

На правах рукописи

Ветошкина Дарья Васильевна

РОЛЬ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В АДАПТАЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО  
АППАРАТА К УСЛОВИЯМ ОСВЕЩЕНИЯ

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пушино – 2016 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН)

Научные руководители: доктор биологических наук  
**Иванов Борис Николаевич**  
кандидат биологических наук  
**Борисова Мария Мансуровна**

Официальные оппоненты: **Мамедов Махир Джафар оглы,**  
доктор биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования «Московский  
государственный университет им. М.В. Ломоносова»,  
Научно-исследовательский институт физико-химической  
биологии им. А. Н. Белозерского, отдел биоэнергетики,  
лаборатория электрогенных процессов, ведущий научный  
сотрудник

**Тютерева Елена Владимировна,**  
кандидат биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
Науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова  
Российской академии наук, лаборатория экологической  
физиологии, научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

Защита состоится 25 ноября 2016 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.066.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук по адресу: 142290, г. Пущино, Московская область, ул. Институтская, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИФПБ РАН (<http://www.ibbp.psn.ru/>).

Автореферат разослан «    » сентября 2016 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Галина Николаевна Назарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В ходе своей жизни растения постоянно сталкиваются с изменениями в условиях окружающей среды, что привело к формированию у них множества механизмов адаптации, в том числе и в фотосинтетическом аппарате. Известно, что при изменении освещенности растений оптимизация фотосинтетической активности на стадии поглощения энергии квантов света происходит за счет изменений в функционировании светособирающих комплексов. Механизм кратковременной адаптации, *state transitions*, запускается в первые минуты освещения, а механизм долговременной адаптации включается при длительном воздействии измененной освещенности, более трех дней. Процесс *state transitions* заключается в миграции части светособирающей антенны фотосистемы 2 между фотосистемой 2 и фотосистемой 1, что приводит к перераспределению световой энергии между ними. При долговременной адаптации к условиям повышенной освещенности происходит уменьшение размера антенны фотосистемы 2 за счет подавления биосинтеза периферических белков антенны, что приводит к уменьшению количества поглощенных квантов света, что позволяет избежать фотоингибирования и оптимизирует работу фотосинтетического аппарата. До настоящего времени оставалось неизвестным, подавление какого именно этапа биосинтеза белков, транскрипции или трансляции, приводит к уменьшению размера антенны фотосистемы 2 при долговременной адаптации к повышенной освещенности.

Многократно показано, что механизм кратковременной адаптации и механизм долговременной адаптации запускаются изменениями в окислительно-восстановительном состоянии пула пластохинона – центрального звена переноса электронов в фотосинтетический электрон-транспортной цепи. Молекулярная природа сигнала, поступающего из пула пластохинона и инициирующего эти адаптационные изменения, оставалась до сих пор невыясненной.

Активные формы кислорода, в частности пероксид водорода, играют важную роль в различных сигнальных путях. В частности, АФК, образованные в хлоропластах, могут влиять на экспрессию ядерных генов. Ранее было показано, что образование пероксида водорода может происходить внутри тилакоидной мембраны и предположено, что молекулы  $H_2O_2$  образуются в реакции супероксидного радикала с дважды восстановленным пластохиноном, пластогидрохиноном. Пероксид водорода, образованный при участии пула пластохинона, мог бы выполнять сигнальную функцию, передавая информацию об окислительно-восстановительном состоянии пула пластохинона.

Таким образом, оставался целый ряд вопросов, касающихся развития адаптационных изменений фотосинтетического аппарата при приспособлении к изменениям интенсивности действующего света, который поглощается фотосинтетическим аппаратом.

Цель и задачи работы. Целью работы являлось исследование роли пероксида водорода в адаптации растений к условиям освещения, осуществляемой посредством изменений в функционировании светособирающих комплексов, таких как: механизм кратковременной адаптации, *state transitions*, который заключается в миграции части светособирающей антенны фотосистемы 2 между фотосистемой 2 и фотосистемой 1, и механизм долговременной адаптации, который заключается в уменьшении размера антенны фотосистемы 2 за счет подавления биосинтеза периферических белков антенны.

Задачи, поставленные в работе:

- Установить, происходит ли образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны при скоростях электронного транспорта, близких к физиологическим.
- Определить роль пероксида водорода в уменьшении размера антенны фотосистемы 2 при адаптации к долговременной повышенной освещенности.
- Определить, существует ли корреляция между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием процесса state transitions.

Научная новизна. В работе впервые было показано, что образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны происходит при скоростях электронного транспорта близких к физиологическим. Представлены доказательства того, что в этом случае пероксид водорода образуется в результате реакции пластогидрохинона с супероксидным радикалом. Показано, что пероксид водорода выполняет сигнальную роль в уменьшении размера антенны ФС2 в ходе долговременной адаптации к повышенной освещенности, которая происходит за счет уменьшения экспрессии генов, кодирующих белки светособирающей антенны ФС2. Представлены различия в регуляции протекания state transitions в двух видах растений при изменении интенсивности действующего света. Найдено, что увеличение количества пероксида водорода в листьях коррелирует с отсутствием перехода фотосинтетического аппарата из состояния 2 в состояние 1.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в работе данные об участии пероксида водорода в регуляции размера антенны фотосистемы 2 расширяют знания о сигнальных путях в высших растениях и открывают перспективы для выяснения детального механизма передачи сигнала от хлоропласта к ядру, необходимого для оптимизации уровня экспрессии ядерных генов. Эти знания могут иметь практическое значение для понимания того, как растения приспосабливаются к изменениям в окружающей среде.

Разработаны экспериментальные подходы, позволяющие регулировать количество пероксида водорода в листьях, что может быть в дальнейшем использовано при исследовании роли пероксида водорода в различных процессах.

В ходе диссертационной работы был разработан методический подход, позволяющий оценить протекание state transitions на целых растениях с помощью измерений кинетики релаксации нефотохимического тушения после освещения.

Показаны видовые отличия в протекании state transitions, что необходимо учитывать при изучении этого процесса в различных объектах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны происходит при скоростях электронного транспорта, близких к физиологическим, и является результатом протекания реакции между пластохигидрохиноном и супероксидным радикалом.
2. Пероксид водорода выполняет сигнальную роль в ходе долговременной адаптации к повышенной освещенности; происходящее при этой адаптации уменьшение размера антенны фотосистемы 2 происходит за счет уменьшения уровня экспрессии генов, кодирующих белки светособирающей антенны фотосистемы 2.
3. Разработан экспериментальный подход, основанный на исследовании релаксации нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* после освещения, позволяющий выявить протекание процесса state transitions в листьях.

4. При увеличении интенсивности света до 600 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с в листьях арабидопсиса полностью перестает протекать state transitions, в то время как в листьях ячменя при этой интенсивности света state transitions происходит.
5. Увеличение количества пероксида водорода в листьях приводит к ингибированию возвращения светособирающих белков (L-тример) от ФС1 к ФС2 в процессе state transitions.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: The 17th International Congress on Photosynthesis Research (постер), 4th International Symposium on Plant Signaling and Behavior 2016 (постер), "Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений", посвященная 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (устный доклад), 12th International conference on reactive oxygen and nitrogen species in the plants: from model systems to field (постер), Oxidative stress conference (постер), VII Конгресс Российского общества фотобиологов (устный доклад), школа-конференция для молодых ученых ИФПБ РАН (устный доклад), «Экотоксикология» (устный доклад), современные проблемы Биофизических сложных систем (постер), 17-ая Международная Пущинская школа-конференция для молодых ученых (постер).

Личный вклад соискателя. Исследования по теме диссертации были проведены соискателем самостоятельно. Автор участвовал в решении всех экспериментальных задач, обработке полученных результатов и формулировке выводов.

