

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ**

На правах рукописи

САМИРА АББАС кызы АЛИЕВА

**РОЛЬ 33 кДа БЕЛКА В ОКИСЛЕНИИ ВОДЫ И
ФОТОПОВРЕЖДЕНИИ ФОТОСИСТЕМЫ II**

2406.02 – Биохимия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание учёной степени
доктора философии по биологии

БАКУ-2013

Работа выполнена в лаборатории биофизики Института Ботаники Национальной Академии Наук Азербайджанской Республики

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор **Р.А.ГАСАНОВ**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
М.Д.МАМЕДОВ

доктор биологических наук
З.Г.АБИЛОВ

Ведущая организация:

Кафедра биохимии Азербайджанского
Медицинского Университета

Защита состоится «_11_» _10_ 2013 г. в «_____» часов на заседании Диссертационного Совета Д.01.061 при Институте Ботаники НАН Азербайджанской Республики по адресу: Бадамдарское шоссе 40, Баку AZ1073

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Ботаники НАН Азербайджанской Республики

Автореферат разослан «_____» _____ 2013 г.

**Учёный секретарь
Диссертационного Совета
Д.01.061, д.б.н., проф.**

С.Д.ИБАДУЛЛАЕВА

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы – Фотосистема II (ФСII) - фотохимический супрамолекулярный комплекс, который состоит из ключевых белков осуществляющих световые реакции фотосинтеза. Функция ФСII и её роль в световых реакциях фотосинтеза не может быть полностью раскрыта без детальных знаний её структуры, включая структуру белков реакционного центра и периферических белков. В высших растениях три периферических белка PsbO, PsbP и PsbQ необходимы для нормального выделения кислорода в физиологических условиях. Современные данные о функциях этих белков особенно PsbO (33 кДа) белка весьма противоречивы.

PsbO периферический белок играет центральную роль в стабилизации фотохимического выделения кислорода, который помогает функциональному связыванию двух других PsbP и PsbQ периферических белков и важных кофакторов (Ca^{2+} и Cl^-) с ФСII [Bricker et al., 2012], а также поддерживает стабильность и активность каталитических свойств $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера [Yamamoto et al., 2001]. PsbO, располагаясь на люменальной стороне вблизи $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера, взаимодействует со многими субъединицами ФСII [Bricker et al., 2012]. Хотя из рентгеноструктурного анализа структуры ФСII [Ferreira, 2004; Loll et al., 2005; Umena et al., 2011; Zouni et al., 2001; Kamiya et al., 2003] вытекает, что PsbO белок не принимает участия в связывании Mn и Ca, прямое взаимодействие PsbO белка с кислород-выделяющим комплексом (КВК), а также контролирование связывания субстрата воды с КВК и освобождения протонов, по-видимому, возможно вследствие его близкого расположения к $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластеру. Однако существуют данные, не исключающие возможность непрямого взаимодействия PsbO белка с $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластером. Это было показано исследованиями, сопровождаемыми трипсиновым расщеплением белков ФСII, при предварительном вымывании двух других периферических белков (PsbP и PsbQ) [Hong et al., 2001]. Косвенно было обнаружено, что действие трипсина на PsbO белок зависит от окислительно-восстановительного состояния $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера [Hong et al., 2001]. Помимо влияния связывания PsbO белка на структурную целостность ФСII комплекса, его собственная конформация, возможно, регулируется посредством S состояний КВК. Это подкрепляет идею о том, что помимо регуляторной роли (Cl^- и Ca^{2+}) PsbO белок участвует непосредственно в процессе окисления воды. Корреляция окислительно-восстановительного сос-

тояния $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера с чувствительностью PsbO белка к трипсиновой обработке предполагает, что PsbO периферический белок может взаимодействовать непосредственно с $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластером [Hong et al., 2001].

Цель работы – Целью данной работы является выявление роли белкового окружения реакционного центра ФСII, в частности PsbO периферического белка в процессе функционирования ФСII в физиологических и различных стрессовых условиях (высокая инсоляция, тяжёлые металлы) и в реакциях, связанных с процессом окисления воды, а также выявление чувствительных к этим факторам сайтов на донорной стороне ФСII. Поставленная цель достигалась посредством выполнения следующих задач:

- исследование влияния различных значений pH среды на фотокаталитические функции ФСII;
- исследование влияния модификации белкового окружения $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера на различные стадии окисления КВК ФСII;
- исследование устойчивости каталитического КВК при избыточном освещении;
- исследование фотоповреждения каталитических функций ФСII при предварительном блокировании донорной и акцепторной сторон ФСII.

Научная новизна – В работе представлены научные результаты, вносящие вклад в понимание фотобиохимических процессов, протекающих в ФСII, в частности, в понимание механизма действия каталитического центра окисления воды и его устойчивости в ответ на изменение pH люмена, действия избыточного видимого света (фотоингибирование), а также действия протеолитических факторов и тяжёлых металлов.

На КВК-ФСII частицах (BBY-типа) показано, что как выделение кислорода, так и мультилинейный сигнал, характеризующий S_2 состояние $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера, подавляются в кислой ($\text{pK}_a \sim 5.3$) и щелочной средах ($\text{pK}_a \sim 8.1$), проявляя максимальные величины при pH 6.0-7.0. Впервые выявлено, что потеря способности выделения кислорода и уменьшение амплитуды мультилинейного сигнала S_2 состояния сопровождаются падением быстрой фазы миллисекундной замедленной флуоресценции (мсек-ЗФ) хлорофилла (Хл) *a* только в щелочной среде (pH 7.0-8.5). Это позволяет утверждать, что мсек-ЗФ отражает состояние каталитического центра окисления воды ($\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера), т.е. реакции, характеризующие фотобиохимические процессы, протекающие

на донорной стороне ФСЦ. Экспериментально доказано, что $S_2 \rightarrow S_3$ переход может быть ответственным за рекомбинационное свечение, проявляемое в виде быстрой фазы мсек-ЗФ. В зависимости от pH среды партнёром в рекомбинации с $P680^+Q_A^-$ может быть либо $Y_Z^\bullet$, либо Mn_4O_5Ca -кластер, где локализируются электронные вакансии. Показано, что в кислой среде рекомбинационное свечение может быть результатом $[Y_Z^\bullet \leftrightarrow P680Q_A^-]$ реакции, а при щелочной среде $[S_{i+1}^\bullet \leftrightarrow P680Q_A^-]$.

