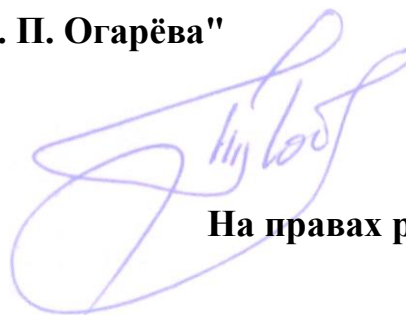


**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования**

**"Национальный исследовательский Мордовский государственный  
университет имени Н. П. Огарёва"**



**На правах рукописи**

**ТЮТЯЕВ ЕВГЕНИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
КАРОТИНОИДОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЕМПЕРАТУРЫ И ИЗМЕНЕНИЯ  
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ КЛЕТКИ**

**Специальность 03.01.02– Биофизика**

**Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель  
доктор биологических наук  
профессор Максимов Г.В.**

**САРАНСК  
2016**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1 Обзор литературы.....	9
1.1 Фотосинтетические пигменты .....	9
1.1.1 Хлорофиллы. Химическое строение, распределение, выполняемые функции .....	9
1.1.2 Общая характеристика каротиноидов как структурных компонентов фотосинтетического аппарата и липидных мембран фотосинтетических организмов.....	14
1.1.2.1 Биосинтез каротиноидов .....	16
1.1.2.2 Содержание каротиноидов в различных фотосинтетических комплексах .....	26
1.1.2.3 Изменения в составе и распределении ксантофиллов во время деэпоксидации, индуцированной светом высокой интенсивности .....	29
1.1.2.4 Влияние каротиноидов на физико-химические свойства мембран .....	32
1.1.2.5 Роль липид-липидных и липид-белковых взаимодействий в эффективной работе фотосинтетического аппарата.....	35
1.2 Светосбор и передача энергии возбуждения в фотосинтетических комплексах .....	37
1.2.1 Транспорт энергии через разные энергетические состояния каротиноидов в фотосинтетических комплексах .....	38
1.2.2 Тушение триплетных состояний хлорофилла и дезактивация АФК каротиноидами .....	42
1.2.3 Регуляция сбора световой энергии и участие каротиноидов в тушении синглетного состояния хлорофилла .....	44
Глава 2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.1 Объект.....	48
2.1 Методы .....	49
2.2.1 Абсорбционная спектроскопия .....	49

2.2.2 Спектроскопия комбинационного рассеяния света .....	51
2.2.3 Метод регистрации стационарной флуоресценции от клеток и тканей (оптический имидж) .....	55
2.2.4 Метод регистрации мгновенных спектров флуоресценции.....	57
2.2.5 Электронный парамагнитный резонанс в сочетании с методом спиновых меток.....	59
2.2.6 Метод инфракрасной спектроскопии .....	60
2.2.7 Метод замедленной флуоресценция хлорофилла .....	62
Глава 3 Результаты и их обсуждение .....	66
3.1. Изучение молекулярных характеристик каротиноидов в биологических мембранах мутантов цианобактерии <i>Synechocystis PCC6803</i> .....	66
3.1.1 Изучение конформации каротиноидов клеток цианобактерий <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 и её мутанта без ФС2 ( $\Delta$ PSII).....	68
3.1.2 Изучение конформации каротиноидов и времени жизни флуоресценции хлорофилла у мутантов $\Delta$ PSI/ $\Delta$ PSII, OCP и дикого типа цианобактерий <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 .....	81
3.1.3 Изучение действия температуры на конформацию каротиноидов при изменении насыщенности жирных кислот фотосинтетических мембран цианобактерий <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 .....	86
3.3 Изучение флуоресценции хлорофилла и физико-химических характеристик молекул каротиноидов в клетках высших растений .....	101
3.3.1 Исследование температурной зависимости флуоресценции хлорофилла в листьях инбредных линий кукурузы ( <i>Zéa máys</i> L.) и пшеницы ( <i>Triticum aestivum</i> L.).....	102
3.3.2 Исследование изменения содержания и конформации каротиноидов в клетках листьев инбредных линий и гибридов кукурузы ( <i>Zéa máys</i> L.) ...	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	130
ВЫВОДЫ.....	132
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	133
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	135

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Фотосинтез является одним из ключевых процессов, происходящих в биосфере, благодаря которому стало возможным образование органического вещества путем аккумуляции солнечной энергии в энергию химических связей. Основную роль в конверсии световой энергии играют белковые комплексы, содержащие в своем составе фотосинтетические пигменты – хлорофиллы и каротиноиды. Эти пигменты являются структурными компонентами большинства групп фотосинтетических организмов. (Golovko T.K. *et al.*, 2014. P.21-48). При их участии одновременно осуществляются процессы как сбора световой энергии (Хл, КАР), разделение зарядов (хлорофиллы P680, P700), транспорта электронов, так и защита всего ФСА от высоких энергий света и продуктов его действия (Telfer A., 2005; Корнеев Д.Ю., 2002).

В настоящее время широко отмечается, что каротиноиды играют важную роль не только поддержания стабильности ФСА, а также, являясь мощными природными антиоксидантами, приобретают высокую значимость и для других организмов (Baranski R. *et al.*, 2005). В связи с усиливающимся интересом к каротиноидам в последние годы (Ладыгин В.Г., 2014) весьма актуальным является выяснение влияния на каротиноиды тех или иных факторов среды (свет, температура, рН и др.) и как в ответ меняется их микроокружение на клеточном уровне. Изучение этих свойств молекул дает перспективу для их использования в различных отраслях жизни человека.

**Цель работы:** Исследование физико-химических свойств каротиноидов при действии температуры и изменения генетического профиля клетки.

**Задачи:**

1. Исследовать изменения в функционировании и распределении молекул каротиноидов в клетках дикого типа и мутанта цианобактерии;

2. Исследовать роль изменений конформации каротиноидов в регуляции миграции энергии в клетках мутанта и дикого типа цианобактерии;
3. Исследовать изменения конформации молекул каротиноидов в клетках дикого типа и мутанта цианобактерии при различных температурах;
4. Исследовать роль pH в изменении содержания и конформации каротиноидов в клетках водоросли;
5. Исследовать температурную зависимость флуоресценции хлорофилла в листьях высших растений;
6. Исследовать изменения содержания и конформации пигментов в клетках листьев инбредных линий и гибридов кукурузы (*Zea máys L.*).

**Научная новизна работы** Установлено, что в мутанте  $\Delta PSII$  в сравнении с диким типом, содержание каротиноидов увеличено и пигменты распределены равномерно по всей клетке. У дикого типа и мутантах  $\Delta PSI/\Delta PSII$ ,  $\Delta OCP$  цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*, обнаружено увеличение времени жизни флуоресценции хлорофилла, что коррелирует с уменьшением степени делокализации  $\pi$ -электронной системы молекул каротиноидов. Доказано, что у дикого типа цианобактерий конформация каротиноидов зависит от изменения жирнокислотного состава, вызванного ферментом – десатуразой. Повышение экстраклеточного pH с 8,0 до 9,0 приводит как к увеличению содержания каротиноидов в клетках водоросли, так и к изменению их конформации (состава). Доказано, что инбредные линии растений отличаются в строении ССК ФС 1 и 2, а гибриды - конформацией молекул каротиноидов. Изменение температуры приводит как к увеличению флуоресценции хлорофилла, так и изменению распределения пигмента в листе, что, вероятно, связано с фазовыми переходами липидов мембран.

**Научно-практическая значимость работы:** Полученные результаты представляют дополнительную информацию для более глубокого изучения путей взаимодействия между конформацией каротиноидов, флуоресценцией хлорофилла и физико-химическим состоянием фотосинтетических мембран, а также разработки методологии тестирования процессов регуляции и адаптации фотосинтетического аппарата к стрессовым условиям, молекулярной генетики и селекции. Результаты по изменению содержания, конформации и распределения пигментов (каротиноиды, хлорофилл) могут быть предложены в качестве методологии диагностики состояния ФСА.

**Связь работы с научными программами.** Часть представленных результатов были получены в ходе исследований, проведенных в рамках научно-практических работ при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере У.М.Н.И.К. 2014–16 «Разработка метода индукции флуоресценции хлорофилла для изучения состояния фотосинтетического аппарата» (проект 3069 ГУ/2014 от 04.08.2014г).

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на Огарёвских чтениях в Мордовском государственном университете им. Н. П. Огарёва (Саранск, 2012–2013); на конференции «Актуальные проблемы фундаментальных и прикладных наук» (Саранск, 2012); на конференции БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI века: 16-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 16-21 апреля 2012); на международной научной конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Саранск, 3-5 октября 2012г.); на XXI Пущинских чтениях по фотосинтезу и Всероссийской конференции «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты» (Пущино, 2015); Всероссийской конференции с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке» (Саранск, 2015), международной конференции Biophysics, Biophotonics and Biotechnology (Москва, 2016).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 16 работ, в числе которых 4 статьи в российских научных журналах, рекомендованных ВАК, 3 статьи цитируемые в базах данных Web of Science и Scopus.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. У мутанта *ΔPSII* содержание каротиноидов увеличена и молекулы в клетке распределены более равномерно, чем в диком типе;

2 В фотосинтетических системах мутанта *ΔOCP* и дикого типа обнаружены изменения конформации каротиноидов и хлорофилла: у хлорофилла возрастает время пребывания в возбужденном состоянии, а у каротиноидов увеличивается степень делокализации π-электронов;

3. Изменение жирнокислотного состава липидов мембраны, вызванное активацией фермента десатуразы ЖК у дикого типа цианобактерий приводит к делокализации π-электрона в полиеновой цепочке каротиноидов как в фотосинтетических системах, так и в мембране;

4. В клетках листьев растений функционирование фотосистем зависит от вязкости тилакоидной мембраны, что важно для адаптации растения к действию температур;

5. У генетически модифицированных гибридов и линий пигменты ФС1 и 2 отличаются по составу и конформации: у гибридов меняется конформация каротиноидов и не меняется состав ССК, а у линий меняется состав ССК.

Личный вклад автора заключается в поиске и анализе научной литературы по теме работы, участии в планировании и постановке конкретных задач диссертации на всех этапах её выполнения, осуществлении экспериментальной части исследования, в обсуждении результатов, подготовке публикаций и докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Во введении обоснована актуальность

темы диссертации, сформулированы цель и основные задачи, отражена научная новизна и практическая значимость работы.

Первая глава представлена аналитическим обзором литературы, касающегося общей характеристики хлорофиллов и каротиноидов, а также путей транспорта энергии от каротиноидов к хлорофиллам и обратно в фотосинтетических комплексах. Во второй главе изложены экспериментальные методики и теоретические аспекты методов, используемых в работе. В третьей главе изложены основные результаты и их обсуждение. В заключении сформулированы основные результаты работы



## **Глава 1 Обзор литературы**

### **1.1 Фотосинтетические пигменты**

Процесс фотосинтеза был бы невозможен без фотосинтетических пигментов, выполняющих роль сбора, конверсии световой энергии в энергию химических связей АТФ и НАДФН и безопасности протекания вышеуказанных процессов. Практически все клетки способные к фотосинтезу имеют два общих класса пигментов – это (бактерии) хлорофиллы и каротиноиды. У разных систематических групп фотосинтетических организмов хлорофиллы и каротиноиды могут несколько отличаться по химическому строению, локализации и количественному содержанию, что может быть обусловлено приспособлением к условиям обитания. Помимо хлорофиллов и каротиноидов у низших фотосинтетических организмов (цианобактерий) имеется ряд дополнительных пигментов, выполняющих аналогичную функцию хлорофилла в ССК высших растений и водорослей. К ним относятся фикоцианин, аллофикоцианин и фикоэритрин (MacColl R., 1998). Эти пигменты входят в состав светособирающих антенн для комплексов ФС1 и ФС2 и при физиологической необходимости (например, при избыточной восстановленности пула хинонов, повреждении ФС1 или ФС2) могут мигрировать от одного комплекса к другому.

Однако, ключевая роль многих процессов фотосинтеза принадлежит (бактерии) хлорофиллам и каротиноидам, о которых и пойдет речь далее.

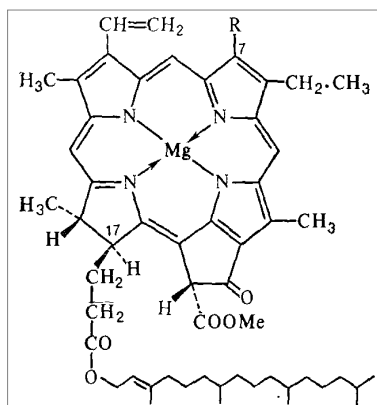
#### **1.1.1 Хлорофиллы. Химическое строение, распределение, выполняемые функции**

Термин «хлорофилл» был впервые предложен Пеллеттиером и Кавентоу в 1818 году при описании зелёных пигментов, которые были вовлечены в процессы фотосинтеза в высших растениях. Первые важнейшие шаги в

изучении свойств хлорофиллов были сделаны Тимирязевым, который показал, что хлорофиллы поглощают большую часть световой энергии в красной области спектра и играют важную роль в процессах фотосинтеза (1877). Ученым Цветом были впервые хроматографически разделены хлорофиллы из растительных экстрактов в начале XX века. В 1915 г. была вручена Нобелевская премия Вильштаттеру и Штолю за то, что они первыми доказали, что хлорофиллы являются важными фотоактивными компонентами ФСА высших растений. Также весомый вклад в изучение роли хлорофиллов сыграл отечественный ученый Любименко, который предложил концепцию тене- и светлюбивых растений, на основании своих исследований при определении концентрации этих типов пигментов у растений разных климатических зон. Немаловажной вехой в изучении этих пигментов было установление точной химической формулы и искусственного синтеза хлорофилла. Последнее достижение было удостоено Нобелевской премии в 1964 г (Golovko T.K. *et al.*, 2014. P.140-141).

(Бактерио) хлорофиллы – зеленые пигменты, обуславливающие окраску фотосинтезирующих бактерий, водорослей и растений в зеленый цвет; при их участии осуществляется процесс фотосинтеза. Основу молекулы хлорофилла составляет тетрапирольный скелетный каркас – порфин. При замещении в порфине водородных атомов радикалами (метил, этил, пропил) образуются порфирины. Порфирин, структура которого лежит в основе молекулы хлорофилла, имеет, кроме четырех гетероциклов, пятую изоциклическую группировку – циклопентан (Бриттон Г., 1986). В настоящее время известно более 100 хлорофиллов (Scheer H., 2006. P. 1-26). Они отличаются по химическому строению, окраске, распространению среди живых организмов. Цвет хлорофилла, исходя из химического строения его молекулы, объясняется наличием двойных конъюгированных связей в порфириновом кольце и образованием металлорганической связи с магнием (Ладыгин В.Г., 2006).

Все зеленые ткани высших растений содержат в хлоропластах два хлорофилла *a* и *b*. Ядром этих соединений служит форбин, представляющий собой хлориновую структуру, содержащую добавочное изоциклическое кольцо (рис. 1.1). Это кольцо образуется в процессе биосинтеза путем окисления и замыкания цепи пропионатного заместителя при С–13. Структуры хлорофиллов *a* и *b* различаются лишь заместителем при С–7. В хлорофилле *a* –  $\text{CH}_3$ , а в хлорофилле *b* –  $\text{CHO}$  (Бриттон Г., 1986. С.159-163).

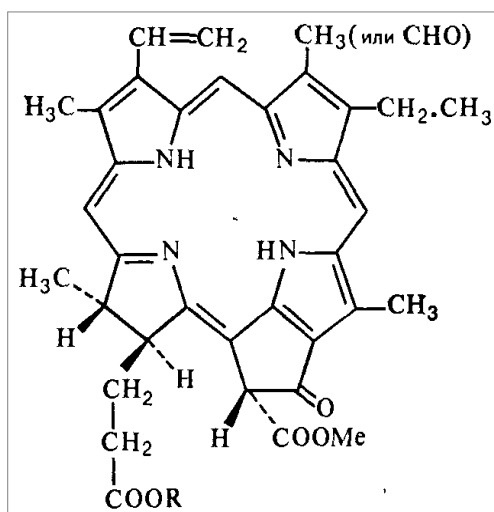


Хлорофилл *a* –  $\text{R}-\text{CH}_3$ ; хлорофилл *b* –  $\text{R}=\text{CHO}$

Рисунок 1.1– Структурная формула хлорофиллов

Хлорофиллы растворимы в большинстве органических растворителей. Они не стабильны и легко разрушаются при действии света, кислорода, тепла, кислот и щелочей. В присутствии кислот удаляется ион магния и в результате образуется феофитин (рис. 1.2). Более жесткая обработка кислотой приводит к отщеплению этерифицирующего спирта, в результате чего образуется водорастворимый феофорбид (рис.1.3).

Феофорбиды и их метиловые эфиры, а также хлорофиллиды являются продуктами щелочного гидролиза хлорофиллов в отсутствие кислорода. Некоторые из этих продуктов широко используются в исследованиях биосинтеза хлорофилла с применением радиоактивных изотопов углерода и водорода и стабильных изотопов углерода (Бриттон Г., 1986. С. 159-163).



R – остаток фитола

Рисунок 1.2 – Структурная формула феофитина

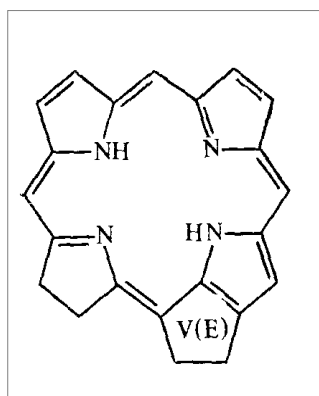


Рисунок 1.3 – Структурная формула феофорбида

Спектральные свойства хлорофилла являются основой для сбора и конверсии световой энергии в процессе фотосинтеза. Различия между абсорбцией *Хл а* и *Хл b* обусловлены ассоциацией макроциклической  $\pi$ -электронной системой и  $\pi$ -электронами кетогруппы в *Хл b*.

Существуют три типа структуры хлорофиллов (рис.1.4):

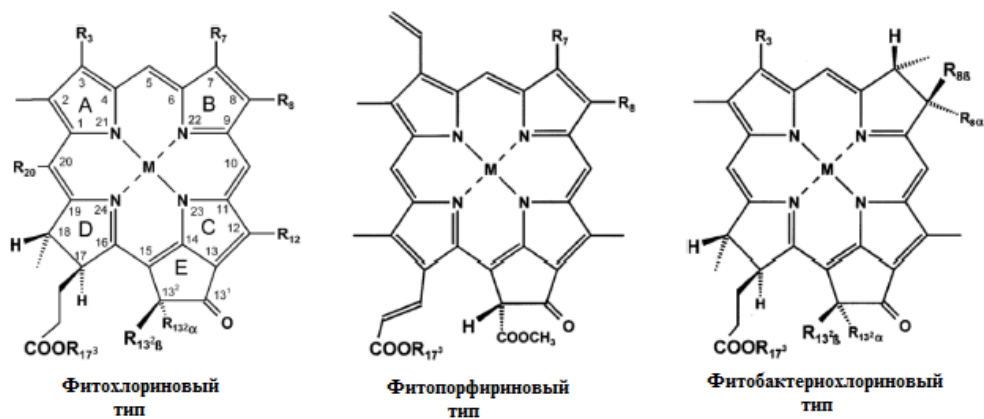


Рисунок 1.4 Типы структур хлорофиллов

1. Mg-фитопорфириновый тип включает семейство хлорофилла *c*. С химической точки зрения они относятся к протохлорофиллидам, но с биологической точки зрения они, будучи незтерифицированными участвуют в светосборе;

2. Mg-фитохлорины. Они владеют D-кольцом, в котором редуцированы транс двойные связи у  $\Delta C17-18$  атомов углерода. Этот тип хлорофиллов включает Хл *a* и *b* высших растений и зеленых водорослей и Хл *d* и *f*, Бхл *c*, *d*, *e*. Все эти хлорофиллы являются хлорофиллами антенны, но Хл *a* и *d*, могут быть сосредоточены в РЦ. Главным образом они поглощают свет в спектральной области 400 – 450 нм и 640 – 700 нм. У Хл *d* и *f* имеются формильные группы в кольце А в С3 и С2 положениях соответственно, что позволяет увеличить область спектра абсорбции от 700 до 710 и до 750нм соответственно (Chen M. *et al.*, 2009).

3. Mg-бактериохлорофиллы. Этот тип включает в себя Бхл *a*, *b*, *g*, где в кольцах В и D имеет место транс редукция при  $\Delta C7-8$  и  $\Delta C17-18$  связей соответственно. Бхл также поглощает в двух областях спектра: в ультрафиолетовой (360-400) нм и в ближней ИК области спектра (770-795 нм). Эти типы хлорофиллов содержатся в аноксигенных фотосинтетических пурпурных и гелиобактериях. Вместо *Mg*, Бхл *a* содержит *Zn* в качестве центрального атома металла, как было показано на *Acidiphilium rubium*

(Kobayashi M. *et al.*, 2006). Бхл *b* имеет лабильную этилен-диеновую группу ( $=CH-CH_3$ ) при С8 атоме углерода, как и Бхл *g*.

Макроцикл *Mg* порфиринов полностью ненасыщен и они умеренно поглощают свет в области 620 нм и больше в 10-кратном размере в полосе Соре (400-450нм) (рис.1.5).

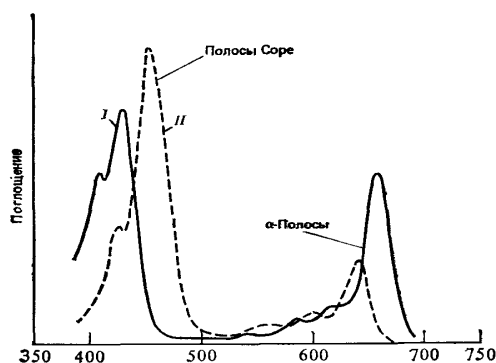


Рисунок 1.5 – Спектры поглощения света хлорофиллов а (I) и б (II) в диэтиловом эфире

Более подробно об этом типе хлорофиллов изложено в обзоре (Zarata M. *et al.*, 2006. P. 39-53).

### 1.1.2 Общая характеристика каротиноидов как структурных компонентов фотосинтетического аппарата и липидных мембран фотосинтетических организмов

Большинство каротиноидов состоят из С40-углеводородного остова, содержащего сопряженные двойные связи. Именно эта система двойных связей выполняет функции хромофора и определяет спектральные свойства конкретных каротиноидов, которые имеют три или два максимума поглощения света в диапазоне от 420 до 530 нм. Количество конъюгированных двойных связей в гидрокарбоновой цепи определяет цвет каротиноидов. С увеличением количества конъюгированных  $-C=C-$  связей, абсорбционный максимум сдвигается в сторону больших длин волн. Например, фитоеин с тремя конъюгированными связями хорошо поглощает в ультрафиолетовой области спектра, в то время как ликопин с одиннадцатью

конъюгированными двойными связями имеет красный цвет (Смоликова Г.Н., *и др.*, 2015).

Каротиноиды встречаются как в свободном состоянии, так и в виде гликозидов; они способны нековалентно связываться с белками и мембранными липидами. Цис- и транс-стереоизомеры каротиноидов существенно различаются по физико-химическим свойствам и выполняют различные функции. Большинство природных каротиноидов (ликопин, циклические каротины, ксантофиллы) находятся в термодинамически более стабильной *all*-транс-конфигурации, в то время как цис-изомеры присутствуют в небольших количествах (Cuttriss A.J. *et al.*, 2004).

Каротиноиды ФСА, могут служить как дополнительные пигменты, способствующие увеличению потенциала светособирающих антенн ФС1 и ФС2 в синей области спектра (они увеличивают поперечное сечение светособирающей антенны). Очевидно, для максимизации сбора световой энергии предполагается, что каротиноиды находятся в непосредственной близости и в необходимом положении по отношению к ССК антенн фотосистем. Таким образом, большинство каротиноидов тилакоидной мембраны специфически собраны в пигмент-белковые комплексы, где белковый каркас определяет и расстояние, и ориентацию по отношению к молекулам хлорофилла в том же самом комплексе. В случае семейства белков ССК, ксантофиллы являются структурными детерминантами для всего комплекса, так что в их отсутствии гомокомплексы не могут складываться в полноценную антенну (Theg S.M. *et al.*, 2014. P. 397-399). В случае ФС2 отсутствие каротиноидов приводит к её дестабилизации и угнетению выделения кислорода (Sozer O. *et al.*, 2010). Тем не менее, часть несвязанных каротиноидов, распределена в липидной фазе мембран, где она играет антиоксидантную функцию (Steiger S. *et al.*, 1999; Johnson M.P. *et al.*, 2007) и модулирует физико-химические свойства липидного бислоя (Navaux M., 1998; Gruszecki W.I. *et al.*, 2005; Kłodawska K. *et al.*, 2012). Установлено, что размер пула каротиноидов в липидной фазе составляет ~

15% от общего содержания каротиноидов в *Arabidopsis*. На мембранах тилакоидов шпината было продемонстрировано, что свободная фракция ксантофиллов, может пополняться за счет слабосвязанных ксантофиллов виолоксантинового цикла на сайте V1 связывания с ССК2 (Ruban A.V. *et al.*, 1999). Исходя из этого, требуется большая осторожность для точной оценки от белок-несвязанной липидо-растворимой фракции пигмента, описанной выше.

### 1.1.2.1 Биосинтез каротиноидов

Предшественником каротиноидов является изопентенилпирофосфат (ИППФ) или его изомер – диметилаллилпирофосфат (ДМАПФ), который в растениях может синтезироваться двумя независимыми метаболическими путями (рис.1.6) – глицеральдегидфосфат-пируватным (ГФП) или мевалонатным (МВК) (Kasahara H. *et al.*, 2002). В первом случае ИППФ/ДМАПФ синтезируется в пластидах из 1-дезоксисилулозо-5-фосфата, который образуется из пирувата и глицеральдегид-3-фосфата (Nagata N. *et al.*, 2002) и также является предшественником этерифицированного спирта в составе молекул хлорофилла – фитола. Второй путь синтеза ИППФ/ДМАПФ протекает в цитоплазме из мевалоновой кислоты. Перемещение ИППФ между пластидами и цитоплазмой может осуществляться с помощью мембранного переносчика, который выявлен в пластидах (Okada K. *et al.*, 2008). В отличие от растений цианобактерии владеют только МВК путем биосинтеза. Эукариотические фототрофы приобрели этот путь биосинтеза каротиноидов от древних цианобактерий, предположительно, предшественников современных хлоропластов. Наземные растения и некоторые группы водорослей содержат оба пути биосинтеза.



### ***Глицеральдегид-пируватный способ синтеза ИППФ/ДМАПФ***

Первый шаг этого пути заключается в образовании 1-дезоксидеокси –D-ксилоулозо-5-фосфата (1ДК5Ф) путем конденсации пирувата и глицеральдегид-3-фосфата, при этом от пирувата отщепляется карбонильная группа. Фермент 1-дезоксидеокси –D-ксилоулозо-5-фосфат синтаза (1ДК5ФСин) катализирует эту реакцию в присутствии тиаминдифосфата как кофактора и требующего двухвалентных ионов  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ . Следующий фермент 1-дезоксидеокси-D-ксилоулозо-5-фосфат-редуктоизомераза (1ДК5ФИзо обозначаемая как МЭФ синтаза) катализирует изомеризацию и редукцию 1ДК5Ф с образованием 2-С метил-D-эритрол 4-фосфата (МЭФ) в НАДФН – зависимой реакции (ее механизм уточняется). МЭФ является субъединицей разветвленной цепи изопрена. Дальнейшая трансформация наблюдается через циклофосфатный интермедиат. К этому концу МЭФ-цитидил трансфераза транспортирует цитидил фосфатный остаток к МЭФ, и затем остаток фосфата от АТФ транспортируется на гидроксигруппу в позиции 2 к образовавшемуся на предыдущем этапе 4-(цитидин 5`-дифосфо)-2-С-метил-D-эритрол (ЦДФ-МЭ2Ф) в реакции катализируемой ЦДФ-МЭ-киназой. ЦДФ-МЭ2Ф конвертируется при помощи МЭЦДФ синтазы через внутримолекулярное трансфосфорилирование (с высвобождением цитидил-монофосфата (ЦМФ)) с образованием 2-С-метил-D-эритрол 2,4 циклофосфата (МЭЦДФ). МЭЦДФ конвертируется до ИППФ и ДМАПП в двух последовательных реакциях ферментативным путем (при участии фермента ГМБДФ-синтазы) с образованием интермедиата (Е)-1-гидрокси-2 метил-2 бутенил дифосфата (ГМБДФ). Полученный продукт служит субстратом для ГМБДФ-редуктазы. Химия этого пути и генов, опосредующих синтез ферментов этой стадии, подробно описаны в обзорах (Lichtenthaler H. K.; 1999; Rohmer M., 2008).

В растениях и водорослях ферменты МЭФ-пути закодированы в ядре и транспортируются в пластидные сайты их биосинтетической активности. (Lohr M. *et al.*, 2012.) ДКФ, катализирующий первую реакцию пути играет критическую скорость-лимитирующую роль. Хотя каротиноиды

синтезируются в основном из изопреноидов, которые поставляются МЭФ путем, имеются некоторые связи с интермедиатами МВК пути, вероятно, для обеспечения баланса между двумя путями.

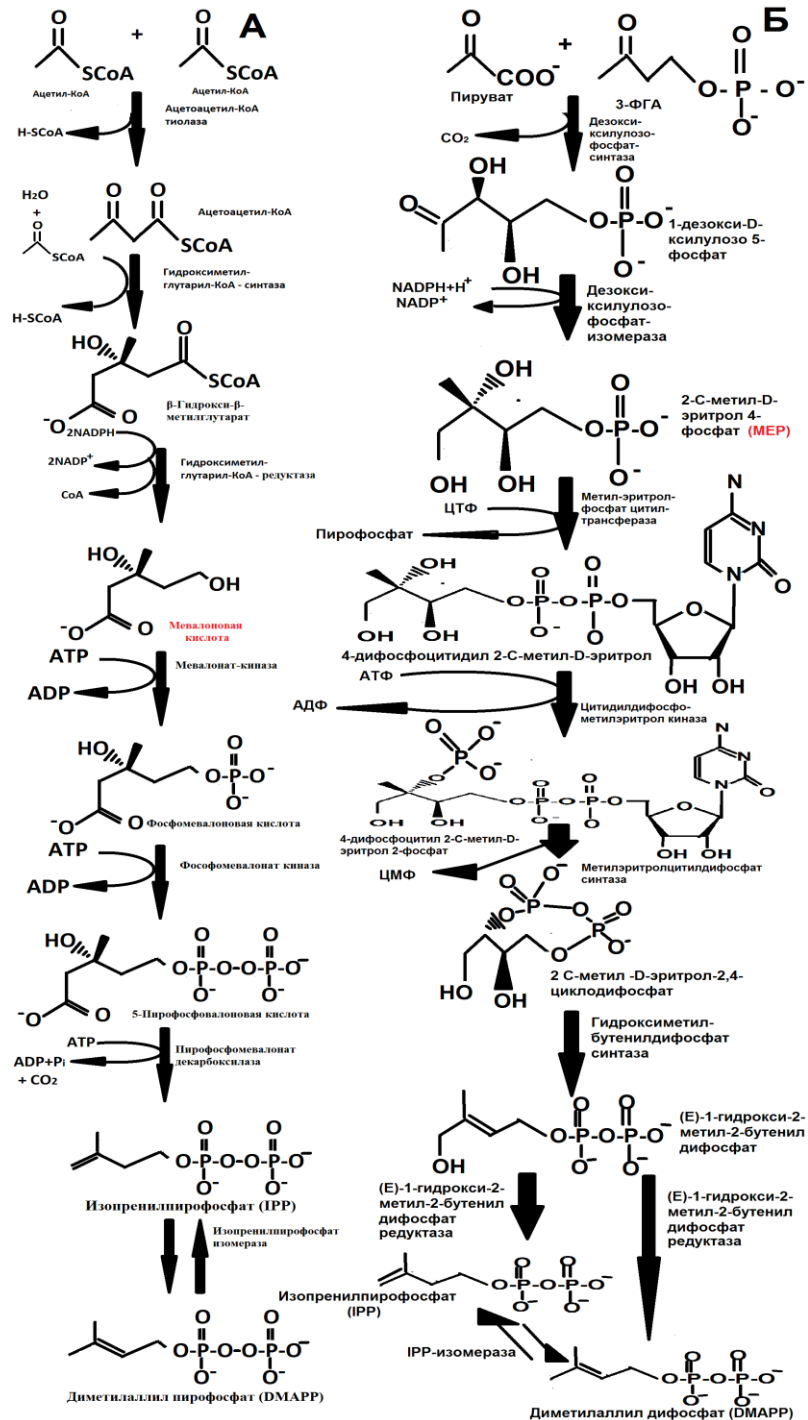


Рисунок 1.6 Пути биосинтеза предшественника каротиноидов (изопентил пирофосфат) ИППФ и (диметил аллил пирофосфат) ДМАПФ. А – мевалонатный путь; В – глицеральдегид – фосфатный путь

### ***Мевалоновый путь биосинтеза ИППФ/ДМАПФ.***

Путь начинается с конденсации двух молекул ацетил-КоА с образованием ацетоацетил-КоА. Далее происходит конденсация третьей молекулы ацетил-КоА с образованием  $\beta$ -гидрокси-метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА) в реакции катализируемой ГМГ-КоА-синтазой. Тиоэфир в ГМГ-КоА редуцируется до алкогольной группы в ГМГ-КоА- катализируемой реакции (НАДФН-зависимой) с образованием мевалоната (МВК). На следующем этапе МВК фосфорилируется в области ОН- группы ферментом МВК-киназой, следом происходит фосфорилирование первого остатка фосфорной кислоты при действии фермента фосфо-МВК-киназы. Далее в АТФ-зависимой реакции 5 дифосфоМВК декарбоксилируется и дегидратируется до ИППФ при участии фермента дифосфатМВК-декарбоксилазы. ИППФ-изомераза синтезирует ДМАПФ из ИППФ в обратимой (равновесной) реакции.

Ферменты МВК пути растворены в цитоплазме (кроме ГМГ-редуктазы), которые связаны с эндоплазматическим ретикулом мембран. При помощи amino-терминального домена (Leivar P. *et al.*, 2005) ГМГ-редуктаза играет ключевую роль в регуляции активности этого пути.

Изопреноидные единицы это объекты для реакции полимеризации. ДМАПФ является первоначальным субстратом для изопренил-трансферазы, которая формирует цепь путем реакции с ИППФ в 1-4 конденсации (голова к хвосту) с последовательным выделением дифосфатов. Последовательные шаги элонгации приводят к образованию соединений, таких как геранил-пирофосфат (С10), фарнезит-дифосфат (С15) и геранил-геранил-пирофосфата (ГГПФ, С20) – ключевого интермедиата синтеза каротиноидов и фитольного остатка хлорофиллов.

### ***Синтез ликопина***

Следующим важнейшим этапом в синтезе каротиноидов является синтез ликопина – общего предшественника всех каротиноидов (рис. 1.7). Он

начинается с образования 15-цис-фитоена – первого цветного каротина, из двух молекул ГГПФ.

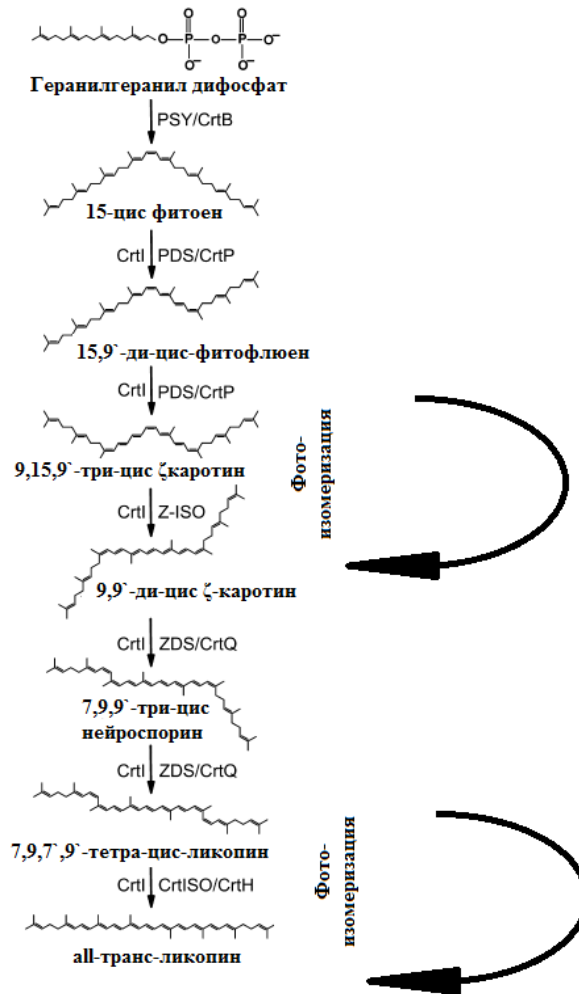


Рисунок 1.7 Путь биосинтеза all-транс ликопина из геранилгеранил дифосфата. PSY/CrtB – фитоен синтаза; PDS/CrtP – фитоен десатураза; ZDS/CrtQ ζ-каротин-десатураза; Z-ISO, 15-цис- ζ-каротин изомераза; CrtISO/CrtH – цис – транс каротиноид изомераза; CrtI – каротин изомераза бактериального типа

Реакция конденсации осуществляется голова к голове (полярные) при участии фермента фитоен-синтазы (ФС) в бактериях эквивалент – Crt-β. Синтез all-транс ликопина из фитоена (15-цис) включает в себя четыре последовательных шага десатурации и изомеризации. Эти реакции (десатурации и изомеризации) приводят к образованию хромофоров каротиноидов. Количество конъюгированных двойных связей в

гидрокарбоновой цепи определяет цвет каротиноидов. С увеличением количества конъюгированных  $-C=C-$  связей, абсорбционный максимум сдвигается в сторону больших длин волн. Фитоен с тремя конъюгированными связями хорошо поглощает в ультрафиолетовой области спектра, в то время как ликопин с одиннадцатью конъюгированными двойными связями имеет красный цвет. В растениях реакции десатурации осуществляются двумя связанными ферментами – фитоен-десатуразой (PPS/CrtP) и  $\zeta$ -каротин десатуразой (ZPS/CrtQ) (Sandmann G., 2009). На каждом шаге два атома водорода удаляются из смежных позиций, на месте которых возникает двойная связь. 9, 15,9'-три цис  $\zeta$ -каротин образован через 15, 9' ди цис фитофлюен фитоен-десатуразой, однако, он не является благоприятным субстратом для  $\zeta$ -каротин десатуразы. Сперва цис двойная связь при C15 углеродном атоме изомеризуется в присутствии света либо фермента  $\zeta$ -каротин изомеразы (Z-ISO). Затем наблюдаются две дальнейшие десатурации. В результате чего образуется 7,9,7',9' тетра цис ликопин (проликопин) через интермедиат 7,9,9' три цис нейроспорин. Проликопин не может быть утилизирован до реакции циклизации пока не изомеризуется до all-транс формы.

Процесс изомеризации осуществляется либо на свету, либо ферментативно при помощи цис-транс изомеразы (Crt ISO/CrtH) (Yu Q. *et al.*, 2011; Isaacson T. *et al.*, 2002). Масамото с соавторами (Masamoto K. *et al.*, 2001), изучая CrtH фермент *Synechocystis sp. PCC6803*, показали, что оба, CrtQ-образованные каротиноиды поли-цис нейроспорин и ликопин, были изомеризованы до all-транс формы при помощи CrtH. Гомологи растительных Z-ISO широко распространены в цианобактериях, но их функции до сих пор мало изучены.

### ***Синтез каротинов***

Ликопин – начальное соединение, составляющие концевые группы которого, подвергаясь модификациям, продуцирует большое количество каротиноидов с различными физическими свойствами (рис. 1.8). Два

фермента  $\beta$ -циклаза (LYCB/CrtL- В ) и ликопин  $\epsilon$ -циклаза (LYCE/CrtL- Е ), используют ликопин как субстрат, создавая точку разветвления в пути биосинтеза каротиноидов.

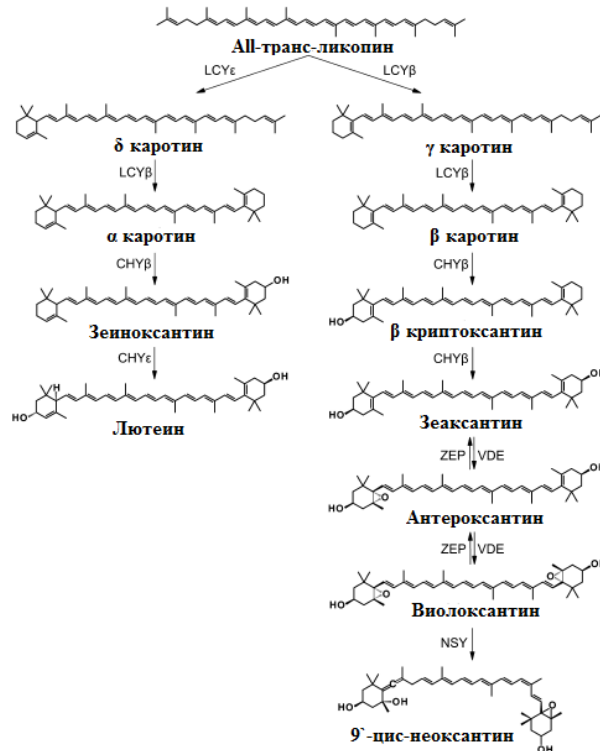


Рисунок 1.8 Путь биосинтеза каротиноидов в высших растениях: LYC $\epsilon$ -ликопин  $\epsilon$ -циклаза; LYC $\beta$  – ликопин  $\beta$ -циклаза; CHY $\beta$  –  $\beta$ -гидроксилаза; CHY $\epsilon$  –  $\epsilon$ -гидроксилаза; ZEP – зеаксантин эпоксидаза; VDE – виолоксантиндеэпоксидаза; NSY – неоксантин синтаза;.

