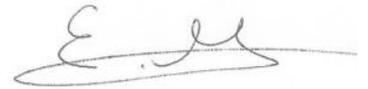


На правах рукописи



Максимов Евгений Георгиевич

**МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ В НАТИВНЫХ И ГИБРИДНЫХ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ АНТЕННЫХ КОМПЛЕКСАХ**

Специальность: 03.01.02. – “Биофизика”

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор
Пащенко Владимир Захарович

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Рубин Андрей Борисович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук
Разживин Андрей Павлович

кандидат биологических наук

Шубин Владимир Вениаминович

Ведущая организация: **Институт фундаментальных проблем биологии РАН**

Защита состоится 15 декабря 2011 года в __ часов __ минут на заседании Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском Государственном Университете им. М. В. Ломоносова по адресу: 119991, Россия, Москва, Ленинские горы 1/12, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория “Новая”.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова.

Автореферат разослан __ октября 2011 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

доктор биологических наук



М. Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фотосинтез – совокупность процессов поглощения, превращения и использования энергии квантов света в различных эндергонических реакциях, в том числе преобразование углекислого газа в органические вещества (Рубин, 2000). Первичные процессы фотосинтеза в цианобактериях, водорослях и высших растениях осуществляются на тилакоидных мембранах, где локализованы трансмембранные комплексы фотосистемы 2 (ФС2), цитохрома *b₆f* и фотосистемы 1. Известно, что эффективность разделения зарядов в реакционных центрах (РЦ) фотосинтеза близка к 100 %. Высокий квантовый выход образования первичной ион-радикальной пары в РЦ позволяет рассматривать их в качестве перспективных фотопреобразователей световой энергии в электрическую. Расчеты показывают, что при использовании этих природных «генераторов» коэффициент полезного действия фотопреобразователя может быть существенно выше, чем у лучших современных солнечных батарей (Govorov, 2007). За последние годы было осуществлено несколько попыток получения электрического тока с помощью наноразмерных устройств, включающих фотосинтетические РЦ, у которых хиноны замещены синтетическими акцепторами электронов, соединенными с электродом посредством «молекулярных проводов» (Terasaki, 2006). Общим недостатком подобных устройств является ничтожно малая поглощающая способность тонких слоев изолированных РЦ, что существенно снижает эффективность и целесообразность применения таких систем для получения электрического тока. Очевидна необходимость создания искусственных многокомпонентных энергопреобразующих устройств, способных эффективно поглощать солнечную энергию и преобразовывать её в электрохимический потенциал.

Современные исследования показывают, что для увеличения поглощающей способности изолированных РЦ могут быть использованы полупроводниковые нанокристаллы, или квантовые точки (КТ). КТ в роли искусственных антенных комплексов могут быть перспективны, только если они способны обеспечить эффективность переноса энергии к акцепторам, сравнимую с таковой в природных светосборщиках, например, в таких как фикобилисомы цианобактерий.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось сравнение процессов миграции энергии в нативных и гибридных антенных комплексах. Для осуществления цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать эффективность переноса энергии от фикобипротенинов к хлорофиллу реакционных центров ФС2 у *Synechocystis* sp. PCC6803 и её мутантов отличающихся размером фикобилисом.
2. Изучить процессы миграции энергии в гибридных комплексах типа КТ – природные ПБК и сравнить полученные данные с результатами исследования нативных светосборщиков.
3. Изучить влияние температуры на процессы миграции энергии в природных светосборщиках и в гибридных комплексах.

Научная новизна работы. В условиях *in vitro* были получены гибридные структуры из полупроводниковых (CdSe/ZnS) квантовых точек и природных пигмент-белковых комплексов. Впервые показано, что в полученных структурах происходит высокоэффективный перенос энергии от доноров (КТ) к акцепторам (фикоэритрин, комплексы ядра ФС2) по индуктивно-резонансному механизму. Установлено, что увеличение эффективного сечения возбуждения флуоресценции комплексов ФС2 за счет взаимодействия с КТ приводит к увеличению скорости восстановления первичных акцепторов электрона. Сравнение КТ и природных ПБК – фикобилипротеинов показало, что КТ не уступают нативным ПБК по эффективности светосбора. Установлено, что длительность (τ_{fl}) флуоресценции аллофикоцианина (АФЦ) зависит от скорости замораживания. Предложен механизм взаимодействия хромофоров и водно-белковой матрицы, объясняющий влияние температуры и скорости замораживания на τ_{fl} АФЦ.

Научно-практическая ценность работы. Полученные результаты расширяют современные представления о механизмах взаимодействия хромофоров и апопротеинов фикобилипротеинов и важны для понимания процессов преобразования энергии в фикобилисомах цианобактерий. Результаты исследования гибридных комплексов из полупроводниковых нанокристаллов и природных ПБК могут быть использованы в биотехнологии для создания гибридных фотопреобразователей энергии или высокочувствительных биофотосенсоров. Обнаруженная температурная зависимость времени жизни флуоресценции АФЦ может служить параметром в тест-системах для оценки скорости замораживания.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на XIX Пушкинских чтениях по фотосинтезу и Всероссийской конференции «Фотохимия хлорофилла в модельных и природных системах» (г. Пушкино, 2009); 15-ом международном конгрессе по фотосинтезу

(г. Пекин, Китай, 2010); конференции молодых ученых в рамках Rusnanoforum 2010 (г. Москва, 2010); международной конференции «Photosynthesis for sustainability» (г. Баку, Азербайджан, 2011), а также докладывались на семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 6 в реферируемых журналах.

Сокращения, принятые в работе. ПБК – пигмент-белковый комплекс; ФС1 – фотосистема 1; ФС2 – фотосистема 2; ФБС – фикобилисома; ФЭ – фикоэритрин; ФЦ – фикоцианин; АФЦ – аллофикоцианин; ОСР – оранжевый каротин-протеин; WT – дикий тип *Synechocystis* sp. PCC 6803; СК, PAL – мутанты *Synechocystis* sp. PCC 6803 лишённые фикоцианина и фикобилисом, соответственно; ΔPSI/ΔPSII – мутанты *Synechocystis* sp. PCC 6803, лишённые ФС1 и ФС2; КТ 530 (или 630) – квантовые точки с максимумом эмиссии при 530 (или 630) нм.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа содержит 44 рисунка и 5 таблиц. Список литературы включает 130 источников.

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и основные задачи, показана научная новизна и практическая значимость работы. В главе 1 представлен обзор литературы, в котором отражены основные современные подходы к исследованию миграции энергии в гибридных структурах. В главе 2 изложены экспериментальные методики, используемые в работе. В главе 3 изложены основные результаты и их обсуждение.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили клетки дикого типа *Synechocystis* sp. PCC 6803, которые выращивали в модифицированной среде BG-11 (Ripka, 1979) при 30 °С и постоянном освещении люминесцентными лампами 40 мкЭ м⁻² с⁻¹. Мутант СК, лишённый ФЦ, и мутант PAL, полностью лишённый фикобилисом выращивали в среде BG-11, содержащей удвоенную концентрацию NaNO₃. Мутант СК выращивали в присутствии канамицина, мутант PAL – в присутствии спектиномицина и хлорамфеникола. Мутанты

Δ PSI/ Δ PSII, лишённые ФС1 и ФС2 выращивали в среде BG-11, содержащей глюкозу, спектиномицин, эритромицин и хлорамфеникол при освещенности $5 \text{ мкЭ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Культуру *Acaryochloris marina* выращивали в искусственной морской воде при температуре $28 \text{ }^\circ\text{C}$ и постоянном освещении $5 \text{ мкЭ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и аэрации (Larkum, 2002).

Одноклеточные цианобактерии *Gloeobacter violaceus* выращивали в стационарных условиях также в среде BG-11. Фикоэритрин из *G. violaceus* выделяли методом анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (Guglielmi, 1981).

Аллофикоцианин (АФЦ) получали из супернатанта разрушенных во Френч-прессе клеток нитчатой цианобактерии *Arthrospira platensis* с использованием трех последовательных хроматографических процедур (Gottschalk, 1993).

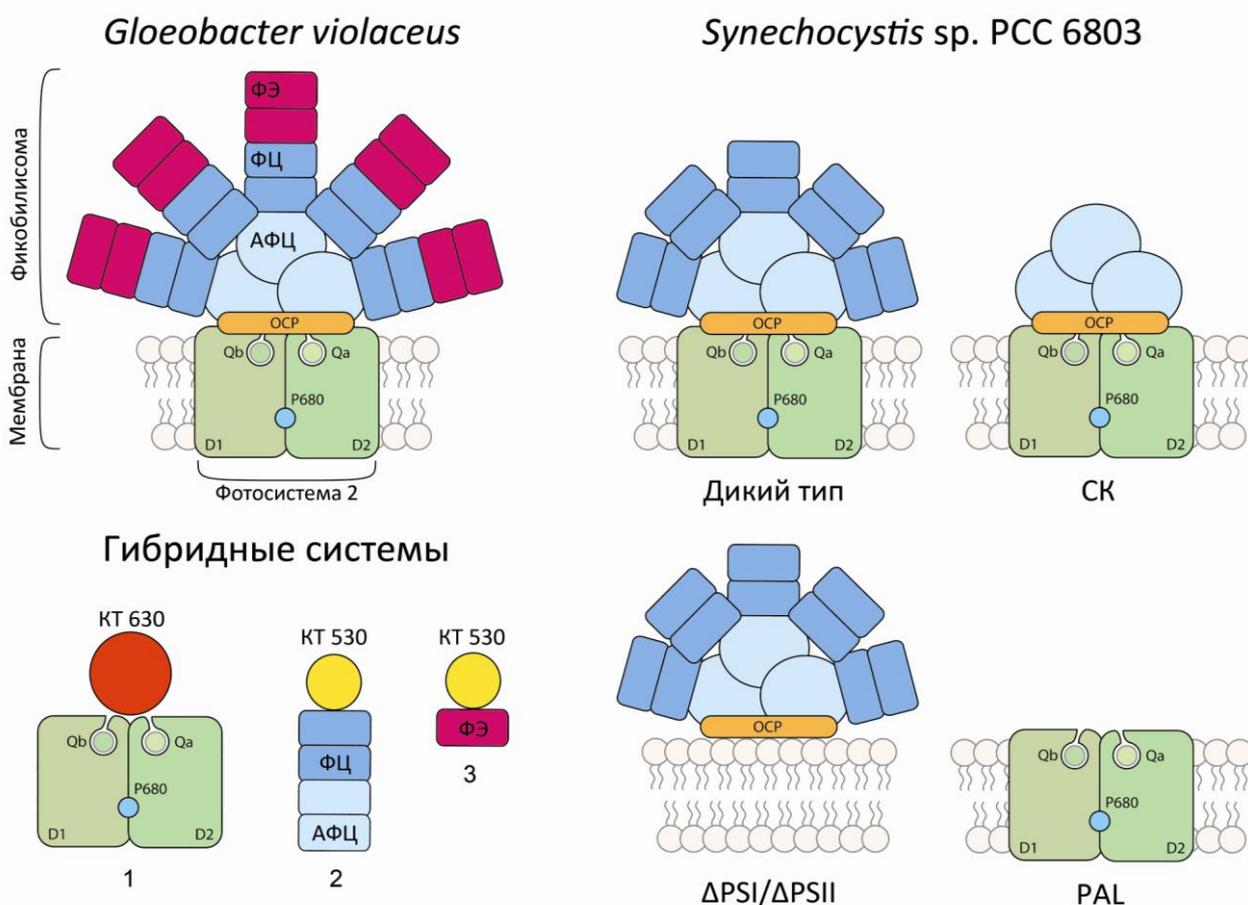


Рис. 1. Схематическое представление объектов исследования. Показано строение: антенных комплексов цианобактерии *Gloeobacter violaceus*; *Synechocystis* sp. PCC 6803 и её мутантов СК, PAL и Δ PSI/ Δ PSII; гибридных структур: 1 – КТ 630 + ФС2, 2 – КТ 530 + фикобилисома *A. marina*, 3 – КТ 530 + фикоэритрин.