Впервые прямыми измерениями мультилинейного сигнала S_2 состояния каталитического центра окисления воды и выделения кислорода на ФСЦ частицах лишённых PsbQ (17 кДа) и PsbP (24 кДа) периферических белков, на основании степени доступности периферического PsbO белка к воздействию трипсина показано, что переходы $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2$ связаны с конформационными перестройками каталитического центра в процессе окисления Mn_4O_5Ca -кластера. Установлено, что в восстановленном (S_0) состоянии PsbO белок более уязвим к воздействию трипсина, что выражается в существенном уменьшении мультилинейного ЭПР сигнала и выделения кислорода. Предполагается, что в зависимости от окислительно-восстановительного состояния Mn_4O_5Ca -кластера конформация, а возможно, и расположение PsbO белка по отношению к фотохимическому реакционному центру ФСЦ могут меняться, и люменальная петля D1 или CP47 белков может играть роль молекулярного переключателя, приводящего к конформационной перестройке PsbO белка и S переходов.

Впервые показано, что фотоингибирование ФСЦ резко усиливается при подщелачивании люмена. В кислой среде фотоингибирование остаётся на уровне нормального pH, особенно в присутствии экзогенного акцептора электронов PpBQ. Полагается, что это связано с изменением равновесия между Y_Z [$Y_Z^\bullet \leftrightarrow (P680Q_A^-)$] и Mn_4O_5Ca -кластером [$(S_{i+1})^\bullet \leftrightarrow (P680Q_A^-)$], которое возникает при смещении pH люмена в щелочную сторону, при этом донорный механизм фотоингибирования становится решающим.

Впервые установлено, что в результате одновременного действия ингибирующего освещения и тяжёлых металлов (Cd^{2+} и Co^{2+}) ФСЦ становится более чувствительной к действию избыточного света, особенно заметно в случае ингибирования донорной стороны под действием ионов Cd^{2+} . Сайтами повреждения при действии ионов Cd^{2+} и Co^{2+} являются донорная и акцепторная стороны ФСЦ, соответственно. Показано, что сайт связывания Cd^{2+} находится в непосредственной близости к Mn_4O_5Ca -кластеру или тирозиновому радикалу Y_Z , являю-

щимся в зависимости от pH среды рекомбинационными партнёрами P680Q_A. Таким образом, действие ионов Cd²⁺ приводит главным образом к развитию донорного механизма фотоингибирования.

Научная и практическая значимость – Представленные в работе результаты собственных экспериментальных исследований и сделанные на их основе выводы вносят новые, расширенные и углублённые представления о механизме функционирования фотокаталитического центра, связанного с выделением кислорода в процессе фотосинтеза. Ряд из этих результатов получен впервые и может быть использован при создании искусственных имитирующих фотосинтез систем получения энергии при фотоокислении воды с помощью света, в частности результаты, которые связаны с пониманием устойчивости каталитической системы окисления воды в экстремальных условиях, а также могут быть использованы в процессе селекции новых устойчивых к экстремальным факторам сортов сельскохозяйственных растений.

Впервые показано, что метод мсек-ЗФ Хл может быть использован для анализа донорной стороны ФСII. Его информативность, удобство и возможности автоматизации и компьютеризации измерений при исследовании *in vivo*, дают основание рекомендовать этот метод наряду с переменной флуоресценцией Хл *a* для экологического мониторинга *in vivo* и в сельскохозяйственной практике.

Апробация работы - Полученные результаты представлены и доложены на международных конференциях: 5th EBSA and 15th IUPAB Int. Biophys. Cong. (Montpellier, France, 2005); Photosynthesis in the Post-Genomic Era: Structure and Function of Photosystems (Pushino, Russia, 2006); Int. Conf.: Photosynthesis in the Global Perspective (Indore, India, 2008); 7th EBSA Eur. Biophys. Cong. (Genova, Italy, 2009); The 2nd Int. Biophys. Cong. and Biotech. at GAP & 21st Nat. Biophys. Cong. (Diyarbakir, Turkey, 2009); 3rd Int. Symp. on Metallomics (Münster, Germany, 2011); 7th EBSA Eur. Biophys. Cong. (Budapest, Hungary, 2011); Eur. Biotech. Cong. (Istanbul, Turkey, 2011); 57th Biophys. Soc. Ann. Meeting (Philadelphia, Pennsylvania, 2013).

По результатам диссертационной работы опубликовано 17 научных работ, включая 5 статей, 3 из которых в международных рецензируемых журналах.

Структура диссертации – Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 166 страницах, содержит 36 рисунков, 2 таблицы и 1 схему.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили мембраны, обогащенные КВК-ФСII (ВВУ-типа), [Kuwabara, Murata, 1982] и тилакоидные мембраны хлоропластов [Whatley, Arnon, 1963], выделенные из листьев коммерческого шпината (*Spinacea oleracea*). Отмывание PsbQ и PsbR полипептидов КВК-ФСII мембраны проводилось 1 М NaCl. Для трипсиновой обработки КВК-ФСII мембраны переводили в S_0 , S_1 и S_2 состояния. Измерения кислород-выделяющей активности ФСII проводились с помощью платинового электрода Кларк-типа (Oxygraph, Hansatech, UK). ЭПР измерения проводились в X-полосе на спектрометре Bruker-300E, оснащённом стандартным резонатором ST4102 и с использованием криостата непрерывного потока CF900 (Oxford Instruments, UK) и температурного регулятора ITS-14 для регулирования температуры образца. Для индуцирования мультилинейного ЭПР сигнала из S_2 состояния образцы освещались вольфрамово-галогеновой лампой (500 мВ) через 8 см раствора CuSO_4 при 200 К [Miller, Brudvig, 1991] в смеси сухого льда и этанола в течение 7 мин для перевода всех центров в S_2 состояние КВК. Измерения проводились при температуре образца 6 К.

Фотоингибирование тилакоидных мембран осуществлялось в термостатической кювете действием белого света ($4000 \text{ } \mu\text{моль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) при 20°C и различных значениях pH. Тилакоидные мембраны (20 мкг Хл/мл) подвергались действию солей тяжёлых металлов – CdSO_4 и CoCl_2 . Измерение кинетики мсек-ЗФ Хл *a* проводилось с использованием фосфороскопа [Mamedov, Gasanov 1993].

