

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Петрова Анастасия Александровна

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМЫ 1 С ЭКЗОГЕННЫМИ
МЕДИАТОРАМИ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА**

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории электрогенных фотопроцессов Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** – Семёнов Алексей Юрьевич, д. б. н., профессор
- Официальные оппоненты** – Проскуряков Иван Игоревич – д. ф.-м. н., зав. лаб. молекулярной спектроскопии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт фундаментальных проблем биологии» Российской академии наук
- Нокс Петр Петрович – д. б. н., в.н.с. Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
- Неверов Константин Викторович – к. б. н., н.с. Института биохимии имени А.Н. Баха Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «22» февраля 2017 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр.24, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:

https://istina.msu.ru/dissertation_councils/councils/32241428/

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Оксигенный фотосинтез является одним из основополагающих биохимических процессов в биосфере. В ходе фотосинтеза энергия солнечного света преобразуется в химическую форму, обеспечивая накопление первичной биомассы, а в качестве побочного продукта фотосинтетических реакций в атмосферу выделяется кислород. Первичное преобразование солнечной энергии в энергию разделенных зарядов выполняют пигмент-белковые комплексы фотосистем 1 и 2, совместная работа которых обеспечивает перенос электрона от молекулы воды к молекуле ферредоксина (Фд). Фотосистема 1 (ФС1) – важнейший пигмент-белковый комплекс фотосинтетического аппарата высших растений и цианобактерий. Этот уникальный белок, состоящий из 12 субъединиц, имеет в своем составе внутреннюю антенну и кофакторы электрон-транспортной цепи, организованные в две функционально активные ветви *A* и *B*. В переносе электрона в ФС1 участвуют димер хлорофилла P_{700} в качестве первичного донора электронов, два димера хлорофилла A_0 в качестве первичного акцептора, две молекулы филлохинона A_1 и три последовательно расположенных железо-серных кластера F_X , F_A и F_B (Рис.1). Одной из ключевых реакций в ФС1 является перенос электрона от молекулы филлохинона к железо-серному кластеру F_X . Эта стадия является скоростью-лимитирующей при переносе электрона в ФС1 и, определяет эффективность взаимодействия комплекса с экзогенными акцепторами электронов.

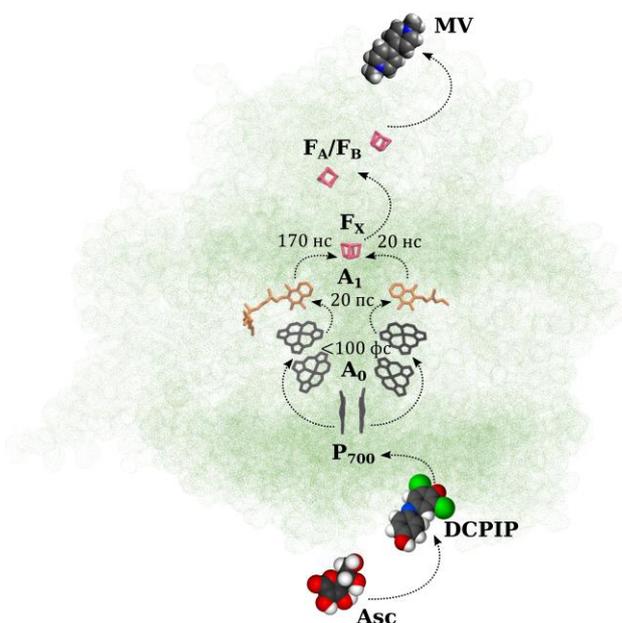


Рис. 1. Расположение редокс-кофакторов и реакции прямого переноса электрона в комплексах ФС1. Показано восстановление P_{700}^+ от внешнего донора электронов 2,6-дихлорфенолиндифенола (DCPIP) и восстановление метилвиологена (MV) от терминальных железо-серных кластеров F_A/F_B .

ФС1 вовлечена как в линейный электронный транспорт, так и в различные циклические и псевдоциклические пути переноса электрона,

распределяя потоки электронов по этим путям. В последние годы появились указания на то, что филлохинон является одной из возможных точек бифуркации, непосредственно взаимодействуя не только с железо-серным кластером F_X , но и с экзогенными акцепторами электронов. Вероятным кандидатом на роль такого акцептора является молекулярный кислород, который в условиях стационарного освещения восстанавливается не только железо-серными кластерами в водной фазе, но и в гидрофобной среде внутри тилакоидной мембраны (Kozuleva et al., 2011).

Точные значения ключевых кинетических и термодинамических параметров реакции $A_1 \rightarrow F_X$ на сегодняшний день не установлены. Так, до сих пор нет надежных оценок значений E_m хинонных кофакторов в сайтах A_{1A} и A_{1B} и железо-серного кластера F_X . Остается невыясненной степень вовлеченности двух ветвей кофакторов в прямые и обратные реакции переноса электрона.

Одним из перспективных подходов к изучению кинетических и термодинамических параметров электронного транспорта с участием хинонного кофактора в ФС1 является замещение филлохинона в сайте A_1 другими хинонами с различными значениями среднеточечных редокс-потенциалов (E_m). Наиболее эффективным методом получения модифицированных комплексов ФС1 является использование мутантного цианобактериального штамма *menB* с нарушенным биосинтезом филлохинона. У таких мутантов в сайт связывания вместо филлохинона включается пластохинон (PQ), который в водном растворе легко замещается на другие хиноны. В данной работе были исследованы препараты ФС1 из мутанта *menB*, содержащие пластохинон (*menB-PQ*) и высокопотенциальный 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон (*menB-Cl₂NQ*).

Другим методом, позволяющим получать модифицированные комплексы ФС1, является удаление субъединицы PsaC, содержащей терминальные железо-серные кластеры F_A/F_B . В полученных комплексах (F_X -core), терминальным кофактором электронного транспорта, взаимодействующим с экзогенными акцепторами электронов, является железо-серный кластер F_X .

В данной работе было исследовано взаимодействие комплексов ФС1, содержащих нативные и реконструированные хинонные кофакторы и различное число железо-серных кластеров, с экзогенными медиаторами электронного транспорта. Это позволило выявить ранее неизвестные особенности переноса электрона в ФС1, детализировать механизмы восстановления экзогенных акцепторов электронов. В частности, были получены оценки редокс-потенциалов хинонных кофакторов (PhQ, PQ) в сайте связывания A_1 , определен вклад двух ветвей кофакторов переноса электрона в реакции обратного переноса электрона и предложен новый механизм взаимодействия ФС1 с экзогенными акцепторами электронов.

Цель и задачи работы. Целью работы являлось изучение влияния направленного изменения состава кофакторов переноса электрона в препаратах ФС1 на взаимодействие этих комплексов с экзогенными редокс-медиаторами. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать взаимодействие искусственных экзогенных акцепторов электронов с комплексами ФС1 в условиях однократного срабатывания комплексов в ответ на лазерную вспышку.
2. Количественно описать полученные результаты с помощью кинетической модели переноса электрона в ФС1.
3. Изучить донорно-акцепторные свойства различных медиаторов переноса электрона, взаимодействующих с ФС1 в условиях стационарного освещения.
4. Установить природу редокс-кофакторов ФС1, восстанавливающих молекулярный кислород в условиях стационарного освещения.

Научная новизна работы. Впервые исследована эффективность взаимодействия комплексов ФС1, содержащих различные модификации состава кофакторов, с экзогенными акцепторами электронов метилвиологеном (MV) и 2,3-дихлор-1,4-нафтохиноном (Cl_2NQ). Были использованы следующие типы комплексов ФС1: интактные ФС1 из дикого типа (WT), комплексы из дикого типа лишённые терминальных кластеров F_A/F_B (F_X -core), ФС1 из мутантного штамма *menB*, содержащие в сайте A_1 PQ (*menB-PQ*) или Cl_2NQ (*menB-Cl_2NQ*). Продемонстрировано снижение эффективности взаимодействия ФС1 с экзогенными акцепторами в ряду WT \rightarrow *menB-PQ* \rightarrow F_X -core. Для комплексов *menB-Cl_2NQ* было впервые продемонстрировано прямое восстановление внешнего акцептора электронов MV от хинонного кофактора в сайте A_1 ФС1. Полученные данные были адекватно аппроксимированы с помощью кинетической модели. На ее основе были рассчитаны значения редокс-потенциалов PhQ в A и B ветвях и PQ в A-ветви ФС1.

Впервые было установлено, что Cl_2NQ и окисленная форма DCRIP (DCRIP^{OX}) являются эффективными акцепторами электронов от ФС1 в условиях стационарного освещения. Кроме того, Cl_2NQ , подобно DCRIP, является медиатором переноса электронов от восстановленного аскорбата к P_{700}^+ . Показано, что механизм взаимодействия DCRIP^{OX} с акцепторной стороной комплекса ФС1 сходен с таковым для MV: образовавшаяся семи-восстановленная форма DCRIP восстанавливает кислород с образованием супероксидного анион-радикала.

Впервые показано прямое восстановление кислорода филохиноном в сайте A_1 ФС1 в условиях стационарного освещения.

Практическая значимость исследования. Полученные в работе результаты позволили численно описать процессы переноса электрона в ФС1, а также установить кинетические и термодинамические параметры переноса электрона в комплексах ФС1. Кроме того были детализированы механизмы взаимодействия экзогенных доноров и акцепторов электронов с ФС1. Результаты изучения взаимодействия комплексов ФС1 с экзогенными донорами и акцепторами электронов могут быть использованы при конструировании высокоэффективных экологически-чистых искусственных фотопреобразователей на основе фотосинтетических пигмент-белковых комплексов.

Апробация работы и публикации.

