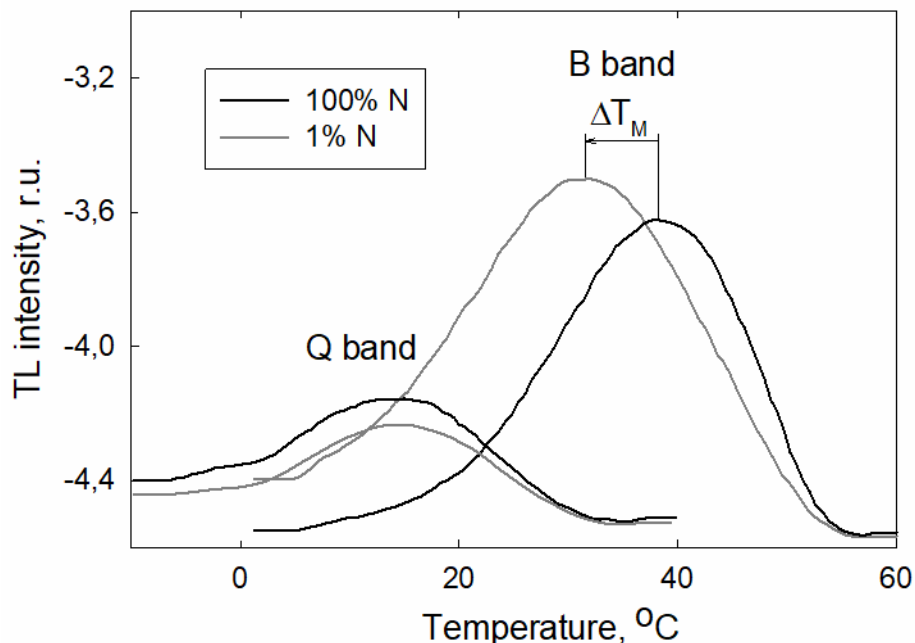


Рис. 7.11. Кривые термолуминесценции, измеренные на препаратах тилакоидных мембран из листьев *P. vulgaris* в присутствии 20 μM диурона (пик 'Q') и без диурона (пик 'B').

Фасоль растили на полной среде (100%) и в условиях дефицита азота (1% N).

Очевидно, что изменение редокс потенциала Qb должно приводить к снижению электронного транспорта с Qa на Qb из-за уменьшения энергетического зазора между этими хинонами. Для подробного исследования электронного транспорта на акцепторной стороне ФС2 измеряли кривые темнового затухания ФХ (кривые ре-окисления Qa⁻). Измерения проводили на препаратах тилакоидных мембран из листьев контрольных и голодающих растений (рис. 7.12).

Сравнение между кривыми выявило снижение скорости затухания ФХ в течение быстрой фазы в условиях дефицита азота, в то время как различия практически отсутствовали в медленной фазе кинетики, в том числе в условиях ингибирования электронного транспорта с Qa на Qb диуроном (см. вставку к рис. 7.12). Как упоминалось ранее, быстрая фаза кинетики затухания включает два компонента, отражающих перенос электрона с Qa⁻ на Qb в центрах ФС2 со связанным пластохиноном и без связанного пластохинона, а медленная фаза обусловлена рекомбинацией зарядов между Qa⁻ и S₂ состоянием КВК. Как и у зеленых водорослей, у высших растений в медленной фазе часто присутствует дополнительный компонент с временем жизни около 100 мс.

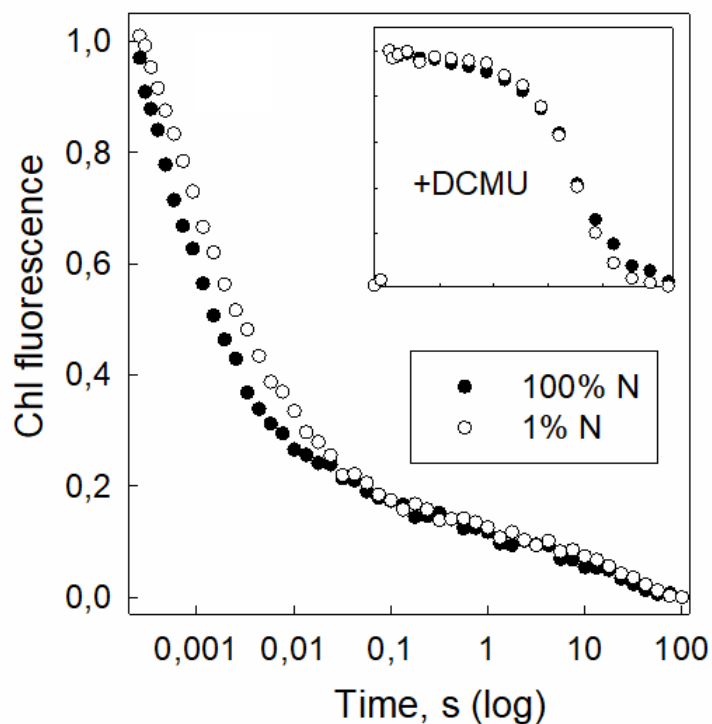


Рис. 7.12. Кривые затухания ФХ (кинетики реокисления Q_a^-) в тилакоидных мембранах, изолированных из листьев контрольных и голодающих по азоту проростков *P. vulgaris*. На вставке приведены кривые в образцах, обработанных 20 мкМ диурона.

Таблица. 7.4. Результаты мультиэкспоненциального разложения кинетических кривых затухания ФХ, приведенных на рис. 7.12

	Быстрый компонент		Средний компонент		Медленный компонент (I)		Медленный компонент (II)	
	τ , мс	A, %	τ , мс	A, %	τ , мс	A, %	τ , с	A, %
100% N	0.45	70	3.1	14	77	4	8.3	12.0
1% N	1.02	53	10.4	23	96	9	9.2	15.0

В таблице 7.4 приведены результаты мультиэкспоненциального разложения кинетических кривых, приведенных на рис. 7.12. Результаты разложения выявили четыре

компонента, включая минорный дополнительный медленный компонент I, амплитуда которого не превышала 10% от величины переменной ФХ. Из таблицы видно, что время жизни быстрого компонента было в 2.5 раза выше, а среднего – в 3.0 раза выше в препаратах из голодающих растений по сравнению с контрольными, что согласуется с обнаруженными изменениями свойств Qb-сайта. В тилакоидах из голодающих растений амплитуда быстрого компонента была на 17% ниже, а амплитуда среднего компонента – на 9% выше, чем в контроле. Эти изменения можно объяснить тем, что аффинность молекулы ПХ к Qb-сайту снижается в условиях голодания, в результате чего возрастает доля центров ФС2, не содержащих связанной ПХ в адаптированном к темноте состоянии. Изменения амплитуды и времени жизни медленного компонента II в условиях голодания были незначительными, свидетельствуя о практическом отсутствии изменений свойств КВК, Qa, а также содержания Qb-невосстанавливающих центров.

Таким образом, дефицит азота индуцирует специфические изменения свойств Qb – сайта ФС2, следствием чего является снижение редокс потенциала Qb, скорости переноса электрона с Qa на Qb и константы связывания ПХ с ФС2. Эти изменения не приводят к снижению активности ФС2 (табл. 7.2), но могут вносить вклад в наблюдаемое в условиях голодания увеличение параметра (1-qP), отражающее рост восстановленного Qa на свету (рис. 7.4Б). Необходимо отметить, что специфические изменения редокс потенциала Qb наблюдались как в клетках голодающих по сере микроводорослей, так и в голодающих по азоту растениях. Это указывает на наличие определенной связи между свойствами Qb-сайта и минеральным статусом организма. Механизмы снижения редокс потенциала Qb в условиях минерального голодания не вполне понятны. Возможно, индуцированные стрессом изменения липидного состава тилакоидной мембраны и, в целом, окружения ФС2 оказывают влияние на свойства сайта связывания ПХ. Дискуссионным вопросом является возможная связь между изменениями свойств Qb-связывающего сайта и способностью к безопасному тушению энергии в центрах ФС2.

В голодающих по азоту растениях нарушения редокс баланс в хлоропласте не приводят к окислительному стрессу, что может быть обусловлено генерацией высокого NPQ, фотозащитными изменениями каротиноидного состава и другими регуляторными процессами. Очевидно, что фотозащитные изменения должны повышать резистентность фотосинтеза к деструктивному воздействию света высокой интенсивности. На рис. 7.13 приведены кривые снижения кислород-выделяющей активности ФС2, т.е. кривые фотоингибирования, в препаратах тилакоидных мембран из листьев контрольных и голодающих *P. vulgaris* при освещении ПФПФ 3500. Кривые имели

моноэкспоненциальный характер и различались по скорости снижения активности ФС2. Так, в контрольных препаратах активность ФС2 падала на 80% в течение часа, а в препаратах из голодающих растений - на 60%. Наблюдаемое снижение скорости фотоингибирования в условиях азотного голодания согласуется с данными по усилению механизмов фотозащитного характера.

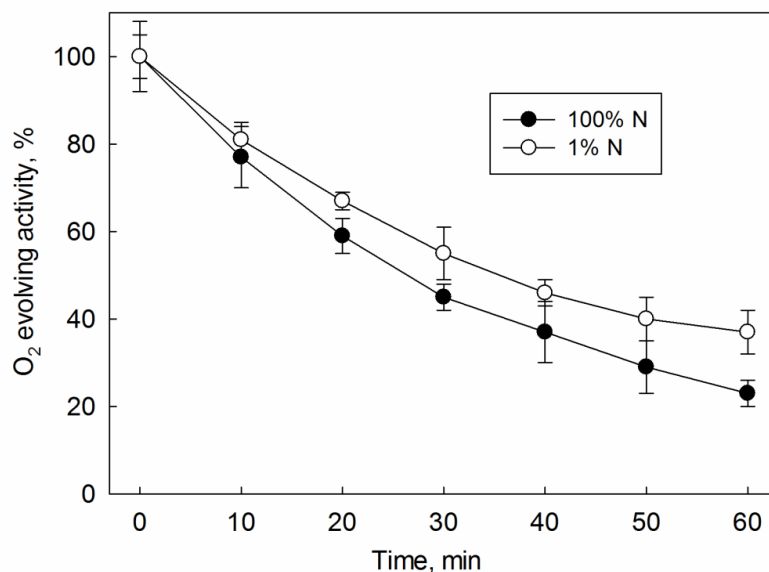


Рис. 7.13. Динамика фотоингибирования в препаратах тилакоидных мембран из листьев контрольных (100%N) и голодающих (1%N) растений *P. vulgaris*.

Кривые нормированы на величину начальной активности ФС2 (0 мин).

Обсуждение результатов

Настоящая работа представляет собой комплексное сравнительное исследование механизмов адаптации ФСА зеленых микроводорослей и высших растений к недостатку важнейших биогенных элементов в среде. Голодающие по сере клетки *C. reinhardtii* характеризуются снижением синтеза белков и анаболических процессов, что приводит к нарушению клеточного деления и, соответственно, уменьшению потребности организма в продуктах фотосинтеза и запасанию избытка углеводов (Глава 3.1). В этих условиях ФСА становится избыточным и подвергается существенному сокращению. В первую очередь, снижается содержание Рубиско, в то время как ПБК в тилакоидной мембране страдают в меньшей степени. Таким образом, возникает дополнительный дисбаланс между

генерацией восстановительных эквивалентов в световых реакциях и их потреблением в темновых процессах, что индуцирует восстановление переносчиков фотосинтетической ЭТЦ и пула Фд и НАД(Ф) в строме. В результате этого, с одной стороны, возрастает выход АФК и возникает окислительный стресс. С другой стороны, сдвиг редокс баланса способствуют переключению электронного транспорта в циклический режим для поддержания синтеза АТФ. Одновременно в клетках активируется ряд дополнительных фотозащитных и регуляторных процессов. Полученные в работе результаты позволяют сделать вывод о том, что основными механизмами адаптации ФСА микроводорослей к дефициту серы являются: реорганизация ФС2, перераспределение энергии между ФС2 и ФС1 и перенаправление потоков электронного транспорта в хлоропласте на альтернативные пути.

Комплексная реорганизация ФС2 в голодающих клетках включает процессы деградации и функциональной инактивации фотосистемы, а также уменьшение поперечного сечения поглощения и активацию путей безопасной диссипации энергии (Глава 4). Очевидно, что снижение содержания и активности ФС2 в условиях дисбаланса между процессами поглощения и утилизации энергии ослабляет окислительный стресс. Сокращение количества центров ФС2 может быть обусловлено нарушением процесса репарации фотосистемы в условиях снижения белкового синтеза и высокой генерации АФК (Глава 3). Присутствующие в тилакоидной мембране комплексы ФС2 характеризуются пониженной функциональной активностью. В частности, нами показано, что недостаток серы индуцирует переход ФС2 в состояние со стабильно восстановленным Qa, формирование которого может быть связано одновременно с высокой восстановленностью пула ПХ и увеличением редокс потенциала Qa. Также в голодающих клетках нарушается энергетическое взаимодействие между антенными комплексами и центрами ФС2 и накапливаются центры без КВК. Функциональные (Qb-восстанавливающие) центры характеризуются снижением константы скорости переноса электронов с Qa на Qb и аффинности ПХ к Qb-сайту, которые обусловлены изменениями редокс потенциалов хинонных акцепторов электронов. В целом, похожая стратегия регуляции ФС2 наблюдается у микроводорослей в условиях азотного голодания, когда также нарушается баланс между световыми и темновыми реакциями фотосинтеза (Чемерис 1997). Основные особенности адаптации зеленых микроводорослей к дефициту азота определяются, по-видимому, возможностью использования хлорофилла в качестве источника азота и зависят, в значительной мере, от видовой принадлежности и типа питания (Garciaferris 1996, Чемерис и др. 1996, Погосян и др. 2012). В отличие от

гетеротрофных условий, при автотрофном типе питания большую роль в регуляции ППФ играет NPQ.

В голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* возрастает экспрессия генов, кодирующих LHCSR (González-Ballester et al. 2010, Toepel et al. 2013), но при этом снижается световая индукция NPQ и нарушается виолаксантиновый цикл (Глава 4.2). Определенную роль в фотозащите могут играть изменения структуры и состава периферического комплекса ФС2, в котором происходит замещение одних субъединиц другими (Nguyen et al. 2008), возрастает содержание каротиноидов виолаксантина и лютеина, и значительно увеличивается выход ФХ (Глава 4.2). В голодающих клетках также осуществляется переход из состояния 1 в состояние 2, индуцированный восстановлением ПХ пула (Wykoff et al. 1998), играющий фотозащитную роль в зеленых водорослях (Allorent et al. 2013). При этом состояние 2 в голодающих клетках является необратимым, что может быть связано с перестройкой тилакоидных мембран, снижением стэкинга и нарушением энергетического взаимодействия между антенными комплексами и реакционными центрами (Глава 3.2 и 4.1). Обнаруженный нами переход Qa в высокопотенциальную форму может обладать фотопротекторной функцией, направленной на снижение вероятности образования триплетных состояний Хл и синглетного кислорода при рекомбинации первично разделенных зарядов (Fufezan et al. 2007).

Ингибирование ЛЭТ в голодающих по сере клетках микроводорослей приводит к перераспределению потоков электронов в хлоропласте в пользу альтернативных путей (Глава 3.2). Прежде всего, происходит активация ЦЭТ, чему способствует изменение энергетического баланса между двумя фотосистемами в пользу ФС1. Как известно, активный ЦЭТ повышает отношение АТФ/НАД(Ф)Н в клетке, что лучше соответствует метаболическим потребностям в условиях стресса. К альтернативным путям в хлоропласте *C. reinhardtii* также относятся светоиндуцированные процессы, протекающие при участии ферментов реакции Меллера, флавопротеинов FlvA и FlvB и компонентов хлородыхательной цепи (рис. 1.5). Очевидно, что ингибирование потока электронов на СО₂ в голодающих клетках приводит к росту скорости поглощения кислорода на свету, а деградация накопленных запасов крахмала – к увеличению хлородыхания в темноте. Изучение состояния компонентов циклов ‘вода-вода’ в голодающих по сере клетках *C. reinhardtii* выявило снижение активности и содержания СОД, каталазы, FlvA и FlvB, а также незначительный рост активности РТОХ (Глава 3.2). При этом серное голодание индуцирует рост содержания аскорбата и аскорбат-пероксидазную активность (Salbitani et

al. 2015, Nagy et al. 2016). В целом, имеющиеся экспериментальные данные позволяют предположить, что окислительный стресс в условиях дефицита серы обусловлен в большей степени генерацией супероксид анион радикала на свету в ФС1, в то время как образование синглетного возбужденного состояния кислорода в ФС2 играет меньшую роль из-за комплекса фотозащитных перестроек ФС2.