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

рН-зависимость каталитических реакций окисления воды

Исследовали влияние pH на формирование характерных спектров мультилинейного ЭПР сигнала S_2 состояния $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера (рис. 1). Индукция мультилинейного сигнала была максимальной в нейтральной области (pH ~ 6.5) и уменьшалась в кислой и щелочной областях pH. Эффект уменьшения мультилинейного ЭПР сигнала при низких и высоких значениях pH является результатом изменений магнитных свойств $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера в S_2 состоянии и отражает реакции протонирования и депротонирования лигандов, взаимодействующих с ионами Mn в $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластере или кислородных мостиков между ионами Mn, скорее чем изменениями в переходе $S_1 \rightarrow S_2$ [Bernat et al., 2002; Geijer et al., 2000].

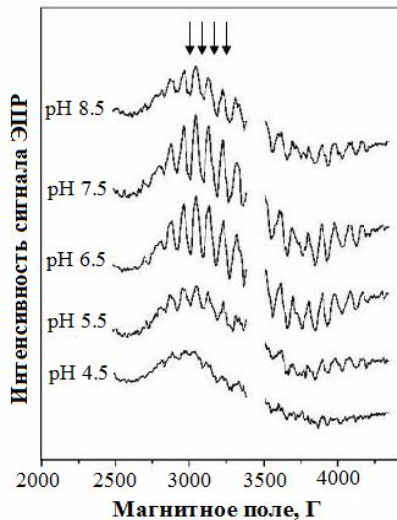


Рис. 1. S_2 мультилинейный ЭПР сигнал индуцированный освещением ФСII мембран при 200 К и различных значениях pH. Стрелки показывают пики, использованные для количественного определения интенсивности мультилинейного сигнала ЭПР. Условия измерения ЭПР сигнала: частота 9.64 ГГц, энергия 31 мВ, амплитуда модуляции 20 Г, температура 6 К.

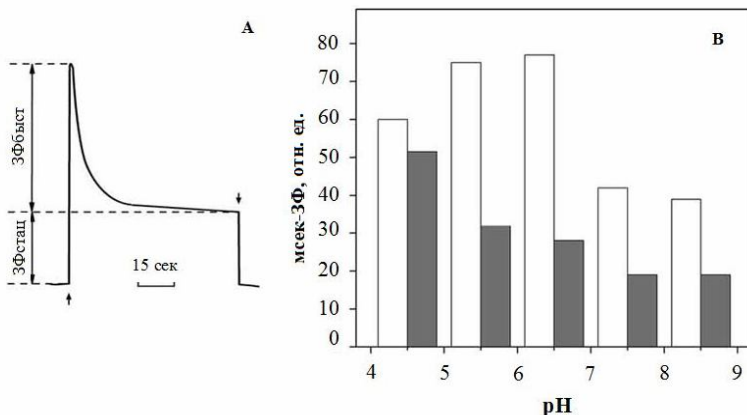


Рис. 2. Типичная индукционная кривая мсек-3Ф Хл *a* тилакоидных мембран при pH 6.5; стрелки показывают момент включения и выключения света (А). pH зависимость быстрой ($3Ф_{\text{быстр}}$) (белые столбики) и стационарной ($3Ф_{\text{стан}}$) (серые столбики) фазы мсек-3Ф Хл *a* в мембранах ФСII (В).

Типичная индукционная кривая мсек-ЗФ Хл *a*, во время адаптации от света к темноте, в миллисекундной временной области содержит две фазы: быструю ($ЗФ_{\text{быстр}}$) и стационарную ($ЗФ_{\text{стат}}$) (рис. 2, *a*), которые проявляют различную рН-зависимость (рис.2, *b*). Такая зависимость быстрой фазы от рН предполагает, что рекомбинационная реакция при низких значениях рН происходит более эффективно. Стационарная фаза мсек-ЗФ Хл *a* проявляет менее существенную рН-зависимость и связана со стабилизацией потока электронов направленного от Q_A^- и поэтому связана с реакциями протонирования и депротонирования на Q_B сайте и на уровне пластохинонового пула.

Кривая рН-зависимости кислород-выделяющей активности ФСII мембран имеет колоколообразную форму, с максимальной активностью в области рН 6.3-6.7, и уменьшением этой активности при $pK_a \sim 5.5$ и ~ 8.0 . Исследования рН-зависимости S_2 мультилинейного ЭПР сигнала в области 4.5-8.5 демонстрируют сходную зависимость с выделением кислорода (рис. 3). Кривая рН-зависимости отношения быстрой и стационарной фаз мсек-ЗФ Хл *a* имеет сходство с кривой активности выделения кислорода, т.е. такую же колоколообразную форму, однако, менее чувствительна к изменениям рН в исследованной области (рис. 3).

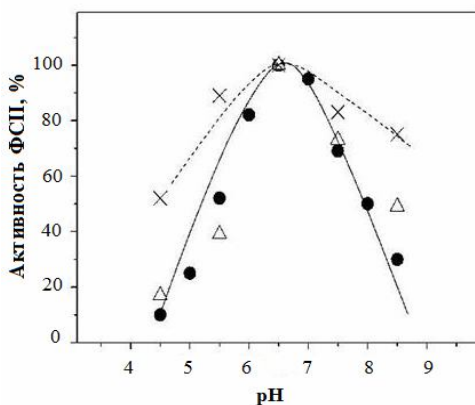


Рис. 3. рН-зависимость выделения кислорода (●), S_2 мультилинейного ЭПР сигнала (Δ) и отношения быстрой и стационарной фаз индукционной кривой мсек-ЗФ Хл *a* (×) в ФСII мембранах.

Таким образом, впервые показано, что одно из состояний Mn_4O_5Ca -кластера, а именно S_2 состояние его окисления, процесс выделения кислорода, а также отношение быстрой фазы к стационарной фазе индукционной кривой мсек-ЗФ Хл *a* на изолированных мембранах

имеют сходную зависимость от pH. На основании полученных результатов предложена реакция рекомбинации $P_{680}^+Q_A^-$ с S_2 состоянием Mn_4O_5Ca -кластера или с Y_Z^* в зависимости от состояния pH на донорной стороне ФСII:



Зависимость состояния реконструированных КВК-ФСII частиц от pH среды

Исследование pH-зависимости S_2 мультилинейного ЭПР сигнала КВК-ФСII мембран, лишённых PsbP и PsbQ периферических белков показало, что при значениях pH ниже 6.5 наблюдается заметное ингибирование амплитуды ЭПР сигнала, которая также монотонно уменьшается в щелочной области pH (7.5-8.5). Амплитуда ЭПР сигнала в кислой области pH ингибируется значительно сильнее, чем в щелочной области (рис. 4).