Результаты работы были представлены на семинаре отдела биоэнергетики НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Основные положения работы были изложены на XXI Пущинских чтениях по фотосинтезу (Пушино, 2015), Photosynthesis Research for Sustainability (Баку, 2013, Пушино, 2016), International Workshop of the Russian Photobiological Society “Primary Electron Transfer in Photosynthetic Reaction Centers” (Псков, 2015), 17th International Congress on Photosynthesis Research. Photosynthesis in a Changing World (Маастрихт, 2016) и VIII Съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, 2017).

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus.

Личный вклад соискателя.

Личный вклад заключался в анализе данных литературы, постановке экспериментов, обработке полученных экспериментальных данных и их интерпретации, подготовке публикаций.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа содержит 25 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 145 источников.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Раздел 1.1 дает общее представление об устройстве фотосинтетического аппарата у высших растений и цианобактерий и роли фотосистемы 1 в переносе электрона. В **Разделе 1.2** описаны структурно-функциональные особенности ФС1, особое внимание уделено описанию сайта связывания хинонного кофактора. **Раздел 1.3** посвящен роли термодинамических параметров в механизмах переноса электрона в ФС1. В **разделе 1.4.** описаны способы получения комплексов ФС1, содержащих различные хинонные кофакторы в сайте A_1 . В **разделе 1.5** приведены данные о взаимодействии комплексов ФС1 с экзогенными акцепторами электронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на комплексах, выделенных из цианобактерий *Synechocystis sp.* PCC 6803 дикого типа и штамма мутантного по гену *menB*. Штамм был любезно предоставлен нам профессором J. N. Golbeck (Университет штата Пенсильвания, США).

Нативные комплексы ФС1, содержащие PhQ (WT) и PQ (*menB-PQ*) получали из клеток путем их разрушения и последующей обработки полученных тилакоидных мембран n-додецил- β -D-мальтозидом. Триммерные комплексы ФС1 выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

Препараты ФС1, содержащие в сайте A_1 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон (*menB-Cl₂NQ*), получали путем замещения PQ в комплексах *menB-PQ* при часовой инкубации в водном растворе при комнатной температуре в присутствии избытка Cl_2NQ (соотношение $Cl_2NQ/ФС1$ составляло 400/1). Избыток Cl_2NQ из раствора удаляли путем гель-фильтрации через сефадекс G-50.

Кинетику восстановления P_{700}^+ в ответ на лазерные вспышки измеряли путем регистрации изменений поглощения на длине волны 820 нм. В качестве источника возбуждения использовался неодимовый лазер Quantel YG-481 (Франция) с максимумом на длине волны 532 нм, интенсивностью 30 мДж и полушириной импульса 12 нс, в качестве источника измерительного света использовался лазерный диод Spinder and Hoyer DC25A (длина волны 820 нм). Временное разрешение установки составило ~100 нс. Препараты с концентрацией хлорофилла 50 мкг/мл помещались в кварцевую кювету с оптическим путем 10 мм. В качестве донора электронов для P_{700}^+ был использован 10 мМ аскорбат натрия (Asc) в присутствии 25 мкМ редокс буфера 2,6-дихлорфенолидофенола (DCPIP). В качестве акцептора для железо-серных кластеров использовали MV и Cl_2NQ в различных концентрациях.

Измерение окислительно-восстановительного состояния P_{700} в условиях стационарного освещения проводилось с помощью ЭПР-спектрометра Varian E-4 и оптически с помощью флуориметра РАМ101, оснащенного модулем EDP700DW для измерения P_{700}^+ .

Измерения ЭПР-спектров P_{700}^+ (3210 - 3310 Гс) и кинетики его темнового восстановления (3260 Гс) проводились на препаратах F_x-core с концентрацией хлорофилла 1 мг/мл, которые помещались в проницаемые для воздуха пластиковые капилляры. В качестве донора электронов для P_{700}^+ был использован 10 мМ Asc и различные концентрации редокс медиаторов DCPIP и Cl_2NQ . В качестве акцептора для железо-серных кластеров использовали различные концентрации MV и Cl_2NQ . Препараты, предварительно адаптированные к полной темноте, освещали стационарным белым светом в течение 30 с. Стационарное освещение обеспечивалось вольфрамовой лампой мощностью 100 Вт. Инфракрасная часть спектра отрезалась 5-см слоем воды. Интенсивность освещения составляла ~1 мкЕ/м²×с⁻¹.

Оптические измерения редокс-состояния P_{700} в условиях стационарного освещения проводили на суспензии ФС1 с концентрацией хлорофилла 5 мкг/мл в стандартной камере (WALZ, Германия). Образцы освещались белым светом лампы накаливания (KL-1500) в течение 30 с. Суспензия содержала 100 мкМ MV, 10 мМ Asc и различные концентрации редокс-буферов N,N,N',N'-тетраметил-*p*-фенилендиамина (TMPD) и DCPIP.

Кинетику поглощения кислорода измеряли с помощью стандартного электрода Кларка. Измерения проводили в условиях постоянного перемешивания. Реакционная среда содержала ФС1 с концентрацией хлорофилла 7,5 мг/мл, 2 мМ Asc и различные концентрации TMPD и DCPIP. Перед началом измерений проводили темновую инкубацию препаратов с целью установления темнового уровня поглощения кислорода. В качестве источника

света использовался красный светодиод ($610 < \lambda < 760$), интенсивность света составляла $640 \text{ мкЕ/м}^2 \times \text{с}$.

Обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения OriginLab 9.0

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Взаимодействие нативных и модифицированных комплексов ФС1 с экзогенными акцепторами электронов в условиях импульсного освещения.

1.1. Кинетика восстановления фотоокисленного P_{700} в различных типах комплексов в присутствии метилвиологена и 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона.

Несмотря на то, что в настоящее время, известны характерные времена реакций прямого переноса электрона и основных кинетических компонент рекомбинации зарядов в ФС1, до сих пор не установлено, в какой мере две ветви участвуют в обратном электронном транспорте, и как кинетические и термодинамические характеристики переноса электрона в комплексе влияют на взаимодействие с экзогенными акцепторами электронов. Одним из наиболее распространенных подходов к изучению переноса электрона в ФС1 является регистрация кинетики восстановления фотоокисленного P_{700} в ответ на вспышку света. Мы проанализировали взаимодействие экзогенных акцепторов электронов в условиях импульсного освещения с интактными комплексами ФС1 из цианобактерий дикого типа (WT), лишенных железо-серных кластеров F_A/F_B (F_X -core) ФС1 дикого типа, комплексов ФС1 из мутантного штамма *menB*, содержащих пластохинон (*menB-PQ*) или 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон (*menB-Cl₂NQ*).

Препараты WT, F_X -core, *menB-PQ* и *menB-Cl₂NQ* были охарактеризованы в отсутствие искусственных акцепторов электронов. Полученные кинетики были аппроксимированы двумя экспоненциальными компонентами. Более быстрая компонента отражает рекомбинацию зарядов между восстановленными кофакторами ФС1 и P_{700}^+ , в то время как более медленная соответствует восстановлению P_{700}^+ от внешнего донора электронов в той части комплексов, где произошел перенос электрона к экзогенному акцептору. Характерное время (τ) этой компоненты не зависело от типа комплекса и составляло 500 мс при используемой нами концентрации доноров электронов (10 mM Asc и 25 μ M DCPIP). Важно также отметить, что эксперименты проводились в аэробных условиях, поэтому в отсутствие искусственных акцепторов часть комплексов ФС1 восстанавливала молекулярный кислород (Рис. 2).

Кинетические компоненты, соответствующие рекомбинации зарядов и восстановлению фотоокисленного P_{700} от внешнего донора в случае комплексов WT (черная кривая на Рис.2) имели относительно близкие характерные времена 50 и 500 мс. Вклад более медленной кинетической компоненты в отсутствие искусственных внешних акцепторов составлял порядка 40 %, что существенно

превышало вклад аналогичной компоненты в случае других типов комплексов ФС1.

Терминальные железо-серные кластеры F_A/F_B являются естественным эволюционным приобретением ФС1 для эффективного взаимодействия с природными акцепторами электронов ферредоксином и флаводоксином. Поэтому, важную информацию о механизме взаимодействия ФС1 с искусственными акцепторами можно получить, сравнивая интактные ФС1 с комплексами, лишенными терминальных железо-серных кластеров (F_X -core), в которых терминальным кофактором является железо-серный кластер F_X . Основная компонента кинетики восстановления P_{700}^+ в F_X -core (Рис.2) ускорена в ~ 50 раз по сравнению с WT (τ составляют 1 мс и 50 мс, соответственно).