Сравнение основных физиологических характеристик зеленых микроводорослей и высших растений в условиях биогенного голодания выявило такие общие черты, как подавление роста, накопление значительных запасов углеводов и сокращение ФСА. При этом сокращение ФСА у голодающих микроводорослей обусловлено нарушением функциональной активности и деградацией основных фотосинтетических комплексов, в то время как у высших растений, в основном, снижается количество хлоропластов в клетках мезофилла листа. В голодающих по азоту проростках *P. vulgaris* так же, как и у водорослей, нарушается баланс между световыми и темновыми реакциями фотосинтеза, индуцирующий восстановление фотосинтетической ЭТЦ (Глава 7.1). Эти нарушения компенсируются активацией схожих фотозащитных и регуляторных процессов в хлоропласте, включая нефотохимическое тушение, накопление каротиноидов с фотозащитными и антиоксидантными свойствами, переход из состояния 1 в состояние 2 и активацию ЦЭТ. Основным отличием голодающих высших растений от водорослей является полностью активное состояние компонентов фотосинтетической ЭТЦ и отсутствие окислительного стресса. По-видимому, возможность регуляции количества хлоропластов и развитие высокого NPQ на свету позволяют в значительной степени адаптировать фотосинтез к редуцированным потребностям голодающего организма.

Некоторые абиотические стрессы могут индуцировать изменения ФСА, схожие с теми, которые наблюдаются при дефиците макроэлементов. Так, воздействие неоптимальных температур, дефицита воды (засуха, засоление, осмотический стресс) на фотосинтез зачастую характеризуется переходом из состояния 1 в состояние 2, активацией ЦЭТ, ростом NPQ, накоплением фотозащитных каротиноидов и антиоксидантов, изменениями редокс потенциалов хинонных акцепторов в ФС2 и другими сопутствующими перестройками ФСА (Åström et al. 1998, Cousins et al. 2002, Salvucci et al. 2004, Ensminger et al. 2006, Chaves et al. 2009, Zhang and Sharkey 2009, Софронова и др. 2014, Zia et al. 2016, Lima Neto et al. 2017). В отличие от действия избыточной освещенности, первичной мишенью которой являются компоненты фотосинтетической ЭТЦ, вышеназванные абиотические факторы инактивируют, в первую очередь, процесс

ассимиляции CO₂. Это указывает на центральную роль инактивации темновых реакций фотосинтеза в формировании комплексного фотосинтетического ответа на стресс.

У некоторых микроорганизмов протоны могут выполнять функцию акцептора электронов в условиях дефицита кислорода (Voichenko et al. 2004). Среди аэробных фотосинтетиков только некоторые зеленые микроводоросли и цианобактерии обладают способностью синтезировать водород при помощи специализированных ферментов анаэробного метаболизма – гидрогеназ (Vignais and Billoud 2007). Феномен длительного выделения водорода голодающей культурой *C. reinhardtii* в закрытом фотобиореакторе на свету тесно связан с фотосинтетическим транспортом электронов и является результатом синергетического действия двух стрессовых факторов: дефицита минерального питания и анаэробных условий (Глава 5.1). Примерно через сутки после начала инкубации клеток без серы в закрытом культиваторе происходит самопроизвольное установление анаэробных условий (Melis et al. 2000). Однако активность ФС2 может иметь достаточно высокие значения, достигающие 80% от величины в стандартных условиях роста, непосредственно перед полным поглощением кислорода в культуре (Глава 5.1). Это свидетельствует о том, что переход в анаэробноз обусловлен не столько инактивацией ФС2, сколько ингибированием цикла Кальвина, в результате чего возрастает поток электронов на кислород на свету. В момент, когда содержание кислорода в среде становится практически нулевым, происходит быстрая инактивация ФС2. Очевидно, что этот процесс обусловлен практически полным восстановлением пула ПХ, блокировкой реокисления ФС2 и, соответственно, переходом Qa в полностью восстановленное состояние на свету. В свою очередь, анаэробные условия индуцируют гидрогеназную активность и выделение водорода на свету, что приводит к частичному реокислению фотосинтетической ЭТЦ и реактивации ФС2. В результате переноса электронов с ФС2 (воды) на гидрогеназу (H⁺) в хлоропласте голодающей клетки осуществляется биофотолиз воды. При этом синтезированный водород выделяется из клетки во внешнюю среду, позволяя утилизировать избыток электронов и протонов, а кислород восстанавливается в процессах дыхания и псевдоциклического транспорта в хлоропласте. По-видимому, между процессами фотообразования кислорода и водорода в анаэробной фазе серного голодания устанавливаются сбалансированные реципрокные отношения. Так, высокая активность гидрогеназы должна приводить к значительному реокислению пула ПХ, дополнительной реактивации ФС2 и увеличению содержания кислорода в клетке, который оказывает ингибиторное действие на гидрогеназу. В результате происходит

восстановление ПХ пула, закрытие ФС2, снижение содержания кислорода в клетке, и, соответственно, реактивация гидрогеназы.

Проведенный в настоящей работе ингибиторный анализ выявил тесную связь между фотообразованием водорода и ЦЭТ, процессами дыхания, энергизацией тилакоидных мембран (Глава 5.2). В частности, показано, что ЦЭТ дополнительно активируется при переходе голающей культуры в анаэробноз и оказывает значительное ингибиторное действие на фотопродукцию водорода, свидетельствуя о конкурентных отношениях между реакциями циклического пути и гидрогеназой за восстановленный ферредоксин. В свою очередь, отсутствие активной гидрогеназы в клетке приводит к росту ЦЭТ-зависимого фотофосфорилирования на анаэробной стадии серного голодания (Глава 5.3).

При переходе голодающей культуры в анаэробные условия происходит полное восстановление переносчиков фотосинтетической и дыхательной ЭТЦ, что приводит к снижению скоростей всех окислительно-восстановительных реакций в клетке и, соответственно, синтеза АТФ. Фотообразование водорода сопровождается частичной реактивацией фотосинтетического электронного транспорта и ФС2, способствуя фотофосфорилированию. Выделяемый фотосистемой 2 кислород может утилизироваться в реакциях клеточного дыхания, что позволяет реактивировать митохондриальную ЭТЦ и, возможно, оказывает влияние на функциональное состояние цикла Кребса. Более того, продукция водорода сопровождается выведением протонов из клетки, что играет положительную роль при закислении среды продуктами брожения. Исходя из этого, можно предположить, что индуцированные гидрогеназной активностью метаболические изменения должны оказывать положительное действие на физиологическое состояние клеток. В пользу этого предположения свидетельствуют полученные нами данные о снижении жизнеспособности культуры и активности ФС2 в мутанте *C. reinhardtii* без гидрогеназной активности на анаэробной стадии серного голодания (Глава 5.3). Неожиданным является тот факт, что отсутствие гидрогеназной активности в клетках не приводит к снижению содержания АТФ на анаэробной стадии голодания, а, наоборот, увеличивает его. Вероятно, это связано с более высокой скоростью ЦЭТ и фотофосфорилирования, а также со снижением потребления АТФ в клетках в отсутствие гидрогеназной активности. В связи с выявленной ролью фотообразования водорода в адаптации голодающей клетки к анаэробным условиям важным является вопрос об актуальности этого процесса в естественных условиях обитания. Достоверного ответа на этот вопрос не существует. Предположительно, фотообразование водорода может протекать на поздних стадиях цветения микроводорослей или при локальном скоплении

клеток, когда высокая плотность популяции способствует исчерпанию основных питательных элементов в среде обитания и «выеданию» кислорода.

В настоящее время научный интерес к феномену длительного фотообразования водорода зелеными микроводорослями обусловлен поиском возможных путей промышленного производства этого экологически чистого источника энергии с использованием фотобиореакторов (Torzillo et al. 2014). Разработка подходов к оптимизации выхода водорода в клетках *C. reinhardtii* направлена, в значительной степени, на тестирование новых протоколов получения голодающих культур и различных экспериментальных условий (Antal 2015, 2018). В данной работе показано, что клетки *C. reinhardtii*, иммобилизованные в тонких альгинатных пленках, способны к более продолжительному выделению водорода в условиях серного голодания по сравнению с суспензионной культурой (Глава 6.1). Механизмы этого явления обусловлены, по-видимому, высокой эффективностью ФС2-независимого пути продукции водорода, обеспеченного значительными запасами и высокой скоростью деградации крахмала. Выявлена важная роль спектральных характеристик света в качестве фактора, влияющего на скорость и продолжительность фотообразования водорода голодающими клетками. Так, освещение культуры монохроматическим светом ФС1 повышает скорость и длительность фотопродукции водорода по сравнению со светом ФС2 за счет стабилизации компонентов фотосинтетической ЭТЦ и увеличения скорости электронного потока через ФС1. Сравнительный анализ действия недостатка серы и магния выявил повышение фотообразования водорода голодающими по магнию клетками за счет увеличения продолжительности продуктивного периода. Это связано с тем, что дефицит магния оказывает в целом более мягкое деструктивное воздействие на метаболизм водорослевых клеток, чем дефицит серы. Отличительной чертой магниевое голодания является высокая активность ФС2 на стадии выделения водорода, что, по-видимому, положительно влияет на общее физиологическое состояние клеток за счет поддержания отдельных 'аэробных' метаболических путей в хлоропласте и митохондриях. Полученные в работе результаты указывают на то, что эффективная деградация крахмала, высокая остаточная активность ФС2, высокая скорость утилизации кислорода, отсутствие ЦЭТ и преимущественное возбуждение ФС1 являются основными факторами, стимулирующими выход водорода на анаэробной стадии голодания.

Заключение

Понимание фундаментальных основ регуляции фотосинтеза предполагает владение информацией об общем и специальном характере структурно-функциональных перестроек ФСА в ответ на воздействие важных абиотических стрессовых факторов в разных фотосинтезирующих организмах. В связи с этим в настоящей работе с использованием сравнительного подхода и сходных методов исследовали характер воздействия минерального стресса на физиологическое состояние и фотосинтетическую способность зеленых микроводорослей и высших растений. Полученные результаты позволили раскрыть базовые механизмы фотосинтетического ответа на стресс, среди которых важную роль играет редокс состояние ПХ пула. Показано, что в исследованных организмах дефицит основных макроэлементов индуцирует значительное сокращение ФСА, похожие изменения энергетического и редокс баланса, и активацию ряда сходных фотозащитных и регуляторных механизмов. Выявлены механизмы специфической модификации ФС2 в микроводорослях, среди которых – переход ФС2 в состояние со стабильно восстановленным Qa и направленные изменения редокс потенциалов Qa и Qb, которые носят фотозащитный характер.

В работе исследованы механизмы фотообразования водорода голодающими клетками, в том числе связь гидрогеназной реакции с электрон-транспортными потоками в клетке и особенности регуляции ППФ на стадии фотопродукции водорода. Показано, что процесс фотообразования водорода может играть адаптационную роль в условиях минерального стресса, поскольку оказывает положительное воздействие на фотозащитные свойства и жизнеспособность клеток. Практический интерес к фотопродукции водорода подразумевает разработку новых подходов к оптимизации процесса с целью реализации возможности получения газа в промышленных масштабах. В настоящей работе подобраны условия для продолжительного фотообразования водорода иммобилизованными культурами *C. reinhardtii* и выявлены механизмы стимулирующего эффекта магниевого голодания на выделение водорода по сравнению с серным голоданием. Полученные результаты позволили определить метаболические модификации, способствующие фотообразованию водорода, что может быть использовано для получения высокопродуктивных штаммов.

В рамках диссертации разработаны методы мониторинга состояния культур микроводорослей в фотобиореакторе, подходы для определения длин волн, возбуждающих преимущественно ФС1 или ФС2, и создана подробная Монте-Карло

модель ППФ, позволяющая анализировать экспериментальные кинетические кривые. Использован комплексный подход для оценки функционального состояния ФС2, включающий измерение и анализ кинетических кривых индукции ФХ на высоком (ПФПФ 2000-3000) и очень высоком (>10000) свете, кривых затухания ФХ в пико- наносекундном диапазоне, кривых релаксации ФХ в интервале от микросекунд до секунд и кривых окисления P_{700} . Эти методы могут быть использованы в биотехнологии микроводорослей.

Выводы

1. Дефицит основных элементов минерального питания у зеленых микроводорослей и высших растений приводит к нарушению баланса между световыми и темновыми реакциями фотосинтеза и ответной активации комплекса фотозащитных механизмов и системы динамической регуляции электронных потоков в хлоропласте, центральным звеном которой является ПХ пул.
2. У голодающих микроводорослей важную роль в адаптации к минеральному стрессу играет избирательная деградация компонентов ППФ, функциональная реорганизация ФС2 и переключение фотосинтетического электронного транспорта с основного на альтернативные пути, в то время как у высших растений основное значение имеет регуляция деления хлоропластов и рост NPQ.
3. Характерные для минерального голодания механизмы модификации ФС2 в клетках зеленых микроводорослей включают стабилизацию Qa в восстановленном состоянии, разобщение ССК и реакционных центров, деструкцию КВК и направленные изменения редокс потенциалов Qa и Qb фотозащитного характера.
4. Фотообразование водорода голодающими зелеными микроводорослями является адаптационным механизмом, улучшающим фотозащитные свойства и жизнеспособность клеток.
5. Активность ФС2 в суспензионной культуре *S. reinhardtii* на анаэробной стадии голодания регулируется в зависимости от редокс состояния ПХ пула, которое определяется балансом между образованием водорода гидрогеназой, образованием кислорода в ФС2, псевдоциклическими путями электронного транспорта и дыханием. Между фотообразованием водорода и ЦЭТ существуют конкурентные отношения.

6. Имобилизация клеток *C. reinhardtii* в альгинатных пленках, замещение серного голодания на магниевое и освещение культуры светом, поглощаемым преимущественно ФС1, продлевают период фотопродукции водорода за счет положительного воздействия на фотосинтез и общее физиологическое состояние клеток.

7. Разработана и верифицирована Монте-Карло модель ППФ, позволяющая анализировать кривые световой индукции и темнового затухания ФХ, а также редокс переходы P700 в различных экспериментальных условиях.

Список литературы

1. Бухов, Н. Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза / Н. Г. Бухов // Физиология растений.– №51. – 2004. – С. 825–837.
2. Васильева, С. Г. Применение иммобилизованных микроводорослей в биотехнологии / С.Г. Васильева, Е.С. Лобакова, А.А. Лукьянов, А.Е. Соловченко // Вестник Московского университета.– № 3. – 2016. – С. 65–72.
3. Гольцев, В.Н. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла *a* – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений. / В.Н. Гольцев, М.Х. Каладжи, М.А. Кузманова, С.И. Аллахвердиев. – М. – Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. – 220 с.
4. Иванов, Б.Н. Кооперация фотосистемы 1 и пула пластохинона в восстановлении кислорода в хлоропластах высших растений / Б.Н. Иванов // Биохимия. – № 73. – 2008. – С. 137–144.
5. Иванов, Б. Н. Роль кислорода и его активных форм в фотосинтезе. Современные проблемы фотосинтеза. Т.1 (под ред. С. И. Аллахвердиева, А. Б. Рубина, В. А. Шувалова) / Б.Н. Иванов, С.А. Хоробрых, М.А. Козулева, М.М. Борисова-Мубаракшина — М.–Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. – С. 407–461.
6. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопросы медицинской химии.– №36. – 1990. – С. 88–91.
7. Кочубей С.М. Организация фотосинтетического аппарата высших растений (ред: Моргун В.В.)/ С.М. Кочубей – Киев: Альтерпрес, 2001. –204 с.
8. Кренделева, Т.Е. О физиологической значимости альтернативных электрон-транспортных потоков в фотосинтезе. Физико-химические механизмы и регуляция процессов трансформации энергии в биологических структурах (под ред. Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубина) / Т.Е. Кренделева, Т.К. Антал, Г.П. Кукарских, А.А. Волгушева — М.–Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2017. – С. 357–392.
9. Кувыкин, И. В. Кислород как альтернативный акцептор в фотосинтетической цепи электронного транспорта С₃-растений / И.В. Кувыкин, А.В. Вершубский, В.В. Птушенко, А.Н. Тихонов // Биохимия. – № 73. – 2008. – С. 1329–1344.