Они вводят терминальные  $\epsilon$  и  $\beta$  ионовые кольца, путем циклизации изопреноидных групп ликопина. LYCE –циклаза формирует на одной из концевых сторон ликопина  $\epsilon$ -кольцо, образуя  $\delta$ -каротин. Он является плохим субстратом для LYCE –циклазы, но хороший субстрат для LYCB –циклазы, таким образом, формируются  $\beta$ ,  $\epsilon$  каротины ( $\alpha$ -каротин) и  $\beta$ ,  $\beta$ -каротины ( $\beta$ -каротин) – типичные каротиноиды наземных растений. Водоросли и цианобактерии содержат, в основном  $\beta$ -каротин и его производные, но у некоторых типов водорослей (*Rhodophyta*, *Cryptophyta*, *Chlororachniophyta*, *Chlorophyta*) и видов родов цианобактерий *Acariochloris* и *Prochlorococcus* также синтезируют  $\alpha$ -каротин (Takaichi S. *et al.*, 2007, 2012; Takaichi S., 2011).

Многие циклазы Crt-L-типа распределены в некоторых цианобактериях, таких как *Prochlorococcus* и *Synechocystis elongatus* PCC7942. Другие цианобактерии, лишенные Crt-L, содержат Crt-A и паралогичные Crt-P ликопин-циклазы, которые были идентифицированы путем определения аналогичной последовательности (генетического кода) ликопин циклаз в зелено-серных бактериях *Chlorobium tepidum*. Эти ферменты были охарактеризованы в *Synechococcus* sp.7002.

Однако, CruA/CruP гомологи в *Synechocystis* sp. PCC6803 и *Anabena* sp. PCC7120 показали отсутствие активности этих ликопин циклаз. Эти организмы могут содержать другие, пока неизвестные типы циклаз.

### **Синтез ксантофиллов**

Гидроксилирование каждого из ионовых колец  $\alpha$  и  $\beta$  каротина в C3 или C3' положениях продуцирует образование лютеина через зеиноксантин или зеаксантина через  $\beta$ -криптоксантин соответственно (рис.1.9). Эпоксидация зеаксантина ферментом зеаксантин-эпоксидазой (ЗЭ) при C5, C6 приводит к образованию антероксантина (промежуточного соединения), а дальнейшая эпоксидация C5', C6' атомов углерода приводит к образованию виолоксантина. В зависимости от условий среды, зеаксантин может конвертироваться из виолоксантина ферментом виолоксантиндеэпоксидазой (ВДЭ), катализирующей удаление двух эпоксидных групп. Взаимопревращение этих двух типов ксантофиллов в тилакоидах высших растений носит название цикла ксантофилла (виолоксантинового цикла). Он является ключевым фотозащитным механизмом зеленых водорослей и наземных растений. Диатомовые и динофлагелиновые водоросли имеют диадиноксантиновый цикл, включающий эпокси каротиноид – диадиноксантин (Ддкс) и продукт его деэпоксидации – диатоксантин. Механизм этого работы этого цикла аналогичен циклу превращения виолоксантина. В подобных водорослях также представлен и виолоксантиновый цикл. В высших растениях может встречаться еще и лютеин-5,6 эпоксидный цикл.

Виолоксантин в дальнейшем может конвертироваться в неоксантин, путем открытия циклогексанового 5-6 эпоксидного кольца, в результате чего формируется алленовая связь. Важность эпоксикаротиноидов объясняется тем, что являются субстратом для синтеза абсцизовой кислоты – одного их ключевых фитогормонов.

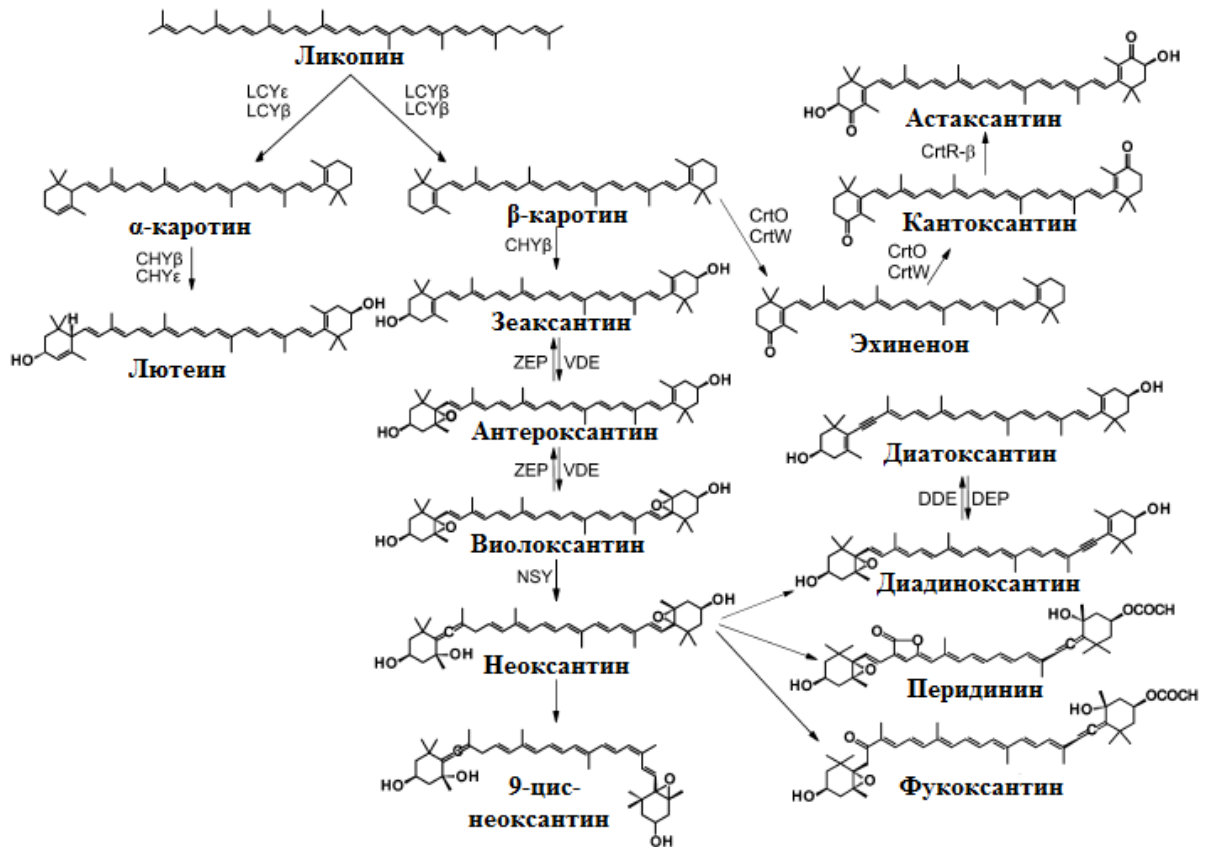


Рисунок 1.9 Путь биосинтеза каротиноидов в эукариотических водорослях. LCY $\epsilon$ - ликопин  $\epsilon$ -циклаза; LCY $\beta$  – ликопин  $\beta$ -циклаза; CHY $\beta$  –  $\beta$ -гидроксилаза; CHY $\epsilon$  –  $\epsilon$ -гидроксилаза; ZEP – зеаксантин эпоксидаза; VDE – виолоксантиндеэпоксидаза; NSY – неоксантин синтаза; CrtR – каротин  $\beta$ -гидроксилаза; CrtO/CrtQ – каротин  $\beta$ -кетолаза.

Для цианобактерий типичны такие каротиноиды как:  $\beta$ -каротин, его гидроксильированные и кетолированные формы, а также гликозиды каротиноидов.  $\beta$ -каротин гидроксилаза (CrtR) продуцирует образование двух гидроксигрупп при C3 и C3' позициях, в результате чего образуется



зеаксантин через промежуточный интермедиат  $\beta$ -криптоксантин (Makino T. *et al.*, 2008). Окси- и кетопроизводные – эхиненоны образуются ферментативным путем -  $\beta$ -каротин – кетолазой (CrtO), дальнейшая активность этого фермента продуцирует кантаксантин (Breitenbach J. *et al.*, 2013). Каталитическая функция CrtW (другой известной  $\beta$ -каротин кетолазы) не лимитирована  $\beta$ -каротином.

Некоторые водоросли (*Haemotococcus pluvialis*) – эффективные продуценты астаксантина, биотехнологически важного как сильнейшего антиоксиданта и тушителя синглетного кислорода, в условиях стрессовых условиях накапливают большое количество этого пигмента. Биосинтез астаксантина вовлекает кетолизацию и последующее гидроксилирование его предшественника  $\beta$ -каротина (Lemoine Y. *et al.*, 2010).

Каротиноидные гликозиды – общие для большинства цианобактерий. Каротиноидные фрагменты были определены как миксол, 4 кетомиксол, деоксимиксол, 2-гидроксимиксол, 4-гидроксимиксол и осцилол (Iwai M. *et al.*, 2008; Takaichi S. *et al.*, 2005, 2006). Ключевым шагом в синтезе миксоксантофиллов является гидроксилирование тетракарбонового  $\psi$  –конца ликопина или  $\gamma$ -каротина при помощи *CruF*. Добавление  $\beta$ -ионового кольца и десатурации при 3',4' и гидроксилирование при 2' положении образуют 3-гидроксимиксол путем действия представленного неизвестного фермента (*CruF*). CrtR гидроксилирует 3-дегидроксимиксол, гликозилированный *CruG*, с образованием миксоксантофилла (Graham J.E. *et al.*, 2009).

Недавно было показано, что цианобактерии способны синтезировать ароматические каротиноиды. Синехоксантин ( $\chi,\chi$ -каротен-18,18'-дионовая кислота) является очень полярным и, вероятно локализована в клеточной стенке и внутренней мембране и может выполнять функцию защиты от солнечной радиации и антиоксиданта. Биосинтез начинается с  $\beta$ -каротина. *CruE*,  $\beta$ -каротин десатураза/метилтрансфераза формирует концевые ароматические кольца с метиловыми группами в 1, 2, 3 и 1',2',3' положениях  $\beta$ -колец и затем окисляется в C18 и C18' положениях формируя карбоновые

кислоты. Эта стадия до конца еще не выяснена, но полагается, что начальное гидроксирование осуществляется при помощи  $\text{CuH}$ .

### 1.1.2.2 Содержание каротиноидов в различных фотосинтетических комплексах

Фотосинтез осуществляется благодаря деятельности четырех белковых суперкомплексов, встроенных в мембраны тилакоидов хлоропласта: две фотосистемы (ФС1 и ФС 2), комплекса цитохрома *b6f* и АТФ-синтазы. Поглощение света обеими фотосистемами заполняет электронный транспорта от  $\text{O}_2$  до  $\text{НАДФ}^+$  в два энергетических шага, в то время как цитохром *b6f* комплекс преобразует часть энергии ОВ-потенциала хранящейся на промежуточном пластохиноновом акцепторе электронов, в транстилакоидный  $\Delta\mu\text{H}$  градиент, в конечном счете эксплуатируемый АТФ-синтазой для производства АТФ (Nelson N., Shem B. The complex architecture of oxygenic photosynthesis // Nature. 2004. Vol.5. P.1-12). ФС1 и ФС 2 имеют сложный набор обогащенных ксантофиллами белков (антенн), окружающих ядро комплекса, которые увеличивают поглощение света (рис. 1.10).

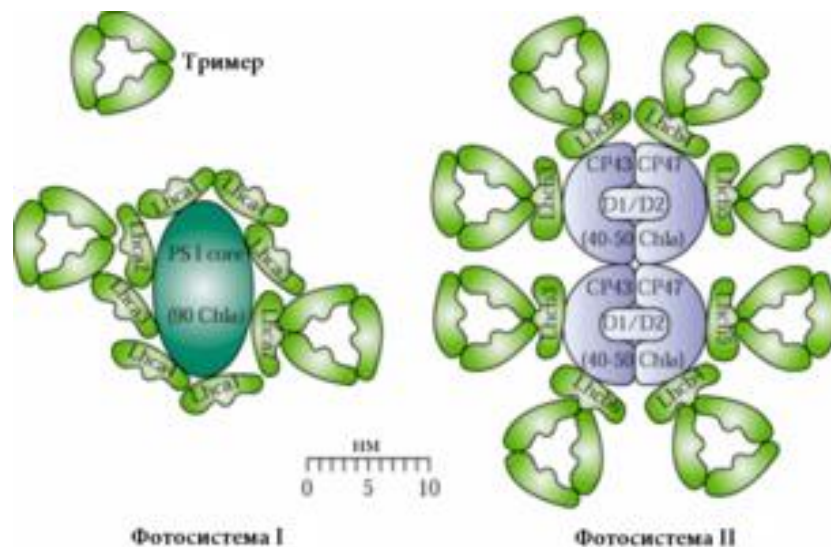


Рисунок 1.10 Система расположения субъединиц ССК ФС1 и ФС2

В ФС2 функция светосбора выполняется двумя классами белков: PsbV (CP47) и PsbC (CP43). Они пластид-закодированные компоненты ядра комплекса и связывают Хл *a* и  $\beta$ -каротин, в то время как периферийный слой пигмент-белковых субъединиц кодируется ядерными генами ССК белков, которые связывают Хл *a*, *b* и ксантофиллы. Компоненты ядра ФС2 включают также и D1 / D2 / цитохром *b559*, РЦ– место первичного разделения зарядов и ранние этапы электронного транспорта, а также ряд небольших трансмембранных белков (рис.1.11).

Внешняя система антенн представлена двумя копиями, состоящими из трех мономерных ССК, называемых Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) и Lhcb6 (CP24), и, более периферическими, представленными двумя - четырьмя экземплярами крупной антенны сложной ССК2, образованной в гетеротример, состоящий из Lhcb1/2/3 субъединиц. Тримерные комплексы ССК2 различаются на S (сильно связанные), M (средне связанные) или L (слабо связанные) типы в зависимости от их силы связывания к фотосистемами. В ФС1, РЦ комплекс и внутренняя антенна слиты в единый комплекс, где Хл *a* и  $\beta$ -каротин являются хромофорами, связанными с PsaA и PsaB главными субъединицами, вместе с большинством кофакторов цепи переноса электронов. Структура ядра ФС1 с его внешней антенной (ФС1-ССК1) в горохе посевном, согласно рентгеновской кристаллографии, представлена периферической антенной системой, состоящей из одного экземпляра каждого из полипептидов Lhca1-4 (Theg S.M. et al., 2014. P. 397-399).

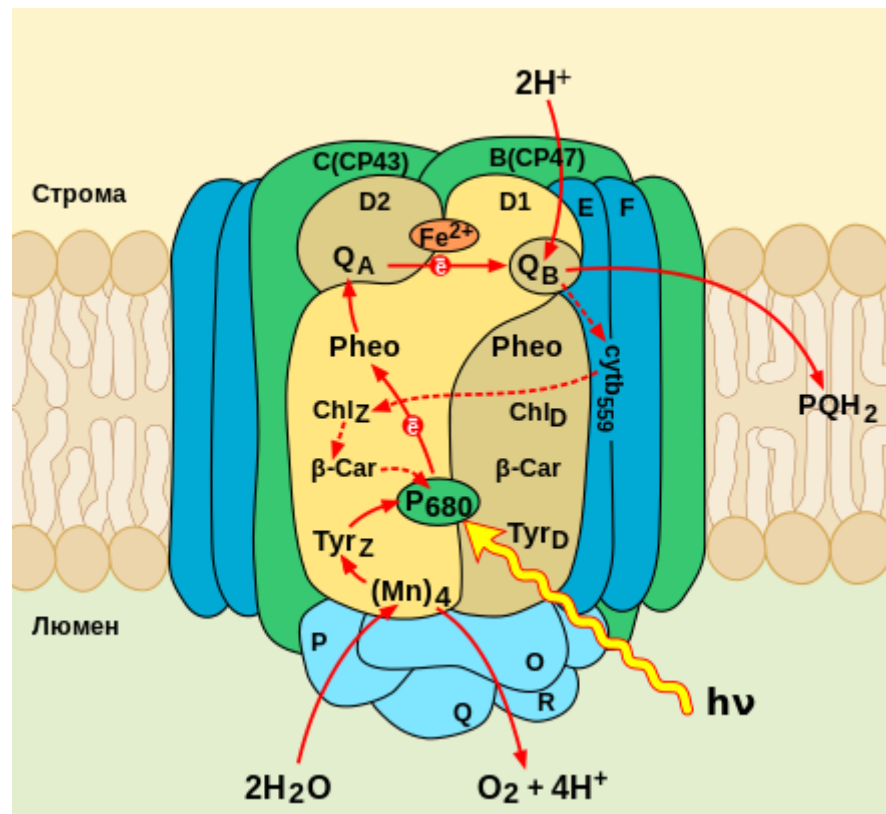


Рисунок 1.11 Схематическое расположение структурных единиц мономера ФС2 и пути транспорта электронов. Показаны белки D1 и D2, цитохром b559 (cyt b559), хлорофиллы PЦ (P680), вспомогательные хлорофиллы Z и D (Chl<sub>Z</sub> Chl<sub>D</sub>), две молекулы β-каротина (β-Car), первичный (Pheo) и вторичные (Q<sub>A</sub> Q<sub>B</sub>) акцепторы электронов, две внутренних, фокусирующих антенны CP43 и CP47 и марганцевый кластер ((Mn)<sub>4</sub>) с субъединицами.

Пул белок –связанных ксантофиллов тилакоидов обязательно входит в состав внешних антенных комплексов - ССК. В них ксантофиллы играют роль не только пигментов абсорбирующих свет, но и имеют жизненно важное значение для правильной сборки и стабилизации структуры ССК, а также принимают участие в защитной диссипации энергии (Pioiaia C. *et al.*, 2013). Главный ССК2 из шпината, сообщалось, связывает 13 хлорофиллов (Dainese P. *et al.*, 1991) и четыре молекулы ксантофиллов: два лютеина, один неоксантин и виолаксантин /зеаксантин на мономер. Вследствие конструкции молекулы, два лютеина полностью в транс-конфигурации связываются с

внутренними сайтами L1 и L2, а также стабилизируют весь комплекс. Кроме того, L1 сайт связывающий лютеин был обнаружен, как эффективный тушитель избыточной энергии.  $\beta$ -циклогексанные кольца обеих молекул лютеина расположены в направлении люмена, в то время как  $\epsilon$ -циклогексановые кольца расположены близко к поверхности стромальной стороне мембраны. Сайты связывания неоксантина и виолаксантина обозначены соответственно как N1 и V1. Циклогексановое кольцо неоксантина выступает из белка в липидный бислой; высокая селективность сайта связывания N1 для неоксантина объясняется его высокой специфичностью только для 9'-цис стереоизомера. Четвертый ксантофилл лиганд находится на границе мономер-мономер, в периферийном участке под названием V1. Его цепь полиена имеет all-транс-конфигурацию и образует малый угол по отношению к нормали мембраны. Состав V1 сайта отличается у разных видов; например в ССК2 из *Arabidopsis*, было установлено, что он связывает и лютеин в дополнение к виолаксантину или зеаксантину. V1 сайт был предложен Хортоном и сотрудниками, который, по их мнению, играет роль в аллостерического регулятора NPQ процесса. Кроме того, эта роль была приписана и сайту L2 Басси и сотрудниками (Morosinotto T. *et al.*, 2002). Процессы протонирования ССК2 и замена виолаксантина на зеаксантин работают совместно для индукции конформационного состояния тушения в комплексе, связанного с его агрегацией (Theg S.M. *et al.*, 2014. P. 399-400).

### **1.1.2.3 Изменения в составе и распределении ксантофиллов во время дезоксидации, индуцированной светом высокой интенсивности**

Каротиноидный состав тилакоидов не является постоянным: он претерпевает изменения во время быстрых колебаний интенсивности света, а также во время долгосрочной акклиматизации растений к стрессовым условиям. Ксантофилл зеаксантин трудно обнаружить в условиях низкой

освещенности или в темно-адаптированных листьях, в связи с тем, что он накапливается при высоком уровне освещенности (Jahns P. *et al.*, 2009 Lambrev C. *et al.*, 2012). Воздействие света на ФСА способствует закислению люмена, что в свою очередь способствует активации виолаксантин-деэпоксидазы (ВДЭ), что в конечном счете, приводит к ассоциации последнего с тилакоидной мембраной в виде димера (Schaller S. *et al.*, 2012), который может вместить виолаксантин и одновременно катализировать двустороннюю деэпоксидацию, с выделением зеаксантина (рис.1.12). Вновь образованный зеаксантин, предлагается, что связывается либо с V1 сайте ССК2 (Johnson M.P. *et al.*, 2007) или на сайт L2 мономерных Lhcb (Dall'Osto L. *et al.*, 2005). Масштабы и динамика связывания зеаксантина с белками ССК в естественных условиях сильно отличаются среди белков антенн, и отражают различные степени аффинности связывания.

Мономерные антенны CP26 и CP24 показывают высокое содержание зеаксантина. В случае CP29, при его изоляции от этого комплекса, у растений обработанных светом высокой интенсивности, наблюдаются значительно более низкие уровни связанного с этим белком зеаксантина. Зеаксантин также найден в ФС1-ССК1 комплексах при воздействии света высокой интенсивности (Theg S.M. *et al.*, 2014. P. 402)

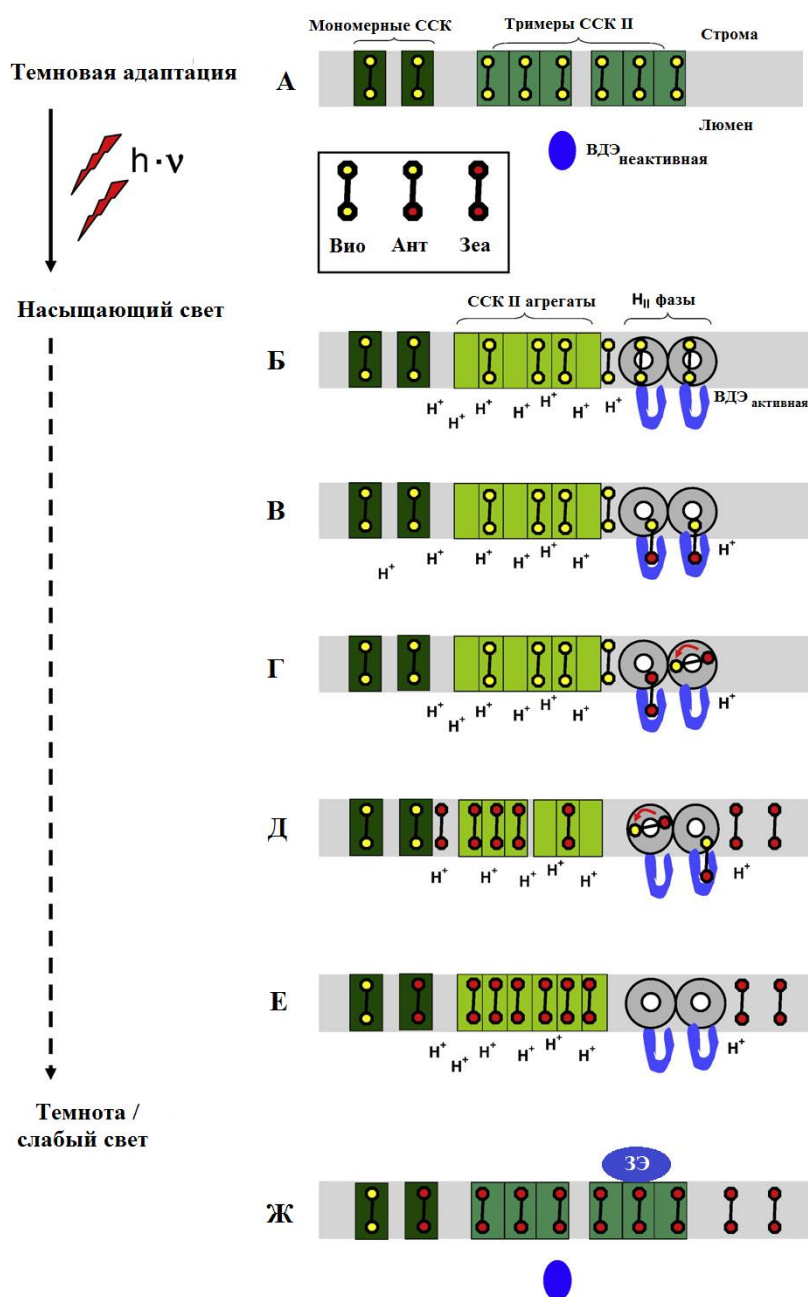


Рисунок 1.12 Модель виолоксантинового цикла.

В темно-адаптированном состоянии (А) только молекулы виолоксантина (Вио) связаны с антенными белками. Во время перехода от темноты к свету высокой интенсивности (Б), рН люмена закисляется ниже 6.0, что обуславливает образование ССК2 агрегатов и N<sub>II</sub> фазы и происходит связывание ВДЭ с мембраной. Одновременно с агрегацией ССК2 происходит перемещение некоторого количества виолоксантина в мембрану. Освещение приводит к образованию зеаксантина, который высвобождается из N<sub>II</sub> фазы либо связывается с пустыми ксантофилловыми сайтами или обменивается на

виолоксантин, связанного с более плотно ксантофилловыми сайтами связывания белков в мономерных антеннах. При адаптации к темноте, происходит повышение люминального рН, что ингибирует ВДЭ и активирует, расположенную в строме зеаксантиноксидазу (ЗЭ), которая катализирует конверсию зеаксантина → виолоксантин. (Jahns P. *et al.*, 2009).

#### 1.1.2.4 Влияние каротиноидов на физико-химические свойства мембран

Одним из мест расположения каротиноидов в клетке является гидрофобное ядро мембран. Такая локализация применима для ксантофиллов и каротинов (рис.1.13). Процесс минимизации энергии требует расположение полярных групп ксантофиллов на внешней стороне гидрофобного ядра мембраны в водной фазе или области полярных головных групп мембраны. Расположение полярных групп по отношению к мембранному бислою является важным фактором, определяющим организацию каротин-липидных мембран. (Navaux M., 1998; Jiirgens U. J. *et al.*, 1991).

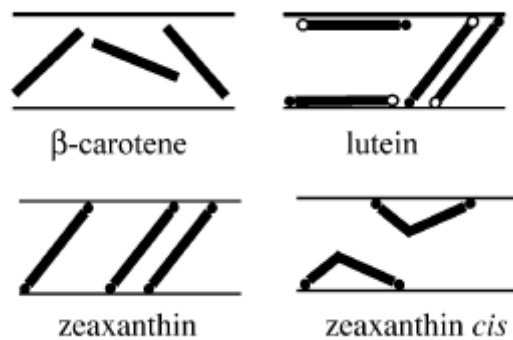


Рисунок 1.13 Возможные ориентации бета-каротина, лютеина и зеаксантина в мембране (Frank H.A., 2004. P. 363-367).

Трансмембранная ориентация ксантофиллов хорошо согласуется с толщиной гидрофобного слоя ядра биомембран (~3 нм в случае тилакоидов),



а расстояние между полярными группами (3 – 3,2 нм, в зависимости от точного расположения атомов кислорода в каротиноидах). Толщина гидрофобного слоя мембраны меньше, чем расстояние между полярными группами ксантофиллов, что способствует адаптации каротиноидов в мембране и их ориентация становится несколько наклоненной к нормали оси мембраны.

Однако, с другой стороны, ацильные остатки ЖК могут ориентировать каротиноиды параллельно оси нормали мембраны (особенно в геле состоянии липидной фазы), с другой стороны отсутствие полярных группировок ( $\beta$ -каротин), способных быть якорем в головной области липидов, не дает никаких условий для ориентации каротиноидов в липидном бислое. Таким образом, ориентация каротиноидов в липидном бислое и влияние их на физико-химические свойства мембраны зависят непосредственно от липидного состава мембраны (Frank H.A., 2004. P. 363-367) и, собственно, от химической природы каротиноида (Gruszecki W.I. *et al.*, 2005) расположенного в мембране (рис.1.14):

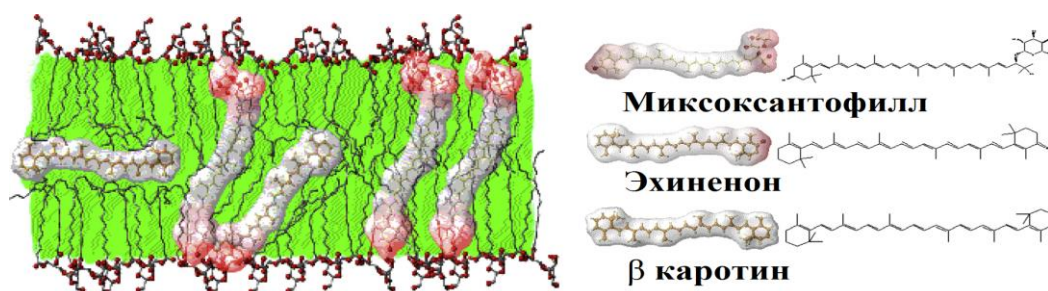


Рисунок 1.14 Расположение каротиноидов в фотосинтетических мембранах цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803*

Условно, каротиноиды делят на три группы по принципу модуляции свойств фотосинтетических мембран: первая группа это ксантофиллы, которые не оказывают значительного влияния на состояния мембраны;

вторая – это каротины, которые «разжижают» мембрану; и третья – это ксантофиллы повышающие жесткость липидного бислоя.

К первому типу можно отнести однополярные каротиноиды, такие как эхиненон. Внедряясь в гидрофобный слой мембраны, эти каротиноиды имеют возможность закрепиться своей полярной областью на одной из сторон мембран, при этом, никак не модулируя ее свойства (подобно еще одному липиду, встроившемуся в липидный бислой).

Ко второй группе можно отнести неполярные каротиноиды, такие как  $\beta$ -каротин, который не имеет в своем составе полярных областей. При внедрении этих типов каротиноидов в гидрофобный слой мембраны происходит разжижение мембраны. За счет своей молекулярной структуры он ( $\beta$ -каротин) может разупорядочивать остатки ацильных цепей ЖК, и как следствие разжижает мембрану. Опыты, проведенные на фосфотидилхолиновых липосомах, показали, что внедрение  $\beta$ -каротина в их состав способствовало увеличению текучести мембраны в гидрофобном ядре, а также способствовало увеличению вращательной свободы в области головных групп липидов в жидко-кристаллической фазе (Domonkos I. *et al.*, 2013).

Не смотря на то, что фотосинтетическая мембрана является достаточно текучей (вероятно из-за высокого соотношения белок/липид), в связи с выполняемыми ею функциями, также нуждается в повышении жесткости своей структуры, чтобы предотвратить её деградацию и переходу мембраны из нормального жидкокристаллического состояния в жидкое состояние. Наряду с изменением ненасыщенности ацильных цепей ЖК ферментативным путем, существует механизм внедрения в состав фотосинтетической мембраны каротиноидов, повышающих ее жесткость (например, зеаксантин миксоксантофилл). Это те ксантофиллы, имея в своем составе две полярных области, способны заякореваться на обеих гидрофильных сторонах мембраны, тем самым способствуя повышению ее жесткости, выступая неким «каркасом» мембраны. Особенно важным является повышение

жесткости мембраны в условиях повышенных температур, для смещения точки фазового перехода мембраны в сторону более высоких температур (Domonkos I. *et al.*, 2013).

Толщина мембраны с насыщенными и ненасыщенными липидами различается. Как может показаться, в гидрофобном ядре мембраны увеличивается толщина, когда расстояние между полярными группами мембран меньше и уменьшается толщина мембраны, когда расстояние между полярными группами липидов больше. Этот феномен отражает сильное взаимодействие жестких стержнеобразных молекул каротиноидов и гидрофобного ядра, сформированного ацильными цепями ЖК. Можно ожидать, что эти типы взаимодействия влияют на молекулярные и динамические свойства мембраны (Frank H.A., 2004. P. 363-367).

#### **1.1.2.5 Роль липид-липидных и липид-белковых взаимодействий в эффективной работе фотосинтетического аппарата**

Известно, что мембраны тилакоидов содержат в своем составе несколько классов гликолипидов: моноацилглицерол (50%), диацилглицерол (30%), сульфолипиды (7%), и фосфоглицерол (7%). Моногалактозилдиацилглицеролы (МГДГ) являются важными полярными видами липидов в природе. В тилакоидных мембранах они образуют гексогональную фазу, имеющих ключевое значение для липид-белковых взаимодействий (Schaller S. *et al.*, 2010). Высокое липид-белковое соотношение (~0,34) необходимо, вероятно, для того, чтобы увеличить количество кооперативных взаимодействий и подобные взаимодействия могут быть саморегулируемыми путем внедрения в мембрану небилатеральных липидов (высокое соотношение небилатеральных липидов в смеси тилакоидной мембраны предотвращает разжижение мембраны) (Garab G. *et al.*, 2000). МГДГ является примером небилатерального липида,

которой может формировать небилатериальные структуры такие как замкнутые гексагональные фазы (Pali T. *et al.*, 2003). Было предложено, что подобные липиды могут играть структурную и функциональную роль в тилакоидах – таких как мембранная текучесть (Latowski D. *et al.*, 2007). Мембранная текучесть может быть предсказана не только по количеству насыщенных жирных кислот липидов, температуре фазового перехода, но и также и по липидному составу (Harwood J.L., 1999. P. 287–302). Изменения в соотношении МГДГ/ДГДГ зависят от факторов среды и могут модифицировать температуру фазового перехода и более того способствовать внедрению внутрь мембраны больше липидов из-за уменьшения предрасположенности мембраны к небилатеральности (Garab G. *et al.*, 2000).

Высокое содержание белков в тилакоидной мембране обуславливает белок-белковые взаимодействия. Более того, белковые комплексы найдены в виде больших агрегатов, находящихся в пространстве между липидами, что согласуется с микродоменной организацией гранальной области тилакоидной мембраны. Обнаружено, что мембранные липиды и интегральные мембранные белки владеют различной вращательной и поступательной подвижностью, которая имеет ключевое значение для поддержания молекулярной упаковки (Pali T. *et al.*, 2003). Например, ЭПР-спектр различных спиновых меток в ФС-2 обогащенных участках тилакоидной мембраны показал, что большинство липидов менее мобильны, в то время как около 60% от общего количества тилакоидных липидов были найдены в аморфной фазе при комнатной температуре (Li G. *et al.*, 1989). Предложено, что концентрация этих менее мобильных липидов в определенной области, является важным структурным параметром тилакоидной мембраны (Pali T. *et al.*, 2003).

В мицеллах, образованными МГДГ, хорошо растворяются эпоксидированные ксантофиллы (виолоксантин, диадиноксантин) и происходит процесс их ферментативной дезоксидации. Фермент,

расположенный на люминальной стороне, в условиях закисления люмена и протонированием его остатков глутаминовой кислоты изменяет свою конформацию, что приводит к образованию сайтов связывания фермента с мембраной. Было установлено, что мицеллы МГДГ состоят из 28 молекул и что такая структура позволяет колебания эпоксицианидина делать более доступным для субстрат-связывающего сайта фермента и таким образом – формирование односторонне эпоксицианидина. Необходимый переворот (flip-flop) односторонне эпоксицианидина (который обязательно необходим, чтобы позволить ферментативное превращение второй эпокси-группы) может затем быть ускорено подвижностью односторонне эпоксицианидина внутри мицеллы МГДГ. Основываясь на физико-химических свойствах МГДГ было получено, что МГДГ не образует мицеллы в воде, а предпочтительнее выворачивает гексагональные структуры ( $H_{II}$ ) (Sen A. *et al.*, 1981).

Таким образом, динамическое равновесие качественного липидного, жирно-кислотного состава, образование не- и билатеральных липидных участков и больших и малых агрегатов белковых структур в мембране в результате приводит к эффективной работе фотосинтетического аппарата.

## **1.2 Светосбор и передача энергии возбуждения в фотосинтетических комплексах**

Хлорофилл и каротиноиды являются пигментами, которые поглощают и эффективно трансдуцируют энергию солнечного света в фотосинтетической мембране. Универсальное распределение этих молекул в фотосинтезирующих организмах, начиная от бактерий и заканчивая высшими растениями, играет важную роль в процессе фотосинтеза. В процессе светосбора требуется близость хромофоров, а также взаимная правильная ориентация в фотосистемах, где светосбор и фотохимические

реакции имеют место. Действительно, пигменты расположены очень упорядоченно в комплексах антенн и реакционного центра (Snyder A.M. *et al.*, 2004).

Первый процесс в фотосинтезе предполагает поглощение фотона пигментом в антенной системе, и в конечном итоге передаче возбуждения к реакционному центру (Sundstrom V., 2008)  $X_l b \rightarrow X_l a$  и  $KAP \rightarrow X_l a$  эффективность передачи энергии при данных процессах в изолированных пигмент-белковых комплексах может быть оценена с помощью деконволюции спектров поглощения и флуоресценции возбуждения антенных комплексов в их элементарных компонентах. Эффективность переноса энергии от каждого пула пигмента рассчитывают как отношение площадей спектра возбуждения флуоресценции к областям спектра поглощения отдельных компонентов, полученных в результате деконволюции.

Фотофизические реакции, происходящие в светособирающих пигментах должны протекать в очень быстрых интервалах времени (в пико- и даже в фемтосекундных временных масштабах). Это предполагает конкуренцию между транспортом энергии и другими механизмами де-возбуждения, таких, как внутреннее преобразование, межсистемные переходы и флуоресценция (Theg S.M. *et al.*, 2014. P. 403).

### **1.2.1 Транспорт энергии через разные энергетические состояния каротиноидов в фотосинтетических комплексах**

Все каротиноиды фотосинтетического аппарата, (в т.ч.  $\beta$ -каротин) связаны с ядерным комплексом в обеих фотосистемах, что было показано с помощью однофотонного запрещенного перехода  $S_0 \rightarrow S_1$ . Тем не менее, возбужденное состояние  $S_1$  может быть заселено за счет внутренней конверсии с помощью из состояния  $S_2$ . Переход из состояния  $S_0 \rightarrow S_2$  допустимо, и ответственно за видимое поглощение. Состояние  $S_2$  имеет

время жизни 120-150 фс (Polivka T. *et al.*, 2004). Транспорт энергии возбуждения от возбужденных синглетных состояний *KAP* к *Xл*, достаточно быстр (Bodea S. *et al.*, 2009), чтобы конкурировать с быстрой внутренней конверсией. На изолированных комплексах CP43, CP47 и FC2 реакционного центра комплексов высших растений (Berera R. *et al.*, 2009) было показано, что состояние S2  $\beta$ -каротина является основным донором в передаче энергии между *KAP* и *Xл*, в то время как S1 состояние не участвовало в этом процессе. Во всех комплексах, выход этой передачи не превышает 35%, в связи с конкурирующим внутренним преобразованием S2  $\rightarrow$  S1 (рис. 1.15).

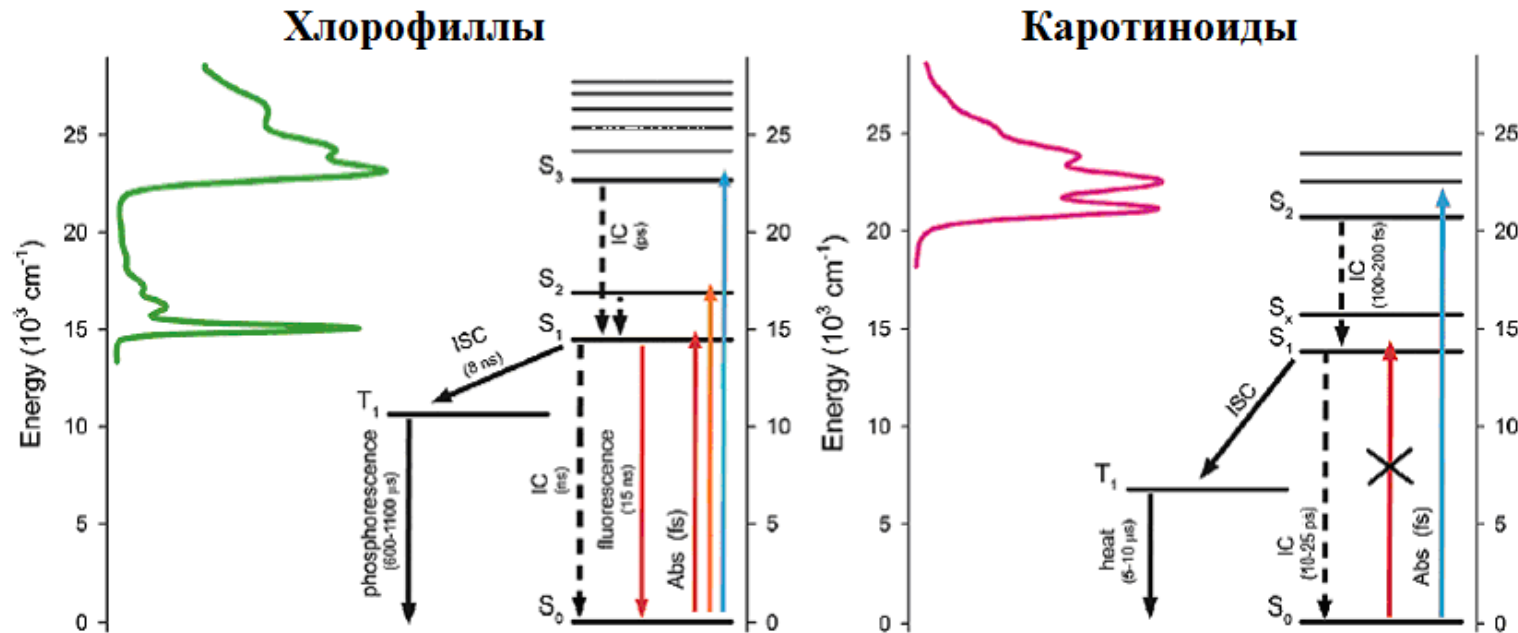


Рисунок 1.15 Диаграммы энергетических переходов в молекулах хлорофилла (слева) и каротиноида (справа). Процессы возбуждения и релаксации показаны стрелками и сообщают временные константы. Диапазон энергетических переходов в пигменте также связан с соответствующим спектром видимой абсорбции пигмента (зеленый – хлорофилл; пурпурный – каротиноид) ISC – межсистемные переходы, IC – внутренняя конверсия, Abs – поглощение (Theg S.M. *et al.*, 2014.)