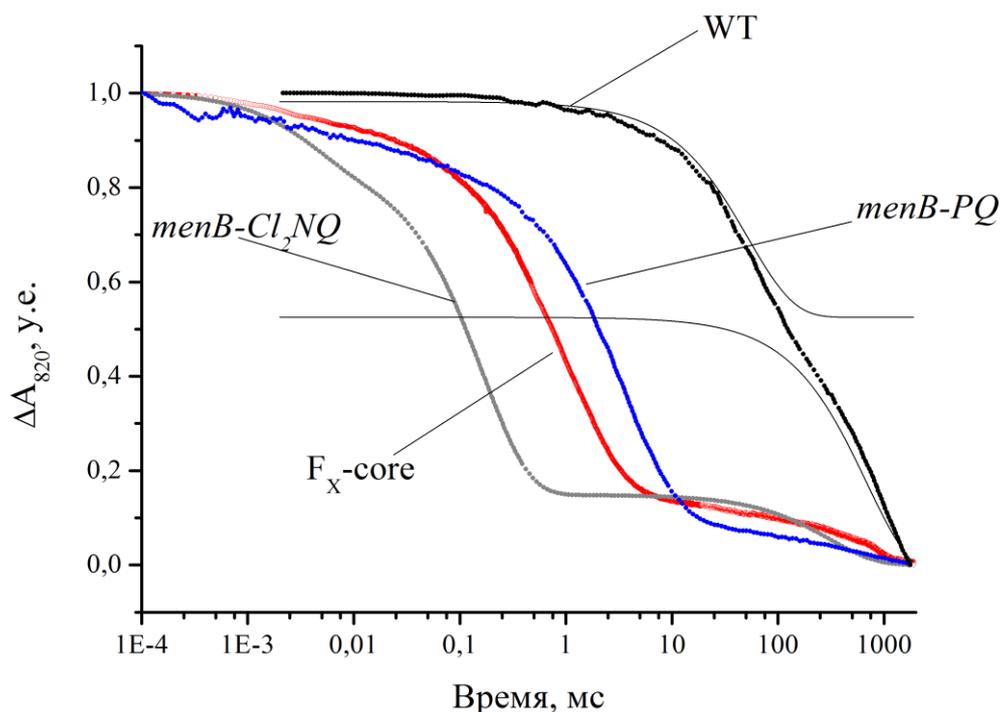


Рис.2. Кинетика восстановления P_{700}^+ в комплексах WT, F_X -core, $menB-PQ$ и $menB-Cl_2NQ$ в отсутствие экзогенных акцепторов. В качестве экзогенных доноров электронов использовались 10 мМ Asc и 25 мкМ DCPIP.

Комплексы ФС1 из мутантного штамма $menB$ ($menB-PQ$) характеризуются ускоренной по сравнению с ФС1 дикого типа кинетикой рекомбинации зарядов ($\tau \approx 3$ мс), однако содержат функционально активные железо-серные кластеры F_A/F_B , которые способны восстанавливать экзогенные акцепторы электронов. На основе комплексов $menB-PQ$ могут быть получены содержащие высокопотенциальный 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон препараты, в которых не происходит переноса электрона на железо-серные кластеры ($menB-Cl_2NQ$), поскольку значение E_m в сайте A_1 более положительно, чем E_m железо-серных кластеров. Основная кинетическая компонента восстановления P_{700}^+ в $menB-Cl_2NQ$ (Рис.2) имеет характерное время ~ 150 мкс, и соответствует рекомбинации зарядов в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$. Изучение таких

комплексов представляет особенный интерес, поскольку в них не происходит переноса электрона на железо-серные кластеры, и они не должны участвовать во взаимодействии с экзогенными акцепторами электронов. Сведения о характерных временах рекомбинации зарядов в комплексах ФС1 WT, F_X -core, *menB-PQ* и *menB-Cl₂NQ* суммированы на Рис. 3.

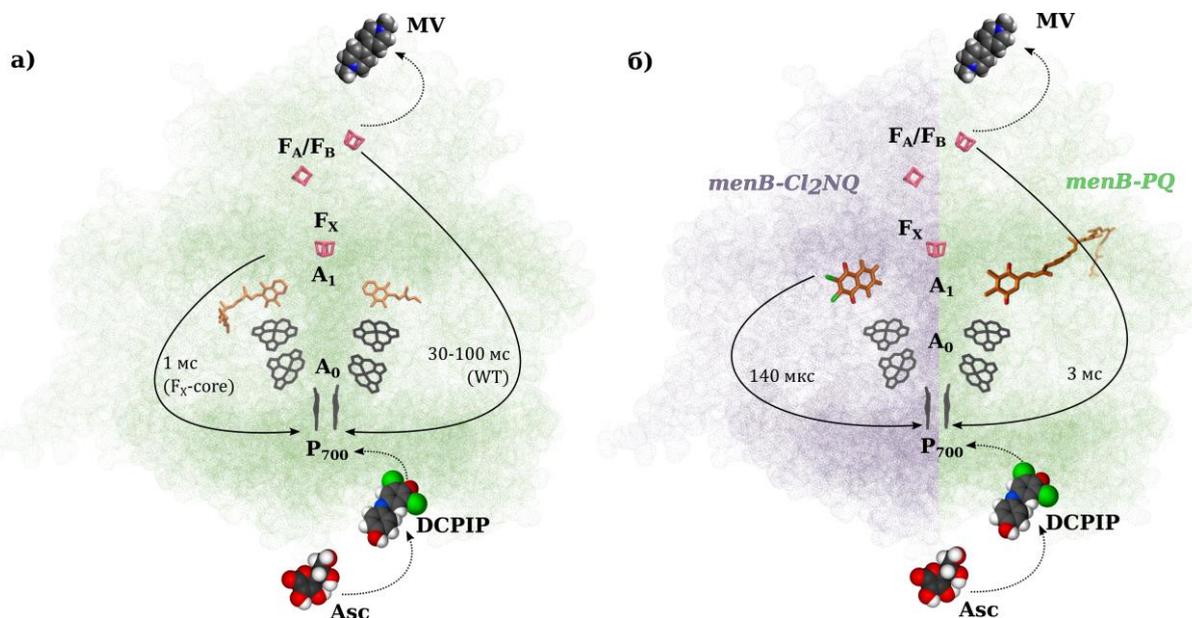


Рис.3. Рекомбинация зарядов в комплексах ФС1: (а) WT и F_X -core, (б) *menB-PQ* и *menB-Cl₂NQ*.

В качестве внешнего акцептора для всех изученных комплексов мы использовали MV, который восстанавливается от ФС1 и, в свою очередь, восстанавливает кислород, а также Cl_2NQ , который характеризуется высоким E_m (-98 мВ против стандартного водородного электрода) и, как нами было показано, также может восстанавливаться терминальными железо-серными кластерами ФС1.

Добавление MV или Cl_2NQ приводило к увеличению вклада обусловленной восстановлением комплексами ФС1 внешних акцепторов медленной кинетической компоненты за счет быстрой, однако не влияло на значения τ , характерные для данного типа комплексов. Зависимость амплитуды медленной компоненты ($\tau \sim 500$ мс) от концентрации акцепторов электронов для комплексов WT, F_X -core, *menB-PQ* и *menB-Cl₂NQ*, показана на Рис. 4. При расчете этих значений нами был учтен вклад переноса электрона на кислород в присутствии экзогенных акцепторов: для этого амплитуда медленной компоненты в отсутствие экзогенных акцепторов электронов MV и Cl_2NQ вычиталась из общей амплитуды сигнала. Вклад медленной компоненты определяется конкуренцией между обратным переносом электрона в ФС1 и реакцией восстановления экзогенного акцептора.

Черные кривые, представленные на Рис.4, иллюстрируют зависимость вклада долгоживущей компоненты кинетики восстановления фотоокисленного P_{700} от концентрации MV (сплошная линия) и Cl_2NQ (пунктирная линия) в комплексах WT. Очевидно, что при концентрациях обоих акцепторов

превышающих 5 мкМ, доля электронов, передаваемых акцепторам достигает ~ 90%. При этом Cl₂NQ является более эффективным акцептором для интактной ФС1, чем MV: концентрация Cl₂NQ, необходимая для достижения 50% вклада медленной компоненты (который может служить мерой эффективности), примерно в два раза ниже по сравнению с MV. Значения E_m для MV и Cl₂NQ против стандартного водородного электрода оценивались как -448 мВ (Wardman 1989) и -98 мВ (Currie and Holmes 1966). Таким образом, более высокая эффективность Cl₂NQ как акцептора электронов, вероятнее всего, объясняется, большей разницей в значениях свободной энергии (ΔG) реакции переноса электрона от терминальных железо-серных кластеров F_A/F_B.

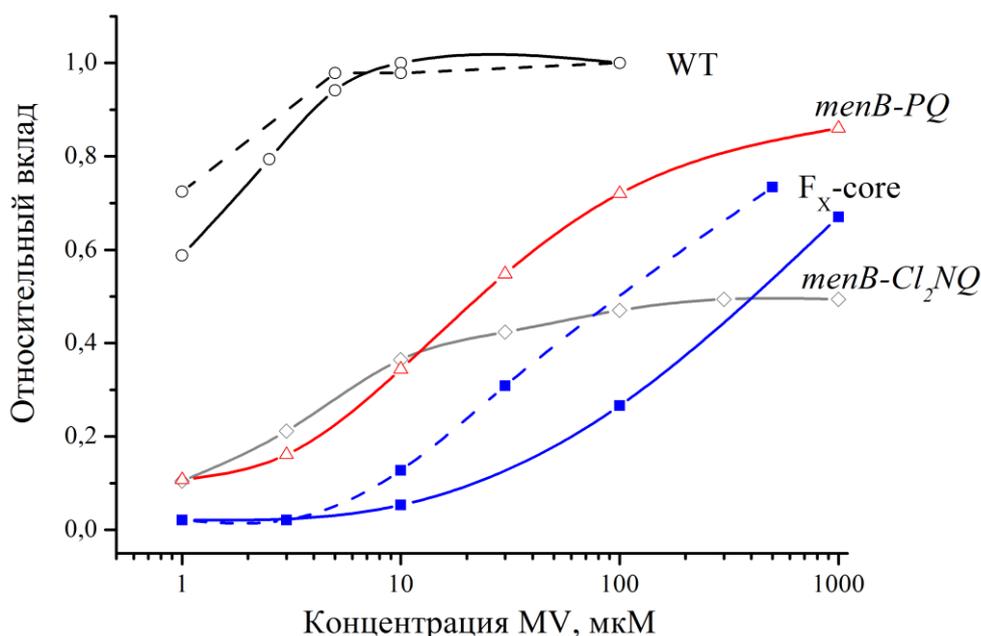


Рис. 4. Зависимость амплитуды медленной кинетической компоненты восстановления P700+ ($\tau \sim 500$ мс) в комплексах WT (чёрные кривые), F_x-core (синие кривые), *menB-PQ* (красная кривая) и *menB-Cl₂NQ* (серая кривая) от концентрации экзогенных акцепторов электронов метилвиологена (сплошные линии) и 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона (пунктирные линии). В качестве экзогенных доноров электронов использовались 10 мМ Asc и 25 мкМ DCPIP.