10. Кукушкин, А. К. Лекции по биофизике фотосинтеза высших растений / А.К. Кукушкин, А.Н. Тихонов – М.: Изд-во МГУ. – 1988. –320 с.
11. Маслаков, А. С. Монте-Карло моделирование первичных процессов фотосинтеза / А.С. Маслаков, Т.К. Антал, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин // Биофизика. – № 61. – 2016. – С. 464–477.
12. Маторин, Д.Н. Исследование индукционных кривых замедленной флуоресценции зеленых растений / Д.Н. Маторин, П.С. Венедиктов, К.Н. Тимофеев, А.Б. Рубин // Науч Докл Высш Школы Биол Науки. – № 2. – 1978. – С. 35.
13. Термолюминесценция хлорофилла и ее применение в физиологических и экологических исследованиях. Современные проблемы фотосинтеза. Т. 1. (под ред. С.И. Аллахвердиева, А.Б. Рубина, В.А. Шувалова). /Д.Н. Маторин, А.Б. Рубин – М. – Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. – С. 311– 332.
14. Плюснина, Т.Ю. Анализ кинетики индукции флуоресценции хлорофилла с помощью спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации / Т.Ю. Плюснина, С.С. Хрущев, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин // Биофизика. – № 60. – 2015. – С. 487–495.
15. Погосян, С.Й. Влияние дефицита азота на рост и состояние фотосинтетического аппарата зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* / С.Й. Погосян, И.В. Конюхов, А.Б. Рубин, А.В. Кузнецова, Е.Н. Воронова // Вода: химия и экология. –№ 4. – 2012. – С. 68–76.
16. Погосян, С.Й. Применение флуориметра «МЕГА-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата / С.Й. Погосян, Ю.В. Казамирко, С.В. Гальчук, И.В. Конюхов, А.Б. Рубин // Вода: химия и экология. – № 6. – 2009. – С. 34–40.
17. Полесская, О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода / О. Г. Полесская. – М: Книжный дом университет, 2007. –140 с.
18. Рубин, А.Б. Регуляция первичных процессов фотосинтеза / А. Б. Рубин, Т. Е. Кренделева // Успехи биологической химии. – №43. – 2003. – С. 225–266.
19. Софронова, В.Е. Фотозащитные механизмы в фотосистеме II *Erythra monosperma* в период формирования морозоустойчивого состояния / В.Е. Софронова, Т.К. Антал, О.В. Дымова, Т.К. Головки // Физиол Раст. – 61. – 2014. – С. 798– 807.
20. Тихонов, А. Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза / А.Н. Тихонов // Соросовский Образовательный Журнал. – №11. – 1999. – С. 8–15.
21. Цыганков, А.А. Метаболизм водорода у микроводорослей. Современные проблемы фотосинтеза. Т.1 /под ред. С.И. Аллахвердиева, А.Б. Рубина, В.А. Шувалова / А.А.

- Цыганков. – М.–Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. – С. 461–487.
22. Чемерис, Ю.К. Хлоропластное дыхание в клетках хлореллы: влияние дефицита азота, экзогенной глюкозы, повышенной температуры / Ю.К. Чемерис, Л.В. Шендерова, П.С. Венедиктов // Физиол Раст. – 43. – 1996. – С. 541–547.
 23. Чемерис, Ю.К. Метаболитная регуляция первичных процессов фотосинтеза / Ю.К. Чемерис. Москва, 1997. – 312 с.
 24. Aebi, H. Catalase in vitro. In: Methods in Enzymology (Colowick S.P., Kaplan N.O. eds.). / H. Aebi. Florida: Acad. Press, 1984. – 105. – P. 114–121.
 25. Allahverdiyeva, Y. The function of D1-H332 in photosystem II electron transport studied by thermoluminescence and chlorophyll fluorescence in site-directed mutants of *Synechocystis* 6803 / Y. Allahverdiyeva, S. Deák, A. Szilárd, B.A. Diner, P.J. Nixon, I. Vass // Eur J Biochem. – 271. – 2004. – P. 3523-3532.
 26. Allen, J. F. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis / J.F. Allen // Biochim Biophys Acta. – 1098. – 1992. – P. 275–335.
 27. Allorent, G. A dual strategy to cope with high light in *Chlamydomonas reinhardtii* / G. Allorent, R. Tokutsu, T. Roach, G. Peers, P. Cardol et al. / Plant Cell // – 25. – 2013. – P. 545–557.
 28. Alric, J (2014) Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*: (II) involvement of the PGR5-PGRL1 pathway under anaerobic conditions / J. Alric // Biochim Biophys Acta. – 1837. – 2014. – P. 825–834.
 29. Amunts, A. The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4-Å resolution // A. Amunts, O. Drory, N. Nelson // Nature. – 447. – 2007. – P. 58–63.
 30. Andersson, B. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts / B. Andersson, J.M. Anderson // Biochim Biophys Acta. – 593. –1980. –P. 427–440.
 31. Anderson, J.M. Dynamic flexibility in the structure and function of photosystem II in higher plant thylakoid membranes: the grana enigma / J.M. Anderson, W.S. Chow, J. De Las Rivas // Photosynth Res. – 98. – 2008. – P.575–587.
 32. Andersson I. Catalysis and regulation in Rubisco / I. Andersson // J Exp Botany. – 59. – 2008. P. 1555– 1568.
 33. Andrée, S. Heterogeneity and photoinhibition of Photosystem II studied with thermoluminescence / S. Andrée, E. Weis, A. Krieger // Plant Physiol. – 116. – 1998. – P. 1053–1061.

34. Antal, T.K. The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells / T.K. Antal, T.E. Krendeleva, T.V. Laurinavichene, V.V. Makarova, M.L. Ghirardi, A.B. Rubin, A.A. Tsygankov, M. Seibert // *Biochim Biophys Acta*. – 1607. – 2003. – P. 153–160.
35. Antal, T.K. Effects of sulfur limitation on the PS II functioning in *Chlamydomonas reinhardtii* as probed by the chlorophyll *a* fluorescence / T.K. Antal, A.A. Volgusheva, G.P. Kukarskih, A.A. Bulychev, T.E. Krendeleva, A.B. Rubin // *Physiol Plantarum*. – 128. – 2006. – P. 360–367.
36. Antal, T.K. Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris* / T.K. Antal, H. Mattila, M. Hakala-Yatkin, T. Tyystjärvi, E. Tyystjärvi // *Planta*. – 232. – 2010. – P. 887–898.
37. Antal, T.K. Photosynthesis-related quantities for education and modeling / T.K. Antal, I.B. Kovalenko, A.B. Rubin, E. Tyystjärvi // *Photosynth Res*. – 117. – 2013a. – P. 1–30.
38. Antal, T.K. Study of the effect of reducing conditions on the initial chlorophyll fluorescence rise in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* / T. Antal, A. Maslakov, G. Riznichenko, T. Krendeleva, A. Rubin // *Photosynth Res*. – 114. – 2013b. – P. 143–154.
39. Antal, T.K. Antimycin A effect on the electron transport in chloroplasts of two *Chlamydomonas reinhardtii* strains / T.K. Antal, G.P. Kukarskikh, A.A. Bulychev, E. Tyystjarvi, T. Krendeleva // *Planta*. – 237. – 2013c. – P. 1241–1250.
40. Antal, T.K. Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae: relation to hydrogen production / T.K. Antal, T.E. Krendeleva, E. Tyystjärvi // *Photosynth Res*. – 125. – 2015. – P. 357–381.
41. Antal, T. K. The metabolic acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to depletion of essential nutrients: application for hydrogen production. In: *Microalgal hydrogen production: achievements and perspectives* (Seibert M., Torzillo G. eds) / T.K. Antal – England, Cambridge: RSC Publishing, 2018. – P. 235–264.
42. Antal, T. Chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors / T. Antal, I. Konyukhov, A. Volgusheva, T. Plyusnina, S. Khrushev, G. Kukarskikh, S. Goryachev, A. Rubin // *Physiologia Plantarum*. – 2018. doi: 10.1111/ppl.12693.
43. Antal, T.K. Simulation of chlorophyll fluorescence rise and decay kinetics, and P₇₀₀-related absorbance changes by using a rule-based kinetic Monte-Carlo method / T. Antal, A. Maslakov, O. Yakovleva, T. Krendeleva, G. Riznichenko, A. Rubin // *Photosynth Res*. – 2018. doi: 10.1007/s11120-018-0564-2.

44. Arnon, D.I. Photosynthesis by isolated chloroplasts / D.I. Arnon, M. B. Allen, F.R. Whatley // *Nature*. – 174. – 1954. – P. 394–396.
45. Asada, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons / K. Asada // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. – 50. – 1999. – P. 601–639.
46. Asada, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions / K. Asada // *Plant Physiol*. – 141. – 2006. – P. 391–396.
47. Åström, J. Effects of low temperature stress and cold acclimation on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* leaves. In: *Photosynthesis: mechanisms and effects* (Garab G. ed.) / J. Åström, L.V. Savitch, A.G. Ivanov, N.P. A. Huner, G. Öquist, P. Gardeström. – Netherlands, Dordrecht: Springer, 1998. – P. 2501-2504.
48. Atteia, A. Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes / A. Atteia, R. van Lis, A.G. Tielens, W.F. Martin // *Biochim Biophys Acta*. – 1827. – 2013. – P. 210–218.
49. Aucoin, H.R. Omics in *Chlamydomonas* for biofuel production / H.R. Aucoin, J. Gardner, N.R. Boyle // *Subcell Biochem*. – 86. – 2016. – P. 447–69.
50. Badger, M.R. Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and Rubisco oxygenase / M.R. Badger, S. von Caemmerer, S. Ruuska, H. Nakano // *Phil Trans Roy Soc London B*. – 355. – 2000. – P. 433–446.
51. Bajhailya, A.K. PSR1 is a global transcriptional regulator of phosphorus deficiency responses and carbon storage metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* / A.K. Bajhailya, A.P. Dean, L.A. Zeef, R.E. Webster, J.K. Pittman // *Plant Physiol*. – 170. – 2016. – P. 1216–1234.
52. Ball, S.G. Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* / S.G. Ball, L. Dirick, A. Decq, J.-C. Martiat, R. Matagne // *Plant Sci*. – 66. – 1990. – P.1–9.
53. Barber, J. A functional model for the role of cytochrome b_{559} in the protection against donor and acceptor inhibition / J. Barber, J. de Las Rivas // *Proc Nat Acad Sci USA*. – 90. – 1993. – P. 10942–10946.
54. Barham, D. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system / D. Barham, P. Trinder // *Analyst*. – 97. – 1972. – P. 142–145.
55. Batyrova, K. Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures / K. Batyrova, A. Tsygankov, S. Kosourov // *Int J Hydrogen Energy*. – 37. – 2012. – P. 8834– 8839.

56. Batyrova, K. Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp. / K. Batyrova, A. Gavrisheva, E. Ivanova, J. Liu, A. Tsygankov // Int J Mol Sci. – 16. – 2015. – P. 2705–2716.
57. Bennoun, P. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast / P. Bennoun // Proc Nat Acad Sci USA. – 79. – 1982. – P. 4352–4356.
58. Benzie, I. F. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay / I.F. Benzie, J.J. Strain // Analytical Biochemistry. – 239. – 1996. – P. 70–76.
59. Berges, J.A. Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae / J.A. Berges, D.O. Charlebois, D.C. Mauzerall, P.G. Falkowski // Plant Physiol. – 110. – 1996. – P. 689–696.
60. Bernanding, J. Kinetic studies on the stabilization of the primary radical pair P680⁺Pheo⁻ in different photosystem II preparations from higher plants / J. Bernanding, H.-J. Eckert, H.J. Eichler, A. Napivotzki, G. Renger // Photochem Photobiol. – 59. – 1994. – P. 566–573.
61. Bilger, W. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis* / W. Bilger, O. Björkman // Photosynth Res. – 25. – 1990. – P.173–185.
62. Blaby, I.K. Systems-level analysis of nitrogen starvation induced modifications of carbon metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* starchless mutant / I.K. Blaby, A.G. Glaesener, T. Mettler, S.T. Fitz-Gibbon, S.D. Gallaher // Plant Cell. – 25. – 2013. – P. 4305–4323.
63. Blankenship, R.E. Molecular mechanisms of photosynthesis / R.E. Blankenship. – UK, Oxford: Blackwell Science, 2002. – 312 pp.
64. Boichenko, V.A. Verification of the Z-scheme in *Chlamydomonas mutants* with Photosystem I deficiency / V.A. Boichenko, K.P. Bader // Photosynth Res. – 56. – 1998. P. 113–115.
65. Bölling, C. Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation / C. Bölling, O. Fiehn // Plant Physiol. – 139. – 2005. – P. 1995–2005.
66. Bonente, G. Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro / G. Bonente, B.D. Howes, S. Caffarri, G. Smulevich, R. Bassi // J Biol Chem. – 283. – 2008. – P. 8434–8445.
67. Bondada, B.R. Leaf chlorophyll, net gas exchange and chloroplast ultrastructure in citrus leaves of different nitrogen status / B.R. Bondada, J.P. Syvertsen // Tree Physiol. – 23. – 2003. – P. 553–559.

68. Borisova-Mubarakshina, M.M. Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins / M.M. Borisova-Mubarakshina, M.A. Kozuleva, N.N. Rudenko, I.A. Naydov, I.B. Klenina, B.N. Ivanov // *Biochim Biophys Acta.* – 1817. – 2012. – P. 1314–1321.
69. Breyton, C. The cytochrome b_6/f complex: structural studies and comparison with the bc_1 complex / C. Breyton // *Biochim Biophys Acta.* – 1459. – 2000. – P. 467–474.
70. Breyton, C. Redox modulation of cyclic electron flow around photosystem I in C3 plants / C. Breyton, B. Nandha, G.N. Johnson, P. Joliot, G. Finazzi // *Biochem.* – 45. – 2006. – P. 13465–13475.
71. Brinkert, K. Biocarbonate-induced redox tuning in Photosystem II for regulation and protection / K. Brinkert, S. de Cuasmaecker, A. Krieger-Liszkay, A. Fantuzzi, A.W. Rutherford // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 113. – 2016. – P. 12144–12149.
72. Brooks, A. Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some Calvin cycle metabolites in spinach leaves / A. Brooks // *Aust J Plant Physiol.* – 13. – 1996. – P. 221–237.
73. Brooks, M.D. PsbS-Dependent non-photochemical quenching. In: *Advances in photosynthesis and respiration including bioenergy and related processes* (Demmig-Adams B., Garab G., Adams III W, Govindjee eds. / M.D. Brooks, S. Jansson, K.K. Niyogi. – New York, London, Dordrecht, Heidelberg: Springer, 2014. – P. 297–314.
74. Bruce, D. The origins of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. Direct quenching by P_{680}^+ in photosystem II enriched membranes at low pH / D. Bruce, G. Samson, C. Carpenter // *Biochem.* – 36. – 1997. – P. 749–755.
75. Burkhard, J. Photoproduction and detoxification of hydroxyl radicals in chloroplasts and leaves and relation to photoinactivation of photosystems I and II / B. Jakob, U. Heber // *Cell Physiol.* – 37. – 1996. – P. 629–635.
76. Cakmak, T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii* / T. Cakmak, P. Angun, Y.E. Demiray, A.D. Ozkan, Z. Elibol, T. Tekinay // *Biotechnol Bioeng.* – 109. – 2012. – P. 1947–1957.
77. Cardol, P. Impaired respiration discloses the physiological significance of state transitions in *Chlamydomonas* / P. Cardol, J. Alric, J. Girard-Bascou, F. Franck, F. A. Wollman, G. Finazzi // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 106. – 2009. – P. 15979–15984.
78. Cardol, P. Regulation of electron transport in microalgae / P. Cardol, G. Forti, G. Finazzi // *Biochim Biophys Acta.* – 1807. – 2011. – P. 912–918.