Публикации. По результатам работы опубликовано 8 печатных работ, в том числе 5 статей: 2 в реферируемых научных российских журналах, 1 в реферируемом научном зарубежном журнале, 2 в других журналах и 3 в материалах конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 127 страницах, содержит 6 таблиц, 46 рисунков. Список литературы содержит 303 источника.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы составляет первую часть диссертации. В нем изложены основные современные сведения о строении и функционировании фотосинтетической электрон-транспортной цепи высших растений. Описаны адаптационные изменения, происходящие в организации светособирающих антенн ФС2 и ФС1, при кратковременном и долговременном освещении светом высокой интенсивности. Описана регуляторная роль пула пластохинона в этих процессах. Представлены механизмы образования активных форм кислорода в хлоропластах. Приводится анализ имеющихся к настоящему моменту данных об участии STN7 киназы и в кратковременной, и в долговременной адаптации.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования были растения: 1) гороха посевного (*Pisum sativum*), выращенные в оранжерее, интенсивность света выращивания – 100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с; 2) ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*), выращенные в климатической камере при t=20°C, при различной интенсивности света, светопериоде 8/16 часов (день/ночь) или при постоянном освещении (см. Результаты и обсуждение); 3) арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) экотип Columbia и мутантные растения арабидопсиса с заблокированным синтезом STN7 киназы.

Мутантные растения были получены из лаборатории Dario Leister. Выделение тилакоидов из листьев ячменя проводили, как описано в Bassi et al., 1985. Выделение тилакоидов из листьев арабидопсиса проводили, как описано ранее (Ignatova et al., 2011). Выделение тилакоидов из листьев гороха проводили, как описано ранее (Khorobrykh, Ivanov, 2002).

Флуоресценция хлорофилла *a* была измерена, используя флуориметры PAM-101 и miniPAM, (Walz, Германия), после предварительной адаптации листьев или суспензии тилакоидов к темноте. Эффективный квантовый выход ( $Y$ ) и коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* ( $qN$ ) были рассчитаны по следующим формулам:  $Y = (F_m' - F_s) / F_m'$  и  $qN = (F_m - F_m') / (F_m - F_0')$ , где  $F_m$  – максимальный уровень флуоресценции в ответ на подачу вспышки насыщающего света (8000 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с, продолжительность вспышки – 0.8 с) на адаптированном к темноте объекте.  $F_s$  – стационарный уровень флуоресценции при включенном актиничном свете.  $F_m'$  – максимальный уровень флуоресценции в ответ на подачу насыщающей вспышки, подаваемой в ходе стационарного освещения актиничным светом.  $F_0'$  – уровень флуоресценции сразу после выключения действующего света. Относительный уровень восстановления ПХ-пула оценивали согласно Tullberg et al., (2000) по формуле  $1 - (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ . Относительный уровень восстановления ПХ-пула в присутствии ксантин/ксантиноксидазной системы измеряли на 80-ой секунде освещения, интенсивность света – 100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с. Для генерации супероксидного радикала использовали систему, состоящую из 200 мкМ ксантина и 0,12 ед/мл ксантиноксидазы. Для исследования релаксации коэффициента нефотохимического тушения ( $qN$ ) подавали вспышки насыщающего света на 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 и 24 минутах после освещения. Для инкубации с NaF листья ячменя или листья арабидопсиса прокалывали с нижней стороны, оставляя целым верхний слой листа. Проколотой стороной лист помещали в чашку Петри, содержащую 15мМ NaF и инкубировали в темноте в течение 1 часа.

ОЛР-кинетики записывали с помощью флуориметра, оснащенного синим светодиодом и кремниевым фотодиодом (Kreslavski et al., 2014). Для измерения использовали синий свет.

Для оценки уровня экспрессии генов, кодирующих белки светособирающей антенны фотосистемы 2, из листьев, замороженных в жидком азоте, с помощью Aurum total RNA mini Kit (Bio Rad, США) экстрагировали тотальную РНК и обрабатывали ДНКазами для предотвращения контаминации геномной ДНК. Затем 400 нг каждого РНК образца использовали для обратной транскрипции с помощью BioRad iScript reverse transcription supermix reagents. Количественная ОТ-ПЦР была проведена в трех независимых повторностях. Данные были нормализованы по экспрессии гена актина. ПЦР реакцию проводили с помощью IQ5 cyclor (Bio Rad, США).

Денатурирующий электрофорез проводили согласно Schagger and von Jagow (1987) в 12-18% градиентном полиакриламидном геле, используя трис-трициновый буфер. Для визуализации белковых полос гели инкубировали в течение 2-3 часов в 0,25% растворе кумасси G-250, который диффундировал в гель и прочно связывался с белками. Отмывку фонового окрашивания проводили в среде, содержащей 96% этанол и 10% уксусную кислоту в течение 1-2 дней, периодически заменяя раствор свежим до тех пор, пока общий фон геля не становился значительно светлее окрашенных белковых полос (Остерман, 1981).

Для оценки количества белков с помощью вестерн-блот анализа тилакоиды разделяли, как описано ранее (Ballottari et al., 2004). Результаты реакции с антителами оценивали с помощью

денситометрии Gel-Pro Analyser 3.1. Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit был использован для визуализации белковых полос.

Оценку скорости поглощения/выделения кислорода суспензией тилакоидов проводили с помощью закрытого электрода кларковского типа.

Восстановление цитохрома *c* в суспензии тилакоидов измеряли по увеличению поглощения при длине волны 550 нм по сравнению с 540 нм. Для измерения использовался двухволновой спектрофотометр (Hitachi 557, Япония).

Измерение количества пероксида водорода было основано на перекисном окислении люминола (Cormier and Prichard, 1968). Листья (50-100 мг) замораживали в жидком азоте, растирали в 0.4 мкл 2М трихлоруксусной кислоты. Экстракцию пероксида водорода проводили с помощью 3 мл 0.05 М К-фосфатного буфера (pH 8.5). Для удаления пигментов суспензию инкубировали в течение 1 часа с активированным углем (250 мг). Далее центрифугировали 20 мин  $10\ 000 \times g$ . Супернатант отбирали и титровали с помощью 2М КОН до pH 8.5. Для определения содержания пероксида водорода использовали 50 мкл полученного экстракта, к которому с помощью дозатора вносили 1 мл смеси люминола ( $2,26 \times 10^{-4}$  М) и пероксидазы ( $1 \times 10^{-6}$  М). Для построения калибровочной кривой использовали растворы пероксида водорода с известной концентрацией.

Измерение спектров низкотемпературной флуоресценции проводили на целых листьях ячменя или арабидопсиса. Лист помещали в специальную «лопатку», в которой образец замораживался и затем измерялся в жидком азоте при 77К. Измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi 850 при длине волны возбуждения флуоресценции 435 нм. С помощью полученных спектров низкотемпературной флуоресценции для каждого образца определяли отношение максимумов флуоресценции хлорофилла *a*, входящего в состав ФС1 или ФС2 (ФС1/ФС2). За «0» принимали отношение пиков флуоресценции ФС1/ФС2, измеренное сразу после темновой адаптации. Для инициации перехода в state 2 был использован свет, возбуждающий предпочтительно ФС2, для чего использовали интерференционный светофильтр ( $\lambda = 647$  нм). Для каждого варианта эксперимента было проведено более 5 независимых измерений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны при участии компонентов ПХ-пула.**

Ранее образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны было показано на изолированных тилакоидах без добавления акцепторов (Мубаракшина и др., 2006; Mubarakshina *et al.*, 2006; Borisova-Mubarakshina *et al.*, 2012): в таких условиях кислород является единственным акцептором электронов от фотосинтетической электрон-транспортной цепи и скорости переноса электронов по цепи гораздо ниже потенциально возможных. В данной работе был использован эффективный акцептор электронов метилвиологен (МВ), который акцептирует электроны от компонентов ФС1 –  $F_A/F_B$  – и переносит их к кислороду ( $k = 8 \times 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ), образуя супероксидный радикал.

Для оценки образования пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны был использован подход, предложенный в работе (Mubarakshina *et al.*, 2006). Данный подход основан на использовании цитохрома *c*, водорастворимого белка, который действует как ловушка

супероксидных радикалов, окисляя их до  $O_2$ . Цитохром *c* не способен проникать внутрь тилакоидной мембраны и предотвращает образование пероксида водорода в водной фазе тилакоидной суспензии. Для того, чтобы цитохром *c* улавливал все супероксидные радикалы, образованные вне тилакоидной мембраны, необходимо использовать его в значительных количествах, т.е. в насыщающей концентрации. В присутствии 1 мкМ МВ при концентрации цитохрома *c* равной 40 мкМ, цитохром *c* улавливал все супероксидные радикалы. Для экспериментов был использован 60 мкМ цитохром *c*.