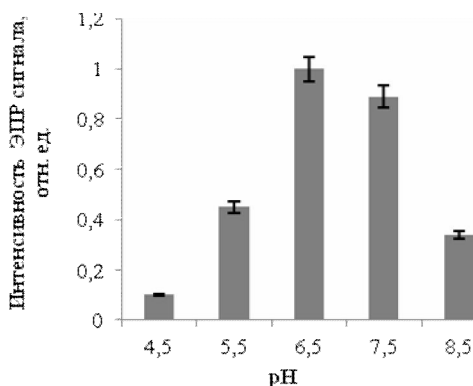


Рис. 4. Влияние различных pH среды на КВК, лишённые PsbP и PsbQ периферических полипептидов на индукцию мультилинейного ЭПР сигнала S_2 состояния Mn_4O_5Ca -кластера в присутствии 10 мМ $CaCl_2$. Интенсивность сигнала рассчитывалась на основе усредненной суммы четырех основных амплитуд мультилинейного сигнала и принята за 1.0 при pH 6.5. Условия измерения ЭПР сигнала см. на рис. 1.

Полученные результаты подкрепляются результатами исследования кислород-выделяющей активности КВК-ФСII мембран, без двух периферических белков в условиях изменения pH среды (4.5-8.5) (табл.1).

Таблица 1. Влияние изменения pH среды в «реконструированных» КВК-ФСII частицах на выделение фотосинтетического кислорода.

$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{PpBQ}$ $\mu\text{M O}_2 (\text{мг Хл})^{-1}/\text{ч}^{-1}$	pH		
	4.5	6.5	8.5
	41.5±2,0678	416,0±4,0175	126,0±3,4267

Реакционная среда содержала: КВК-ФСII частицы (20 $\mu\text{г}$ Хл/мл), 25 мМ HEPES/NaOH (pH 8.5), или MES/NaOH (pH 4.5 и 6.5), 10 мМ NaCl, 400 мМ сахарозы, 0.4 мМ PpBQ (pH - как указано в таблице).

Полагаем, что уменьшение амплитуды S_2 мультилинейного ЭПР сигнала и понижение кислород-выделяющей активности «реконструированных» КВК-ФСII частиц являются следствием индуцированных pH конформационных изменений в PsbO белке. При отсутствии двух других периферических белков PsbO белок даже в присутствии повышенных концентраций ионов Ca^{2+} и Cl^- более подвержен конформационным изменениям. Кроме того, сам $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластер более открыт для реакций протонирования (при низком pH) и депротонирования (при высоком pH), что ведёт к ингибированию S переходов, связанных с выделением протонов ($S_2 \rightarrow S_3$ и $S_3 \rightarrow S_0$, а также $S_0 \rightarrow S_1$ переходов) и в результате к ингибированию выделения кислорода.

Действие трипсина на функциональное состояние КВК-ФСII частиц при различных pH

Влияние различных значений pH на формирование характерных спектров S_2 мультилинейного сигнала ЭПР в обработанных трипсином «реконструированных» КВК-ФСII частицах показало, что трипсиновая обработка КВК-ФСII приводит к существенным изменениям амплитуды S_2 мультилинейного сигнала ЭПР при индукции $S_1 \rightarrow S_2$ перехода в КВК (рис. 5). Можно полагать, что подщелачивание среды приводит к такому конформационному изменению PsbO белка, которое делает его уязвимую часть более доступной для протеолиза.

pH-зависимость кислород-выделяющей способности «реконструированных» КВК-ФСII частиц, как обработанных, так и необработанных трипсином, имеет «колоколообразную» форму с оптимальным выходом в нейтральной области pH и значительным ингибированием его в кислой и щелочной областях pH (рис. 6).

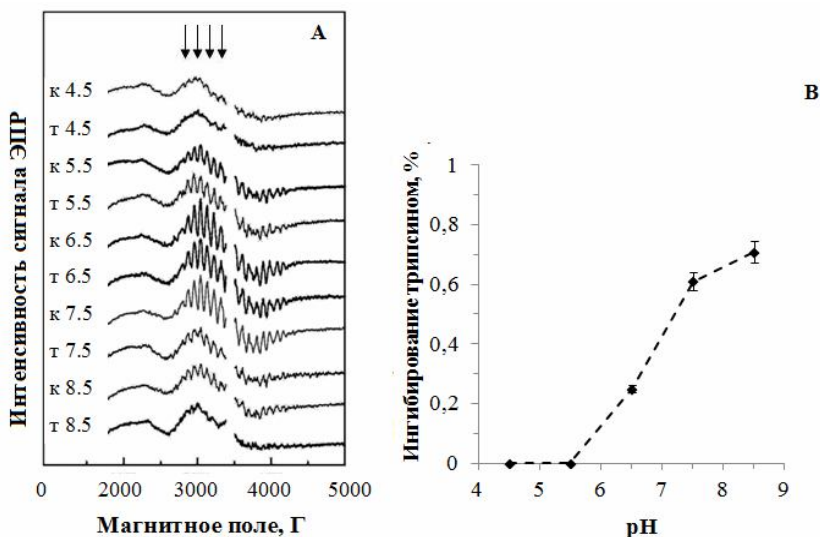


Рис. 5. Характерные спектры S_2 мультилинейного сигнала ЭПР после трипсиновой обработки реконструированных КВК-ФСII частиц при различных pH (А); Зависимость величины ингибирования трипсином интенсивности S_2 мультилинейного ЭПР сигнала от pH (В).

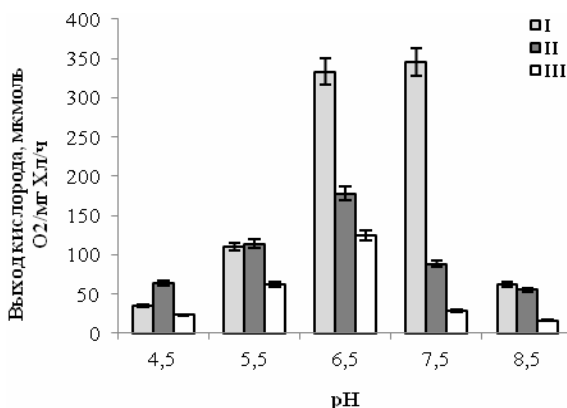


Рис. 6. Зависимость фотосинтетического выделения кислорода от pH после трипсиновой обработки реконструированных КВК-ФСII частиц: (I) в присутствии PrBQ без трипсиновой обработки (контроль), (II) после трипсиновой обработки частиц в присутствии PrBQ, (III) после трипсиновой обработки частиц в присутствии FeCN.