79. Catalanotti, C. Fermentation metabolism and its evolution in algae / C. Catalanotti, W. Yang, M.C. Posewitz, A.R. Grossman // *Front Plant Sci.* – 4. – 2013. – P. 150.
80. Chang, C.W. The LPB1 gene is important for acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to phosphorus and sulfur deprivation / C.W. Chang, J.L. Moseley, D. Wykoff, A.R. Grossman // *Plant Physiol.* – 138. – 2005. – P. 319–329.
81. Chaves, M.M. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell / M.M. Chaves, J. Flexas, C. Pinheiro // *Ann Bot.* – 103. – 2009. – P. 551–560.
82. Chen, M. Proteomic analysis of hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells / M. Chen, L. Zhao, Y.L. Sun, S.X. Cui, L. F. Zhang, B. Yang, J. Wang, T.Y. Kuang, F. Huang // *Proteome Res.* – 9. – 2010. – P. 3854–3866.
83. Corneille, S. Reduction of the plastoquinone pool by exogenous NADH and NADPH in higher plant chloroplasts-characterization of a NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase activity / S. Corneille, L. Cournac, G. Guedeney, M. Havaux, G. Peltier // *Biochim Biophys Acta.* – 1363. – 1998. – P. 59–69.
84. Cournac, L. Limiting steps of hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analyzed by light-induced gas exchange transients / L. Cournac, F. Mus, L. Bernard, G. Guedeney, P. Vignais, G. Peltier // *Int J Hydrogen Energy.* – 27. – 2002. – P. 1229–1237.
85. Cousins, A. Photosystem II energy use, non-photochemical quenching and the xanthophyll cycle in *Sorghumbicolor* grown under drought and free-air CO₂ enrichment (FACE) conditions / A. Cousins, N. Adam, G. Wall, B. Kimball, P. Pinter, M. Ottman // *Plant Cell Environ.* – 25. – 2002. – P. 1551–1559.
86. Croce, R. Carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in recombinant major light-harvesting complex (LHCII) of higher plants. I. Femtosecond transient absorption measurements / R. Croce, M.G. Müller, R. Bassi, A.R. Holzwarth // *Biophys J.* – 80. – 2001. – P. 901–915.
87. Cullen, J.J. Nutrient limitation of marine photosynthesis. In: Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. (Falkowski P.G., Woodhead A.D. eds.) / J.J. Cullen, X. Yang, H.L. MacIntyre. – New York: Springer, 1992. – 43. – P. 69–88.
88. Curien, G. The water to water cycles in microalgae / G. Curien, S. Flori, V. Villanova, L. Magneschi, C. Giustini, G. Forti, M. Matringe, D. Petroustos, M. Kuntz, G. Finazzi // *Plant Cell Physiol.* – 57. – 2016. – P. 1354–1363.
89. Dainty, A.L. Stability of alginate-immobilized algal cells / A.L. Dainty, K.H. Goulding, P.K. Robinson, I. Simpkins, M.D. Trevan // *Biotechnol Bioeng.* – 28. – 1986. – P. 210–216.

90. Dall'Osto, L. Zeaxanthin protects plant photosynthesis by modulating chlorophyll triplet yield in specific light-harvesting antenna subunits / L. Dall'Osto, N.E. Holt, S. Kaligotla, M. Fuciman, S. Cazzaniga, D. Carbonera, H.A. Frank, J. Alric, R. Bassi // *J Biol Chem.* – 287. – 2012. – P. 41820–41834.
91. DalCorso, G. A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis* / G. DalCorso, P. Pesaresi, S. Masiero, E. Aseeva, D. Schunemann // *Cell.* – 132. – 2008. – P. 273–285.
92. Dang, K.V. Combined increases in mitochondrial cooperation and oxygen photoreduction compensate for deficiency in cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* / K.V. Dang, J. Plet, D. Tolleter, M. Jokel, S. Cui n  // *Plant Cell.* – 26. – 2014. – P. 3036–3050.
93. Danielsson, R. Dimeric and monomeric organization of photosystem II. Distribution of five distinct complexes in the different domains of the thylakoid membrane / R. Danielsson, M. Suorsa, V. Paakkarinen, P.- . Albertsson, S. Styring, E.-M. Aro, F. Mamedov // *J Biol Chem.* – 281. – 2006. – P.14241–1429.
94. Davies, J.P. Sac1, a putative regulator that is critical to survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur deprivation / J.P. Davies, F.H. Yildiz, A.R. Grossman // *EMBO J.* – 15. – 1996. – P. 2150–2159.
95. Dau, H. A study on the energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by means of photoacoustic measurements / H. Dau, U.-P. Hansen // *Photosynth Res.* – 25. – 1990. – P. 269–278.
96. De k, Z. Characterization of wave phenomena in the relaxation of flash-induced chlorophyll fluorescence yield in cyanobacteria / Z. De k, L. Sass, E Kiss, I. Vass // *Biochim Biophys Acta.* – 1837. – 2014. – P. 1522–1532.
97. Delosme, R. Changes in light energy distribution upon state transitions: An in vivo photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* / R. Delosme, J. Olive, F.-A. Wollman // *Biochim Biophys Acta.* – 1273. – 1996. – P. 150–158.
98. Demmig-Adams, B. Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment. In: *Advances in photosynthesis and respiration Series, V.2.* (Govindjee ed.) / B. Demmig-Adams, W.W. Adams III, A.K. Mattoo – Netherlands, Dordrecht: Springer, 2006. – 365 pp.
99. Dekker, J.P. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. / J.P. Dekker, E.J. Boekema // *Biochim Biophys Acta.* – 1706. – 2005. – P. 12–39.

100. Desplats, C. Characterization of Nda2, a plastoquinone-reducing type II NAD(P)H dehydrogenase in *Chlamydomonas* chloroplasts / C. Desplats, F. Mus, S. Cuine, E. Billon, L. Cournac, G. Peltier // *J Biol Chem.* – 284. – 2009. – P. 4148–4157.
101. Dietzel, L. Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry-functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants / L. Dietzel, K. Bräutigam, T. Pfannschmidt // *FEBS J.* – 275. – 2008. – P. 1080–1088.
102. Drechsler, Z. Antimycin A as an uncoupler and electron transport inhibitor in photoreactions of chloroplasts / Z. Drechsler, N. Nelson, J. Neumann // *Biochim Biophys Acta.* – 189. – 1969. – P. 65–73.
103. Drop, B. Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in *Chlamydomonas reinhardtii* / B. Drop, M. Webber-Birungi, S.K. Yadav, A. Filipowicz-Szymanska, F. Fusetti, E.J. Boekema, R. Croce // *Biochim Biophys Acta.* – 1837. – 2014. – P. 63–72.
104. Drozak, A. Acclimation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize to different irradiances during growth / A. Drozak, E. Romanowska // *Biochim Biophys Acta.* – 1757. – 2006. – P. 1539–1546.
105. Dubini, A. Flexibility in anaerobic metabolism as revealed in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking hydrogenase activity / A. Dubini, F. Mus, M. Seibert, A.R. Grossman, M.C. Posewitz // *J Biol Chem.* – 284. – 2009. – P. 7201–7213.
106. Duffy, C.D.P. Quantum mechanical calculations of xanthophyll–chlorophyll electronic coupling in the light-harvesting antenna of photosystem II of higher plants / C.D.P. Duffy, L. Valkunas, A.V. Ruban // *J Phys Chem.* – 117. – 2013. – P. 7605–7614.
107. Eastmond, P.J. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds / P.J. Eastmond, I.A. Graham // *Trends Plant Sci.* – 6. – 2001. – P. 72–78.
108. Eberhard, S. The dynamics of photosynthesis / S. Eberhard, G. Finazzi, F. A. Wollman // *Annu Rev Genet.* – 42. – 2008. – P. 463–515.
109. Ensminger, I. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis / I. Ensminger, F. Busch, N.P.A. Huner // *Physiol Plant.* – 126. – 2006. – P. 28–44.
110. Erickson, E. Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii* / E. Erickson, S. Wakao, K.K. Niyogi // *Plant J.* – 82. – 2015. – P. 449–465.
111. Epstein, E. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. 2nd Edition / E. Epstein, A. J. Bloom – Sunderland: Sinauer Associates, 2005. –390 pp.

112. Evans, J.R. The effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach / J.R. Evans, I. Terashima // *Aust J Plant Physiol.* – 14. – 1987. – P. 59–68.
113. Fan, X. The NdhV subunit is required to stabilize the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis* / X. Fan, J. Zhang, W. Li, L. Peng // *Plant J.* – 82. – 2015. – P. 221–231.
114. Fan, D.-Y. Obstacles in the quantification of the cyclic electron flux around Photosystem I in leaves of C3 plants / D-Y. Fan, D. Fitzpatrick, R. Oguchi, W. Ma, J. Kou, W.S. Chow // *Photosynth Res.* – 129. – 2016. – P. 239–251.
115. Fernandez, E. Nitrogen assimilation and its regulation. In: The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas* (Rochaix J.D., Goldschmidt-Clermont M., Merchant S., eds.) / E. Fernandez, A. Galvan, A. Quesada – Netherlands: Springer, 1998. – P. 637–659.
116. Fernandez, E. Nitrogen assimilation and its regulation in *Chlamydomonas*. In: The *Chlamydomonas* sourcebook, 2nd ed. (E.H. Harris, D.B. Stern and G.B. Witman eds.) / E. Fernandez, A. Llamas, A. Galvan. – London: Academic Press, 2009. – P. 69–113.
117. Ferreira, K.N. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center / K.N. Ferreira, T.M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata // *Science.* – 303. – 2004. – P. 1831–1838.
118. Finazzi, G. Involvement of state transition in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* / G. Finazzi, F. Rappaport, A. Furia, M. Fleischmann // *EMBO reports.* – 3. – 2002. – P. 2280–2285.
119. Finazzi, G. A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex / G. Finazzi, G.N. Johnson, L. Dall'Osto, P. Joliot, F.-A. Wollman, R. Bassi // *Proc Nat Acad Sci USA.* – 101. – 2004. – P. 12375–12380.
120. Finazzi, G. Nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii* / G. Finazzi, G.N. Johnson, L. Dall'osto, F. Zito, G. Bonente, R. Bassi, F.A. Wollman // *Biochem.* – 45. – 2006. – P. 1490–1498.
121. Finazzi, G. Cyclic electron flow: facts and hypotheses / G. Finazzi, G. N. Johnson // *Photosynth Res.* – 129. – 2016. – P. 227–230.
122. Franck, F. The Mehler reaction in *Chlamydomonas* during photosynthetic induction and steady-state photosynthesis in wild-type and in a mitochondrial mutant. In: Photosynthesis. Energy from the sun (Allen J.F., Gantt E., Golbeck J.H., Osmond B. eds.) / F. Franck, P.A. Houyoux – Netherlands, Dordrecht: Springer, 2008. – P. 581–584.
123. Franklin, K. Light signals, phytochromes and crosstalk with other environmental cues / K.A. Franklin, G.C. Whitelam // *J Exp Botany.* – 55. – 2004. – P. 271–276.

124. Fufezan, C. Influence of the redox potential of the primary quinone electron acceptor on photoinhibition in photosystem II / C. Fufezan, C.M. Gross, M. Sjödin, A.W. Rutherford, A. Krieger-Liszkaya, D. Kirilovsky // *J Biol Chem.* – 282. – 2007. – P. 12492–12502.
125. Gaffron, H. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae / H. Gaffron, J. Rubin // *J Gen Physiol.* – 26. – 1942. – P. 219–240.
126. Garciaferris, C. Correlated biochemical and ultrastructural changes in nitrogen starved *Euglena gracilis* / C. Garciaferris, A. Delosrios, C. Ascaso // *J Phycol.* – 32. – 1996. – P. 953–963.
127. Gfeller, R.P. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of fermentative products from starch in dark and light / R.P. Gfeller, M. Gibbs // *Plant Physiol.* – 75. – 1984. – P. 212–218.
128. Ghirardi, M.L. Two-phase photobiological algal H₂-production system / M.L. Ghirardi, S.N. Kosourov, A.A. Tsygankov, M. Seibert / *Proceedings of the 2000 DOE Hydrogen Program Review.* – 2000. NREL/CP-570-28890.
129. Ghysels, B. Function of the chloroplast hydrogenase in the microalga *Chlamydomonas*: the role of hydrogenase and state transitions during photosynthetic activation in anaerobiosis / B. Ghysels, D. Godaux, R.F. Matagne, P. Cardol, F. Franck // *PLoS ONE.* – 8. – 2013. – P. e64161.
130. Gibasiewicz, K. Modulation of primary radical pair kinetics and energetics in photosystem II by the redox state of the quinone electron acceptor Q_a / K. Gibasiewicz, A. Dobek, J. Breton, W. Leibl // *Biophys J.* – 80. – 2001. – P. 1617–1630.
131. Gollan, P. Photosynthetic light reactions: integral to chloroplast signaling / P. Gollan, M. Tikkanen, E.-M. Aro // *Curr Opin Plant Biol.* – 27. – 2015. – P. 180–191.
132. González-Ballester, D. RNA-seq analysis of sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells reveals aspects of acclimation critical for cell survival / D. González-Ballester, D. Casero, S. Cokus, M. Pellegrini, S. S. Merchant, A. R. Grossman // *Plant Cell.* – 22. – 2010. – P. 2058–2084.
133. Gorman, D.S. Photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. V. Purification and properties of cytochrome 553 and ferredoxin / D.S. Gorman, R.P. Levine // *Plant Physiol.* – 41. – 1966. – P.1643–1647.
134. Govindjee. Evolution of the Z-scheme of photosynthesis: a perspective / Govindjee, D. Shevela, L.O. Björn // *Photosynth Res.* –133. – 2017. – P. 5–15.
135. Graan, T. Quantitation of the rapid electron donors to P₇₀₀, the functional plastoquinone pool, and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts / T. Graan, D.R. Ort // *J Biol Chem.* – 259. – 1984. – P. 14003–14010.

136. Grundmeier, A. Structural models of the manganese complex of photosystem II and mechanistic implications / A. Grundmeier, H. Dau // *Biochim Biophys Acta.* – 1817. – 2012. – P. 88–105.
137. Guoa, W. Magnesium deficiency in plants: An urgent problem / W. Guoa, H. Nazim, Z. Liang, D. Yanga // *The Crop J.* – 4. – 2016. – P. 83–91.
138. Haehnel, W. Evidence for complexed plastocyanin as the immediate electron donor of P-700 / W. Haehnel, A. Propper, H. Krause // *Biochim Biophys Acta.* – 593. – 1980. – P. 384–399.
139. Haehnel, W. Lateral distribution and diffusion of plastocyanin in chloroplast thylakoids / W. Haehnel, R. Ratajczak, H. Robenek // *J Cell Biol.* – 108. – 1989. – P. 1397–1405.
140. Hakala, M. Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II / M. Hakala, I. Tuominen, M. Keränen, T. Tyystjärvi, E. Tyystjärvi // *Biochim Biophys Acta.* – 1706. – 2005. – P. 68–80.
141. Hanke, G. Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism / G. Hanke, P. Mulo // *Plant Cell Environ.* – 36. – 2013. – P. 1071–1084.
142. Happe, T. Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* / T. Happe, A. Kaminski // *Eur J Biochem.* – 269. – 2002. – P. 1022–1032.
143. Harris, E.H. The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use / E.H. Harris. – San Diego: Academic Press, 1989. – 780 pp.
144. Harris, E.H. *Chlamydomonas* as a model organism / E.H. Harris // *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* – 52. – 2001. P. 363–406.
145. Hasan, S.S. Transmembrane signaling and assembly of the cytochrome *b₆f* –lipidic charge transfer complex / S.S. Hasan, E. Yamashita, W.A. Cramer // *Biochim Biophys Acta.* – 1827. – 2013. – P. 1295–1308.
146. Havaux, M. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism / M. Havaux, K.K. Niyogi // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 96. – 1999. – P. 8762–8767.
147. He, M. The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation / M. He, L. Li, L. Zhang, J. Liu // *Int J Hydrogen Energy.* – 37. – 2012. – P. 16903–16915.
148. Hemschemeier, A. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks / A. Hemschemeier, S. Fouchard, L. Cournac, G. Peltier, T. Happe // *Planta.* – 227. – 2008. – P. 397–407.