Изучения сверхбыстрого переменного поглощения на CP29 и на ССК2, (Liu Z. *et al.*, 2004), дают информацию о транспорте энергии в этих комплексах, что передача энергии возбуждения от поперечно-разветвленных, центральных ксантофиллов к хлорофиллам происходит с высокой эффективностью (например, > 80% для обеих молекул лютеина в ССК2) из S2 возбужденном состоянии в течение 100 фс. Тем не менее, Кроче и сотрудники (Croce R. *et al.*, 2003) сообщили, что эффективность передачи энергии возбужденного из состояния S2 упала до 50% в случае, когда виолаксантин, связан с сайтом L2 в CP29. В ССК2, вклад состояния S1 в передачи энергии от каротиноидов к Хл составляет от 10 до 20% от общей энергии, поглощаемой хромофором. Нет передачи энергии из состояния S1 каротиноидов к хлорофиллам в обоих CP26 и CP24 комплексах, предполагая, что это состояние является энергетически ниже хлорофилльного Q<sub>y</sub> уровня энергии (Marin A. *et al.*, 2011), в соответствии с измерениями на ССК2 (Holt N.E. *et al.*, 2004).

Было показано, что ксантофилл связанный с сайтом V1 неэффективно транспортирует энергию на Хл, таким образом, он не может функционировать в светосборе. Что касается β-каротина, связанного с ядерным комплексом ФС1, эффективность переноса энергии возбуждения к Хл высока и достигает ~ 80%. Передача энергии от β-каротина к Хл была найдена из обоих возбужденных состояний S2 и S1 (Kennis J.T.M. *et al.*, 2001), но большинство передачи энергии возбуждения происходило через состояние S2. Периферическая ССК1 антенна несет хлорофиллы и каротиноиды и, следовательно, обеспечивает увеличение сечения РЦ ФС1. Передача энергии возбуждения от каротиноидов к Хл а включает, главным образом, канал S2 → Q<sub>y</sub> и завершается в пределах ~ 100 фс, это было измерено на нативных димерных ССК1 (Kennis J.T.M. *et al.*, 2001)

Структура *b6f* комплекса цитохрома связывает одну молекулу хлорофилла и один каротиноид (9-цис β-каротин). Роль этого каротиноида еще плохо понята: первоначально было предложено, что он необходим для

предотвращения образования  $^1\text{O}_2$  фотовозбужденными молекулами *Xl a*. Однако, ни триплетная передача энергии от хлорофилла к каротиноидам, ни синглетного переноса энергии от каротиноидов к *Xl* не имели место (Cramer W.A. *et al.*, 2006). Эти наблюдения согласуются со структурными данными, которые показывают, что расстояние между двумя пигментами составляет 14 Å, таким образом, они находятся слишком далеко для синглет/триплетного переноса энергии.

### **1.2.2 Тушение триплетных состояний хлорофилла и дезактивация АФК каротиноидами**

Каротиноиды играют важную роль в акклиматизации фотосинтетических организмов: соотношение кар/хл увеличивается в листьях, находящихся на солнечной стороне по сравнению с теневыми (Ma X. *et al.*, 2015). Фотоадаптация *Arabidopsis* при низкой температуре вызывает накопление антиоксидантов, в том числе каротиноидов (Navaux M. *et al.*, 2001). Общее содержание ксантофиллов увеличивается под сильным светом (Grudzinski W.\* *et al.*, 2016) и соотношение между лютеином и компонентами ксантофиллового цикла, зеаксантина антероксантина и виолаксантина уменьшается (Dall'Osto A.A. *et al.*, 2007). Анализ транскрипции из *Arabidopsis* мутанта, который способен накапливать  $^1\text{O}_2$  в более высокой степени, чем дикий тип (Dall'Osto A.A. *et al.*, 2011) показал, что усиливается экспрессия генов, ответственных за синтез каротиноидов, у этого мутанта. Это акклиматизационная картина наводит на мысль о том, что каротиноиды могут иметь решающее значение в развитии фотозащитной функции в растениях в условиях, которые приводят к образованию  $^1\text{O}_2$ .

Каротиноиды вносят вклад в антиоксидантную систему хлоропластов, направленных на детоксикацию АФК генерируемого в процессе фотосинтеза. Пул каротиноидов тилакоидной мембраны увеличивает резистентность к

свету высокой интенсивности (Pinnola A. *et al.*, 2013). Каротиноиды действуют нейтрализующее как на  $O^{2-}$  и  $OH \bullet$  так и на  $^1O_2$  путем их тушения в тилакоидных мембранах, тем самым предотвращая перекисное окисление липидов (Zhou J. *et al.*, 2015).

Недавно была исследована антиоксидантная активность каротиноидов несвязанных с фотосинтезирующих комплексами в естественных условиях (Xu P. *et al.*, 2009; Navaux M. *et al.*, 2007). Они обнаружили, что каротиноиды обеспечивают защиту тилакоидной мембраны от перекисного окисления. В частности, антиоксидантная активность зеаксантина была заметно выше по отношению ко всем другим каротиноидам в листьях *Arabidopsis*.

Как описано ранее, ФС2 и ССК могут становиться интенсивными источниками АФК вследствие перевозбуждения. Каротиноиды, содержащиеся в мембранах тилакоидов играют свою фотозащитную роль в двух различных формах, что определяет спектр их действия. Было предложено, что наблюдаемая свободная фракция каротиноидов (~ 15% от общего пула каротиноидов) выполняет антиоксидантную функцию, направленную на угнетение АФК высвобожденных из ССК и РЦ комплексов. Большинство каротиноидов, однако, связаны с процессами фотосинтеза, где они находятся в тесном контакте с молекулами хлорофилла – основных фотосинтезирующих пигментов в системах растений. Ван-де-Ваальсовый контакт с хлорофиллами позволяет тушить потенциально опасный триплетный хлорофилл –  $^3Хл^*$ . Действительно, концентрация каротиноидов в триплетном возбужденном состоянии возрастает пропорционально интенсивности света на всех уровнях организации от листа до ССК комплексов (Mozzo M. *et al.*, 2008) за счет триплет-триплетной передачи энергии от  $^3Хл^*$ . Эффективность тушения каротиноидами  $^3Хл^*$ , связанного с ССК, может достигать до 100% (Fassioli F. *et al.*, 2014; Peterman E.J. *et al.*, 1995).

В ССК, триплеты, как ожидается, появляются только на  $Хл a$ , что обусловлено очень быстрым переходом энергии от  $Хл b$  к  $Хл a$ . Триплетная

передача энергии между хлорофиллами и каротиноидами требует контактное расстояние для Ван-дер-Ваальсового взаимодействия между этими молекулами ( $<3.6 \text{ \AA}$ ). Структура ССК2 (Liu Z. *et al.*, 2004) показывает, что по крайней мере одна молекула *Хл а* находится в непосредственной близости от каждого лиганда ксантофилла. В ядре ФС2 большинство молекул  $\beta$ -каротина находятся в тесном контакте с головными группами *Хл*, как это требуется для облегчения передачи энергии на *Хл* и тушения  $^3\text{Хл}^*$ . Тем не менее, два лиганда  $\beta$ -каротина в РЦ ФС2, локализованы на D1/CP43 и их димерная поверхность находится далеко от специальной пары хлорофиллов. В самом деле, их относительное расстояние друг от друга больше, чем  $3,6 \text{ \AA}$ , подразумевая, они не могут тушить состояние  $^3\text{P680}^*$  путем триплет-триплетного транспорта энергии. Топология молекул  $\beta$ -каротина в РЦ ФС2 отражает их функционирование в строго кислой среде. В самом деле, прямое тушение  $^3\text{P680}^*$ , кажется, невозможно, потому что каротиноиды будут окисляться из-за сильного окислительного потенциала, формируемого в процессе разделения заряда. Молекулы  $\beta$ -каротина РЦ ФС2, скорее всего являются гасителями  $^1\text{O}_2$  появившегося в результате разделения зарядов и на самом деле эффективны в снижении обесцвечивания хлорофилла в изолированных ФС2 (Telfer A., 2005).

### **1.2.3 Регуляция сбора световой энергии и участие каротиноидов в тушении синглетного состояния хлорофилла**

Как было показано выше, реакция  $^1\text{Хл}^* \rightarrow ^3\text{Хл}^* (\rightarrow ^1\text{O}_2)$  является конститутивной и неизбежным процессом, протекающим в пигмент-белковых комплексах при освещении. В то время как утилизация АФК каротиноидами и другими антиоксидантами обеспечивает профилактику фотостарения в низких или умеренных световых условиях; избыток света в течение длительного времени приводит к истощению АФК поглощающих

соединений. Таким образом, способность контролировать образование АФК, в частности  $^1\text{O}_2$  имеет ключевое значение для поддержания функциональной целостности фотосинтетического аппарата.

Фотосинтетические процессы, которые снижают общий выход флуоресценции хлорофилла ( $\Phi_{\text{ФСII}} \text{ Хл}$ ) включают фотохимическое тушение ( $qP$ ), которое обусловлено обратной регуляцией с разделением зарядов в РЦ ФС2 и нефотохимическим тушением (NPQ), а именно тушением флуоресценции, которое не зависит от разделения зарядов (Horton P. *et al.*, 1996). NPQ это регуляторный механизм предотвращения образования избыточного  $^1\text{Хл}^*$  в виде рассеивания тепла, в ФС2 достигает 90% от поглощенной световой энергии. NPQ активность может быть легко обнаружена по уменьшению квантового выхода ФС2 ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) в связи с обратной регуляцией среднего времени жизни возбужденного состояния хлорофилла. Таким образом, снижение выхода флуоресценции указывает на то, что канал диссипации для  $^1\text{Хл}^*$  был активирован, который в свою очередь может безопасно рассеивать избыток поглощенной энергии. С другой стороны, снижение концентрации  $^1\text{Хл}^*$ , и, таким образом, сведение к минимуму образование  $^1\text{O}_2$  в ССК и РЦ ФС2, NPQ предотвращает сверхацидификацию люмена хлоропласта и формирование  $^3\text{P680}^*$  (Zaks J. *et al.*, 2013).

Известно, что NPQ зависит от величины амплитуды колебания транс-тилакоидного  $\Delta p\text{H}$  и этот процесс выступает как регулирующий механизм, передачи энергии возбуждения в РЦ ФС2. Концентрация протонов в люмене тилакоида определяется скоростью фотосинтетического переноса электронов, в то время как нейтрализация градиента  $\Delta p\text{H}$  в основном определяется активностью АТФ синтазного комплекса. В условиях высокой световой интенсивности, ограничивающим фактором для АТФ-синтазы является дефицит субстратов  $\text{P}_i$  (неорганический фосфор) и АДФ, которые используются в АТФ-зависимых реакциях хлоропластов, таких как цикл Кальвина-Бенсона для ассимиляции  $\text{CO}_2$ , фотодыхания, ассимиляции азота.

Подобный регуляторный механизм гарантирует, что тушение применимо только к фракции возбужденных состояний хлорофилла, превышающих потенциал для использования энергии для метаболизма клеток или экспорта продуктов фотосинтеза к нижестоящим органам растения. Способность к модуляции эффективности утилизации света имеет особое значение в условиях колебания его интенсивности. Было показано, что NPQ имеет решающее значение для адаптации растений в естественной среде обитания (Kulheim C. *et al.*, 2002).

Термин NPQ представляет собой набор индуцибельных механизмов тушения флуоресценции с различными свойствами и, вероятно, на основе различных, хотя и связанных, молекулярных процессов. Преобладающим компонентом является qE (quenching Energy). qE зависит от энергизации хлоропласта, а именно свето-зависимого подкисления люмена (Pioaia C. *et al.*, 2011\*). Этот процесс быстро активируется при переходе от темновых к световым условиям и быстрым возвращением из световых условий к темновым. Инкубация с ионофором нигерицином приводит к разрушению ΔpH и предотвращает активацию qE. При быстрых колебаниях интенсивности света, qE является основным фактором для быстрой модуляции процессов фотосинтеза в разрешении от нескольких секунд до нескольких минут (Zaks J. *et al.*, 2013). Медленным компонентом NPQ является qI. Это определение основывается на том, что время qI релаксации зависит от скорости ресинтеза D1 белка с временем восстановления от нескольких часов. Анализ динамики релаксации NPQ выделил третий компонент тушения с промежуточной жизни, названный qT (Niyogi K.K. *et al.*, 1998). Было показано, что релаксирование в течение нескольких минут первоначально отнесено к тушению фосфорилированных популяций ССК2 после их миграции из гранальной в стромальную часть мембран при наступлении состояния 2 (Horton P. *et al.*, 1996). Другие недавние результаты предполагают участие зеаксантина в модуляции как qI и qT (Nilkens M. *et al.*, 2010).

Большое количество доказательств подтверждает мнение, что ксантофиллы присутствуют в семействе белков Lhcb и играют ключевую роль в модуляции процессов, приводящих к тушению  $^1\text{Хл}^*$  в растениях и зеленых водорослей. Следовательно, Ch1 мутант *Arabidopsis*, который обеднен ксантофилл связанными комплексами, имеет очень низкий показатель NPQ (Navaux M. *et al.*, 2007), в то время как мутанты в пути биосинтеза ксантофиллов показывают сильные изменения, как максимальной амплитуды, так и кинетики тушения (Dall'Osto L. *et al.*, 2007).

## Глава 2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объект

В качестве объектов исследования в работе использовали цианобактерии водоросли и высшие растения

В работе использовали клетки дикого типа *Synechocystis sp. PCC 6803*, которые выращивались в модифицированной среде BG-11 (Rippka R. *et al.*, 1979) при 33 °С и мутант лишенный каротин белка (*ΔOCP*) выращивали в аналогичных условиях, под люминесцентными лампами белого света при постоянной освещенности 40 мкЭ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. Мутант *ΔPSII*, полученный при инактивации *psbB* гена (кодирующего субъединицу CP47 ФС2) и *psbD1C* оперона (кодирующего D1 CP43 субъединицы), (Rakhimberdieva M.G. *et al.*, 2010) был выращен в среде BG-11 в присутствии 10 мМоль глюкозы, 25 мг/мл стрептомицина, 25 мг/мл эритромицина при освещенности 5 мкЭ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. Мутант *ΔPSI/ΔPSII* (*DpsaAB/DpsbD1C/DpsbDII*), лишенный ФС1 и ФС2 выращивали в среде BG-11, содержащей глюкозу (10 мМ), стрептомицин (25 мкг/мл), эритромицин (20 мкг/мл) и хлорамфеникол (20 мкг/мл) при освещенности 5 мкЭ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. (Maksimov E.G. *et al.*, 2011).

Культуру водоросли *Cladophora rivularis* выращивали в отстоявшейся воде в течение 7 суток при 25°С, освещенности 40 мкЭ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. pH доводили с помощью растворов 1М NaOH и 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до кислотности: 5, 7, 8, 9. Рассеивали по 10 проб с каждым значением pH. Водоросль выращивали в химических стаканах в среде Чу-10 (состав среды (г/л): Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-0,04; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O-0,025; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,01; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 0,02; Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>\*9H<sub>2</sub>O – 0,025; FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O – 0,0008). После окончания инкубации проводилась регистрация спектров РКР и ИК и высчитывались концентрации пигментов в ацетоновых экстрактах водоросли.

20–дневные проростки пшеницы двух сортов: Эскада 70 и Прохоровка. Семена в количестве 10 штук высаживались на глубину 3 см. Растения



выращивали в при 20°C, относительной влажности 60% с 16–ти часовым световым периодом, полив растений производился один раз в день (по 50–70 мл). Образцы растений выращивали до фазы третьего настоящего листа (20–й день). После того как растения достигали фазы третьего настоящего листа начинали проводить эксперимент.

Гибриды (ZP505, ZP341, ZP341) и инбредные линии кукурузы (M1-3-3Sdms, ZPPL225, ZPPL186), предоставлены Институтом Кукурузы («Земун поле», г. Белград, Сербия). Семена проращивали и высаживали в количестве 10 штук и выращивались до фазы 3-го настоящего листа (14-й день), в условиях 16 часового светового периода при относительной влажности 75%.

Инбредные линии ZPPL16, ZPPL218 и ZPPL62 кукурузы были выращены в полевых условиях.

## 2.1 Методы

### 2.2.1 Абсорбционная спектроскопия

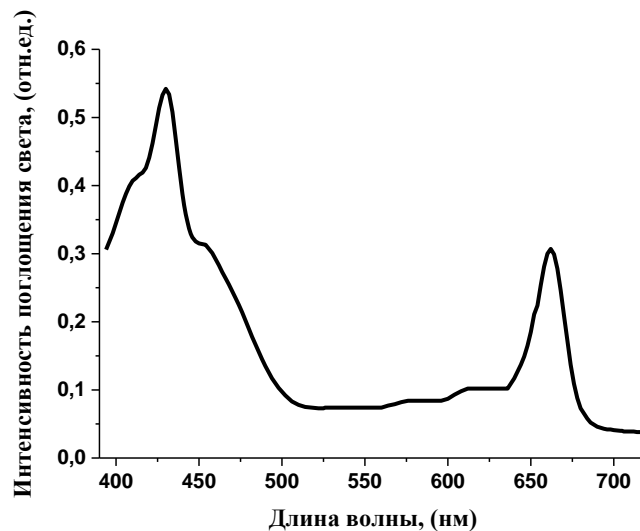
Поглощение света обусловлено электронным строением молекул и атомов и длиной волны падающего на них света, температуры, концентрации вещества, толщины слоя, наличия электрических и магнитных полей (Левшин Л.В. *и др.*, 1989). Метод абсорбционной спектроскопии основан на законе Ламберта – Бугера – Бера:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon cd} \quad (2.1)$$

где  $I_0$  и  $I$  - интенсивности падающего и прошедшего через вещество света,  $d$  - толщина слоя,  $c$  - концентрация вещества. Если величина  $c$  выражена в моль/л, то её называют молярным коэффициентом поглощения.

Структура спектра поглощения обусловлена природой образующих атомов и молекул и агрегатным состоянием вещества.

Благодаря анализу спектров поглощения можно получить информацию о качественном и количественном составе веществ (рис. 2.1). Метод широко применяется для изучения строения веществ. Абсорбционная спектроскопия имеет большую эффективность при исследовании процессов в жидких средах; по изменениям состояния полос поглощения (интенсивность, форма, амплитуда) судят об изменениях состава и строения, поглощающих свет частиц без их выделения из растворов (Левшин Л.В. и др., 1989).



## 2.1 Спектр поглощения ацетоновой вытяжки пигментов из листьев кукурузы линии М-1-3-Sdms

Для регистрации поглощательной способности веществ используют спектрофотометры — оптические приборы, которые представлены источником света, камерами для образцов, монохроматора (призма или дифракционная решетка) и детектора. Сигнал от детектора регистрируется в виде непрерывной кривой (спектра поглощения).

В настоящей работе спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра спектрофотометре UV-mini 1240 (с однолучевой оптической схемой) фирмы Shimadzu (Япония). Спектральная ширина щели 5 нм, точность установки длины волны составляла  $\pm 0,1$  нм; фотометрическая точность прибора  $\pm 0,003-0,005$  Abs (при 0,5-1,0 Abs).

Концентрацию фотосинтетических пигментов рассчитывали по соответствующим максимумам поглощения хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в ацетоне (Шлык А.А., 1968; Журавская А.Н. и др., 2011) с пересчетом на мг/г сырой ткани (Корнилина В.В., 2012).

### 2.2.2 Спектроскопия комбинационного рассеяния света

Комбинационное рассеяние света это явление, которое возникает вследствие того, что движение электронов в молекуле связано с колебаниями ядер. Взаимное расположение ядер определяет поле, в котором находится электронное облако. Способность электронного облака деформироваться под действием электрического поля электромагнитной волны зависит от конфигурации ядер в данный момент и в случае внутримолекулярных колебаний изменяется с их частотой. И, наоборот, при деформации электронного облака могут возникнуть колебания ядерного остова молекулы.

Молекула переходит из одного энергетического состояния  $E$  (описываемого квантовыми числами  $n, v, j$  – электронным, колебательным и вращательным соответственно) в другое  $E'$ . В стандартной постановке эксперимента по наблюдению КР исследуемое вещество облучается частотой, на которой данное вещество не поглощает, т. е. квант света недостаточно велик, чтобы перевести молекулу в возбужденное электронное состояние. Однако взаимодействие кванта приводит к возмущению электронной оболочки молекулы, которая перестраивается, приводя к изменению колебательного состояния ядерного скелета. При этом молекула переходит в новое колебательное состояние  $v'$ , расположенное выше (например, из  $v = 0$  в  $v' = 1$ ) или ниже исходного  $v$  (например, из  $v = 1$  в  $v' = 0$ ). Схематическое изображение переходов при комбинационном рассеянии света приведено на рисунке 2.2.

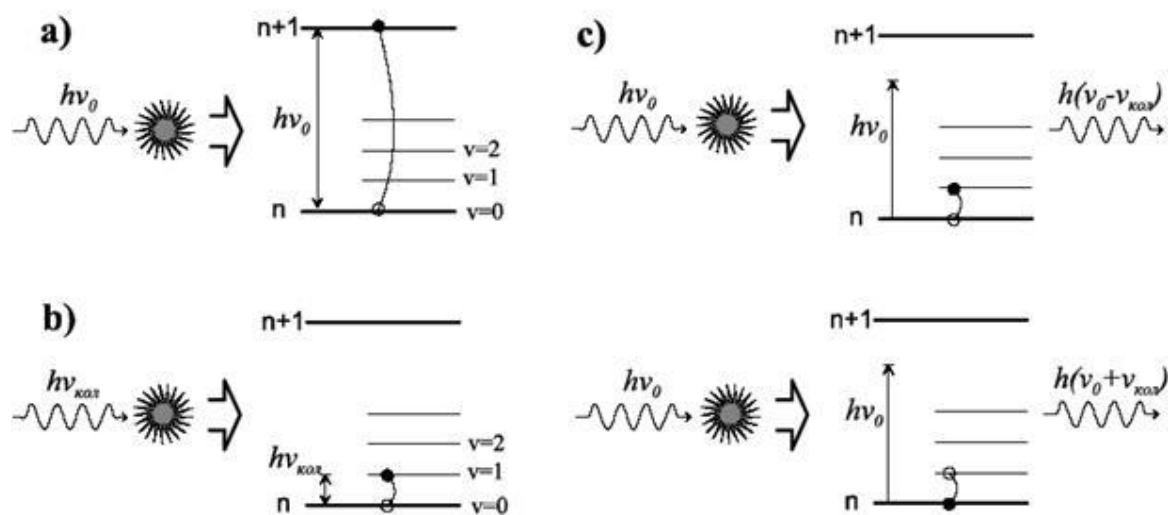


Рисунок 2.2 . Схема процессов при взаимодействии излучения с веществом: а – поглощение в оптической области; б – поглощение в ИК-области; с – комбинационное рассеяние света, вверху – стоксово, внизу – антистоксово

Структура спектров комбинационного рассеяния света (число, расположение и интенсивность в спектре линий, называемых комбинационными линиями, рамановскими линиями, сателлитами или спутниками) определяется молекулярным строением вещества. Собственные колебания вещества приводят к появлению в спектре рассеянного света дополнительных частот разной интенсивности, связанных с этими колебаниями, и, следовательно, со структурой вещества. Эти спутники различаются измененными частотами колебаний молекулярной структуры вещества: в связи с тем, что, согласно распределению Больцмана большая часть электронов находится на нулевых и первых энергетических и далее, с повышением энергетического уровня вероятность их нахождения на них уменьшается экспоненциально. В спектре КР наиболее интенсивны полосы спутников с уменьшенными частотами, относительно частоты возбуждающего света. Это объясняется тем, что при действии возбуждающего излучения, большинство электронов, находясь на нулевых энергетических уровнях, получив часть энергии, поднимаются на

виртуальный уровень с более высокой энергией, и затем релаксируют на подуровень, находящийся несколько выше основного колебательного уровня (Стоксово рассеяние). Соответственно, при релаксации излучается квант с длиной волны большей, чем у возбуждающего света. В случае Антистоксова рассеяния, электрон, находясь не на основном энергетическом уровне (подуровне) при релаксации с виртуального энергетического уровня (достигнутого в ходе поглощения энергии возбуждения), может попасть на основной энергетический уровень. При этом, увеличивается частота рассеянного излучения, относительно частоты возбуждающей спектральной линии, и соответственно уменьшается длина волны также относительно длины волны возбуждающего света. Однако, следует отметить, что Стоксово и Антистоксово составляют лишь 0,0001 % от общего рассеяния. Около 99,9999% составляет Рэлеевское (упругое) рассеяние, то есть электрон, перейдя из основного на более высокий виртуальный энергетический уровень, релаксирует до начального состояния, без изменения частоты (Накамото К., 1991.).

В работе были задействованы два типа спектрометров:

Первая установка представляла собой источник света лазера с длиной волны 473 нм, систему линз, которые переводили источник излучения на объект. Мощность излучения поддерживалась на уровне 20 мВт. Интенсивность излучения составляла порядка 1-2 кДж/м<sup>2</sup>. Рассеянное излучение собирали системой линз на входную щель монохроматора ДФС-24. Спектральная область прибора 400-850 нм, относительное отверстие 1:5,3, обратная дисперсия 0,45 нм/мм, полуширина аппаратной функции не более 1 см<sup>-1</sup> при длине волны 550 нм, точность измерения около 4 см<sup>-1</sup>. Регистрация комбинационного рассеяния осуществлялась с помощью системы регистрации МОРС 1/3648 (Троицк, Россия), сделанной на базе линейной ПЗС TCD1304DG (Toshiba, Япония). Кювету с образцом устанавливали на специальной подставке, таким образом, чтобы источник света падал на образец под углом 60 градусов. Отраженный свет лазера

отсекали при помощи фильтра LPO2-473RS-50 (Shemrock, Россия), установленного перед системой регистрации. Время накопления составляло 60 секунд. При записи спектров на ПК использовалось программное обеспечение МОРС (Троицк, Россия). Установка для проведения исследований разработана на кафедре биофизики биологического факультета МГУ им.М.В. Ломоносова;

Вторая установка представлена рамановским дисперсионным спектрометром inVia Microscope (Renishaw, UK). Прибор представлен на базе конфокального микроскопа исследовательского класса Leica DM 2500M, оборудованного встроенной видеокамерой и ручным координатным столиком с минимальным шагом движения по осям X и Y – 100 нм (рис. 2.3). Лазер 532 нм (максимальная мощность 100мВт); система регистрации сигнала КР и флуоресценции представляет собой CCD- детектор с Пельтье охлаждением до  $-70^{\circ}\text{C}$ , дифракционные решетки 1200 и 1800 штрихов /мм со спектральной шириной  $2607\text{ см}^{-1}$  и  $1780\text{ см}^{-1}$  соответственно и разрешающей способностью  $2,2 - 3,0\text{ см}^{-1}$  и  $1,6 - 1,9\text{ см}^{-1}$  соответственно. Ширина входной щели составляла 65 микрон.



Рисунок 2.3 Спектрометр inVia Microscope (Renishaw, UK).

Обработка спектров КР проводилась с помощью пакета программ Wire 3.3 (UK), Origin 8.0 (USA) и MS Excel 2003.

### 2.2.3 Метод регистрации стационарной флуоресценции от клеток и тканей (оптический имидж)

Метод предназначен для неинвазивной прижизненной (*in vivo*) визуализации живых объектов малых размеров с целью изучения их клеточной и тканевой фотосинтетической активности в режиме реального времени .

Система визуализации IVIS Lumina II (рис. 2.4) позволяет получить изображения, даже при очень низком уровне освещенности, которые затем могут быть сохранены и отображены для последующего анализа. В дополнение к биолюминесцентному изображению, IVIS Lumina также включает оборудование для флуоресценции XFO-12, которое позволяет визуализировать флуоресцентные возможности для *in vitro* и *in vivo* приложений. Диапазон чувствительности ПЗС-камеры позволяет использовать для флуоресценции длины волн от 400 до 950 нм.



Рисунок 2.4 – Аппаратное устройство системы визуализации IVIS® Lumina II: 1 – камера визуализации, 2 – системный блок, 3 – монитор

Интегрированная система визуализации IVIS Lumina включает:

- ПЗС–камера научного класса, охлаждаемая термоэлектрически, устанавливается на светонепроницаемую камеру визуализации;
- Источник питания камеры;
- Компьютерная система на основе Windows® для сбора и анализа данных;
- Оборудование для флуоресценции XFO–12 (рис. 2.5).

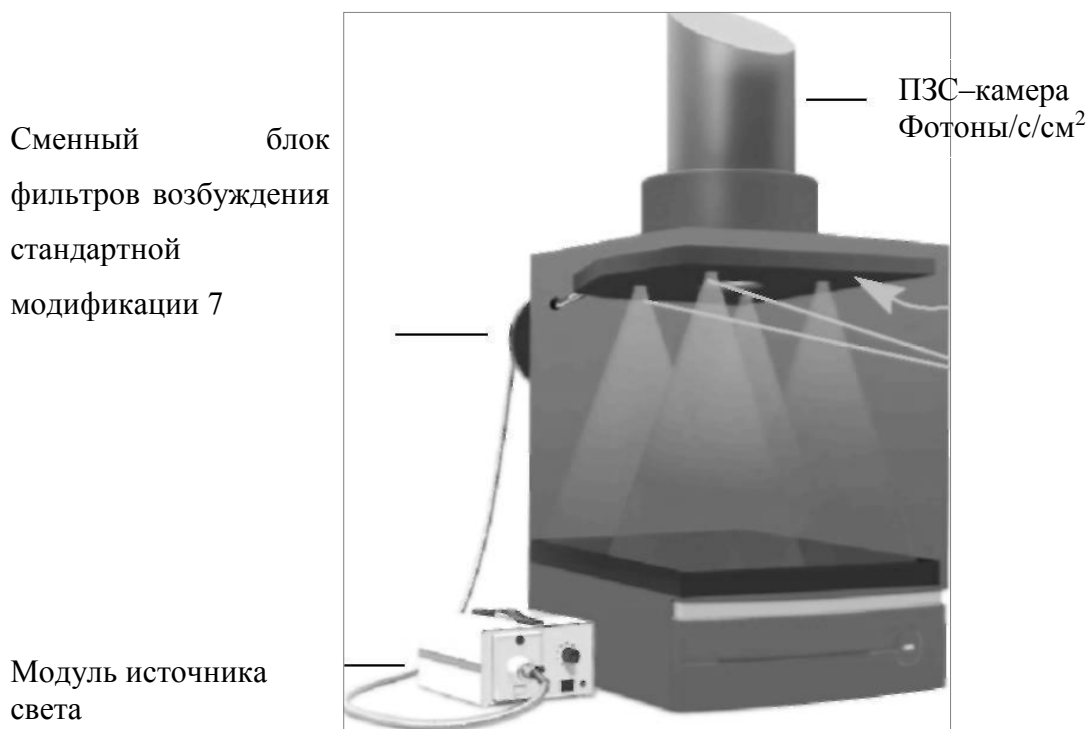


Рисунок 2.5 – Оборудование для флуоресценции XFO–12

Флуоресцентное изображение образцов с эпископическим разрешением (эпископическое освещение производилось при помощи источника освещения возбуждения, расположенного над платформой) получали при помощи оборудования для флуоресценции XFO–12 (рис. 2.5) в программе Living Image. Для возбуждения флуоресценции хлорофилла использовали свет с длиной волны 640 нм, а для регистрации флуоресценции хлорофилла –



фильтром эмиссии  $\text{Cu5.5}$  (695-770 нм). Накопление сигнала проводилось в течение 60 секунд.

### 2.2.4 Метод регистрации мгновенных спектров флуоресценции

Ключевым параметром флуоресценции является её длительность у разных излучающих систем. Она обычно представляет собой некий средний промежуток времени, в интервале которого молекулы остаются в возбужденном состоянии. Число молекул в возбужденном состоянии убывает со временем по экспоненциальному закону и становится равным нулю только спустя продолжительное время.

Одним из методов такой регистрации является представление спектров флуоресценции с временным разрешением. Такие спектры получили название мгновенных спектров флуоресценции. Метод получения мгновенных спектров флуоресценции заключается в следующем: производится регистрация кривых затухания флуоресценции при определенных длинах волн, выбираемых на разных участках спектра, который разбивается на равные промежутки длин волн (рис. 2.6).

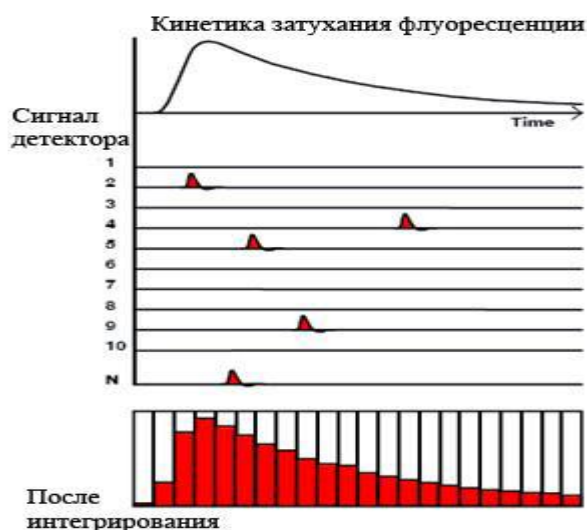


Рисунок 2.6 Последовательность этапов регистрации и математической обработки кинетик затухания флуоресценции с помощью метода счета фотонов.

Мгновенные спектры флуоресценции с пикосекундным временным разрешением получали с помощью измерительного комплекса на основе системы однофотонного счета Simple Tau 140 (Becker & Hickl, Германия). Для возбуждения флуоресценции использовали светодиодный лазер (длина волны 405 нм, длительность импульса 25 пс, частота следования импульсов 50 МГц, энергия одиночного импульса 13 пДж, ИОС, Россия). Лазерный луч фокусировали на передней части пластиковой кюветы образца, которая находилась в специальной камере. Сигнал флуоресценции по световоду поступал на полихроматор (MS 125), далее флуоресценцию регистрировали с помощью 16-канального детектора (PML-16-1-C, спектральная ширина канала 12.5 нм, Becker & Hickl, Германия), работающего в режиме счета фотонов. Перед детектором устанавливали граничный светофильтр LPF 600 (Thorlabs). Флуоресценцию регистрировали в диапазоне 600 – 800 нм. Накопление сигнала проводили в течение 60 секунд 10 раз (Максимов Е.Г., 2011).

Для сравнения кинетик затухания флуоресценции мутантов и дикого типа *Synechocystis* sp. использовали среднее время жизни флуоресценции, которое определялось, как:

$$\tau_{av} = \tau_1 \alpha_1 + \tau_2 \alpha_2 \quad (2.2)$$

где  $\tau$  - время жизни  $i$  – компоненты,  $\alpha$  - амплитуда  $i$  – компоненты в долях единицы.

Кинетики затухания флуоресценции аппроксимировали суммой экспонент. В работе использовалась двухэкспоненциальная модель, позволившая уменьшить значение ошибки. Все полученные данные обрабатывались с помощью пакета программ SPCImage (Becker & Hickl, Germany).

Анализ полученных данных проводили при помощи пакетов программ Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США) и SPCImage (Becker & Hickl, Германия).

### 2.2.5 Электронный парамагнитный резонанс в сочетании с методом спиновых меток

Применение спектроскопии ЭПР при изучении биологических объектов может ограничиваться отсутствием в биологической системе парамагнетиков. Для решения этой задачи применяют метод спиновых меток и зондов. Принцип этого метода заключается в химическом «пришивании» к необходимой молекуле (впоследствии вводимой к биологическому объекту) парамагнитной частицы, которая впоследствии помещенная в магнитное поле будет давать сигнал ЭПР. В зависимости от того как глубоко встроится метка и каким образом будет ограничиваться ее подвижность в исследуемом объекте (липидный бислой, биологическая мембрана, белок и др.), можно говорить об изменении конформации молекулы по искажению спектров ЭПР (уширению/сужению сигнала интегральной кривой).

В качестве спиновой метки была использована 16-доксилстеариновая кислота (рис. 2.7). Одним из видов применения этой метки является изучения физико-химических свойств липидной мембраны. От степени проникновения/непроникновения этой метки внутрь липидного бислоя зависят амплитуды сигнала ЭПР.

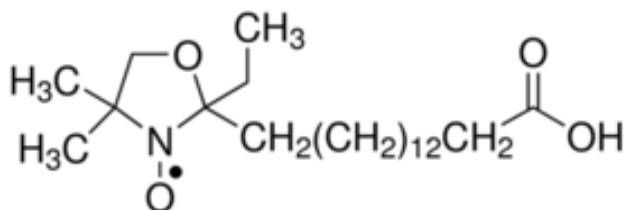


Рисунок 2.7 Структурная формула 16-доксил стеариновой кислоты

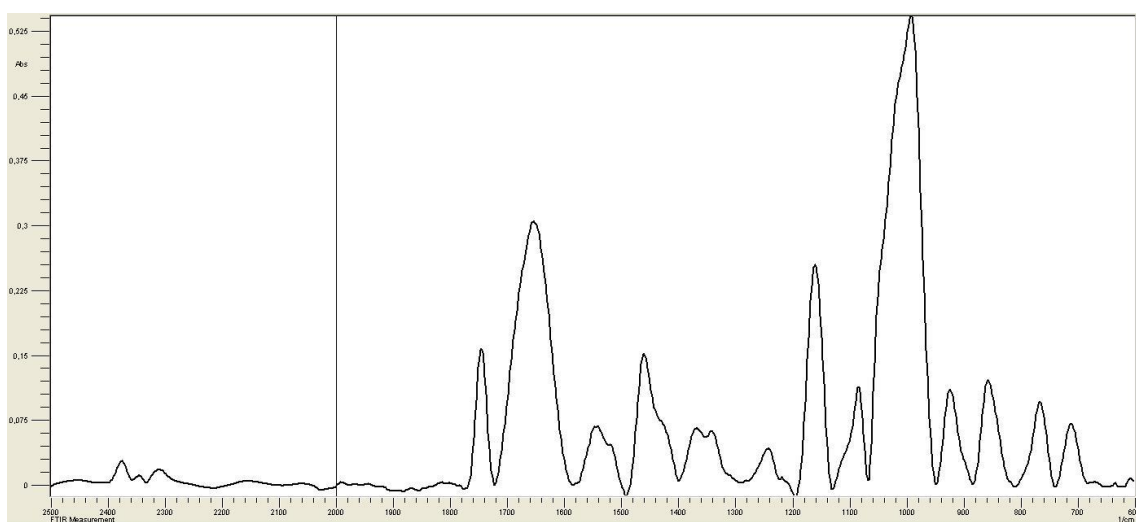
Спектры ЭПР регистрировались на ЭПР-спектрометре MMS ESR – Analyser. Для оценки эффективности встраивания спиновой метки в

биологическую мембрану, прибором, автоматически, из полученного спектра, вычислялось количество в % от основной концентрации связанной метки (т.е. внедрившейся в биологическую мембрану) это параметр С1 и С2, количество метки, которая образовала мицеллы – С3, количество свободной метки – С4 и количество свободных липидов – С5.

### 2.2.6 Метод инфракрасной спектроскопии

Инфракрасная (ИК) спектроскопия является одним из методов анализа органических соединений в биосистемах. С помощью ИК-спектроскопии быстро и надёжно идентифицируются большинство функциональных групп (карбонильная, гидроксильная, карбоксильная и др).

ИК спектр молекулы представляет собой ряд пиков (полос поглощения), которые отвечают разным колебательным энергетическим переходам. В диапазоне  $4000-400 \text{ см}^{-1}$  обнаруживается преобладающее количество колебательных переходов в молекулах органических веществ. (рис. 2.8).



2.8 ИК спектр семян кукурузы в таблетке из бромида калия (KBr), зарегистрированной в диапазоне  $400 - 4000 \text{ см}^{-1}$ .

Колебания молекул подразделяются на валентные ( $\nu$ ) и деформационные ( $\delta$ ). В случае валентных колебаний происходит изменение

длины связи вдоль ее оси, при этом различают симметричные и асимметричные колебания (рис. 2.9 а,б). Деформационные колебания сопровождаются изменением угла между связями (рис. 2.9в).