Синие кривые на Рис.4 представляют динамику изменения вклада медленной кинетической компоненты, полученную для комплексов F_x-core в присутствии возрастающих концентраций MV (сплошная линия) и Cl₂NQ (пунктирная линия). В этом случае амплитуда медленной компоненты не достигала насыщения в исследуемом диапазоне концентраций, и доля электронов, которые уходили к экзогенным акцепторам, достигала ~70% при максимальной концентрации MV и Cl₂NQ. Кроме того, в образцах F_x-core 50%-ный вклад медленной компоненты наблюдался при концентрациях экзогенных акцепторов в ~200 раз больших, чем в случае интактных комплексов ФС1. Таким образом, эффективность взаимодействия обоих экзогенных акцепторов с

железо-серным центром F_X была значительно ниже, чем с терминальными кластерами F_A/F_B . По-видимому, снижение эффективности взаимодействия с экзогенными акцепторами при удалении F_A/F_B , может быть обусловлено более быстрой по сравнению с комплексами WT рекомбинацией зарядов и примерно двукратным увеличением расстояния от терминального кофактора до поверхности белка. Однако эффективность Cl_2NQ как внешнего акцептора и в этом случае оказалась в 10 раз выше, чем MV. Таким образом, в диссертационной работе показано, что Cl_2NQ является значительно более эффективным экзогенным акцептором электронов от ФС 1, чем MV.

Красная кривая на Рис.4 отражает зависимость относительного вклада медленной компоненты восстановления P_{700}^+ от концентрации MV в комплексах *menB-PQ*. Как и в случае комплексов WT, зависимость выходила на плато, причем доля электронов, переданных акцептору от ФС1, достигала ~ 90%. Для достижения 50%-ного вклада медленной компоненты требовалась концентрация MV ~ 10 мкМ, что примерно в 10 раз больше, чем для интактных комплексов WT, но значительно меньше по сравнению с препаратами F_X -core. В этом случае расстояние между терминальным акцептором F_B и поверхностью белка было таким же, как и в случае комплексов WT. Однако значение E_m PQ в A_1 -сайте *menB-PQ* на ~100 мВ более положительное, чем у PhQ в A_1 -сайте комплексов WT (Semenov et al., 2000). Вследствие этого рекомбинация зарядов в паре $P_{700}^+[F_A/F_B]^-$ в *menB-PQ* ($\tau \sim 3$ мс) ускорена по сравнению с интактной ФС1 WT ($\tau \sim 50$ мс), и для предотвращения обратного электронного транспорта в *menB-PQ* была необходима более высокая концентрация внешнего акцептора. Таким образом, уменьшение ΔG между A_{1A} и F_X является наиболее вероятной причиной менее эффективного восстановления MV комплексами *menB-PQ* в сравнении с интактными комплексами дикого типа.

Серая кривая (Рис.4) соответствует концентрационной зависимости долгоживущей компоненты спада сигнала P_{700}^+ в случае комплексов *menB-Cl₂NQ*. Как было показано в работе (Mula et al. 2012), встраивание Cl_2NQ в комплексы ФС1 из *menB*, приводит к блокированию прямого переноса электрона от хинонного кофактора на железо-серные кластеры, т.к. значение E_m Cl_2NQ в A_1 -сайте существенно более положительно, чем E_m терминального кластера F_B . Однако данные, полученные в ходе наших исследований, свидетельствуют о том, что комплексы *menB-Cl₂NQ* способны восстанавливать MV (Рис.4). Концентрационная зависимость достигает насыщения при концентрациях MV близких к 30 мкМ, но, в отличие от всех других образцов, максимальная доля электронов, которые передаются внешнему акцептору, достигает только 50% при 100 мкМ MV и практически не меняется при дальнейшем повышении концентрации акцептора. Эти данные показывают, что в таких комплексах скорость восстановления внешнего акцептора не может быть выше, чем скорость рекомбинации в паре $P_{700}^+A_1^-$ даже при очень высокой концентрации MV.

Можно предположить два различных механизма взаимодействия между комплексами *menB-Cl₂NQ* и MV. Первый механизм предполагает восстановление экзогенно добавленного MV терминальными кластерами F_A/F_B .

В этом случае должен быть преодолен значительный энергетический барьер между Cl_2NQ в A_1 сайте и F_A/F_B , и значения E_m участников этой реакции становятся ключевым фактором определяющим вероятность переноса электрона по этому пути. Редокс-потенциал Cl_2NQ в A_1 -сайте по крайней мере, на 220 мВ более положителен, чем E_m нативного PhQ (Makita и Hastings 2016), потенциал которого составляет -670 мВ (Ptushenko et al., 2008). Полученный путем прибавления разницы в 220 мВ к значению потенциала PhQ E_m Cl_2NQ в A_1 -сайте составил -450 мВ. Это значение более положительно, чем значения E_m железо-серных кластеров, среднеточечные потенциалы которых, по-видимому, лежат в диапазоне -480 до -540 мВ (Ptushenko et al., 2008). Это делает перенос электрона от Cl_2NQ в A_1 -сайте до MV через железо-серные кластеры слишком медленным, чтобы конкурировать с рекомбинацией между Cl_2NQ^- и P_{700}^+ .

Второй механизм предполагает прямое восстановление MV от Cl_2NQ в сайте A_1 . Значение E_m Cl_2NQ в A_1 -сайте составляет -450 мВ и является достаточно низким для частичного восстановления экзогенного MV ($E_m = -448$ мВ (Wardman 1989)). Однако необходимо также принимать во внимание расстояние между хиноном в A_1 -сайте и MV. Мы провели тщательное изучение структуры кристаллов ФС1, полученной методом рентгеноструктурного анализа. Это позволило выявить в структуре ФС1 асимметричную водную полость, сообщающуюся с поверхностью белка и отстоящую на ~ 10 Å от филлохинона A_{1A} . При этом полость соразмерна молекуле MV. Мы предполагаем, что MV может заходить в эту полость. При таком расстоянии между хиноном и MV скорость переноса электрона от Cl_2NQ на MV должна быть сопоставимой или превышать скорость рекомбинации заряда в ФС1 *menB-Cl₂NQ* (10^4 с⁻¹). В то же время в случае комплексов WT регистрируемая скорость прямого электронного транспорта от PhQ в A_1 -сайте на F_A/F_B (5×10^6 с⁻¹) намного выше, чем скорость возможной реакции между хиноном и MV, поэтому прямое взаимодействие филлохинона с MV в комплексах WT не наблюдается. Принимая во внимание данные о том, что в комплексах *menB-Cl₂NQ* прямой перенос электрона за пределы хинона полностью подавлен (Mula et al., 2012; Makita и Hastings, 2015), можно сделать вывод, что прямое восстановление MV Cl_2NQ , содержащимся в A_1 -сайте, является наиболее вероятным механизмом.

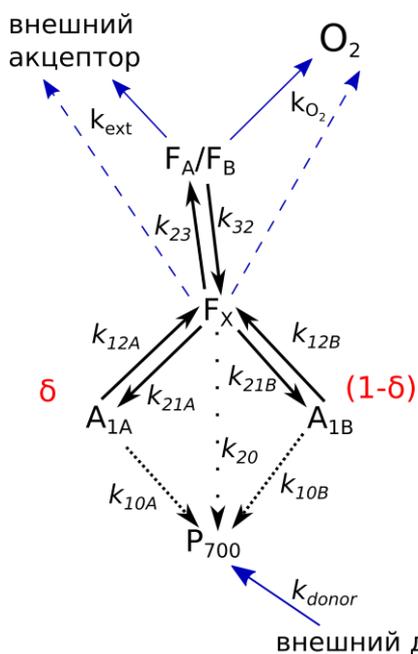
1.2. Описание механизмов взаимодействия различных типов комплексов ФС1 с экзогенными акцепторами электронов методами кинетического моделирования.

Для описания процессов переноса электрона в различных типах комплексов ФС1 была использована кинетическая модель, разработанная в нашей лаборатории на основе экспериментов, описанных в предыдущем разделе (Milanovsky et al., 2017). Схема модели и параметры, которые были получены в результате аппроксимации кинетик восстановления P700 в препаратах WT, F_x -core, *menB-PQ* и *menB-Cl₂NQ* в условиях их взаимодействия с экзогенными акцепторами электронов представлена на Рис.5. Модель представляет собой систему линейных дифференциальных уравнений первого

порядка, которые отражают зависимость заселенности основных состояний системы от времени. Восстановление фотоокисленного P_{700} рассматривалось как серия последовательных реакций обратного переноса электрона $F_A/F_B \rightarrow F_X \rightarrow A_1 \rightarrow P_{700}$. В качестве стартовых параметров при моделировании были использованы оценки констант скоростей отдельных реакций известные из литературы. Степень асимметрии электронного транспорта по двум ветвям предполагалась равной 80% (Sun et al., 2014; Makita, Hastings, 2015). Взаимодействие ФС1 с акцепторами электронов было описано с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен, где скорость реакции зависела от концентрации внешнего акцептора электронов.

Кинетические константы, полученные нами в ходе моделирования, представлены в Табл.1.

Полученные из модели оценки изменения доли электронов, которые восстанавливали экзогенные акцепторы, в зависимости от концентрации акцепторов хорошо соответствовали предварительным данным, которые были получены в результате мультиэкспоненциальной аппроксимации. Интересно, что, исходя из нашей модели, рекомбинация зарядов в комплексах WT, F_X -core и $menB-PQ$ происходит в основном через хинон в сайте A_{1A} . Вклад рекомбинации через A_{1B} составлял менее 5%.