В работе использовали водорастворимые квантовые точки с ядром из CdSe/ZnS, покрытые гидрофильной оболочкой с карбоксильными группами двух типов, обладающие

максимальной интенсивностью флуоресценции при 530 и 630 нм (Sukhanova, 2001) (см. рис. 1).

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометров Hitachi – 557 (Япония) и Ocean Optics (США). Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Horiba Jobin Yvon FluoroMax-4 (Франция).

Кривые индукции флуоресценции регистрировали с помощью приборов Handy-PEA (Hansatech, Великобритания), FIRE (США) и флуориметра высокого временного разрешения, разработанного на кафедре биофизики биологического факультета МГУ им. Ломоносова (РФ). При анализе индукционных кривых флуоресценции использовали подход, основанный на предположении, что первая (быстрая) стадия индукционной кривой характеризует восстановление Q_A (т.е. переход РЦ в «закрытое» состояние), последующие медленные стадии характеризуют восстановление Q_B и другие процессы (Falkowski, 1993). Начальный участок кривой индукции флуоресценции аппроксимировали суммой экспонент: $X(t) = 1 - [B_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + B_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}]$, где B_i – предэкспоненциальные факторы компонент, τ_i – соответствующие им времена (см. рис. 4). Поскольку, τ_2 более чем на порядок превосходит τ_1 , экспоненциальные составляющие функции $X(t)$ не перекрываются во времени. Константа скорости фотохимической реакции пропорциональна плотности потока фотонов возбуждающего импульса I_0 и эффективному сечению возбуждения флуоресценции РЦ ФС2 $\sigma_{\text{ФС2}}$ (Falkowski, 1998), которое равно произведению эффективного сечения поглощения и квантового выхода флуоресценции. Доля РЦ ФС2 в закрытом состоянии $X(t)$ может быть определена следующим образом:

$$X(t) = \frac{F(t) - F_0}{F_m - F_0} = 1 - e^{-\sigma_{\text{ФС2}} I_0 t},$$

где $\sigma_{\text{ФС2}}$ - эффективное сечение возбуждения флуоресценции, которое рассчитывали по формуле $\sigma_{\text{ФС2}} = \frac{1}{\tau_1 I_0}$, где τ_1 – характерное время быстрой стадии индукции флуоресценции хлорофилла ФС2.

Мгновенные спектры флуоресценции с пикосекундным временным разрешением регистрировали с помощью измерительного комплекса на основе системы однофотонного счета Simple Tau 140 (Becker & Nickl, Германия). Для анализа кинетик затухания флуоресценции использовали двух- и трехэкспоненциальные модели и алгоритм

Левенберга-Марквардта для снижения χ^2 после деконволюции. Также для обработки мгновенных спектров флуоресценции использовали метод «глобального анализа» (Global Lifetime Analysis), позволяющий рассчитать набор связанных (времен жизни компонент кинетики затухания флуоресценции τ_i) и свободных параметров (амплитуд при различных длинах волн $A_i(\lambda)$). Зависимость $A_i(\lambda)$ - графическое представление результатов глобального анализа, называют спектральным распределением компонент кинетики затухания флуоресценции (Decay Associated Spectra - DAS) (см. рис. 12). В системе с переносом энергии DAS характеризуются положительными амплитудами компонент в области эмиссии донора и отрицательными в области соответствующей флуоресценции акцептора.

Анализ полученных данных проводили при помощи пакетов программ Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США) и SPCImage (Becker & Hickl, Германия) Globals Unlimited (Университет штата Иллинойс, Urbana, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Перенос энергии в фикобилисомах мутантов *Synechocystis* sp. PCC6803 с различным набором фикобилипротеинов

Известно, что в фотосинтетических мембранах цианобактерий перенос энергии от фикобилинов фикобилисом (донор - D) к хлорофиллу (акцептор - A) реакционных центров осуществляется по механизму Фёрстера (FRET) (см. рис. 2). Для описания донорно-акцепторных взаимодействий обычно оценивают изменение интенсивности флуоресценции или времени жизни донора в присутствии акцептора и коэффициент усиления флуоресценции донора. В случае, когда спектры флуоресценции донора и акцептора энергии перекрываются, а возбуждение флуоресценции акцептора происходит в широком диапазоне длин волн, интенсивность регистрируемой флуоресценции можно описать уравнением:

$$I_{fl}^t = I_{fl}^{da} + AI_{fl}^a = K\varphi_{da}I_0(1 - 10^{-\varepsilon_d c_a l}) + AK\varphi_a I_0(1 - 10^{-\varepsilon_a c_a l}),$$

где I_{fl}^{da} - интенсивность флуоресценции донора в присутствии акцептора; I_{fl}^a - интенсивность флуоресценции акцептора; A - коэффициент усиления флуоресценции акцептора; K - инструментальная константа; I_0 - интенсивность возбуждающего света; φ_{da} - квантовый выход флуоресценции донора в присутствии акцептора; ε_d , - коэффициент

экстинкции донора; c_d , - молярная концентрация донора; l - длина оптического пути. Неизвестными параметрами уравнений являются φ_{da} и A , поэтому аналитическое решение уравнения невозможно. Следовательно, в случае перекрывания спектров флуоресценции донора и акцептора, оценка миграции энергии в рамках теории Фёрстера с помощью методов флуориметрии и тауметрии становится затруднительной. Именно к таким системам относятся фотосинтетические мембраны цианобактерий *Synechocystis sp.* PCC 6803, и её мутантов СК и PAL (см. рис. 1).

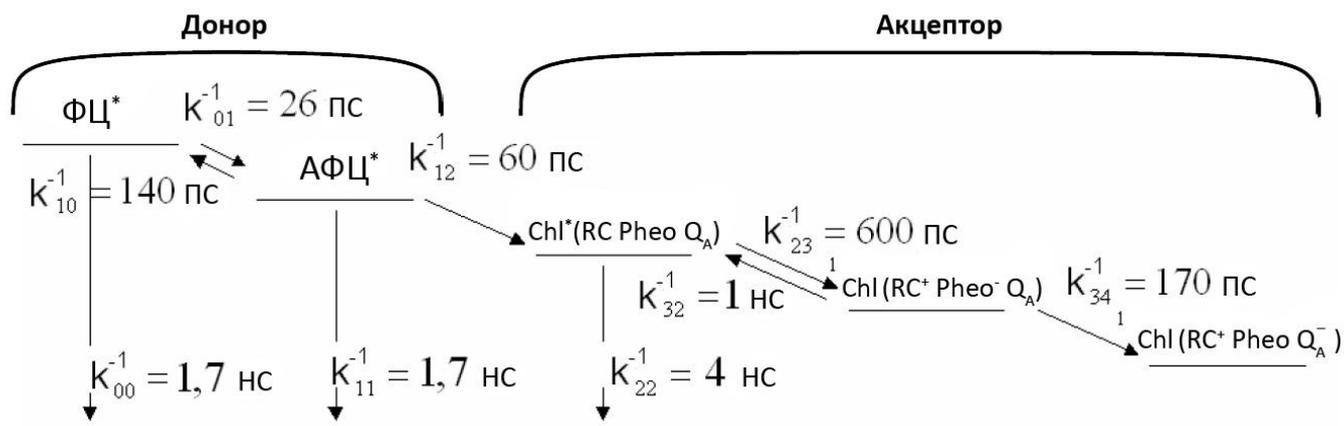


Рис. 2. Схема процессов преобразования энергии в антенных комплексах цианобактерии *Acaryochloris marina* (по F.-J. Schmitt et. al.).

Альтернативным подходом для оценки эффективности миграции энергии является анализ индукционных кривых флуоресценции. Известно, что рост интенсивности флуоресценции хлорофилла от минимального уровня F_0 до максимального F_m характеризует динамику накопления продуктов фотохимической реакции (Kautsky, 1931). Оценка миграции энергии возможна в приближении, когда константа флуоресценции акцептора и скорости фотохимической реакции не зависят от константы скорости миграции энергии, а захват энергии возбуждения осуществляется реакционными центрами (РЦ) ФС2 с эффективностью 100%. Тогда процесс миграции энергии от фикобилисом (донор – \mathbb{D}) к хлорофиллу (акцептор – \mathbb{A}) и затем к РЦ $[PQ]$ можно представить в виде схемы:



Скорость накопления состояния $P^+Q_A^-$ зависит от концентрации акцептора в возбужденном состоянии. Миграция энергии от донора к акцептору приводит к увеличению количества молекул акцептора в возбужденном состоянии, и, таким образом, к увеличению скорости образования фотопродуктов. Поскольку эффективное сечение

возбуждения флуоресценции σ непосредственно влияет на скорость восстановления Q_A при освещении (Falkowski, 1993), то в рамках данной модели коэффициент усиления флуоресценции A определяется отношением:

$$A = \frac{\sigma_{\Phi C2+\Phi BC}}{\sigma_{\Phi C2}} - 1,$$
 где $\sigma_{\Phi C2+\Phi BC}$ и $\sigma_{\Phi C2}$ – эффективные сечения возбуждения флуоресценции $\Phi C2$ в присутствии ΦBC и в отсутствии, соответственно.

Спектры поглощения цианобактерии *Synechocystis* 6803 и её мутантов с дефектами фикобилисом представлены на рис. 3. Для сравнения приведен спектр поглощения водоросли *Gloeobacter violaceus* sp., обладающей полным набором фикобилипротеинов.