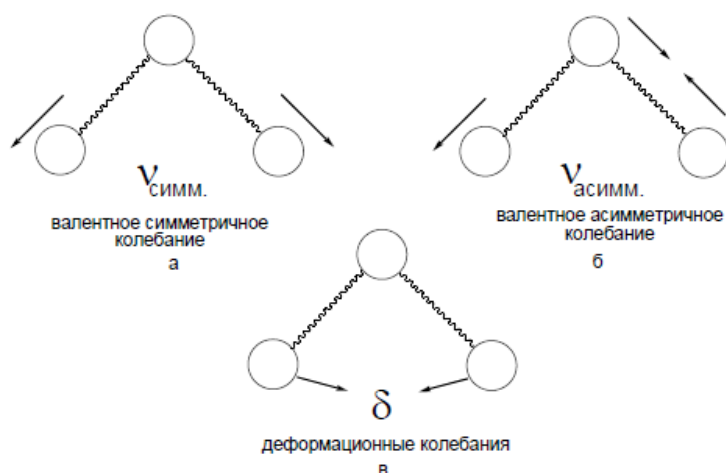


Рисунок 2.9 Виды колебаний молекул проявляющихся в ИК спектрах

Частота валентных колебаний детерминирована массой атомов и прочностью (энергией) связи. Чем больше масса, тем меньше частота, например:

$$\nu_{\text{C-C}} \sim 1000 \text{ см}^{-1} \quad \nu_{\text{C-H}} \sim 3000 \text{ см}^{-1}$$

Чем прочнее связь, тем выше частота колебаний, например:

$$\nu_{\text{C-C}} \sim 1000 \text{ см}^{-1} \quad \nu_{\text{C=C}} \sim 1600 \text{ см}^{-1}.$$

При расшифровке ИК-спектров информативными являются области  $2500\text{-}1500 \text{ см}^{-1}$  и  $4000\text{-}2500 \text{ см}^{-1}$ . При анализе первой в структуре соединения определяются непредельные фрагменты:  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}=\text{N}$ ,  $\text{C}\equiv\text{N}$ , ароматические и гетероароматические ядра. Полосы поглощения в области  $4000\text{-}2500 \text{ см}^{-1}$  являются маркерами таких функциональных групп как  $\text{O-H}$ ,  $\text{N-H}$ ,  $\text{S-H}$ , а также различные типы связей углерод-водород  $\text{Csp}^3\text{-H}$ ,  $\text{Csp}^2\text{-H}$ ,  $\text{Csp-H}$ ,  $(\text{O}=\text{C})\text{-H}$  (альдегид). В связи с этим ИК-спектры начинают анализировать с этих двух областей. При обнаружении в них характерных полос валентных колебаний связей рекомендуется дополнительно найти полосы соответствующих деформационных колебаний в области  $1500\text{-}500 \text{ см}^{-1}$ , например, в случае связей  $\text{O-H}$ ,  $\text{N-H}$ ,  $\text{C-H}$ . (Васильев А.В. и др., 2007; Смит А., 1982).



квантов света  $h\nu_2$ ), или переход 3 на уровень первичного акцептора Q с потерей энергии на величину  $\Delta E$  и образованием окисленного P680<sup>+</sup>. Далее происходит перенос электрона на вторичные акцепторы (переход 5) и восстановление фотоокисленного хлорофилла реакционного центра от первичного донора Z (6). Реакциями 5 и 6 завершается цикл окислительно-восстановительных реакций, связанных с утилизацией энергии поглощенного антенным хлорофиллом кванта света. Возможен обратный переход электрона (4) на возбужденный уровень P680 с последующим испусканием кванта света  $h\nu_3$  (7). Этот переход сопряжен с преодолением достаточно высокого барьера энергии активации ( $\Delta E \sim 70$  кДж/моль), поэтому вероятность обратного перехода 4 мала по сравнению с прямым переносом электрона 5 на вторичные акцепторы. Последнее обстоятельство обуславливает очень низкую интенсивность послесвечения. Таким образом, энергия, высвечиваемая в виде замедленной флуоресценции, выделяется в реакции обратного переноса электрона с восстановленного акцептора Q на хлорофилл реакционного центра P680 (в реакции рекомбинации зарядов (2.3)):



За счет высоких скоростей миграции энергии возбуждения между молекулами хлорофилла замедленная флуоресценция высвечивается не пигментом реакционного центра, а светособирающими молекулами хлорофилла. Согласно общепринятым представлениям интенсивность послесвечения (I) пропорциональна скорости рекомбинации (w) P680<sup>+</sup> и Q<sup>-</sup> и квантовому выходу излучения в акте рекомбинации (h).

Система регистрации индукционной кривой сконструирована на базе фосфороскопа, который представляет собой систему из трех коаксиальных цилиндров (рис.2.11). Неподвижные внешний и внутренний цилиндры имеют два окна; через окна проходит свет возбуждения от источника (светодиод)

или свет послесвечения, который регистрируется ФЭУ. Средний подвижный цилиндр имеет одно окно и приводится во вращение электродвигателем. При вращении среднего цилиндра попеременно открывается окно возбуждения или измерения свечения. Объект помещается во внутренний неподвижный стакан ближе к окну регистрации; освещение объекта производится красным светом.

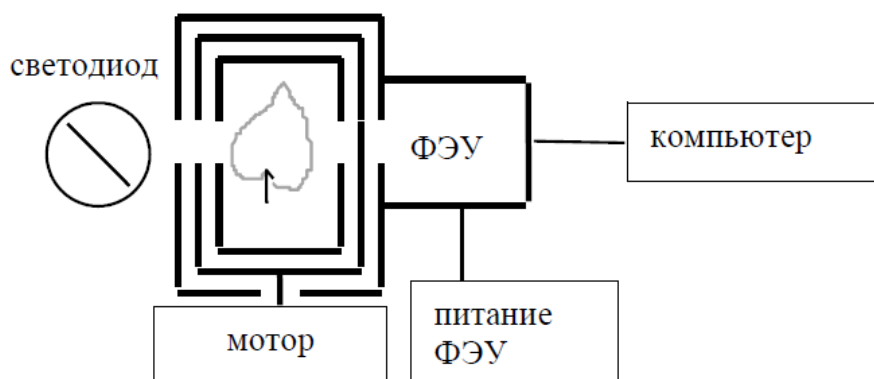


Рисунок 2.11 Схема фосфороскопа, используемого для регистрации индукционной кривой миллисекундной компоненты за медленной флуоресценции.

Время между возбуждением и измерением послесвечения определяется скоростью вращения электродвигателя и составляет обычно несколько миллисекунд. Установка позволяет регистрировать короткоживущие компоненты послесвечения с  $t = 10^{-3} - 10^{-2}$  с.

С помощью фосфороскопа регистрируется параметр  $L$  (см. рис. 2.12), пропорциональный среднему значению интенсивности послесвечения  $I_{cp}$  за время его регистрации:  $\Delta t = t_4 - t_2$  (этот параметр часто называют "интенсивностью миллисекундной компоненты послесвечения").



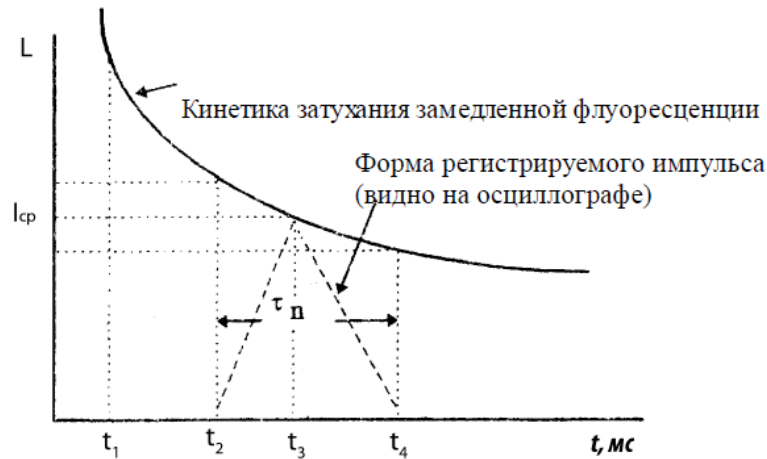


Рисунок 2.12 График, иллюстрирующий принцип измерения интенсивности миллисекундной компоненты послесвечения в течение каждого цикла работы фосфороскопа

$t_1$  - момент окончания возбуждения флуоресценции

$t_2$  - момент начала регистрации послесвечения

$t_3$  - момент полного совмещения окон фосфороскопа при регистрации послесвечения

$t_4$  - момент окончания регистрации

$t_n$  - длительность импульса

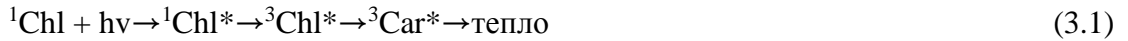
### 2.3 Математическая и статистическая обработка результатов

Все результаты получены не менее чем в трёх последовательных опытах, каждый из которых состоял из не менее чем 3–5 повторностей. Результаты обрабатывали статистически по общепринятым методам в биологических исследованиях (Härdle W. *et al.*, 2007). Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2013, Statistica 8 и OrginPro 8.1. Сравнение вариантов опытов проводили при 5% уровне значимости по t-критерию Стьюдента. Далее в главах представлены средние значения из всех опытов со стандартными ошибками.

## Глава 3 Результаты и их обсуждение

### 3.1. Изучение молекулярных характеристик каротиноидов в биологических мембранах мутантов цианобактерии *Synechocystis PCC6803*

**Введение.** Известно, что около 99% всех хлорофиллов клетки нековалентно связаны с белками фотосистем, в т.ч. ССК (Lokstein H. *et al.*, 2013). Не связанные с белком хлорофиллы, как правило, образуют реакционные центры (РЦ) – место первичного разделения зарядов. Соответственно, хлорофиллы преимущественно локализованы в мембранах в виде пигмент-белковых комплексов (ПБК) (Vermaas W.F.J. *et al.*, 2008). Другие пигменты – каротиноиды, в отличие от хлорофиллов, неравномерно распределены в разных структурах клеток и могут быть как связанными с белками (García-Martín A. *et al.*, 2008) так и нет, неся при этом множество функций. В клетке каротиноиды локализованы преимущественно в фотосинтетических комплексах и в фотосинтетических мембранах (Green B.R., 1996) часть из них расположены пластоглобулах, а также в этерифицированном состоянии с жирными кислотами (Collins A.M. *et al.*, 2011). От того в каком из компартментов (структур) клетки локализован каротиноид, зависят и выполняемые им функции. Например, каротиноидные-ПБК выполняют с одной стороны функции сбора световой энергии (ССК в тилакоидных мембранах хлоропластов), так и тепловой диссипации энергии (у цианобактерий белок ОСР (orange carotene protein), у высших растений, водорослей эту же функцию несут ССК, регулируя количество энергии необходимой для фотохимических процессов (Jahns P. *et al.*, 2009, 2012). Каротиноиды, связанные с белками, являются тушителями триплетных состояний хлорофилла (3.1), способствуя защите белков, липидов и других пигментов от активных форм кислорода (3.2) (Telfer A., 2005):



Также каротиноиды в составе белков выполняют роль связующего каркаса, необходимого для олигомеризации белков (в т.ч. и ССК) фотосистем в ди- и тримерные комплексы, (Domonkos I. *et al.*, 2013), что способствует более эффективной работе ФСА (рис.3.1).

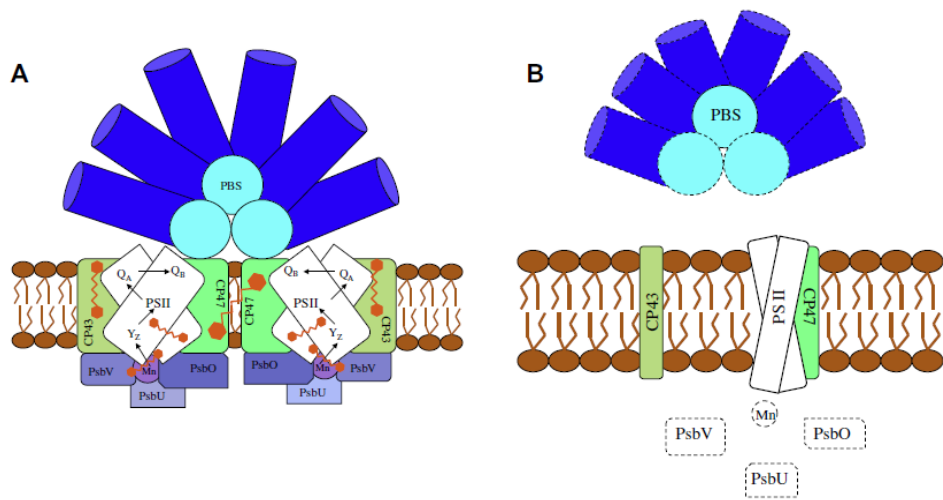


Рисунок 3.1 Схема димерного комплекса РЦ ФС2 цианобактерии. (А) собранный димерный комплекс в присутствии каротиноидов и фикобилисом (PBS), (В) – структуры, образованные в отсутствие каротиноидов в РЦ ФС2 с отдельным магранцевым кластером и фикобилисом (PBS). Каротиноиды обозначены оранжевым цветом (Domonkos I. *et al.*, 2013)

Однако, каротиноиды играют важную роль и в поддержании постоянства микровязкости мембран (в т.ч. и фотосинтетических) (Kłodawska K. *et al.*, 2012). Известно, что существуют каротиноиды, которые способствуют разупорядочению ( $\beta$ -каротин), упорядочиванию (зеаксантин, миксоксантофилл и др) жирнокислотных «хвостов» липидов мембраны и не влияющие на её физические свойства (эхиненон). (Domonkos I. *et al.*, 2013).

Наконец, каротиноиды могут накапливаться и в виде эфиров жирных кислот либо в пластоглобулах, либо в жировых каплях в строме хлоропласта и цитоплазме клетки, выполняя при этом экранирующую функцию, выступая барьером, для доступа энергии к ФСА (Соловченко А. Е. *и др.*, 2010).

Итак, несомненно, очевидно, что большой спектр функций каротиноидов зависит не только от состояния молекулы, но и от ее микроокружения, места локализации. В связи с этим актуальной является задача выяснение причин возможного перераспределения каротиноидов между разными, описанными каротиноид-содержащими системами. Очень удобным объектом для подобных исследований являются цианобактерии, поскольку они имеют полностью секвенированный геном, что облегчает выполнения задач исследования.

### **3.1.1 Изучение конформации каротиноидов клеток цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803* и её мутанта без ФС2 (*ΔPSII*)**

Как было отмечалось выше, в разных местах локализации каротиноиды могут выполнять разные функции. Перераспределение пигментов в клетке может указать на то, что изменяются функции каротиноида. Особенно важным является изменение локализации каротиноидов из белков фотосистем и мембран в цитоплазму и обратно. Если происходит накопление каротиноидов вне комплекса с белком, то вероятнее всего, они сосредотачиваются в цитоплазматических, фотосинтетических мембранах, а также в цитозоле клетки в виде липидных пластоглобул (Соловченко А. Е. *и др.*, 2010). Исходя из этого, можно говорить о том, что применение манипуляций над геномом приводит к возникновению молекулярных механизмов, способствующих адаптации клеток и перераспределению функций пигментов.

Для исследования перераспределения пигментов широко используются методы абсорбционной, ИК-Фурье спектроскопии, РКР (Schradler B. *et al.*,

2000., Schulz H. *et al.*, 2005, 2007), которые идеально подходят изучения молекулярных перестроек функций пигментов.

В первой серии экспериментов исследовали спектры поглощения дикого типа и мутанта  $\Delta PSII$  цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*. В видимом диапазоне спектров поглощения (рис. 3.2) выявлены несколько максимумов в области 420-530 нм, что соответствует поглощению каротиноидов; около 630 нм, что соответствует поглощению фикобилисом (ФБС) и около 680 нм – поглощение хлорофилла *a*. (Rakhimberdieva M.G. *et al.*, 2010).

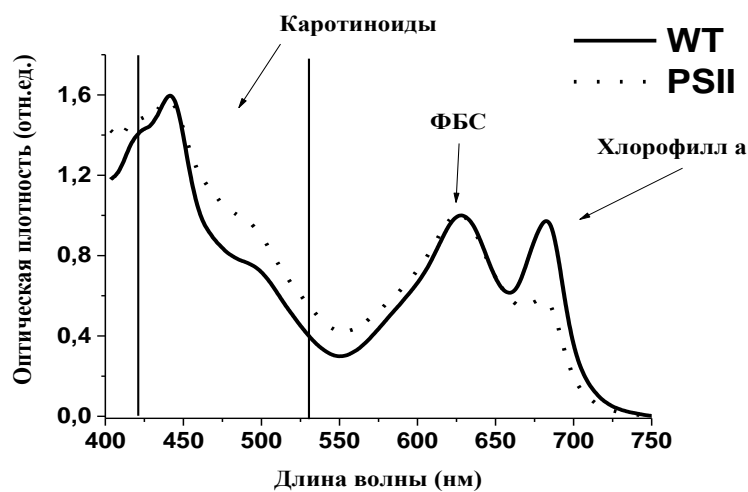


Рисунок 3.2 (А). Спектры поглощения дикого типа (*WT*) и мутанта без ФС2 ( $\Delta PSII$ ); Стрелкой на рисунке показаны области поглощения каротиноидов, фикобилисом (ФБС) и хлорофилла *a*. Спектры снормированы на значение оптической плотности ФБС и приведены к нулю при 750 нм.

Как известно, каротиноиды вносят значительный вклад в светопоглощение в области 420–530 нм (Maksimov E.G. *et al.*, 2011). В ходе выполнения данной серии экспериментов выявлено увеличение поглощения в этой области спектра у мутанта  $\Delta PSII$ . Анализируя полученные результаты (сравнив площади под кривыми поглощения света в области каротиноидов у дикого типа и мутанта), установлено, что у мутанта площадь под кривой увеличивается на 14% относительно *WT*, а хлорофилла *a* уменьшается на 38% (табл. 3.1). Известно, (Rakhimberdieva M.G. *et al.*, 2010) что содержание

каротиноидов у мутанта дефектного по ФС2 (в опытах проведенных *in vitro*) составляет  $70 \pm 10\%$  на клетку, а хлорофилла *a*  $84 \pm 13\%$  от содержания этих же пигментов в диком типе. Вероятно, в случае экстракции каротиноидов, часть из них могла быть полностью не извлечена, а увеличенное поглощение света в области 420-530 нм обусловлено либо изменением количества вторичных каротиноидов, либо с их перераспределением. Концентрируясь в определенном месте клетки, либо распределяясь по ней более равномерно, каротиноиды (в т.ч. и другие экранирующие соединения (микроспорин-подобные аминокислоты, сцитонемин и др. (Wada N. *et al.*, 2013; Quesada A. *et al.*, 1999)) создают защитную преграду (т. н. экран) препятствующую доступу энергии света к ФБС и хлорофиллу *a*. Образование защитных пигментов может обусловлено увеличенным содержанием АФК, ввиду отсутствия основного донора электронов для ФС1 – водоокисляющего комплекса ФС2, еще бóльшая доля электронов поставляется из реакций дыхания. Следовательно, в подобной системе в большей степени высока вероятность образования АФК (Mullineaux C.W. *et al.*, 1986, 1990).

Таблица № 3.1 Поглощение клеток дикого типа *Synechocystis* PCC 6803, мутанта  $\Delta PSII$  (см. рис. 3.1) в диапазоне 420-530 нм (\*  $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

Название образца	WT	$\Delta PSII$
Площадь под спектром поглощения (отн.ед.)	$106 \pm 3,2$	$121,4 \pm 4,8^*$
в % от WT	$100 \pm 3,0$	$114 \pm 4,0^*$
Нормировка спектров поглощения	Спектры нормированы на оптическую плотность при 630 нм	

Исходя из полученных данных, нами предположено, что увеличенное поглощение света в области 420-530 нм у мутанта без ФС2 может быть обусловлено либо увеличением концентрации каротиноидов, либо связано с перераспределением и изменением конформации молекул каротиноидов в

клетке или изменением количества воды в клетке – что могло вызвать избыточное светорассеяние.

С целью рассмотрения этих гипотез была проведена следующая серия экспериментов по изучению распределения каротиноидов и их возможных конформаций в клетках цианобактерий мутанта и дикого типа.

Каротиноиды имеют в своем составе систему сопряженных  $\pi$ -связей (рис. 3.3), для которой характерна делокализация  $\pi$ -электронов. Делокализация  $\pi$ -электронов приводит к тому, что в сопряженной системе связи становятся нецелочисленными (дробными), т.е. ни двойными, ни одинарными (Liu W.L. *et al.*, 2008).

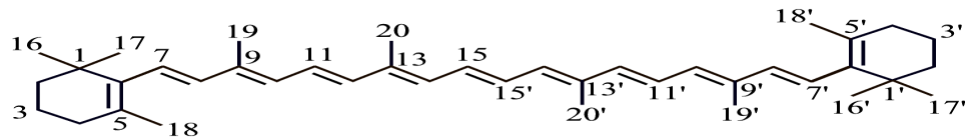


Рисунок 3.3 Структурная формула молекулы  $\beta$ -каротина.

Полосы спектра резонсного комбинационного рассеяния света (РКР) каротиноидов характеризуют колебания ядер в цепи сопряженных связей молекулы. В спектрах КР интенсивность полос валентных колебаний обычно выше интенсивности полос деформационных колебаний, а линии колебаний кратных связей более интенсивные, чем линии простых связей (Коваленко А.А. *и др.*, 2011).

У мутанта и дикого типа были зарегистрированы спектры РКР каротиноидов на спектрометрах с синим (473 нм) и с зеленым (532 нм) лазерами (рис. 3.4, 3.5 соответственно). В связи с тем, что каротиноиды обладают широкой полосой поглощения, которая включает различные популяции каротиноидов (каротины, ксантофиллы), это было сделано, для того чтобы зарегистрировать изменения при помощи РКР в различных популяциях каротиноидов, отличающихся своими диэлектрическими свойствами микроокружения (Gruszecki W.I. *et al.*, 2009).

В спектрах были идентифицированы полосы, характеризующие следующие молекулярные изменения в структуре каротиноидов: так, полоса около  $1520\text{ см}^{-1}$  характеризует интенсивность валентных колебаний двойных C=C-связей молекулы каротиноида (Ruban A.V. *et al.*, 2001). Сдвиг данной полосы спектра КР в область высоких частот, наблюдается при изменении конформации молекулы каротиноида из all-trans в cis, причем, чем ближе cis положение связи находится к центру молекулы, тем больший сдвиг наблюдается. Ди-cis конформация сдвигает полосу  $1520\text{ см}^{-1}$  еще дальше в сторону больших частот (Frank H.A., 2004. P. 189-201.); полоса  $\sim 1156\text{ см}^{-1}$  характеризует валентные колебания C-C в сочетании с валентными колебаниями C=C связей. Однако, молекула каротиноидов помимо конъюгированных двойных связей имеют метиловые группировки, которые тоже вносят вклад в положение полос. (Merlin J.C., 1985). Полоса  $\sim 1188\text{ см}^{-1}$ , предположительно, характеризует изменения положения метила C16 в all-trans конформации; полоса около  $1004\text{ см}^{-1}$  спектра КР характеризует плоскостные валентные колебания боковой метильной группы C-CH<sub>3</sub> (Andreeva A. *et al.*, 2011); полоса  $\sim 960\text{ см}^{-1}$  спектра КР характеризует внеплоскостные колебаниями C-H около C=C связи, причем увеличение интенсивности данной полосы наблюдается при нарушении плоской конформации молекулы. При экстракции каротиноидов из клеток и тканей интенсивность этой полосы КР спектра снижается, в связи с тем, что в растворах молекула каротиноида представлена в плоской ориентации (Alexandre M.T.A. *et al.*, 2014) в то время как полосы  $1520\text{ см}^{-1}$ ,  $1156\text{ см}^{-1}$ ,  $1004\text{ см}^{-1}$ , изменяются незначительно. Как было показано Б. Робертом каротиноид, связанный с множеством протеинов в ССКП *Rhodobacter spheroides*, характеризуется интенсивной полосой КР  $960\text{ см}^{-1}$ , которая по амплитуде практически не отличается от полос  $1156\text{ см}^{-1}$  и  $1004\text{ см}^{-1}$  (Frank H.A., 2004. P. 189-201; Ruban A.V. *et al.*, 2007; Gruszecki W.I. *et al.*, 2009). Другими словами, при ассоциации каротиноида с белком наблюдаются искажения молекулы около C-C связи, что приводит к изменению



ориентации молекулы (т.е. она уже не находится в плоской конформации), следовательно обнаруживаются внеплоскостные колебания C-H связи, которые обычно резонансно запрещены в плоской ориентации молекулы (Pioaia C. *et al.*, 2011). Чем жестче связь между каротиноидом и белком, тем наблюдается большее усиление полосы около  $960\text{ см}^{-1}$  (Alexandre M.T.A. *et al.*, 2014).

При анализе КР спектров каротиноидов в биологических объектах часто положение полос не изменяется, а интенсивность КР зависит от условий эксперимента или объекта (например, несколько различных каротиноидов, каротиноиды в белке, либо колебания  $\text{-C=C-}$  и  $\text{=C-C=}$  связей жирных кислот липидов). Для нормировки вклада отдельных связей молекулы в спектре КР используют соотношения отдельных полос друг другу, выбирая, как правило, постоянную по амплитуде полосу КР, изменения которой минимальны в данном процессе (внутримолекулярный маркер) (Тютяев Е.В. *и др.*, 2015).

В ходе работы было исследовано распределение каротиноидов по клеткам цианобактерии дикого типа и мутанта на установке *inVia Microscope* (см гл. 2.2). Обнаружено, что распределение каротиноидов в клетках мутантов и дикого типа отличается. Можно отметить, что у дикого типа, наибольший уровень сигнала от каротиноидов в клетке сосредоточен локально, а у мутанта он распределен равномернее по всей клетке (рис. 3.4).

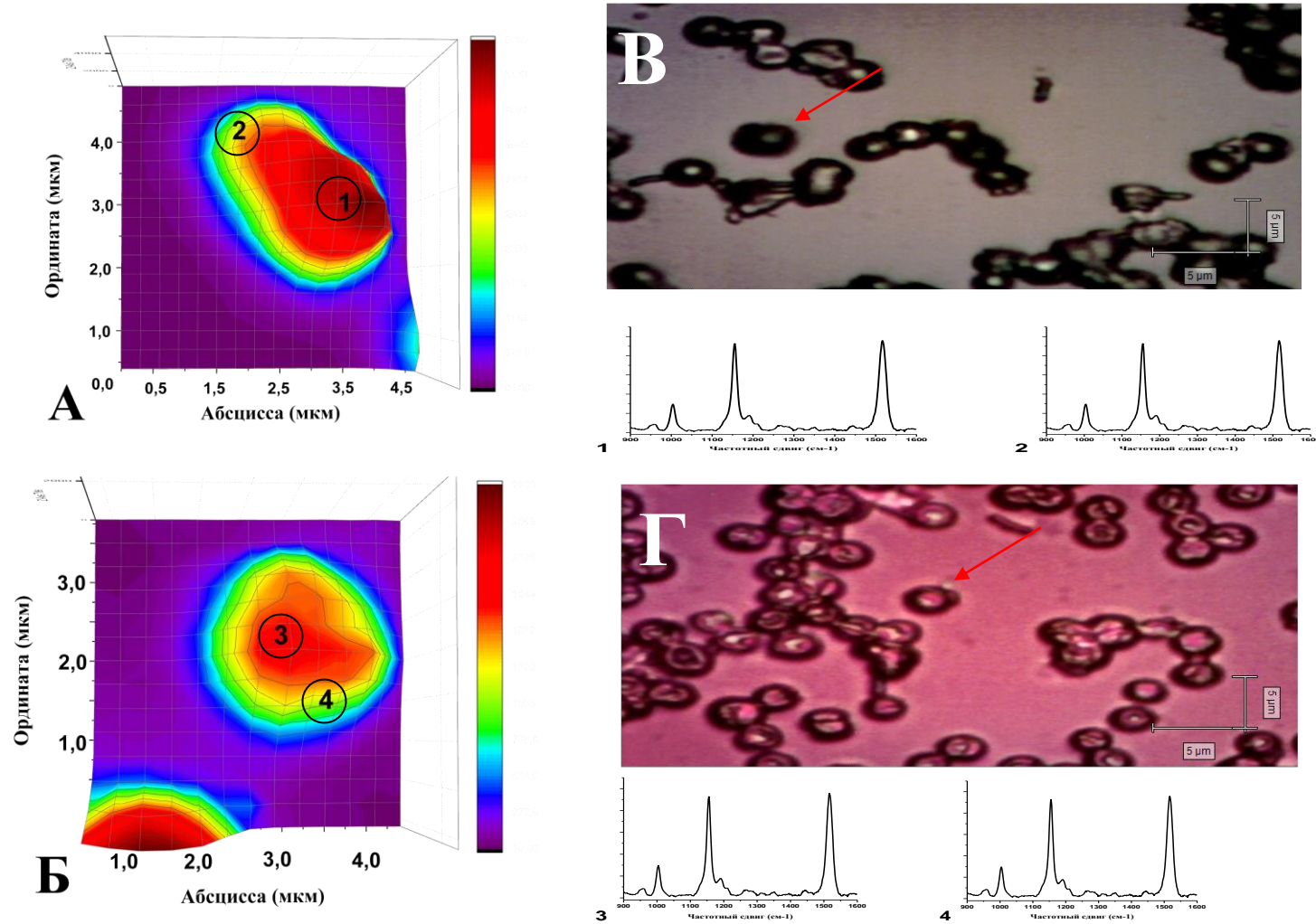


Рисунок 3.4 Распределение интенсивности сигнала РКР полосы  $\sim 1520 \text{ см}^{-1}$  каротиноидов, зарегистрированной на клетках дикого типа (А) и мутанта (Б) *Synechocystis sp. PCC6803*. Разрешение пикселя для рисунка 3.4А и 3.4Б – 300 нм; На рисунке представлены микрофотографии картируемых клеток дикого типа (В) и мутанта (Г) с увеличением  $\times 1500$ , а также соответствующие спектры, зарегистрированные на выделенных областях (1, 2, 3, 4)

Следующим этапом работы стало изучение молекулярной структуры, распределенных по клетке каротиноидов. Нами исследовались все участки клетки, однако, несмотря на то, что они отличаются по интенсивности сигнала, соотношение амплитуд полос, характеризующих изменения молекулярной структуры каротиноидов было неизменно, также как и положение полосы  $\sim 1520\text{см}^{-1}$  (табл. 3.2).

Таблица 3.2 Соотношения амплитуд полос спектра РКР в разных областях клетки дикого типа и мутана  $\Delta PSII$  цианобактерии *Synechocystis PCC6803* (\*  $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

Амплитуда полос спектра РКР	Область 1	Область 2	Область 3	Область 4
	Отн.ед.			
$1520\text{ см}^{-1}$	$5134 \pm 462$	$2554 \pm 281^*$	$2234 \pm 268$	$1390 \pm 111^*$
$1160\text{ см}^{-1}$	$4667 \pm 420$	$2432 \pm 268^*$	$2068 \pm 248$	$1241 \pm 99^*$
$1004\text{ см}^{-1}$	$1820 \pm 164$	$826 \pm 91^*$	$930 \pm 112$	$596 \pm 48^*$
$960\text{ см}^{-1}$	$782 \pm 70$	$322 \pm 35^*$	$363 \pm 44$	$262 \pm 21^*$
Соотношение полос спектра РКР	Отн.ед.			
$I_{1520}/I_{1160}$	$1,11 \pm 0,04$	$1,05 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,03$	$1,12 \pm 0,04$
$I_{960}/I_{1004}$	$0,43 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02$
$I_{1004}/I_{1160}$	$0,39 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,15$	$0,48 \pm 0,13$
$I_{1004}/I_{1520}$	$0,28 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$

Согласно рис. 3.5 и 3.6 не выявлены изменения в положении характерных полос спектра РКР каротиноидов у мутанта и дикого типа.

При использовании зелёного лазера (возбуждение 532 нм), полосам валентных колебаний  $\text{-C=C-}$  соответствует пик  $1515\text{ см}^{-1}$ ,  $\text{=C-C=}$  в сочетании с  $\text{-C=C-}$  –  $1154\text{ см}^{-1}$ ,  $\text{C-CH}_3$  –  $1000\text{ см}^{-1}$  и внеплоскостных  $\text{C-H}$  колебаний около  $\text{C=C}$  связи  $956\text{ см}^{-1}$ . Зарегистрированы только изменения положения вышеописанных полос при использовании другого лазера.

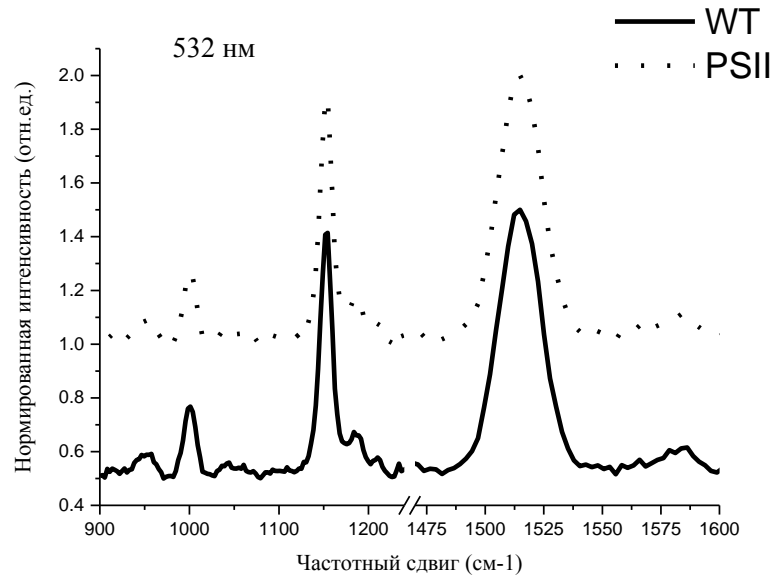


Рисунок 3.5 Спектр РКР каротиноидов мутанта  $\Delta PSII$  и дикого типа цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*; возбуждение 532 нм.

При использовании синего лазера (возбуждение 473 нм) полосам валентных колебаний  $-C=C-$  соответствует пик  $1527\text{ см}^{-1}$ ,  $=C-C=$  –  $1161\text{ см}^{-1}$ ,  $C-CH_3$  –  $1008\text{ см}^{-1}$  и внеплоскостным  $C-H$  колебаниям около  $C-C$  связи –  $963\text{ см}^{-1}$ .

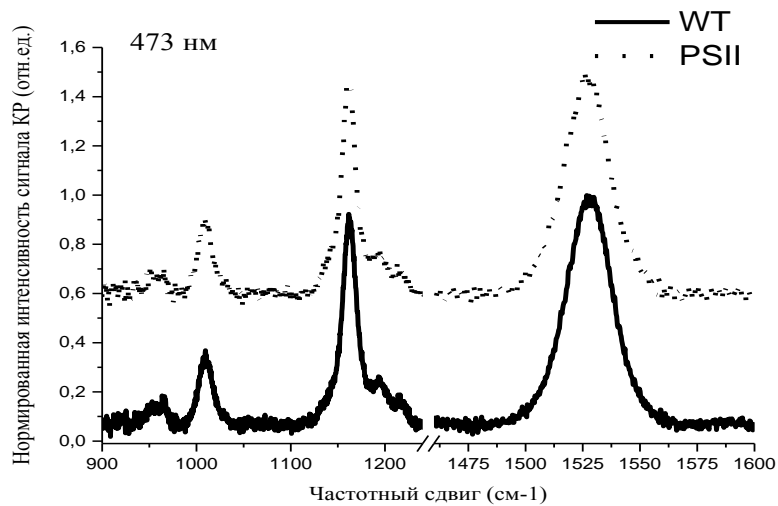


Рисунок 3.6 Спектр РКР каротиноидов мутанта  $\Delta PSII$  и дикого типа цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*; возбуждение 473 нм.

Вероятно, полученные различия в сдвиге полос при разных длинах волн возбуждающего лазера объясняются наличием нескольких популяций каротиноидов, которые имеют максимумы поглощения в сине-зеленой (473 нм) либо в зеленой области спектра (532 нм). В подобном случае мы наблюдаем резонансное усиление сигнала КР от разных каротиноидов (Grudzinski W. *et al.*, 2016).

Известно, положение полосы  $1520\text{ см}^{-1}$  является надежным маркером количества конъюгированных двойных ( $\text{C}=\text{C}$ ) связей, и сдвиг этой полосы в сторону больших частот свидетельствует о уменьшении количества конъюгированных двойных ( $\text{C}=\text{C}$ ) связей и/или об изомеризации молекулы каротиноида (Pioaia C. *et al.*, 2011). Сдвиг полосы  $1520\text{ см}^{-1}$  в сторону меньших частот сопровождается увеличением длины конъюгированной цепи  $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$  (см. обзор литературы). Согласно (Merlin J.C., 1985) соотношение амплитуд  $I_{1520}/I_{1160}$  отражает степень делокализации  $\pi$ -электронов в молекулах каротиноидов, которая зависит от его микроокружения, то есть упорядоченности жирных кислот липидов (Koyama.Y. *et al.*, 1979). В данных экспериментах мы не обнаружили, изменения положения полос спектров подтверждающихся практически так и не изменяющимися их амплитудами (рис. 3.7 и 3.8).

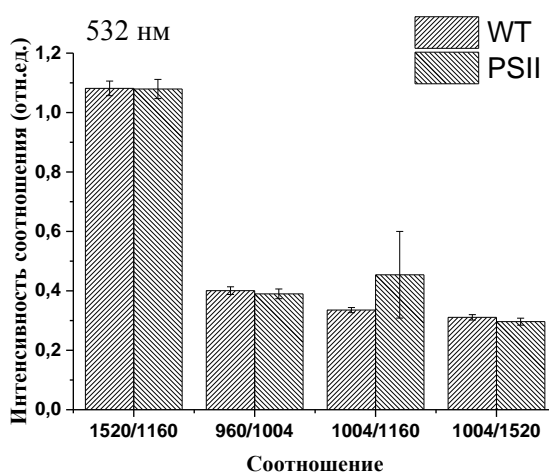


Рисунок 3.7 Соотношения амплитуд характерных полос спектров РКР каротиноидов.

Установлено, что достоверных изменений микроокружения каротиноидов не наблюдается (рис. 3.7-3.8), поскольку соотношения полос  $I_{1520}/I_{1160}$  в спектрах мутанта и дикого типа отличаются друг от друга менее чем на 5%. Количество каротиноидов в неплоской конформации (соотношение  $I_{960}/I_{1004}$ ) отличаются друг от друга на 8,9% (473 нм) и 2,7% (532 нм), однако следует отметить, что в двух перечисленных случаях эти различия были недостоверны. Различия в интенсивности валентных колебаний метиловой группировки между диким типом и мутантом ( $I_{1004}/I_{1520}$ ,  $I_{1008}/I_{1160}$ ) не превышает 7,9% и 2,9% для 473 нм лазера соответственно и 26,8% и 4,5% для 532 нм лазера соответственно. Тем не менее, кажущееся высокое различие в последнем случае (26,8%) сводится к минимуму за счет высокой погрешности опыта.

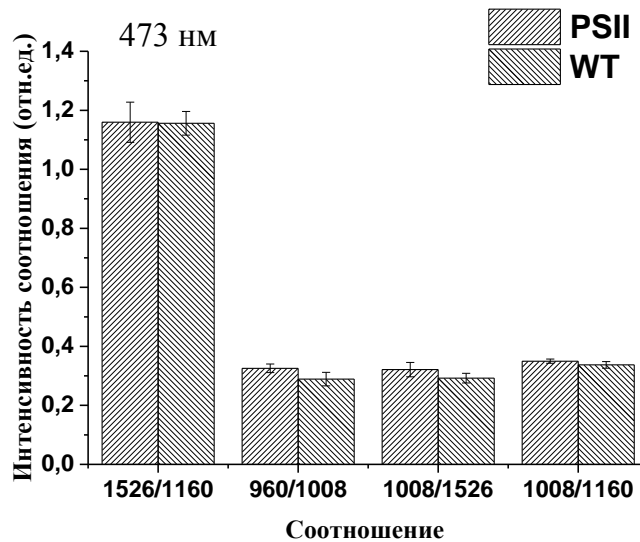


Рисунок 3.8 Соотношения амплитуд характерных полос спектров РКР каротиноидов.

Изменения в амплитудах полос спектров РКР, при использовании возбуждения с 473 нм, подобны изменениям, зарегистрированным при возбуждении 532 нм. Вероятно, что в разных популяциях каротиноидов отсутствуют достоверные изменения конформации.

Исходя из данных спектроскопии РКР, было показано, что распределение каротиноидов в клетках мутанта  $\Delta PSII$  и дикого типа имеет

различия. При более детальном анализе структуры молекул каротиноидов было установлено отсутствие изменений в системе сопряженных двойных связей молекул каротиноидов и/или их микроокружении, количества связанного пигмента с белком, выраженности валентных колебаний метильных группировок у дикого типа и мутанта в разных популяциях каротиноидов.

В следующей серии экспериментов регистрировали и анализировали ИК спектры цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803* дикого типа (WT) и мутанта (*ΔPSII*) (Рис. 3.9). Согласно библиотеке данных ИК- спектров (Тарасевич Б.Н., 2012) были идентифицированы и анализированы следующие полосы:

~3015–3707 $\text{см}^{-1}$  – валентные колебания ОН- связи, совместно с внутримолекулярными колебаниями О-Н;

~2936, 2856  $\text{см}^{-1}$  –валентные колебания –СН<sub>2</sub>- связи в алканах;

~1640 – полоса амида I, характеризующая валентные колебания С=О связи третичных амидов, либо структурированной воды.

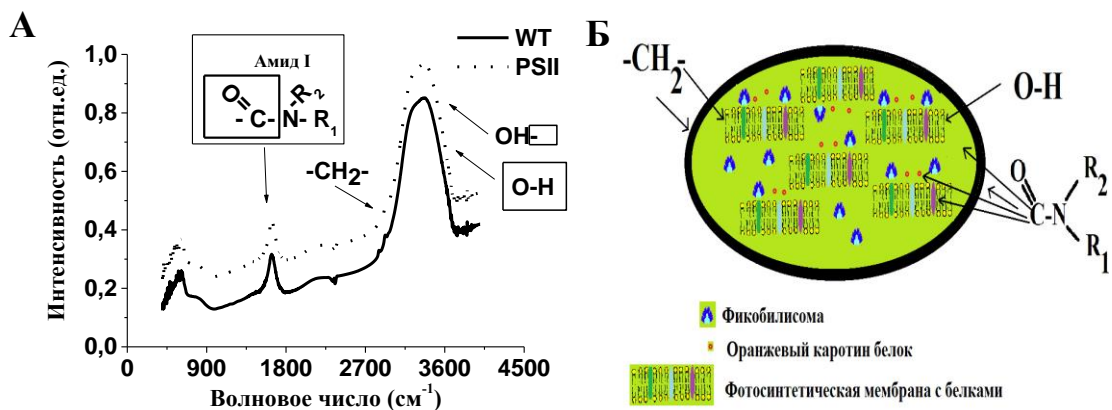


Рисунок 3.9 Инфракрасные спектры цианобактерий *Synechocystis sp. PCC 6803* дикого типа и мутанта без ФС2 (А) и схема возможной локализации веществ с зарегистрированными молекулярными связями в клетке цианобактерии (Б).

