

На правах рукописи

КУЗЬМИНОВ Федор Игоревич

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ НЕФОТОХИМИЧЕСКОГО
ТУШЕНИЯ В ЦИАНОБАКТЕРИЯХ МЕТОДАМИ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

01.04.05 – оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре квантовой электроники физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор Фадеев Виктор Владимирович.

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор Горелик Владимир Семёнович,
Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, заведующий лабораторией;

доктор физико-математических наук,
профессор Кукушкин Александр Константинович,
кафедра биофизики физического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор.

Ведущая организация: Научный центр волновых исследований учреждения
Российской академии наук Института общей физики
им. А.М. Прохорова РАН (филиал), Москва.

Защита состоится “ 16 ” мая 2012 года в 15 часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 501.001.45 на базе Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.5 (19-й корпус Научно-исследовательского института ядерной физики имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М. В. Ломоносова), ауд. 2-15

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке НИИЯФ имени Д.В. Скобельцына МГУ имени М. В. Ломоносова

Автореферат разослан “ 10 ” апреля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Д 501.001.45 на базе Московского государственного
университета имени М.В.

Ломоносова

кандидат физ.-мат. наук

Вохник О.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Фотосинтез – многостадийный процесс, направленный на преобразование энергии света в энергию химических связей синтезируемых органических соединений. В этом процессе выделяют первичные, фотофизические стадии - поглощение света светособирающими пигментами, перенос энергии возбуждения между пигментами светособирающего комплекса и с него на реакционный центр (РЦ), разделение зарядов в РЦ и др. К ним можно отнести и механизмы защиты фотосинтетического аппарата от избыточного освещения, приводящего к накоплению молекул пигментов в возбуждённых состояниях с последующей генерацией высокоактивного синглетного кислорода. Эти фотопротекторные механизмы, в конечном счёте, направлены на тушение (деактивацию) возбуждённых состояний молекул светособирающих пигментов и получили название «нефотохимическое тушение», в отличие от фотохимического тушения, обусловленного разделением зарядов в РЦ. Нефотохимическое тушение (НФХТ) возбуждённых состояний светособирающих пигментов приводит к появлению дополнительного канала дезактивации возбуждений, в результате чего уменьшаются квантовые выходы других процессов (фотохимического тушения, флуоресценции и др.), что, как правило, проявляется в тушении флуоресценции тех или иных пигментов.

Цианобактерии – старейшие организмы, способные к кислородному фотосинтезу – входят в состав фитопланктона (наряду с микроводорослями) и играют важную роль в функционировании глобальной экосистемы Земли, являясь основными первичными продуцентами во многих экосистемах и обеспечивая производство значительной доли первичной продукции на планете. Фотофизические процессы в цианобактериях имеют ряд принципиальных отличий от таковых в других классах фотосинтезирующих организмов (например, водорослей и высших растений). Эти особенности обусловлены, прежде всего, строением фотосинтетического аппарата. Процесс поглощения излучения осуществляется у цианобактерий как молекулами хлорофилла *a* (Хл-а) и каротиноидов (как и в водорослях), так и особыми пигментами – фикобилинами, структурированными в виде внемембранных светособирающих комплексов, фикобилисом (ФБС). В состав ФБС входят различные светособирающие пигменты, которые поглощают свет в широком диапазоне длин волн (490-650 нм) и обеспечивают эффективную миграцию возбуждений по светособирающей антенне, а также обладают отличным от нуля квантовым выходом флуоресценции. Это приводит к тому, что, в отличие от микроводорослей, в спектре флуоресценции цианобактерий, помимо полосы флуоресценции Хл-а, присутствует ещё несколько полос, обусловленных флуоресценцией этих пигментов, что, с одной стороны, усложняет модель фотофизических процессов, но, с другой, даёт дополнительные возможности для диагностики состояния фотосин-

тетического аппарата цианобактерий методами флуоресцентной спектроскопии, если эти сложности удаётся преодолеть.

Наличие особенностей в строении и функционировании светособирающего комплекса у цианобактерий предполагает наличие особых (отличных от водорослей и высших растений) механизмов защиты от избыточного освещения - НФХТ. Действительно, сравнительно недавно было показано возникновение тушения флуоресценции фикобилинов и Хл-а при освещении клеток цианобактерий синезеленым светом, что обусловлено наличием специфического только для этих организмов механизма НФТХ. Последующие исследования выявили ряд особенностей данного процесса. В частности, было показано, что ключевую роль в данном процессе играет особый белок (ОСР – Orange Carotenoid-binding Protein), содержащий молекулу каротиноида (3'-hydroxechinenone). При поглощении кванта света изменения в структуре каротиноида вызывают структурные изменения белка, что в конечном итоге приводит к тушению флуоресценции фикобилинов и Хл-а. Процесс НФХТ подробно исследовался методами рентгеноструктурного анализа, конфокальной микроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, фемтосекундной абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, а также рядом других экспериментальных техник для выявления структурных особенностей взаимодействующих компонент, стадий процесса тушения, изменения процессов переноса возбуждения по светособирающей антенне цианобактерий при активации тушения и т.п.

К началу исследований по теме диссертации, несмотря на значительное количество экспериментального материала, оставался не до конца ясным ряд важных деталей механизма данного тушения (взаимодействие отдельных компонент, число и последовательность стадий данного процесса, точное место тушения и др.). В большой степени это связано с тем, что применявшиеся методы не обеспечивали определения необходимого для построения соответствующих математических моделей набора фотофизических параметров молекул, участвующих в процессе НФХТ.

Цель работы.

Целью данной диссертационной работы являлось развитие новых подходов во флуоресцентной спектроскопии применительно к исследованию фотофизических процессов в светособирающих комплексах фотосинтезирующих организмов - цианобактерий как системах с несколькими взаимодействующими флуорофорами и построение, на этой основе, модели процесса нефотохимического тушения в цианобактериях. Предполагалось, что в основу развиваемых подходов будет положено совместное применение современных, высокоинформативных методов флуоресцентной спектроскопии – метода индукции и релаксации флуоресценции (Fluorescence Induction and Relaxation, FIRE), метода модуляции амплитуды им-

пульсов (Pulse Amplitude Modulation, PAM) и нелинейной лазерной флуориметрии (НЛФ).

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

1. Адаптация выбранных методов флуоресцентной спектроскопии к специфике фотофизических процессов в цианобактериях и родственных им природных органических комплексов с несколькими типами флуорофоров в условиях их высокой локальной концентрации.
2. Построение модели формирования центра тушения возбужденных состояний пигментов светособирающей антенны цианобактерий при избыточном освещении.
3. Построение моделей формирования флуоресцентного отклика светособирающих пигментов цианобактерий при возбуждении флуоресценции наносекундными лазерными импульсами и определение максимального набора параметров, восстанавливаемых из кривых насыщения флуоресценции в результате решения обратной задачи.
4. Исследование механизмов нефотохимического тушения в цианобактериях: определение характеристик формирования центра тушения при избыточном освещении, влияния избыточного освещения на фотофизические параметры светособирающих пигментов и выявление, на этой основе, мишеней воздействия тушащего центра.