Модификации белкового окружения $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера под действием трипсина

Исследовали влияние трипсинизации модифицированных КВК-ФСII частиц, в S_0 и S_2 состояниях $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера на интенсивность мультилинейного сигнала ЭПР. Трипсиновая обработка КВК-ФСII частиц в S_0 и S_2 состояниях в течение 5 и 15 мин приводит к существенным изменениям интенсивности S_2 мультилинейного сигнала ЭПР (рис.7). Эти результаты показывают, что pH-зависимые структурные модификации на донорной стороне ФСII делают мишеневый PsbO белок доступным действию трипсина. Трипсинизация PsbO белка зависит от окислительно-восстановительного состояния $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера [Hong et al., 2001]. Так, в более восстановленном S_0 состоянии $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластер более восприимчив к действию трипсина, что, связано с тем, что PsbO белок, который защищает каталитический сайт окисления воды от повреждения, в S_0 состоянии имеет конформацию, доступную действию трипсина, который повреждает его, что приводит к нарушению процесса ступенчатого окисления воды. Корреляция окислительно-восстановительного состояния $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера с чувствительностью PsbO белка к трипсиновой обработке предполагает, что PsbO периферический белок может взаимодействовать непосредственно с $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластером [Hong et al., 2001].

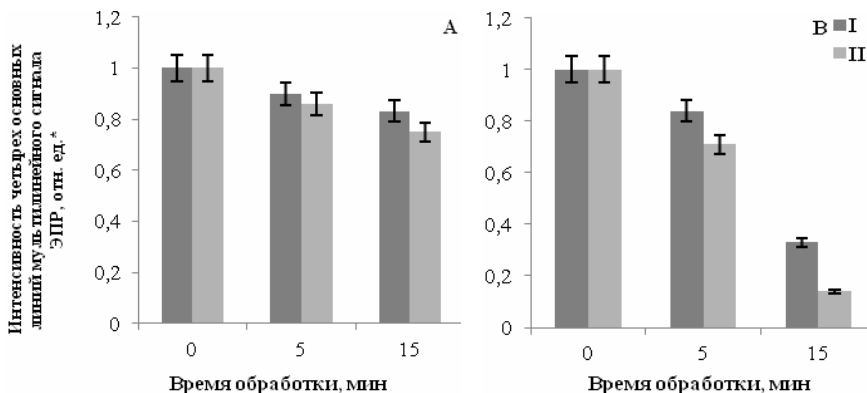


Рис. 7 Влияние обработки трипсином КВК-ФСII частиц, лишённых PsbP и PsbQ периферических полипептидов в условиях когда $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластер находится в S_2 (А) и S_0 (В) состояниях на формирование мультилинейного сигнала ЭПР. Интенсивность сигнала определялась, как показано на рис. 6. Перевод в S_2 состояние: (I) однократное освещение при 200 К [$S_0/S_1 \rightarrow S_2$]; (II) после предварительного освещения и темновой адаптации при комнатной температуре, повторное освещение при 200 К [$S_1 \rightarrow S_2$ (II)].

Установлено, что $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластер погружён на $5\text{\AA}$ внутрь мембраны в D1 белке и положение и форма PsbO белка делают прямое взаимодействие между ними маловероятным [Umena et al., 2011]. Однако, тот факт, что трипсиновая обработка КВК-ФСII частиц приводит к модификационным перестройкам PsbO белка, с отщеплением 15 кДа фрагмента, что сопровождается подавлением кислород-выделяющей способности КВК-ФСII частиц, даёт основание предполагать, что между PsbO белком и $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластером действительно существует связь, которая разрушается в результате трипсинизации КВК-ФСII частиц, что сопровождается нарушением $\text{S}_0/\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ переходов.

Влияние избыточного освещения на фотобиохимическую активность ФСII

Результаты исследований действия ингибирующего освещения на активность ФСII при различных значениях pH демонстрируют, что наибольшее ингибирование быстрой и стационарной фаз мсек-ЗФ Хл *a* происходит в щелочной области (pH 8.5), что также проявляется и на отношении двух кинетических фаз индукционной кривой (Рис.8, А). Сильный фотоингибирующий эффект наблюдаемый при высоких значениях pH предполагает его связь с индуцированным фотоингибированием донорной стороны ФСII, так как при высоких значениях pH наблюдается более выраженное разрушение $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера [Suzuki et al., 2005; Tyystjärvi et al., 2008; Vass et al., 2012].

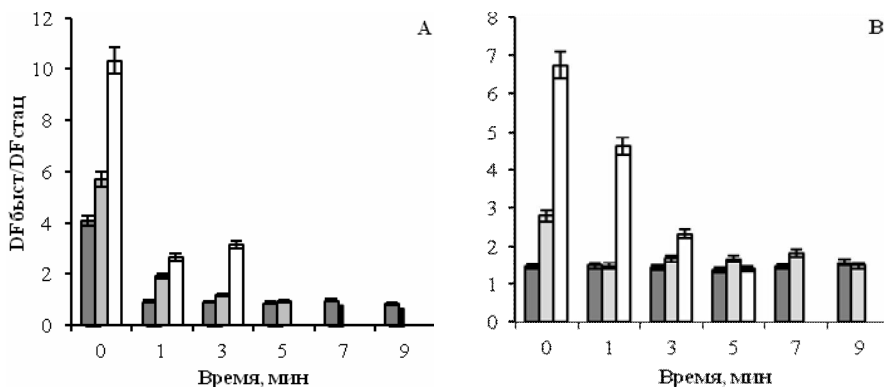


Рис. 8. Изменения отношения между быстрой и стационарной фазами индукционной кривой мсек-ЗФ Хл *a* во время ингибирующего освещения тилакоидных мембран при различных значениях pH (А) и в присутствии 25 мкМ PpBQ (В). Тёмносерые столбики - pH 5.5, светлосерые - pH 7.0, белые - pH 8.5.