Установлено, что спектры флуоресценции PAL-мутанта в области 640-720 нм (при возбуждении 400-600 нм) практически соответствуют спектрам флуоресценции хлорофилла *a*; у СК-мутанта наблюдается значительная флуоресценция АФЦ, а у дикого типа - ФЦ и АФЦ, однако, интенсивность флуоресценции фикобилисом дикого типа значительно ниже, чем таковая у мутанта $\Delta PSI/\Delta PSII$, лишённого $\Phi C1$ и $\Phi C2$. Если рассматривать *Synechocystis* 6803 и её мутантов в рамках теории Фёрстера, то флуоресценция PAL-мутанта соответствует флуоресценции акцептора (A) в отсутствие донора, мутант $\Delta PSI/\Delta PSII$ можно рассматривать как донор (D) в отсутствие акцептора, а дикий тип и мутант СК - как системы с разным соотношением A и D, в которых происходит перенос энергии.

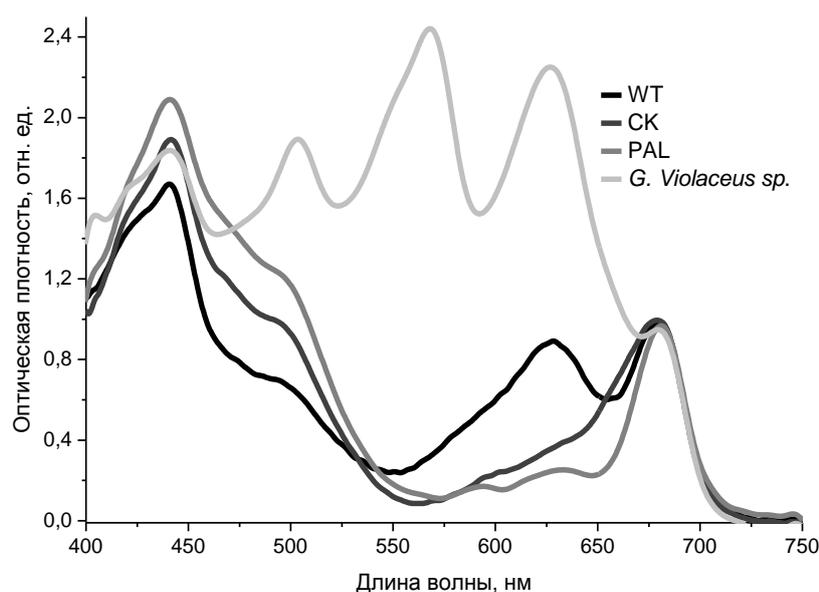


Рис. 3. Спектры поглощения клеток дикого типа *Synechocystis* sp. PCC 6803, мутанта СК, мутанта PAL и *Gloeobacter violaceus* sp. Спектры нормированы на поглощение при длине волны 680 нм (максимум поглощения хлорофилла *a*).

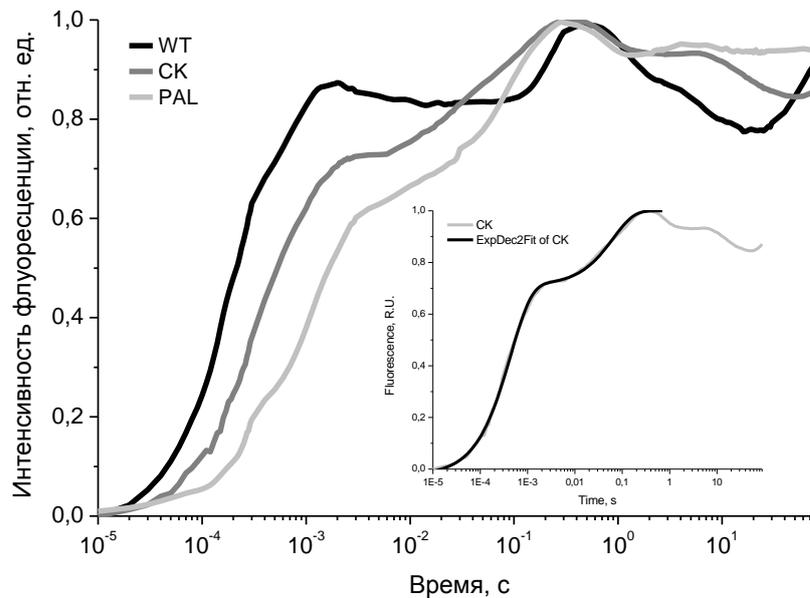


Рис. 4. Кривые индукции флуоресценции цианобактерии *Synechocystis* sp PCC6803 и мутантов CK и PAL, полученные с помощью прибора Handy-PEA (возбуждение 655 нм). Минимальное значение флуоресценции (F_0) принято равным нулю, максимальное (соответствующее F_m) равным единице. На вставке приведены результаты аппроксимации индукционной кривой суммой двух экспонент. Относительные погрешности определения τ_1 и τ_2 не превышают 2.4 и 5.9 %, соответственно.

Процедуру регистрации спектров поглощения, флуоресценции и индукций флуоресценции проводили на пяти культурах цианобактерий. Известно, что соотношение хлорофилл/фикобилина у *Synechocystis* 6803 может изменяться в широких пределах даже при строгом соблюдении условий культивирования (Ripka, 1979), поэтому усреднение результатов, полученных на разных культурах, невозможно. Однако, во всех экспериментах наблюдались одинаковые тенденции. По этой причине, далее мы иллюстрируем характерные результаты на примере экспериментов из одной серии. Экспериментальные кривые аппроксимировали суммой двух экспонент (рис. 4). Результаты анализа индукционных кривых флуоресценции представлены в таблице 1.

Таблица 1: Эффективные сечения возбуждения флуоресценции (σ) ФС2 в исследуемых образцах. Величины сечений возбуждения флуоресценции на длинах волн 455, 470, 589 и 655 нм рассчитаны по кривым индукции флуоресценции. Относительная погрешность не превышает 5 %.

Длина волны возбуждающего света, нм	455	470	589	655
$\sigma_{\text{ФС2}}^{\text{WT}}(\lambda), \text{\AA}^2$	210	65	263	896
$\sigma_{\text{ФС2}}^{\text{CK}}(\lambda), \text{\AA}^2$	175	65	67	220
$\sigma_{\text{ФС2}}^{\text{PAL}}(\lambda), \text{\AA}^2$	170	60	57	83

Коэффициенты усиления флуоресценции $A = \frac{\sigma_{\text{ФС2}} + \sigma_{\text{ФЕС}}}{\sigma_{\text{ФС2}}} - 1$, представлены в таблице №2.

Таблица 2. Коэффициенты усиления флуоресценции ФС2 за счет миграции энергии от светособирающих комплексов (АФЦ + ФЦ для WT, АФЦ для СК) по сравнению с мутантом PAL, лишенным фикобилипротеинов, при различных длинах волн возбуждающего света. Относительная погрешность не превышает 10 %.

Длина волны возбуждающего света, нм	455	470	589	655
$A^{PC+APC}(\lambda)$	0.24	0.08	3.61	9.73
$A^{PC}(\lambda)$	0.03	0.08	0.18	1.63

Увеличение эффективного сечения возбуждения флуоресценции ФС2 наблюдается только в областях спектра, соответствующих поглощению фикобилипротеинов (550 – 670 нм), присутствующих в ФБС цианобактерии, поэтому при возбуждении 470 нм $\sigma_{\text{ФС2}}$ практически не отличаются. Проведенный анализ свидетельствует, что присутствие АФЦ повышает эффективность светосбора реакционными центрами ФС2 в 2.6 раз, а комбинация АФЦ и ФЦ в фикобилисомах увеличивает эффективное сечение возбуждения ФС2 и коэффициент усиления флуоресценции хлорофилла практически на порядок.

Расчет коэффициента усиления флуоресценции ФС2 позволяет, выполнив анализ спектров флуоресценции, получить оценку квантового выхода флуоресценции донора энергии (ФБС) в присутствии акцептора (ФС2) φ_{da} и, соответственно, определить эффективность миграции энергии от донора к акцептору как функцию тушения флуоресценции донора: $E_t = 1 - \frac{\varphi_{da}}{\varphi_d}$, где φ_d - интенсивность флуоресценции донора, φ_{da} - интенсивность флуоресценции донора в присутствии акцептора. Для определения φ_d исследовали оптические свойства мутантов $\Delta\text{PSI}/\Delta\text{PSII}$, лишенных ФС1 и ФС2, т.е. не содержащих акцепторов энергии, и, в тоже время, имеющих набор фикобилипротеинов, необходимых для сборки ФБС. Анализ спектров флуоресценции дикого типа, мутантов $\Delta\text{PSI}/\Delta\text{PSII}$ и PAL позволил оценить тушение флуоресценции ФБС в присутствии ФС2. Значение E_t в данном случае соответствует эффективности миграции энергии и составляет примерно 95 %. Анализ кинетики затухания флуоресценции ФБС мутанта $\Delta\text{PSI}/\Delta\text{PSII}$ позволил определить время жизни флуоресценции t_m , которое составило 1.83 ± 0.1 нс. Эти оценки позволяют вычислить константу скорости миграции энергии $k_\tau = \frac{E_t}{t_m(1-E_t)}$, значение которой составило $1.04 \cdot 10^{10} \text{ c}^{-1}$.

Таким образом, эффективное сечение возбуждения флуоресценции хлорофилла ФС2 увеличивается с 83 ± 4 до $896 \pm 27 \text{ \AA}^2$ за счет миграции энергии возбуждения от природных

антенных комплексов – фикобилисом к ФС2, что приводит к десятикратному усилению интенсивности флуоресценции хлорофилла.

2. Исследование миграции энергии в гибридных системах из КТ и природных пигмент-белковых комплексов

Водорастворимый белок фикоэритрин (ФЭ) выполняет функцию светосборщика в природных антенных комплексах фотосинтеза - фикобилисомах, поглощая свет в области 450 - 570 нм и эффективно передавая энергию электронного возбуждения на другие фикобилипротеины. В водной среде свободный ФЭ агрегирует, образуя гексамеры в форме диска диаметром 11.5 нм и толщиной 6 нм; в центре диска имеется отверстие диаметром около 3.5 нм (Bryant, 2010). В состав ядра ФС2 входят белки D1, D2, cp43, cp47 и кислородвыделяющий комплекс. Каждый комплекс ФС2 содержит ~ 50 молекул хлорофилла и сохраняет способность к фотоиндуцируемому выделению кислорода (Ramesh, 1997). Описанные комплексы являются наименьшими по размеру антенными частицами фотосинтетической единицы, обладающими характерной индукцией флуоресценции хлорофилла.