Согласно рис. 3.9, табл. 3.3 обнаруженные и идентифицированные полосы поглощения в ИК-области спектра не отличаются амплитудой (различия по оси OY введены специально, с целью показать, что полосы не смещены по оси OX) и положением друг относительно друга.

Таблица 3.3 Значения амплитуд полос валентных колебаний связей в ИК спектрах дикого типа и мутанта  $\Delta PSII$  цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*

Полосы валентных колебаний, см <sup>-1</sup>	Образец	
	Дикий тип (отн.ед.)	Мутант $\Delta PSII$ (отн.ед.)
1635	2,85±0,13	2,86±0,15
3381	7,65±0,33	7,73±0,40
2854	2,98±0,14	2,90±0,15
2926	3,43±0,17	3,32±0,18

Известно, что каротиноиды (зеаксантин, 3-гидроксиэхиненон и др.) имеют в своем составе ОН-группы и вероятно содержание той фракции О-Н-содержащих каротиноидов (имеющих водородные связи с кислородом) остается постоянным как у дикого типа, так и у мутанта (3600см<sup>-1</sup>), также как и постоянным остается и общее содержание белков (~1640см<sup>-1</sup>).

Вероятно, увеличение коэффициента поглощения света у мутанта  $\Delta PSII$  в области поглощения каротиноидов на фоне постоянной концентрации белка и/или содержания воды (ИК-спектры) не связано с перераспределением и изменением конформации пигмента в цитоплазме клетки, а обусловлена большим содержанием каротиноидов в клетке.

Итак, в мутанте  $\Delta PSII$  содержится больше каротиноидов и они, распределены более равномерно по всей клетке, чем в диком типе, что вероятно, обусловлено накоплением вторичных каротиноидов внутри пластоглобул и/или жировых капель. Полученные данные согласуются с тем, что в клетках мутанта в большей степени интенсифицированы свободнорадикальные процессы, за счет окисления органического субстрата



(процессов дыхания) с целью поддержания нециклического транспорта электронов и изменение содержания каротиноидов регулирует данный процесс.

### 3.1.2 Изучение конформации каротиноидов и времени жизни флуоресценции хлорофилла у мутантов $\Delta PSI/\Delta PSII$ , $\Delta OCP$ и дикого типа цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803*

Для исследования использовали клетки дикого типа *Synechocystis sp. PCC 6803*, мутанта лишённого каротин белка ( $\Delta OCP$ ), мутанта лишённого ФС1 и ФС2 ( $\Delta PSI/\Delta PSII$ ) (рис.3.10). Мутант  $\Delta OCP$  представлен клетками цианобактерий *Synechocystis sp. PCC 6803*, в фотосинтетическом аппарате, которого отсутствует оранжевый каротин белок ( $\Delta OCP$ ), который является главным нефотохимическим тушения флуоресценции ФБС и хлорофилла *a*. Более подробно о нем изложено в обзорах (Kirilovskya D. *et al.*, 2012; Golovko T.K. *et al.*, 2014). После темновой адаптации, в течение 30 минут, регистрировались мгновенные спектры флуоресценции с пикосекундным временным разрешением. Спектры получали с помощью измерительного комплекса на основе системы однофотонного счета Simple Tau 140 (Becker & Nickl, Германия).

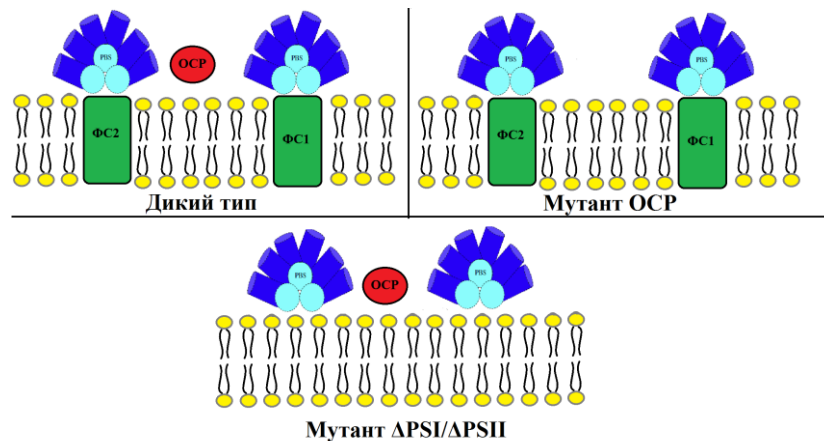


Рисунок 3.10 Схематическое строение фотосинтетической мембраны цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803* дикого типа, мутанта  $\Delta OCP$  и  $\Delta PSI/\Delta PSII$

Установлено, что у цианобактерий дикого типа среднее время жизни флуоресценции хлорофилла уменьшается быстро и наблюдается её эффективное тушение. Таким образом, у дикого типа, энергия квантов света, поглощенных ФБС быстро излучается в виде тепла и на фотохимические процессы. Среднее время жизни флуоресценции хлорофилла составило 195 пс (рис. 3.11).

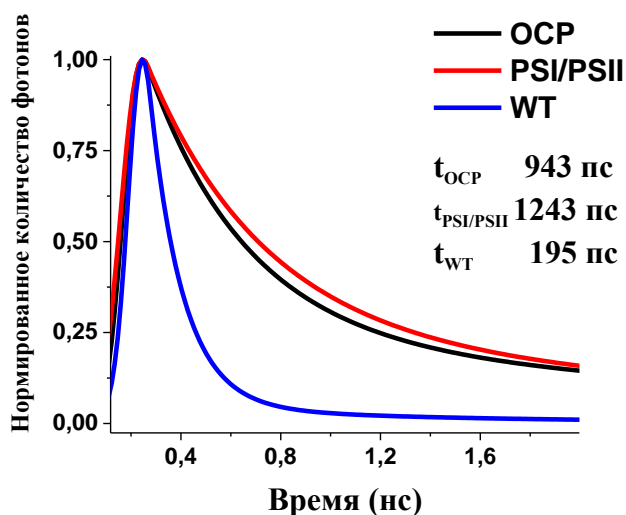


Рисунок 3.11 Изменение среднего времени жизни флуоресценции хлорофилла и светособирающих антенн у дикого типа и его мутантов лишённого оранжевого каротин белка ( $\Delta OCP$ ) и ФС1 и ФС2 ( $\Delta PSI/\Delta PSII$ )

У мутантов дефектных по белку *OCP* (orange carotenoid protein) время жизни флуоресценции хлорофилла намного больше, чем у дикого типа (в 4,8 раза в сравнении с диким типом). Это объясняется отсутствием белка *OCP*, который является одним из путей дезактивации энергии квантов света. У данного мутанта наблюдается только фотохимическое тушение ФХ. Среднее время жизни флуоресценции составило 943 пс (рис.3.11). Важно отметить, что качественный состав каротиноида в белке *OCP* тоже влияет на его функциональную активность. Так, например, если у дикого содержащего основной каротиноид белка *OCP* – 3-гидроксиэхиненон заменить на зеаксантин, то *OCP* полностью теряет свою активность (Punginelli C.A. *et al.*, 2009).

Кинетика затухания флуоресценции компонентов фотосинтетических антенн в ФСА мутанта лишённого ФС1 и ФС2 в сравнении с диким типом имеет наибольшее время жизни (рис.3.11). ФС1 и ФС2 являются одними из основных акцепторов энергии квантов света, полученных от ФБС, они преобразуют ее в энергию первичных разделенных зарядов, то есть они являются фотохимическими тушителями флуоресценции. Среднее время жизни флуоресценции ФБС составило ~ 1,2 нс.

Максимальное эффективное тушение ФХ наблюдается у штаммов бактерий дикого типа, поскольку в них содержатся все структурные ПБК дезактивирующие энергию квантов света. Сравнивая между собой средние времена жизни ФХ, флуоресценции компонентов фотосинтетических антенн можно предположить, что фотохимическое тушение происходит с большей эффективностью, чем нефотохимическое, поскольку среднее время жизни флуоресценции у мутантов лишённых ФС1 и ФС2 больше, чем у мутанта без каротин белка и штамма дикого типа. Следует отметить, что все молекулярные структуры содержащие каротиноиды (ФС1, ФС2, ОСР), способствуют более эффективному тушению ФХ.

Исходя, из результатов исследования времен жизни флуоресценции у мутантов  $\Delta OCP$ ,  $\Delta PSI/\Delta PSII$  и дикого типа, можно заключить, что: наиболее эффективное тушение флуоресценции имеет место в присутствии всех ПБК, которые составляют фото- и нефотохимическое тушение флуоресценции в ФСА; фотохимическое тушение флуоресценции протекает с большей эффективностью, чем нефотохимическое.

В связи с тем, что мутанты и дикий тип отличаются по наличию структурных компонентов ФСА, содержащих разные каротиноиды, важно было установить, связаны ли процессы изменения конформации каротиноидов, и изменения среднего времени жизни флуоресценции хлорофилла (рис. 3.12-3.13, табл. 3.4).

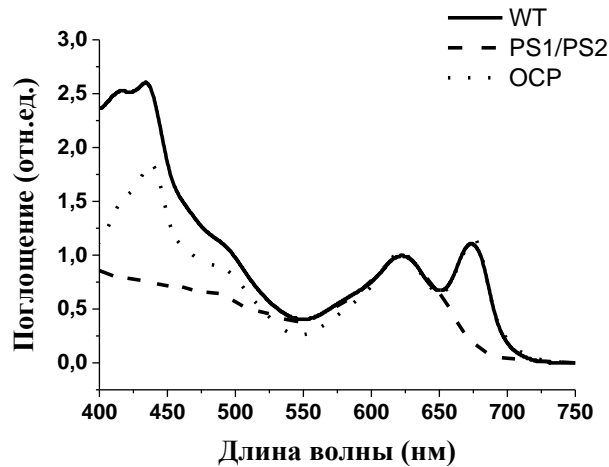


Рисунок 3.12 Спектры поглощения дикого типа (*WT*) и мутантов,  $\Delta PSI/\Delta PSII$  и  $\Delta OCP$ , нормированных на максимум поглощения ФСБ (630 нм) и приведенных к нулю при 750 нм.

Таблица № 3.4 Поглощение клеток дикого типа *Synechocystis* PCC 6803, мутантов  $\Delta PSI/\Delta PSII$  и *OCP* (см. рис. 3.12), рассчитанное как площадь под соответствующими спектрами в диапазоне 420-530 нм (\*  $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

Название образца	<i>WT</i>	$\Delta PSI/\Delta PSII$	$\Delta OCP$
Площадь под спектром поглощения, отн.ед.	159,6±6,7	70,2±2,7*	116,9±4,8*
в % от <i>WT</i>	100±4,3	44,0±3,8*	72,9±4,1*

Установлено, (рис. 3.12) что в области поглощения каротиноидов 420-530 нм у мутантов наблюдается снижение коэффициента светопоглощения на 56,0% и на 27,1% для мутантов  $\Delta PSI/\Delta PSII$  и  $\Delta OCP$  соответственно, относительно дикого типа. Вероятно, что у мутантов снижены концентрации каротиноидов.

Наряду с количественными изменениями, вероятно, происходят и качественные изменения молекулярной структуры каротиноидов.

Согласно данным РКР спектроскопии установлено, что при адаптации мутантов и дикого типа к свету высокой интенсивности в течение 20 минут (~ 1200 Лк) наблюдаются конформационные изменения в молекулах, что

проявляется в уменьшении соотношения амплитуд полос  $I_{1518}/I_{1156}$  спектра РКР на 32,5% и 47,5% соответственно (рис. 3.13).

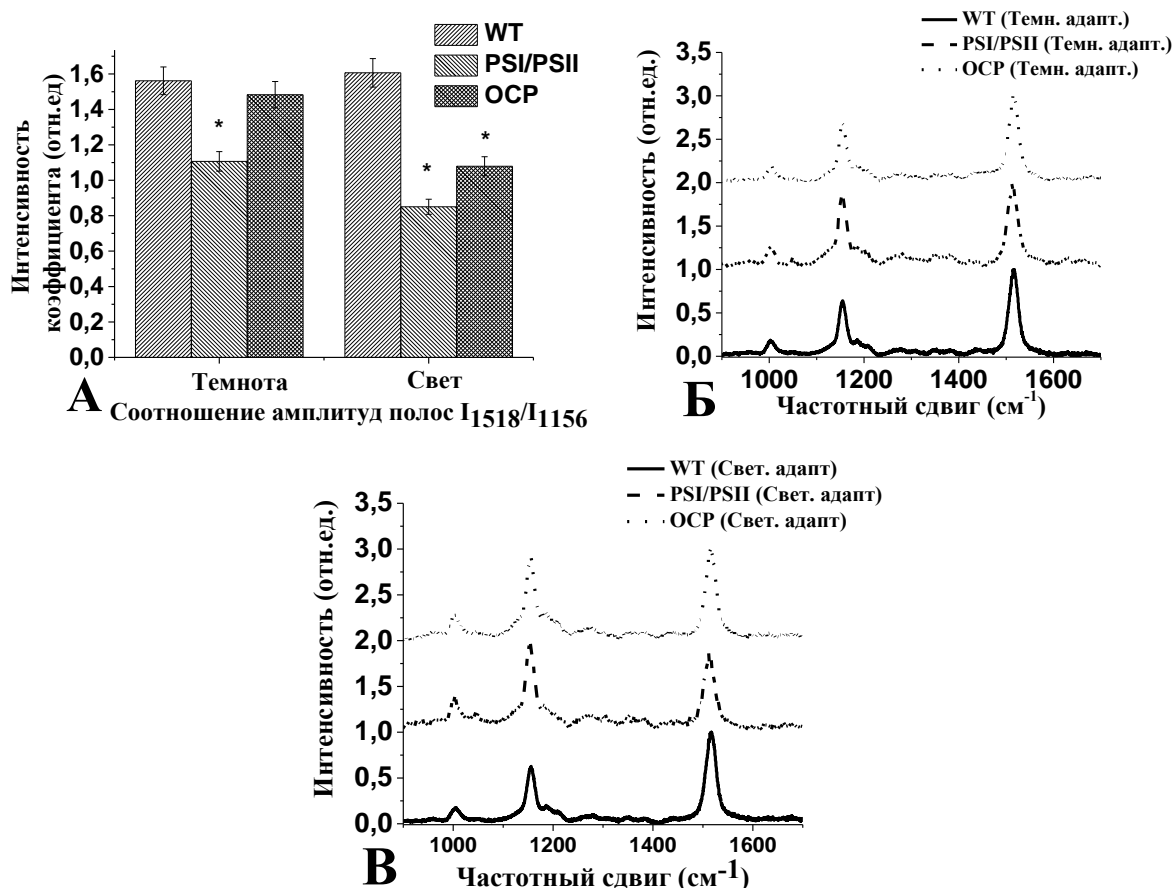


Рисунок 3.13 (А) соотношение амплитуды полос  $1518\text{см}^{-1}$  и  $1156\text{см}^{-1}$  спектра РКР каротиноидов у дикого типа (*WT*) и мутантов ( $\Delta OCP$ ) и ( $\Delta PSI/\Delta PSII$ ) при адаптации к свету высокой интенсивности; спектры РКР дикого типа и мутантов  $\Delta PSI/\Delta PSII$ ,  $\Delta OCP$  адаптированных к темноте (Б) и к свету (Г) (\*  $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

Отметим, что у дикого типа подобных изменений нами не обнаружено. Поскольку, у мутанта  $\Delta PSI/\Delta PSII$  отсутствует каротиноид-белковые комплексы – ФС1 и ФС2, а у мутанта  $\Delta OCP$  отсутствует OCP, то соотношение полос  $I_{1518}/I_{1156}$  снижается, что вероятно обусловлено уменьшением степени делокализации  $\pi$ - электронов в молекулах каротиноидов, находящихся в ПБК и/или мембранах. Вероятно, данные мутанты лишены белков, с которыми связаны каротиноиды (в случае мутанта  $\Delta PSI/\Delta PSII$  это ФС1 и ФС2, а в случае мутанта  $\Delta OCP$  – OCP).

Итак, на диком типе и мутантах  $\Delta PSI/\Delta PSII$ ,  $\Delta OCP$  цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*, установлено, что с увеличением времени жизни флуоресценции хлорофилла, уменьшается степень делокализации  $\pi$ -электронов в конъюгированной цепи каротиноидов.

### **3.1.3 Изучение действия температуры на конформацию каротиноидов при изменении насыщенности жирных кислот фотосинтетических мембран цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803***

Известно, что температура влияет на физико-химические свойства биологических мембран и их компонентом, следовательно, и на функции, которые с ней связаны (Sheng J. *et al.*, 2011). Для нормального функционирования мембрана должна находиться в жидкокристаллическом состоянии. Поэтому во всех биологических системах при понижении температуры окружающей среды наблюдается адаптационное изменение химического состава мембран, обеспечивающее понижение температуры фазового перехода (Wada H. *et al.*, 1990). Температура фазового перехода понижается при увеличении числа ненасыщенных связей в жирно-кислотных хвостах. (рис.3.14).

По сравнению с другими биологическими мембранами, тилакоидная мембрана является одной из наиболее жидких, поскольку она содержит большое количество белка и МГДГ. Функции этого необычного липида с высокой степенью ненасыщенности его жирнокислотных остатков, заключается в обеспечении жидкой среды, для облегчения диффузионных процессов фотосинтетического переноса электронов, возможно также и для облегчения оптимальной упаковки больших белков в пределах, естественной наблюдаемой структуры бислоя. (Gounaris K. *et al.*, 1983). В фотосинтетических мембранах содержится относительно большая доля полиненасыщенных жирных кислот, которые могут сохранить нативные свойства мембраны при действии низкотемпературного стресса путем понижения температуры точки фазового перехода тилакоидной мембраны из

жидкокристаллического состояния в состояние геля (в состоянии при котором могут нарушаться липид-белковые взаимодействия, ограничивается подвижность белковых комплексов, затрудняется электронный транспорт, что, в конечном счете, может привести к деградации белков ФСА). Тем не менее, их присутствие является невыгодным при высокой температуре, поскольку при воздействии высоких температур на мембрану, происходит «разжижение» липидного бислоя, что приводит к нарушению липид-липидных и липид-белковых взаимодействий, таким образом, увеличивается проницаемость всей мембраны.

Защита от фотоингибирования при низких температурах требует высокого уровня полиненасыщенных липидов, чтобы поддерживать состояние мембраны в жидко-кристаллическом состоянии. С повышением уровня полиненасыщенных жирных кислот микровязкость мембраны уменьшается. Важную роль в поддержании фазового состояния мембраны играют биполярные каротиноиды – ксантофиллы. Они могут предотвратить чрезмерное разжижение путем встраивания в мембрану, расположением своих полярных групп по обеим полярным сторонам липидного бислоя и образования т.н. «каркаса» мембраны. Итак, противоположные эффекты разжижения мембраны и повышения её микровязкости требуют тонко настроенной координации между различными уровнями полиненасыщенных ЖК липидов и ксантофиллов (Domonkos I. *et al.*, 2013).

Понижение температуры приводит к увеличению вязкости (жесткости) мембраны, т.е. ЖК-ные остатки ацильных цепей плотнее прилегают друг к другу (рис. 3.14). Это непременно может повлечь за собой изменения в работе ПБК и, следовательно, способствовать изменению конформации каротиноидов, локализованных в мембранах и ассоциированных с белками, что в свою очередь, гипотетически, может приводить к перераспределению пигмента как внутри, так и между разными пулами.

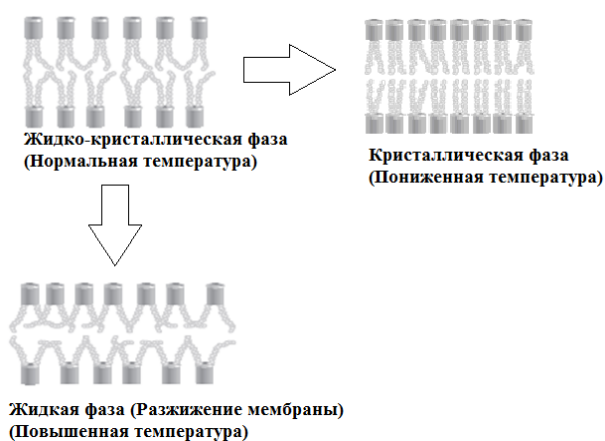


Рисунок 3.14 Влияние температуры на состояние биологической мембраны.

Для изучения возможного изменения конформации каротиноидов были изучены клетки цианобактерий *Synechocystis sp. PCC6803* (далее *Synechocystis*) дикого типа и мутанта  $desA^-/desD^-$  (далее мутант). У данного мутанта нокаутированы гены десатураз А и D жирных кислот. Эти гены несут информацию о ферментах (десатуразах), которые осуществляют десатурацию жирнокислотных хвостов липидов при 6, 12 и 15 атомах углерода (рис.3.15), в связи с чем, мутант практически полностью утратил способность к регуляции жирнокислотного состава мембран, посредством десатурации ЖК (Mironov K.S. *et al.*, 2012).

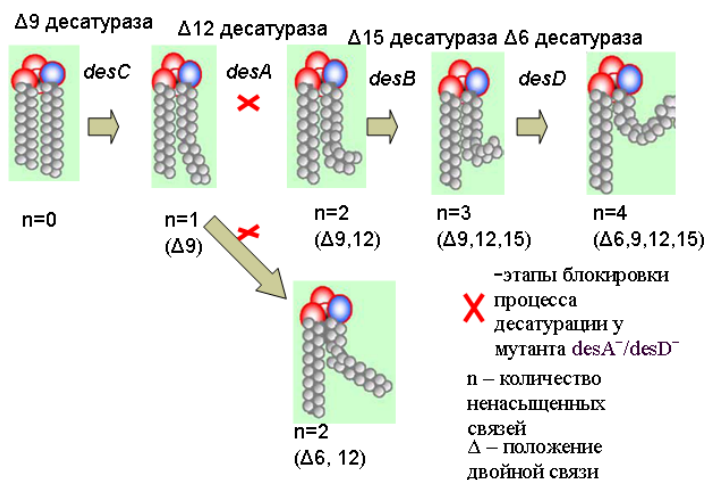


Рисунок 3.15 Механизм десатурации жирнокислотных цепей у дикого типа *Synechocystis* (Los D.A. *et al.*, 2004)



В серии экспериментов было изучено изменение конформации каротиноидов клеток дикого типа и мутанта цианобактерии *Synechocystis*, выращенных при нормальных температурах (33°C) и в условиях холодого шока (25°C) при помощи метода спектроскопии РКР. Исследование проводилось при комнатной температуре (25°C).

Установлено, что при нормальных условиях культивирования (33°C) не было обнаружено достоверных различий в полуширине спектральных полос (рис.3.16) их положении (смещении) (рис. 3.17) и соотношении полос (рис. 3.18, табл. 3.5), между диким типом и мутантом цианобактерий *Synechocystis*. Также показано, что при культивации клеток мутанта по A/D десатуразам при нормальных условиях (33°C) и при холодом стрессе (25°C) не выявлено достоверных различий в положении основных полос спектра, их полуширины и соотношения интенсивностей отдельных полос (рис. 3.20).

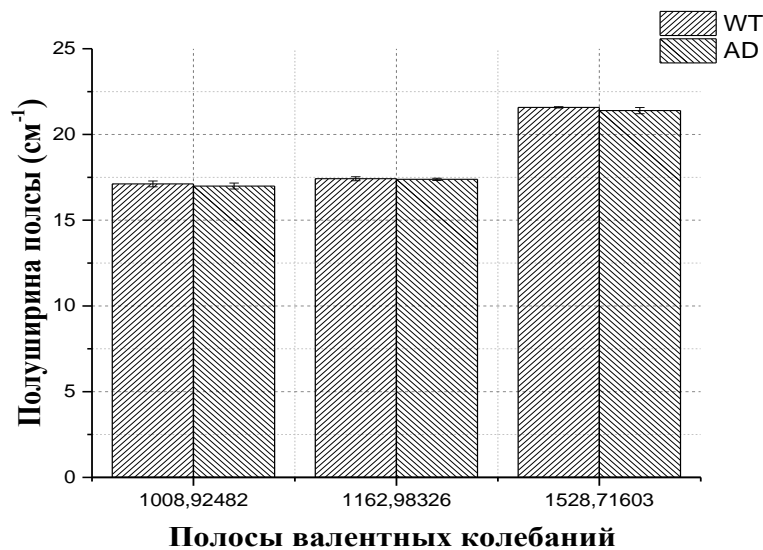


Рисунок 3.16 Полуширина полос в спектрах РКР мутанта и дикого типа цианобактерий *Synechocystis*, выращенных в условиях нормальных температур (33°C)

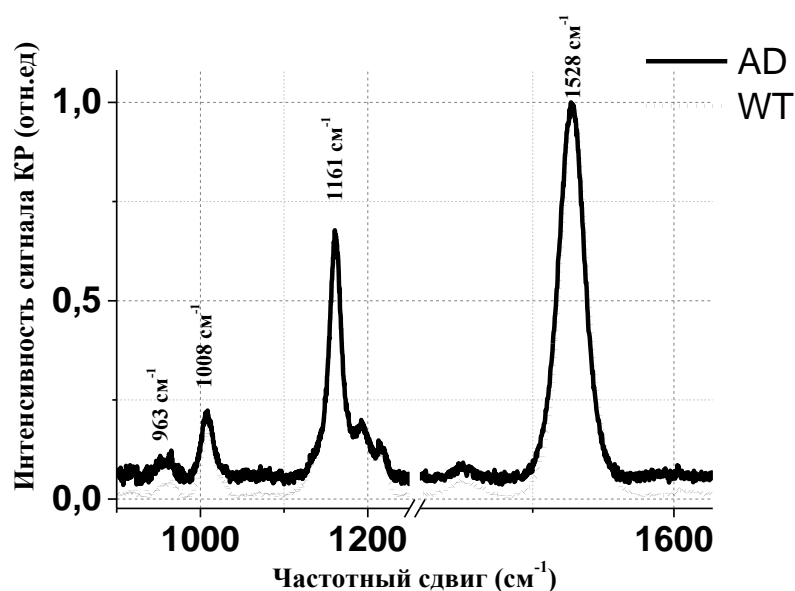


Рисунок 3.17 Спектры РКР каротиноидов мутанта и дикого типа цианобактерий *Synechocystis*, выращенных в условиях нормальных температур (33°C).

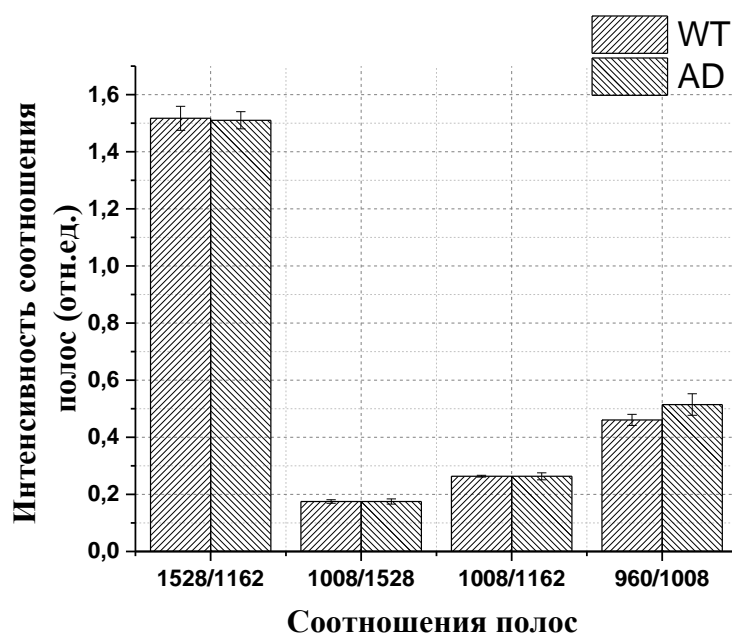


Рисунок 3.18 Соотношения амплитуд анализируемых полос в спектрах РКР, каротиноидов мутанта и дикого типа цианобактерий *Synechocystis*, выращенных в при нормальных температурах (33°C).

Таблица 3.5 Амплитуды полос спектра РКР, каротиноидов мутанта и дикого типа цианобактерий *Synechocystis*, выращенных в условиях нормальных температур (33°C) (\*p<0,05 по t-критерию Стьюдента)

Полосы спектра( см <sup>-1</sup> )	Амплитуда полос (отн.ед.)
	Дикий тип
966	0,0605±0,0027
1009	0,1329±0,0079
1162	0,5026±0,0262
1529	0,7548±0,0223
	Мутант
966	0,022±0,004*
1009	0,043±0,005*
1162	0,1723±0,0243*
1529	0,2599±0,0365*

В тилакодных мембранах мутанта и дикого типа могут содержаться участки с разной гидрофобностью и разной плотностью упаковки ПБК и липидов. Полярная метка может прикрепляться к белкам, а также она может проникать либо внутрь липидного слоя, либо оставаться на поверхности (прикрепляться с низкой степенью аффинности к мембране), что зависит как от плотности упаковки липидной мембраны, так и от степени её гидрофобности. Также метка может образовывать мицеллы в растворе мембран (С4), находится в свободном виде (С5) следует также отметить, что во всех вышеперечисленных случаях подвижность спин-метки в магнитном поле будет различной.

Данные спектроскопии РКР согласуются с результатами экспериментов ЭПР с применением зонда 16-доксил стеариновой кислоты фотосинтетических мембран дикого типа и мутанта, выращенных в условиях нормальных температур (33°C).

Установлено, что (рис. 3.19) концентрация метки связанной с высокой (С1) и низкой (С2) степенью аффинности с мембраной (С1+С2) составляют 35

и 36,5% от общего количества спин-метки для дикого типа и мутанта соответственно.

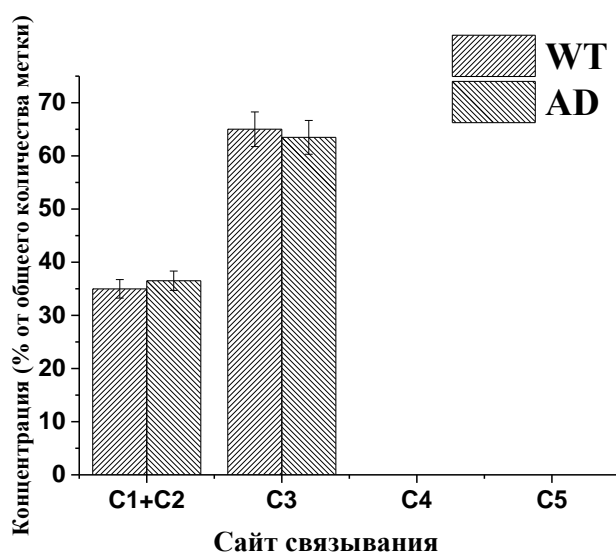


Рисунок 3.19 Концентрации спин-зонда, в высоко- и низкоаффинных сайтах связывания с фотосинтетическими мембранами (C1+C2), свободного спин-зонда (C3), количество спин-зонда, образовавшего мицеллы (C4) и концентрации свободных ЖК (C5) (в % от общего количества спин-метки) цианобактерии *Synechocystis* дикого типа (WT) и мутанта (AD) при концентрации спин-зонда 0,75 мМоль.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что фотосинтетические мембраны цианобактерий дикого типа и мутанта, выращенные при нормальных температурах культивирования, обладают одинаковым распределением гидрофобных участков в мембране.

В следующей серии экспериментов исследовали изменения в спектра РКР дикого типа, выращенного при 33°C и 25°C. Мы предполагали, что анализ этих данных позволит зафиксировать изменения в молекулярной структуре каротиноидов (рис.3.20) .

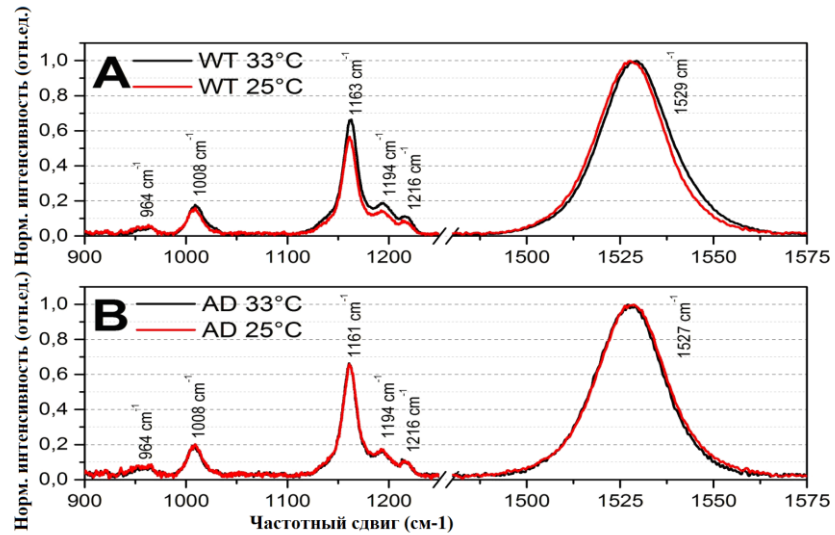


Рисунок 3.20 Спектры РКР каротиноидов дикого типа (*WT*) и мутанта (*AD*) цианобактерий *Synechocystis*, выращенных в условиях нормальных температур (33°C) и в условиях холодного шока (25°C).

Установлено, что в условиях низких температур произошло увеличение амплитуды полосы около 1526 $\text{cm}^{-1}$  у дикого типа на 16%, (рис. 3.21 А) и достоверное изменение её полуширины на 0,5  $\text{cm}^{-1}$  (рис. 3.21Б), Также наблюдается сдвиг той же полосы в сторону меньших частот (рис. 3.22 А)

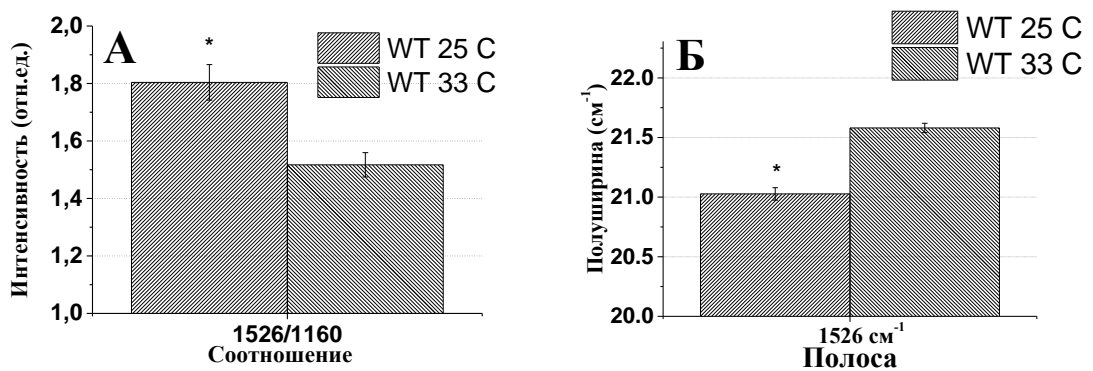


Рисунок 3.21 Изменение соотношений интенсивностей полос  $I_{1526}/I_{1160}$  (А), и полуширины полосы 1526  $\text{cm}^{-1}$  (В), у дикого типа *Synechocystis sp.* при действии низких температур (\* $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

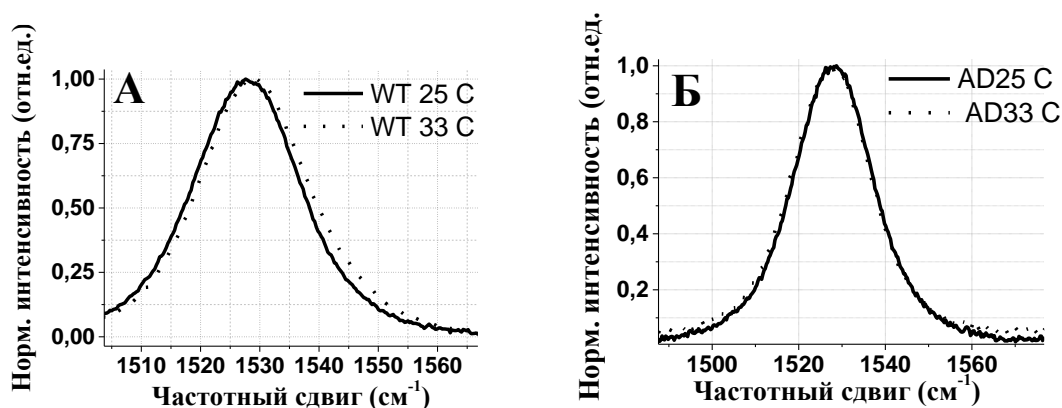


Рисунок 3.22 Изменение положения полос спектра РКР  $\sim 1526\text{cm}^{-1}$  у дикого типа (А) *Synechocystis sp. PCC6803* при воздействии низких температур и отсутствии таковых у мутанта *desA*<sup>-</sup>/*desD*<sup>-</sup> (Б).

В связи с тем, что мы достоверно не можем определить в каком из пулов каротиноидов (белковом/мембранном/свободном) происходят подобные изменения, мы попытались выявить общий механизм развития изменения конформации каротиноидов при воздействии низких температур. На наш взгляд эти различия могут объясняться степени делокализации  $\pi$ -электронов в молекулах каротиноидов, обусловленной возможным изменением их жирнокислотного и белкового микроокружения, при воздействии пониженных температур.

Согласно сопоставлению интенсивностей полос  $I_{960}/I_{1008}$  у дикого типа при адаптации к пониженным температурам, происходит увеличение амплитуды полосы  $960\text{ cm}^{-1}$  на 28%, (в сравнении с нормальными температурами роста) характеризующей связь пигмента с белком (рис. 3.23).

Вероятно, в условиях действия низких температур может происходить изменение количества и прочно-ассоциированных каротиноид-белковых комплексов (в т.ч. находящихся в липидной мембране). В литературе описаны подобные случаи увеличения амплитуды полосы около  $960\text{cm}^{-1}$  (Frank H.A., 2004. P. 189-201); это объясняется искажением молекулы каротиноида около С-С связей, которое индуцируется влиянием белкового микроокружения. Подобный эффект сопровождается увеличением

амплитуды полосы  $960\text{ см}^{-1}$  (в нашем случае увеличение соотношения  $I_{960}/I_{1008}$ ) у мутанта подобных достоверных изменений не наблюдается.

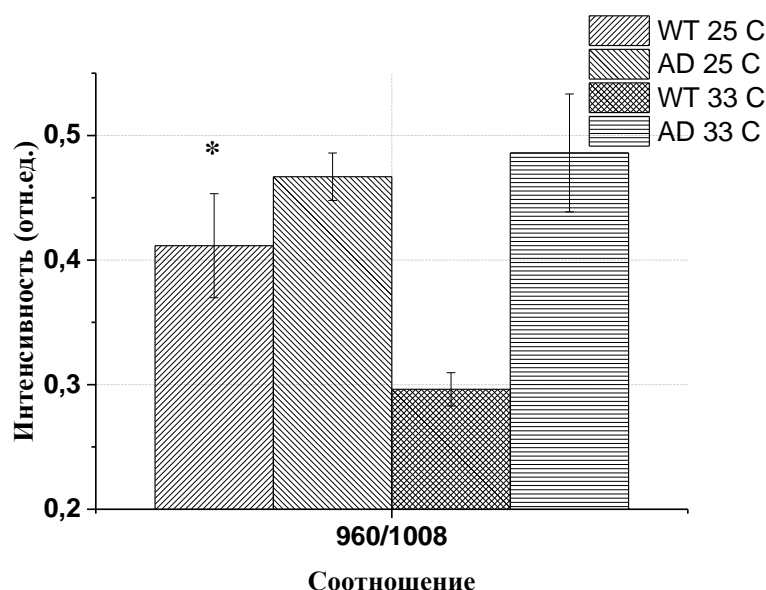


Рисунок 3.23 Изменение соотношения амплитуд полос  $I_{960}/I_{1008}$  у дикого типа *Synechocystis* и мутанта *desA*<sup>-</sup>/*desD*<sup>-</sup> при адаптации к пониженным температурам культивирования (\* $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

Предполагается, что при адаптации цианобактерий дикого типа к низким температурам культивирования происходит либо увеличение количества каротинод-белковых комплексов, либо увеличение прочности связи между молекулой каротиноида и белком. Это можно объяснить тем, что при низкотемпературном стрессе происходит образование большого количества стресс-белков, которые могут иметь в своем составе и каротиноиды. Так, например, в тилакоидных мембранах имеются низкомолекулярные белки из семейства ELIPs (Early Light Induced Proteins), которые при стрессовых условиях обнаруживают способность ассоциироваться с ксантофиллами. Ассоциация каротиноидов с этим классом низкомолекулярных белков в тилакоидах растений и водорослей коррелирует с увеличением уровня нефотохимического тушения флуоресценции

хлорофилла (Aro E.M., 2006. P 495-502). Вероятно, возможная ассоциация белка с пигментом в клетках цианобактерий приводит к увеличению тепловой диссипации энергии, что является весьма актуальным в условиях низкотемпературного стресса.

Отсутствие характерных изменений в спектрах РКР у мутантов дефектных по генам *desA*<sup>-</sup> /*desD*<sup>-</sup> при культивации в условиях пониженных температур, свидетельствует о важной роли изменении насыщенности жирных кислот, позволяющих клеткам цианобактерий регулировать микровязкость мембран и состояние ПБК и эффективно адаптироваться к пониженным температурам.