Научная новизна работы.

1. Предложены модели формирования флуоресцентного отклика в системах с высокой локальной концентрацией нескольких типов взаимодействующих флуорофоров при возбуждении наносекундными импульсами лазерного излучения в линейном и нелинейном режимах.
2. Предложена модель, описывающая процесс образования центра тушения возбужденных состояний светособирающих пигментов в антенне цианобактерий.
3. Определены значения молекулярных фотофизических параметров светособирающих пигментов цианобактерии *in vivo* (на примере культуры *Synechocystis* sp. PCC 6803): сечений возбуждения, времен жизни возбужденных состояний и максимальных скоростей синглет-синглетной аннигиляции.
4. Методами флуориметрии определены значения параметров предложенной в диссертационной работе модели формирования тушащего центра в цианобактериях при избыточном освещении - скоростей переходов между различными стадиями процесса формирования тушащего центра, исследованы зависимости этих скоростей от температуры, а также зависимость характеристик тушения от световых условий, при которых выращивались культуры цианобактерий.
5. С использованием нелинейной лазерной флуориметрии определено, какие пигменты являются мишенями нефотохимического тушения в цианобактериях, и получена оценка эффективности этого тушения.

Научная и практическая значимость.

Полученные в диссертационной работе результаты могут найти применение для решения следующих фундаментальных и прикладных задач флуоресцентной спектроскопии природных органических соединений и комплексов, в биофизике фотосинтеза, в экологическом мониторинге водных систем:

- исследовании процессов миграции энергии в системах с несколькими типами флуорофоров;
- исследовании динамики систем с несколькими взаимодействующими пигмент-белковыми комплексами;
- получении новых знаний о первичных процессах фотосинтеза в различных классах фотосинтезирующих организмов;
- использовании флуоресцентных характеристик цианобактерий для биоиндикации состояния водных экосистем.

Положения, выносимые на защиту.

1. Измерения кинетических характеристик тушения флуоресценции при избыточном освещении сине-зеленым светом позволяют выявить, по крайней мере, три стадии в процессе формирования центра тушения возбужденных состояний светособирающих пигментов цианобактерий и определить характерные времена этих стадий.
2. Метод нелинейной лазерной флуориметрии позволяет определять из кривых насыщения флуоресценции нескольких взаимодействующих флуорофоров в комплексах с их высокой локальной концентрацией (в частности, в цианобактериях) до четырёх фотофизических параметров каждого из флуорофоров: сечение возбуждения, время линейной дезактивации возбужденных состояний, максимальную скорость синглет-синглетной аннигиляции и квантовый выход флуоресценции.
3. Метод нелинейной лазерной флуориметрии позволяет определить, какие пигменты являются мишенями нефотохимического тушения в цианобактериях, и сделать оценку эффективностей этого тушения, а также получить информацию о структурных изменениях в светособирающей антенне при избыточном освещении.

Достоверность результатов.

Достоверность результатов обеспечивается проработкой и многократной апробацией методик и тщательностью спектральных измерений, которые были проведены на аппаратуре высокого качества, а также контролем повторяемости результатов экспериментов и отсутствием противоречий между полученными данными и данными других исследовательских групп, приведенными в цитируемой литературе.

Апробация работы и публикации и публикации.

Полученные в диссертационной работе результаты докладывались на следующих международных конференциях: SPIE Photonics Europe (12–16 апреля 2010 года, Брюссель, Бельгия); XII International Conference on Laser Applications in Life Sciences (9–11 июня 2010 года, Оулу, Финляндия); ASLO/NABS 2010 Joint Summer Meeting (6-11 июня 2010 года, Санта-Фе, США); International Workshop “Mechanisms of Non-Photochemical Quenching” (6–10 апреля 2011 года, Пассау, Германия); ESF conference “Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria: From Cell to Community” (10-15 апреля 2011 года, Сант-Фелиу-де-Кодинес, Испания); XIX International Conference on Advanced Laser Technologies (3–8 сентября 2011 года, Золотые пески, Болгария). Большинство из этих докладов были представлены автором диссертации лично.

Автором опубликовано 35 научных работ, в том числе 24 работы по теме диссертации, из них 5 статей в журналах (4 из списка ВАК России) и 5 статей в трудах конференций и сборниках статей, 14 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, трех содержательных глав, заключения и списка литературы из 95 наименований. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, включая 33 рисунка и 5 таблиц.

Личный вклад автора.

Все представленные в диссертации результаты получены автором лично, либо при его определяющем участии в постановке задач, разработке методик и проведении экспериментов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность темы диссертации, формулируются цель и задачи исследований, приводятся положения, выносимые на защиту, кратко излагается содержание диссертации.

В первой главе на основе анализа литературы приводятся необходимые сведения об устройстве и функционировании фотосинтетического аппарата цианобактерий, описаны процессы переноса возбуждения по светособирающей антенне и механизмы защиты от избыточного освещения в цианобактериях.

§1.1.1 содержит общие сведения о цианобактериях и затрагивает вопросы происхождения, среды обитания и классификации цианобактерий. **§1.1.2** посвящен изложению вопросов касающихся строения и функционирования различных элементов клетки цианобактерий, в частности, основное внимание уделяется особенностям строения фотосинтетического аппарата и его отличительным признакам по сравнению с другими фотосинтезирующими организмами.

В §1.2 изложены сведения о световых стадиях фотосинтеза в цианобактериях. В §1.2.1 даются общие сведения о процессе и этапах фотосинтеза характерных для различных фотосинтезирующих организмов и, в том числе, для цианобактерий. §1.2.2 посвящен изложению общепринятых на сегодняшний день сведений о первичных стадиях фотосинтеза (поглощение квантов света и миграция возбужденных состояний пигментов по светособирающей антенне) в цианобактериях. Приводятся спектральные характеристики светособирающих пигментов и характерные времена переноса возбуждений между ними. В §1.2.3 излагаются основные сведения о механизмах фотопротекции в фотосинтетическом аппарате цианобактерий. Описываются особенности протекания данного процесса именно у цианобактерий по сравнению с водорослями и растениями. Делается вывод о том, что в процессе НФХТ в цианобактериях можно выделить две стадии: стадию формирования тушащего центра под действием избыточного сине-зеленого освещения и стадию тушения этим центром возбужденных состояний пигментов расположенных в светособирающей антенне цианобактерий. Дается оценка состояния исследований механизмов НФХТ, на основании которой делается заключение о необходимости развития новых подходов к решению этой проблемы.

Вторая глава посвящена исследованию механизма формирования центра тушения при индукции механизма НФХТ: дается описание методов переменной флуоресценции, приводятся экспериментальные данные по исследованию кинетики формирования центра тушения на различных культурах цианобактерий и предлагается многостадийная модель формирования центра тушения.