По сути, фикоэритрин и ядерные комплексы ФС2 представляют собой природные мезоскопические наноструктуры. Именно поэтому они подходят для модельных экспериментов в качестве акцептора энергии возбуждения КТ. Функциональные группы органической оболочки КТ (COO^-), доступные для электростатических взаимодействий с положительно заряженными аминокислотными остатками, обеспечивают самоорганизацию гибридных структур (Mattoussi, 2009).

Из спектров флуоресценции КТ и спектров поглощения природных ПБК (рис. 5) нами были рассчитаны соответствующие интегралы перекрытия: $I = \int_0^\infty F_d(\lambda)\varepsilon_a(\lambda)\lambda^4 d\lambda$, где $F_d(\lambda)$ - нормированный спектр флуоресценции донора, $\varepsilon_a(\lambda)$ - молярный коэффициент экстинкции акцептора, λ - длина волны. Фёрстеровский радиус переноса энергии от КТ к ПБК был вычислен из соотношения $R_0 = \sqrt[6]{8,8 \times 10^{-25}(k^2n^{-4}\varphi_d I)}$, где φ_d - квантовый выход донора в отсутствие акцептора, n — показатель преломления среды, k^2 - ориентационный фактор, который считали равным 2/3. Полученное значение R_0 для системы КТ 530 – фикоэритрин составило 78.5 Å, для системы КТ 630 – ядерный комплекс ФС2 R_0 равен 52.3 Å. Очевидно, что для обеспечения переноса энергии с КТ на ПБК

необходимо либо сближение в растворе молекул донора и акцептора на расстояния порядка R_0 , либо образование устойчивых гибридных комплексов белок – КТ.

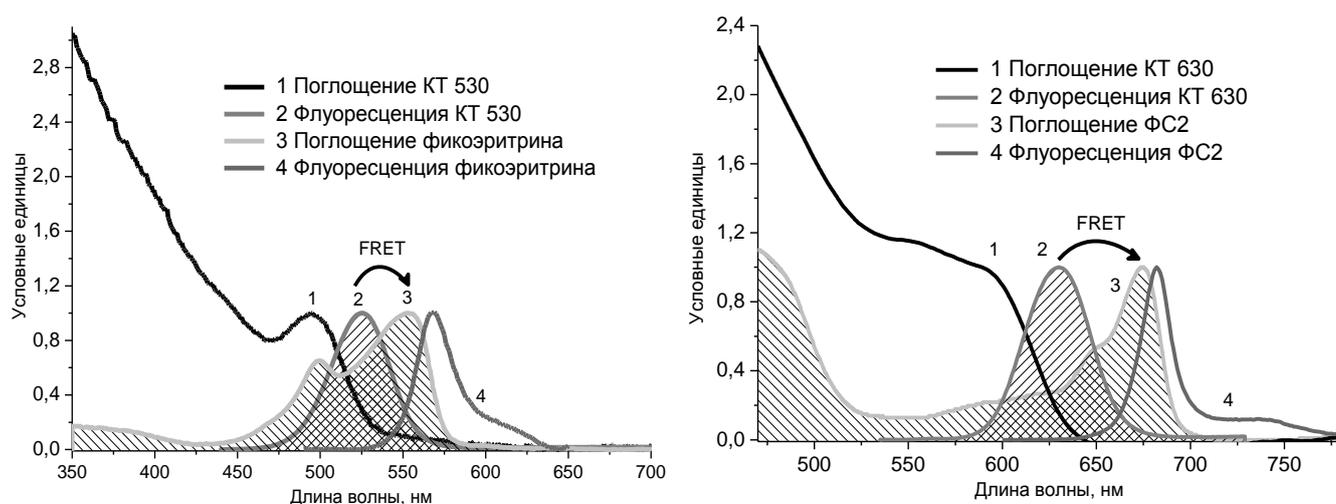


Рис. 5. Слева: спектры поглощения и флуоресценции фикоэритрина и КТ 530, справа: поглощение и флуоресценция ядерных комплексов ФС2 и КТ 630. Спектры нормированы на соответствующие значения интенсивностей максимумов поглощения/флуоресценции. Максимальное значение относительной погрешности не превышает 3 %.

При добавлении белков к раствору КТ наблюдаются изменения, характерные для донорно-акцепторных взаимодействий – увеличение интенсивности флуоресценции ПБК и снижение интенсивности собственной флуоресценции КТ. Каждый эксперимент повторяли не менее пяти раз. Рассчитывали средние значения измеряемых величин, дисперсии и соответствующие коэффициенты вариации, которые не превышали 7 - 9% (рис. 6, слева).

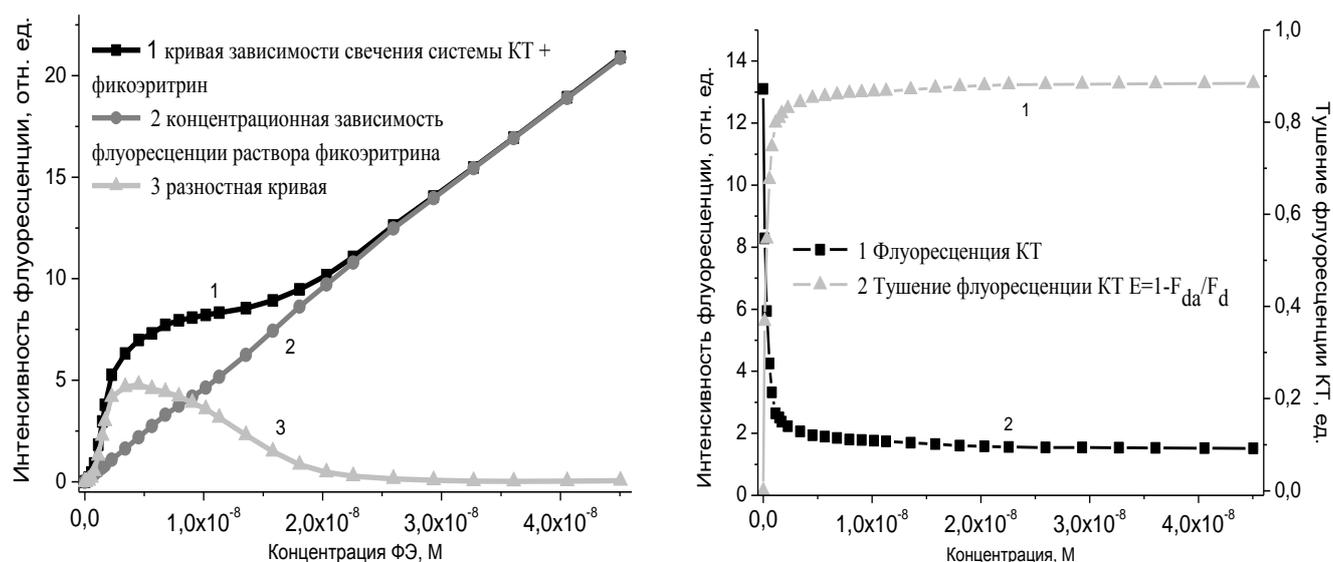


Рис. 6. Слева: изменение интенсивности свечения в полосе 570 нм (максимум в спектре флуоресценции ФЭ) от концентрации фикоэритрина. Возбуждение флуоресценции 266 нм. Справа: зависимость интенсивности флуоресценции КТ и тушения флуоресценции КТ от концентрации акцептора ФЭ. Кривая $E = 1 - F_{da}/F_d$ рассчитана из изменений интенсивности полосы

530 нм (максимум флуоресценции КТ). Максимальная относительная погрешность не превышала 5 %.

Тушение флуоресценции КТ при добавлении повышающихся концентраций ФЭ рассчитывали по формуле $E_t = 1 - \frac{F_{da}}{F_d} \eta$, где F_d - относительный квантовый выход флуоресценции донора, F_{da} - относительный квантовый выход донора в присутствии акцептора энергии, η - коэффициент коррекции: $\eta = \frac{A_{ex}^d A_{em}^d (1 - 10^{-A_{ex}^a}) (1 - 10^{-A_{em}^a})}{A_{ex}^a A_{em}^a (1 - 10^{-A_{ex}^d}) (1 - 10^{-A_{em}^d})}$, где A_{ex}^d, A_{ex}^a - поглощение акцептора и донора на длине волны возбуждения, A_{em}^d, A_{em}^a - поглощение акцептора и донора на длине волны регистрации сигнала флуоресценции (Borissevitch, 1997). Значение параметра E_t достигает 88 % для пары КТ 530 – ФЭ (рис. 6, справа), аналогичный параметр для пары КТ 630 – ФС2 достигает 65 % (данные не приведены).

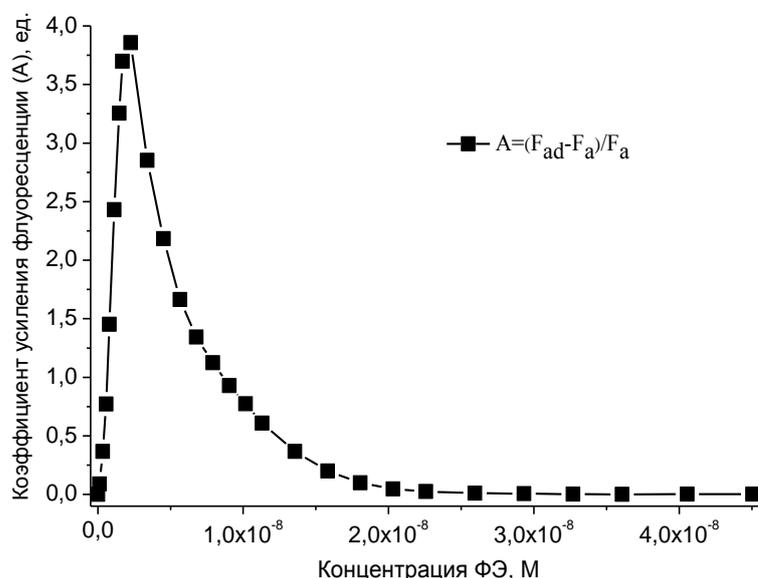


Рис. 7. Коэффициент усиления флуоресценции фикоэритрина при добавлении КТ Y530. Рассчитан по данным рис.6 (левая часть). Максимальное значение относительной погрешности не превышает 12 %.

Как известно, в исследуемых системах могут наблюдаться два типа тушения флуоресценции КТ – статическое и динамическое. Доказательством миграции энергии служит увеличение интенсивности флуоресценции акцептора энергии: $A = \frac{F_{ad} - F_a}{F_a}$, где F_a - относительный квантовый выход акцептора, F_{ad} - относительный квантовый выход акцептора в присутствии донора. Было установлено, что при оптимальном соотношении концентраций КТ и ФЭ интенсивность флуоресценции акцептора усиливается почти на 400 % ($A = 3.89 \pm 0.3$, рис. 7). Значение коэффициента усиления флуоресценции A ядерных комплексов при образовании гибридных комплексов с КТ 630 достигало 0.65 (по данным представленным на рис.8).