### **3.2 Влияние экстарклеточного pH на конформацию каротиноидов в водоросли *C. rivularis***

В серии экспериментов были изучены и проанализированы спектры поглощения, флуоресценции, РКР и ИК водоросли *Cladophora rivularis* L. (далее *C. rivularis*) и определены концентрации хлорофиллов и каротиноидов при культивировании в течение 7 суток при разных значениях pH (5,0, 7,0, 8,0, 9,0) среды.

В ходе проведения экспериментов было установлено, что величина поглощения и флуоресценция хлорофилла водоросли *C. rivularis* зависит от величины pH среды культивирования (рис.3.24 А-Б).



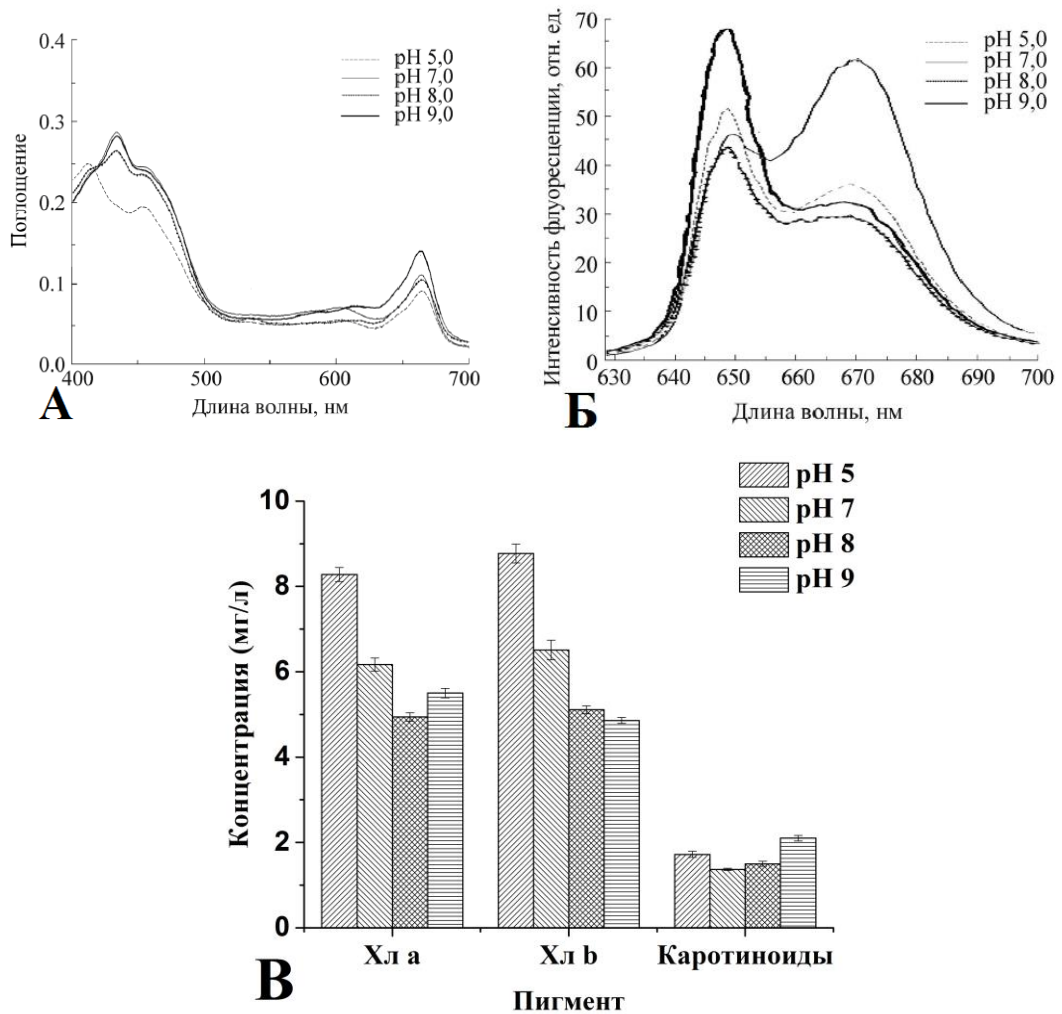


Рисунок 3.24 Спектры поглощения (А), флуоресценции (Б) и содержания пигментов (В) при различных рН среды культивирования водоросли *C.rivularis*.

В спектрах поглощения наблюдаются характерные полосы каротиноидов (410-460 нм) и хлорофиллов *a* и *b* (640-660 нм). Установлено, что при культивировании в среде с рН 8, наблюдается максимальный рост водоросли и, при этом, рН среды еще больше смещается в щелочную сторону (8,5 – 8,7). Отметим, что при увеличении рН (от рН 5 до рН 8), в первую очередь, снижается содержание хлорофилла *b*, затем хлорофилла *a*, и в меньшей степени каротиноидов, содержание которых существенно возрастает при увеличении с рН 8 до рН 9 (рис.3.24В).

С помощью микроскопии нами было зарегистрировано распределение флуоресценции хлорофилла в клетке кладофоры (рис.3.25). Установлено, что

распределение сигнала флуоресценции пигментов в клетке кладофоры гетерогенное, максимальная флуоресценция выявлена, как правило, по периметру клетки водоросли и, вероятно, обусловлена гетерогенным распределением хлоропластов.

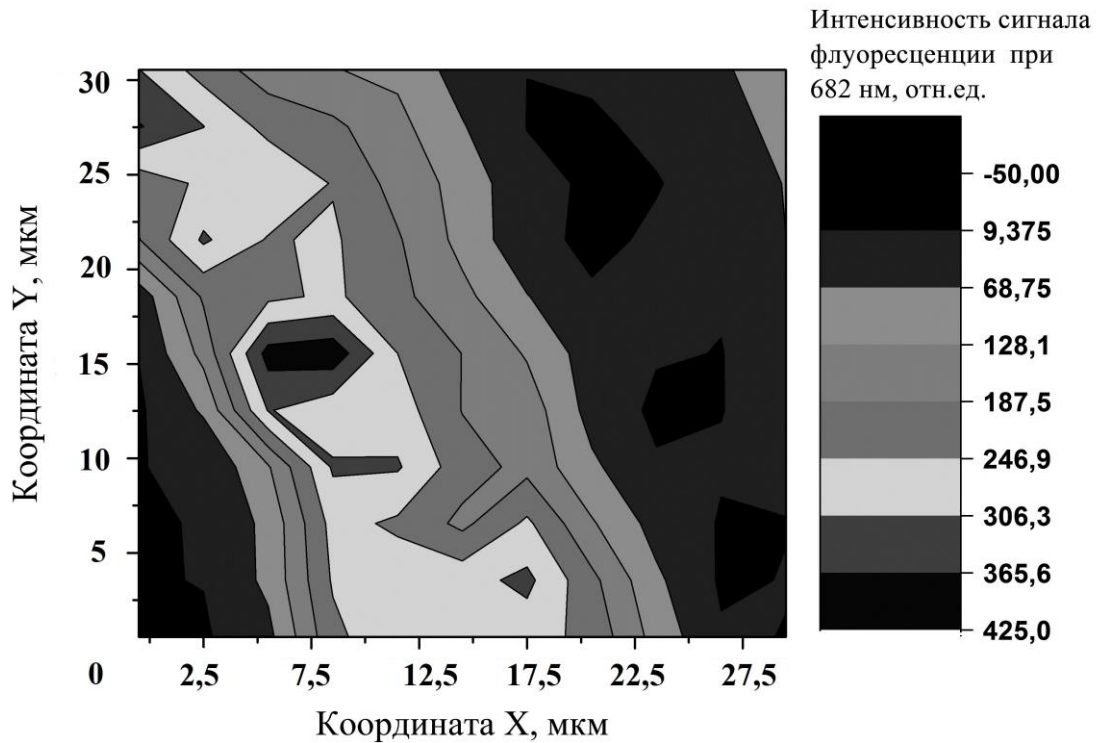


Рисунок 3.25 Распределение величины интенсивности флуоресценции хлорофилла при 682 нм в клетке водоросли *C.rivularis*.

В следующей серии экспериментов с помощью РКР- и ИК-спектроскопии исследовали изменения конформации молекулы каротиноидов водоросли *C.rivularis* при культивировании в средах с различным рН (рис. 3.26 – 3.27). В спектре РКР водорослей *Cladophora* в области  $900-1600\text{ см}^{-1}$  обнаружены полосы, характерные для колебаний некоторых связей молекулы каротиноидов (Рис.3.26А).

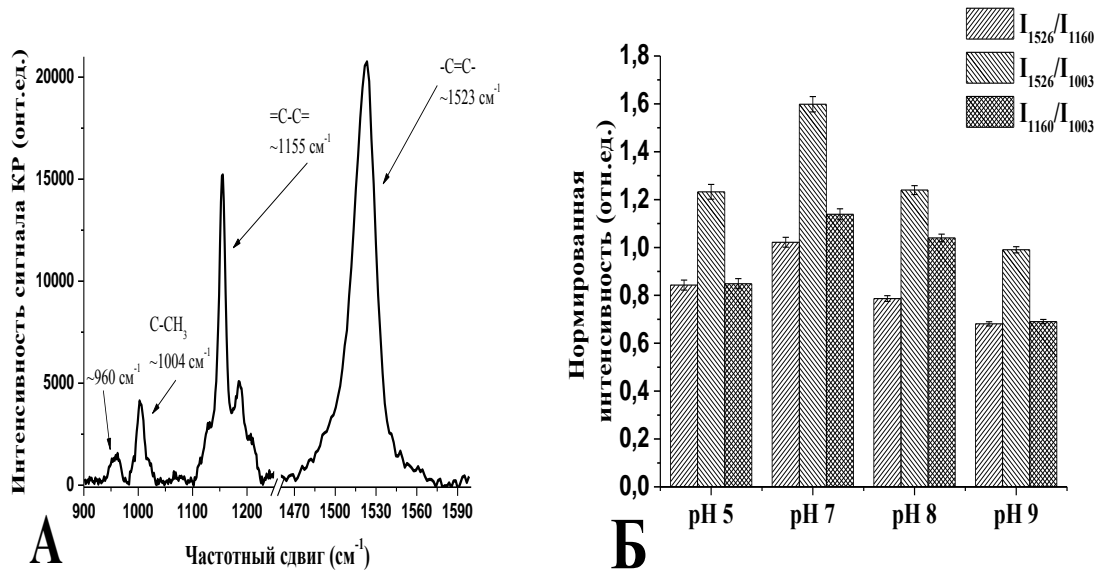


Рисунок 3.26 Спектр РКР (А) и изменения соотношений амплитуд полос РКР- спектра каротиноидов (Б) при различном рН культивирования водоросли *C. rivularis*.

Установлено, что в зависимости от рН среды культивирования водоросли меняется не только содержание, но и конформация каротиноидов (Рис.3.26Б): максимальный вклад полосы  $1526\text{cm}^{-1}$  наблюдается при рН 7 (исходя из соотношений амплитуды полос  $I_{1526}/I_{1160}$  и  $I_{1526}/I_{1003}$ ). Вероятно, при культивировании водоросли меняется либо состав каротиноидов, либо конформация молекулы: возрастает вклад молекул каротиноидов, имеющих большее количество сопряженных двойных С=С связей (Piouia C. *et al.*, 2011) или микроокружение пигментов становится более плотным (Максимов Г. В. и др., 1996). Максимальный вклад полосы  $1160\text{cm}^{-1}$  (С-С связей в сочетании с  $\text{C}=\text{C}$ -,  $I_{1160}/I_{1003}$ ) выявлен при нейтральных значениях рН, и достоверно снижается при закислении или защелачивании среды.

Для сопоставления результатов двух методов, дополнительно исследовали изменения в ИК спектрах (в диапазоне  $400\text{--}4000\text{cm}^{-1}$ ) образцов из водоросли в зависимости от рН (рис.3.27). Установлено, что ИК-спектры водоросли характеризуются следующими максимумами:  $3480\text{cm}^{-1}$ ;  $2940\text{cm}^{-1}$ ;  $1650\text{cm}^{-1}$ ;  $1530\text{cm}^{-1}$ ,  $1440\text{cm}^{-1}$ ,  $1260\text{cm}^{-1}$ ,  $1050\text{cm}^{-1}$ ,  $660\text{cm}^{-1}$ . (рис.3.27).

Известно, что наличие полосы ИК- спектра в области  $3480\text{ см}^{-1}$  может свидетельствовать о наличии либо NH или OH, а также O–H-валентных колебаний (водородная связь - OH-группы). Полосы  $1651\text{--}1530\text{ см}^{-1}$  характеризуют либо колебания связей полосы амид 1 и амид 2 (валентные колебания C=O в первичных, вторичных и третичных амидах  $1651\text{ см}^{-1}$ , частоты деформационных колебаний NH и колебаний C-N во вторичных амидах –  $1541\text{ см}^{-1}$ ) для молекулы белков, пептидов и свободных аминокислот, либо O–H – групп кристаллической воды целлюлозы. Полоса  $1050\text{ см}^{-1}$  характеризует ароматические C–H плоскостные деформационные колебания (Браун А. и др., 1992).

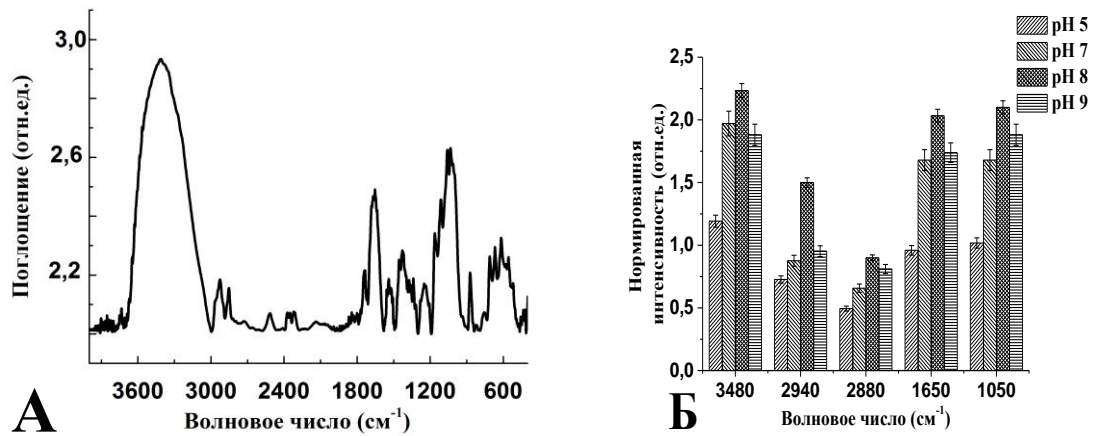


Рисунок 3.27 (А) - характерный ИК –спектр (при рН8); (Б) изменения амплитуды полос ИК- спектра при различных рН культивирования водоросли *C. rivularis*

Полосы ИК- спектра водоросли могут соответствовать как колебаниям определенных связей в молекуле каротиноидов, так и изменениям состояния других молекул в клетке. Так при увеличении рН среды культивирования водоросли с 7,0 до 9,0: амплитуда полосы ИК- спектра -  $3480\text{ см}^{-1}$  увеличивается, что может свидетельствовать об увеличении вклада O–H-валентных колебаний (возможно и в структуре каротиноидов) либо увеличению доли свободной воды в клетке. Действительно, при этом возрастает амплитуда полосы  $1605\text{--}1593\text{ см}^{-1}$  – что, вероятно,

свидетельствует об увеличении либо вклада колебания связей в амидных плоскостях полосы амидов, либо кристаллической воды в целлюлозной оболочке клетки.

Вероятно, при нормальном функционировании водоросли (увеличении рН с 8,0 до 9,0 при длительном культивировании) содержание каротиноидов увеличивается, а конформация меняется – снижается вклад  $-C=C-$  связей полиеновой цепочки молекулы каротиноида: соотношение амплитуд полос  $I_{1526}/I_{1160}$  и  $I_{1526}/I_{1003}$  (РКР-спектроскопия).

### **3.3 Изучение флуоресценции хлорофилла и физико-химических характеристик молекул каротиноидов в клетках высших растений**

**Введение.** Изучение состояния пигментов на клеточном уровне имеет важное значение в связи с тем, что в изменяющихся условиях среды происходят изменения в геноме фотосинтетических организмов, которые могут приводить к формированию новых механизмов взаимодействия пигментов между собой и другими структурами клетки. Например, по мере усложнения организации фотосинтетических организмов от предков фототрофов и примитивных цианей до современных голосеменных и высших растений, происходило выделение фотозащитных, экранирующих пигментов во внеклеточную среду (в т.ч. и каротиноидов) до накопления этих же (либо модифицированных) пигментов в цитоплазме и вакуолях, а также и внутри самих хлоропластов в виде пластоглобул (Соловченко А.Е. и др., 2010). Все эти модификации были индуцированы, генетическими изменениями, которые в свою очередь были обусловлены изменяющимися условиями среды, к которым фотосинтетические организмы эффективно приспособились.

В связи с этим исследовали связь между изменениями генотипа растений, молекулярными изменениями пигментов и возможными липид-белковыми и липид-липидными взаимодействиями в листьях гибридов, инбредных линий кукурузы, а также нескольких сортов пшеницы.

### 3.3.1 Исследование температурной зависимости флуоресценции хлорофилла в листьях инбредных линий кукурузы (*Zea máys L.*) и пшеницы (*Triticum aestivum L.*)

В ходе исследования были изучены три инбредных линии кукурузы (*Zea máys L.*) со стоячими верхними листьями и чувствительные к холоду, ZPPL16, ZPPL218 и ZPPL62, из коллекции Научно-исследовательского института кукурузы, Земун Поле. Инбредная линия ZPPL 16 была получена из BSSS-популяции и относится к группе созревания FAO 700. Инбредная линия ZPPL218 принадлежит к гетеротической группе Ланкастера и группе созревания FAO 650. Инбредная линия ZPPL62 представляет собой гетеротическую группу BSSS и принадлежит к группе созревания FAO 350.

В данной серии экспериментов было проведено исследование выбранных инбредных линий и гибридов кукурузы, с прямостоячими верхними листьями. Величину угла между надпочаточным листом и стеблем растения определяли с помощью специально сконструированного угломера на базе Института кукурузы «Земун поле». Площадь листа была измерена с использованием портативного измерителя площади (модель 3000 LI-A, LICOR, Lincoln, NE). Измерения угла между надпочаточными листьями и стеблями и площади листа были проведены на 218 растений для каждой инбредной линии (Radenovic S.N. *et al.*, 2004).

Температурная зависимость ЗФ хлорофилла листьев была использована для идентификации критических температур и энергии активации возникновения ЗФ хлорофилла, то есть такую энергию, при которой был бы возможен переход  $Q_A^- \rightarrow P680^*$ .

В лаборатории, растения с продольно срезанными междуузлиями были помещены в дистиллированную воду. Перед измерениями ЗФ, растения находились в темноте на протяжении двух часов (Radenovic S.N. *et al.*, 1994; Rubin A.V. *et al.*, 1988.). В экспериментах изучались 268 растений каждой инбредной линии.

Первая серия экспериментов включала измерения угла, площади листьев (табл. 3.6; рис. 3.28).

Таблица 3.6 Параметры ЗФ хлорофилла и морфологии листа

Инбредная линия	Температура, °С	Еа, кДж/моль	Угол пазушного листа, °	Площадь пазушного листа, $\times 10^3 \text{см}^2$
ZPPL 16	53	51,9	18,3	3,63
ZPPL218	48-49	33,2	22,1	3,91
ZPPL 62	46	99,2	20,3	3,30

Вторая серия экспериментов была посвящена изучению замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла *a*, связанной с функциональными изменениями в интактных пазушных листьях престижных инбредных линий кукурузы. Температурная зависимость ЗФ инбредных линий кукурузы представлена на рис. 3.28 и 3.29.

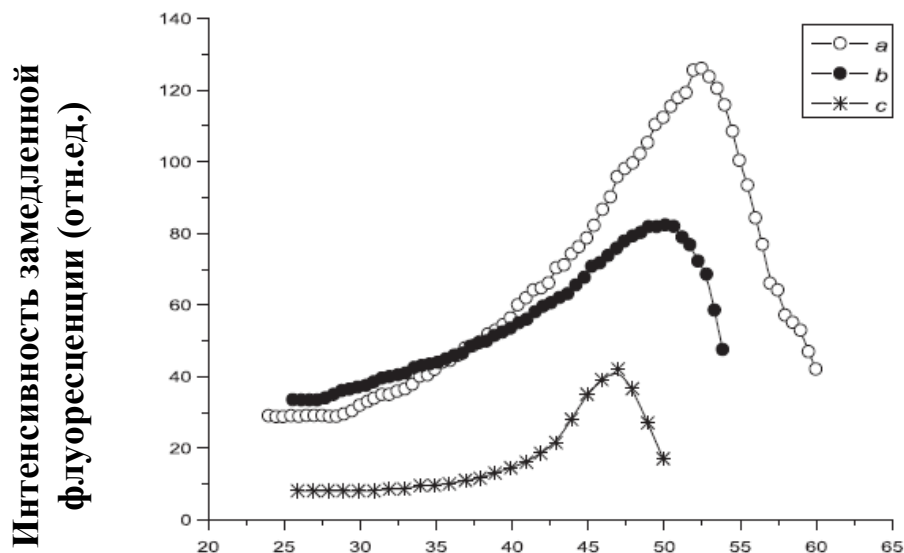


Рисунок 3.28 Температурная зависимость изменений интенсивности ЗФ интактного пазушного листа кукурузы инбредных линий ZPPL 16 (a), ZPPL 218 (b), ZPPL 62 (c)

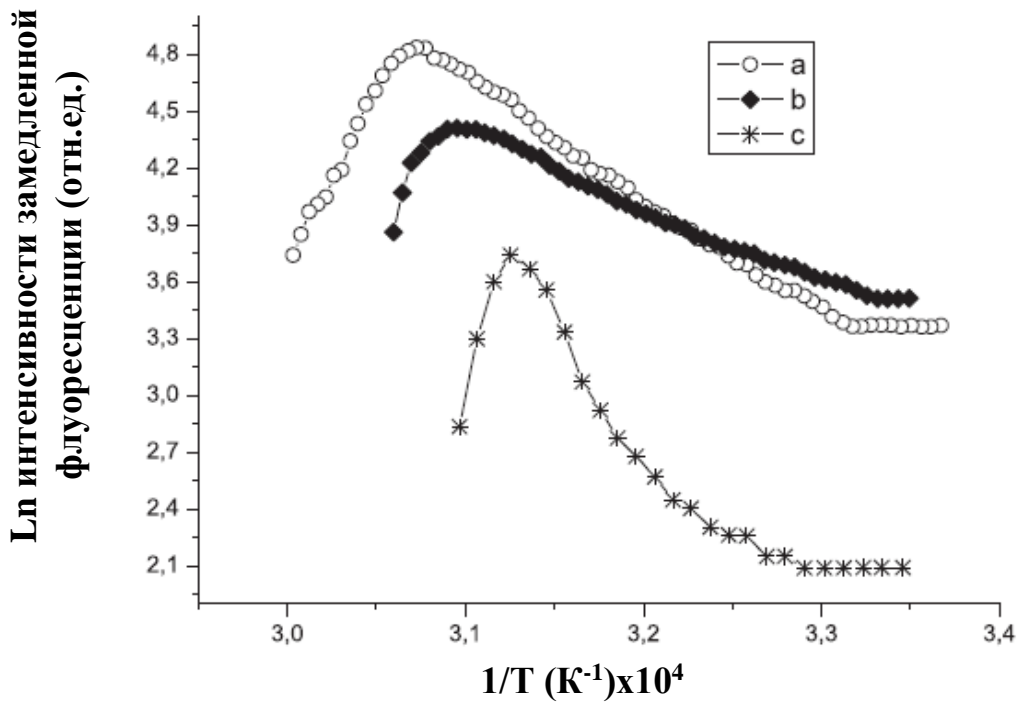


Рисунок 3.29 Температурная зависимость (в координатах Аррейниуса) изменений интенсивности ЗФ хлорофилла интактного пазушного листа инбредных линий ZPPL16 (a), ZPPL218 (b), ZPPL62 (c)

В ходе исследования было установлено, что температурная зависимость интенсивности ЗФ не монотонна и имеет характерный максимум (критическая температура) для каждого гибрида: для ZPPL62 является температура в 47°C, что значительно ниже, чем соответствующий максимум ZPPL16 при 52°C (рис. 3.27 а). Возможно, что температурная зависимость изменения интенсивности ЗФ хлорофилла пазушных листьев кукурузы инбредных линий является обязательным методом для диагностики генетически модифицированных растений (Radenovic C.N. *et al.*, 1985; Radosavljevic M. *et al.*, 2000). Температурные зависимости изменений ЗФ были проанализированы согласно критерию Аррениуса (рис. 3.29), который отображает логарифм кинетических констант ( $\ln(I)$ , ось ординат) нанесенных против обратной температуры ( $1/T$ , абсцисса). Критерий Аррениуса позволяет определить энергию активации ( $E_a$ ) одиночных скорость-лимитирующих, активируемых температурой процессов (рис. 3.28, табл. 3.6). Точка пересечения двух касательных прямых определяется



критической температурой, результатом чего являются значения  $E_a$ , в части включающей наклон и снижение тепловой кривой (рис. 3.28) объясняется значениями противоположных знаков, которые, вероятно, относятся к фазовым переходом тилакоидных мембранных липидов (Navaux M. *et al.*, 1983), что происходит при повышении температуры. Обусловленные подобными изменениями молекулы хинонов могут стать более реактивными, и тем самым получить дополнительную энергию, которая используется в процессе возникновения ЗФ.

Изменения в интенсивности ЗФ коррелируют с различными процессами, которые включают в себя наращивание электрического и трансмембранного градиента протонов (Wraight C.A. *et al.*, 1971), и зависят от наличия электронных акцепторов (Rubin A.B. *et al.*, 1988) и доноров (Mar T. *et al.*, 1975), а также на состояние кислород-выделяющего-комплекса (Zankel K.L., 1972).

В экспериментах, выполненных на кукурузе, была исследована температурная зависимость выхода замедленной флуоресценции хлорофилла в естественных условиях. В чувствительной к холоду кукурузе, было показано, что уровень ЗФ в стационарном состоянии демонстрировал максимум вблизи температуры, при которой тилакоидные мембранные липиды претерпевают фазовый переход, что было показано при помощи измерений на дифференциальном сканирующем калориметре. Было показано, что измерения интенсивности замедленной флуоресценции в естественных условиях могут являться быстрым и чувствительным методом для обнаружения фазовых переходов мембранных липидов в интактных листьях чувствительных к холоду видов растений (Navaux M. *et al.*, 1983).

В аналогичных исследованиях, с применением других методов, было четко обнаружено, что температура, при которой начинается разделение фаз в мембранных липидах, находится вблизи температуры 25°C. Это согласуется с данными Оно и Мурата (Оно Т. *et al.*, 1982), которые показали, что в *Anacystis nidulans* явления ЗФ тесно связаны с наступлением фазового

разделения липидов цитоплазматической мембраны, но не мембран тилакоидов. В холодоустойчивых растениях (например, пшеницы, сахарной свеклы и плющом), уровень ЗФ хлорофилла уменьшался монотонно с увеличением температуры и резкой модификации текучести мембран не наблюдалось.

В этом исследовании было показано, что существует положительная взаимосвязь между физическим состоянием мембранных липидов и интенсивностью замедленной флуоресценции хлорофилла.

В следующей серии экспериментов использовали два сорта пшеницы – «Эскада 70» и «Прохоровка». Контрольная группа растений (30 растениями) выращивались без изменения условий. Первую группу растений (30 растений), культивировали при температуре 4°C в течении 16 часов, вторую группу растений помещали в климатическую камеру SANYO MLR 351H с режимом температуры 43°C, относительной влажности 60 %, также на 16 часов. По истечении времени экспозиции проводились измерения. Затем первая и вторая группы растений помещались в условия, при которых выращивалась контрольная группа растений (20°C, относительная влажность 60%) на 8 часов. Растения помещали в описанные выше условия в течение трех дней и потом проводили исследование кинетики развития ФХ при воздействии повышенных и пониженных температур методом оптического имиджа (рис.3.30). Флуоресцентные изображение образцов впервые получали при помощи системы для флуоресценции XFO-12 в программе Living Image на базе системы визуализации Ivis Lumina II, время экспозиции составляло 60 секунд. Для работы использовался фильтр Cyt5.5 с возбуждением 640 нм и излучением 695–770 нм. В дальнейшем для анализа использовались суммарные значения флуоресценции хлорофилла с фрагментов листьев, помещенных в камеру для визуализации.

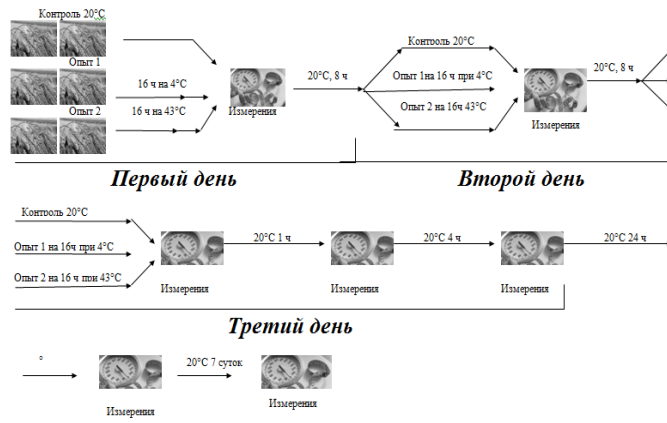


Рисунок 3.30 Схема эксперимента

В ходе исследования было установлено, что уровень флуоресценции листа вне зависимости от сорта увеличивается с первого по третий день воздействия повышенной и пониженной температур (рис. 3.31 –3.32).

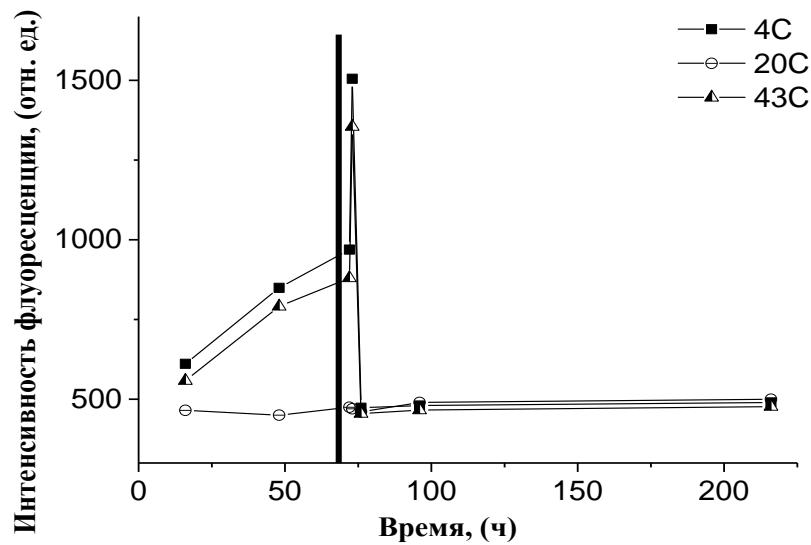


Рисунок 3.31 Кинетика изменения флуоресценции пшеницы сорта Эскада 70. Вертикальной линией указано окончание воздействия температуры

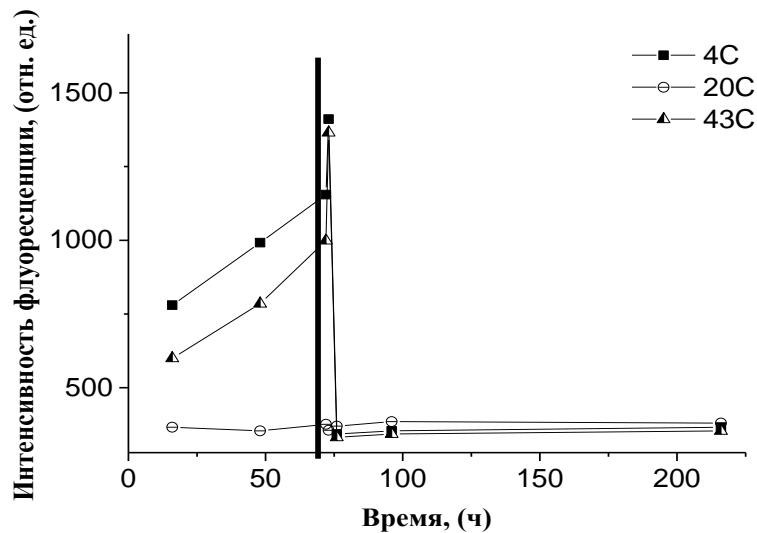


Рисунок 3.32 Кинетика изменения флуоресценции пшеницы сорта Прохоровка с течением времени. Вертикальной линией указано окончание воздействия температуры

У сорта Эскада 70 (рис. 3.33) уровень флуоресценции на первые сутки увеличивается на 31 и 20 %, на вторые на 89 и 76 %, на третьи (72–й час опыта) на 104 и 85 %, на третьи (73–й час опыта) на 220 и 188 % для растений подвергнутых воздействию температур 4°C и 43°C соответственно.

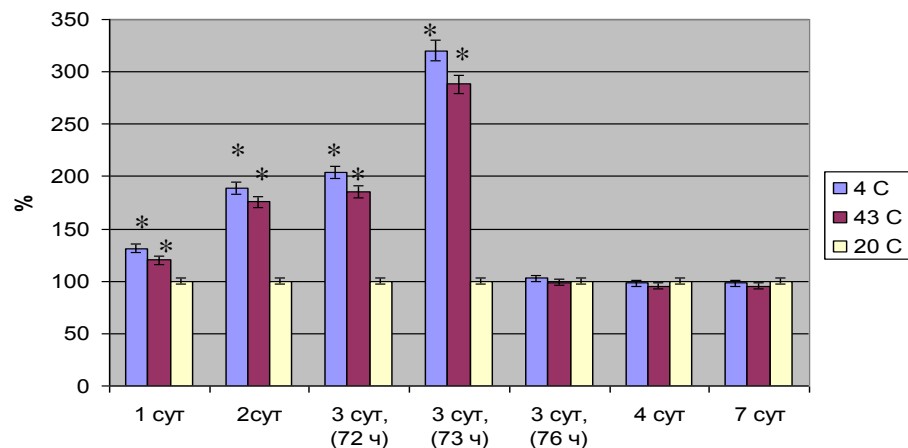


Рисунок 3.33 Влияние температуры культивирования на величину флуоресценции листа (относительно контроля выраженное в процентах) для сорта Эскада 70 (\* $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

Для сорта Прохоровка (рис. 3.34) также характерно повышение уровня флуоресценции на первые сутки на 113 и 64%, на вторые 180 и 122%, на третьи (72-й час опыта) 207 и 166 %, на третьи (73-й час опыта) 296 и 283% для растений подвергнутых воздействию температур 4°C и 43°C соответственно. Уровень ФХ достигает своего максимума для обоих сортов через 1 час с момента последнего воздействия повышенных и пониженных температур (73-й час опыта). Далее наблюдается спад флуоресценции до её первоначального значения по истечении четырех часов с момента последнего воздействия температур (76-й час опыта), после чего кривая флуоресценции выходит на плато.

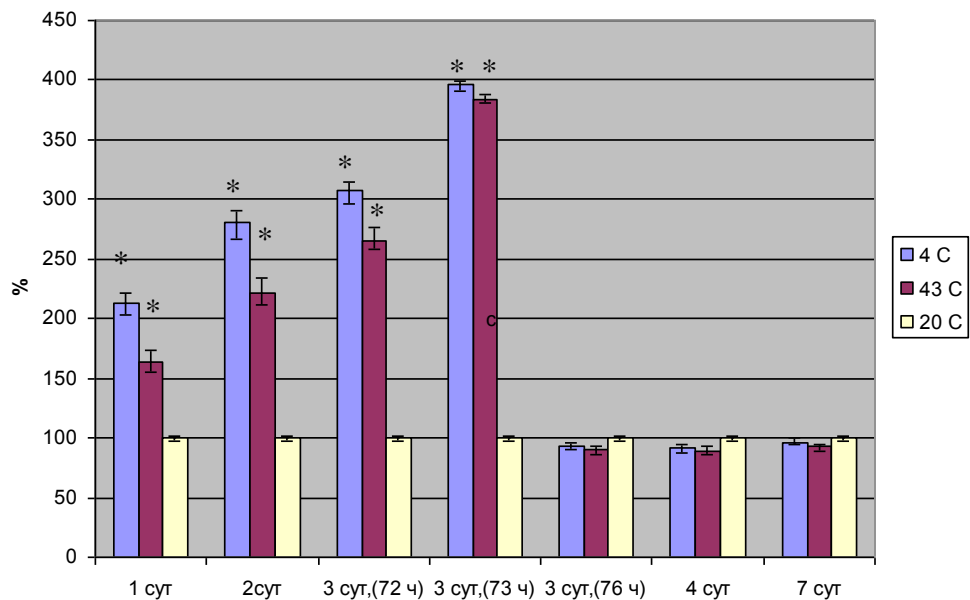


Рисунок 3.34 – Влияние температуры культивирования на величину флуоресценции листа (относительно контроля выраженное в процентах) для сорта Прохоровка (\* $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента).

В следующей серии экспериментов исследовали распределение ФХ вдоль и поперек середины листа. Для анализа были взяты оба сорта, но поскольку распределение ФХ в них изменяется аналогично друг другу, то для демонстрации был взят один сорт.

Анализу для исследования распределения флуоресценции хлорофилла подвергались растения уровень флуоресценции хлорофилла, которых достигал максимума на первый час с момента окончания воздействия стрессовых температур.

На рисунке 3.35 изображен фрагмент листа пшеницы, где по оси OX отмечено распределение ФХ поперек центральной жилки листа; и линия O<sub>1</sub>Y соответствует центральной жилке и оси OX.

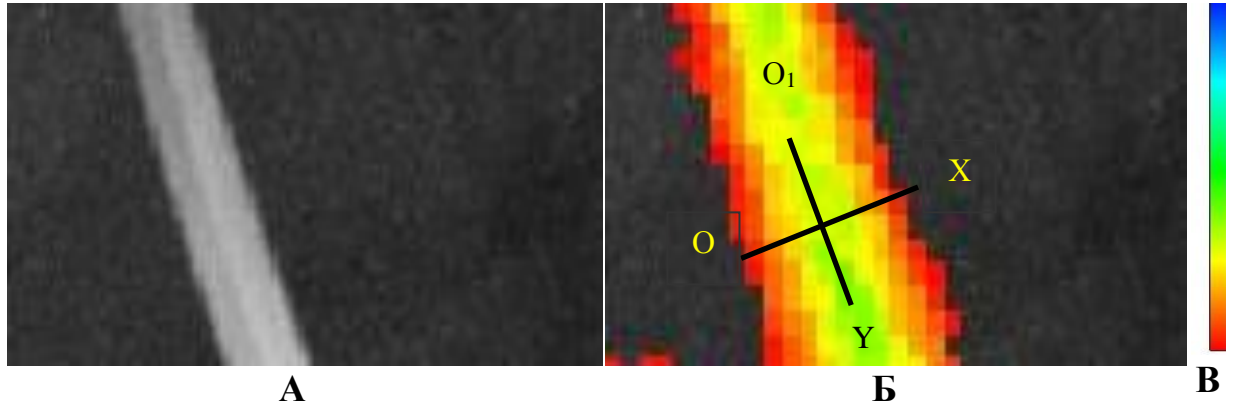


Рисунок 3.35 (А) Фотография листа; (Б) Распределение ФХ по листу пшеницы; (В) Шкала интенсивности флуоресценции (отсчеты (Counts))

Интенсивность ФХ листа пшеницы увеличивается при сканировании центра листа по направлению OX (Рис. 3.36).

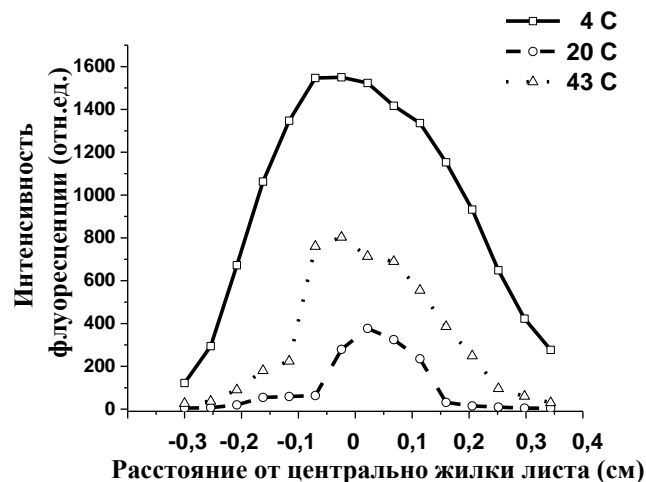


Рисунок 3.36 Изменение величины интенсивности ФХ листа пшеницы от центра листа к периферии в условиях нормальных температур (20°C), в стрессовых условиях пониженных (4°C) и повышенных температур (43°C).

С другой стороны, исследование распределения интенсивности флуоресценции вдоль середины листа (рис. 3.37) не выявило достоверных различий в распределении ФХ при сканировании от кончика к основанию листа.