§2.1 посвящен описанию методов переменной флуоресценции (метода индукции и релаксации флуоресценции (FIRe) и метода амплитудной импульсной модуляции (РАМ)) (§2.1.1) и полученных с помощью них результатов исследования процесса формирования центра тушения возбужденных состояний светособирающих пигментов (§2.1.2).

При помощи метода FIRe было обнаружено существенное тушение максимального и минимального уровней флуоресценции (соответствующих различным состояниям фотосинтетического аппарата), а также уменьшение функционального сечения фотосистемы 2 (рис. 1). Совокупное изменение данных параметров позволяет сделать вывод о том, что тушение флуоресценции происходит за счет уменьшения эффективности утилизации падающего света, что проявляется в уменьшении функционального сечения фотосистемы, и не связано с изменением состояния фотосинтетического аппарата на дальнейших стадиях фотосинтеза.

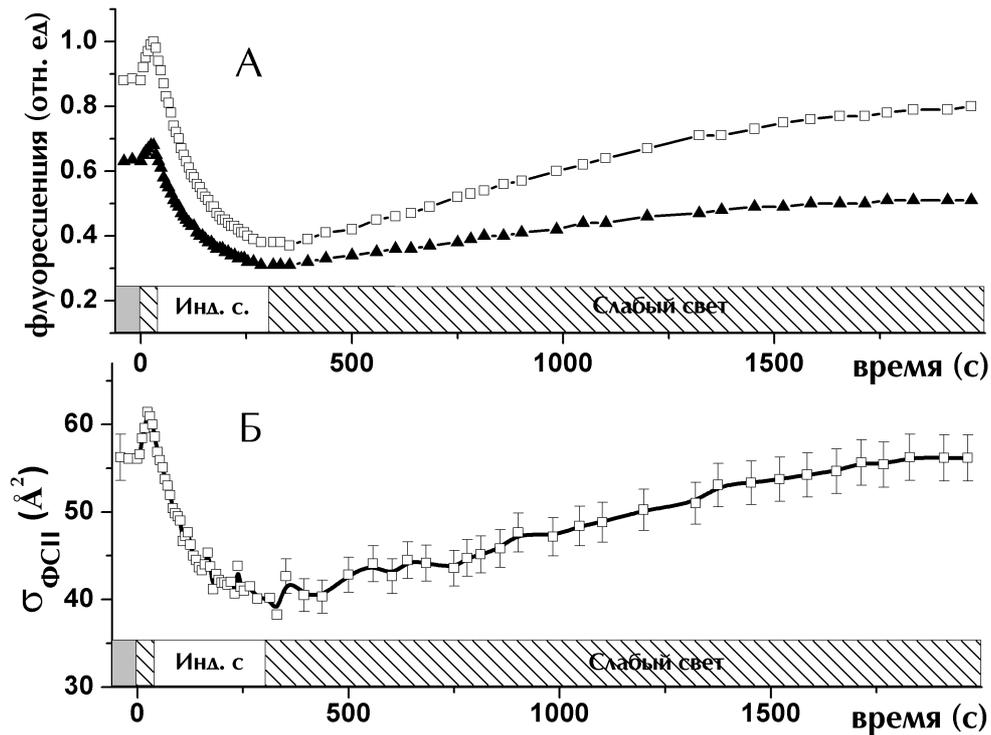


Рис 1. Кривые тушения и восстановления флуоресценции при индукции механизма нефотохимического тушения в цианобактерии *Synechocystis sp. PCC 6803*. (А) Кинетика максимального уровня флуоресценции, F_m (квадраты) и минимального уровня флуоресценции, F_o (треугольники) при освещении синим светодиодом с интенсивностью 4 мВт/см^2 и длиной волны в максимуме испускания 470 нм (полуширина 30 нм). (Б) Кинетика функционального сечения поглощения фотосистемы II ($\sigma_{\text{ФСII}}$). Восстановление измерялось при слабой синей засветке с интенсивностью $<1 \text{ мВт/см}^2$ (наличие освещения данной интенсивности при измерении кинетических кривых недостаточно для индукции механизма нефотохимического тушения, но необходимо в силу особенностей процессов происходящих в светособирающем аппарате цианобактерий).

Использование различного освещения для индукции НФХТ позволило выявить зависимость скорости тушения флуоресценции от характера падающего света: при малых интенсивностях скорость тушения пропорциональна интенсивности освещения, при больших – происходит насыщение величины данной скорости (рис. 2). Амплитуда и скорость тушения также зависели от спектральных характеристик индуцирующего света – максимальный эффект наблюдался при освещении светом в диапазоне длин волн $450 - 520 \text{ нм}$. Эти данные могут свидетельствовать о том, что выражение для скорости НФХТ представляет собой суперпозицию элементов как зависящих, так и не зависящих от интенсивности индуцирующего освещения. При этом скорость восстановления уровня флуоресценции после выключения индуцирующего освещения от характера предшествующего освещения не зависела.

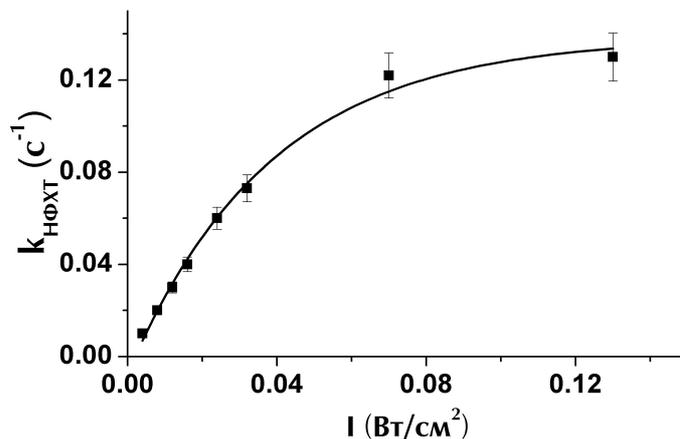


Рис 2. Характерная зависимость скорости нефотохимического тушения от интенсивности синей светодиодной засветки.