Для того чтобы, отделить эффекты связанные с акцепторной и донорной сторонами во время фотоингибирования ФСII и определить сайты фотоповреждения в ФСII, реакции фотоингибирования в ФСII исследовали при различных значениях pH в присутствии PpBQ (рис.8, В). Исследования сайтов фотоингибирования в ФСII установили, что защита от фотоингибирования в присутствии PpBQ наблюдается только в кислых условиях. Сильный фотоингибирующий эффект при высоких значениях pH, который может быть связан с индуцированным фотоингибированием донорной стороны ФСII, а точнее с разрушением Mn_4O_5Ca -кластера при высоких значениях pH [Suzuki et al., 2005] подтверждается нашими экспериментами фотоингибирования ФСII в присутствии PpBQ. Во время фотоингибирования ФСII при низких значениях pH Mn_4O_5Ca -кластер остаётся более стабильным, а присутствие PpBQ устраняет механизмы фотоингибирования индуцированные на акцепторной стороне.

Фотоингибирование при предварительном блокировании донорной и акцепторной сторон ФСII ионами Cd^{2+} и Co^{2+}

Исследования одновременного действия избыточного освещения и тяжёлых металлов показывают, что при ингибирующем освещении тилакоидных мембран в присутствии ионов Cd^{2+} и Co^{2+} наблюдается более резкое понижение быстрой фазы мсек-3Ф Хл *a* (рис. 9, А).

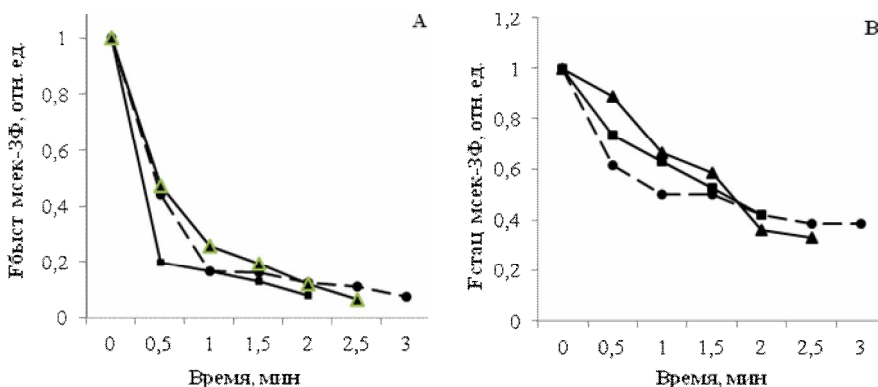


Рис. 9. Временная зависимость быстрой ($F_{\text{быст}}$) (А) и стационарной (В) фазы индукционной кривой мсек-3Ф Хл *a* от ингибирующего освещения (4000 моль фотоны $m^{-2}s^{-1}$) при одновременном инкубировании с ионами Cd^{2+} и Co^{2+} (10^{-3} М) тилакоидных мембран (20 мкг Хл/мл), при pH 7.0. ■ – Cd^{2+} , ▲ – Co^{2+} , ---●--- только фотоингибирование.

Ингибирующее действие ионов Cd^{2+} при избыточном освещении значительно сильнее, чем действие ионов Co^{2+} . В сравнении с поведением быстрой фазы мсек-ЗФ Хл *a* наблюдается относительно слабое ингибирование величины стационарного уровня (рис. 9, В). Эффект ингибирования величины быстрой фазы при действии Cd^{2+} даёт возможность предположить, что ионы Cd^{2+} приводят к ингибированию донорной стороны ФСII. Это подтверждается исследованиями многих авторов показавших ингибирование активности ФСII под действием ионов Cd^{2+} , направленных на определение сайтов связывания, путём ингибирования всего линейного транспорта электронов через ФСII [Bazzaz, Govindjee 1974; Vrettos et al., 2001] и показано, что таким сайтом повреждающего действия ионов Cd^{2+} является донорная сторона ФСII [Haag-Krewer et al., 1999; Pagliano et al., 2006].

ВЫВОДЫ

1. Влияние изменений pH среды и действия протеолитического фермента – трипсина на S_2 мультилинейный сигнал ЭПР $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера и кислород-выделяющую способность КВК тилакоидов шпината показывают, что изменение pH среды как в кислую, так и в щелочную области приводит к конформационным изменениям PsbO периферического белка $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера, тогда как действие трипсина модифицирует этот белок ближайшего окружения кластера. Таким образом, как конформационные перестройки белка ближайшего белкового окружения $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера в результате изменения pH среды, так и модификация его при воздействии протеолитического фермента приводят к нарушению $\text{S}_0/\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ и $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ переходов, проявляющемуся в уменьшении амплитуды мультилинейного S_2 сигнала ЭПР и подавлению выхода фотосинтетического кислорода.
2. Исследования активности разложения воды и мультилинейного ЭПР сигнала, ассоциированного с S_2 состоянием $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ -кластера, на ФСII частицах в области pH 4.5-8.5 показали, что выделение кислорода и мультилинейный ЭПР сигнал ингибируются при кислых ($\text{pK}_a \sim 5.3$) и щелочных ($\text{pK}_a \sim 8.1$) значениях pH и имеют максимальные значения при pH 6.0-7.0.
3. Исследования быстрой и стационарной фаз индукционной кривой мсек-ЗФ Хл *a* из ФСII на тилакоидных мембранах в области pH 4.5-8.5 показали, что снижение выделения кислорода и выхода S_2 мультилинейного ЭПР сигнала коррелирует с уменьшением мсек-ЗФ Хл *a*

только в щелочной области (pH 7.0-8.5).

4. Исследования pH-зависимости мсек-ЗФ Хл *a* установили, что рекомбинационный партнёр для первичного хинонового акцептора Q_A^- на донорной стороне ФСII определяется доступностью протонов в среде таким образом, что при значениях pH среды выше 7.5 этим партнёром является Mn_4O_5Ca -кластер, тогда как при значениях ниже pH 7.5 партнёром для рекомбинации служит $Y_Z^{\cdot}$.
5. Исследования локализации сайтов фотоингибирования в ФСII при разных значениях pH установили, что избыточное освещение повреждало реакцию рекомбинации с Mn_4O_5Ca -кластером $[(S_{i+1})^{\cdot} \leftrightarrow (P_{680}Q_A^-)]$ в большей степени, чем рекомбинационную реакцию с $Y_Z [(Y_Z^{\cdot} \leftrightarrow (P_{680}Q_A^-)]$, указывая на Mn_4O_5Ca -кластер как на сайт фотоповреждения при высоких значениях pH. Защита ФСII от фотоингибирования в присутствии экзогенного акцептора электрона PpBQ отчётливо наблюдалась в кислых условиях (pH<7.5). Присутствие PpBQ устраняет механизмы фотоингибирования индуцированные акцепторной стороной ФСII.
6. Исследования влияния токсического действия ионов тяжёлых металлов – Cd^{2+} и Co^{2+} на активность ФСII показали, что сайтами действия ионов Cd^{2+} и Co^{2+} являются донорная и акцепторная стороны ФСII, соответственно. Предполагается, что сайтом связывания Cd^{2+} является Mn_4O_5Ca -кластер или тирозиновый радикал Y_Z , один из рекомбинационных партнёров на донорной стороне ФСII, в зависимости от pH среды. Таким образом, действие ионов Cd^{2+} стимулирует главным образом механизм фотоингибирования, индуцированный донорной стороной ФСII.