149. Henrysson, T. Characterization of photosystem II in stroma thylakoid membranes / T. Henrysson, C. Sundby // *Photosynth Res.* – 25. – 1990. – P. 107–117.
150. Hertle, A.P. PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow / A.P. Hertle, T. Blunder, T. Wunder, P. Pesaresi, M. Pribil, U. Armbruster, D. Leister // *Mol Cell.* – 49. – 2013. – P. 511–523.
151. Hoagland, D.R. The water-culture method for growing plants without soil / D.R. Hoagland, D.I. Arnon // *Agricultural Experiment Station Circular.* – 347. – 1950. – P. 1–32.
152. Hodges, M. Time-resolved chlorophyll fluorescence studies on photosynthetic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: origin of the kinetic decay components / M. Hodges, I. Mova // *Photosynth Res.* – 13. – 1987. – P. 125–41.
153. Horton, P. Characterization of two quenchers of chlorophyll fluorescence with different midpoint oxidation-reduction potentials in chloroplasts / P. Horton, E. Croze // *Biochim Biophys Acta.* – 545. – 1979. – P. 188–201.
154. Horton, P. Developments in research on non-photochemical fluorescence quenching: emergence of key ideas, theories and experimental approaches. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration Including Bioenergy and Related Processes.* (Demmig-Adams B., Garab G., Adams III W., Govindjee eds.) / P. Horton. - New York, London, Dordrecht, Heidelberg: Springer, 2014. – P. 73–95.
155. Horváth, E.M. Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure / E.M. Horváth, S.O. Peter, T. Joët, D. Rumeau, L. Cournac // *Plant Physiol.* – 123. – 2000. – P. 1337–1349.
156. Hoshino, T. Design of new strategy for green algal photo-hydrogen production: spectral-selective photosystem I activation and photosystem II deactivation / T. Hoshino, D.J. Johnson, J.L. Cuello // *Bioresour Technol.* – 120. – 2012. – P. 233–40.
157. Hoshino, T. Effects of implementing PSI-light on hydrogen production via biophotolysis in *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strains / T. Hoshino, D. Johnson, M. Scholz, J. Cuello // *J Biomass Bioenergy.* – 59. – 2013. – P. 243–52.
158. Houille-Vernes, L. Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas* / L. Houille-Vernes, F. Rappaport, F.A. Wollman, J. Alric, X. Johnson // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 108. – 2011. – P. 20820–20825.
159. Inskeep, W. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N,N-dimethylformamide and 80% acetone / W. Inskeep, P.R. Bloom // *Plant Physiol.* – 77. – 1985. – P. 483–485.
160. Ivanov, A. G. Seasonal responses of photosynthetic electron transport in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) studies by thermoluminescence / A.G. Ivanov, P.V. Sane, Y. Zeinalov, I. Simidjiev, N.P.A. Huner, G. Oquist // *Planta.* – 215. – 2002. – P. 457–465.

161. Ivanov, A.G. Photosystem II reaction centre quenching mechanisms and physiological role / A.G. Ivanov, P.V. Sane, V. Yurry, G. Öquist, N.P. Huner // *Photosynth. Res.* – 98. – 2008. – P. 565–574.
162. Ivanov, B.N. Formation mechanisms of superoxide radical and hydrogen peroxide in chloroplasts, and factors determining the signalling by hydrogen peroxide / B. Ivanov, M. Borisova-Mubarakshina, M. Kozuleva // *Funct Plant Biol.* – 45. – 2017. – P. 102–110.
163. Iwai, M. Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis / M. Iwai, K. Takizawa, R. Tokutsu, A. Okamuro, Y. Takahashi, J. Minagawa // *Nature.* – 464. – 2010. – P. 1210–1213.
164. Jans, F. A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas* / F. Jans, E. Mignolet, P.-A. Houyoux, P. Cardol, B. Ghysels, S. Cuink, L. Cournac, G. Peltier, G. Remacle, F. Franck // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 105. – 2008. – P. 20546–20551.
165. Jahns, P. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II / P. Jahns, A.R. Holzwarth // *Biochim Biophys Acta.* – 1817. – 2012. – P. 182–193.
166. Jo, J.H. Modeling and optimization of photosynthetic hydrogen gas production by green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in sulfur-deprived circumstance / J.H. Jo, D.S. Lee, J.M. Park // *Biotechnol Prog.* – 22. – 2006. – P. 431–437.
167. Joët, T. Involvement, of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco / T. Joët, B. Genty, E.-M. Josse, M. Kuntz, L. Cournac, G. Peltier // *J Biol Chem.* – 277. – 2002. – P. 31623–31630.
168. Joliot, A. Etude cinétique de la réaction photochimique libérant l'oxygène au cours de la photosynthèse / A. Joliot, P. Joliot // *CR Acad Sci Paris.* – 258. – 1964. – P. 4622–4625.
169. Joliot, P. Electron-transfer between photosystem-II and the cytochrome-B/F complex—mechanistic and structural implications / A. Joliot, P. Joliot // *Biochim Biophys Acta.* – 1102. – 1992. – P. 53–61.
170. Joliot, P. Quantification of cyclic and linear flows in plants / A. Joliot, P. Joliot // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 102. – 2005. – P. 4913–4918.
171. Joliot, P. Proton equilibration in the chloroplast modulates multiphasic kinetics of nonphotochemical quenching of fluorescence in plant / P. Joliot, G. Finazzi // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 107. – 2010. – P. 12728–12733.
172. Joly, D. Sigmoidal reduction kinetics of the photosystem II acceptor side in intact photosynthetic materials during fluorescence induction / D. Joly, R. Carpentier // *Photochem Photobiol Sci.* – 8. – 2009. – P. 167–173.

173. Krieger, A. On the determination of the redox midpoint potential of the primary quinone acceptor, Q_A, in photosystem II / A. Krieger, A.W. Rutherford, G.N. Johnson // *Biochim Biophys Acta.* – 1229. – 1995. – P. 193–201.
174. Johnová, P. Plant responses to ambient temperature fluctuations and water-limiting conditions: A proteome-wide perspective / P. Johnová, J. Skalák, I. Saiz-Fernández, B. Brzobohatý // *Biochim Biophys Acta.* – 1864. – 2016. – P. 916–931.
175. Johnson, G.N. A change in the midpoint potential of the quinone Q_A in Photosystem II associated with photoactivation of oxygen evolution / G.N. Johnson, A.W. Rutherford, A. Krieger-Liszkay // *Biochim Biophys Acta.* – 1229. – 1995. – P. 202–207.
176. Johnson, E.A. Expression by *Chlamydomonas reinhardtii* of a chloroplast ATP synthase with polyhistidine-tagged beta subunits / E.A. Johnson, J. Rosenberg, R.E. McCarty // *Biochim Biophys Acta.* – 1767. – 2007. – P. 374–380.
177. Johnson, G.N. Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants / G.N. Johnson // *Biochim Biophys Acta.* – 1807. – 2011. – P. 384–389.
178. Johnson, M.P. Restoration of rapidly reversible photoprotective energy dissipation in the absence of PsbS protein by enhanced delta-pH / M.P. Johnson, A.V. Ruban // *J Biol Chem.* – 286. – 2011. – P. 19973–19981.
179. Johnson, X. Proton gradient regulation 5-mediated cyclic electron flow under ATP- or redox-limited conditions: a study of Δ ATPase *pgr5* and Δ rbcL *pgr5* mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* / X. Johnson, J. Steinbeck, R.M. Dent, H. Takahashi, P. Richaud, S. Ozawa, L. Houille-Vernes, D. Petroustos, F. Rappaport, A.R. Grossman, K.K. Niyogi, M. Hippler, J. Alric // *Plant Physiol.* – 165. – 2014. – P. 438–452.
180. Johnson, X. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch / X. Johnson, J. Alric // *Eukaryot Cell.* – 12. – 2013. – P. 776–793.
181. Josse, E.-M. In vitro characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX) / E.-M. Josse, J.-P. Alcaraz, A.-M. Labouré, M. Kuntz // *J Biochem.* – 270. – 2003. – P. 3787–3794.
182. Juergens, M.T. The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* / M.T. Juergens, R.R. Deshpande, B.F. Lucker, J.J. Park // *Plant Physiol.* – 167. – 2015. – P. 558–573.
183. Kato, R. Redox potential of the terminal quinone electron acceptor Q_B in photosystem II reveals the mechanism of electron transfer regulation / R. Kato, T. Nagao // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 113. – 2016. – P. 620–625.

184. Kawakami, K. Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography / K. Kawakami, Y. Umenab, N. Kamiyab, J. Shen // Proc Natl Acad Sci USA. – 106. – 2009. – P. 8567–8572.
185. Keren, N. Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow / N. Keren, A. Berg, P.J.M. VanKan, H. Levanon, I. Ohad // Proc Natl Acad Sci USA. – 94. – 1997. – P. 1579–1584.
186. Khorobrykh, S.A. Oxygen reduction in a plastoquinone pool of isolated pea thylakoids / S.A. Khorobrykh, B.N. Ivanov // Photosynth Res. – 71. – 2002. – P. 209–219.
187. Kiss, A.Z. The PsbS protein controls the organization of the Photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes / A.Z. Kiss, A.V. Ruban, P. Horton // J Biol Chemistry. – 283. – 2008. – P. 3972– 3978.
188. Kok, B. Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. I. A linear four-step mechanism / B. Kok, B. Forbush, M. McGloin // Photochem Photobiol. – 11. – 1970. – P. 467–475.
189. Kolbe, A. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase / A. Kolbe, A. Tiessen, H. Schluemann, M. Paul, S. Ulrich, P. Geigenberger // Proc Natl Acad Sci USA. – 102. – 2005. – P. 11118–11123.
190. Kosourov, S. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of culture parameters / S. Kosourov, A. Tsygankov, M. Seibert, M.L. Ghirardi // Biotechnol Bioeng. – 78. – 2002. – P. 731–740.
191. Kosourov, S. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures / S. Kosourov, M.S. Seibert, M.L. Ghirardi // Plant Cell Physiol. – 44. – 2003. – P. 146–155.
192. Kosourov, S.N. Hydrogen photoproduction by nutrient-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions / S.N. Kosourov, M. Seibert // Biotechnol Bioeng. – 102. – 2009. – P. 50–58.
193. Kouřil, R. Supramolecular organization of photosystem II in green plants / R. Kouřil, J.P. Dekker, E.J. Boekema // Biochim Biophys Acta. – 1817. – 2012. – P. 2–12.
194. Kozuleva, M.A. O₂ reduction by photosystem I involves phylloquinone under steady-state illumination / M.A. Kozuleva, A.A. Petrova, M.D. Mamedov, A.Y. Semenov, B.N. Ivanov // FEBS Lett. – 588. – 2014. – P. 4364–4368.
195. Kramer, D.M. The concerted reduction of the high- and low-potential chains of the bf complex by plastoquinol / D.M. Kramer, A.R. Crofts // Biochim Biophys Acta. – 1183. – 1993. – P. 72 – 84.

196. Krause, G.H. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms / G.H. Krause // *Physiol Plantarum*. – 74. – 1988. – P. 566–574.
197. Krause, G.H. Photoinhibition at low temperatures. In: *Photoinhibition of Photosynthesis. From Molecular Mechanisms to the Field* (Baker N.R. and Bowyer J.R. eds.) / G.H. Krause. – Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1994. – P. 331–348.
198. Krause, G.H. Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. In: *Light Harvesting Antennas in Photosynthesis* (Green B.R. and Parson W. eds) Series: *Advances in Photosynthesis and Respiration*, V.13. / G.H. Krause, P. Jahns. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. – P. 373–399.
199. Krieger-Liszkay, A. The dual role of the plastid terminal oxidase PTOX: between a protective and a pro-oxidant function / A. Krieger-Liszkay, K. Feilke. // *Front Plant Sci*. – 6. – 2015. – P. 1147.
200. Krieger-Liszkay, A. Singlet oxygen production in photosynthesis / A. Krieger-Liszkay // *J Exp Bot*. – 56. – 2005. – P. 337–346.
201. Kroese, D.P. *Handbook of Monte Carlo methods*. 1st edition. Wiley Series in Probability and Statistics / D.P. Kroese, T. Taimre, Z.I. Botev. Wiley, 2011. – 772 pp.
202. Kruger, N.J. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organization / N.J. Kruger, A. von Schaewen // *Curr Opin Plant Biol*. – 6. – 2003. – P. 236–246.
203. Kruk, J. An HPLC-based method of estimation of the total redox state of plastoquinone in chloroplasts, the size of the photochemically active plastoquinone-pool and its redox state in thylakoids of *Arabidopsis* / J. Kruk, S. Karpinski // *Biochim Biophys Acta*. – 1757. – 2006. – P. 1669–1675.
204. Kuntz, M. Plastid terminal oxidase and its biological significance / M. Kuntz // *Planta*. – 218. – 2004. – P. 896–999.
205. Kutik, J. Chloroplast ultrastructure of sugar beat (*Beta vulgaris* L.) cultivated in normal and elevated CO₂ concentrations with two contrasted nitrogen supply / J. Kutik, N. Lubomir, H.H. Demmers-Derks, D.W. Lawlor // *J Exp Bot*. – 46. – 1995. – P. 1797–1802.
206. Labs, M. The antimycin A-sensitive pathway of cyclic electron flow: from 1963 to 2015 / M. Labs, T. Rühle, D. Leister // *Photosynth Res*. – 129. – 2016. – P. 231–238.
207. Laisk, A. Control of cytochrome b₆f at low and high intensity and cyclic electron transport in leaves / A. Laisk, H. Eichelmann, P. Oja, P.R. Peterson // *Biochim Biophys Acta*. – 1708. – 2005. – P. 79–90.
208. Laurinavichene, T.L. Dilution methods to deprive *Chlamydomonas reinhardtii* cultures of sulfur for subsequent hydrogen photoproduction / T.L. Laurinavichene, I. Tolstygina, R.R.