При освещении светом высокой интенсивности ($I > 10 \text{ мВт/см}^2$) в течение 1-3 секунд у исходной культуры *Synechocystis* sp. PCC 6803 было обнаружено наличие тушения флуоресценции и после выключения индуцирующего света, т.н. «темновая» фаза тушения. Это является дополнительным свидетельством того, что выражение для скорости НФХТ содержит элементы, не зависящие от характера индуцирующего освещения. Для более детального исследования данной фазы НФХТ в работе использовалась генетически модифицированная культура *Synechocystis* sp. PCC 6803, у которой полностью отсутствуют фотосистемы (и, соответственно, Хл-а), что проявляется в увеличении амплитуды НФХТ (в том числе и «темновой» фазы). «Темновое» тушение в генетически модифицированной культуре (измеренное с помощью РАМ флуориметра) наблюдается при более низких интенсивностях индуцирующего света, чем в случае исходной культуры, и позволяет обнаружить зависимость амплитуды «темновой» фазы НФХТ от интенсивности индуцирующего света (рис. 3). Поскольку длительность освещения при различных интенсивностях оставалась постоянной (1 с), можно сделать вывод о зависимости амплитуды тушения от дозы облучения, что свидетельствует о накоплении в течении действия индуцирующего освещения неких промежуточных состояний центра тушения, которые затем, трансформируясь во время «темновой» фазы в активное тушащее состояние, приводят к тушению флуоресценции. Наличие насыщения в зависимости амплитуды «темновой» фазы тушения от интенсивности индуцирующего света (при этом максимальная амплитуда «темнового» тушения в несколько раз меньше амплитуды тушения, полученной при постоянной засветке) может свидетельствовать о наличии дополнительного канала расхода накопленных при освещении состояний помимо того, что приводит к НФХТ.

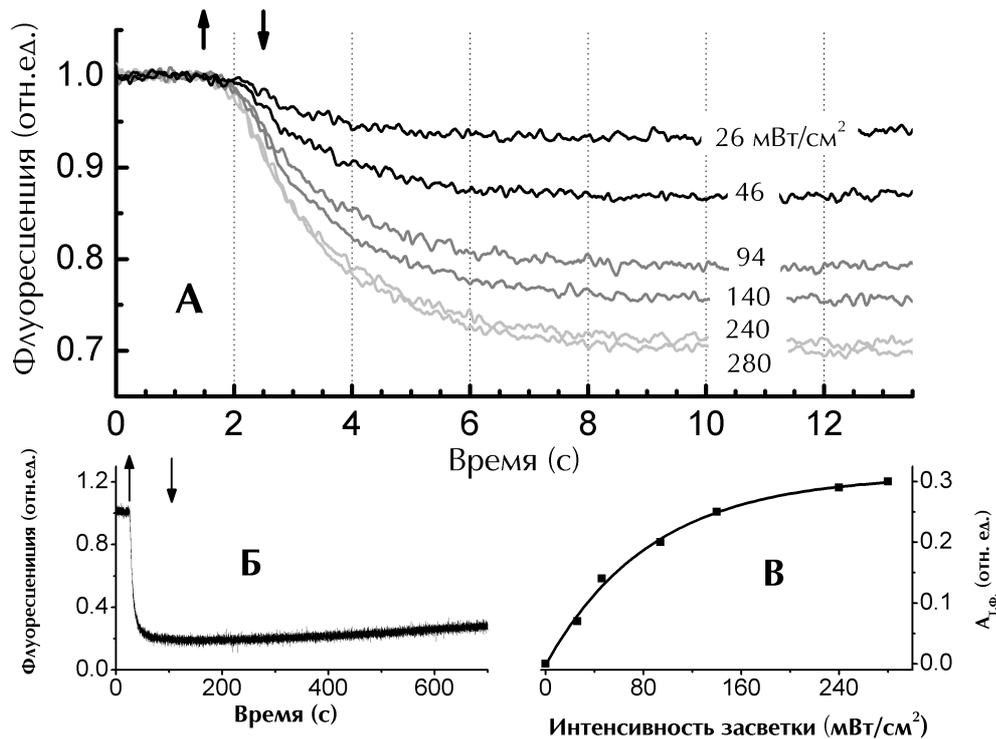


Рис 3. Нефотохимическое тушение в мутанте цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, лишённого фотосистем. (А) Кинетика тушения флуоресценции при освещении светодиодами (максимум длины испускания 503 нм, полуширина 30 нм), измеренные при различной интенсивности внешней засветки. (Б) Характерная кривая тушения и восстановления флуоресценции при диодном освещении интенсивностью 20 мВт/см². (В) Амплитуда «темновой» фазы тушения как функция интенсивности внешнего освещения. Стрелки \uparrow и \downarrow показывают момент включения и выключения внешнего освещения.

В §2.2 на основе литературных и оригинальных экспериментальных данных предлагаются модели, описывающие динамику формирования тушащего центра. §2.2.1 содержит описание модели формирования центра тушения с начальным [S_0] и тушащим [S_{NPQ}] состояниями. В §2.2.1 рассматривается более сложная модель, где дополнительно вводится промежуточное состояние [S_i]. Вся совокупность наблюдаемых в эксперименте зависимостей может быть описана только в рамках модели с тремя состояниями. Именно она и используется в дальнейшем для определения характеристик процесса формирования центра тушения (рис. 4).

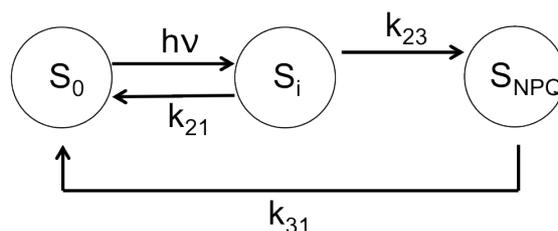


Рис 4. Переходы между различными состояниями системы, участвующей в нефотохимическом тушении для модели с начальным, промежуточным и тушащим состояниями.

Можно написать следующую систему кинетических уравнений для описания динамики формирования центра тушения при индукции НФХТ:

$$\frac{d[S_0]}{dt} = -k_{12}[S_0] + k_{21}[S_i] + k_{31}[S_{NPQ}] \quad (1),$$

$$\frac{d[S_i]}{dt} = k_{12}[S_0] - k_{21}[S_i] - k_{23}[S_i] \quad (2),$$

$$\frac{d[S_{NPQ}]}{dt} = k_{23}[S_i] - k_{31}[S_{NPQ}] \quad (3),$$

$$[S_0] + [S_i] + [S_{NPQ}] = 1 \quad (4),$$

где $[S_0]$, $[S_i]$, и $[S_{NPQ}]$ – относительные концентрации состояний S_0 , S_i , и S_{NPQ} . Скорость k_{12} определяет переход из начального состояние в промежуточное и представляет собой произведение сечения перехода начальной формы в промежуточную и интенсивности индуцирующего освещения ($k_{12} = \sigma_{S_0-S_i} I$). Параметр k_{23} – это скорость спонтанного перехода из промежуточного состояния в тушащее, которая не зависит от интенсивности и спектральных характеристик света индуцирующего тушение. Параметр k_{21} – скорость возврата из промежуточного состояния в начальное, а k_{31} – скорость возврата системы в начальное состояние (предполагаем, что это происходит, минуя промежуточное состояние). Обработка экспериментальных данных при помощи системы (1)-(4) позволяет определить параметры модели (таблица 1).

Таблица 1. Параметры модели формирования тушащего центра описывающей динамику формирования центра тушения в цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, измеренные при 25°C.