	WT	F_X -core	$menB-PQ$	$menB-Cl_2NQ$
k_{12A}, s^{-1}	5×10^6	5×10^6	$1,4 \times 10^4$	
k_{12B}, s^{-1}	5×10^7	5×10^7	3×10^5	
k_{30}, s^{-1}	7,6	$1,3 \times 10^3$	325	
K_{12A}	7	7	0,05	
K_{23}	170	-	170	
$K_{12A} \times K_{23}$	1200	-	8,5	
k_{10A}, s^{-1}	$9,1 \times 10^3$	$9,1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$9,3 \times 10^3$
k_{10B}, s^{-1}	4×10^5	4×10^5	5×10^4	$2,8 \times 10^5$

Рис. 5. Кинетическая модель переноса электрона в ФС1.

Скорости реакций прямого и обратного переноса электрона в комплексах ФС1 в значительной степени определяются значениями E_m кофакторов. Однако E_m хинонных кофакторов ФС1 являются слишком низкими для прямого экспериментального определения. Согласно электростатическим расчетам, значения E_m для A_1 составляют от -671 мВ до -840 мВ (Ptushenko et al., 2008,

Vos, van Gorkom, 1990). В нашей работе, используя полученные значения констант скорости, мы определили значения свободной энергии (ΔG) реакций $F_X \rightarrow F_A/F_B$ и $A_{1A} \rightarrow F_X$ (см. Уравнение 1). Значение ΔG для переноса электрона между A_{1B} и F_X не было рассчитано, т.к. рекомбинация протекает практически исключительно по ветви А.

$$(1) \Delta G_{12} = -RT \ln(k_{12}/k_{21})$$

Используя эти величины, мы рассчитали значения E_m для F_X , а также для PhQ и PQ в сайтах A_{1A} и A_{1B} . В качестве референтных были использованы определенные экспериментально значения E_m кластеров F_A и F_B против стандартного водородного электрода, которые составили -500 и -550 мВ соответственно (Golbeck et al., 1987).

Определенное нами значение E_m для филлохинона в A_{1A} сайте составило -680 мВ, что хорошо согласуется с рассчитанной в работе (Ptushenko et al., 2008) величиной -670 мВ. Используя значение разницы между значениями E_m A_{1A} и A_{1B} , равное 170 мВ, мы рассчитали величину E_m для филлохинона в сайте A_{1B} , которая составила -850 мВ.

Использование констант скорости прямой и обратной реакций переноса электрона между A_{1A} и F_X в комплексах *menB-PQ*, позволило определить E_m PQ в сайте связывания A_{1A} . Эта величина оказалась близка к полученной ранее (Makita, Hastings, 2016) и составила -555 мВ.

Таким образом, рассчитанные нами значения E_m для молекул PhQ в сайтах A_{1A} и A_{1B} , предполагают, что перенос электрона в реакции $A_{1A} \rightarrow F_X$ является экзергоническим.

Значения констант скорости реакций, полученные из модели, также позволили нам определить константы скорости и константы Михаэлиса реакции комплексов ФС1 с экзогенными акцепторами электронов. В случае комплексов WT добавление MV значительно ускоряло окисление $[F_A/F_B]^-$: при концентрации 10 мкМ, MV акцептировал более 90% электронов, поэтому восстановление P_{700}^+ обеспечивалось в основном за счет окисления внешнего донора электронов ДСРР. Константа скорости реакции взаимодействия MV с $[F_A/F_B]^-$ (k_a), полученная из модели, оказалась равной $1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Табл.1).

Параметры взаимодействия ФС1 и Cl_2NQ как внешнего акцептора электронов отличались от таковых, полученных для MV. Во-первых, значение константы скорости взаимодействия Cl_2NQ комплексами WT было выше и составило $1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Табл.1). Во-вторых, Cl_2NQ проявлял умеренное сродство к ФС1 с константой диссоциации $K_m = 5 \text{ мкМ}$, что характерно для неспецифического связывания полярных органических соединений на границе между белком и водой.

Для сравнения мы также включили в Табл.1 данные, характеризующие взаимодействие ФС1 с природными внешними акцепторами ферредоксином (Фд) и фдлаводоксином (Флд), которые являются небольшими растворимыми белками и способны специфически взаимодействовать с акцепторной частью комплекса ФС1 (Sétif 2001). Из приведённых в таблице данных следует, что

эффективность Cl_2NQ выше, чем у Фд и лишь в три раза ниже эффективности Фд. Можно предположить, что высокая эффективность Cl_2NQ как акцептора электронов является следствием полярности и высокого окислительно-восстановительного потенциала этого соединения. Интересно также сравнить акцепторную эффективность MV и Cl_2NQ с молекулярным кислородом, который будучи растворен в воде наряду с Фд и Флд, является естественным акцептором электронов для ФС1. При концентрации молекулярного кислорода в воде $\sim 2 \times 10^{-4}$ М константа скорости взаимодействия O_2 с восстановленными железо-серными кластерами $[F_A/F_B]$ составляет $7,5 \times 10^4$ $M^{-1} s^{-1}$ (Cherepanov et al., 2017). Это значение существенно меньше по сравнению с константами скорости взаимодействия ФС1 с MV, Cl_2NQ , и нативными акцепторами Фд и Флд (Табл.1).

Таблица 1. Параметры взаимодействия комплексов ФС1 с экзогенными акцепторами электронов, полученные из модели. Для сравнения даны значения K_m и k_a для природных акцепторов Фд и Флд (Setif et al., 2001)

	K_m, M	$k_a, M^{-1}s^{-1}$
<i>MV</i>		
WT	$\gg 10^{-4}$	$1,6 \times 10^7$
F_X -core	$\gg 10^{-3}$	$5,2 \times 10^6$
menB-PQ	$\gg 10^{-4}$	2×10^7
menB- Cl_2NQ	10^{-5}	$1,5 \times 10^9$
<i>Cl₂NQ</i>		
WT	$5,2 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^8$
F_X -core	$\gg 10^{-4}$	5×10^7
O_2		
WT	-	$7,5 \times 10^4$
F_X -core	-	$1,2 \times 10^6$
menB-PQ	-	2×10^5
menB- Cl_2NQ	-	5×10^6
<i>Фд</i>		
WT	4×10^{-7}	$3,5 \times 10^8$
<i>Флд</i>		
WT	$7,5 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^7$

Константа скорости окисления F_X внешним акцептором MV в комплексах F_X -core оказалась примерно в три раза ниже константы скорости окисления $[F_A/F_B]$ в комплексах WT (Табл.1). При этом зависимость скорости окисления F_X метилвиологеном не достигала насыщения даже при наиболее высокой концентрации акцептора, которую мы использовали в экспериментах (1 мМ). Полученные данные свидетельствуют о том, что как F_X , так и F_A/F_B окисляются MV, который связывается на поверхности белка, причем его связывание не является сайт-специфичным. Взаимодействие Cl_2NQ с F_X -core отличалось от взаимодействия с комплексами WT: в случае интактных комплексов мы

наблюдали связывание Cl_2NQ с $K_m = 5$ мкМ, в случае F_X -core мы не наблюдали дальнейшего увеличения вклада медленной кинетической компоненты даже при концентрации акцептора 100 мкМ (Табл.1).

Характер взаимодействия комплексов *menB-PQ* с MV был сходен с наблюдаемым в случае интактных комплексов дикого типа. Однако замедление реакций прямого переноса электрона примерно на три порядка и одновременное пятидесятикратное ускорение обратных реакций (Semenov et al., 2000) приводило к снижению константы скорости взаимодействия MV с F_A/F_B , в то время как K_m не изменялась. Интересно отметить, что величина константы скорости для *menB-PQ* заняла промежуточное положение между значениями, полученными в случае интактных комплексов WT и F_X -core.

В то же время описать взаимодействие комплексов *menB-Cl₂NQ* с MV оказалось невозможным в рамках модели, предполагающей его взаимодействие с F_A/F_B . Хорошая аппроксимация экспериментальных кинетик моделью оказалась возможной только в предположении, что взаимодействие с MV осуществляется напрямую с хиноном в сайте A_1 . Константа скорости реакции окисления Cl_2NQ в сайте A_1 внешним акцептором MV достигала $1,5 \times 10^9$ М⁻¹ с⁻¹ (Табл. 1). Такая эффективность близка к пределу для диффузионно-контролируемых реакций (Eigen и Hammes 2006). Нами также было продемонстрировано эффективное взаимодействие Cl_2NQ в сайте A_1 с молекулярным кислородом: в отсутствие внешнего акцептора около 10% электронов уходило на кислород, что соответствует константе скорости 5×10^6 с⁻¹. Таким образом, константа скорости реакции переноса электрона от Cl_2NQ в сайте A_1 на кислород оказалась значительно выше по сравнению с константой скорости переноса электрона от терминальных железо-серных кластеров в комплексах WT.

До настоящего времени не было установлено, какие именно кофакторы ФС1 и в какой мере участвуют во взаимодействии с кислородом. Однако было показано, что на долю внутримембранных переносчиков электронов ФС1 приходится образование значительной доли супероксидного анион-радикала в фотосинтетической ЭТЦ (Miyake, Asada, 1992, Kozuleva et al., 2011). Среди всех кофакторов, ассоциированных с ФС1 только семихинонные анион-радикалы обладают достаточно низким редокс-потенциалом и достаточно долгим временем жизни для восстановления кислорода в гидрофобной области пигмент-белкового комплекса. В следующем разделе нами были детально исследованы процессы взаимодействия кислорода с комплексами ФС1 в условиях стационарного освещения и получены прямые экспериментальные свидетельства участия филлохинона в восстановлении кислорода ФС1 (см. ниже)

2. Взаимодействие комплексов ФС1 с различными экзогенными акцепторами электронов в условиях стационарного освещения.