СПИСОК ТРУДОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Алиева С.А., Рашидова С.Н., Гасанов Р.А. Зависимость процесса выделения кислорода, окисления Mn кластера и длительной флуоресценции фотосистемы 2 от pH среды, “Eksperimental biologiya və muasirlik” elmi konfransın materialları, BDU, 2005, s.121-122.
2. Aliyeva S.A., Gasanov R.A. Effect of pH on photosynthetic redox-reactions around photosystem II of the thylakoids, 5thEBSA & 15thIUPAB Inter. Biophysics Congress, Montpellier, France, Eur. Biophys. J., 34, 6, 2005, pp.810

3. Aliyeva S.A., Abdullayeva I.T., Gasanov R.A. Photosynthetic electron transport properties of wheat thylakoids in different environmental stress, Photosynthesis in the Post-Genomic Era, II: "Structure and Function of Photosystems", Pushino, Russia, 2006, pp. 228
4. Gasanov R., S.Aliyeva, S.Arao, A.Ismailova, N.Katsuta, H.Kitade, Sh.Yamada, A.Kawamori, F.Mamedov, Comparative study of the water oxidizing reactions and the millisecond delayed chlorophyll fluorescence in Photosystem 2 at different pH, Photochemistry and Photobiology B: Biology 86, 2007, 160-164.
5. Алиева С.А., Абдуллаева И.Т., Гасанов Р.А. Влияние конформации и модификации белков ближайшего окружения Мп кластера на кислород выделяющий комплекс ФСII тилакоидов, Известия НАНА (биол.сер.), 1-2, 2007, 26-34.
6. Aliyeva S.A., Gasanov R.A. The pH-dependence of PSII donor side photoinhibition, International Conference: Photosynthesis in the Global Perspective, 27-29 November 2008, Indore, India, p.25.
7. Aliyeva S.A. Ms-Delayed fluorescence – a probe for Photosystem II donor side in vitro photoinhibition, 7th EBSA European Biophysics Congress sup.1, S95, 2009, Genova, Italy, pp.S95
8. Abdullayev Kh., Aliyeva S.A., Bayramova S.A., Bashirdadeh A., Ganiyeva R.A., Dadashova S., Mahmudov Z., Kurbanova I.M., Gasanov R.A. Ms-Delayed fluorescence as an indicator of stress factors action on photosystem II, 7thEBSA European Biophysics Congress sup.1, S95, 2009, Genova, Italy, pp. S95
9. Aliyeva S.A. and Gasanov R.A. Millisecond Delayed Fluorescence (ms-DF) – as a probe of Photosystem II reactions in vivo and in vitro, The 2nd International Biophysical Congress and Biotechnology at GAP& 21stNatl. Biophysical Congress, Diyarbakir, Turkey, 2009, OP-17
10. Gasanov R.A., Aliyeva S.A. and Mamedov F. Delayed Fluorescence in a Millisecond Range – a Probe for Donor Side-Induced Photoinhibition in Photosystem II, In: Photosynthesis: Overviews on Recent Progress and Future Perspectives, (Eds: Guruprasad K.N., Itoh S., Mohanty P.) Narosa Publishing House, New Delhi, India, Chapter 7, 2012, pp.101-107
11. Aliyeva S., Qaniyeva R., Qaziyev A., Mahmudov Z. and Gasanov R. Delayed fluorescence (ms-DF) of chlorophyll *a* as a probe for analysis of photosynthesis in stressed environmental, "Aqrar təhsil sisitemində innovasiya texnologiyalarının tətbiqi və beynəlxalq əməkdaşlıq formaları" Beynəlxalq elmi-praktiki konfrans, 21-22 may 2010, Gəncə, s.55.

12. Arif Gaziyeu, Samira Aliyeva, Inna Kurbanova, Rena Ganiyeva, Sona Bayramova, Ralphreed Gasanov, The state of energy transforming biological membranes at the action of the heavy metals, 3rd Intern. Symp. Metallomics, 15-18 June, 2011, Münster, Germany, pp.
13. Aliyeva Samira A., Gasanov Ralphreed A. Action of double stress on Photosystem 2, 7th EBSA, 23-27 August, 2011, Budapest, Hungary, p.174.
14. Aliyeva S., Ganieva R., Novruzov E., Shikhiev A., Dadasheva S., Abdullayev Kh., Bashirzade A., Mahmudov Z. and Gasanov R. Responses and protection of photosynthetic reactions under stress, European Biotechnology Congress, 28 September – 1 October, 2011, Istanbul, Turkey, p.139-140.
15. Алиева С.А. Миллисекундная замедленная флуоресценция – путь познания донорной стороны фотосистемы II, Труды Института Ботаники НАН Азербайджана, том XXXI, 2011, с.415- 420.
16. Arif Gaziyeu, Samira Aliyeva, Inna Kurbanova, Rena Ganiyeva, Sona Bayramova, Ralphreed Gasanov, Molecular operation of metals into the function and state of photosystem II, Metallomics, 2011, pp. 1362-1367.
17. Aliyeva S. and Gasanov R. Donor side-induced photoinhibition in photosystem II, The 57th Biophys. Soc. Ann. Meet., Philadelphia, Pennsylvania, February 2-6, 2013 (<http://www.abstractsonline.com>).

33 kDa ZÜLALIN SUYUN OKSİDLƏŞMƏSİNDƏ VƏ 2-Cİ FOTOSİSTEMİN FOTOZƏDƏLƏNMƏSİNDƏ ROLU

XÜLASƏ

Fotosistem II (FSII) fotosintezin işıq reaksiyalarını yerinə yetirən vacib zülallardan ibarət olan fotokimyəvi supramolekulyar kompleksdir. Dissertasiya işi FSII-nin fizioloji və müxtəlif stress şəraitdə (intensiv işıqlandırma, ağır metallar) fəaliyyətində və suyun parçalanma prosesində FSII-nin fotokimyəvi reaksiya mərkəzinin yaxın zülal ətrafının, xüsusilə də PsbO (33 kDa) periferik zülalın rolunun öyrənilməsi və FSII-nin donor tərəfində bu stress amillərə qarşı həssas olan saytların müəyyən edilməsinə həsr olunmuşdur.