$\sigma_{S_0-S_i}, \text{см}^{-2}$	$k_{23}, \text{с}^{-1}$	$k_{21}, \text{с}^{-1}$	$k_{31}, \text{с}^{-1}$
$(5.0 \pm 0.3) \times 10^{-19}$	0.12 ± 0.01	0.29 ± 0.04	$(7.8 \pm 0.8) \times 10^{-4}$

В работе была также проведена серия экспериментов по исследованию зависимости данных параметров от температуры. Было показано, что значение $\sigma_{S_0-S_i}$ в пределах погрешностей не зависит от температуры, в то время как скорости перехода k_{23} , k_{21} и k_{31} зависят от температуры по закону Эйринга: $\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \frac{A}{T} + B$.

В §2.3 на основе предложенной модели и литературных данных выдвигается и обосновывается гипотеза о механизме формирования центра тушения при НФХТ в цианобактериях. Литературные данные свидетельствуют об участие в механизме НФХТ двух белков: оранжевого каротиноид-содержащего белка (ОСР) и белка восстанавливающего флуоресценцию (FRP). Наличие ОСР является необходимым условием НФХТ, причем концентрация ОСР в клетке пропорциональна амплитуде тушения. Кроме того, содержащийся в ОСР каротиноид имеет спектр поглощения совпадающий со спектром действия НФХТ и при поглощении света изменяет свою пространственную конформацию, что ведет к переходу ОСР из оранжевой в крас-

ную форму. Повышенная концентрация FRP в клетке существенно ускоряет процесс восстановления флуоресценции, а при высокой концентрации приводит к снижению амплитуды НФХТ. Таким образом, можно предложить следующий молекулярный механизм образования центра тушения при НФХТ (рис. 5). При освещении клеток сине-зеленым светом молекул ОСР, находящихся в неактивной форме (и не тушащей возбужденные состояния ФБС), происходит их активация. Активная форма ОСР может либо присоединиться к ФБС, формируя тушащий центр, либо вернуться в основное состояние (как за счет собственной дезактивации, так и за счет взаимодействия с молекулой FRP). Пока ОСР (красная форма) присоединена к ФБС, происходит эффективное тушение возбужденных состояний ФБС. При выключении внешнего действующего света происходит отсоединение молекул ОСР от ФБС, тушение возбужденных состояний пигментов ФБС прекращается, и происходит восстановление уровня флуоресценции.

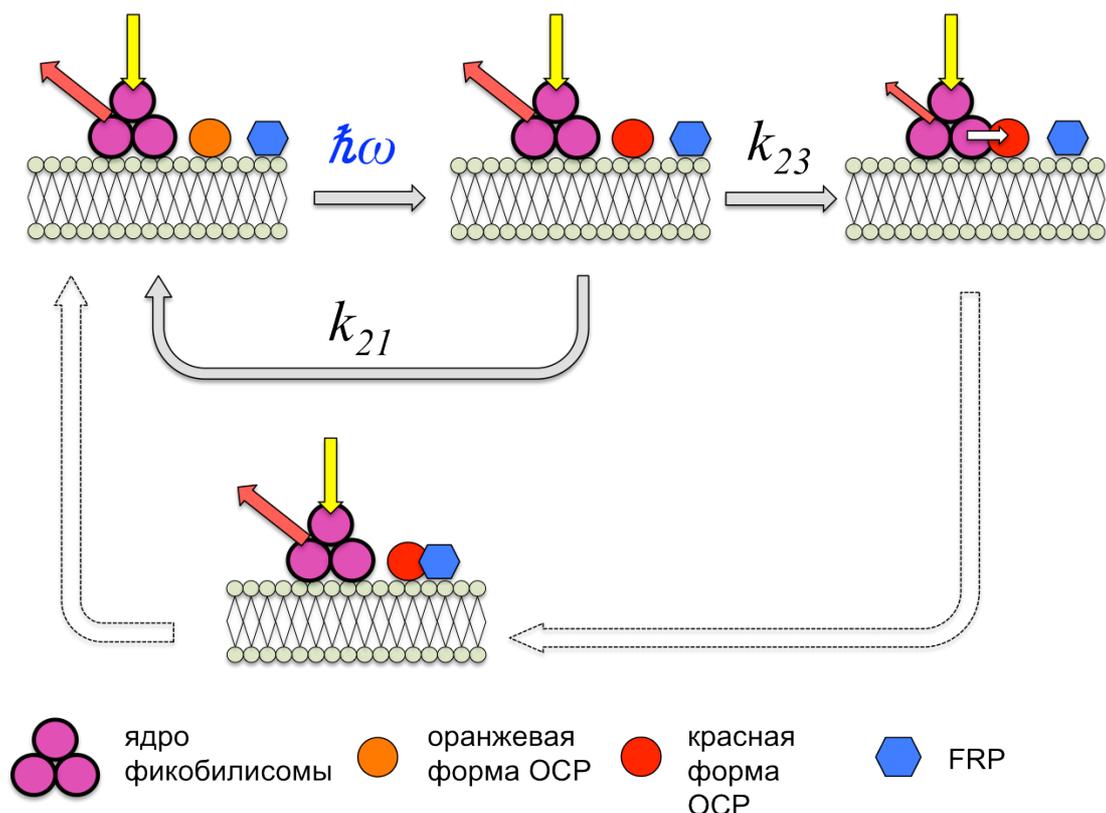


Рис 5. Схема молекулярного механизма нефотохимического тушения в цианобактериях при освещении сине-зеленым светом интенсивностью $>2 \text{ мВт/см}^2$ с участием фикобилисомы, оранжевого каротиноидного белка (ОСР) и белка восстанавливающего флуоресценцию (FRP). Пояснения в тексте.

В §2.4 представлены результаты исследований влияния солености и минерального питания на различные фотофизические параметры, определяемые методом FIRE. Показано, что наиболее чувствительным параметром является коэффициент НФХТ. При этом остальные параметры в пределах погрешностей не

меняются в случае долговременной адаптации цианобактерий к различным условиям среды. Эти результаты могут быть полезными при разработке флуоресцентных биоиндикаторов состояния водных экосистем с использованием цианобактерий.

Третья глава посвящена исследованию возможностей нелинейной лазерной флуориметрии (НЛФ) в изучении механизма нефотохимического тушения в цианобактериях. В данной главе предлагается ряд моделей формирования флуоресцентного отклика цианобактерий при возбуждении наносекундными импульсами лазерного излучения. Полученные экспериментальные кривые насыщения (полученные в темноте и при индукции НФХТ) обрабатываются по выбранной модели, в результате чего определяется набор фотофизических параметров, что позволяет выявить наиболее вероятные мишени тушения и сделать вывод о механизме тушения возбужденных состояний.