- Galiulina, M. Ghirardi, M. Seibert, A.A. Tsygankov // Int J Hydrogen Energy. – 27. – 2002. – P. 1245–1249.
209. Lawlor, D.W. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants / D.W. Lawlor, G. Cornic // Plant, Cell and Environment. – 25. – 2002. – P. 275–294.
210. Lavergne, J. Photosystem II heterogeneity. In: Oxygenic photosynthesis: the light reactions (Ort D.R., Yocum C.F. eds.) / J. Lavergne, J.-M. Briantais. – Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. – P. 265–287.
211. Lewandowska, M. Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress / M. Lewandowska, A. Sirko // Acta Biochim Pol. – 55. – 2008. – P. 457–471.
212. Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes / H.K. Lichtenthaler // Methods Enzymol. – 148. – 1987. – P. 350–382.
213. Lima Neto, M.C. Cyclic electron flow, NPQ and photorespiration are crucial for the establishment of young plants of *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* exposed to drought / M.C. Lima Neto, J.V.A. Cerqueira, J.R. da Cunha, R.V. Ribeiro, J.A.G. Silveira // Plant Biol. – 19. – 2017. – P. 650–659.
214. Liran, O. Microoxic niches within the thylakoid stroma of air-grown *Chlamydomonas reinhardtii* protect [FeFe]-hydrogenase and support hydrogen production under fully aerobic environment / O. Liran, R. Semyatich, Y. Milrad, H. Eilenberg, I. Weiner, I. Yacoby // Plant Physiol. – 172. – 2016. – P. 264–271.
215. Livingston, A.K. An *Arabidopsis* mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (hcef) involving the NADPH dehydrogenase complex / A.K. Livingston, J.A. Cruz, K. Kohzuma, A. Dhingra, D.M. Kramer // Plant Cell. – 22. – 2010. – P. 221–233.
216. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A. Farr, R.J. Randall // J Biol Chem. – 193. – 1951. – P. 265–275.
217. Mamedov, F. EPR characterization of photosystem II from different domains of the thylakoid membrane / F. Mamedov, R. Danielsson, R. Gadjieva, P.-A. Albertsson, S. Styring // Biochem. – 47. – 2008. – P. 3883–3891.
218. Marschner, H. Mineral nutrition of higher plants. 2nd edition / H. Marschner. – London: Academic Press, 1995. – 889 pp.
219. Mathur, S. Photosynthesis: Response to high temperature stress / S. Mathur, D. Agrawal, A. Jajoo // J Photochem Photobiol. – 137. – 2014. – P. 116–126.

220. Mathy, G. Proteomic and functional characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant lacking the mitochondrial alternative oxidase 1 / G. Mathy, P. Cardol, M. Dinant, A. Blomme, S. Gérin // J Proteome Res. – 9. – 2010. – P. 2825–2838.
221. Mehler, A.H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents / A.H. Mehler // Arch Biochem Biophys. – 33. – 1951. – P. 65–67.
222. Melis, A. Kinetic analysis of the fluorescence induction in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea poisoned chloroplasts / A. Melis, P. Homann // Photochem Photobiol. – 21. – 1975. – P. 431–437.
223. Melis, A. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* / A. Melis, L. Zhang, M. Forestier, M. Ghirardi, M. Seibert // Plant Physiol. – 122. – 2000. – P. 127–136.
224. Melis, A. Hydrogen production. Green algae as a source of energy / A. Melis, T. Happe // Plant Physiol. – 127. – 2001. – P. 740–748.
225. Melis, A. Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae) / A. Melis // Planta. – 226. – 2007. – P. 1075–1086.
226. Merchant, S.S. Elemental economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation / S.S. Merchant, J.D. Helmann // Adv Microb Physiol. – 60. – 2012. – P. 91–210.
227. Michelet, L. Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new / L. Michelet, M. Zaffagnini, S. Morisse, F. Sparla, M. E. Perez-Perez, F. Francia, A. Danon, C.H. Marchand, S. Fermani, P. Trost, S. D. Lemaire // Front Plant Sci. – 4. – 2013. – P. 470.
228. Miller, R. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism / R. Miller, G. X. Wu, R.R. Deshpande, A. Vieler, K. Gartner, X.B. Li, E.R. Moellering // Plant Physiol. – 154. – 2010. – P. 1737–1752.
229. Moore, C.M. Processes and patterns of oceanic nutrient limitation / C.M. Moore // Nat Geosci. – 6. – 2013. – P. 701–710.
230. Moreno-Garrido, I. Microalgae immobilization: current techniques and uses / I. Moreno-Garrido // Bioresour Technol. – 99. – 2008. – P. 3949–3964.
231. Moseley, J.L. Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii* / J.L. Moseley, C.W. Chang, A.R. Grossman // Eukaryot Cell. – 5. – 2006. – P. 26–44.

232. Müh, F. The nonheme iron in photosystem II / F. Müh, A. Zouni // *Photosynth Res.* – 116. – 2013. – P. 295–314.
233. Mulo, P. Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(+) oxidoreductase (FNR): structure, function and location / P. Mulo // *Biochim Biophys Acta.* – 1807. – 2011. – P. 927–934.
234. Munekage, Y. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis / Y. Munekage, M. Hashimoto, C. Miyake, K.-I. Tomizawa, T. Endo, M. Tasaka M., Shikanai T. // *Nature.* – 429. – 2004. – P. 579–582.
235. Murata, N. Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll *a* fluorescence in *Porphyridium cruentum* / N. Murata // *Biochim Biophys Acta.* – 172. – 1969. – P. 242–251.
236. Mus, F. Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways / F. Mus, A. Dubini, M. Seibert, M.C. Posewitz, A.R. Grossman // *J Biol Chem.* – 282. – 2007. – P. 25475–25486.
237. Nagy, V. Ascorbate accumulation during sulphur deprivation and its effects on photosystem II activity and H₂ production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* / V. Nagy, A. Vidal-Meireles, R. Tengölics, G. Rákhely, G. Garab, L. Kovács, S.Z. Tóth // *Plant Cell Environ.* – 39. – 2016. – P. 1460–1472.
238. Nagy, V. Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin-Benson-Bassham cycle / V. Nagy, A. Podmaniczki, A. Vidal-Meireles, R. Tengölics, L. Kovács, G. Rákhely, A. Scoma, S.Z. Tóth // *Biotechnol Biofuels.* – 2018. doi: 10.1186/s13068-018-1069-0. eCollection 2018.
239. Nandha, B. The role of PGR5 in the redox poisoning of photosynthetic electron transport / B. Nandha, G. Finazzi, P. Joliot, S. Hald, G.N. Johnson // *Biochim Biophys Acta.* – 1767. – 2007. – P. 1252–1259.
240. Nawrocki, W.J. The plastid terminal oxidase: its elusive function points to multiple contributions to plastid physiology / W.J. Nawrocki, N.J. Tourasse, A. Taly, F. Rappaport, F.-A. Ewollman // *Annu Rev Plant Biol.* – 66. – 2015. – P. 49–74.
241. Nguyen, A.V. Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* / A.V. Nguyen, S.R. Thomas-Hall, A. Malnoë, M. Timmins, J.H. Mussgnug, J. Rupprecht, O. Kruse, B. Hankamer, P.M. Schenk // *Eukaryot Cell.* – 7. – 2008. – P. 1965–1979.
242. Nishikawa, Y. PGR5-dependent cyclic electron transport around PSI contributes to the redox homeostasis in chloroplasts rather than CO₂ fixation and biomass production in rice /

- Y. Nishikawa, H. Yamamoto, Y. Okegawa, S. Wada, N. Sato, Y. Taira, K. Sugimoto, A. Makino, T. Shikanai // *Plant Cell Physiol.* – 53. – 2012. – P. 2117–2126.
243. Nixon, P.J. Chlororespiration / P.J. Nixon // *Phil Trans R Soc Lond B*, – 355. – 2000. – P. 1541–1547.
244. Niyogi, K.K. Safety valves for photosynthesis / K.K. Niyogi // *Curr Opin Plant Biol.* – 3. – 2000. – P. 455– 460.
245. Niyogi, K.K. Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? / K.K. Niyogi, X.-P. Li, V. Rosenberg, H.-S. Jung // *J Exp Bot.* – 56. – 2004. – P. 375–382.
246. Noth, J. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is coupled to light-independent hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* / J. Noth, D. Krawietz, A. Hemschemeier, T. Happe // *J Biol Chem.* – 288. – 2013. – P. 4368–4377.
247. Oelze, M.-L. Efficient acclimation of the chloroplast antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana* leaves in response to a 10- or 100-fold light increment and the possible involvement of retrograde signals / M.-L. Oelze, M.O. Vogel, K. Alsharafa, U. Kahmann, A. Viehhauser, V.G. Maurino, K.-J. Dietz // *J Exp Bot.* – 63. – 2012. – P. 1297-1313.
248. Okegawa, Y. A balanced PGR5 level is required for chloroplast development and optimum operation of cyclic electron transport around photosystem I / Y. Okegawa, T.A. Long, M. Iwano, S. Takayama, Y. Kobayashi // *Plant Cell Physiol.* – 48. – 2008. – P. 1462–1471.
249. Ostroumov, E.E. Photophysics of photosynthetic pigment-protein complexes In: *Advances in photosynthesis and respiration including bioenergy and related processes.* (Demmig – Adams B., Garab G., Adams III W., Govindjee, eds.) / E.E. Ostroumov, Y.R. Khan, G.D. Scholes. – Dordrecht: Springer, 2014. – 40. – P. 97–128.
250. Papazi, A. Potassium deficiency, a “smart” cellular switch for sustained high yield hydrogen production by the green alga *Scenedesmus obliquus* / A. Papazi, A.-I. Gjindali, E. Kastanaki, K. Assimakopoulos, K. Stamatakis, K. Kotzabasis // *Int J Hydrogen Energy.* – 39. – 2014. – P. 19452–19464.
251. Park, J.J. The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: a systems biology analysis / J.J. Park, H. Wang, M. Gargouri, R.R. Deshpande, J.N. Skepper, F.O. Holguin, M.T. Juergens, Y. Shachar-Hill, L.M. Hicks, D.R. Gang // *Plant J.* – 81. – 2015. – P. 611–624.
252. Paschenko, V.Z. Photophysical properties of carborane-containing derivatives of 5,10,15,20-tetra(p-aminophenyl)porphyrin / V.Z. Paschenko, R.P. Evstigneeva, V.V. Gorokhov, V.N. Luzgina, V.B. Tusov, A.B. Rubin // *J Photochem Photobiol.* – 54. – 2000. – P. 162–167.

253. Paulsen, H. Carotenoids and the assembly of light-harvesting complexes. In: The photochemistry of carotenoids. Advances in Photosynthesis and Respiration (Frank H.A., Young A.J., Britton G. Cogdell R.J. eds.) / H. Paulsen. – Dordrecht: Springer, 1999. – 8. – P. 123–135.
254. Peers, G. An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis / G. Peers, T.B. Truong, E. Ostendorf, A. Busch, D. Elrad, A.R. Grossman, M. Hippler, K.K. Niyogi // Nature. – 462. – 2009. – P. 518–521.
255. Peltier, G. Chlororespiration / G. Peltier, L. Cournac // Annu Rev Plant Biol. – 53. – 2002. – P. 523–550.
256. Peltier, G. Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae / G. Peltier, D. Tolleter, E. Billon, L. Cournac // Photosynth Res. – 106. – 2010. – P. 19–31.
257. Peng, L. The chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex interacts with photosystem I in *Arabidopsis* / L. Peng, H. Shimizu, T. Shikanai // J Biol Chem. – 283. – 2008. – P. 34873–34879.
258. Peng, L. Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis* / L. Peng, Y. Fukao, M. Fujiwara, T. Takami, T. Shikanai // Plant Cell. – 21. – 2009. – P. 3623–3640.
259. Petrillo, E. A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing / E. Petrillo, M.A. Godoy Herz, A. Fuchs, D. Reifer, J. Fuller // Science. – 344. – 2014. – P. 427–430.
260. Petrouleas, V. Binding of carboxylate anions at the non-heme Fe(II) of PS II. 2: competition with bicarbonate and effects on the Q_A/Q_B electron transfer rate / V. Petrouleas, Y. Deligiannakis, B.A. Diner // Biochim Biophys Acta. – 1188. – 1994. – P. 271–277.
261. Philipps, G. Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* / G. Philipps, T. Happe, A. Hemschemeier // Planta. – 235. – 2012. – P. 729–745.
262. Pfannschmidt, T. A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment / T. Pfannschmidt, K. Schütze, M. Brost, R. Oelmüller // J Biol Chem. – 28. – 2001. – P. 36125–36130.
263. Porra, R.J. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy / R.J. Porra, W.A. Thompson, P.E. Kriedemann // Biochim Biophys Acta. – 975. – 1989. – P. 384–394.

264. Pospíšil, P. Enzymatic function of cytochrome b_{559} in photosystem II / P. Pospíšil // J Photochem Photobiol. – 104. – 2011. – P. 341–347.
265. Pospíšil, P. Production of reactive oxygen species by Photosystem II as a response to light and temperature stress / P. Pospíšil // Front Plant Sci. – 7. – 2016. – P. 1950.
266. Quisel, J.D. Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* / J.D. Quisel, D.D. Wykoff, A.R. Grossman // Plant Physiol. – 111. – 1996. – P. 839–848.
267. Raghothama, K.G. Phosphate acquisition / K.G. Raghothama // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. – 50. – 1999. – P. 665–693.
268. Renger, G. Primary processes of photosynthesis: Principles and apparatus. In: Comprehensive series in photochemical and photobiological sciences (Häder D.P., Jori G. eds.) / G. Renger – Cambridge, UK: RSC Publishing, 2007. – 474 pp.
269. Rochaix, J.-D. Reprint of: regulation of photosynthetic electron transport / J.-D. Rochaix // Biochim Biophys Acta. – 1807. – 2011. – P. 878–886.
270. Rolland, N. *Chlamydomonas* proteomics / N. Rolland, A. Atteia, P. Decottignies, J. Garin, M. Hippler, G. Kreimer, S. D. Lemaire, M. Mittag, V. Wagner // Curr Opin Microbiol. – 12. – 2009. – P. 285–291.
271. Rosso, D. Immutans does not act as a stress-induced safety valve in the protection of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* during steady state photosynthesis / D. Rosso, A.G. Ivanov, A. Fu // Plant Physiol. – 142. – 2006. – P. 574–585.
272. Ruiz, F.A. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes / F.A. Ruiz, N. Marchesini, M. Seufferheld, Govindjee, R. Docampo. // J Biol Chem. – 276. – 2001. – P. 46196–46203.
273. Rumeau, D. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response / D. Rumeau, G. Peltier, L. Cournac // Plant Cell Environ. – 30. – 2007. – P. 1041–1051.
274. Rutherford, A.W. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II / A.W. Rutherford, A Krieger-Liszkay // Trends Biochem Sci. – 26. – 2001. – P. 648–653.
275. Salbitani, G. Sulfur deprivation results in oxidative perturbation in *Chlorella sorokiniana* / G. Salbitani, V. Vona, C. Bottone, M. Petriccione, S. Carfagna // Plant Cell Physiol. – 56. – 2015. – P. 897–905.
276. Salvucci, M. E. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis / M.E. Salvucci, S.J. Crafts-Brandner // Physiol Plant. – 120. – 2004. – P. 179–186.

277. Savitch, L.V. Regulation of energy partitioning and alternative electron transport pathways during cold acclimation of *Lodgepole* pine is oxygen dependent / L.V. Savitch, A.G. Ivanov, M. Krol, D.P. Sprott, G. Oquist, N.P.A. Huner // *Plant Cell Physiol.* – 51. – 2010. – P. 1555–1570.
278. Sazanov, L.A. Detection and characterization of a complex I-like NADH specific dehydrogenase from pea thylakoids / L.A. Sazanov, P. Burrows, P.J. Nixon // *Biochem Soc Trans.* – 24. – 1996. – P. 739–743.
279. Schansker, G. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP / G. Schansker, S.Z. Tóth, R.J. Strasser // *Biochim Biophys Acta.* – 1706. – 2005. – P. 250–261.
280. Schmollinger, S. Nitrogen-sparing mechanisms in *Chlamydomonas* affect the transcriptome, the proteome, and photosynthetic metabolism / S. Schmollinger, T. Mühlhaus, N.R. Boyle, I.K. Blaby, D. Casero // *Plant Cell.* – 26. – 2014. – P. 1410–1435.
281. Schreiber, U. Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse-modulation system / U. Schreiber, C. Klughammer, C. Neubauer // *Z Naturforsch C.* – 43. – 1988. – P. 686–698.
282. Schreiber, U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* (G.C. Papageorgiou and Govindjee eds). Dordrecht, London: Kluwer Academic, 2004. – P. 279–319.
283. Scoma, A. Acclimation to hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*: can biophotolysis be the major trigger for long-term H₂ production? / A. Scoma, L. Durante, L. Bertin, F. Fava // *New Phytol.* – 204. – 2014. – P. 890–900.
284. Sétif, P. The ferredoxin docking site of photosystem I / P. Sétif, N. Fischer, B. Lagoutte, H. Bottin, J.D. Rochaix // *Biochim Biophys Acta.* – 1555. – 2002. – P. 204–209.
285. Shao, N. Photosynthetic electron flow affects H₂O₂ signaling by inactivation of catalase in *Chlamydomonas reinhardtii* / N. Shao, C.F. Beck, S.D. Lemaire, A. Krieger-Liszkay // *Planta.* – 228. – 2008. – P. 1055–1066.
286. Shatz, G.H. Kinetic and energetic model for the primary processes in PSII / G.H. Shatz, H. Brock, A.R. Holzwarth // *Biophys J.* – 54. – 1988. – P. 397–405.
287. Shevela, D.N. Interactions of photosystem II with bicarbonate, formate and acetate / D.N. Shevela, V. Klimov, J. Messinger // *Photosynth. Res.* – 94. – 2007. – P. 247–264.