Как видно из рис. 7, коэффициент усиления достигает максимального значения, и, затем, уменьшается до нуля, когда концентрация акцепторных хромофорных групп ФЭ в 8-10 раз превышает концентрацию КТ. Возможно, после достижения оптимального соотношения КТ/ФЭ, дальнейшее увеличение концентрации белка приводит к экранированию КТ. В результате снижается доля энергии, поглощаемой непосредственно КТ и затем мигрирующей к ФЭ. Действительно, при высоких концентрациях белка в спектре возбуждения флуоресценции ФЭ вклад от КТ не выявлен (данные не представлены).

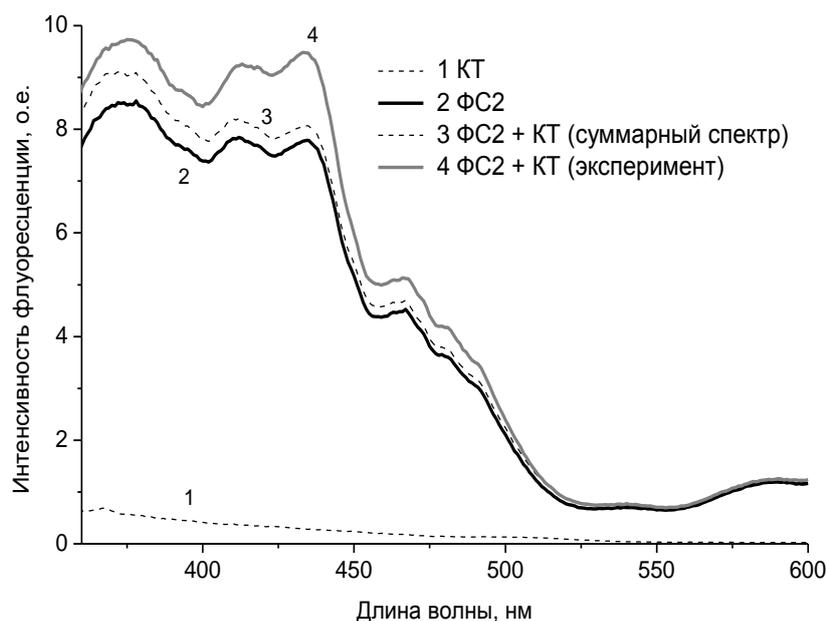


Рис. 8. Спектры возбуждения флуоресценции растворов КТ, ядерных комплексов ФС2, гибридных комплексов КТ R630 и ядерных комплексов ФС2. Для сравнения приведена сумма спектров возбуждения растворов квантовых точек и ядерных комплексов ФС2. Флуоресценцию регистрировали при 685 нм.

Сокращение $\tau_{\text{фл}}$ донора и увеличение $\tau_{\text{фл}}$ акцептора являются характерными отличиями динамического тушения флуоресценции от статического (Вавилов, 1940). Поэтому измерение времени жизни флуоресценции необходимо для определения механизма тушения и вычисления эффективности миграции энергии. Были выполнены эксперименты по измерению длительности флуоресценции КТ, ФЭ и их гибридных комплексов (рис. 9). Кинетики аппроксимировали суммой двух экспонент. Среднее время жизни флуоресценции рассчитывали по формуле: $\tau_{\text{av}} = \frac{\tau_1 a_1 + \tau_2 a_2}{a_1 + a_2}$, где τ_i – длительность, a_i – амплитуда i компоненты кинетики затухания флуоресценции. Относительная погрешность определения τ_{av} не превышает 5.4 %.

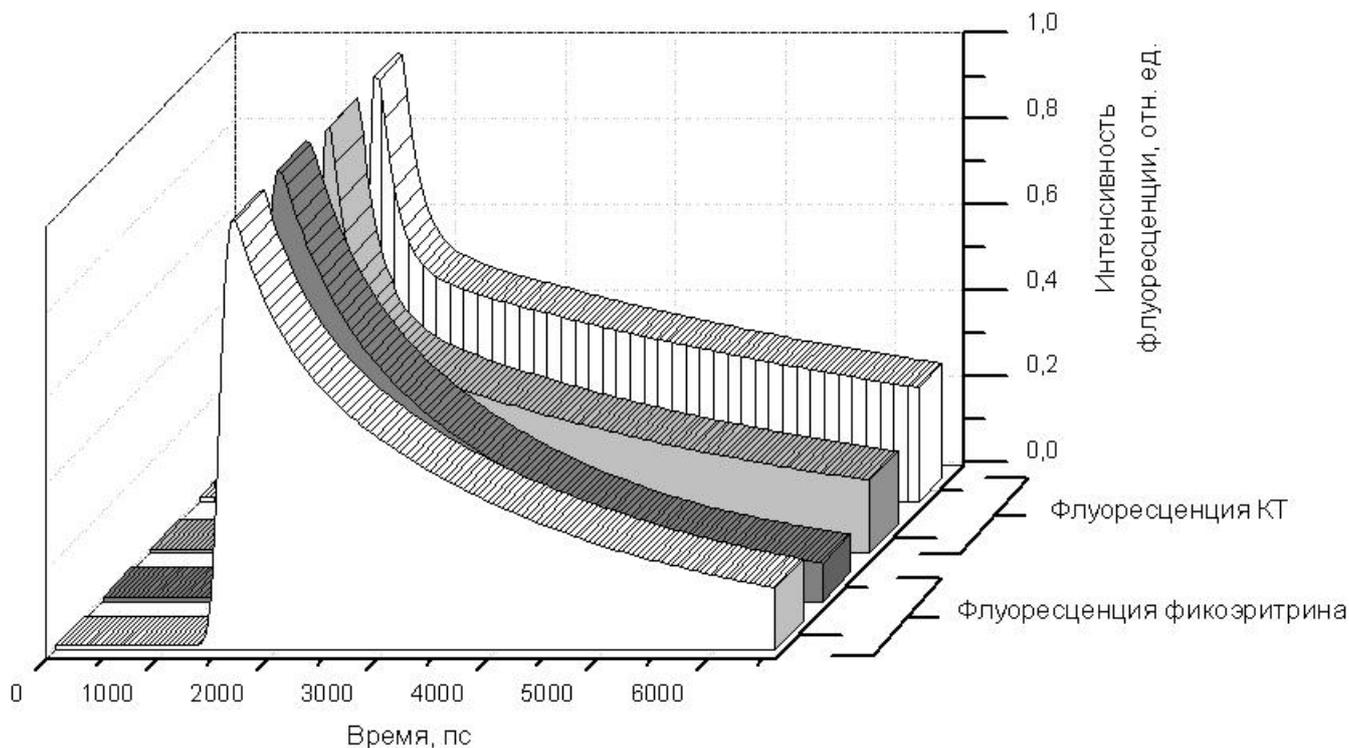


Рис. 9. Кинетики затухания флуоресценции квантовых точек, фикоэритрина, а также их гибридных комплексов. $\lambda_{\text{возб}} = 266$ нм, $\Delta t_{\text{имп}} = 50$ пс. Область наблюдения 530 нм (максимум эмиссии КТ): $\square\square\square\square$ КТ 530, \blacksquare КТ 530 + фикоэритрин. Область наблюдения 570 нм (максимум эмиссии фикоэритрина): \blacksquare фикоэритрин, \square КТ 530 + фикоэритрин. Сигнал флуоресценции квантовых точек и фикоэритрина разделяли с помощью граничных светофильтров. Интенсивности флуоресценции нормированы на соответствующие максимальные значения.

Установлено, что при образовании гибридных структур, состоящих из КТ и ФЭ, t_m КТ сокращается от 6.9 ± 0.3 до 4.1 ± 0.2 нс, при этом τ_{av} ФЭ увеличивается от 2.0 ± 0.1 до 2.7 ± 0.1 нс. Эффективность миграции энергии, вычисленная по формуле $E_a = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d} \eta$, составляет 35 %. Поскольку полное тушение E_t флуоресценции КТ достигает 88 %, то вклад статического тушения равен 53 %. Константа скорости переноса $k_\tau = \frac{E_a}{\tau_{av}(1-E_a)}$ при максимальном значении E_a достигает $8.39 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$.

Исследование индукционных кривых флуоресценции ФС2 показывает, что добавление КТ приводит к увеличению скорости нарастания интенсивности флуоресценции ФС2 (рис. 10), т.е. скорости восстановления первичных акцепторов. Начальные участки индукционных кривых аппроксимировали суммой двух экспонент (рис. 10). Таким образом, были получены значения времен τ_1 , характеризующие скорость восстановления первичного акцептора электрона. Затем, по формуле $\sigma_{\text{ФС2}} = \frac{1}{\tau_1 I_0}$, рассчитывали эффективные сечения возбуждения флуоресценции ФС2 при длине волны возбуждения 455 нм.

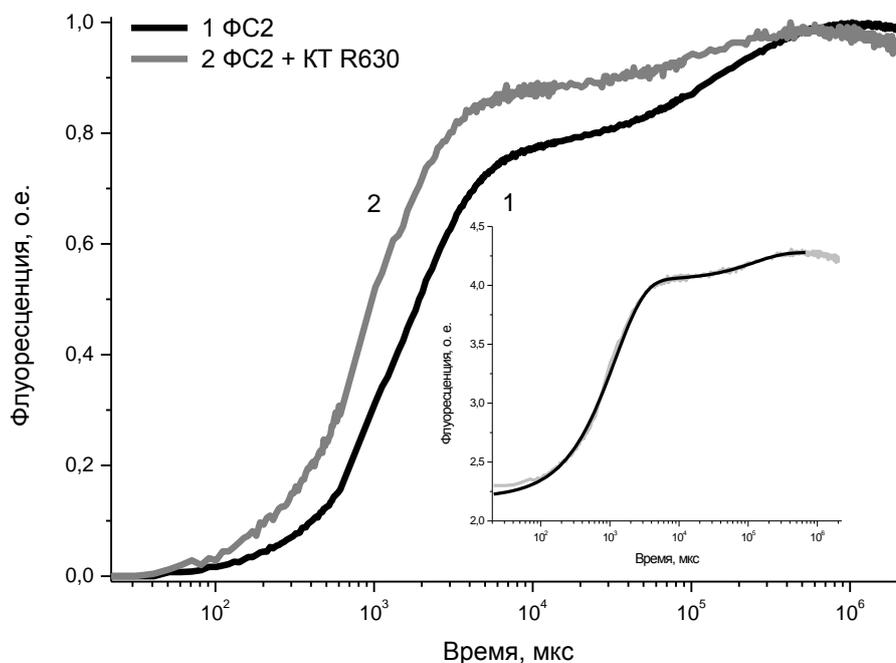


Рис. 10. Кривые индукции флуоресценции комплексов ядра ФС2 и гибридных систем из ФС2 и КТ R630. Возбуждение 455 нм, 1500 мкЭ. На вставке результаты аппроксимации индукционной кривой суммой двух экспонент. Относительные погрешности определения τ_1 и τ_2 не превышают 3.2 и 7.1 %, соответственно.