Добавка каталазы к суспензии тилакоидов в присутствии 1 мкМ МВ и 60 мкМ цитохрома *c* при низкой интенсивности света не оказывала влияния на скорость выделения кислорода (рис. 1 а vs б, белые столбики). Тогда как при высокой интенсивности света приводила к значительному увеличению скорости выделения кислорода (рис. 1 а vs б, серые столбики). Результаты показали, что при высокой интенсивности света, даже в присутствии МВ, пероксид водорода образуется внутри тилакоидной мембраны. Разница между скоростями выделения кислорода в присутствии и отсутствие каталазы (рис. 1) может быть использована для оценки количества пероксида водорода, образованного внутри тилакоидной мембраны. На высоком свету скорость образования пероксида водорода внутри мембраны составила  $38 \pm 4$  мкмоль  $H_2O_2$ /мг Хл час (рис. 1). Если скорость образования пероксида водорода в отсутствие цитохрома *c* принять за 100%, то образование пероксида внутри мембраны составит 30%.

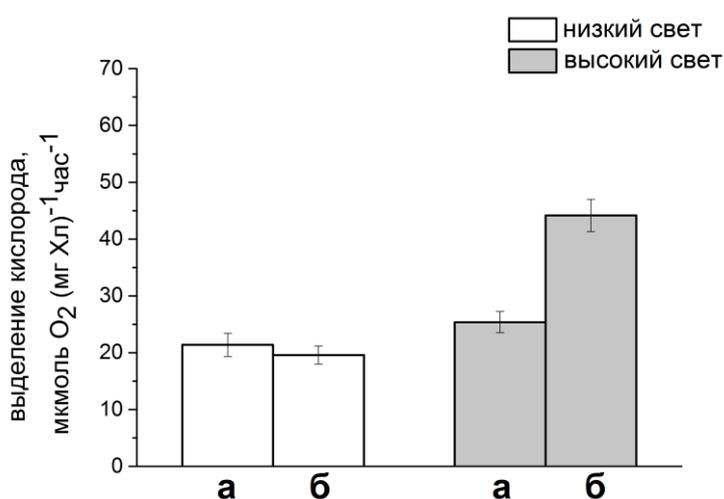


Рисунок 1. Влияние интенсивности света на скорость выделения кислорода в отсутствие (а) и в присутствии (б) 100 ед/мл каталазы. Реакционная среда содержала 1 мкМ МВ и 60 мкМ цитохром *c*. Белые столбики интенсивность света — 25 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с, серые столбики — интенсивность света 180 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с. Результаты представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Для проверки предположения о том, что пероксид водорода в тилакоидной мембране образуется в результате реакции между пластогидрохиноном (ПХН<sub>2</sub>) и супероксидным радикалом ( $O_2^{\bullet-}$ ):  $O_2^{\bullet-} + ПХН_2 = H_2O_2 + ПХ^{\bullet-}$  была использована ксантин/ксантиноксидазная система, которую добавляли к суспензии тилакоидов.

Добавка ксантин/ксантиноксидазной системы не оказывала деструктивного влияния на фотосинтетический аппарат, что видно по одинаковым значениям максимальных квантовых выходов ( $F_v/F_m$ ) и в присутствии ксантина и ксантиноксидазы, и в присутствии только ксантина (табл. 1). Более того, похожие значения максимальных квантовых выходов наблюдались в двух этих вариантах после освещения, что свидетельствует об отсутствии негативного эффекта супероксидного радикала, образованного ксантин/ксантиноксидазной системой, на фотосинтетический аппарат.

Таблица 1. Максимальный квантовый выход до включения действующего света (Fv/Fm), степень восстановления ПХ-пула на 80-ой секунде освещения и максимальный квантовый выход в темноте после освещения (Fv/Fm после освещения). Интенсивность действующего света 100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с. Концентрация хлорофилла 100 мкг/мл. Все измерения проводили в присутствии 1 мМ феррицианида калия и 5 мкМ грамицидина D. Результаты представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего.

Добавки	Fv/Fm в темноте	Относительный уровень восстановления ПХ-пула	Fv/Fm в темноте после освещения
тилакоиды+ксантин	0,63±0,002	0,50±0,006	0,60±0,001
тилакоиды+ксантин + ксантиноксидаза	0,62±0,003	0,41±0,005	0,59±0,002
тилакоиды+ксантин +БСА	0,64±0,010	0,38±0,002	0,58±0,016
тилакоиды+ксантин + ксантиноксидаза+БСА	0,64±0,001	0,37±0,003	0,59±0,001

Было найдено, что степень восстановления ПХ-пула уменьшалась примерно на 18% при добавке ксантин/ксантиноксидазной системы к тилакоидам (табл. 1). Для того, чтобы определить, связан ли наблюдаемый эффект с тем, что ксантин/ксантиноксидазная система генерирует супероксидный радикал в непосредственной близости от пластогидрохинона, что делает возможной реакцию между пластогидрохиноном и супероксидным радикалом, к суспензии тилакоидов добавляли бычий сывороточный альбумин (БСА). БСА – белок, способный прикрепляться к мембране (Kawamura *et al.*, 2013), препятствуя контакту ксантин/ксантиноксидазной системы с поверхностью мембраны. В присутствии БСА добавка ксантин/ксантиноксидазной системы к тилакоидам не приводила к снижению относительного уровня восстановления ПХ-пула (табл. 1).

Таким образом, полученные результаты соответствуют предположению о том, что образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны может происходить в результате реакции между супероксидным радикалом и молекулами пластогидрохинона.

### **Определение сигнала для уменьшения размера светособирающей антенны ФС2 при долговременной адаптации к повышенной освещенности**

Для выяснения участия пероксида водорода в модуляции размера антенны ФС2 при возрастании освещенности были использованы два независимых подхода, позволяющие регулировать количество пероксида водорода в листьях ячменя: 1) снижение количества пероксида водорода в листьях при инкубации в условиях высокой интенсивности света. 2) увеличение количества пероксида водорода в листьях при инкубации в условиях низкой интенсивности света.

### **Влияние на размер антенны ФС2 снижения количества пероксида водорода в листьях при повышенной освещенности**

Для снижения количества пероксида водорода в листьях при постоянном освещении светом

высокой интенсивности проводили инкубацию листьев ячменя в присутствии экзогенной каталазы. Каталаза способна проникать в апопласт, приводя к оттоку пероксида водорода из клетки, эффективно снижая количество  $H_2O_2$  в клеточных органеллах. В отдельных экспериментах было показано, что пероксид водорода способен выходить из листа в среду инкубации.

Инкубация листьев в условиях высокой интенсивности света приводила к значительному накоплению пероксида водорода в первый день и уровень  $H_2O_2$  оставался высоким в ходе всей инкубации (рис. 2А). Уровень пероксида водорода в листьях, инкубированных в условиях высокой интенсивности света, но в присутствии в среде инкубации каталазы, оставался ниже, чем на высоком свете в отсутствие каталазы (рис. 2А). На 5-ый день на свету высокой интенсивности уровень пероксида водорода в присутствии каталазы оказывался схожим с наблюдаемым в листьях, инкубируемых при низкой интенсивности света (рис. 2А).