288. Shikanai, T. Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs CEF around photosystem I / T. Shikanai, T. Endo, T. Hashimoto, Y. Yamada, K. Asada, A. Yokota // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 95. – 1998. – P. 9705–9709.
289. Shikanai, T. Cyclic electron transport around Photosystem I: genetic approaches / T. Shikanai // *Annu Rev Plant Biol*. – 58. – 2007. – P. 199–217.
290. Shikanai, T. Regulatory network of proton motive force: contribution of cyclic electron transport around photosystem I / T. Shikanai // *Photosynth Res*. – 129. – 2016. – P. 253–260.
291. Shikanai, T. Contribution of cyclic and pseudo-cyclic electron transport to the formation of proton motive force in chloroplasts / T. Shikanai, H. Yamamoto // *Mol Plant*. – 10. – 2017. – P. 20–29.
292. Shinopoulos, K.E. Cytochrome b559 and cyclic electron transfer within Photosystem II / K.E. Shinopoulos, G.W. Brudvig // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1817. – 2012. – P. 66–75.
293. Shurin, J.B. Recent progress and future challenges in algal biofuel production / J.B. Shurin, M.D. Burkart, S.P. Mayfield, V.H. Smith // *F1000Res*. – 2016. – F1000 Faculty Rev-2434.
294. Solovchenko, A. Production of carotenoids using microalgae cultivated in photobioreactors. In: *Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology* (Paek K.-Y., Hosakatte N.M., Zhong J.-J. eds.) / A. Solovchenko, K. Chekanov. Dordrecht: Springer Science Business Media, 2014. – P. 63–91.
295. Solovchenko, A. Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell / A. Solovchenko // *Photosynth Res*. – 125. – 2015. – P. 437–449.
296. Smidsrød, O. Alginate as immobilization matrix for cells / O. Smidsrød, G. Skjak-Bræk // *Trends Biotechnol*. – 8. – 1990. – P. 71–78.
297. Sözer, Ö. Carotenoids assist in assembly and functions of photosynthetic complexes in cyanobacteria: doctoral thesis / Ö. Sözer. – Szeged, Hungary, 2011. – 90 pp.
298. Spreitzer, R.J. Photosynthesis-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotypes / R.J. Spreitzer, L. Mets // *Plant Physiol*. – 67. – 1981. – P. 565–569.
299. Srinivasan, N. Protein-cofactor interactions in bioenergetic complexes: the role of the A1A and A1B phylloquinones in Photosystem I / N. Srinivasan, J.H. Golbeck // *Biochim Biophys Acta*. – 1787. – 2009. – P. 1057–1088.
300. Stachula, P. Short and long term low temperature responses in *Arabidopsis thaliana* / P. Stachula. – Umeå, Sweden, 2015. – 85 pp.
301. Staehelin, L.A. Structure, composition, functional organization and dynamic properties of thylakoid membranes. In: *Oxygenic Photosynthesis: the light reactions* (Ort D.R., Yocum

- C.F. eds.) / L.A. Staehelin, G.W.M. van der Staay. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. – P. 11–30.
302. Stirbet, A. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and photosystem II: Basis and applications of the OJIP fluorescence transient / A. Stirbet, Govindjee // *J Photochem Photobiol B.* – 104. – 2011. – P. 236–257.
 303. Stirbet, A. Excitonic connectivity between Photosystem II units: What is it, and how to measure it? / A. Stirbet // *Photosynth Res.* – 116. – 2013. – P. 189–214.
 304. Strasser, R.J. The grouping model of plant photosynthesis. In: *Chloroplast Development.* (Akoyunoglou G. eds.) / R.J. Strasser. – North Holland: Elsevier, 1978. – P. 513–524.
 305. Strasser, B.J. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients / B.J. Strasser // *Photosynth Res.* – 52. – 1997. – P. 147–155.
 306. Strasser, B.J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: *Photosynthesis: From Light to Biosphere.* (Mathis P. ed.) / B. Strasser, R. Strasser Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. – P. 977– 980.
 307. Strasser, R.J. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: *Advances in photosynthesis and respiration,* (Papageorgiou G., Govindjee eds.) V.19; *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* / R.J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael – The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 321–362.
 308. Stroebel, D. An atypical heme in the cytochrome *b₆f* complex / D. Stroebel, Y. Choquet, J.-L. Popot, D. Picot // *Nature.* – 426. – 2003. – P. 413–418.
 309. Subramanian, V. Profiling *Chlamydomonas* metabolism under dark, anoxic H₂-producing conditions using a combined proteomic, transcriptomic, and metabolomic approach / V. Subramanian, A. Dubini, D.P. Astling, L.M. Laurens, W.M. Old, A.R. Grossman, M.C. Posewitz, M. Seibert // *J Proteome Res.* – 13. – 2014. – P. 5431–5451.
 310. Sugiharto B. Regulation of expression of carbon-assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf / B. Sugiharto, K. Miyata, H. Nakamoto, H. Sasakawa, T. Sugiyama // *Plant Physiol.* – 92. – 1990. – P. 963–969.
 311. Sugimoto, K. A single amino acid alteration in PGR5 confers resistance to antimycin A in cyclic electron transport around PSI / K. Sugimoto, Y. Okegawa, A. Tohri, T.A. Long, S.F. Covert, T. Hisabori, T. Shikanai // *Plant Cell Physiol.* – 54. – 2013. – P. 1525–1534.
 312. Suorsa, M. Proton gradient regulation is essential for proper acclimation of *Arabidopsis* photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions / M. Suorsa, S. Jarvi, M. Grieco, M. Nurmi, M. Pietrzykowska, M. Rantala // *Plant Cell.* – 24. – 2012. – P. 2934–2948.

313. Suorsa, M. PGR5-PGRL1-dependent cyclic electron transport modulates linear electron transport rate in *Arabidopsis thaliana* / M. Suorsa, F. Rossi, L. Tadini, M. Labs et al. // *Mol Plant*. – 9. – 2016. – P. 271–288.
314. Takahashi, H. Sulfur economy and cell wall biosynthesis during sulfur limitation of *Chlamydomonas reinhardtii* / H. Takahashi, C.E. Braby, A.R. Grossman // *Plant Physiol*. – 127. – 2001. – P. 665–673.
315. Takahashi, H. Cyclic electron flow is redox-controlled but independent of state transition / H. Takahashi, S. Clowez, F.A. Wollman, O. Vallon, F. Rappaport // *Nat Commun*. – 4. – 2013. – P. 1954.
316. Takagi, D. Photorespiration provides the chance of cyclic electron flow to operate for the redox-regulation of P₇₀₀ in photosynthetic electron transport system of sunflower leaves / D. Takagi, M. Hashiguchi, T. Sejima, A. Makino, C. Miyake // *Photosynth Res*. – 129. – 2016. – P. 279–290.
317. Terashima, I. Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach / I. Terashima, J.R. Evans // *Plant Cell Physiol*. – 29. – 1988. – P. 143–155.
318. Terashima, M. Characterizing the anaerobic response of *Chlamydomonas reinhardtii* by quantitative proteomics / M. Terashima, M. Specht, B. Naumann, M. Hippler // *Mol Cell Proteomics*. – 9. – 2010. – P. 1514–1532.
319. Tibiletti, T. *Chlamydomonas reinhardtii* PsbS protein is functional and accumulates rapidly and transiently under high light / T. Tibiletti, P. Auroy, G. Peltier, S. Caffarri // *Plant Physiol*. – 171. – 2016. – P. 2717–2730.
320. Tikhonov, A.N. pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts / A.N. Tikhonov // *Photosynth Res*. – 116. – 2013. – P. 511–534.
321. Tikhonov, A.N. The cytochrome b₆f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways / A.N. Tikhonov // *Plant Physiol Biochem*. – 81. – 2014. – P. 163–183.
322. Tikhonov, A.N. Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts / A.N. Tikhonov // *Photosynth Res*. – 125. – 2015. – P. 65–94.
323. Tikkanen, M. Novel insights into plant light-harvesting complex II phosphorylation and ‘state transitions’ / M. Tikkanen, M. Grieco, E.-M. Aro // *Trends Plant Sci*. – 16. – 2011. – P. 126–131.
324. Tikkanen, M. Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants / M. Tikkanen, E.-M. Aro // *Biochim Biophys Acta*. – 1817. – 2012. – P. 232–238.

325. Timmins, M. The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H₂ production by sulfur depletion / M. Timmins, W. Zhou, J. Rupprecht, L. Lim, S.R. Thomas-Hall, A. Doebbe, O. Kruse, B. Hankamer, U.C. Marx, S.M. Smith, P.M. Schenk // *J Biol Chem.* – 284. – 2009. – P. 23415–23425.
326. Toepel, J. Construction and evaluation of a whole genome microarray of *Chlamydomonas reinhardtii* / J. Toepel, S. Albaum, S. Arvidsson, A. Goesmann, M. la Russa, K. Rogge, O. Kruse // *BMC Genomics.* – 12. – 2011. – P. 579.
327. Toepel, J. New insights into *Chlamydomonas reinhardtii* hydrogen production processes by combined microarray/RNA-seq transcriptomics / J. Toepel, M. Illmer-Kephalides, S. Jaenicke, J. Straube, P. May, A. Goesmann, O. Kruse // *Plant Biotechnol J.* – 11. – 2013. – P. 717–733.
328. Tolleter, D. Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* / D. Tolleter, B. Ghysels, J. Alric, D. Petroustos, I. Tolstygina, et al. // *Plant Cell.* – 23. – 2011. – P. 2619–2630.
329. Tolstygina, I.V. Hydrogen production by photoautotrophic sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* pre-grown and incubated under high light / I.V. Tolstygina, T.K. Antal, S.N. Kosourov, T.E. Krendeleva, A.B. Rubin, A.A. Tsygankov // *Biotechnol Bioeng.* – 102. – 2009. – P. 1055–1061.
330. Torzillo, G. Advances in the biotechnology of hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* / G. Torzillo, A. Scoma, C. Faraloni, L. Giannelli // *Crit Rev Biotechnol.* – 35. – 2014. – P. 485–496.
331. Trebst, A. Function of beta-carotene and tocopherol in photosystem II / A. Trebst // *Z Naturforsch C.* – 58. – 2003. – P. 609–620.
332. Triantaphylidès, C. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling / C. Triantaphylidès, M. Havaux // *Trends Plant Sci.* – 14. – 2009. – P. 219–228.
333. Tsygankov, A.A. Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures / A.A. Tsygankov, S. Kosourov, M. Seibert, M.L. Ghirardi // *Int J Hydrogen Energy.* – 27. – 2002. – P. 1239–1244.
334. Tyystjärvi, E. Light emission as a probe of charge separation and recombination in the photosynthetic apparatus: relation of prompt fluorescence to delayed light emission and thermoluminescence. In: *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Series: advances in photosynthesis and respiration (Papageorgiou G.C., Govindjee eds.). V.19.* / E. Tyystjärvi, I. Vass. – Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 363–388.

335. Tyystjärvi, E. Connectivity of photosystem II is the physical basis of retrapping in photosynthetic thermoluminescence / E. Tyystjärvi, S. Rantamäki, J. Tyystjärvi // *Biophys J.* – 96. – 2009. – P. 3735–3743.
336. Tyystjärvi, E. Photoinhibition of Photosystem II / E. Tyystjärvi // *Int Rev Cell Mol Biol.* – 300. – 2013. – P. 243–303.
337. Valledor, L. System-level network analysis of nitrogen starvation and recovery in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals potential new targets for increased lipid accumulation / L. Valledor, T. Furuhashi, L. Recuenco-Munoz, S. Wienkoop, W. Weckwerth // *Biotechnol Biofuels.* – 7. – 2014. – P. 171.
338. van Gorkom, H.J. The calcium and chloride cofactors. In: *Photosystem II: the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase* (Wydrzynski T.J. Satoh K. eds.) / H.J. van Gorkom, C.F. Yocum. – Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005. – P. 307–328.
339. Vass, I. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of Photosystem II: stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation / I. Vass, S. Styring, T. Hundal, A. Koivuniemi, E.-M. Aro, B. Andersson // *Proc Nat Acad Sci USA.* – 89. – 1992. – P. 1408–1412.
340. Vass, I. UV-B radiation-induced donor- and acceptor- side modifications of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 / I. Vass, D. Kirilovsky, A.-L. Etienne // *Biochemistry.* – 38. – 1999. – P. 12786–12794.
341. Vass, I. The history of photosynthetic thermoluminescence / I. Vass // *Photosynth Res.* – 76. – 2003. – P. 303–318.
342. Vass, I. Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex / I. Vass // *Biochim Biophys Acta.* – 1817. – 2012. – P. 209–217.
343. Rensen, J.J.S. Bicarbonate interactions. In: *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase* (Wydrzynski T.J. Satoh K. eds.) / J.J.S. Rensen, V. Klimov. – Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005. – P. 329–345.
344. Vener, A.V. Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome bf mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash / A.V. Vener, P.J. van Kan, P.R. Rich, I. Ohad, B. Andersson // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 94. – 1997. – P. 1585–1590.
345. Vernotte, C. Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool / C. Vernotte, A.L. Etienne, J.-M. Briantais // *Biochim Biophys Acta.* – 545. – 1979. – P. 519–527.

346. Vetoshkina, D.V. Involvement of the chloroplast plastoquinone pool in the Mehler reaction / D.V. Vetoshkina, B.N. Ivanov, I.I. Proskuryakov, M.M. Borisova-Mubarakshina // *Physiol Plant.* – 161. – 2017. – P. 45–55.
347. Vignais, P.M. Occurance, classification, and biological function of hydrogenases: an overview / P.M. Vignais, B. Billoud // *Chem Rev.* – 107. – 2007. – P. 4206–4272.
348. Volgusheva, A.A. Examination of chlorophyll fluorescence decay kinetics in sulfur deprived algae *Chlamydomonas reinhardtii* / A.A. Volgusheva, V.E. Zagidullin, T.K. Antal, B.N. Korvatovsky, T.E. Krendeleva, V.Z. Paschenko, A.B. Rubin // *Biochim Biophys Acta.* – 1767. – 2007. – P. 559–564.
349. Volgusheva, A. Increased photosystem II stability promotes H₂ production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* / A. Volgusheva, S. Styring, F. Mamedov // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 110. – 2013. – P. 7223–7228.
350. Volgusheva, A. Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under magnesium deprivation / A. Volgusheva, G. Kukarskikh, T. Krendeleva, A. Rubin, F. Mamedov // *RSC advances.* – 5. – 2015. – P. 5633–5637.
351. Volgusheva, A. Comparative analyses of H₂ photoproduction in magnesium and sulfur starved *Chlamydomonas reinhardtii* cultures / A. Volgusheva, M. Jokel, Y. Allahverdiyeva, G. Kukarskikh, E. Lukashev, T. Krendeleva, T. Antal // *Physiol Plantarum.* – 161. – 2017. – P. 124–137.
352. Wang, P. Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress / P. Wang, W. Duan, A. Takabayashi, T. Endo, T. Shikanai // *Plant Physiol.* – 141. – 2006. – P. 465–474.
353. Wang, H. Comprehensive comparison of iTRAQ and label-free LC-based quantitative proteomics approaches using two *Chlamydomonas reinhardtii* strains of interest for biofuels engineering / H. Wang, S. Alvarez, L.M. Hicks // *J Proteome Res.* – 11. – 2011. – P. 487–501.
354. Wase, N. Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling / N. Wase, P.N. Black, B.A. Stanley, C.C. DiRusso // *J Proteome Res.* – 13. – 2014. – P. 1373–1396.
355. Werdan, K. The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO₂ fixation in the light and dark / K. Werdan, H.W. Heldt, M. Milovancev // *Biochim Biophys Acta.* – 396. – 1975. – P. 276–292.
356. Wobbe, L. Translational control of photosynthetic gene expression in phototrophic eukaryotes / L. Wobbe, C. Schwarz, J. Nickelsen, O. Kruse // *Physiol Plant.* – 133. – 2008. – P. 507–515.