Экспериментально установлено, что эффективное сечение возбуждения флуоресценции комплексов ядра ФС2 составляет $160 \pm 5 \text{ \AA}^2$ при 455 нм, добавление КТ приводит к увеличению $\sigma_{\text{ФС2}}$ до $247 \pm 8 \text{ \AA}^2$. Таким образом, значение коэффициента усиления флуоресценции ФС2, рассчитанное с помощью формулы: $A = \frac{\sigma_{\text{ФС2+КТ}}}{\sigma_{\text{ФС2}}} - 1$, равно 0.64 ± 0.04 , что хорошо соответствует значениям A , полученным при анализе спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции.

Оценка коэффициентов усиления флуоресценции позволила сравнить эффективность светосбора фикобилипротеинов и гибридных светособирающих комплексов. Как отмечалось выше, коэффициент усиления флуоресценции ФС2 за счет АФЦ варьирует от 0.2 до 1.63 в зависимости от длины волны возбуждающего света, соответствующий коэффициент для пары КТ - ФС2 равен 0.64 ± 0.04 . Данные, представленные в таблице 2, позволяют оценить коэффициент усиления флуоресценции комплекса ФС2 – АФЦ за счет ФЦ, величина которого составляет 5,9. Значение коэффициента усиления флуоресценции ФЭ за счет КТ достигает 3,9. Итак, КТ практически не уступают природным светосборщикам по коэффициентам усиления флуоресценции акцептора. Очевидно, это объясняется большими, по сравнению с природными антенными комплексами, расстояниями между донором и акцептором энергии и, возможно, слабыми электростатическими взаимодействиями между КТ и ПБК.

3. Влияние температуры на процессы миграции энергии в природных светосборщиках и в гибридных комплексах

Для изучения зависимости эффективности миграции энергии от температуры в гибридных системах ФБС цианобактерии *A. marina* (максимум флуоресценции при 660 нм) инкубировали с КТ 530 (см. рис. 1). Кинетики затухания флуоресценции регистрировали в диапазоне 500 – 700 нм с помощью метода счета фотонов.

Увеличение скорости затухания флуоресценции КТ (рис. 11, слева) и рост интенсивности флуоресценции ФБС (см. раздел 3.3.2 диссертации) свидетельствуют о тушении флуоресценции КТ за счет высокоэффективного переноса энергии возбуждения к ФБС *A. marina*. Как известно, в результате переноса энергии от донора к акцептору, время жизни флуоресценции акцептора увеличивается. В данном эксперименте, напротив, наблюдается некоторое сокращение времени жизни флуоресценции ФБС в присутствии КТ за счет увеличения вклада быстрых компонент кинетики (см. рис. 11 справа и рис. 12 слева), что, вероятно, обусловлено изменением колебательных взаимодействий молекул хромофоров и белковой матрицы в гибридных комплексах ФБС-КТ, по сравнению с природными ФБС.

Среднее время жизни флуоресценции КТ в отсутствие ФБС τ_d оказалось около 1.1 ± 0.1 нс. После добавления ФБС эта величина снизилась до $\tau_{da} = 230 \pm 20$ пс. Таким образом, эффективность миграции энергии, рассчитанная по формуле $E_a = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d}$, составляет 0.78, соответствующее значение константы скорости миграции энергии k_τ достигает $3.22 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$.

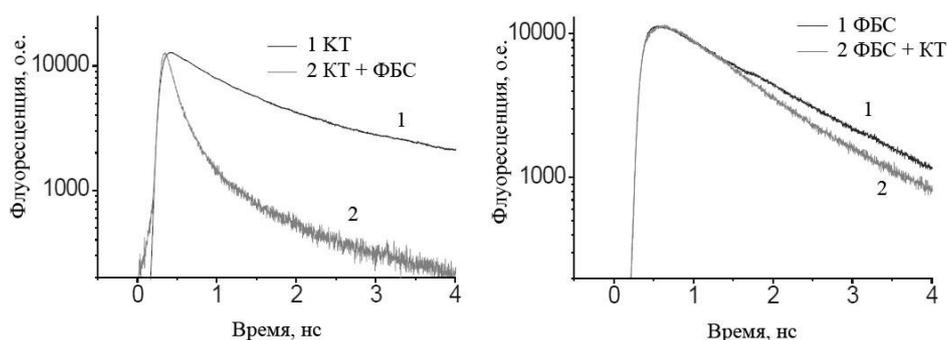


Рис. 11. Слева: кинетики затухания флуоресценции КТ на длине волны 530 нм после возбуждения лазерными импульсами (405 нм, 60 пс) при комнатной температуре в отсутствие (1) и в присутствии (2) ФБС *A. marina*. Справа: кинетики затухания флуоресценции ФБС на длине волны 660 нм при комнатной температуре в отсутствие (1) и в присутствии (2) КТ. Кинетики нормированы.

Важная информация о миграции энергии в исследуемых комплексах была получена при регистрации кинетик затухания флуоресценции с помощью метода «глобального анализа».

Набор из 16 кинетик затухания флуоресценции в спектральном диапазоне 500 - 700 нм аппроксимировали суммой экспонент с фиксированными значениями времен τ_i , результаты аппроксимации использовали для построения зависимости предэкспоненциального фактора $A_i(\lambda)$ от длины волны (decay associated spectra – DAS – спектрального распределения компонент кинетики).

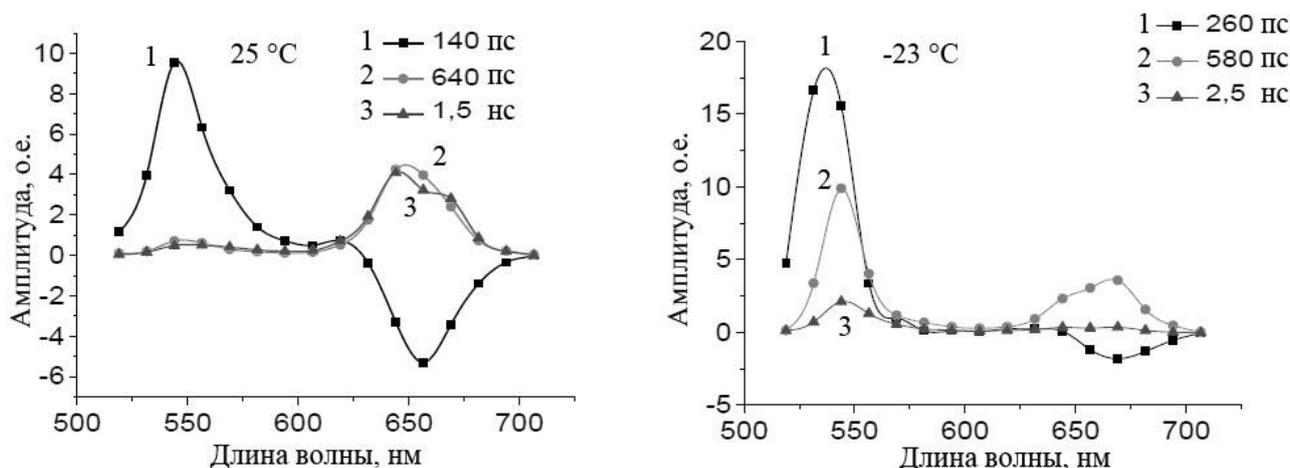


Рис. 12. Спектральное распределение компонент кинетики затухания флуоресценции (DAS) гибридной системы из квантовых точек и ФБС *A.marina* при возбуждении 405 нм при комнатной температуре (25 °C, слева) и -23 °C (справа).

На рисунке 12 представлены кинетики DAS гибридной системы КТ-ФБС при комнатной температуре (слева) и при -23 °C (справа). В обоих случаях для фитирования кинетик затухания флуоресценции использовали трехэкспоненциальную модель. При комнатной температуре кинетика представлена компонентами с временами 140 пс (кривая 1), 640 пс (кривая 2) и 1.5 нс (кривая 3). Спектр компоненты 140 пс характеризуется положительной полосой при 530 нм и отрицательной в области флуоресценции ФБС при 660 нм. Это свидетельствует о том, что миграция энергии от КТ к ФБС происходит в течение 140 пс. Амплитуды компонент с временами более 140 пс не превышали 10 % в области флуоресценции КТ, следовательно, более 90% всех КТ передает энергию на ФБС. Полученные времена затухания флуоресценции ФБС, равные 1.5 нс, хорошо согласуются с литературными данными (Vermaas, 1991), а дополнительный компонент с временем 640 пс, вероятно, характеризует ФБС с измененной конформацией хромофора.

При -23 °C спектральное распределение компонент кинетики флуоресценции заметно изменяется (рис. 12, справа). Были обнаружены три компоненты: с временами 250 пс (кривая 1), 580 пс (кривая 2) и 2.5 нс (кривая 3). Амплитуды отрицательных компонент в области флуоресценции ФБС (660 нм) значительно снижены по сравнению с таковыми при 25 °C, что свидетельствует о нарушении переноса энергии от КТ к ФБС при температурах

ниже точки заморзания воды. Большая, по сравнению с комнатной температурой, амплитуда компоненты с временем 580 пс (кривая 2) в области излучения ФБС (660 нм), вероятно, свидетельствует об увеличении количества ФБС с нарушенной конформацией.

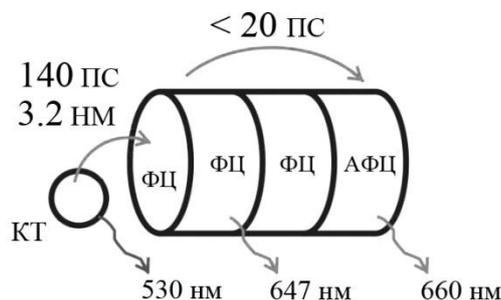


Рис. 13. Схема переноса энергии в гибридных системах, состоящих из CdSe/ZnS квантовых точек и ФБС из *A.marina*. КТ, флуоресцирующие при 530 нм, передают энергию возбуждения на ФБС за время порядка 140 пс. Возбуждение распространяется по ФБС за времена порядка 20 пс. Максимумы в спектре флуоресценции ФБС - 647 и 660 нм соответствуют фикоцианину (ФЦ) и аллофикоцианину (АФЦ).