В §3.1 рассматриваются модели формирования флуоресцентного отклика в системах с несколькими флуорофорами при возбуждении наносекундными импульсами. §3.1.1 содержит необходимую информацию о фотофизических процессах и механизмах формирования флуоресценции в фотосинтезирующих организмах. В §3.1.2 приводится модель формирования флуоресцентного отклика для возбужденных состояний 4^x различных светособирающих пигментов, присутствующих и взаимодействующих в фотосинтетическом аппарате цианобактерий, с учетом НФХТ. Вводятся обобщенные молекулярные фотофизические параметры данных пигментов (τ – время линейной релаксации возбужденных состояний, σ – сечение возбуждения, γp_0 – максимальная скорость синглет-синглетной аннигиляции).

В §3.1.3 рассматривается подход к построению модели формирования флуоресцентного отклика на основе формализма коллективных состояний, который позволяет рассматривать комплексы с точно известным числом флуорофоров и учитывать их взаимное расположение в структуре данного комплекса. В §3.1.4 предложена модель формирования флуоресцентного отклика в ядре ФБС, использующая формализм коллективных состояний. В частности, в ФБС были выделены три пространственные группы флуорофоров (рис. 6) – возможные места крепления центра тушения. Результаты численного моделирования, приведенные в §3.1.5, показали, что спектры флуоресценции и кривые насыщения, полученные в рамках решения прямой задачи существенно зависят от того, с какой именно пространственной группой флуорофоров происходит взаимодействие центра тушения при индукции НФХТ.

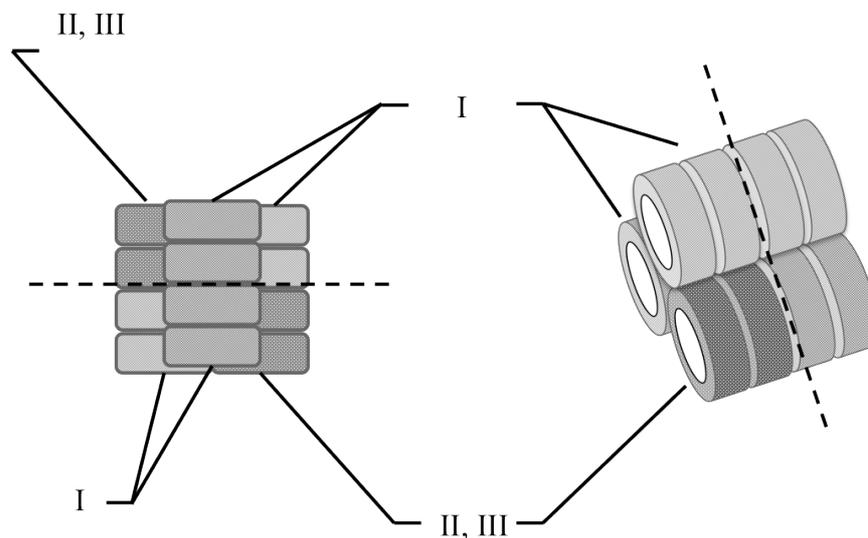


Рис 6. Схема ядра фикобилисомы. Цифрами I, II, III обозначены различные группы флуорофоров: к группе I относятся флуорофоры, входящие в состав однородных тримеров (содержат только аллофикоцианина с максимумом флуоресценции на 660 нм); к группе II и III относятся флуорофоры, входящие в состав неоднородных тримеров (содержат аллофикоцианин с максимумами флуоресценции на 660 нм (II группа) и 680 нм (III группа)).

В §3.2 изложены основы метода нелинейной флуориметрии: вводятся основные понятия и параметры, дается описание экспериментальной установки.

§3.3 посвящен определению из экспериментальных кривых насыщения фотофизических параметров флуоресцирующих светособирающих пигментов цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и анализу изменений их значений при индукции НФХТ. В фотосинтетическом аппарате цианобактерий присутствует 4 основных светособирающих пигментов: фикоцианин (максимум полосы флуоресценции на длине волны ~ 640 нм), две формы аллофикоцианина (максимумы флуоресценции ~ 660 и ~ 680 нм) и хлорофилл *a* (максимум полосы флуоресценции на длине волны 685 нм). Поскольку флуоресценция длинноволновой формы аллофикоцианина и хлорофилла *a* сильно перекрываются, то для определения фотофизических параметров каждого флуорофора использовался следующий подход: определение фотофизических параметров фикоцианина и аллофикоцианина проводилось с использованием мутанта *Synechocystis* sp. (у которого отсутствовали фотосистемы, *a*, следовательно, и Хл-*a*), а для определения фотофизических параметров Хл-*a* использовалась исходная (т.е. генетически не измененная) культура.

В §3.3.1 приводятся экспериментальные данные по нелинейной лазерной флуориметрии мутанта *Synechocystis* sp. Для определения фотофизических параметров фикоцианина и аллофикоцианина измерялись спектры испускания флуоресценции при различной интенсивности лазерного излучения с длиной волны 532 нм (рис. 7 А). Полученные таким образом спектры затем раскладывались на три основные (доминирующие) гауссовы компоненты с максимумами 640, 660, 680 (рис. 7 Б-Г). Отклонение реальных спектров флуоресценции фикобилинов от гауссиан было учтено введением дополнительной компоненты с максимумом на 715

нм (на рисунке не приведена). После этого строились кривые насыщения для соответствующих компонент. Измерение спектров проходило как в условиях темновой адаптации, так и при облучении образца сине-зеленым светом для индукции НФХТ.

При НФХТ наблюдается значительное уменьшение флуоресцентного параметра, $\Phi = \frac{N_{\text{флуор}}}{N_{\text{репер}}}$ ($N_{\text{флуор}}$ – число квантов флуоресценции, $N_{\text{репер}}$ – число квантов в опорном канале) для компонент с максимумами флуоресценции на 660 и 680 нм (рис. 8 А-Б). При нормировке кривых насыщения на ненасыщенный флуоресцентный параметр, $\Phi_0 = \log_{I \rightarrow 0} \Phi(I)$ (I – плотность потока фотонов лазерного излучения), можно определить фактор насыщения Γ , характеризующий степень насыщения флуоресценции (рис. 8 А-Б). Видно, что фактор Γ для данных компонент значительно снижается, что указывает на уменьшение динамического обеднения основного состояния молекул пигментов и/или скорости синглет-синглетной аннигиляции под влиянием НФХТ, следовательно, о соответствующих изменениях фотофизических параметров, что может быть количественно охарактеризовано в результате решения обратной задачи.