2.1. Взаимодействие 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона с фотосистемой 1.

Выше нами были приведены данные о механизмах взаимодействия ФС1 с экзогенными акцепторами электронов ответ на единичную вспышку света.

Однако в условиях стационарного освещения механизмы электронного транспорта в ФС1 могут отличаться. В частности, при высоких интенсивностях света может наблюдаться так называемое перевосстановление кофакторов переноса электрона, когда прямой перенос электрона от терминальных кофакторов к внешним акцепторам затруднен и скорость восстановления P_{700} становится выше, чем скорость восстановления F_A/F_B природному акцептору электронов Фд. Это может приводить к увеличению времени жизни радикальных форм предшествующих кофакторов переноса электронов, в частности, филлохинона. Как было показано выше, механизмы взаимодействия внешних акцепторов электронов с ФС1 зависят в том числе от времени жизни кофакторов в восстановленном состоянии: в комплексах *menB-Cl₂NQ*, где время жизни семихинона выше, чем в других типах комплексов, увеличивается вероятность прямого взаимодействия хинона с экзогенными акцепторами электронов метилвиологеном и кислородом. Все вышесказанное делает изучение взаимодействия изолированных комплексов ФС1 с экзогенными акцепторами электронов в условиях стационарного освещения важным этапом на пути раскрытия механизмов функционирования и регуляции ФС1 *in vivo*.

Взаимодействие Cl_2NQ с ФС1 в условиях стационарного освещения было исследовано методами ЭПР-спектроскопии. В качестве модельного объекта нами были использованы комплексы F_X -core, механизмы взаимодействия которых с экзогенными акцепторами электронов сходны с таковыми в интактных комплексах ФС1, однако рекомбинация зарядов ускорена, что позволяет регистрировать более выраженные изменения в амплитуде стационарного сигнала P_{700}^+ . На Рис. 6 представлены кинетики фотоокисления и последующего восстановления фотоокисленного P_{700} в комплексах F_X -core в отсутствие добавок, а также в присутствии Asc и Cl_2NQ в различных сочетаниях. В отсутствие Asc и Cl_2NQ единственным доступным акцептором электронов от ФС1 является молекулярный кислород, константа скорости реакции которого с кофакторами ФС1 на два порядка ниже, чем константа определенная для MV (Табл.1). В этих условиях уровень фотоокисленного P_{700} в ответ на включение света растет, но стационарные значения достигаются лишь спустя 2 минуты после начала освещения. При выключении света восстановление фотоокисленного P_{700} происходит крайне медленно: полное восстановление достигается только через 20 минут темновой инкубации (не показано)

Добавление 200 мкМ Cl_2NQ приводило к значительному ускорению фотоокисления P_{700} , однако не отражалось на скорости последующего темнового восстановления P_{700}^+ . Это показывает, что Cl_2NQ является эффективным акцептором электронов для ФС1. Интересно, что добавление 10 мМ Asc приводило к резкому ускорению восстановления фотоокисленного P_{700} , что свидетельствует о появлении в среде эффективного донора электронов. При этом, скорость восстановления P_{700}^+ в присутствии Asc как единственного донора электронов была значительно ниже, чем в присутствии комбинации Asc и Cl_2NQ (Рис. 6).

Таким образом, можно заключить, что в условиях стационарного освещения Cl_2NQ является не только эффективным акцептором электронов от терминальных кофакторов ФС1, но и медиатором переноса электрона между восстановленным Asc и P_{700}^+ .

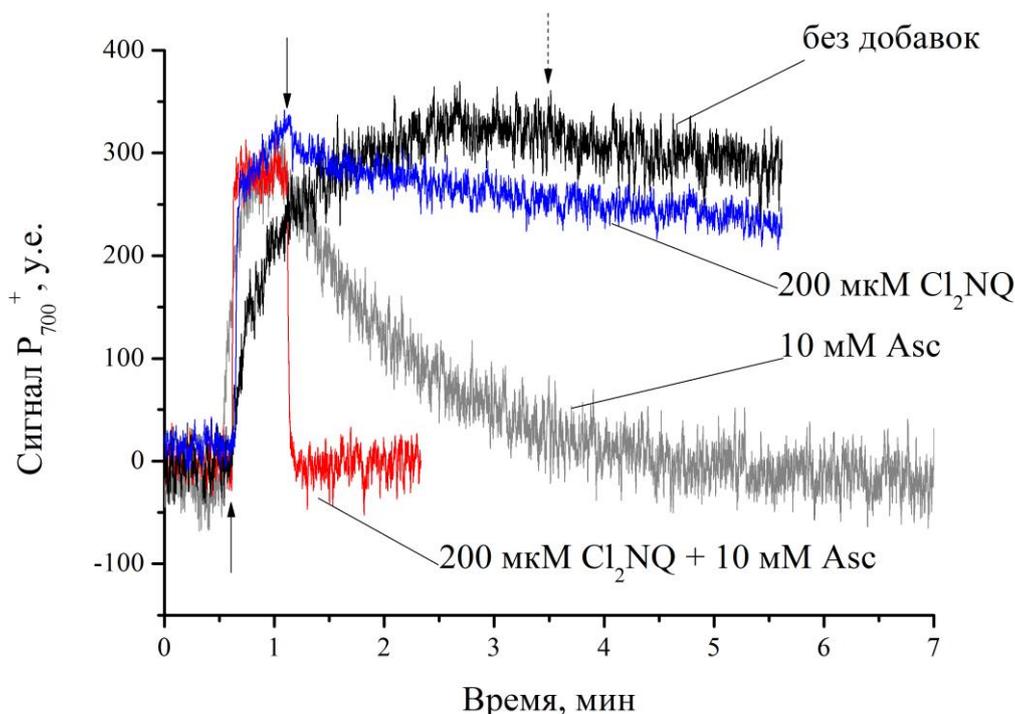


Рис.6. Кинетика светозависимых изменений амплитуды сигнала ЭПР P_{700}^+ в F_x -сое комплексах.

2.2. Взаимодействие 2,6-дихлорфенолиндофенола и N,N,N',N' -тетраметил-*p*-фенилендиамин с фотосистемой I.

Редокс-медиаторы N,N,N',N' -тетраметил-*p*-фенилендиамин (TMPD) и 2,6-дихлорфенолиндофенол (DCPIP) широко применяются для изучения механизмов переноса электрона в фотосинтетических реакционных центрах. С целью сравнения эффективности TMPD и DCPIP как доноров электронов в условиях стационарного освещения мы измерили влияние концентрации этих медиаторов на амплитуду стационарного сигнала фотоокисленного P_{700} (ΔP_{700}^+) комплексах WT (Рис.7). Измерения оптической плотности в диапазоне длин волн 810-860 нм проводились с помощью в присутствии избытка Asc и MV. В этих условиях скорость-лимитирующей стадией переноса электрона является восстановление P_{700}^+ редокс-медиаторами.

При увеличении концентрации обоих медиаторов наблюдалось падение амплитуды сигнала P_{700}^+ , однако эффект DCPIP был более выраженным, что указывает на большую эффективность восстановленного DCPIP как донора электронов для P_{700}^+ , по сравнению с TMPD.

Для более полной характеристики взаимодействия комплексов ФС1 с TMPD и DCPIP в условиях стационарного освещения, была измерена скорость поглощения кислорода (V_{O_2}) в присутствии восстановленных избытком Asc TMPD или DCPIP (Рис.8).

В присутствии MV значения V_{O_2} были значительно выше в присутствии DCPIP. Это также показывает, что восстановленный DCPIP является более эффективным донором электронов для ФС 1, чем TMPD, и согласуется с данными измерений амплитуды сигнала P_{700}^+ .

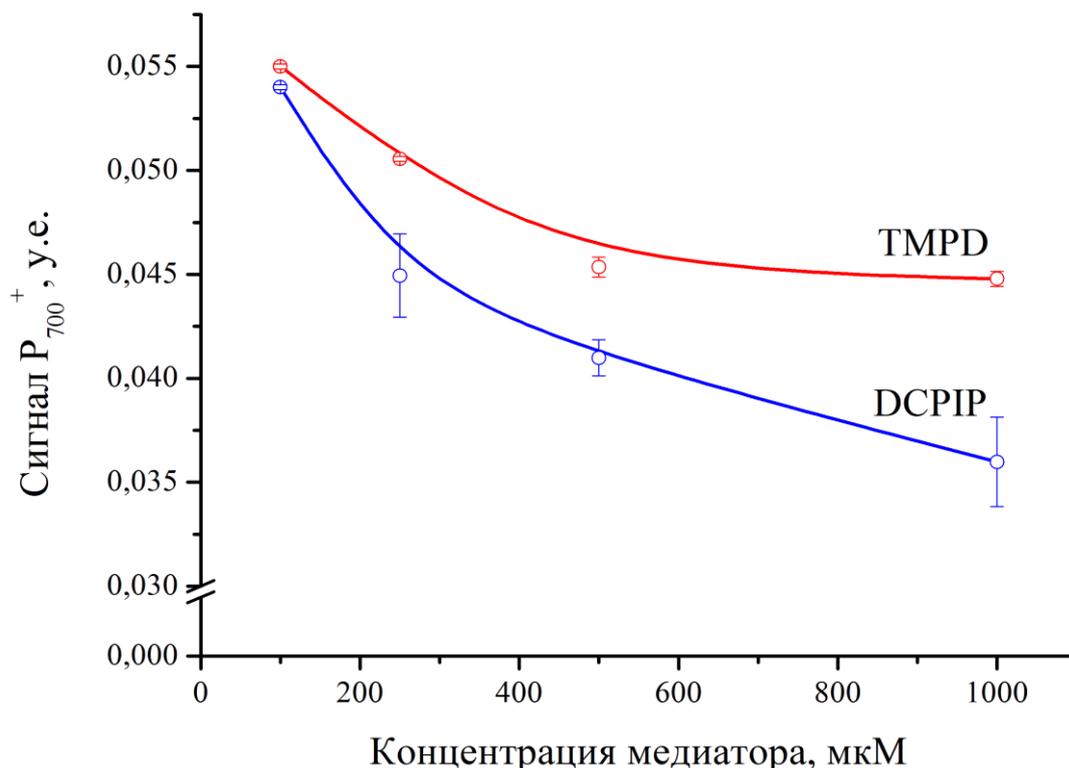


Рис.7. Зависимость амплитуды сигнала P_{700}^+ от концентрации редокс-медиаторов TMPD и DCPIP. Измерения проводились в присутствии 10 мМ Asc и 100 мкМ MV.