Таким образом, в гибридных комплексах перенос энергии от КТ к ФБС прекращается при температурах ниже температуры заморзания растворителя. Вероятно, это можно объяснить нарушением слабых электростатических взаимодействий КТ и ПБК.

Для изучения влияния температуры на эффективность миграции энергии исследовали кинетики затухания флуоресценции Δ PS1/PS2 мутанта *Synechocystis* 6803 (см. рис. 1). Оказалось, что при замораживании миграция энергии в нативных антенных комплексах не только не прекращается, но и наблюдается увеличение её эффективности.

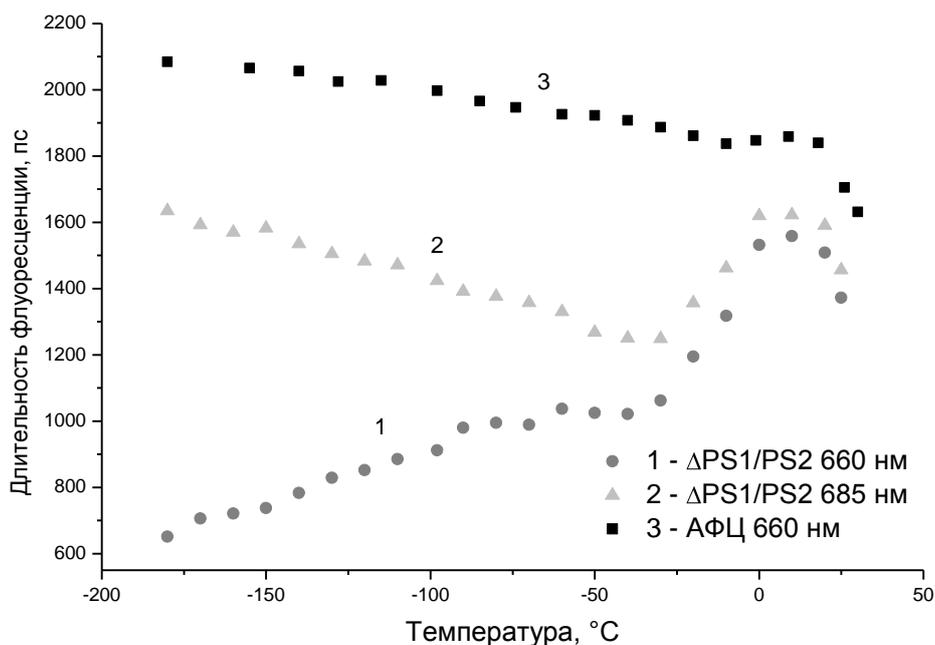


Рис. 14. Изменение среднего времени жизни флуоресценции аллофикоцианина (кривая 1) и терминальных эмиттеров (кривая 2) Δ PS1/PS2 мутанта *Synechocystis* 6803 при размораживании после быстрого замораживания. Для сравнения приведена аналогичная зависимость для АФЦ в растворе (кривая 3). Максимальное значение относительной погрешности не превышает 6.7 %.

Как следует из рисунка 14, быстрое замораживание приводит к сокращению среднего времени жизни флуоресценции аллофикоцианина $\Delta PS1/PS2$ мутанта *Synechocystis* 6803 в канале 660 нм (максимум флуоресценции АФЦ) в широком диапазоне температур, и, одновременно, к росту времени жизни флуоресценции в канале, соответствующем флуоресценции концевых эмиттеров (685 нм). Таким образом, наблюдаемое тушение флуоресценции АФЦ и увеличение $\tau_{\phi л}$ концевых эмиттеров при понижении температуры свидетельствует об увеличении эффективности миграции энергии от АФЦ к концевым эмиттерам. Полученные данные наглядно свидетельствуют о различии температурных зависимостей времени жизни флуоресценции АФЦ в фикобилисомах и в растворе (см. рис. 14, кривая 1 и 3, соответственно). Известно, что в фикобилисомах $\Delta PS1/PS2$ мутанта присутствует оранжевый каротин-протеин (ОСР) (Kirilovsky, 2008), который является тушителем флуоресценции ФБС. Вероятно, сокращение времен жизни флуоресценции АФЦ в составе фикобилисом, по сравнению с АФЦ в растворе, обусловлено взаимодействием ОСР и ФБС.

4. Температурная зависимость времени жизни флуоресценции аллофикоцианина

При комнатной температуре время жизни флуоресценции АФЦ τ_{av} известно и составляет 1600 ± 200 пс (Barber, 1977). Нами показано, что при быстром замораживании раствора АФЦ с понижением температуры наблюдается увеличение времени жизни флуоресценции до 2100 ± 50 пс при -180 °С (см. рис. 15, левая часть). Последующее размораживание образца приводит к уменьшению τ_{av} с ростом температуры до исходной (1630 ± 24 пс) величины.

Температурная зависимость длительности флуоресценции АФЦ может быть разделена на три участка, (рис. 15): от $+30$ до $+4$ °С – снижение температуры приводит к увеличению τ_{av} от 1.6 до 1.8 нс, как при быстром, так и при медленном замораживании; от $+4$ до -15 °С – снижение температуры приводит к сокращению τ_{av} – незначительному при быстром и до 0.6 нс при медленном замораживании; от -15 до -192 °С – снижение температуры приводит к плавному увеличению τ_{av} , примерно на 0.2 нс. Показано, что при быстром замораживании с ростом τ_{av} наблюдается плавное уменьшение полуширины спектра флуоресценции АФЦ $\Delta\lambda_{\phi л}$ (рис. 15, справа). При медленном замораживании направление изменений $\Delta\lambda_{\phi л}$ противоположно таковому для τ_{av} . Рассчитанные коэффициенты корреляции температурных зависимостей τ_{av} и $\Delta\lambda_{\phi л}$ при быстром и медленном замораживании составили -0.89 и -0.91 .

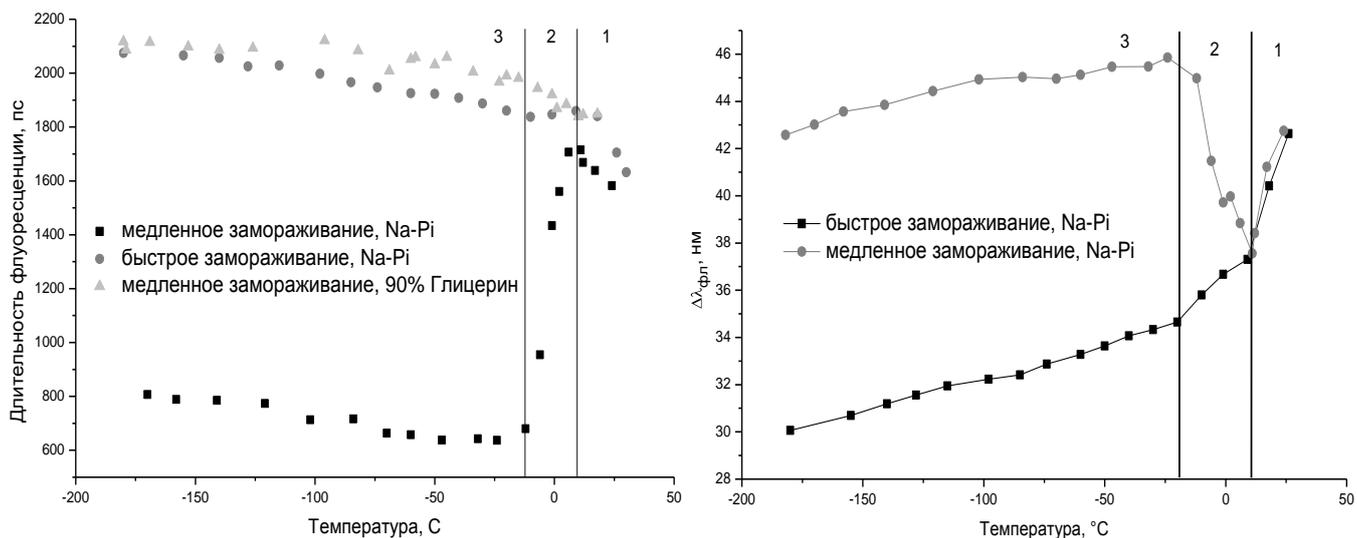


Рис. 15. Влияние скорости замораживания и растворителя на среднее время жизни флуоресценции АФЦ при $\lambda=660$ нм (слева) и полуширину спектра флуоресценции (справа). Черные квадраты – медленное замораживание, Na-Pi буфер pH 7,0. Темно серые круги – быстрое замораживание, Na-Pi буфер pH 7,0. Светло-серые треугольники – медленное замораживание в 90% глицерине.

Увеличение τ_{av} на участках 1 и 3 при понижении температуры, вероятно, связано со снижением заселенности верхних колебательных уровней АФЦ. Наибольший интерес имеет изменение τ_{av} на участке 2 температурной зависимости при медленном замораживании образца. Именно в этом диапазоне температур происходит фазовый переход «лед-вода». Замена растворителя на 90 % глицерин или высушивание образца приводили к тому, что скорость замораживания переставала влиять на форму графика температурной зависимости, а именно - исчезало характерное для участка 2 сокращение τ_{av} .

Для выяснения механизмов наблюдаемой температурной зависимости длительности флуоресценции аллофиикоцианина от скорости замораживания исследовали флуоресценцию АФЦ, денатурированного 8 М раствором мочевины при pH 2.0. Концентрированный раствор мочевины является растворителем, в котором боковым группам полимерной цепи энергетически выгоднее взаимодействовать с молекулами растворителя, чем друг с другом. Поэтому в таких условиях происходит переход «глобула – клубок» (Финкельштейн, 2005). Известно, что при денатурации апопротеина хромофор фикоцианобилин переходит из линейной формы в скрученную, что сопровождается многократным сокращением квантового выхода флуоресценции АФЦ (Scheer, 2007).