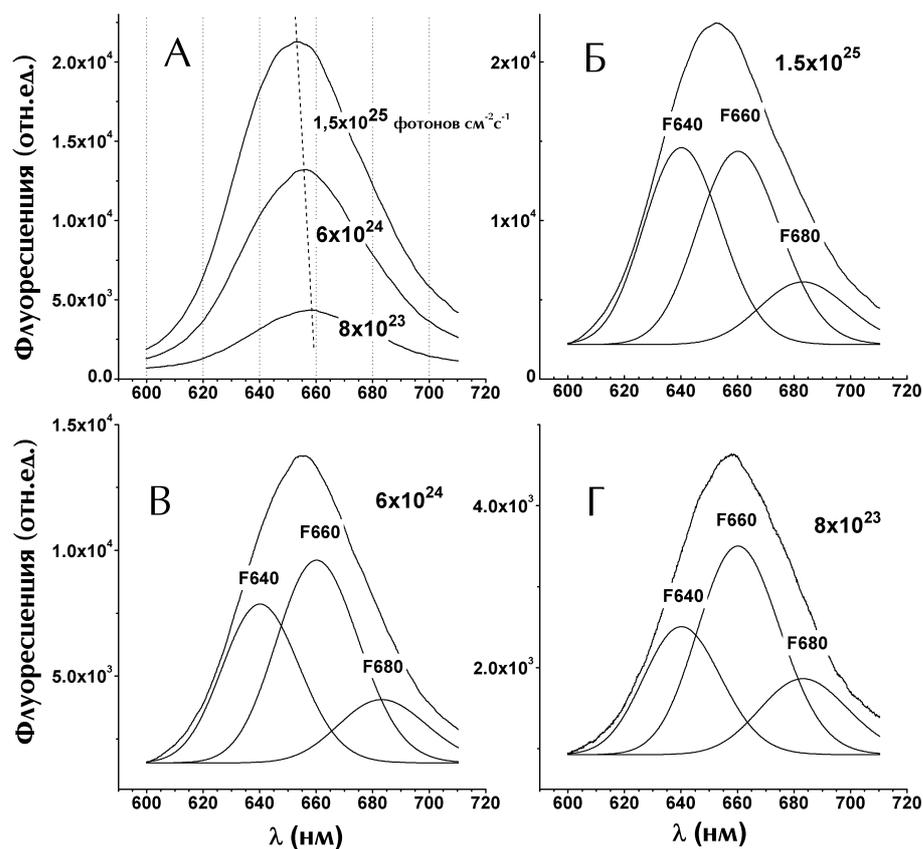


Рис 7. Спектры испускания флуоресценции (в отсутствии НФХТ) измеренные при различной интенсивности лазерного возбуждения (532 нм). (А): сравнение формы спектров испускания при возбуждении излучением различной интенсивности; пунктирная кривая показывает соответствующее смещение максимума в спектре. (Б)-(Г): разложение спектров испускания на гауссовы компоненты; показаны компоненты с максимумами 640, 660 и 680 нм.

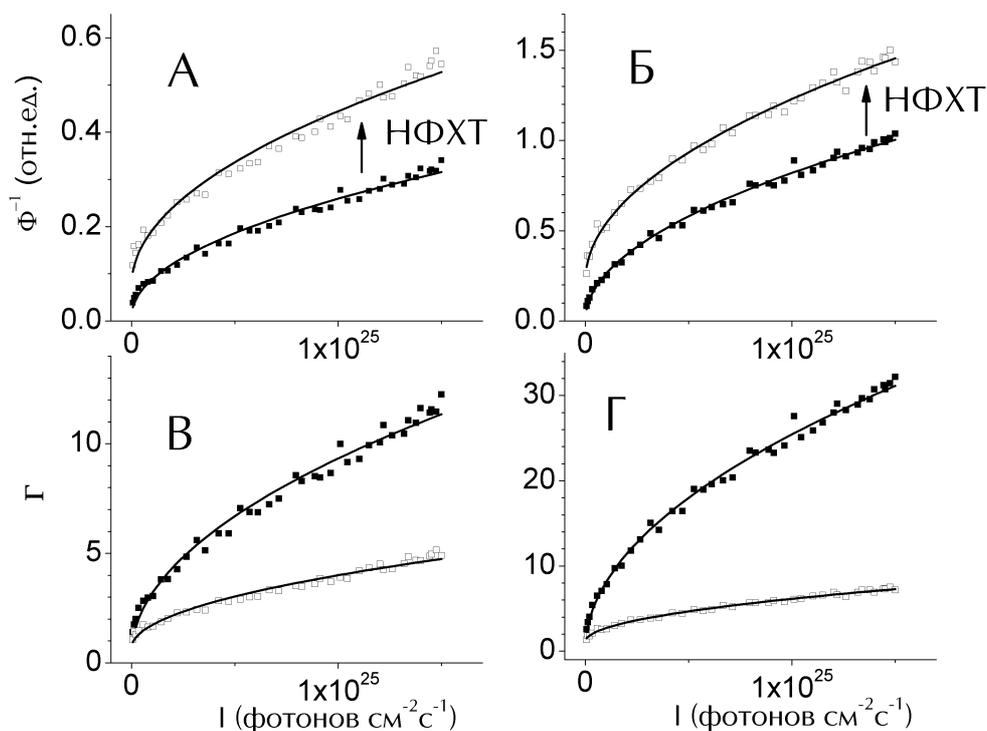


Рис 8. Кривые насыщения измеренные для гауссовых компонент с максимумами на 660 нм (А,В) и 680 нм (Б,Г) в темноте (черные квадраты) и при индукции НФХТ (белые квадраты).

Обработка кривых насыщения для различных компонент при помощи простейшей из предложенных в §3.1 моделей позволяет определить молекулярные фотофизические параметры различных пигментов и их изменения при индукции НФХТ (таблица 2).

В §3.3.2 приводятся экспериментальные данные по исследованию исходной культуры *Synechocystis* sp. и определению молекулярных фотофизических параметров Хл-а. Измерения, как и при исследовании мутанта *Synechocystis* sp., проводились в условиях темновой адаптации и при освещении сине-зеленым светом для индукции НФХТ. Относительные изменения фотофизических параметров Хл-а представлены в таблице 2.

Таблица 2. Относительное изменение фотофизических параметров светособирающих пигментов цианобактерий при индукции НФХТ (ФЦ – фикоцианин, АФЦ₆₆₀ – аллофикоцианин с максимумом испускания 660 нм, АФЦ₆₈₀ - аллофикоцианин с максимумом испускания 680 нм, Хл-а – хлорофилл *a*).

	НФХТ τ / τ	НФХТ γn_0 / γn_0	НФХТ σ / σ
ФЦ	1.1±0.3	0.8±0.3	1.1±0.3
АФЦ ₆₆₀	0.44±0.12	0.8±0.3	1.0±0.3
АФЦ ₆₈₀	0.46±0.13	0.9±0.3	0.21±0.06
Хл-а	1.1±0.3	0.2±0.1	0.9±0.3

В §3.4 обсуждаются результаты определения молекулярных фотофизических параметров цианобактерий. Из таблицы видно, что происходит существенное уменьшение времени линейной релаксации для обеих форм аллофикоцианина, а для длинноволновой формы наблюдается также значительное падение сечения возбуждения, что может быть вызвано уменьшением переноса возбуждения с коротковолновой формы. Из этого можно сделать вывод о том, что мишенями действия тушащего центра являются обе формы аллофикоцианина (660 и 680 нм) в ФБС. Механизм такого действия – прямая дезактивация возбуждённых состояний молекул этих форм. Такого действия тушащего центра на находящиеся в коровой антенне молекулы Хл-а в возбуждённом состоянии не обнаружено. В то же время признаки конформационного влияния тушащего центра на коровую антенну ФС II присутствуют и выражаются в изменении скорости синглет-синглетной аннигиляции возбуждённых состояний молекул хлорофилла *a*. Обращает на себя внимание отсутствие влияния тушащего центра на сечение возбуждения молекул Хл-а. Это может объясняться, в частности, незначительным вкладом процесса переноса энергии с молекул аллофикоцианина в сечение возбуждения Хл-а по сравнению с прямым поглощением Хл-а при использовании данной длины волны возбуждающего излучения (532 нм).