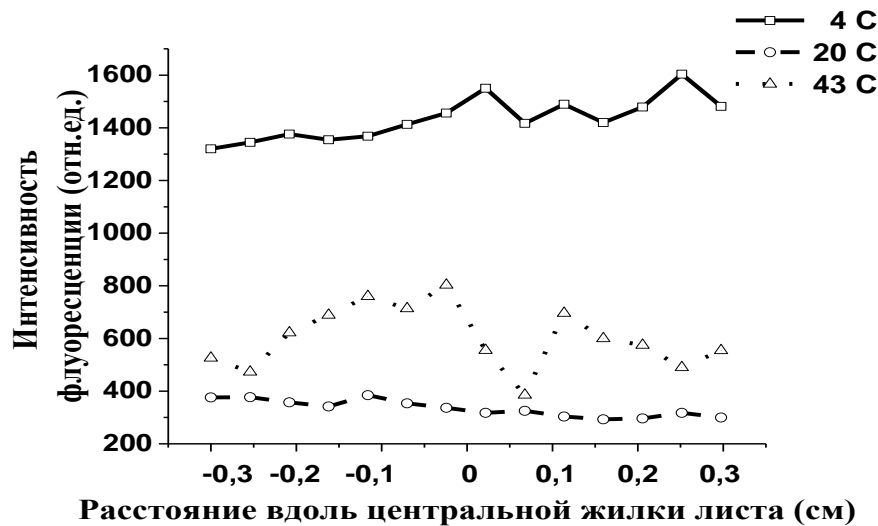


Рисунок 3.37 Изменение ФХ вдоль центра листа пшеницы в условиях нормальных температур (20°C), в условиях пониженных (4°C) и повышенных температур (43°C)

Анализ полученных данных по исследованию распределения ФХ при изменении температуры листа свидетельствует о зависимости от ориентации сканирования; при сканировании ОХ наблюдается увеличение площади флуоресцирующего листа (рис. 3.36), что не выявлено при сканировании О<sub>1</sub>У (рис. 3.37).

Известно, что до 90% флуоресценции излучается ФС2 (Корнеев Д.Ю., 2002), а точнее сказать её антенными комплексами. В норме, как правило, доля флуоресценции не превышает 3% от поглощенного света и изменения в количественном отношении может говорить о структурно-функциональных перестройках фотосинтетического аппарата.

Впервые Сомерсало и Краус (Somersalo S. *et al.*, 1989) сообщили, что холодовая адаптация – результат увеличения толерантности к фотоингибированию в листьях растений толерантных к холоду таких как

пшеница. Это не результат изменения оптических свойств листа, но развитие подобной толерантности ассоциировано с минимальными изменениями в микровязкости тилакоидной мембраны. В частности в листьях холодостойких зерновых культур реакция защиты против фотоингибирования проявляется в увеличении степени окисленности пула пластохинонов опосредованно через увеличение количества белков (ферментов) ассоциированных с метаболизмом углерода: рубиско, стромальной и цитозольной фруктозо-бифосфатазы, фосфо-сахароз-синтазы и повышения их активности. Как следствие, наблюдается усиленное развитие и рост растений в потенциально опасных условиях среды. Одними из защитных реакций адаптации фотосинтетического аппарата к длительным стрессовым температурам, как правило, служат следующие: уменьшение размера светособирающей антенны ФС2 – ССК2; изменение соотношения ФС2/ФС1; стимулирование скорости восстановления белка D1 РЦ ФС2; стимулирование способности использовать АТФ и НАДФН путем обмена веществ для поддержания высокого уровня фотохимической тушения энергии возбуждения ФС2 (Huner N.P.A. *et al.*, 1998).

Также известно, что увеличение температуры на 10-15°C приводит к перестройке фотосинтетического аппарата, что в свою очередь лимитирует процессы фотосинтеза. Воздействие высоких температур приводит к денатурации ферментных белковых комплексов, пигментов фотосистем. Хлорофиллы и каротиноиды тесно связаны с белками фотосистем, поэтому их повреждение может привести к изменению как одних, так и других. Температурный стресс обуславливает деградацию биосинтеза хлорофилла, дезинтегрирует мембраны хлоропластов и разобщает биохимические реакции в фотосистемах (Golovko T.K. *et al.*, 2014).

Эфеоглу (Efeoglu B.) и Терзиоглу (Terzioglu S.) показали, что в листьях разных сортов пшеницы с уменьшением содержания хлорофиллов и каротиноидов увеличивается уровень темновой флуоресценции ( $F_0$ ), что может являться сигналом к необратимым повреждениям



фотосинтетического аппарата. Увеличение флуоресценции обычно интерпретируется как результат отделения ССК2 от реакционного центра, а также благодаря блокированию донорной стороны ФС2. Увеличение  $F_0$  может быть следствием сдвига ОВ-равновесия, таким образом, параметр повышается путем закрытия РЦ. (Efeoglu B. *et al.*, 2009).

Мы предполагаем, что при воздействии высоких и низких температур на фотосинтетический аппарат листьев пшеницы происходит уменьшение размера светособирующей антенны ФС2. Это происходит благодаря сдвигу ОВ-потенциала пула пластохинов, вследствие этого включается процесс известный как «state transitions» - происходит фосфорилирование белков светособирающей антенны ФС2 (ССК2) и их отделение от РЦ димерного комплекса ФС2 (Song Y. *et al.*, 2014) и перемещение их в строму хлоропласта. Вследствие того, что у антенны не имеется акцептора энергии света (ФС2) и, молекулы хлорофилла ССК2 излучают эту энергию в виде флуоресценции находясь в свободном состоянии, а другая доля неиспользуемой в процессе фотосинтеза может диссипироваться за счет возможного накопления каротиноидов в результате температурного воздействия. Известно, что увеличение восстановленности пула хинонов сопровождается интенсификацией каротиногенеза (Соловченко А. Е. *и др.*, 2010). Описанные процессы являются приспособительными механизмами в ответ на длительное воздействие повышенных и пониженных температур.

При прекращении действия на ФСА пониженных и повышенных температур происходит снижение уровня флуоресценции хлорофилла до первоначального уровня. Это объясняется уменьшением доли свободных фосфорилированных и нефосфорилированных ССК2 в несвязанном с РЦ ФС2 состоянии, а также, возможно образование свободных молекул хлорофилла. Возможно имеет место дальнейшая ассоциация ССК2 с РЦ ФС2, вследствие чего уменьшается квантовый выход ФХ.

Показано, что при низких температурах культивирования (4°C) (рис. 3.33 – 3.34) отмечается максимальное увеличение уровня

флуоресценции до 220 и до 296 % для сортов Эскада 70 и Прохоровка соответственно по сравнению с контролем. Обнаружено, что уровень ФХ листа растений подвергавшихся воздействию повышенных температур (43°C) увеличивается до 188 и до 283% для сортов Эскада 70 и Прохоровка соответственно по сравнению с контролем. Согласно вышеописанным данным, из этого следует, что при воздействии пониженных температур наблюдается большее уменьшение размера светособирающей антенны ФС2, обусловленное отделением ССК2 от РЦ ФС2.

Итак, на листьях пшеницы двух сортов было показано, что действие температуры приводит к увеличению и изменению распределения ФХ поперек центра листа.

### **3.3.2 Исследование изменения содержания и конформации каротиноидов в клетках листьев инбредных линий и гибридов кукурузы (*Zéa máys L.*)**

В следующей серии экспериментов рассмотрена взаимосвязь между качественным составом зерна, количеством пигментов и конформацией некоторых из них в листьях инбредных линий и гибридов кукурузы.

Материал для изучения был предоставлен Институтом кукурузы «Земун поле» г. Белград, Сербия – это семена инбредных линий (M1-3 – Sdms, ZPPL225, ZPPL186) и гибридов кукурузы (*Zéa máys L.*) (ZP505, ZP341, ZP434). Семена проращивали согласно методике п. 2.1, предварительно анализируя их при помощи метода ИК-спектроскопии.

Изучаемые гибриды и инбредные линии являются одними из перспективных, которые выращиваются для получения высокого урожая в странах Европы и России. Они обладают следующими семеноводческими, селекционными свойствами и химическим составом (табл. 3.7-3.8).

Таблица 3.7 Химический состав, семеноводческие и селекционные свойства гибридов (Данные предоставлены проф. Ч.Н. Раденовичем (Институт кукурузы, г. Белград (Сербия)).

Гибрид	Группа созревания FAO	Тип зерна		Высота растения, см			
ZP341	300	Зубан		210			
ZP434	400	Зубан		220			
ZP505	500	Зубан		230			
Морфологические особенности початка							
Гибрид	Влага (%)	Длина колоса (см)	Масса колоса(г)	Количество рядов	Количество зерна	Масса кочана (г)	Масса зерна (г)
ZP341	11,96	21,53	281,43	14,6	604,1	41,31	240,33
ZP434	11,56	21,53	296,62	14,7	599,5	43,07	253,56
ZP505	11,14	23,05	309,13	15,7	706,2	45,18	263,95
Химический состав зерна							
Гибрид	Крахмал (%)	Белок (%)	Жиры (%)	Пепел (%)	Растворимые углеводы (%)		
ZP341	70,40	9,75	6,28	1,34	0,20		
ZP434	72,04	10,15	6,02	1,40	0,10		
ZP505	73,38	9,88	6,38	1,31	0,40		

Таблица 3.8 Химический состав, семеноводческие и селекционные свойства инбредных линий (Данные предоставлены проф. Ч.Н. Раденовичем (Институт кукурузы, г. Белград (Сербия)).

Инбредная линия	Группа созревания FAO	Тип зерна		Высота растения, (см)			
ZPPL186	700	Полузубан		181			
ZPPL225	300-400	Зубан		187			
M1-3-3Sdms	550-600	Зубан		173			
Морфологические особенности початка							
Инбредная линия	Влага (%)	Длина колоса (см)	Масса колоса(г)	Количество рядов	Количество зерна	Масса кочана (г)	Масса зерна (г)
ZPPL186	10,24	117	160	16	624	30	130
ZPPL225	8,64	118,2	130	12	432	20	110
M1-3-3Sdms	8,78	145	170	16	480	25	145
Химический состав зерна кукурузы инбредных линий со стоячими верхними листьями							
Инбредная линия	Крахмал (%)	Белок (%)	Жиры (%)	Пепел (%)	Растворимые углеводы (%)		
ZPPL186	67,80	10,22	7,53	1,48	0,20		
ZPPL225	64,22	11,33	6,96	1,47	0,15		
M1-3-3Sdms	65,52	12,44	7,14	1,43	0,15		

*Содержание пигментов в листьях инбредных линий кукурузы.*

Установлено, что максимальное количество хлорофилла (2,73 мг/г сырой ткани) содержится в листьях инбредных линий кукурузы ZPPL186, а содержание каротиноидов у всех инбредных линий примерно одинаковое (~0,40 мг/г сырой ткани) (рис. 3.38).

Соотношение содержания хлорофиллов *a* и *b* в листьях инбредных линий кукурузы изменялось от 1,93 (ZPPL225) до 2,31 (M1-3-3Sdms). Уменьшение этих соотношений обусловлено повышением содержания хлорофилла *b*, увеличение — повышением содержания хлорофилла *a*. Поскольку хлорофилл *a* является основным хлорофиллом ССК ФС1 и 2, увеличение этих соотношений может трактоваться как увеличение способности к сбору световой энергии и как следствие возрастание функциональной активности ССК обеих фотосистем. Соотношение содержаний хлорофиллов и каротиноидов (рис. 3.39) остается примерно на одном уровне и находится в пределах погрешности определения (6,7—6,9). Концентрации хлорофиллов сильно варьируют, что может отразиться на функции сбора световой энергии в инбредных линиях, хотя концентрация каротиноидов изменяется незначительно. В связи с этим важно проследить, как меняется и зависит ли конформация молекул каротиноидов от их концентрации и от содержания хлорофиллов. Поэтому в следующей серии экспериментов мы исследовали спектры РКР листьев инбредных линий кукурузы.

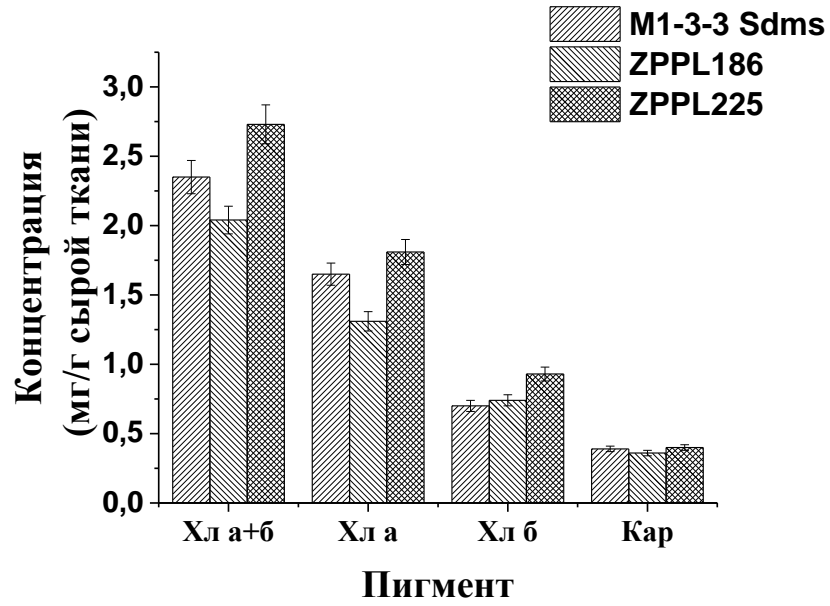


Рисунок 3.38. Количественный пигментный состав клеток инбредных линий листа кукурузы

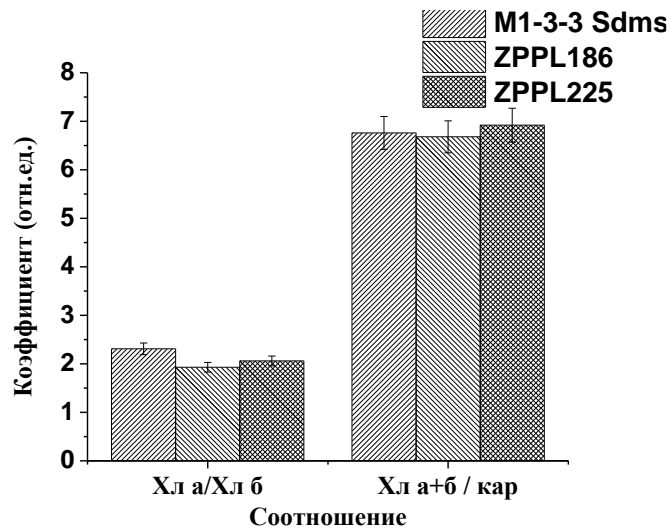


Рисунок 3.39 Соотношение хл *a*/хл *b*, суммы хлорофиллов и каротиноидов в клетках листьев инбредных линий кукурузы

В следующих экспериментах исследовали РКР спектры. Молекулы каротиноидов анализировали по пяти полосам спектра КР:  $\sim 960$ ,  $1004$ ,  $1153$ ,  $1188$  и  $1520 \text{ см}^{-1}$  (рис. 3.40).

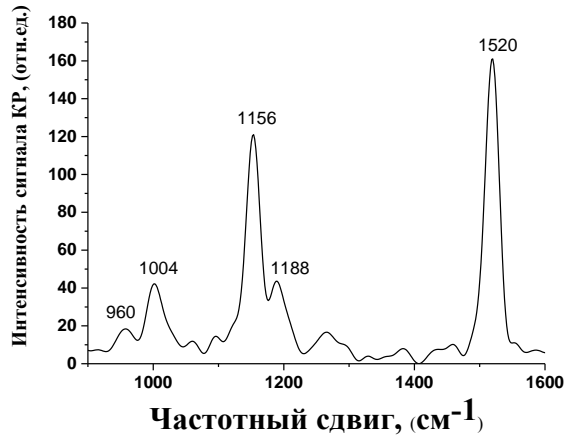


Рисунок 3.40 Спектр КР фрагмента листа кукурузы

Установлено, что соотношение интенсивностей различных полос спектра РКР каротиноидов листа кукурузы зависит от инбредной линии (рис. 3.41, а, рис. 3.42).

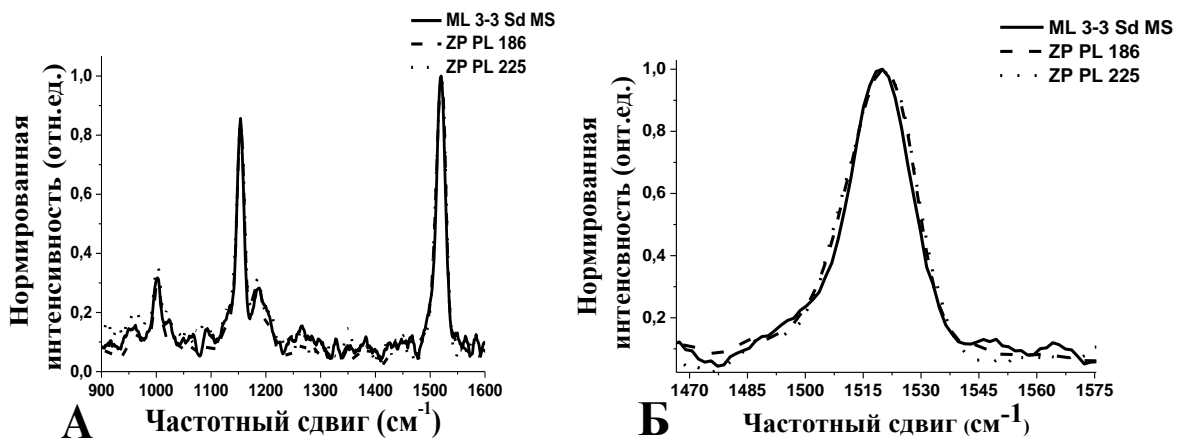


Рисунок 3.41. Спектр КР инбредных линий кукурузы, нормированный на значение максимального пика  $1520\text{ см}^{-1}$

Соотношение  $I_{1520}I_{1153}$ , характеризующее длину полиеновой цепи каротиноидов и/или изменение их микроокружения, варьирует от 1,18 (M1-3-Sdms) до 1,22 (ZPPL225). Поскольку эти коэффициенты различаются между собой не более, чем на 5%, то говорить об изменении микроокружения каротиноидов не приходится. Это предположение подтверждается также и тем, что существенный сдвиг полосы  $1520\text{ см}^{-1}$  в сторону меньших частот не наблюдается (рис. 3.41Б). Однако следует отметить, что тенденция к уменьшению соотношения этих полос и к сдвигу полосы  $1520\text{ см}^{-1}$  спектра

РКР влево (линия M1-3-3Sdms) проявляется достаточно четко, что может свидетельствовать о различной длине или особенностях окружения полиеновой цепи (белки и (или) липиды).

В ходе проведенного исследования выявлены незначительные изменения валентных колебаний метильной группы (соотношения  $I_{1004}/I_{1153}$ ,  $I_{1004}/I_{1520}$ ,  $I_{1153}/I_{1190}$ ) (рис. 3.42, табл. 3.9).

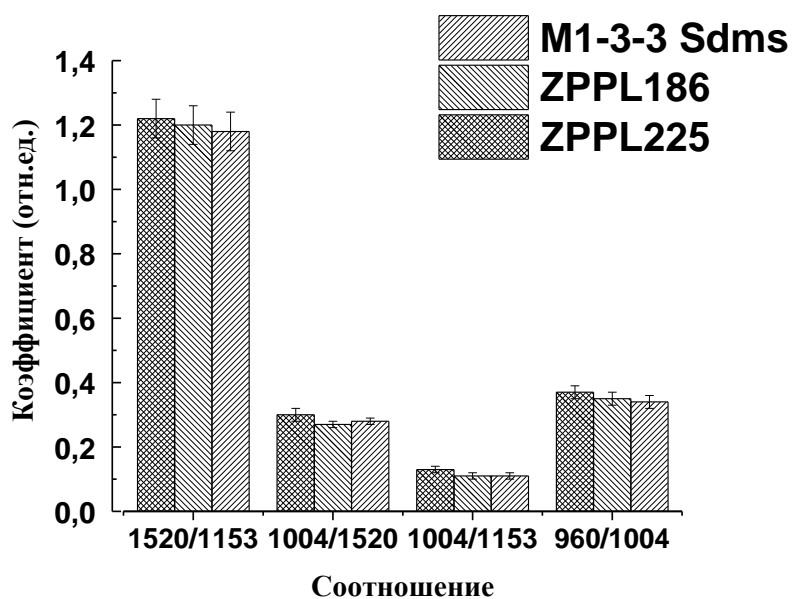


Рисунок 3.42. Соотношение амплитуд полос спектра РКР каротиноидов в инбредных линиях листьев кукурузы.

Установлено, что пространственная ориентация атомов в плоскости ( $I_{960}/I_{1004}$ ) претерпевает незначительные изменения. Выше было показано, что содержание каротиноидов в листовой пластинке разных линий кукурузы постоянно. Вероятно, изученные спектры отражают различные популяции каротиноидов преимущественно в одной и той же *all-транс*-конфигурации, поскольку никаких маркеров в области «отпечатков пальцев» ( $1200\text{—}1300\text{ см}^{-1}$ ) не зафиксировано.



Таблица 3.9 Значения амплитуд полос спектров РКР каротиноидов инбредных линий кукурузы

Инбредная линия	Полоса	Амплитуда (отн.ед.)
M1-3-3 Sdms	1002,5	55,3±2,7
	1153,8	167,4±8,3
	1188,1	47,3±2,3
	1520,0	197,4±9,8
	957,6	18,4±0,9
ZPPL186	1002,5	96,9±3,9
	1153,8	298,3±11,9
	1186,4	99,1±4,0
	1520,0	357,0±14,3
	963,9	34,0±1,4
ZPPL225	1000,7	70,8±2,8
	1153,8	196,3±7,7
	1184,7	59,4±2,3
	1520,0	239,0±9,3
	962,1	26,3±1,0

*Пигментный состав и конформации молекул каротиноидов в листьях гибридов кукурузы.* В данной серии экспериментов было установлено, что максимальное количество хлорофиллов содержится в листьях гибридов кукурузы ZP505 и ZP341 — соответственно 3,00 и 3,32 мг/г сырой ткани, а наибольшее количество каротиноидов — в листьях гибрида ZP341 — 0,52 мг/г сырой ткани (рис. 3.43).

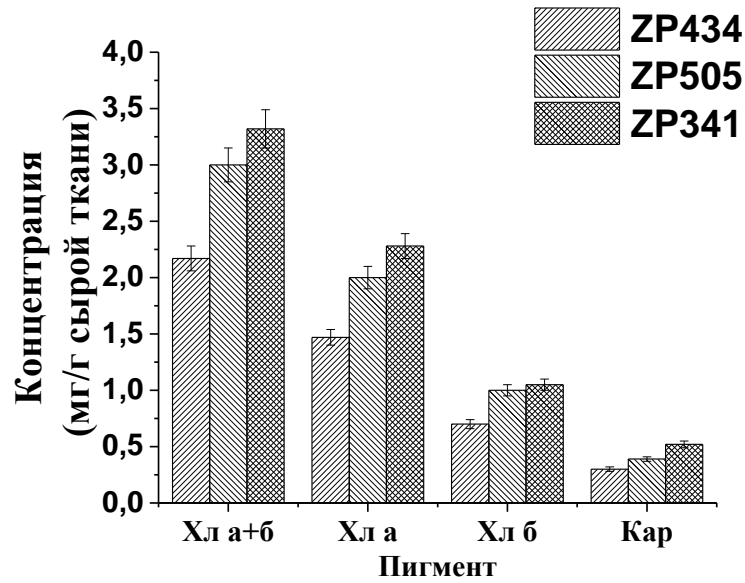


Рисунок 3.43 Содержание пигментов в листьях гибридов кукурузы.

На рис 3.34 представлены полученные в эксперименте соотношения содержания хлорофиллов в листьях гибридов (хл *a*/хл *b*), а также соотношение концентраций суммы хлорофиллов и каротиноидов (хл/каротиноиды) (рис. 3.44).

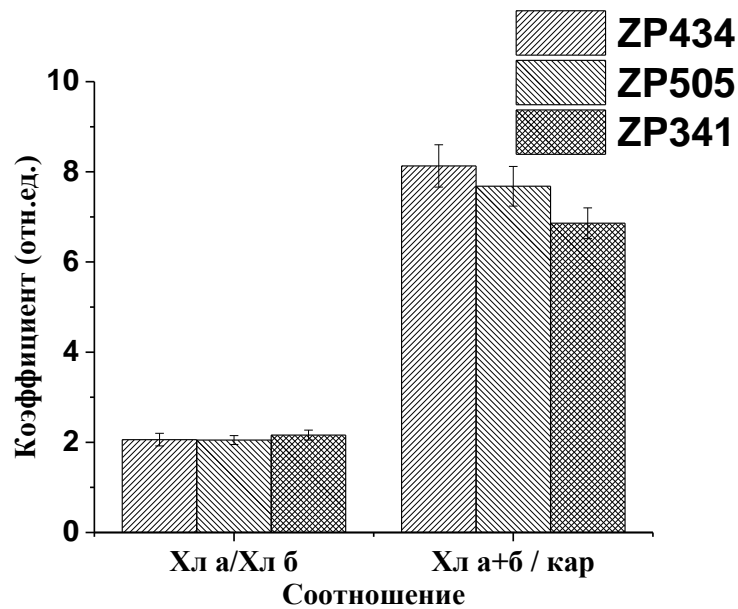


Рисунок 3.44. Изменение соотношений концентраций хл *a*/хл *b*, суммы хлорофиллов и каротиноидов в листьях гибридов кукурузы.

Установлено, что соотношение  $xl\ a/xl\ b$  у разных гибридов не меняется. Это значит, что селекционные изменения генома не отразились на количественном содержании хлорофиллов. Соотношение  $xl/каротиноиды$  у гибрида ZP341 близко к 6,7, у ZP505 – 7,7. Данное соотношение возрастает на фоне снижения концентрации общего хлорофилла (по сравнению с максимальной концентрацией хлорофиллов у гибрида ZP341), при снижении содержания каротиноидов (по сравнению с максимальной концентрацией этого пигмента у гибрида ZP341).

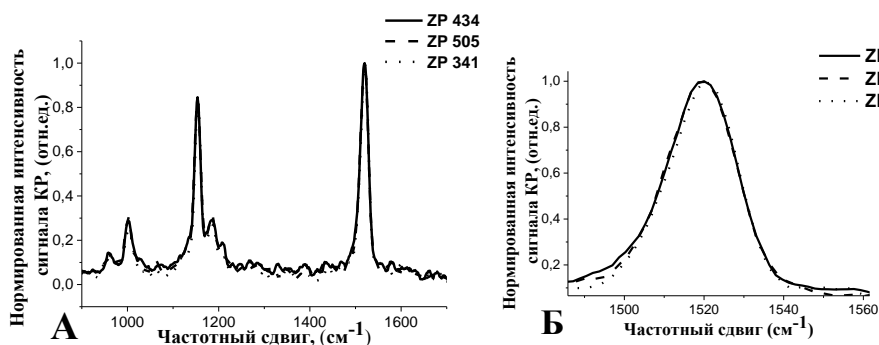


Рисунок 3.45. Спектр комбинационного рассеяния света гибридов кукурузы, нормированный по максимальному пику  $1520\text{ см}^{-1}$  (а) и полоса этого спектра  $1520\text{ см}^{-1}$  (б): 1 — ZP 434; 2 — ZP 505; 3 — ZP 341

Как следует из полученных данных, приведенных в табл. 3.12 и на рис. 3.45, 3.46, соотношение  $I_{1520}/I_{1153}$  изменяется в пределах 1,18—1,24. Однако, как и у инбредных линий, в каротиноидах гибридов ZP434 и ZP505 несколько снижено соотношение  $I_{1520}/I_{1153}$  (по сравнению с ZP341). Этот эффект можно интерпретировать как не выявленную тенденцию к уменьшению упорядоченности структуры полиеновой цепи каротиноидов. Выявлены существенные изменения валентных колебаний метильной группы, что особенно выражено у гибрида ZP341 (соотношения  $I_{1004}/I_{1153}$ ,  $I_{1004}/I_{1520}$ , табл. 3.10), где обнаружена и максимальная концентрация каротиноидов по сравнению с остальными гибридами.

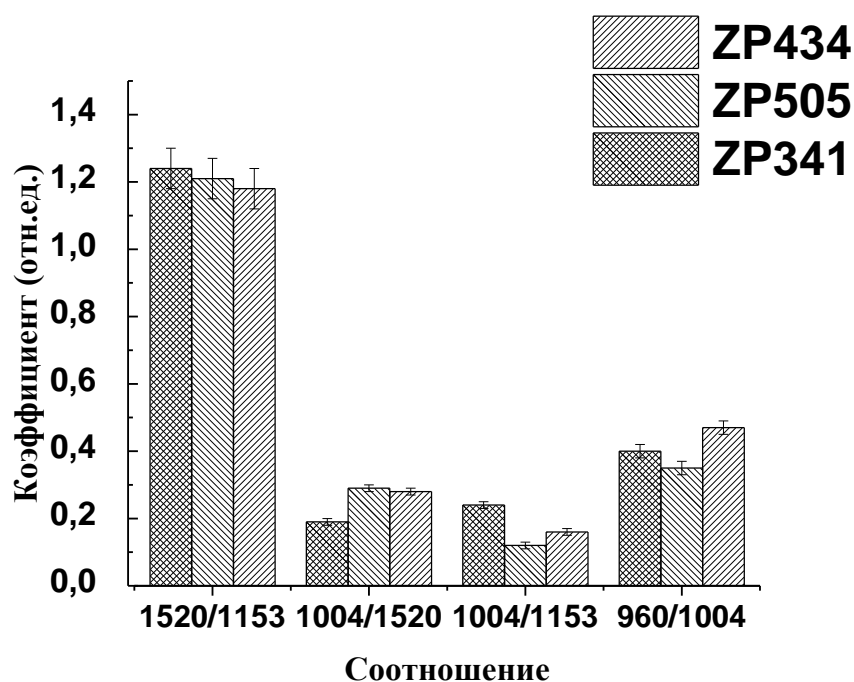


Рисунок 3.46. Соотношение амплитуд полос спектра КР каротиноидов в листьях гибридов кукурузы

Соотношение  $I_{960}/I_{1004}$  у гибрида ZP 434 несколько больше (из-за увеличения амплитуды полосы  $960\text{ см}^{-1}$ ) по сравнению с другими гибридами (Рис. 3.46). Исходя из этих данных, можно предположить, что у гибрида ZP 434 большинство каротиноидов находятся в неплоской конформации, что, вероятно, обусловлено увеличением количества каротиноид-связанных белков. Как и в опыте с инбредными линиями, маркерные пики *цис*-конфигурации в области «отпечатков пальцев» не проявлялись.

Таблица 3.10 Изменения амплитуд пиков спектров КР каротиноидов различных гибридов кукурузы

Гибрид	Полоса $\text{см}^{-1}$	Амплитуда (отн.ед.)
ZP434	1002,5	$101,5 \pm 3,6$
	1153,8	$305,7 \pm 10,8$
	1186,4	$103,5 \pm 3,7$

	1520,0	362,1±12,8
	960,8	47,7±1,7
ZP505	1002,5	103,0±5,2
	1153,8	296,8±15,0
	1184,7	106,7±5,4
	1520,0	359,7±18,2
	960,8	35,7±1,8
ZP341	1153,8	408,0±16,6
	1184,7	116,2±4,7
	1520,0	506,9±20,6
	1002,7	96,5±3,9
	960,8	38,1±1,5

***Изучение ИК спектров семян гибридов и инбредных линий кукурузы.***

Инфракрасный спектр биологического образца представляет собой суммарный спектр, в котором происходит перекрывание полос поглощения различных функциональных групп органических веществ, а также воды. Это явление усложняется в виду взаимодействия отдельных видов колебаний указанных групп, при этом происходит искажение формы полос поглощения и смещение их максимумов. Поэтому на инфракрасных спектрах наблюдается большое число широких полос поглощения с неясными максимумами.

Зерна трех испытуемых инбредных линий и гибридов кукурузы, после гомогенизации и закатывания в таблетку с бромидом калия (KBr), было готово к регистрации инфракрасного спектра.

Установлено наличие около 22 - 24-х спектральных полос в диапазоне волновых чисел от 400 см<sup>-1</sup> до 4000 см<sup>-1</sup>. Спектральные полосы отличаются неодинаковой интенсивностью, неодинаковой кинетикой и неодинаковой шириной в основании. Обнаружено 5 наиболее интенсивно выраженных

спектральных полос (около  $3440\text{ см}^{-1}$ ,  $2926\text{ см}^{-1}$ ,  $1747\text{ см}^{-1}$ ,  $1646\text{ см}^{-1}$ ,  $993\text{ см}^{-1}$ ), четыре средне-выраженных ( $2851\text{ см}^{-1}$ ,  $1538\text{ см}^{-1}$ ,  $1458\text{ см}^{-1}$ ,  $1161\text{ см}^{-1}$ ).

Анализом характерных спектральных полос и их сравнением, сначала со спектральными полосами из стандартной библиотеки полос, полученных при эталонных ИК-испытаниях особо чистых органических веществ, а потом с полосами, полученными в ходе испытания органических, природных и многоатомных соединений, описанными в литературе (Vasilev A. *et al.*, 2007; Тарасевич Б.Н., 2012; Sverdlov L.M. *et al.*, 1970) возможно с определенной вероятностью выявить химический состав и молекулярную структуру зерна трех испытуемых гибридов кукурузы. Кроме в использованной нами литературе, ИК-спектры (их около 150 тыс.) описаны в ASTM (The American Society for Testing and Materials) библиотеке.

В таблице 3.11 представлен химический состав зерна (Раденович Ч.Н. и др., 2014).

Таблица 3.11 Химический состав зерна

Химический состав зерна	Диапазон концентраций соответствующих показателей состава	Среднее значение
Влажность (%)	7-23	16,0
Крахмал (%)	61-78	71,7
Протеин (%)	6-12	9,5
Жиры (%)	1,0-5,7	4,3
Пепел (%)	1,1-3,9	1,4
Пентозы (%)	5,8-6,6	6,2
Волокна (%)	8,3-11,9	9,5
Целлюлоза+лигнин (%)	3,3-4,3	3,3
Суммарный сахар (в виде глюкозы) (%)	1,0-3,0	2,6
Суммарные каротиноиды (мг/кг)	12-36	26,0

Согласно анализу и сравнению полученных спектральных линий с библиотекой данных ИК спектров было нами сделана попытка идентифицировать некоторые интенсивные полосы (рис. 3.47–3.48):

Обнаружено наличие во всех образцах валентных колебаний, как свободной так и связанной ОН- группы и внутри- и межмолекулярные Н- связи в димерах и полимерах (широкая полоса около  $3440\text{см}^{-1}$ ), однако, ввиду того, что эта полоса широкая и очень интенсивная, она также может в себя включать валентные колебания и других простых связей, таких как N-H, (первичные амиды  $3540\text{-}3480\text{ см}^{-1}$ ,  $3420\text{-}3380\text{см}^{-1}$ , вторичные амиды  $3460\text{-}3420\text{ см}^{-1}$ ). Поэтому эта широкая полоса может представлять собой смесь соединений содержащих свободные ОН- группы (например вода), связанные ОН- группы (углеводы, аминокислоты и др.), NH – группы (аминокислоты, белки, производные аминокислот и др.). Имеют место валентные симметричные и ассиметричные колебаний C–H группы (в составе  $-\text{CH}_2-$ ) ( $2927\text{-}2852\text{ см}^{-1}$ ) а также деформационные колебания C–H группы в области около  $1460\text{см}^{-1}$  в алканах. Алканы в зерне, в основном, представлены углеродной цепью жирных кислот.

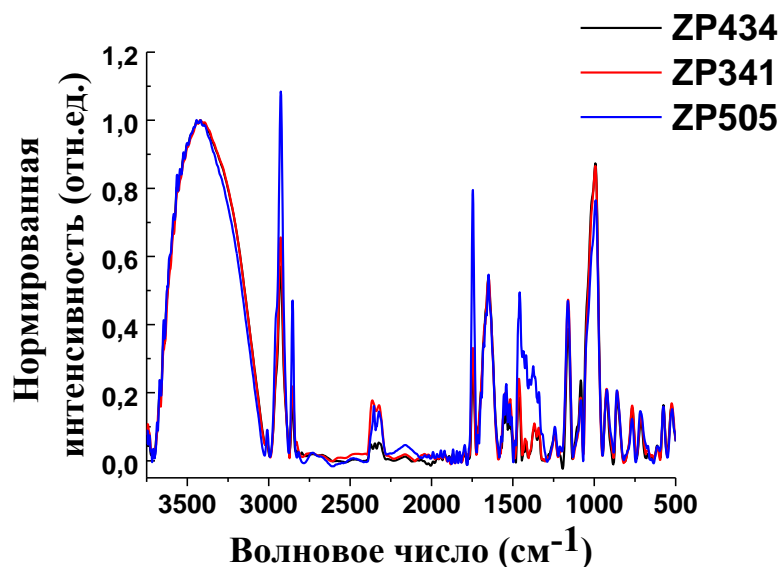


Рисунок 3.47 ИК спектр семян гибридов кукурузы: красная кривая – ZP341, черная кривая – ZP434 и синяя кривая – ZP505.

Выявлены колебания связей в амидных плоскостях полосы амид 1 и амид 2 ((валентные колебания C=O в первичных, вторичных и третичных амидах  $1651\text{см}^{-1}$ ), (составные частоты деформационных колебаний NH и колебаний C–N во вторичных амидах –  $1541\text{см}^{-1}$ )). Колебания этих связей

имеют место в белках, пептида, свободных аминокислотах. Предполагается, что ярко выраженная полоса  $995\text{ см}^{-1}$ , принадлежит колебаниям С-Н связей в алкенах. Менее интенсивные полосы около  $860$ ,  $767$ ,  $711$ ,  $574\text{ см}^{-1}$  предположительно валентные колебания S–O, C–P, C–S связей (Тарасевич Б.Н., 2012).

В эксперименте было выявлено, что полосы идентифицированных колебаний отличаются по амплитуде у некоторых гибридов: так две полосы в области  $2927\text{--}2852\text{ см}^{-1}$  и одна в области  $1460\text{ см}^{-1}$ , подтверждающие наличие валентных и деформационных колебаний С-Н связи соответственно, наиболее выражены у гибрида ZP505. Также у этого гибрида увеличена амплитуда полосы  $995\text{ см}^{-1}$  (С-Н – деформационные колебания в алкенах).

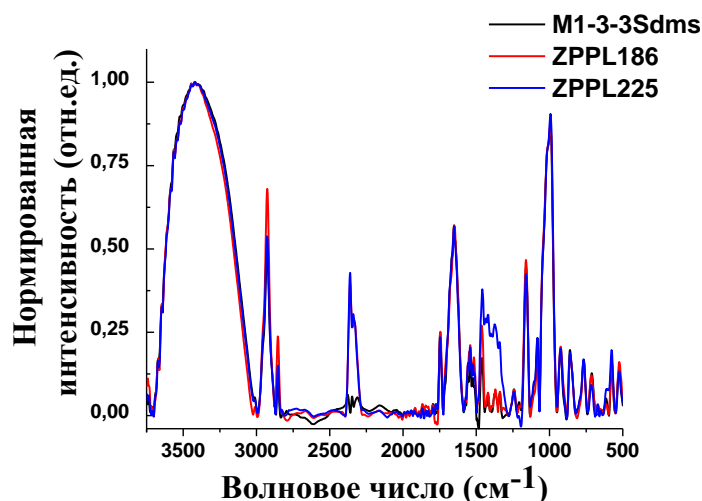


Рисунок 3.48 Нормированный на значение максимальной полосы  $3440\text{ см}^{-1}$  ИК спектр семян инбредных линий кукурузы: красная кривая – ZPPL186, черная кривая – M1-3-3-Sdms и синяя кривая – ZPPL225.

У инбредной линии ZPPL186 обнаруживаются различия в амплитудах идентифицированных полос в области  $2927\text{--}2852\text{ см}^{-1}$  и одной в области  $1460\text{ см}^{-1}$ . (рис.3.48).

Обнаруженные отличия в амплитудах можно объяснить уменьшением концентрации соответствующих соединений, содержащих



идентифицированные нами валентные и деформационные колебания биомолекул.

Исходя из данных ИК-спектров семян чистых линий и гибридов кукурузы, можно сделать вывод о том, что в качественном составе полос отсутствуют изменения, однако имеют место различные амплитуды полос, что объясняется различной концентрацией веществ, содержащих в своем составе.

Установлено, что в инбредных линиях M1-3-3Sdms, ZPPL225, ZPPL228 содержание хлорофиллов *a*, *b* и соотношение между ними варьирует, а также у гибридов ZP341, ZP434, ZP505 изменяется концентрация каротиноидов относительно содержания хлорофиллов. Это, вероятно, связано с различиями в организации ССК фотосистем 1 и 2. Нами выявлены существенные изменения валентных колебаний метильных групп, особенно у гибрида ZP341, у которого концентрация каротиноидов максимальная. Мы обнаружили также различия в пространственной ориентации молекул каротиноидов в гибридах кукурузы, что подтверждено достоверными различиями соотношений  $I_{960}/I_{1004}$ , обусловленным разным количеством каротиноид-связанных белков, что практически не наблюдали у инбредных линий. Что касается стереоизомерии молекул каротиноидов, то различий как между инбредными линиями, так и между гибридами не обнаружено: все молекулы находились преимущественно в *транс*-конфигурации и сдвиги полос 1520, 1153  $\text{см}^{-1}$  незначительны. Достоверная связь между концентрацией и конфигурацией молекул пигментов не выявлена. Вероятно, наблюдающиеся различия обусловлены генетическими особенностями исследованных гибридов и инбредных линий. Так же в ИК спектрах не было обнаружено идентифицированных связей в молекулах уникально характеризующих связь между концентрацией хлорофиллов и каротиноидов и конформацией каротиноидов гибридов и инбредных линий кукурузы.