В отсутствие MV увеличение концентрации TMPD не влияло на V_{O_2} , хотя в его присутствии значение V_{O_2} увеличивалось. Таким образом, отсутствие концентрационной зависимости V_{O_2} в отсутствие MV было обусловлено не слабой донорной эффективностью TMPD, а тем, что лимитирующей стадией является перенос электрона от кофакторов ФС1 к O_2 .

В случае DCPIP V_{O_2} линейно увеличивалась во всем исследуемом диапазоне концентраций (Рис. 8). По-видимому, в этом случае перенос электрона от кофакторов ФС1 к O_2 не является скорость-лимитирующей стадией суммарной реакции. Добавление MV приводило к существенному увеличению V_{O_2} , однако изменяло характер зависимости. Эти данные дают основания полагать, что в присутствии DCPIP происходит окисление

терминальных кофакторов ФС1 экзогенным акцептором электронов, который кроме того способен подобно MV восстанавливать кислород.

Наиболее вероятным кандидатом на роль такого акцептора представляется окисленная форма DCRIP (DCRIP^{OX}), которая присутствует в среде инкубации несмотря на избыток Asc. Расчеты показывают, что в этих условиях концентрация DCRIP^{OX} на три порядка ниже, чем концентрация восстановленной формы DCRIP, однако все еще выше, чем концентрация комплексов ФС1 (Gopta et al., 2008). Полученные данные позволяют предположить, что DCRIP^{OX} способен выступать в качестве акцептора электронов от ФС1 и, также как и MV, впоследствии восстанавливать O_2 .

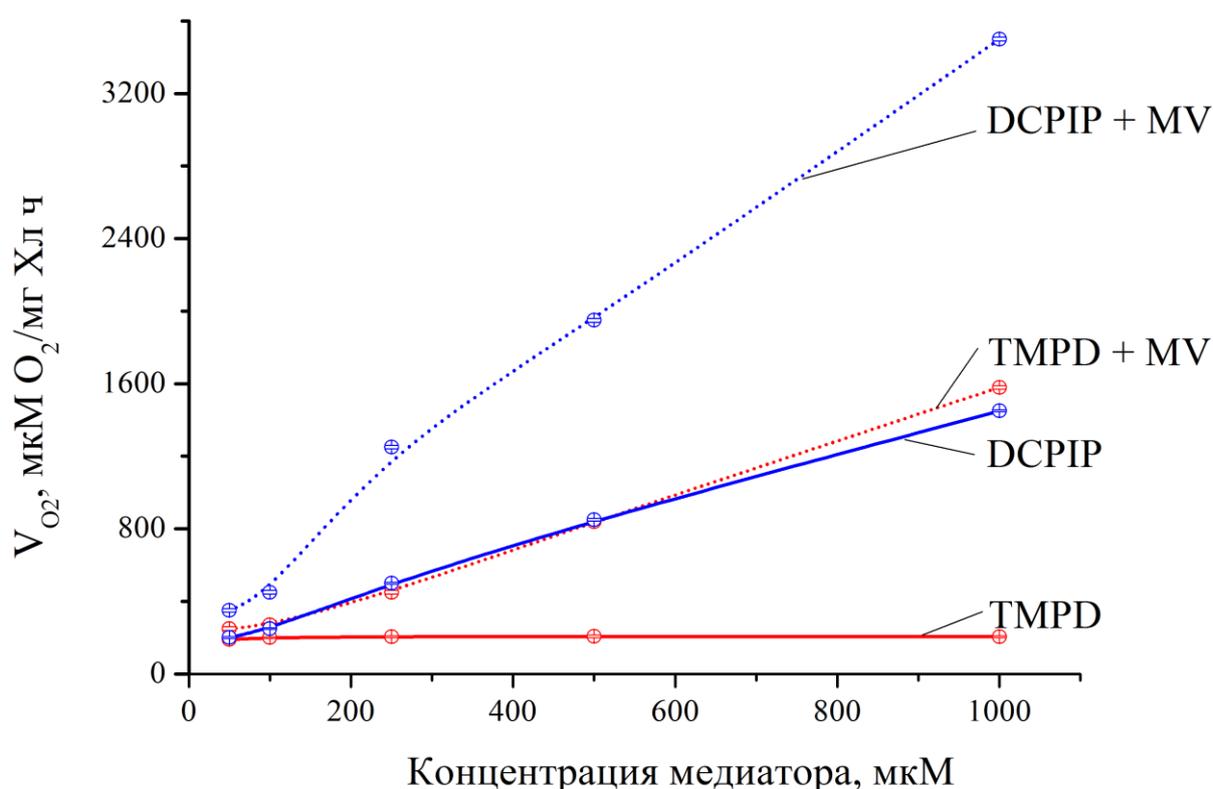


Рис.8. Зависимость скорости поглощения кислорода интактными комплексами ФС1 дикого типа от концентрации редокс-медиаторов TMPD и DCRIP в присутствии и в отсутствие экзогенного акцептора электронов MV. Измерения проводились в присутствии 10 мМ Asc.

Взаимодействие DCRIP^{OX} с терминальными кофакторами переноса электрона в ФС 1 должно влиять на эффективность восстановления MV, что можно оценить путем измерения константы Михаэлиса (K_m) этой реакции.

При расчете K_m восстановления MV железо-серными кластерами ФС1 мы учитывали, что, скорость-лимитирующей стадией в цепи реакций $F_B \rightarrow MV \rightarrow \text{O}_2$ является восстановление MV ФС1, и, следовательно, именно скорость этой реакции определяет V_{O_2} . Кроме того, вклад прямого восстановления O_2 ФС1 в

присутствии MV был аннулирован путем вычитания значения V_{O_2} в отсутствие MV из V_{O_2} в присутствии MV.

Значение K_m реакции восстановления MV железно-серными кластерами ФС1 зависело от того, какое соединение использовалось в качестве медиатора: в случае DCPIP оно оказалось выше ($4.92 \pm 0.14 \mu M$), чем в случае TMPD ($1.39 \pm 0.13 \mu M$). Эти данные демонстрируют существование конкуренции между MV и DCPIP^{OX} за электроны от ФС1.

Полученный результат указывает на сходство механизмов взаимодействия DCPIP^{OX} и MV с ФС 1. Поскольку MV принимает электроны от терминального железно-серного кластера F_B (Fujii et al, 1990, Mamedov et al., 1998), то можно предположить аналогичный механизм восстановления DCPIP^{OX}.

2.3. Взаимодействие молекулярного кислорода с фотосистемой 1.

Недавно было выдвинуто предположение об участии локализованных в гидрофобной части белка редокс-кофакторов ФС1 в восстановлении кислорода в условиях стационарного освещения. Известно, что в тилакоидных мембранах высших растений при высоких интенсивностях света вклад находящихся в липофильном окружении кофакторов в восстановление кислорода весьма значителен (Kozuleva et al., 2011). Восстановленный филлохинон в сайте A_1 по своим термодинамическим характеристикам и временем жизни в восстановленном состоянии является единственным подходящим кандидатом на роль кофактора, восстанавливающего кислород в таких условиях. Он обладает достаточно низким значением E_m для восстановления кислорода, потенциал которого в гидрофобной среде составляет -600 мВ, а его окисление железно-серным кластером F_X является скоростью-лимитирующей стадией переноса электрона в ФС1. В этих условиях даже небольшой сдвиг редокс-потенциала хинонного кофактора будет сказываться на скорости поглощения кислорода.

Нами было изучено взаимодействие с кислородом комплексов ФС1, содержащих нативный PhQ (WT) и комплексов *menB-PQ*, содержащих в сайте связывания A_1 PQ, характеризующийся на ~100 мВ более положительным редокс-потенциалом (Semenov et al., 2000).

Скорости поглощения кислорода в случае комплексов *menB-PQ* при низких и средних интенсивностях света были сходны со скоростями, наблюдаемыми в случае WT. Однако если в случае комплексов WT V_{O_2} росла практически линейно во всем диапазоне увеличения интенсивностей света, то для комплексов *menB-PQ* зависимость выходила на плато, и при интенсивностях света свыше $650 \mu E m^{-1} s^{-1}$ скорости переноса электронов на кислород в *menB-PQ* оказывались значительно ниже, чем в комплексах дикого типа (Рис.9). Интересно отметить, что добавление MV к препаратам *menB-PQ* приводило к увеличению V_{O_2} и к линейному росту этого параметра даже при высокой интенсивности света. Однако значения V_{O_2} в присутствии MV при низких интенсивностях света в случае *menB-PQ* были ниже, чем в случае WT, а при высоких интенсивностях значения становились одинаковыми в обоих

типах комплексов. Это соответствует данным о более низкой акцепторной эффективности MV в случае комплексов *menB-PQ* в сравнении с WT при импульсном освещении.