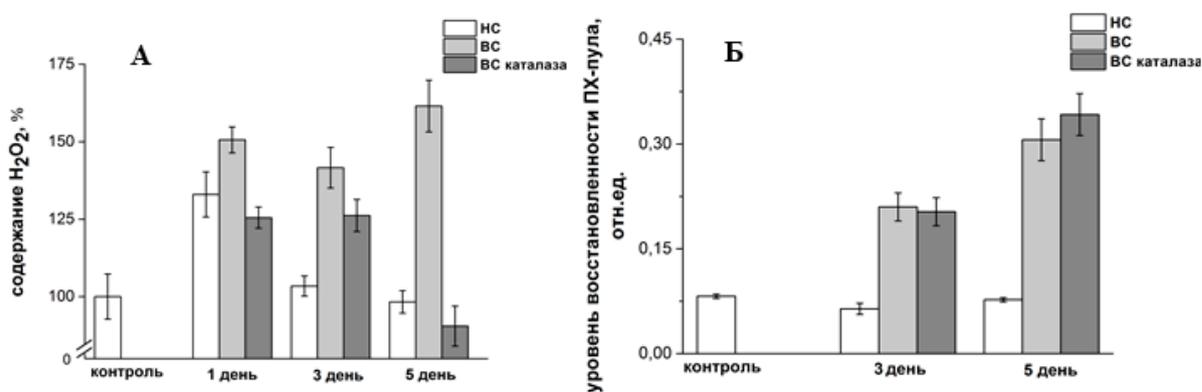


Рисунок 2. Количество пероксида водорода (А) и относительный уровень восстановления ПХ-пула (Б) в листьях ячменя при инкубации листьев при низкой интенсивности (НС,  $100 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$ ) или при высокой интенсивности света ( $1000 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$ ) в отсутствие (ВС) и присутствии каталазы ( $1200 \text{ ед./мл}$ ) в среде инкубации (ВС каталаза) в течение 5 дней. А - Контроль: количество пероксида водорода в листьях ячменя до начала инкубации. За 100% принято значение  $0.346 \text{ мкмоль } H_2O_2/\text{г сырого веса}$  (контрольное значение). Б - Контроль: степень восстановления ПХ-пула в листьях ячменя до начала инкубации. Действующий свет при измерении соответствовал интенсивности света при инкубации листьев. Результаты представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

Инкубация при высокой интенсивности света приводила к увеличению уровня восстановления ПХ-пула и в присутствии, и в отсутствие каталазы (рис. 2Б).

Таким образом, экспериментальные условия позволили снизить количество пероксида водорода в листьях при инкубации при высокой интенсивности света (рис. 2А) на фоне высокого уровня восстановления ПХ-пула, характерного для высокой интенсивности света (рис. 2Б).

Для того, чтобы выявить, как влияет снижение количества пероксида водорода в листьях при высокой интенсивности света на состав тилакоидной мембраны, проводили электрофорез в денатурирующих условиях (рис. 3); после чего с помощью денситометрии проводили сравнение интенсивности окрашивания белковых полос.

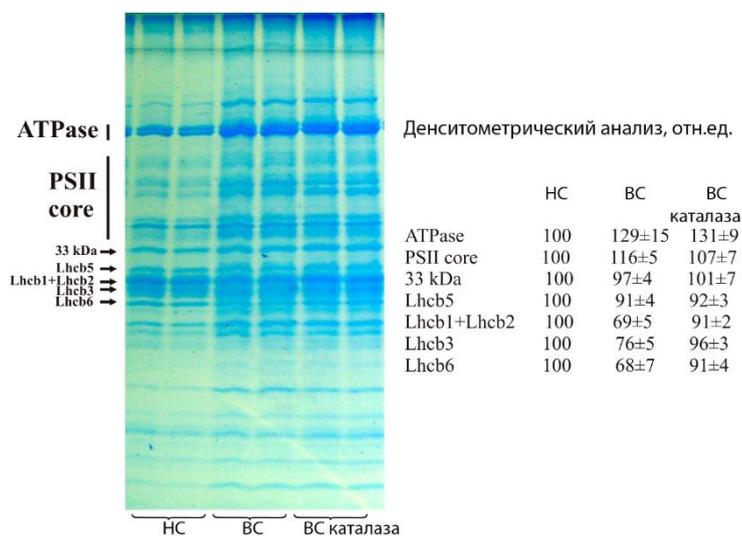


Рисунок 3. Денатурирующий электрофорез и результаты денситометрического анализа тилакоидных белков, изолированных из листьев ячменя через 5 дней инкубации при низкой интенсивности света (НС, 100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с) или высокой интенсивности света (1000 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с) в отсутствие (ВС) или присутствии каталазы (ВС каталаза). Количество каждого белка нормализовано по количеству соответствующего белка в листьях, инкубированных при низкой интенсивности света, и принято за 100%. Результаты представлены как средние значения ± стандартное отклонение.

Количество белков Lhcb1+Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6 уменьшалось при инкубации в условиях высокой интенсивности света по сравнению с листьями, инкубированными при низкой интенсивности (рис.3). Однако такого уменьшения не наблюдалось, когда листья инкубировали в условиях высокой интенсивности света, но в присутствии каталазы. Известно, что именно уменьшение в биосинтезе Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6 белков, но не Lhcb4 и Lhcb5 (Morosinotto *et al.*, 2006) приводит к уменьшению размера антенны ФС2, что согласуется с полученными результатами (рис.3). В качестве контроля была использована интенсивность полосы, соответствующей одной из субъединиц водоокисляющего комплекса, 33 кДа белку. Изменения в интенсивности этих полос не наблюдались при всех условиях инкубации. Вестерн-блот анализ подтвердил, что в листьях ячменя содержится большее количество белков Lhcb3 и Lhcb6, когда листья освещали светом низкой интенсивности или светом высокой интенсивности, но в присутствии каталазы, однако их количество было ниже при освещении светом высокой интенсивности в отсутствие каталазы; при этом значительных изменений не наблюдалось в количестве белков Lhcb4 и Lhcb5.

### **Влияние на размер антенны ФС2 увеличения количества пероксида водорода в листьях при низкой интенсивности света**

Для увеличения количества пероксида водорода в листьях ячменя, листья инкубировали в течение 5 дней при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с) в отсутствие (контроль) или в присутствии экзогенного пероксида водорода (50 мМ или 100 мМ) в среде инкубации. Из таблицы 2 видно, что после 5-ти дней инкубации листьев ячменя эффективный квантовый выход ФС2 был даже выше в присутствии 100 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, коэффициент НФТ (qN) был ниже в присутствии увеличенной концентрации пероксида водорода в среде инкубации по сравнению с контрольными листьями. Полученные результаты показывают отсутствие негативного влияния пероксида водорода в выбранных условиях инкубации на функционирование фотосинтетического аппарата.

Добавки к среде инкубации	Y	qN
-	0.65±0.03	0.33±0.04
50 мМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.67±0.04	0.22±0.09
100 мМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.72±0.01	0.12±0.02

Таблица 2. Влияние присутствия пероксида водорода в течение 5 дней при низкой интенсивности света на эффективный квантовый выход ФС2 (Y) и коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (qN). Результаты представлены как средние значения ±стандартное отклонение.

В ходе инкубации количество пероксида водорода было незначительно выше в листьях, инкубированных в присутствии 50 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, по сравнению с контрольными листьями (рис. 4А). Инкубация листьев в присутствии 100 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводила к увеличению в них уровня пероксида водорода по сравнению с контрольными листьями на 25% на третий день и к двукратному увеличению - на пятый день инкубации.

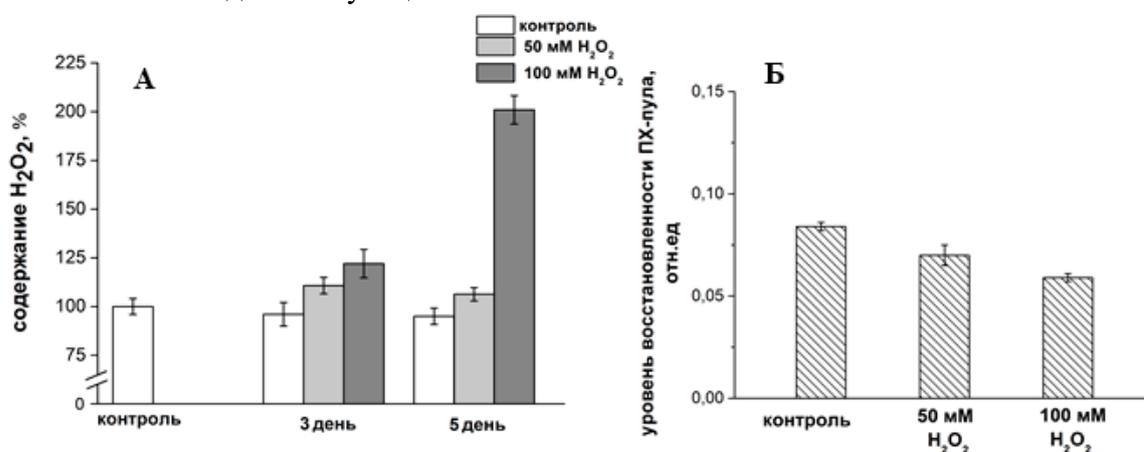


Рисунок 4. А - Количество пероксида водорода в листьях ячменя в течение 5 дней инкубации в отсутствие (контроль) и присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 100 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в среде инкубации при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с). За 100% принято значение 0.346 мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/г сырого веса (контрольное значение).