Итак, установлено, что внутри гибридов присутствуют изменения в конформации молекул каротиноидов, а в инбредных линиях имеются различия в количественном составе ССК фотосистем 1 и 2

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования показано, что содержание и распределение каротиноидов в клетках дикого типа и в клетках мутанта по ФС2 в цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803* различно (Рис.13). Доказано наличие связи между конформацией каротиноидов и некоторыми показателями флуоресценции хлорофилла, а именно на диком типе у мутантов  $\Delta PSI/\Delta PSII$ ,  $\Delta OCP$  цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*: увеличение времени жизни флуоресценции хлорофилла, сопровождается уменьшением степени делокализации  $\pi$ -электронной системы каротиноидов. Также конформация каротиноидов в тилакоидных мембранах определяется температурой, и отсутствием фермента десатуразы. Действительно у дикого типа цианобактерий и мутанте *desA-* /*desD-* в определении конформации каротиноидов существенное место имеет количество полиненасыщенных жирных кислот в мембране при воздействии низких температур. Важно, что наряду с генетически детерминированными, «медленными» факторами (отсутствия гена или селекции и др.) на конформацию каротиноидов в фотосинтетических мембранах влияют экстраклеточные факторы (экстраклеточный pH, температура) (рис. 3.49).

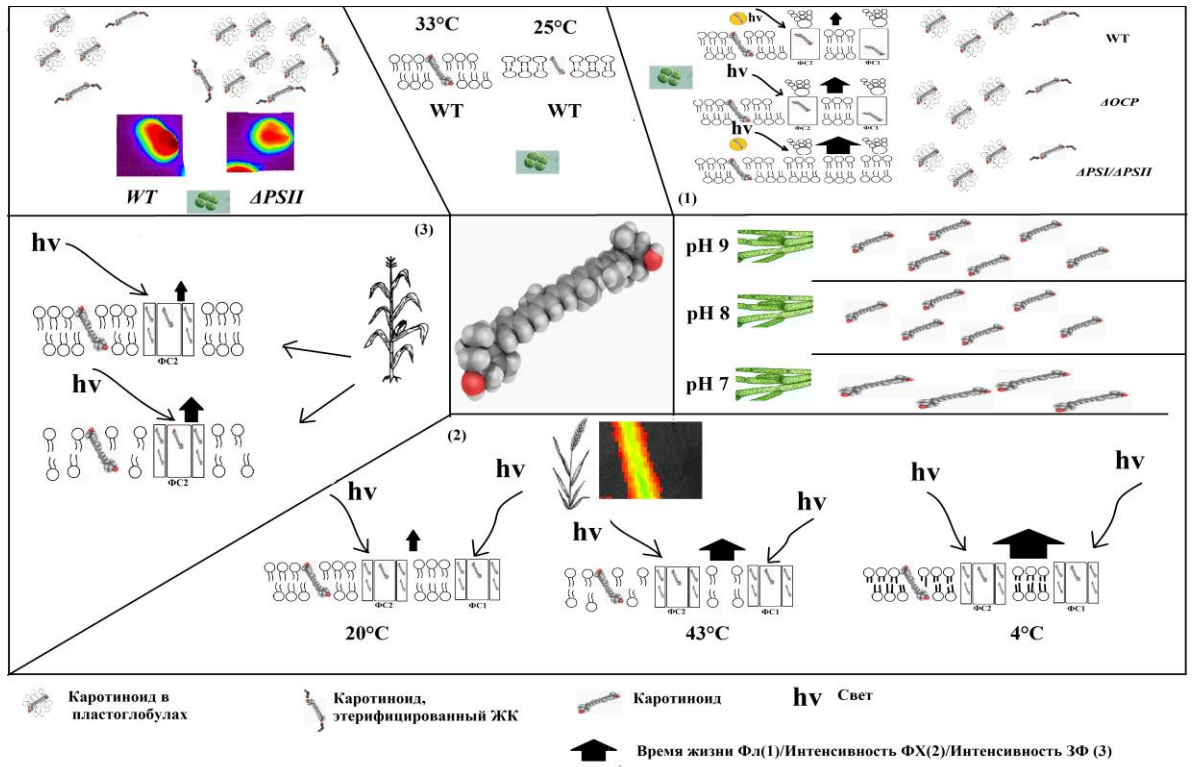


Рисунок 3.49 Взаимосвязь процессов протекающих в ФСА цианобактерий, водорослей и высших растений

## ВЫВОДЫ

1) Установлено, что в мутанте *ΔPSII* в сравнении с диким типом содержание каротиноидов увеличено по сравнению с диким типом, и они распределены более равномерно по всей клетке;

2) Доказано, что у дикого типа и мутантов *ΔPSI/ΔPSII*, *ΔOCP* цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*, с увеличением среднего времени жизни флуоресценции наблюдается снижение степени делокализации π-электронов в молекулах каротиноидов;

3) Установлено, что у дикого типа цианобактерий, увеличение полиненасыщенных жирных кислот при температуре 25°C изменяет конформацию каротиноидов;

4) На водорослях *Cladophora* установлено, что при культивировании в условиях повышения экстраклеточного pH с 8,0 до 9,0 увеличивается количество и изменяется конформация каротиноидов;

5) Установлено, что внутри инбредных линий имеются различия в строении ССК фотосистем 1 и 2, а в гибридах присутствуют изменения в конформации молекул каротиноидов: изменяется вклад метильных групп в спектр РКР и интенсивность внеплоскостных валентных колебаний С-Н связи;

6) Установлено, что интенсивность ЗФ листа кукурузы коррелирует с фазовым переходом липидов тилакоидных мембран, а увеличение температуры приводит к увеличению интенсивности и изменению распределения флуоресценции хлорофилла относительно центра листа пшеницы.

7) Предполагается, что флуоресценция хлорофилла регулируется каротиноидами локализованными в фотосистемах и тилакоидных мембранах в клетке (листе), действия внешних факторов (pH, температура) и генетическим статусом растения.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

$^1\text{O}_2$  – синглетный кислород

$^1\text{Хл}^*$  – первое синглетное состояние хлорофилла

$^3\text{P680}^*$  – триплетное состояние хлорофилла реакционного центра

$^3\text{Хл}^*$  – триплетное состояние хлорофилла

*b6f* – *b6f*-комплекс

$\text{CO}_2$  – углекислый газ

*desA<sup>-</sup>/desD<sup>-</sup>* – мутант цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803* без десатураз

A и D жирных кислот

$E_a$  – энергия активации

$\text{H}_{\text{II}}$  – гексогональная фаза тилакоидной мембраны

NPQ – нефотохимическим тушением

PQ – пластохинон

qP – фотохимическое тушение

$S_0$  – основное синглетное состояние

$S_1$  – первое синглетное состояние

WT – дикий тип цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803*

$\Delta\text{pH}$  – транстилакоидный градиент ионов водорода

$\Delta\text{PSI}/\Delta\text{PSII}$  – мутант цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803* без фотосистем 1 и 2

$\Delta\text{PSII}$  – мутант цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803* без фотосистемы 2

$\Delta\text{OCP}$  – мутант цианобактерии *Synechocystis sp. PCC6803* без оранжевого каротин-белка

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВДЭ – виолоксатиндеэпоксидаза

ГППФ – геранил-геранил-пирофосфат

ГФП – глицеральдегидфосфатный путь синтеза

ДКФ – 1-дезокси-D-ксилулозо-5фосфат  
ДМАПФ – диметилаллилпирозфат  
ЖК – жирная (ые) кислота (ы)  
ЗФ – замедленная флуоресценция хлорофилла  
ЗЭ – зеаксантинэпоскидаза  
ИК-спектр – инфракрасный спектр  
ИППФ – изопентилпирофосфат  
КАР – каротиноид  
МВК – мевалоновая кислота  
МГДГ – моногалактозилдиацилглицерол  
МЭФ – 2-С метил-D-эритрол 4фосфат  
НАДФН – восстановленный никотинамиддинуклеотидфосфат  
ПБК – пигмент-белковый комплекс  
P680<sup>+</sup> – окисленный реакционный центр фотосистемы 2  
РКР – резонансное комбинационное рассеяние  
РЦ – реакционный центр  
ССК – светособирающий комплекс  
ФБС – фикобилисома  
ФС1 – фотосистема 1  
ФС2 – фотосистема 2  
ФСА – фотосинтетический аппарат  
Ф<sub>ФСП</sub> – общий квантовый выход флуоресценции хлорофилла  
ФХ – флуоресценция хлорофилла  
Хл *b* – хлорофилл *b*  
Хл *a* – хлорофилл *a*  
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:**

1. Браун А. Спектроскопия органических веществ / А. Браун, Д. Флойд, М. Сейнсбери. Пер. с англ. М.: Мир, 1992. 300 с
2. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов /Г. Бриттон. – М.: Мир, 1986. – 423с
3. Васильев А.В. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений / А.В. Васильев, Е.В. Гриненко, А.О. Щукин [и др.]. – СПб.: СПбГЛТА, 2007. – 54 с.
4. Журавская А.Н. Влияние предпосевного облучения семян Амаранта (*Amaranthus L.*) на фотосинтез сеного потомства / А.Н. Журавская, И.В. Воронов, Е.Р. Поскачина // Наука и образование. –2011. – №4.– С. 65-68
5. Коваленко А.А. Спектроскопия комбинационного рассеяния / А.А. Коваленко, А.А Елисеев. – М.: 2011. – 37 с.
6. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла/ Д.Ю. Корнеев - К.: “Альтерпрес”, 2002. – 188 с.
7. Корнилина В.В. Влияние ложного осинового трутовика (*Phellinus Tremulae Bond et Boriss*) на содержание пигментов в листьях осины в лесах Ульяновской области / В.В Корнилина // Биологические науки, фундаментальные исследования. – 2012. – №9. – С. 568 – 572
8. Ладыгин В.Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей / Вопросы современной альгологии. – Пушкино, 2014. – 87 с
9. Ладыгин В.Г. Спектральные свойства и структура хлоропластов при блокировке ранних этапов биосинтеза хлорофилла / В.Г. Ладыгин // Биофизика. – 2006. – Т. 51. – вып. 4. – С. 710–723
10. Левшин Л.В. Люминесценция и её измерения: молекулярная люминесценция / Л.В. Левшин, А.М. Салецкий. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 272 с.

11. Максимов Г.В. Исследование вязкости возбудимых мембран с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния/ Г.В. Максимов, Ч.Н. Раденович, Ю.Е. Борисова [и др.] // Биофизика. – 1996. – Т.41. – С. 400-406
12. Максимов Е.Г. Миграция энергии возбуждения в нативных и гибридных фотосинтетических антенных комплексах: Диссертация канд.биол. наук / Е.Г. Максимов. – Москва., 2011. – 131 с.
13. Накамото К. ИК спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений / К. Накамото. – М.: Мир, 1991. – 536 с.
14. Раденович Ч.Н. Диагностирование конформационных и функциональных свойств зерна элитных инбредных линий кукурузы с помощью инфракрасных спектров / Ч.Н. Раденович, Г.В. Максимов, Е.В. Тютяев [и др.] // Селекция и семеноводство. – 2014. Вып. 20. – С.13-33
15. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия / А. Смит. – М.: Мир, 1982. – 328 с.
16. Смоликова Г.Н. Каротиноиды семян: синтез, разнообразие и функции / Г.Н. Смоликова, С.С. Медведев // Физиология растений. – 2015. – Т.62. – № 1. – С.3-16
17. Соловченко А.Е. Оптическое экранирование как фотозащитный механизм растений / А.Е. Соловченко, М.Н. Мерзляк. – М.: А-Литера, 2010. 164 с
18. Тарасевич Б.Н. ИК спектры основных классов органических соединений / Б.Н. Тарасевич. – М.: МГУ, 2012. – 55 с.
19. Тютяев Е.В. фотосинтетических пигментов в листьях инбредных линий и гибридов кукурузы / Е.В. Тютяев, В.В. Шутова, Г.В. Максимов [и др.] // Физиология растений и генетика. – 2015. – Т. 47, № 2. –С. 147-159
20. Шлык А. А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов а, и b / Шлык А.А. // Биохимия. – 1968. – Т.33. – Вып. 2. – С. 275–280



21. Alexandre M.T.A. Probing the carotenoid content of intact *Cyclotella* cells by resonance Raman spectroscopy / M.T.A. Alexandre, K. Gundermann, A.A. Pascal [et al.] // *Photosynth. Res.* 2014. Vol.119. P.273–281
22. Allen D.J. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants / D.J. Allen, D.R. Ort // *Trends Plant Science.* – 2001. – Vol.6. – P.36-42
23. Andreeva A. Temperature dependence of resonance Raman spectra of carotenoids / A. Andreeva, I. Apostolova, M. Velitchkova // *Spectrochimica Acta part A: Biomolecular Spectroscopy.* – 2011. – Vol.78.– P.1261 – 1265
24. Aro E. M. Regulation of photosynthesis / M. Aro, Andersson. – New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 2006. – Vol. 11. 623 p.
25. Baranski R. Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy / R. Baranski, M. Baranska, H. Schulz // *Planta.* – 2005. – Vol.222. – P.448–457
26. Berera R. Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems / R. Berera, R. van Grondelle, J.T.M. Kennis // *Photosynthesis Research.* – 2009 – Vol.101. – P.105–118
27. Bodea S. On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls / S. Bodea, C.C. Quentmeiera, P.-N. Liao [et al.] // *PNAS.* – 2009. – Vol.106 – Iss.30. – P.12311–12316
28. Breitenbach J. Catalytic properties and reaction mechanism of the CrtO carotenoid ketolase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 / J. Breitenbach, T. Gerjets, G. Sandmann // *Arch Biochemistry Biophysics.* – 2013. – Vol. 529. – P.86–91
29. Chen M. A red-shifted chlorophyll / M. Chen, M. Schliep, R.D. Willows [et al.] // *Science.* – 2009. – Vol.329. – P.1318-1319

30. Chen Y. Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants / Y. Chen, F.Q. Li, E.T. Wurtzel // *Plant Physiology*. – 2010. – Vol.153. – P. 66–79
31. Collins A.M. Carotenoid Distribution in Living Cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) / A.M. Collins, H.D.T. Jones, D. Han [et al.] // *PLOS ONE*. – 2011. – Vol.6. – Iss.9. – P.123–134
32. Cramer W.A. Transmembrane Traffic in the Cytochrome b6f Complex / W.A. Cramer, H. Zhang, J. Yan [et al.] // *Annual Review Biochemistry*. – 2006. – Vol.75. – P.769–790
33. Croce R. Energy transfer pathways in the minor antenna complex CP29 of photosystem II: a femtosecond study of carotenoid to chlorophyll transfer on mutant and WT complexes / R. Croce, M.G. Muller, S. Caffarri [et al.] // *Biophysics Journal*. – 2003. – Vol.84. – P. 2517–2532
34. Cuttriss A.J. Carotenoids / A.J. Cuttriss, B.J. Pogson // *Plant Pigments and Their Manipulation*. – 2004. – Vol.14. – P. 57–91
35. Dainese P. Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem- II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll-a/b binding proteins / P. Dainese, R. Bassi // *Journal Biological Chemistry*. – 1991. – Vol.266. – P.8136-8142
36. Dall'Osto A.A. Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation / A.A. Dall'Osto, L. Morosinotto, R. Bassi, [et al.] // *Journal Biological Chemistry*. – 2007. – Vol.282. – P.8947–8958
37. Dall'Osto A.A. Reactive oxygen species and transcript analysis upon excess light treatment in wild-type *Arabidopsis thaliana* vs a photosensitive mutant lacking zeaxanthin and lutein / A.A. Dall'Osto, L.A.A. Carillo, P. Roncaglia, [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2011. – Vol.11. – P.62–70
38. Dall'Osto L. A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna

- protein CP26 / L. Dall'Osto, S. Caffarri, R. Bassi // *Plant Cell*. – 2005. – Vol.17. – P.1217–1232
39. Dall'Osto L. Different roles of  $\alpha$ - and  $\beta$ -branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection / L. Dall'Osto, A. Fiore, S. Cazzaniga [et al.] // *Journal Biological Chemistry*. – 2007. – Vol.282. – P.35056–35068
40. Domonkos I. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis / I. Domonkos, M. Kis, Z. Gombos [et al.] // *Progress in Lipid Research*. – 2013. – Vol.52. – P.539–561
41. Efeoglu B. Photosynthetic responses of two wheat varieties to high temperature / B. Efeoglu, S. Terzioglu // *EurAsia J BioSci*. – 2009. – Vol. 3. – P. 97-106
42. Fassioli F. Photosynthetic light harvesting: excitons and coherence / F. Fassioli, R. Dinshaw, P.C. Arpin [et al.] // *Journal Royal Society. Interface*. – 2014. – Vol.11(92). – P.1–22
43. Frank H.A. The photochemistry of carotenoids / Frank H.A. Young A.J., Britton G. [et al.]. – New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 2004. – Vol. 8. – 420 p.
44. Garab G. Selfregulation of the lipid content of membranes by non-bilayer lipid: a hypothesis / G. Garab, K. Lohner, P. Lager [et al.] // *Trends in plant science*. – 2000. – Vol. 5. – P.489–494
45. García-Martín A. Role of Aromatic Phenylalanine Residues in Binding Carotenoid to Light-Harvesting Model and Wild-Type Complexes / A. García-Martín, A. Pazur, B.M. Wilhelm [et al.] // *Journal Molecular Biology*. – 2008. – Vol.382. – P.154–166
46. Golovko T.K. Photosynthetic pigments chemical structure, biological function and ecology / T.K. Golovko, W.I. Gruszecki, M.N.V. Pasad [et. al] – Syktyvkar, 2014. – 448 p.
47. Gounaris K. Monogalactosyldiacylglycerol – the most abundant polar lipid in nature / K. Gounaris, J. Barber // *Trends Biochem Sciences*. – 1983. – Vol.8. – P.378–381.

48. Graham J.E. The biosynthetic pathway for myxol-20 fucoside (myxoxanthophyll) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 / J.E. Graham, D.A. Bryant // *Journal Bacteriology*. – 2009. – Vol. 191. – P. 4485–4492
49. Green B.R. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis / B.R. Green // *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. – 1996. – Vol.47. – P.685–714
50. Grudzinski W. Strong-light-induced yellowing of green microalgae *Chlorella*: A study on molecular mechanisms of the acclimation response / W Grudzinski, I. Krzeminska, R. Luchowski [et al.] // *Algal Research*. – 2016. – Vol. 16. – P. 245–254
51. Grudzinski W. Light-Driven Reconfiguration of a Xanthophyll Violaxanthin in the Photosynthetic Pigment–Protein Complex LHCII: A Resonance Raman Study / W. Grudzinski, E. Janik, J. Bednarska [et al.] // *Journal Physical Chemistry*. – 2016. – In Press. DOI: 10.1021/acs.jpccb.6b01641 \*
52. Gruszecki W.I. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties / W.I. Gruszecki, K. Strzayka // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2005. – Vol.1740.– P. 108–115
53. Gruszecki W.I. Light-induced Change of Configuration of the LHCII-Bound Xanthophyll (Tentatively Assigned to Violaxanthin): A Resonance Raman Study / W.I. Gruszecki, M. Gospodarek, W. Grudzinski [et al.] // *Journal Physical Chemistry B*. – 2009. – Vol.113. – P.2506–2512
54. Härdle W. *Statistical methods for biostatistics and related fields* / W. Härdle, Y. Mori, Ph. Vieu. – Germany : Berlin Springer–Verlag, 2007. – 372 p.
55. Harwood J.L. Involvement of chloroplast lipids in the reaction of plants submitted to stress / J.L. Harwood // *In Advances in Photosynthesis: Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*. ed. P.A. Siegenthaler, N. Murata. – Dordrecht: Kluwer Publishers, 1999. – Vol.6. – 287-302 p.
56. Havaux M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts / Havaux M. // *Trends in plant science. Perspectives*. –1998. – №4. – Vol. 3

57. Havaux M. Temperature dependence of delayed chlorophyll fluorescence in intact leaves of higher plants. A rapid method for detecting the phase transition of thylakoid membrane lipids / M. Havaux, R. Lannoye // *Photosynthesis Research*. – 1983. – Vol.4. – P.257–263
58. Havaux M. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiations at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and its mutants / M. Havaux, K. Kloppstech // *Planta*. – 2001. – Vol.213. – P.953–966
59. Havaux M. Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae / M. Havaux, L. Dall'Osto, R. Bassi // *Plant Physiology*. – 2007. – Vol.145. – P.1506–1520
60. Holt N.E. Understanding of the Mechanism of Nonphotochemical Quenching in Green Plants / N.E. Holt, G.R. Fleming, K.K. Niyogi // *Biochemistry*. – 2004. – Vol.43. – № 26. – P.8282–8289
61. Horton P. Regulation of light harvesting in green plants / P. Horton, A.V. Ruban, R.G Walters // *Plant Physiology*. *Plant Molecular Biology*. – 1996. – Vol.47. – P.655–684
62. Huner N.P.A. Energy balance and acclimation to light and cold / N.P.A. Huner, G. Öquist, F. Sarhan // *Trends in plant science*. – 1998. – Vol. 3, № 6 – P. 224-230
63. Iliaia C. Changes in the Energy Transfer Pathways within Photosystem II Antenna Induced by Xanthophyll Cycle Activity / C. Iliaia, C.D. P. Duffy, M.P. Johnson [et al.] // *Journal Physical Chemistry B*. – 2013. – Vol.117. – P.5841–5847
64. Iliaia C. Origin of Absorption Changes Associated with Photoprotective Energy Dissipation in the Absence of Zeaxanthin / C. Iliaia, M.P. Johnson, C.D.P. Duffy [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol.286. – №1. – P.91–98

65. Ilioaia C. Photoprotection in Plants Involves a Change in Lutein 1 Binding Domain in the Major Light-harvesting Complex of Photosystem II / C. Ilioaia, M.P. Johnson, P.-N. Liao [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – №. 31 – P. 27247–27254\*
66. Isaacson T. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of  $\beta$ -carotene and xanthophylls in plants / T. Isaacson, G. Ronen, D. Zamir [et al.] // *Plant Cell*. – 2002. – Vol.14. – P. 333–342
67. Iwai M. 2,2-Hydroxylase (CrtG) is involved in carotenogenesis of both nostoxanthin and 2-hydroxymyxol 2-fucoside in *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1 / M. Iwai, T. Maoka, M. Ikeuchi [et al.] // *Plant Cell Physiology*. – 2008. – Vol. – 49. – P. 1678–1687
68. Jahns P. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids / P. Jahns, D. Latowski, K. Strzalka // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – 1787. – P. 3–14
69. Jahns P. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II / P. Jahns, A.R. Holzwarth // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol.1817. – P.182–193
70. Jirgens U.J. Orientation of carotenoids in the outer membrane of *Synechocystis* PCC 6714 (Cyanobacteria) / U.J. Jirgens, J. Mintele // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1991 – Vol. 4. – P. 208–212.
71. Johnson M.P. Elevated Zeaxanthin Bound to Oligomeric LHCII Enhances the Resistance of Arabidopsis to Photooxidative Stress by a Lipid-protective, Antioxidant Mechanism / M.P. Johnson, M. Havaux [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol.282. – №31 – P. 22605–22618
72. Kasahara H. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis/ H. Kasahara, A. Hanada, T. Kuzuyama [et al.] // *Journal Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – P.45188–45194

73. Kennis J.T.M. Light harvesting by chlorophylls and carotenoids in the photosystem I core complex of *Synechococcus elongatus*: a fluorescence upconversion study / J.T.M. Kennis, B. Gobets, I.H.M. van Stokkum [et al.] // *Journal Physical Chemistry B*. – 2001. – Vol.105. – P.4485–4494
74. Kirilovsky D. The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria / D. Kirilovsky, C.A. Kerfeld // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol.1817. – P.158–166
75. Kłodawska K. EPR study of thylakoid membrane dynamics in mutants of the carotenoid biosynthesis pathway of *Synechocystis* sp. PCC6803 / K. Kłodawska, M. Przemysław, M. Kis [et. al] // *Acta biochimica polonica*. – 2012. – № 1. – Vol. 59.– P.87–90
76. Kobayashi M. Unusual tetrapyrrole pigments of photosynthetic antennas and reaction centres: specially tailored chlorophylls / M. Kobayashi, M. Akiyama, H. Kise [et al.] // *In chlorophylls and bacteriochlorophylls biochemistry, biophysics, functions and applications*. – Springer Netherlands, 2006. – P. 55–56
77. Koyama.Y. The resonance Raman spectrum of carotenoids as an intrinsic probe for membrane potential. Oscillatory changes in the spectrum of neurosporene in the chromatophores of *Rhodospseudomonas sphaeroides* / Y. Koyama., R.A. Long, W.G. Martin [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1979. – Vol.548. – P.153-160
78. Kulheim C. Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field / C.Kulheim, J. Agren, S. Jansson // *Science*. – 2002. – Vol.297. – P.91–93
79. Lambrev P.H. On the relationship between non-photochemical quenching and photoprotection of Photosystem II / P.H. Lambrev, Y. Miloslavina, P. Jahns [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol.1817. – P. 760–769
80. Latowski D. Odwrocone struktury lipidowe i ich rola w procesach biologicznych / D. Latowski, K. Strzalka // *Kosmos*. – 2007. – Vol. 56. – P.1-8

81. Leivar P. Subcellular localization of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase / P. Leivar, V.M. Gonzalez, S. Castel [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 137. – P. 57–69
82. Lemoine Y. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress / Y. Lemoine, B. Schoefs // *Photosynthetic Research*. – 2010. – Vol.106. – P.155–177
83. Li G. Spin label ESR studies of lipid-protein interactions in thylakoid membranes / G. Li, P.F. Knowles, D.J. Murphy [et al.] // *Biochemistry*. – 1989. – Vol.28. – P.7446–7452
84. Lichtenthaler H.K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants / H.K. Lichtenthaler // *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. – 1999. – Vol.50. – P. 47–65
85. Liu W.L. Effect of  $\beta$ -Ring Rotation on the Structures and the Vibrational Spectra of  $\beta$ -Carotene Density Functional Theory Analysis / Liu W.L., Z.G. Wang, Z.R. Zheng [et al.] // *Journal Physical Chemistry A*. – 2008. – Vol.112. – P.10580–10585
86. Liu Z. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution / Z. Liu, H. Yan, K. Wang, [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol.428. – P.287–292
87. Lohr M. Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: a spotlight on algae / M. Lohr, J. Schwender, J.E.W. Polle // *Plant Science*. – 2012. – Vol.185. – P. 9–22
88. Lokstein H. Chlorophyll-Binding Proteins / H. Lokstein, B. Grimm // *John Wiley & Sons*. – 2013. – Vol.10. – P.1-10
89. Los D.A. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals / D.A. Los, N. Murata // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2004. – Vol.1666. – P.142–157
90. Ma X. Growth, physiological, and biochemical responses of *Camptotheca acuminata* seedlings to different light environments / X. Ma, L. Song, W. Yu [et al.] // *Front Plant Science*. – 2015. – Vol.6. – P.321–335



91. MacColl R. Cyanobacterial Phycobilisomes / R. MacColl // Journal Structural Biology. – 1998. – Vol. 124. – P. 311–334.
92. Makino T. Characterization of cyanobacterial carotenoid ketolase CrtW and hydroxylase CrtR by complementation analysis in *Escherichia coli* / T. Makino, H. Harada, H. Ikenaga [et al.] // Plant Cell Physiology. – 2008. – Vol. 49. – P.1867–1878
93. Maksimov E.G. Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants / E.G. Maksimov, F.I. Kuzminov, I.V. Konyuhov [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2011. – Vol.104. – P.285–291
94. Mar T. Induction kinetics of delayed light emission in spinach chloroplasts / T. Mar, J. Brebner, G. Roy // Biochim. Biophys. Acta. – 1975. – Vol. 376. – P. 345-353
95. Marin A. Minor complexes at work: light-harvesting by carotenoids in the photosystem II antenna complexes CP24 and CP26 / A. Marin, F. Passarini, I.H. van Stokkum [et al.] // Biophysics Journal. – 2011. – Vol.100. – P. 2829–2838
96. Masamoto K. Identification of a gene required for cis-to-trans carotene isomerization in carotenogenesis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 / K.Masamoto, H. Wada, T. Kaneko [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2001. – Vol. 42. – P. 1398-402
97. Merlin J. C. Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid-containing systems / J.C. Merlin // Pure & Application Chemistry. – 1985. – Vol. 57. – №5. – P. 785–792
98. Mironov K.S. Light-dependent cold-induced fatty acid unsaturation, changes in membrane fluidity, and alterations in gene expression in *Synechocystis* / K.S. Mironov, R.A. Sidorov, M.S. Trofimova [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2012. – Vol. 1817(8). – P.1352–1359

99. Morosinotto T. Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and in vitro during operation of the xanthophyll cycle / T. Morosinotto, R. Baronio, R. Bassi // *Journal Biological Chemistry*. – 2002. – Vol.277. – P. 36913–36920
100. Mozzo M. Photoprotection in the antenna complexes of photosystem II: role of individual xanthophylls in chlorophyll triplet quenching / M. Mozzo, L. Dall'Osto, R. Hienerwadel [et al.] // *Journal Biological Chemistry*. – 2008. – Vol.283. – P.6184–6192
101. Mullineaux C.W. State 1-State 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between Photosystems I and II / C.W. Mullineaux, J.F. Allen // *Photosynthesis Research*. – 1990. – Vol. 23. – P.297–311
102. Mullineaux C.W. The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool / C.W. Mullineaux, J.F. Allen // *Febs Letters*. – 1986. – Vol.205 (1). – P.155–160
103. Nagata N. Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the nonmevalonate pathway / N. Nagata, M. Suzuki, S. Yoshida [et al.] // *Planta*. – 2002. – Vol. 216. – P. 345–350
104. Nelson N. The complex architecture of oxygenic photosynthesis / Nelson N., Shem B. // *Nature*. – 2004. – Vol.5. – P.1-12
105. Nilkens M. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis* / M. Nilkens, E. Kress, P. Lambrev [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol.1797. – P. 466–475
106. Niyogi K.K. *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion /

- K.K.Niyogi, A.R. Grossman, O. Bjorkman // *Plant Cell*. – 1998. – Vol.10. – P.1121–1134
107. Okada K. Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in *Arabidopsis* / K. Okada, H. Kasahara, S. Yamaguchi [et al.] // *Plant Cell Physiology*. – 2008. – Vol. 49. – P.604–616
108. Ono T. Chilling-susceptibility of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. III. Lipid phase of cytoplasmic membrane / T. Ono, N. Murata // *Plant Physiology*. – 1982. – Vol.69. – P.125-129
109. Pali T. Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes / T. Pali, G. Garab, L.I. Horvath [et al.] // *Cellular and molecular life science*. – 2003. – Vol.60. – P. 1591–1606
110. Peterman E.J. Chlorophyll a and carotenoid triplet states in light-harvesting complex II of higher plants / E.J. Peterman, F.M. Dukker, R. van Grondelle [et al.] // *Biophysics Journal*. – 1995. – Vol.69. – P. 2670–2678
111. Pinnola A. Zeaxanthin Binds to Light-Harvesting Complex Stress-Related Protein to Enhance Nonphotochemical Quenching in *Physcomitrella patens* / A. Pinnola, L. Dall'Osto, C. Gerotto [et al.] // *The Plant Cell*. – 2013. – Vol.25. – P. 3519–3534
112. Polivka T. Ultrafast Dynamics of Carotenoid Excited States—From Solution to Natural and Artificial Systems / T. Polivka, V. Sundstrom // *Chemistry Review*. – 2004. – Vol.104. – P.2021–2071
113. Punginelli C.A. Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the Orange Carotenoid Protein / C.Punginelli, A. Wilson, J.-M. Routaboul [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – Vol.1787. – P. 280–288
114. Quesada A. Community and pigment structure of Arctic cyanobacterial assemblages: the occurrence and distribution of UV-absorbing compounds / A. Quesada, W.F. Vincent, D.R.S. Lean // *Microbiology Ecology*. – 1999. – Vol. 28. – P.315–323

115. Radenovic C.N. A kinetic study of delayed fluorescence induction and its dependence on preceding darkness / C.N. Radenovic, D. Fidler, Z. Vucinic [et al.] // *Periodical Biology*. – 1985. – Vol.87. – P.304–306
116. Radenovic C.N. Delayed chlorophyll fluorescence in plant models / C.N. Radenovic, D. Markovic, C. Jeremi [et al.] // *Photosynthetica*. – 1994. – Vol.30. – P. 1–24
117. Radenovic C.N. Photosynthetic properties of elite erect leaf maize inbred lines and their contribution to seed production improvement / C.N. Radenovic, Z. Hojka, D.Selakovic [et al.] // *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska*. – 2004. – Vol.106. – P.45–50
118. Radosavljevic M. Physical and chemical properties of various corn genotypes as a criterion of technological quality / M. Radosavljevic, V. Bekric, I. Bozovic [et al.] // *Genetika*. – 2000. – Vol.32 (3). – P. 319–329
119. Rakhimberdieva M.G. Carotenoid-triggered energy dissipation in phycobilisomes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 diverts excitation away from reaction centers of both photosystems / M.G. Rakhimberdieva, I.V. Elanskaya, W.F.J. Vermaas [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol.1797. – P. 241–249
120. Rippka R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria / R. Rippka, D. Deruelles, J. B. Waterbury [et. al] // *Journal Genetically Microbiology*. – 1979. – Vol.111. – P. 1–61
121. Rohmer M. From molecular fossils of bacterial hopanoids to the formation of isoprene units: discovery and elucidation of the methylerythritol phosphate pathway / M. Rohmer // *Lipids*. – 2008. – Vol.43. – P.1095–1107
122. Ruban A.V. Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes / A.V. Ruban, P.J. Lee, W.M. Young [et al.] // *Journal Biological Chemistry*. – 1999. – Vol.274. – P.10458–10465

123. Ruban A.V. Configuration and Dynamics of Xanthophylls in Light-harvesting Antennae of Higher Plants Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex of photosystem II and thylakoid membranes / A.V. Ruban, A.A. Pascali, B. Robert [et al.] // *The journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – №27. – Iss.6. – P.24862–24870
124. Ruban A.V. Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants / A.V. Ruban, R. Berera, C. Iliaia [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol.450. – P.22–31
125. Rubin A.B. Some kinetic properties of electron transfer processes on the primary photosynthesis reaction / A.B. Rubin, A.A. Focht, P.S. Venediktov // *Transact. Moscow Soc. Nat.* – 1988. – Vol.28. – P. 172–174
126. Samek O. Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids in vivo / O. Samek, A. Jonáš, Z. Pilát [et al.] // *Sensors*. – 2010. – Vol.10. – P.8635–8651
127. Sandmann G. Evolution of carotene desaturation: the complication of a simple pathway / G. Sandmann // *Arch. Biochemistry Biophysics*. – 2009. – Vol. 483. – P.169–174
128. Schaller S. The main thylakoid membrane lipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) promotes the de-epoxidation of violaxanthin associated with the light-harvesting complex of photosystem II (LHCII) / S. Schaller, D. Latowski, M. Jemioła-Rzemińska [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol.1797. – P.414–424
129. Schaller S. Investigating the interaction between the violaxanthin cycle enzyme zeaxanthin epoxidase and the thylakoid membrane / S. Schaller, C. Wilhelm, K. Strzałka [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – Vol.114. – 2012. – P. 119–125
130. Scheer H. An Overview of chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications. In *Advances in Photosynthesis and Respiration* / Ed. B. Grimm, R.J. Porra, W. Rüdiger [et

- al.]: New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer, 2006. – Vol. 16. – P. 1-26
131. Schrader B. Non-destructive NIR-FT-Raman spectroscopy of plant and animal tissues, of food and works of art / B. Schrader, H. Schulz, G.N. Andreev [et al.] // *Talanta*. – 2000. – Vol.53. – P.35–45
132. Schulz H. Potential of NIR-FT-Raman Spectroscopy in Natural Carotenoid Analysis / H. Schulz, M. Baranska, R. Baranski // *Biopolymers*. – 2005. – Vol.77. – P.212–221
133. Schulz H. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy / H. Schulz, M. Baranska // *Vibrational Spectroscopy*. – 2007. – Vol.43. – P.13–25
134. Sen A. The structure and thermotropic properties of pure 1,2-diacylgalactosylglycerols in aqueous systems / A. Sen, W.P. Williams, P.J. Quinn // *Biochimica Biophysica Acta*. – 1981. – Vol.663. – P. 380–389
135. Sheng J. Effects of temperature shifts on growth rate and lipid characteristics of *Synechocystis* sp. PCC6803 in a bench-top photobioreactor / J. Sheng, H.W. Kim, J.P. Badalamenti [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol.102. – P.11218–11225
136. Snyder A.M. Carotenoid Specificity of Light-harvesting Complex II Binding Sites / A.M. Snyder, B. M. Clark, B. Robert [et al.] // *The journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol.279. – №7. – Iss.13. – P. 5162–5168
137. Somersalo S. Photoinhibition at chilling temperatures. Fluorescence characteristics of unhardened and cold-hardened spinach leaves / S. Somersalo, G.H. Krause // *Planta*. – 1989. – Vol. 177. – P.409-416
138. Song Y. Effects of high temperature on photosynthesis and related gene expression in poplar / Y. Song, Q. Chen, D. Ci // *BMC Plant Biology*. – 2014. – Vol. 14 (111). – P. 1-20
139. Sozer O. Involvement of Carotenoids in the Synthesis and Assembly of Protein Subunits of Photosynthetic Reaction Centers of *Synechocystis* sp.

- PCC 6803 / O. Sozer, J. Komenda, B. Ughy [et al.] // *Plant Cell Physiology*. – 2010. – Vol.51(5). – P.823–835
140. Steiger S. High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 / S. Steiger, L. Schaefer, G. Sandmann // *Journal Photochemistry Photobiology. B: Biology*. – 1999. – Vol.52. – P. 14–23
141. Sundstrom V. *Femtobiology* / V. Sundstrom // *Annual Review Physical Chemistry*. – 2008. – Vol.59. – P.53–77
142. Sverdlov L.M. *Vibrational spectra of polyatomic molecules* / L.M. Sverdlov, M.A. Konver, E.P. Marginal. – Moscow: Nauka, 1970. P. 213
143. Takaichi S. Presence of free myxol and 4- hydroxymyxol and absence of myxol glycosides in *Anabaena variabilis* ATCC 29413, and proposal of a biosynthetic pathway of carotenoids / S. Takaichi, M. Mochimaru, T. Maoka // *Plant Cell Physiology*. – 2006. – Vol. 47. – P.211–216
144. Takaichi S. Myxol and 4-ketomyxol 20- fucosides, not rhamnosides, from *Anabaena* sp. PCC 7120 and *Nostoc punctiforme* PCC 73102, and proposal for the biosynthetic pathway of carotenoids / S. Takaichi, M. Mochimaru, T. Maoka [et al.] // *Plant Cell Physiology*. – 2005. – Vol. 46. – P.497–504
145. Takaichi S. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides / S. Takaichi, M. Mochimaru // *Cell Molecular Life Science*. – 2007. – Vol. 64. – P. 2607–2619
146. Takaichi S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions / S.Takaichi // *Marine Drugs*. – 2011. – Vol.9. – P.1101-1118
147. Takaichi S. Opposite chirality of b-carotene in unusual cyanobacteria with unique chlorophylls *Acaryochloris* and *Prochlorococcus* / S. Takaichi, M. Mochimaru, H. Uchida [et al.] // *Plant Cell Physiology*. – 2012. – Vol.53. – P.1881–1888

148. Telfer A. Too much light? How b-carotene protects the photosystem II reaction centre / A. Telfer // *Photochemistry Photobiology Science*. – 2005. – Vol.4. – P.950–956
149. Theg S.M. *Advances in Plant Biology* / S.M. Theg, F.-A. Wollman – New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer, 2014. – Vol. 5. – 585 p.
150. Vasilev A. *Infrared spectroscopy of organic and natural products* / A. Vasilev, E.V. Hriyenko, A.O. Shchukin. – St. Petersburg: Nauka, 2007. 30 p.
151. Vermaas W.F.J. In vivo hyperspectral confocal fluorescence imaging to determine pigment localization and distribution in cyanobacterial cells / W.F.J. Vermaas, J.A. Timlin, H.D.T. Jones [et al.] // *PNAS*. – 2008. – Vol.105. – Iss.10. –P.4050–4055
152. Wada H. Temperature-induced Changes in the Fatty Acid Composition of the Cyanobacterium *Synechocystis PCC68031* / H. Wada, N. Murata // *Plant Physiology*. – 1990. – Vol.92. – P.1062-1069
153. Wada N. Multiple Roles of Photosynthetic and Sunscreen Pigments in Cyanobacteria Focusing on the Oxidative Stress / N. Wada, T. Sakamoto, S. Matsugo // *Metabolites*. – 2013. – Vol.3. – P. 463–483
154. Wraight. C.A. Delayed fluorescence and the highenergy state of chloroplasts / C.A. Wraight, A.T. Crofts // *European Journal Biochemistry*. – 1971. – Vol.19. – P. 386-397.
155. Xu P. Molecular insights into Zeaxanthin-dependent quenching in higher plants / P. Xu, L. Tian, M. Klotz [et al.] // *Nature. Scientific Reports*. – 2009. – Vol.5. – P. 1-20
156. Yu Q. Plant carotene cis–trans isomerase CRTISO: a new member of the FAD(RED)-dependent flavoproteins catalyzing non-redox reactions / Q. Yu, S. Ghisla, J. Hirschberg [et al.] // *Journal Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – P. 8666–8676



157. Zaks J. Models and measurements of energy-dependent quenching / J. Zaks, K. Amarnath, E.J. Sylak-Glassman // *Photosynthesis Research*. – 2013. – Vol.116. – P. 389–409
158. Zankel K.L. Rapid delayed luminescence from chloroplasts: kinetic analysis of components; the relationship to the O<sub>2</sub> evolving system / K.L. Zankel // *Biochimica Biophysica. Acta*. – 1972. – Vol.245. – P. 373–385
159. Zapata M. Chlorophyll c pigments: current status / M. Zapata, J.L. Garrido, S.W. Jeffrey // *In chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications*. Springer Netherlands, 2006. – P. 39-53
160. Zhou J. Manipulation of the Xanthophyll Cycle Increases Plant Susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum*/J. Zhou, L. Zeng, J. Liu, [et al.]/*PLOS Pathogens*. – 2015. – Vol.11(5). – 1-25 p