357. Wykoff, D.D. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* / D.D. Wykoff, J.P. Davies, A. Melis, A.R. Grossman // *Plant Physiol.* – 117. – 1998. – P. 129–139.
358. Yadav, S.K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. / S.K. Yadav // *Agronomy for sustainable development.* – 30. – 2010. – P. 515–527.
359. Yamamoto, H. An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin-binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis* / H. Yamamoto, L. Peng, Y. Fukao, T. Shikanai // *Plant Cell.* – 23. – 2011. – P. 1480–1493.
360. Yamori, W. Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth / W. Yamori, T. Shikanai // *Annu Rev Plant Biol.* – 67. – 2016. – P. 81–106.
361. Yamori, W. A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice / W. Yamori, A. Makino, T. Shikanai // *Sci Rep.* – 6. – 2016. – P. 20147.
362. Yang, W. Algae after dark: mechanisms to cope with anoxic/hypoxic conditions / W. Yang, C. Catalanotti, T.M. Wittkopp, M.C. Posewitz, A.R. Grossman // *Plant J.* – 82. – 2015. – P. 481–503.
363. Yano, J. Light-dependent production of dioxygen in photosynthesis / J. Yano, J. Kern, V.K. Yachandra, H. Nilsson, S. Koroidov, J. Messinger // *Met Ions Life Sci.* – 15. – 2015. – P. 13–43.
364. Zargar, A. A review of drought indices / A. Zargar, R. Sadiq, B. Naser, F.I. Khan // *Environ Rev.* – 19. – 2011. – P. 333–349.
365. Zhang, H. Ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b₆f complex / H. Zhang, J.P. Whitelegge, W.A. Cramer // *J Biol Chem.* – 276. – 2001. – P. 38159–38165.
366. Zhang, L. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga) / L. Zhang, T. Happe, A. Melis // *Planta.* – 214. – 2002. – P. 552–561.
367. Zhang, R. Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heat stress / R. Zhang, T.D. Sharkey // *Photosynth Res.* – 100. – 2009. – P. 29–43.
368. Zia, A. Protection of the photosynthetic apparatus against dehydration stress in the resurrection plant *Craterostigma pumilum* / A. Zia, B.J. Walker, H.M. Oung, D. Charuvi, et al. // *Plant J.* – 87. – 2016. – P. 664–680.

369. Zito, F. The Qo site of cytochrome b₆f complexes controls the activation of the LHCII kinase / F. Zito, G. Finazzi, R. Delosme, W. Nitschke, D. Picot, F.A. Wollman // *EMBO J.* – 18. – 1999. – P. 2961–2969.
370. Zlatev, Z. Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence of young wheat plant / Z. Zlatev // *Biotechnol.* – 23. – 2009. – P. 437–441.
371. Zorin, N.A. Redox properties and active center of phototrophic bacteria hydrogenases / N.A. Zorin // *Biochimie.* – 68. – 1986. – P. 97–101.

Приложение А

Таблица. Параметры модели и их величины. Оценочные значения были определены в ходе тестирования модели.

	Название параметра модели	Величина	Ссылка
1	Константа скорости перехода $S_0 \rightarrow S_1$	$5 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$	Razeghifard et al. (1997)
2	Константа скорости перехода $S_1 \rightarrow S_2$	$3 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$	
3	Константа скорости перехода $S_2 \rightarrow S_3$	$1 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$	
4	Константа скорости перехода $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$	$3 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$	
5	Константа скорости перехода $S_2 \rightarrow S_1$	150 c^{-1}	Оценочное значение
6	Константа скорости перехода $S_3 \rightarrow S_2$	90 c^{-1}	
7	Константа скорости перехода $S_1 \rightarrow S_0$	14 c^{-1}	
8	Константа скорости восстановления P_{680}^+ тирозином Y_Z	$5 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$	Brettel et al. (1984)
9	Константа скорости переноса электрона с P_{680} на Y_Z^+	$1.7 \times 10^6 \text{ c}^{-1}$	
10	Константа скорости первичного разделения зарядов (${}^1P_{680}^*Pheo \rightarrow P_{680}^+Pheo^-$) в ФС2 с окисленным Qa	$3.0 \times 10^9 \text{ c}^{-1}$	Dau (1994)
11	Константа скорости рекомбинации первично разделенных зарядов ($P_{680}^+Pheo^- \rightarrow {}^1P_{680}^*Pheo$) в ФС2 с окисленным Qa	$3.0 \times 10^8 \text{ c}^{-1}$	
12	Константа скорости первичного разделения зарядов в ФС2 с восстановленным Qa	$4.8 \times 10^8 \text{ c}^{-1}$	
13	Константа скорости рекомбинации первично разделенных зарядов в ФС2 с восстановленным Qa	$3.4 \times 10^8 \text{ c}^{-1}$	

14	Константа скорости переноса электрона с Pheo ⁻ на Qa	$2.3 \times 10^9 \text{ c}^{-1}$	
15	Константа скорости переноса электрона с Qa ⁻ на Qb	3500 c^{-1}	Haumann and Junge (1994), Golbeck and Kok (1979), reviewed by Lazár (1999, 2003)
16	Константа скорости переноса электрона с Qb ⁻ на Qa	200 c^{-1}	
17	Константа скорости переноса электрона с Qa ⁻ на Qb ⁻	2000 c^{-1}	
18	Константа скорости переноса электрона с Qb ²⁻ на Qa	50 c^{-1}	
19	Константа скорости диссоциации QbH ₂ с Qb-связывающего сайта	1500 c^{-1}	
20	Константа скорости связывания ПХ с Qb сайтом	1500 c^{-1}	
21	Константа скорости диссоциации Qb с Qb сайта	1500 c^{-1}	
22	Константа скорости безызлучательной рекомбинации первично разделенных зарядов в центре ФС2 с восстановленным Qa	$3 \times 10^8 \text{ c}^{-1}$	Dau (1994)
23	Константа скорости прямой рекомбинации между P ₆₈₀ ⁺ и Qa ⁻ (P ₆₈₀ ⁺ Qa ⁻ → P ₆₈₀ Qa)	$1 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$	Haveman and Mathis (1976), Renger and Wolff (1976)
24	Константа скорости излучательной дезактивации энергии в ССК2	$6.7 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$	Rabinovich and Govindjee (1969)
25	Константа скорости тепловой диссипации энергии в антенне	$1.0 \times 10^8 \text{ c}^{-1}$	Trissl and Lavergne (1995)
26	Скорость генерации возбуждения в ФС2 (такое же значение взято для ФС1)	$k_L=3000 \text{ c}^{-1}$	Lazár and Pospíšil (1999), Lazár (2003) (model estimates)

27	Константа скорости тушения электронного возбуждения Хл состоянием P_{680}^+	$1 \times 10^{11} \text{ c}^{-1}$	Gorbunov et al. (2011)
28	Константа скорости переноса возбуждения с ССК2 на P_{680} (такое же значение взято для аналогичной реакции в ФС1)	$2.4 \times 10^{11} \text{ c}^{-1}$	Holzwarth et al. (2006)
29	Константа скорости переноса возбуждения с P_{680} в ССК2 (такое же значение взято для аналогичной реакции в ФС1)		
	Соотношение между состояниями КВК S_1 и S_0 в условиях темновой адаптации	0.75:0.25	Kok et al. (1970)
	Соотношение между ФС2 β и α типа	35 : 65	Lavergne and Briantais (1996)
	Процент Q_B -невосстанавливающих центров в фотосистемах α и β типа	7.0, 20 %	Tomek et al. (2003)
	Вероятность энергетического обмена в суперкомплексе	100%	Lazâr and Jablonsky (2009)
	Процент ФС2 с незаполненным Q_B сайтом адаптированном к темноте состоянию	20%	Оценочное значение
30	Скорость обмена ПХ между пулом 1 и 2	150 c^{-1}	Оценочное значение
31	Константа скорости окисления PQH_2 в Q_O сайте цит b_{6f}	100 c^{-1}	Crofts et al. (1993)
32	Константа скорости переноса электрона с цит b на связанный ПХ в Q_i сайте	$5 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$	Оценочное значение
33	Константа скорости связывания ПХ с Q_i сайтом и высвобождения PQH_2 с Q_i сайта	1500 c^{-1}	Оценочное значение
34	Константа скорости переноса электрона с белка ke на связанный Пц	$3 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$	Норе (2000)
35	Константа скорости связывания Пц и высвобождения Pc^- со связывающего сайта	1700 c^{-1}	Оценочное значение

	на цит b_0/f		
36	Константа скорости связывания Пц с ФС1	$1.7 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$	Nordling et al. (1991), Hope et al. (1994), Drepper et al. (1996), Hope (2000)
37	Константа скорости высвобождения Пц с сайта связывания в ФС1	$6.7 \times 10^3 \text{ с}^{-1}$	
38	Константа скорости связывания Пц ⁻ с ФС1	$4 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$	
39	Константа скорости диссоциации Пц ⁻ с сайта связывания в ФС1	$2.4 \times 10^3 \text{ с}^{-1}$	
40	Константа скорости переноса электрона с Пц ⁻ на P ₇₀₀ ⁺	$3.8 \times 10^4 \text{ с}^{-1}$	
41	Константа скорости переноса электрона с P ₇₀₀ на Пц	$4.5 \times 10^3 \text{ с}^{-1}$	
42	Константа скорости первичного разделения зарядов в ФС1 ($^1\text{P}_{700}^* \text{A}_0 \rightarrow \text{P}_{700}^+ \text{A}_0^-$)	$4 \times 10^{11} \text{ с}^{-1}$	Brettel (1997), Brettel and Leibl (2001), Holzwarth et al. (2006)
43	Константа скорости рекомбинации первично разделенных зарядов в ФС1 ($\text{P}_{700}^+ \text{A}_0^- \rightarrow ^1\text{P}_{700}^* \text{A}_0$)	$2.3 \times 10^7 \text{ с}^{-1}$	
44	Константа скорости переноса электрона с A ₀ в пул акцепторов	$2.0 \times 10^6 \text{ с}^{-1}$	
45	Константа скорости переноса электрона из пула акцепторов в ФС1 на окисленный Фд	$3.0 \times 10^7 \text{ с}^{-1}$	
46	Константа скорости связывания окисленного Фд с ФС1	1500 с^{-1}	Оценочное значение
47	Константа скорости высвобождения восстановленного Фд с ФС1	1500 с^{-1}	
48	Константа скорости переноса электрона с ФС1 на кислород	2.5 с^{-1}	
49	Константа скорости переноса электрона с восстановленного Фд в ПХ пул 2 (ЦЭТ)	15 с^{-1}	
50	Константы скорости нефотохимического восстановления/окисления ПХ пула 2	2.5 с^{-1}	

	(хлородыхание)		
--	----------------	--	--

Ссылки к Таблице.

- Brettel K, Schlodder E, Witt HT (1984) Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll-*a* II (P-680) in single fleishes as a probe for the electron pathway, H⁺ release and charge accumulation in the O₂-evolving complex. *Biochim Biophys Acta* 766: 403–415
- Brettel K (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1318: 322–373
- Brettel K, Leibl W (2001) Electron transfer in photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1507: 100–114
- Crofts AR, Baroli I, Kramer D, Taoka S (1993) Kinetics of Electron Transfer between QA and QB in Wild Type and Herbicide-Resistant Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z Naturforsch C48*: 259–266
- Dau H (1994) Molecular mechanism and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem Photobiol* 60: 1–23
- Drepper F, Hippler M, Nitschke W, Haehnel W (1996) Binding Dynamics and Electron Transfer between Plastocyanin and Photosystem I. *Biochem* 35: 1282–95
- Haveman J, Mathis P (1976) Flash-induced absorption changes of the primary donor of photosystem II at 820 nm in chloroplasts inhibited by low pH or tris-treatment. *Biochim Biophys Acta* 440: 346–355
- Haumann M, Junge W (1994) Extent and rate of proton release by photosynthetic water oxidation in thylakoids: electrostatic relaxation versus chemical production. *Biochem* 33: 864–872
- Holzwarth AR, Müller MG, Reus M, Nowaczyk M, Sander J, Rögner M (2006) Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: pheophytin is the primary electron acceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6895–6900

- Hope AB, Valente P, Matthews DB (1994) Effects of pH on the kinetics of redox reactions in and around the cytochrome *b_f* complex in an isolated system. *Photosynth Res* 42: 111–120
- Hope AB (2000) Electron transfers amongst cytochrome *f*, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1456: 5–26
- Golbeck JH, Kok B (1979) Redox titration of electron acceptor Q and the plastoquinone pool in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 547: 347–360
- Gorbunov MY, Kuzminov FI, Fadeev VV, Kim JD, Falkowski PG (2011) A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* 1807: 1591–1599
- Kok B, Forbush B, McGloin M (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution - I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol* 11: 457–475
- Lavergne J, Briantais JM (1996) Photosystem II heterogeneity. In: Ort DR, Yocum CF (eds.), *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 265–287
- Lazár D (1999) Chlorophyll *a* Fluorescence induction. *Biochim Biophys Acta* 1412: 1–28
- Lazár D, Pospisil P (1999) Mathematical simulation of chlorophyll *a* fluorescence rise measured with 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-treated barley leaves at room and high temperatures. *Eur Biophys J* 28: 468–477
- Lazár D (2003) Chlorophyll *a* Fluorescence Rise Induced by High Light Illumination of Dark-adapted Plant Tissue Studied by Means of a Model of Photosystem II and Considering Photosystem II Heterogeneity. *J Theor Biol* 220: 469–503
- Lazár D, Jablonský J (2009) On the approaches applied in formulation of a kinetic model of photosystem II: Different approaches lead to different simulations of the chlorophyll *a* fluorescence transients. *J Theor Biol* 257: 260–269
- Nordling M, Sigfridsson K, Young S, Lundberg LG, Hansson O (1991) Flash-photolysis studies of the electron transfer from genetically modified spinach plastocyanin to photosystem I. *FEBS Lett* 291: 327–330
- Rabinovich E and Govindjee (1969) *Photosynthesis*. Wiley, New York, pp. 273
- Razeghifard MR, Klughammer C, Pace RJ (1997) Electron paramagnetic resonance kinetic studies of the S states in spinach thylakoids. *Biochem* 36: 86–92
- Renger G, Wolf C (1976) The existence of a high photochemical turnover rate at the reaction centers of System II in Tris-washed chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 423: 610–614
- Setif P (2001) Ferredoxin and Flavodoxin reduction by photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1507: 161–179

- Setif P (2006) The light-driven plastocyanin:ferredoxin oxidoreductase. In: Photosystem I, Golbeck JH (ed.), Springer, The Netherlands, pp. 439–454
- Tomek P, Ilík P, Lazár D, Štroch M, Nauš J (2003) On the determination of QB-non-reducing photosystem II centers from chlorophyll a fluorescence induction. *Plant Sci* 164: 665–670
- Trissl HW, Lavergne J (1995) Fluorescence Induction From Photosystem II: Analytical Equations for the Yields of Photochemistry and Fluorescence Derived From Analysis of a Model Including Exciton-Radical Pair Equilibrium and Restricted Energy Transfer Between Photosynthetic Units. *Funct Plant Biol* 22(2): 183–193