Б - относительный уровень восстановления ПХ-пула в листьях ячменя после 5 дней инкубации в отсутствие (контроль) и присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 100 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в среде инкубации при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с). Результаты представлены как средние значения ±стандартное отклонение.

На пятый день инкубации содержание пероксида водорода в листьях, инкубированных в присутствии 100 мМ пероксида водорода при низкой интенсивности, было близко к количеству пероксида водорода в листьях, инкубированных при высокой интенсивности света (рис. 2 vs 4). Таким образом, при инкубации листьев при низкой интенсивности света в среде, содержащей 100 мМ пероксид водорода, он накапливается в листьях в количестве, близком к наблюдаемому при высокой интенсивности света.

Более низкий уровень восстановления ПХ-пула наблюдался в листьях, инкубированных в присутствии 100 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, по сравнению с листьями, инкубированными в контрольных условиях (рис. 4Б). Не было значительного отличия (согласно тесту Стьюдента) в восстановлении ПХ-пула в листьях, инкубированных в присутствии 50 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, по сравнению с контролем.

Таким образом, второй экспериментальный подход при инкубации в условиях низкой интенсивности света позволил увеличить количество пероксида водорода в листьях на фоне пониженного уровня восстановления ПХ-пула.

Денситометрический анализ интенсивности полос, соответствующих светособирающим белкам показал, что количество Lhcb1+Lhcb2 белков было ниже после 5 дней инкубации с пероксидом водорода (рис. 5), чем в контрольных листьях. Количество белков Lhcb3 и Lhcb6 также уменьшалось при добавке H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Интенсивность полосы, соответствующей 33 кДа белку, существенно не изменялась (рис. 5).

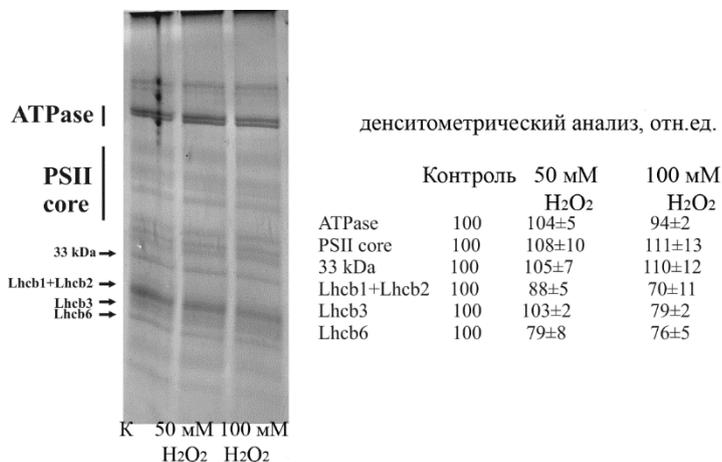


Рисунок 5. Денатурирующий электрофорез и результаты денситометрического анализа тилакоидных белков, изолированных из листьев ячменя после 5 дней инкубации в отсутствие (К, контроль) или присутствии пероксида водорода (50 мМ или 100 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с). За 100% принято количество соответствующего белка в дорожке геля контрольного варианта. Результаты представлены как средние значения ±стандартное отклонение.

Меньшее количество Lhcb1 и Lhcb2 белков в листьях ячменя после 5-дневной инкубации в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> было подтверждено с помощью Вестерн-блот анализа.

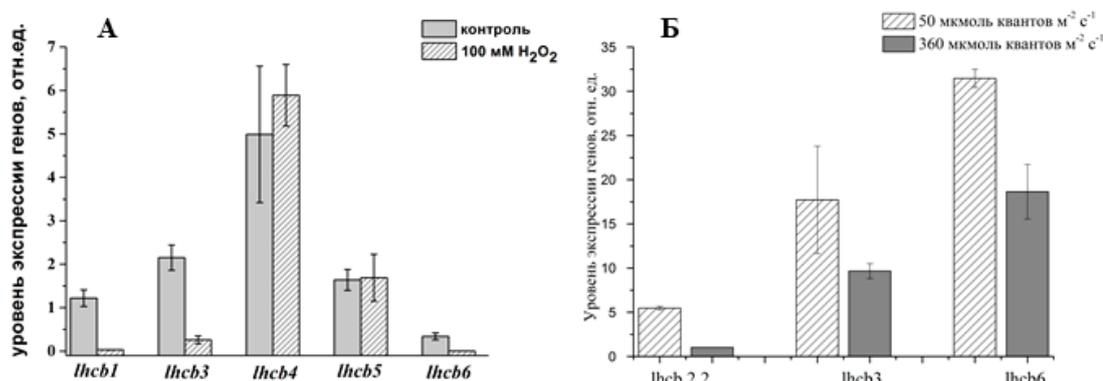


Рисунок 6. А - Количественный ПЦР анализ уровня экспрессии *lhcb1*, *lhcb3*, *lhcb4*, *lhcb5* и *lhcb6* генов в листьях ячменя после 5 дней инкубации при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с) в отсутствие (контроль) и присутствии 100 мМ пероксида водорода в среде инкубации. Б - Количественный ПЦР анализ уровня экспрессии *lhcb2.2*, *lhcb3* и *lhcb6* в листьях *A. thaliana* при разной интенсивности света. Штриховые столбики – 50 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с, серые столбики – 360 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с. Результаты представлены как средние значения ±стандартное отклонение.

Результаты количественного ПЦР анализа (рис. 6А) показали, что увеличение содержания пероксида водорода в листьях приводило к уменьшению в уровне мРНК *lhcb1*, *lhcb3* и *lhcb6* генов, в то время как не наблюдались изменения в уровне экспрессии генов *lhcb4*, *lhcb5* (рис. 6А). Эти результаты хорошо согласуются с результатами, полученными при измерении уровня экспрессии генов, кодирующих Lhcb белки при адаптации растений к условиям высокой интенсивности света (рис. 6Б). Через 5 дней после переноса растений в условия высокой интенсивности света

происходило уменьшение уровня экспрессии генов *At2g05070*, *At5g54270* и *At1g15820*, которые кодируют антенные белки Lhcb2.2, Lhcb3 и Lhcb6, соответственно (рис. 6Б). Полученный результата показал, что уменьшение размера антенны ФС2 при долговременной адаптации происходит на транскрипционном или пост-транскрипционном этапе биосинтеза белков. Таким образом, при инкубации листьев ячменя в присутствии 100 мМ пероксида водорода происходило уменьшение уровня экспрессии генов *lhcb1*, *lhcb2*, *lhcb3* и *lhcb6*, также, как и при адаптации растений к повышенной освещенности.

Полученные данные подтверждают участие пероксида водорода в сигнальном пути, приводящем к уменьшению размера антенны ФС2. Экспериментальное увеличение количества пероксида водорода в листьях приводило к запуску адаптации и уменьшению размера антенны ФС2 при инкубации в условиях низкой интенсивности света.

### **Связь между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием процесса state transitions**

Следующей задачей работы было определить существует ли корреляция между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием процесса state transitions. На данный момент в литературе нет однозначного ответа, как измерять протекание процесса state transitions *in vivo* при комнатной температуре. Поэтому первым этапом этой части работы стала разработка подхода, позволяющего оценить протекание state transitions в целых листьях с помощью измерения релаксации нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (НФТ) после освещения.

### **Разработка экспериментального подхода для оценки протекания state transitions на целых листьях**

В работе были использованы растения арабидопсиса дикого типа и мутантные растения с заблокированным синтезом STN7 киназы, а также листья ячменя, инкубированные в присутствии и отсутствие NaF, ингибитора фосфатаз. В отсутствие STN7 киназы в растениях не протекает процесс state transitions, т.е. на свету не происходит перехода из состояния 1 в состояние 2, в то время как при инкубации с NaF, который ингибирует фосфатазу, переход из состояния 1 в состояние 2 при освещении происходит, однако не происходит последующего возвращения фотосинтетического аппарата из состояния 2 в состояние 1 в темноте, т.е. возвращения антенных комплексов к ФС2.