FSII hissəciklərində oksigen ayırma qabiliyyətinin itirilməsi və S_2 çoxxətli EPR signalın amplitudunun azalması millisaniyə ləngimiş fluoressensiyasının (msan-LF) tez komponentinin zəifləməsilə təkcə qələvi mühitdə (pH 7.0-8.5) müşahidə olunduğu göstərilmişdir. Bu da msan-LF metodunun Mn_4O_5Ca -klasterinin katalitik vəziyyətini, yəni FSII-nin donor tərəfində baş verən fotobiokimyəvi prosesləri əks etdirdiyini deməyə imkan verir.

$P680^+Q_A^-$ ilə rekombinasiya reaksiyasındakı partnyor pH-dan asılı olaraq ya $Y_Z^{\bullet}$, ya da Mn_4O_5Ca -klasteri ola bilər. Müəyyən edilmişdir ki, rekombinasiya fluoressensiyası turş mühitdə [$Y_Z^{\bullet} \leftrightarrow P680Q_A^-$], qələvi mühitdə isə [$S_{i+1}^{\bullet} \leftrightarrow P680Q_A^-$] reaksiyası nəticəsində əmələ gəlir.

PsbO periferik zülalın tripsinin təsirinə qarşı həssaslığı əsasında, $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2$ keçidlərin Mn_4O_5Ca -klasterinin oksidləşməsi zamanı baş verən konformasiya dəyişiklikləri ilə əlaqəli olduğu göstərilmişdir.

FSII-nin fotoingibirləşməsi lyumen qələviləşdirildiyində kəskin güclənir. Bu mühitin pH-ının qələvi tərəfə keçməsi ilə yaranan Y_Z [$Y_Z^{\bullet} \leftrightarrow (P680Q_A^-)$] və Mn_4O_5Ca -klasteri [$(S_{i+1})^{\bullet} \leftrightarrow (P680Q_A^-)$] arasında tarazlığın pozulması ilə əlaqədardır. Bu zaman fotoingibirləşmənin donor mexanizmi həlledici olur.

İntensiv işıq və ağır metalların (Cd^{2+} və Co^{2+}) eyni zamanda təsiri nəticəsində FSII-nin İntensiv işığın təsirinə daha həssas olduğu müəyyən olunmuşdur. Cd^{2+} ionlarının birləşmə saytı FSII-nin donor tərəfində mühitin pH-ından asılı olaraq rekombinasiya partnyoru olan ya Mn_4O_5Ca -klasterinin, ya da Y_Z tirozin radikalının bilavasitə yaxınlığında yerləşdiyi göstərilmişdir. Beləliklə, Cd^{2+} ionlarının təsiri fotoingibirləşmənin donor mexanizminin inkişafına gətirib çıxarır.

Samira Abbas Aliyeva

THE ROLE OF 33 kDa PERIPHERAL PROTEIN IN WATER OXIDATION AND PHOTOINHIBITION OF PHOTOSYSTEM II

SUMMARY

Photosystem II (PSII) is photochemical supramolecular complex, which consists the key proteins carrying out the light reactions of photosynthesis. The main aim of this thesis was dedication of identification the role of the protein environment of the photochemical reaction center PSII, particularly 33 kDa peripheral protein in PSII activity under physiological and various stress conditions (strong light, heavy metals) and in the reactions associated with the oxidation of water, and sensitive to these factors sites on the donor side of PSII.

The loss of oxygen evolution activity of PSII particles and the decrease of the amplitude of the S_2 multiline EPR signal correlated with falling the fast phase of ms-DF Chl *a* only in an alkaline medium (pH 7.0-8.5) was shown. This suggests that the ms-DF reflects the catalytic state of Mn_4O_5Ca -cluster, i.e. reactions characterizing photobiochemical processes on the donor side of PSII.

Depending on the pH a partner in the recombination with $P_{680}^+Q_A$ can be either $Y_Z^{\bullet}$, or Mn_4O_5Ca -cluster where localized electron vacancies. At the acidic environment recombination luminescence could be the result [$Y_Z^{\bullet} \leftrightarrow P_{680}Q_A^-$] reactions and in alkaline medium reaction of [$S_{i+1}^{\bullet} \leftrightarrow P_{680}Q_A^-$] is determined.

On the base of the availability of peripheral PsbO (33 kDa) protein to the action of trypsin transitions $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2$ associated with conformational rearrangements of the catalytic center at the oxidation of Mn_4O_5Ca -cluster is demonstrated.

The photoinhibition of PSII was stronger upon alkalization of lumen. It is believed that this is due to changes in the equilibrium between Y_Z [$Y_Z^{\bullet} \leftrightarrow (P_{680}Q_A^-)$] and Mn_4O_5Ca -cluster [$(S_{i+1})^{\bullet} \leftrightarrow (P_{680}Q_A^-)$], which occurs when the lumen pH shift to the alkaline side, and donor mechanism of photoinhibition is crucial. At simultaneous action of the excess light and the toxic effect of heavy metals, PSII is more sensitive to the action of an excess light, especially in the case of inhibition of the donor side by action of Cd^{2+} ions. The damaged sites under the action of the Cd^{2+} and Co^{2+} ions is a donor and acceptor side PSII, respectively. The binding site for Cd^{2+} in the immediate vicinity of the Mn_4O_5Ca -cluster or Y_Z depending from pH is shown. The effect of Cd^{2+} ions leads mainly to the development of a donor side mechanism of photoinhibition.

**AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
BOTANİKA İNSTİTUTU**

Əlyazması hüququnda

SAMİRƏ ABBAS QIZI ƏLİYEVƏ

**33 KDA ZÜLALIN SUYUN OKSİDLƏŞMƏSİNDƏ VƏ
2-Cİ FOTOSİSTEMİN FOTOZƏDƏLƏNMƏSİNDƏ ROLU**

2406.02 – Biokimya

Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru alimlik dərəcəsi
almaq üçün təqdim olunmuş dissertasiyanın

A V T O R E F E R A T I

BAKİ-2013