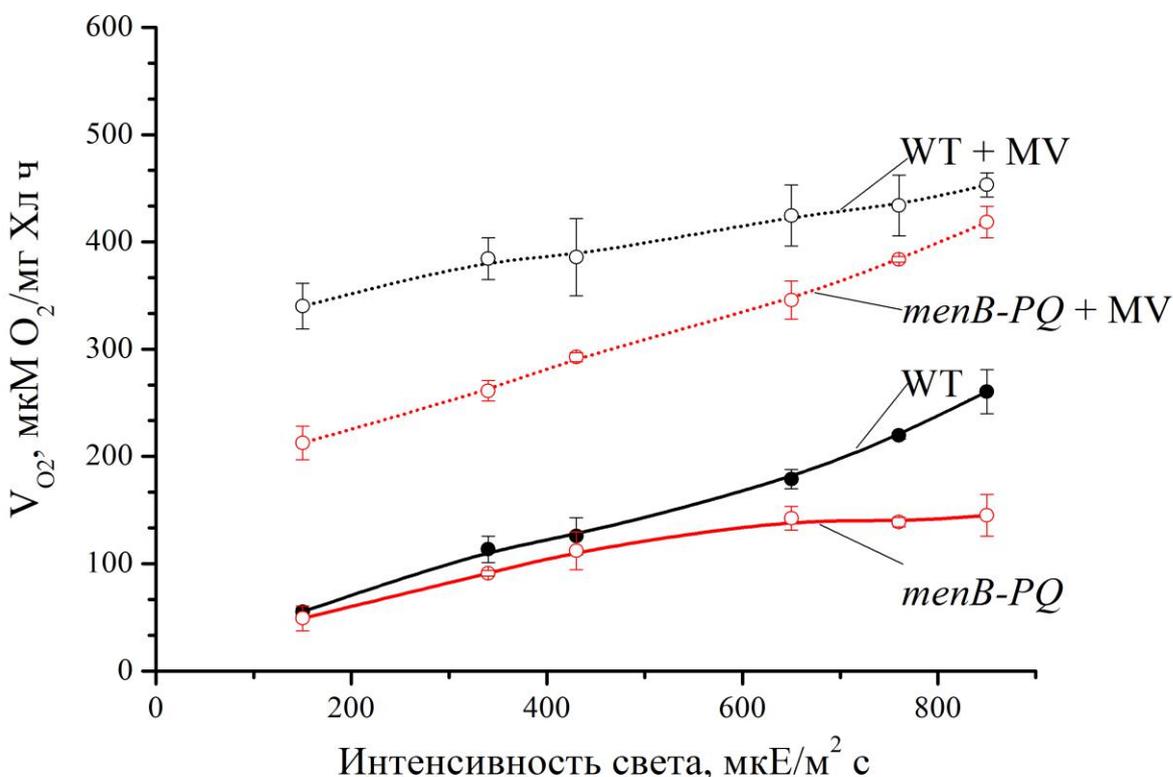


Рис. 9. Зависимость скорости поглощения кислорода от интенсивности освещения в присутствии и в отсутствие MV в комплексах ФС1 из дикого типа, содержащих филлохинон и из мутантного штамма *menB*, содержащих PQ.

Полученные данные показывают, что эффективность восстановления кислорода комплексами WT и *menB-PQ* различна. Можно предположить, что с увеличением интенсивности света в комплексах WT увеличение поглощения кислорода происходит за счет роста вклада от восстановления кислорода PhQ в сайте A₁. В то же время, в *menB-PQ* этот путь функционирует менее эффективно вследствие меньшей величины ΔG реакции переноса электрона от PQ в сайте A₁ на кислород. В этих препаратах перенос электронов на кислород должен происходить преимущественно с железо-серных кластеров даже в условиях высокой интенсивности света, что приводит к уменьшению V_{O2} по сравнению с комплексами WT.

ВЫВОДЫ

1. Впервые продемонстрированы электронакцепторные свойства высокопотенциального производного нафтохинона - Cl₂NQ, применяемого для реконструкции в хинон-связывающий сайт ФС1.

- Показано, что Cl_2NQ является более эффективным акцептором электронов для ФС1, чем традиционно используемый акцептор MV.
2. Количественно описано влияние скорости реакций обратного переноса электрона на эффективность взаимодействия ФС1 с экзогенными акцепторами электронов. Ускорение процесса рекомбинации зарядов в комплексах F_x-core и ФС1 из мутантного штамма *menB* приводило к существенному снижению эффективности взаимодействия с экзогенными акцепторами электронов.
 3. Выявлена возможность прямого восстановления экзогенного акцептора электронов MV от хинонного кофактора для комплексов ФС1 из мутантного штамма *menB*, содержащих в хинон-связывающем сайте A₁ высокопотенциальный Cl_2NQ .
 4. На основе данных кинетического моделирования рассчитаны значения редокс-потенциалов филлохинонов в сайте A₁ ФС1 в симметричных ветвях редокс-кофакторов A и B и пластохинона в ветви A.
 5. Показано, что Cl_2NQ является эффективным акцептором электронов от ФС1, в условиях как импульсного, так и стационарного освещения, а также медиатором переноса электронов от восстановленного аскорбата к фотоокисленному P₇₀₀ в условиях стационарного освещения.
 6. Продемонстрировано, что окисленная форма DCPIP является эффективным акцептором электронов от ФС1 и восстановителем молекулярного кислорода.
 7. Показано, что филлохинон в сайте A₁ участвует в восстановлении кислорода комплексами ФС1 при высокой интенсивности стационарного освещения.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах индексируемых в международных системах цитирования Web of Science, Scopus

1. Kozuleva M.A., **Petrova A.A.**, Mamedov M.D., Semenov A.Yu, Ivanov B.N. O₂ reduction by Photosystem I involves phylloquinone under steady-state illumination. // FEBS Letters. 2014. Т. 588. №23. С. 4364–4368 DOI 10.1016/j.febslet.2014.10.003

2. Kozuleva M.A., Vetoshkina D.V., **Petrova A.A.**, Borisova-Mubarakshina M.M., Ivanov B.N. 2015 The study of oxygen reduction in photosystem I of higher plants using electron donors for this photosystem in intact thylakoids. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2015. Т. 9. № 4. С. 246-251 DOI 10.7868/S0233475514060024

3. Semenov A.Yu, **Petrova A.A.**, Mamedov M.D., Nadtochenko V.A., 2015 Electron transfer in photosystem I containing native and modified quinone acceptors. // Biochemistry (Moscow). 2015. Т. 80. № 6. С. 654-661 DOI 10.1134/S0006297915060024

4. **Petrova A. A.**, Boskhomdzhieva B. K., Milanovsky G. E., Koksharova O. A., Mamedov M. D., Cherepanov D. A., Semenov A. Yu. Interaction of various types

of Photosystem I complexes with exogenous electron acceptors. // *Photosynthesis Research*. 2017. Т. 133. С. 175-184 DOI 10.1007/s11120-017-0371-1

5. Milanovsky G.E., **Petrova A.A.**, Cherepanov D.A., Semenov A.Yu. Kinetic modelling of electron transfer reactions in Photosystem I complexes of various structure with substituted quinone acceptors. // *Photosynthesis Research*. 2017. Т. 133. С. 185-199 DOI: 10.1007/s11120-017-0366-y

6. Cherepanov D.A., Milanovsky G.E., **Petrova A.A.**, Tikhonov A.N., and Semenov A.Yu. Electron transfer through the acceptor side of photosystem I: interaction with exogenous acceptors and molecular oxygen. // *Biochemistry (Moscow)*. 2017. Т. 82. С. 1249-1268.

Тезисы докладов

1. А.А. Петрова, Г.Е. Милановский, Б.К. Босхомджиева, Д.А. Черепанов, М.Д. Мамедов, А.Ю. Семёнов Взаимодействие различных типов комплексов фотосистемы I с экзогенными акцепторами электронов. // VIII Съезд Российского фотобиологического общества. Всероссийская конференция "Современные проблемы фотобиологии". пос. Шепси, Краснодарский край, Россия. 2017. Сборник тезисов. С. 27.

2. Petrova A.A., Shelaev I.V., Gostev F.E., Mamedov M.D., Nadtochenko V.A., Golbeck J. H., Semenov A.Yu. Substitutions of asparagines N591PsaB and N604PsaA in cyanobacterial Photosystem I reveal the involvement of the accessory chlorophyll molecules (Chl2A/Chl2B) in electron transfer. // 17th International Congress on Photosynthesis Research. *Photosynthesis in a Changing World.*, Маастрихт, Нидерланды. 2016. Сборник тезисов. С.202.

3. Petrova A.A., Milanovsky G.E., Boskhomdzhieva B.**К.**, Mamedov M.D., Semenov A.Yu. Interaction of the Photosystem I complexes containing different quinones in the A1-site with exogenous electron acceptors. // 7th International Conference. *Photosynthesis Research for Sustainability-2016*, Пущино, Россия. 2016. Сборник тезисов. С. 97.

4. Petrova A. A., Boskhomdzhieva B. K., Trubitsin B. V., Tikhonov A. N., Mamedov M. D., Semenov A. Yu. Interaction of quinones in the A1-site of Photosystem I with electron acceptors. // International Workshop of the Russian Photobiological Society "Primary Electron Transfer in Photosynthetic Reaction Centers", Псков, Россия. 2015.

5. А.А. Петрова, Б.К. Босхомджиева, Б.В. Трубицин, А.Н. Тихонов, М.Д. Мамедов, А.Ю. Семенов Роль филлохинона в процессах переноса электрона в фотосистеме I. // XXI Пущинские чтения по фотосинтезу и всероссийская конференция «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты», Пущино, Россия. 2015. Сборник тезисов. С. 70.

6. Petrova A.A., Trubitsin B.V., Tikhonov A.N., Semenov A.Y. Interaction of Methylviologen with Electron Acceptors of Photosystem I. // *Photosynthesis Research for Sustainability: in honor of Jalal A. Aliyev*, Баку, Азербайджан, 2013. Сборник тезисов. С. 61.