Измерение релаксации НФТ в листьях арабидопсиса дикого типа и мутантных растений после освещения светом низкой интенсивности в течение 5, 10 и 20 минут (рис. 7 А, Б и В, соответственно) позволили выявить отличия между диким типом и мутантными растениями по STN7 киназе. Коэффициент  $q_N$ , отражающий нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*, в мутантных растениях релаксировал примерно до 12-15 минуты в темноте, после чего достигал стационарного значения, в то время как в диком типе и после 12-15 минуты продолжалась релаксация. Плато релаксации  $q_N$  у мутантных растений достигалось в одно и то же время, не зависимо от продолжительности предварительного освещения действующим светом.

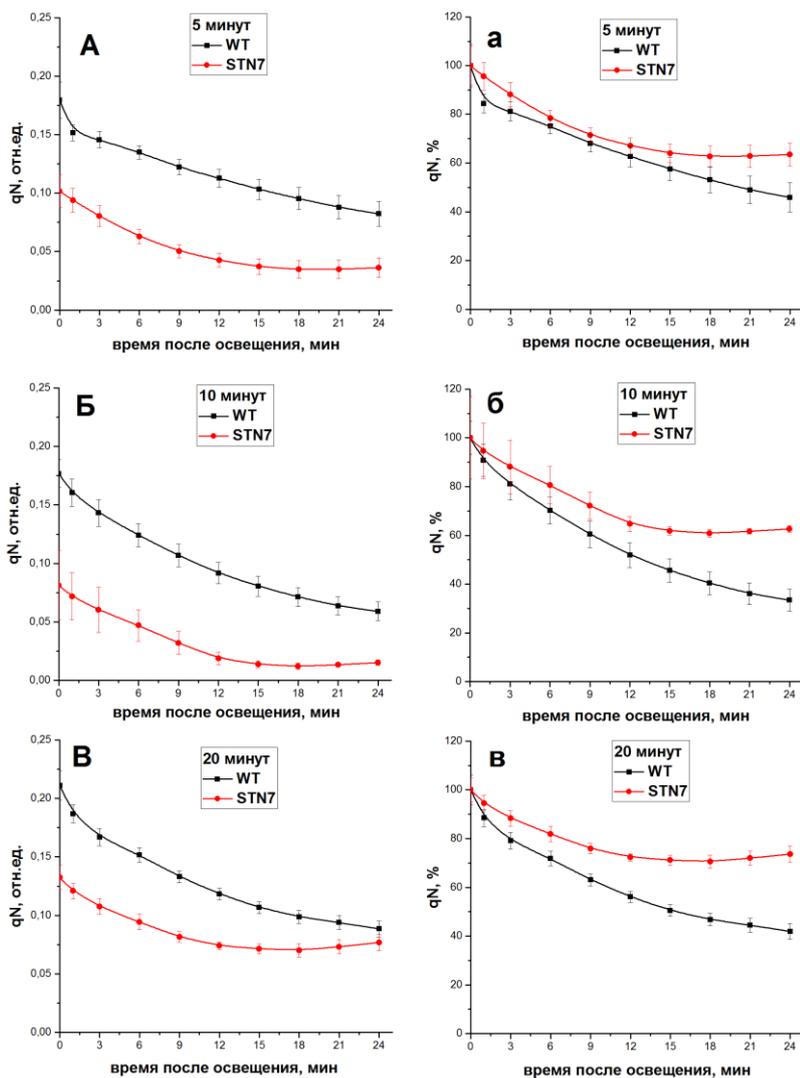


Рисунок 7. Релаксация нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* ( $qN$ ) в листьях арабидопсиса дикого типа (WT, черные линии) и мутантных растениях по STN7 киназе (красные линии) после 5 минут (А), 10 минут (Б), 20 минут (В) освещения. Нормализованные кривые релаксации  $qN$  5 минут (а), 10 минут (б), 20 минут (в). Интенсивность действующего света 60 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с. Результаты представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Полученные результаты (рис 7 А, Б, В) были нормализованы, начальные точки релаксации  $qN$  мутантных растений и дикого типа были взяты за 100% (рис. 7 а, б, в). В случае нормализованных кривых видно, что после 5 минут освещения разница в ходе релаксации между диким типом и мутантными растениями меньше, чем после 10 и 20 минут освещения. Это показывает, что 5-ти минутного освещения недостаточно для полного протекания и корректной оценки state transitions, после 5 минут освещения наблюдается лишь незначительная релаксация НФТ, связанная с протеканием state transitions на свету.

При измерении релаксации  $qN$  в листьях ячменя, инкубированных в присутствии и отсутствие NaF, были получены похожие результаты, однако значение  $qN$  в листьях, инкубированных в присутствии NaF, достигало плато уже на 6 - 9 минуте в темноте, вне зависимости от продолжительности предварительного освещения (рис. 8).

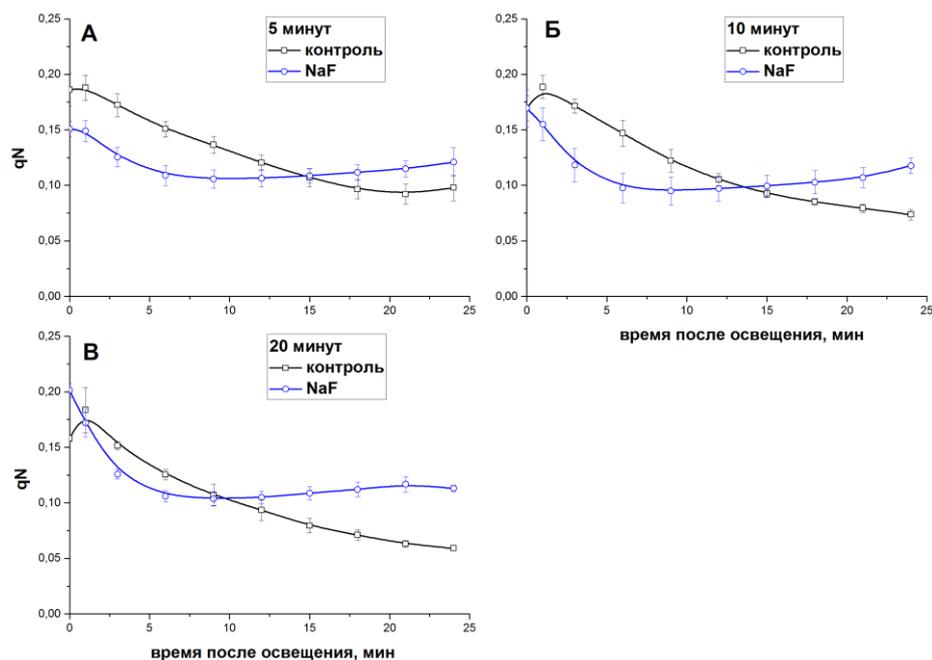


Рисунок 8. Релаксация нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла  $a$   $q_N$  в листьях ячменя в отсутствие (черные линии) и присутствии 15 мМ NaF (синие линии) после 5 минут (А), 10 минут (Б) и 20 минут (В) освещения. Интенсивность действующего света 60 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с. Результаты представлены как средние значения  $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Из рисунка 8 видно, что максимальные отличия в релаксации  $q_N$  в листьях, инкубированных в присутствии и отсутствие NaF, наблюдались после 20 минут освещения, что отражает наибольший вклад state transitions в НФТ при этой продолжительности освещения.

Для подтверждения того, что для полного протекания state transitions необходимо не менее 20 минут проводили измерение спектров низкотемпературной флуоресценции для листьев ячменя и арабидопсиса дикого типа (рис. 9).