Таким образом, основываясь на полученных нами экспериментальных данных и анализе литературы, можно сделать вывод о том, что при формировании тушащего центра присоединение ОСР происходит в такое место ФБС, что возможно эффективное тушение как длинноволновых, так и коротковолновых форм аллофикоцианина. Признаков прямого тушения возбуждённых состояний молекул Хл-а тушащим центром не обнаружено. Зарегистрированное уменьшение интенсивности флуоресценции Хл-а при синем освещении связано, в условиях выполненных экспериментов, с конформационными изменениями в ФС II.

В Заключение сформулированы основные результаты работы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ РАБОТЫ:

1. Предложена многостадийная модель формирования тушащего центра в цианобактериях под действием внешнего сине-зеленого освещения. На основании модели объяснено взаимодействие пигмент-белковых комплексов (фикобилисомы и фотосистемы 2) и отдельных белков (ОСР и FRP) при инициации механизма нефотохимического тушения (НФХТ) и определены характерные скорости перехода между различными стадиями.
2. Предложены основанные на разных подходах модели формирования флуоресцентного отклика в светособирающей антенне цианобактерий. На основе простейшей из предложенных моделей с помощью метода нелинейной лазерной флуориметрии определены молекулярные фотофизические параметры четырёх основных флуоресцирующих пигментов цианобактерии *in vivo* (на примере культуры

Synechocystis sp. PCC 6803): сечения возбуждения, времена жизни возбужденных состояний, квантовые выходы флуоресценции и максимальные скорости синглет-синглетной аннигиляции.

3. На основе измерения молекулярных фотофизических параметров флуоресцирующих пигментов цианобактерий при инициации механизма нефотохимического тушения сделан вывод о том, что основными мишенями тушения возбужденных состояний являются молекулы как коротковолновой (длина волны максимума полосы флуоресценции 660 нм), так и длинноволновой (680 нм) форм аллофикоцианина, при этом тушение флуоресценции хлорофилла *a* происходит за счет конформационных изменений в антенне фотосистема 2 (при возбуждении на длине волны 532 нм).
4. При помощи модели формирования флуоресцентного отклика в цианобактериях с использованием формализма коллективных состояний и с учетом особенностей строения фикобилисомы установлены зависимости флуоресцентных характеристик цианобактерий от пространственного расположения центра тушения при взаимодействии с ядром фикобилисомы.
5. Показана чувствительность фотофизических параметров, в частности, коэффициента нефотохимического тушения, к внешним факторам среды (изменению солености и минерального питания), что открывает перспективы использования цианобактерий в качестве флуоресцентных биоиндикаторов состояния водных экосистем.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ, СОДЕРЖАЩИХ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kuzminov F.I, Maximov E.G, Gorbunov M.Y, Fadeev V.V. Fluorescent diagnostics of cyanobacteria // Proceedings of SPIE. 2010. V. 7715. P. 771521.
2. Gostev T.S, Kouzminov F.I, Gorbunov M.Y, Voronova E.N, Fadeev V.V. Effects of variations in salinity and nitrogen concentration on the physiological characteristics of phytoplankton obtained using fluorescence spectroscopy techniques // 5th EARSel Workshop on Remote Sensing of Coastal Zone, 1–3 June 2011, Prague, Czech Republic. Workshop Proceedings. 2011. № 3. P. 9–18.
3. Rakhimberdieva M.G., Kuzminov F.I., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V. *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant lacking both photosystems exhibits strong carotenoid-induced quenching of phycobilisome fluorescence // FEBS Letters. 2011. V. 585. № 3. P. 585-589.
4. Гостев Т.С., Кузьминов Ф.И., Моисеев С.А. Лазерный on-line сенсор загрязнений природных вод, использующий фотосинтезирующие организмы в качестве флуоресцентных биоиндикаторов // Краткие сообщения по физике ФИАН. 2011. Т. 38. № 1. С. 19-22.

5. Maksimov E.G., Kuzminov F.I., Konyuhov I.V., Elanskaya I.V., Paschenko V.Z. Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants // Journal of Photochemistry and Photobiology B. 2011. V. 104. №1-2. P. 285-291.
6. Гостев Т. С., Кузьминов Ф. И., Горбунов М. Ю., Фадеев В. В. Биофотоника водных фотосинтезирующих организмов: флуоресцентные методы диагностики // Фотоника. 2011. № 2. С. 72–81.
7. Gorbunov M.Y., Kuzminov F.I., Fadeev V.V., Kim J.D., Falkowski P.G. A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria // Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics. 2011, V. 1807. №12. P. 1591-1599.
8. F.I. Kuzminov, E.G. Maximov, M.Y. Gorbunov, V.V. Fadeev. Studying of photo-protection 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, June 9-11, 2010, Oulu, Finland. Book of Abstracts. P. 267.
9. Kuzminov, F I; Gorbunov, M Y; Maximov, E G; Fadeev, V V: Diagnostics of cyanobacteria and zooxanthellae using non-linear laser fluorometry and variable fluorescence techniques // ASLO/NABS 2010 Joint Summer Meeting, June 6-11, 2010, Santa Fe, New Mexico. Book of Abstracts. P. 132.
10. Kuzminov F.I., Gorbunov M.Y., Fadeev V.V., Falkowski P.G. Mechanisms of energy transfer and non-photochemical quenching in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // ESF conference “Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria: From Cell to Community”, April 10-15, 2011, Santa Feliu de Guixols, Spain. Book of Abstracts, P. 56.
11. Кузьминов Ф.И., Горбунов М.Ю., Рахимбердиева М.Г., Еланская И.В., Карапетян Н.В., Фадеев В.В. Моделирование молекулярного механизма нефотохимического тушения в цианобактериях // Девятнадцатая международная конференция "Математика. Компьютер. Образование." , 31 января – 3 февраля, Дубна. 2012. Сборник тезисов. С. 7.

Для заметок

Для заметок

Заказ № 352-і /04/2012 Подписано в печать 06.04.12 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1



ООО “Цифровичок”, тел. (495) 649-83-30
www.cfr.ru ; e-mail:zak@cfr.ru