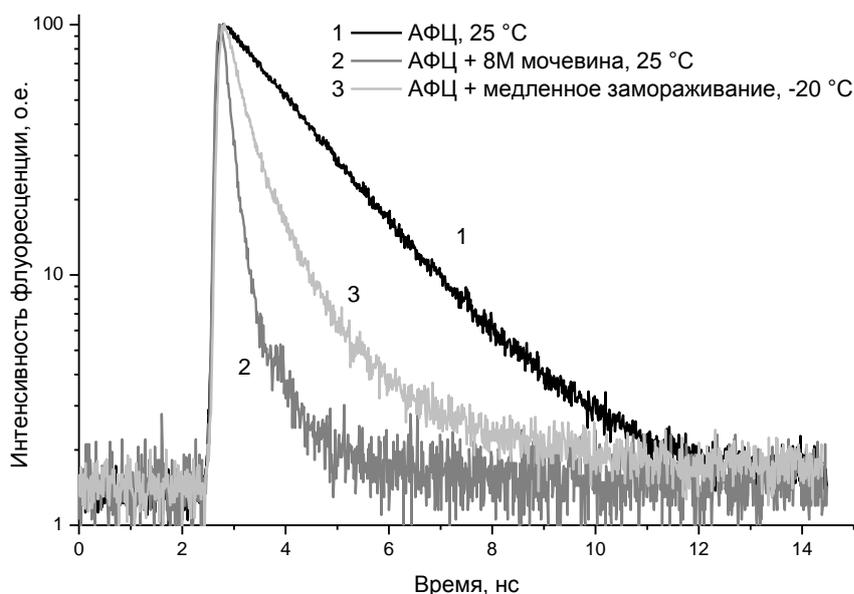


Рис. 16. Кинетики затухания флуоресценции нативного (кривая 1) аллофикоцианина и денатурированного в 8 М растворе мочевины при рН 2,0 (2) при комнатной температуре. Для сравнения представлена кинетика затухания флуоресценции АФЦ при медленном замораживании при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3). Кинетики нормированы.

На рис. 16. представлена характерная кинетика затухания флуоресценции тримеров АФЦ в Na-Pi буфере. Как отмечалось ранее, время жизни флуоресценции нативного АФЦ τ_{av} составляет 1630 ± 24 пс при комнатной температуре. Денатурация АФЦ приводит к снижению значения τ_{av} до 290 ± 17 пс. Медленное замораживание (кривая 2), также как и денатурация (кривая 3), приводит к сокращению длительности флуоресценции АФЦ. В случае, представленном на рис. 12, τ_{av} , АФЦ составляет 630 ± 21 пс.

По-видимому, медленное замораживание вызывает обратимое изменение конформации апопротеина АФЦ, которое приводит к изменению конформации хромофора. Существует несколько процессов, которые могут приводить к изменению конформации белковой части АФЦ. Во-первых, гидрофобные взаимодействия значительно ослабевают при снижении температуры. Происходящее при этом разрыхление нативной структуры белка приводит к появлению новых колебательных степеней свободы. Этим, вероятно, можно объяснить наблюдаемое уширение спектра флуоресценции АФЦ. Во-вторых, при медленном замораживании образуются крупные кристаллы льда. Возникновение такого кристалла во внутренней полости тримера АФЦ приводит к изменению геометрии белка и, как следствие, к изменению конформации хромофоров. Тепловые эффекты, сопровождающие эти перестройки, весьма малы, что характерно для структур, в которых изменение даже небольшого числа связей-фиксаторов влечет перестройку системы в целом (Чернавский, 1999). С этой точки зрения, фазовый переход воды может сопровождаться разрывом

небольшого количества водородных связей, фиксирующих α -спирали в структуре АФЦ относительно друг друга. В результате происходит изменение конформации хромофора, сопровождающееся резким изменением квантового выхода и времени жизни флуоресценции молекулы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью диссертационной работы было сравнение процессов миграции энергии в нативных антенных комплексах цианобактерий и в гибридных системах, состоящих из полупроводниковых квантовых точек и природных ПБК.

Определение эффективных сечений возбуждения флуоресценции позволило описать перенос энергии от ФБС к ФС2 в рамках теории Ферстера. Установлено, что аллофикиоцианин увеличивает эффективное сечение возбуждения флуоресценции ФС2 в 2.6 раз, а сочетание аллофикиоцианина и фикоцианина позволяет увеличить этот параметр на порядок. Показано, что метод световой индукции флуоресценции хлорофилла подходит для оценки донорно-акцепторных взаимодействий в гибридных системах, таких как КТ-ФС2. Сравнительный анализ полученных характеристик природных и гибридных антенных комплексов представлен в таблице 3.

Таблица 3. Сравнение характеристик антенных комплексов из нативных ПБК и полупроводниковых квантовых точек.

	Нативные антенные комплексы	Гибридные антенные комплексы
Расстояние между донором и акцептором	1-3 нм	3-8 нм
Максимальное значение эффективности миграции энергии	95 %	78 %
Максимальное значение коэффициента усиления флуоресценции акцептора	5.9	3.9
Константа скорости миграции энергии, с^{-1}	$1.02 \cdot 10^{10}$	$3.22 \cdot 10^9$
При температурах ниже температуры замерзания растворителя	Эффективность миграции энергии увеличивается на 15%	Нарушается связь между КТ и ПБК

Итак, квантовые точки практически не уступают фикобилипротеинам по величине коэффициента усиления флуоресценции акцептора энергии. Это позволяет рассматривать

квантовые точки как перспективные флуоресцентные зонды, которые могут быть использованы для создания гибридных структур с целью изучения процессов миграции энергии или создания гибридных фотопреобразователей энергии. Очевидно, что для увеличения эффективности миграции энергии в гибридных комплексах необходимо получить структуры, в которых КТ и ПБК находятся на малых расстояниях друг от друга, например, связаны ковалентно.

Показано, что причиной нелинейной температурной зависимости времени жизни и полуширины спектра флуоресценции АФЦ является нарушение нативной конформации апопротеинов, приводящее к изменению конформации хромофоров АФЦ при фазовых переходах растворителя.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что полупроводниковые квантовые точки образуют гибридные структуры с природными пигмент-белковыми комплексами, в которых происходит высокоэффективный перенос энергии.
2. Анализ кинетики световой индукции флуоресценции ФС2 *Synechocystis* 6803 показал, что эффективное сечение возбуждения флуоресценции ФС2 составляет 83 \AA^2 при 655 нм. Аллофикоцианин увеличивает этот параметр до 220 \AA^2 , а сочетание аллофикоцианина и фикоцианина в фикобилисомах увеличивает $\sigma_{\text{ФС2}}$ до 896 \AA^2 .
3. Показано, что увеличение эффективного сечения возбуждения флуоресценции ФС2 при образовании гибридных структур с квантовыми точками приводит к увеличению скорости восстановления первичных акцепторов электрона.
4. Установлено, что время жизни флуоресценции фикобилипротеинов обладает аномальной нелинейной температурной зависимостью времени жизни и полуширины спектра флуоресценции, чувствительной к скорости замораживания.
5. Сравнение характеристик природных и гибридных антенных комплексов показывает, что последние не уступают нативным ПБК по величинам коэффициентов усиления флуоресценции акцептора энергии.
6. Предложенный механизм изменения конформации апопротеинов и хромофоров аллофикоцианина при фазовом переходе вода – лед позволил объяснить зависимость времени жизни и полуширины спектра флуоресценции от температуры.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. E.G. Maksimov, F.I. Kuzminov, I.V. Konyuhov, I.V. Elanskaya, V.Z. Paschenko, Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* (2011), v. 104 (1-2), p. 285 - 291.
2. Е.Г. Максимов, Т.С. Гостев, Ф.И. Кузьминов, Н.Н. Случанко, И.Н. Стадничук, В.З. Пашенко, А.Б. Рубин (2010) Гибридные системы из квантовых точек и фоточувствительного белка фикоэритрина, *Российские Нанотехнологии*, т. 5, № 7–8, с. 531–537.
3. E.G. Maksimov, V.Z. Paschenko, G. Renger, A.B. Rubin. Temperature dependent properties of allophycocyanin fluorescence. International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability”, Baku, Azerbaijan, July 24-30, 2011, Book of Abstracts, p. 77.
4. E.G. Maksimov, V.Z. Pashchenko, A.B. Rubin. Quantum dots and phycoerythrin hybrid systems. The 15th International Congress Of Photosynthesis, August 22-27, 2010, Beijing, China, Book of Abstracts, p. 107.
5. Е.Г. Максимов, Т.С. Гостев, Ф.И. Кузьминов, Н.Н. Случанко, Ф-Й Шмитт, Г. Ренгер, В.З. Пашенко, А.Б. Рубин. Исследование фотофизических свойств гибридных систем, состоящих из нанокристаллов, связанных с фотосинтетическими пигмент-белковыми комплексами // Сборник тезисов XIX Пушинских чтений по фотосинтезу и Всероссийской конференции «Фотохимия хлорофилла в модельных и природных системах», Пушкино, 2009.
6. И.Н. Стадничук, С.К. Жармухамедов, Е.Г. Максимов, В.З. Пашенко, М.Ф. Янюшин, Тушение флуоресценции фикобилисом оранжевым каротин-протеином, *ДАН*, 2011, 439 (2) 270-273..
7. F.-J. Schmitt, E.G. Maksimov, H. Suedmeyer, V. Jeyasangar, C. Theiss, V.Z. Paschenko, H.J. Eichler and G. Renger, Time resolved temperature switchable excitation energy transfer processes between CdSe/ZnS nanocrystals and phycobiliprotein antenna from *Acaryochloris marina*, *Photon Nanostruct: Fundam Appl* (2010), v. 9 (2), p. 190-195.
8. F.-J. Schmitt, J. Fuesers, H. Südmeyer, J. Börner, V. Jeyasangar, R. Olliges, E. G. Maksimov, M. Grehn, C. Theiss, V. Z. Paschenko, H. J. Eichler, and G. Renger, Simulations of Energy Transfer Processes along the Rod Shaped PBP and Chl *d* Antenna of *A.marina*, *AIP Conf. Proc.* November 10, 2010, V 1288, pp. 113-116.
9. Т. С. Гостев, Ф. И. Кузьминов, Е. Г. Максимов, В. З. Пашенко, В. В. Фадеев. Фитопланктон как флуоресцентный биоиндикатор качества природных вод. Сб.: Физические проблемы экологии (экологическая физика), 2008, № 15, с. 102~113, М.: Макс Пресс.
10. F.I. Kouzminov, E.G. Maximov, M.Y. Gorbunov, V.V. Fadeev. Studying of photoprotection mechanisms in photosynthetic apparatus of cyanobacteria using non-linear laser fluorometry and variable fluorescence techniques. The XII International Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS-2010), June 9-11, 2010, Oulu, Finland, Book of Abstracts, p. 267.
11. Миронов К.С., Максимов Е.Г., Максимов Г.В., Бедбенов В.С., Лось Д.А. (2011) Обратная связь между текучестью мембран и транскрипцией гена *desB*, кодирующего ω3-десатуразу жирных кислот у цианобактерии *Synechocystis*. *Молекулярная биология* (в печати).
12. I. Stadnichuk, M. Yanyshin, E. Maksimov, E. Lukashev, S. Zharmukhamedov, I. Yelanskaya, V. Paschenko. Phycobilisomes in phenomena of short-term light adaptations. International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability”, Baku, Azerbaijan, July 24-30, 2011, Book of Abstracts, p. 101