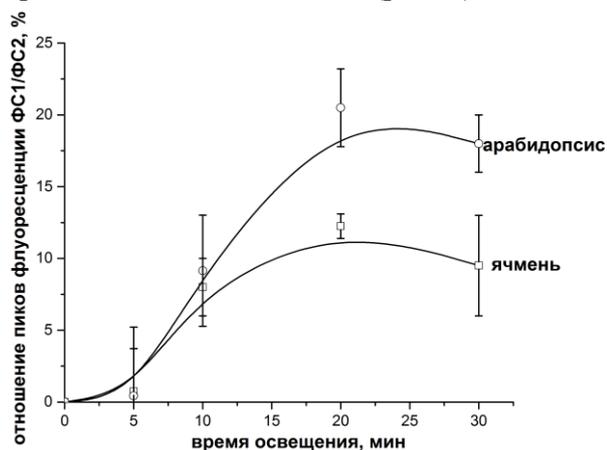


Рисунок 9. Зависимость отношения пика флуоресценция ФС1 к пику флуоресценции ФС2 от времени освещения листьев арабидопсиса или ячменя. Интенсивность света 60 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с. За «0» принято отношение пиков флуоресценции ФС1/ФС2, измеренное сразу после темновой адаптации. Для ячменя темновое значение отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 = 2.1, для арабидопсиса – 2.8. Результаты представлены как средние значения  $\pm$ стандартная ошибка среднего.

На рисунке представлены светоиндуцированные изменения в отношении пиков флуоресценции ФС1/ФС2. После 5 минут освещения и в листьях арабидопсиса, и в листьях ячменя происходят незначительные изменения отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2, которые свидетельствуют о незначительном протекании перехода из состояния 1 в состояние 2. Только после 20 минут освещения в обоих видах растений достигается наибольшее возрастание отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 по сравнению с темнотой. При дальнейшем увеличении времени

освещения до 30 минут не происходило увеличения отношения флуоресценции ФС1/ФС2, что отражает полное протекание state transitions после 20 минут освещения.

Таким образом было показано, что для полного протекания state transitions (перехода из состояния 1 в состояние 2) необходимым временем освещения в обоих видах растений является 20 минут.

### Определение влияния интенсивности действующего света на протекание state transitions

Используя описанный выше подход, проводили оценку протекания state transitions в листьях арабидопсиса и ячменя при разной интенсивности действующего света. На рисунке 10 представлены результаты измерения релаксации  $qN$  в листьях арабидопсиса после 20 минут освещения светом разной интенсивности.

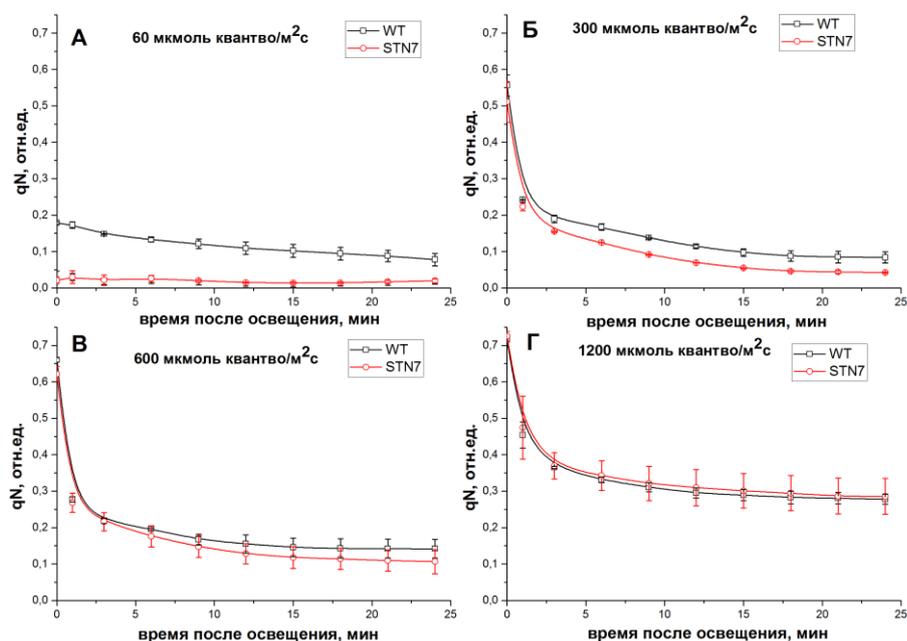


Рисунок 10. Релаксация нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* ( $qN$ ) в листьях арабидопсиса дикого типа (WT, черные линии) и мутантных растениях по STN7 киназе (красные линии) при различной интенсивности действующего света. А – 60 мкмоль квантов/ $\text{м}^2\text{с}$ , Б – 300 мкмоль квантов/ $\text{м}^2\text{с}$ , В – 600 мкмоль квантов/ $\text{м}^2\text{с}$ , Г – 1200 мкмоль квантов/ $\text{м}^2\text{с}$ . Продолжительность освещения – 20 минут. Результаты представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Из рисунка видно, что при повышении интенсивности света и достижения величины 300 мкмоль квантов/ $\text{м}^2\text{с}$  в растениях арабидопсиса дикого типа и STN7 мутантных растениях наблюдается практически одинаковый ход релаксации  $qN$  (рис. 10Б), что свидетельствует о незначительном вкладе state transitions в НФТ или об экранировании вклада state transitions в НФТ другими процессами, происходящими при высокой интенсивности света. В то время как в листьях ячменя, инкубированных в присутствии и отсутствие NaF, при этой же интенсивности света наблюдается отличный ход кривых релаксации  $qN$ , также, как и при интенсивности 600 мкмоль квантов/ $\text{м}^2\text{с}$  (рис. 11), что свидетельствует о протекании state transitions в листьях ячменя при этих интенсивностях. Только при увеличении интенсивности света выше 600 мкмоль квантов/ $\text{м}^2\text{с}$  в листьях ячменя, инкубированных в присутствии и отсутствие NaF, наблюдается одинаковый ход

релаксации  $qN$  и, следовательно, отсутствие state transitions.

Считается, что state transitions происходит только при низкой интенсивности света (100–200 мкмоль фотонов  $m^{-2} c^{-1}$ ). Существуют не прямые свидетельства в пользу того, что при высокой интенсивности света state transitions не протекает, поскольку может происходить ингибирование фермента киназы восстановленного на свету тиоредоксином (Lemeille and Rochaix, 2010). Однако описанные выше результаты показывают, что для разных видов растений существуют различные критические интенсивности света, при которых state transitions перестает происходить.

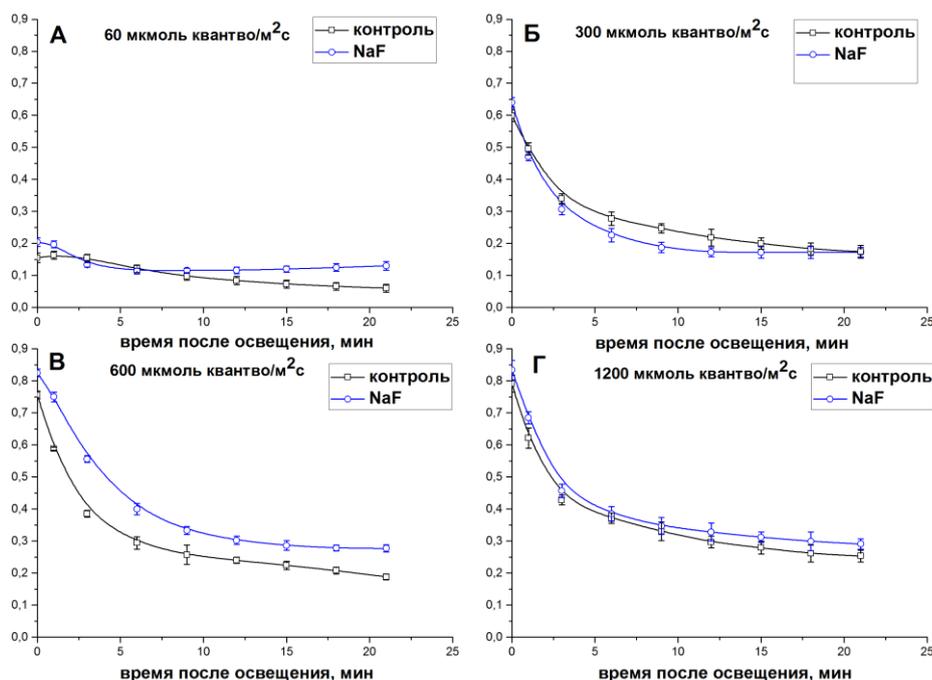


Рисунок 11. Релаксация нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла  $a$   $qN$  в листьях ячменя в отсутствие (контроль, черные линии) и в присутствии NaF (NaF, синие линии) при разных интенсивностях действующего света. А – 60 мкмоль квантов/ $m^2c$ , Б – 300 мкмоль квантов/ $m^2c$ , В – 600 мкмоль квантов/ $m^2c$ , Г – 1200 мкмоль квантов/ $m^2c$ . Продолжительность освещения – 20 минут. Результаты представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### Влияние интенсивности света во время выращивания растений *A. thaliana* на возможность протекания процесса state transitions в листьях и выявление связи между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием state transitions

Растения, выросшие при низкой освещенности (60 мкмоль квантов/ $m^2c$ ), переносили на пять дней в условия высокой освещенности (300 мкмоль квантов/ $m^2c$ ). Интенсивность 300 мкмоль квантов/ $m^2c$  была выбрана в связи с тем, что это пограничная интенсивность света, при которой state transitions еще может происходить, но уже запускается и долговременная адаптация растений дикого типа к высокой интенсивности света, приводящая к уменьшению размера антенны ФС2.

Для выявления протекания state transitions в листьях растений арабидопсиса дикого типа в нулевой день, первый и пятый дни в условиях высокой интенсивности света проводили измерения релаксации  $qN$  после 20 минутного освещения светом низкой интенсивности (60 мкмоль квантов/ $m^2c$ ) (рис. 12). Через один день после переноса растений в условия высокой интенсивности света наблюдался одинаковый ход релаксации  $qN$  в листьях мутантных растений, нокаутированных по гену *stn7*, и растениях дикого типа, что свидетельствует об отсутствии или state transitions, или

возвращения фотосинтетической антенны из состояния 2 в состояние 1 в растениях дикого типа при данных условиях. Через 5 дней адаптации к условиям высокой интенсивности света между мутантными растениями и растениями дикого типа наблюдаются отличия в ходе релаксации  $qN$  подобные тем, которые наблюдаются до переноса растений в условия высокой освещенности (нулевой день).

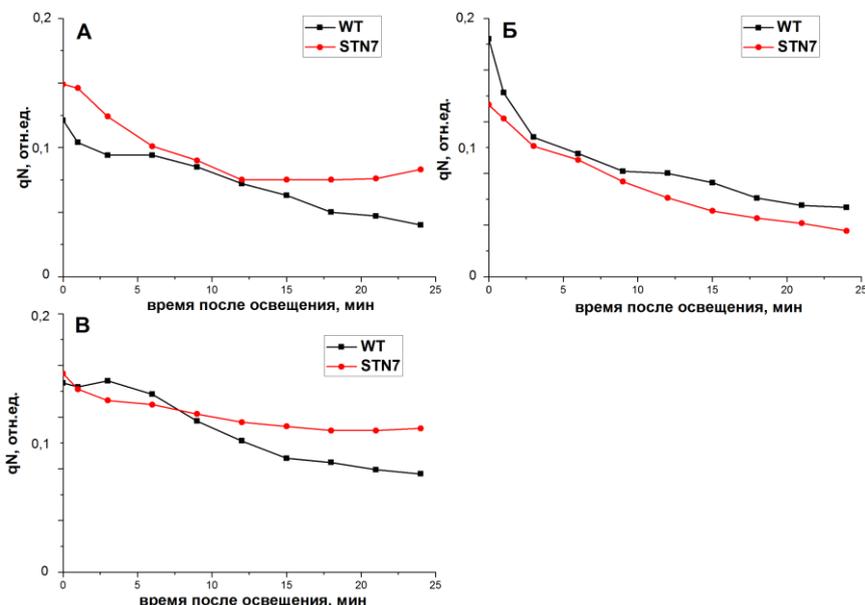


Рисунок 12. Релаксация нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла  $a$   $qN$  в листьях арабидопсиса дикого типа (WT, черные линии) и мутантных растений по STN7 киназе (STN7, красные линии). А – измерения проводили до переноса растений в условия высокой интенсивности света, Б – через один день после переноса растений в условия высокой интенсивности света (300 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с), В – через 5 дней после переноса в условия высокой интенсивности света. Интенсивность действующего света – 60 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с, время освещения – 20 минут. Все измерения проводили на предварительно затемненных (в течение 1 часа) листьях.

Через 1 день после переноса растений в условия высокой интенсивности света, когда измерения релаксации НФТ свидетельствуют о подавлении state transitions, наблюдалось значительное увеличение содержания пероксида водорода в листьях дикого типа, которое затем снижалось к 5-му дню (рис. 13).

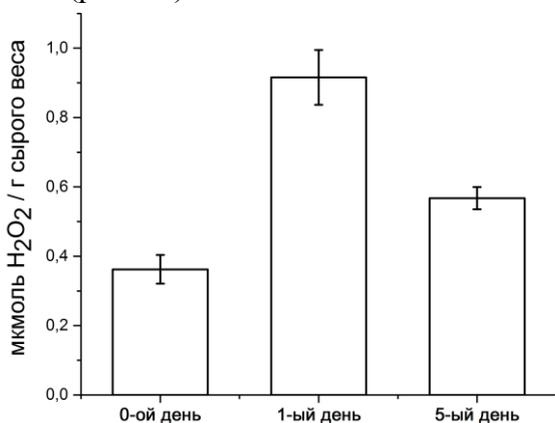


Рисунок 13. Количество пероксида водорода в листьях арабидопсиса дикого типа. 0-ой день – измерения проводили до переноса растений в условия высокой интенсивности света, 1-ый день – через 1 день после переноса растений в условия высокой интенсивности света (300 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с), 5-ый день – через 5 дней после переноса в условия высокой интенсивности света. Результаты представлены как средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

На основании этих результатов можно предположить, что увеличение количества пероксида водорода в листьях в первый день после переноса растений в условия высокой освещенности может

являться сигналом для адаптации фотосинтетического аппарата к увеличению интенсивности света, а снижение к пятому дню – следствие произошедших адаптационных изменений в строении светособирающей антенны ФС2 и оптимизации работы фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

С помощью Вестерн-блот анализа было показано, что в первый день адаптации к высокой интенсивности света в листьях арабидопсиса дикого типа значительно увеличивается количество фосфорилированного Lhcb1 белка.

Таким образом, в ходе работы нами получены принципиально новые данные о возможности протекания процесса state transitions при изменении уровня освещенности растений, а именно то, что в начальный период после переноса растений в условия повышенной освещенности происходит накопление пероксида водорода в листьях, приводящее к ингибированию одной из стадий этого процесса: накопление фосфорилированного Lhcb1 свидетельствует о том, что светособирающая антенна ФС2 заблокирована в состоянии 2, то есть остается связанной с ФС1.

### Заключение

На основании данных литературы и данных, полученных в работе, нами предложена гипотетическая схема участия  $H_2O_2$  в адаптации фотосинтетического аппарата к изменениям в условиях освещения (рис. 14).

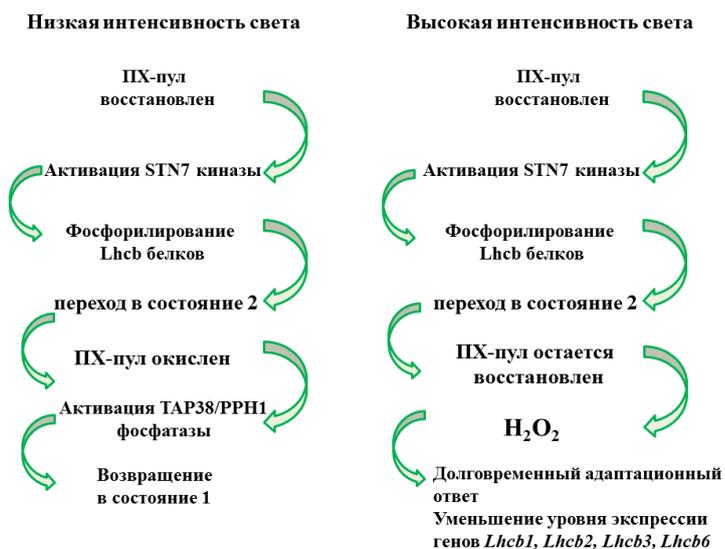


Рисунок 14. Гипотетическая схема участия пероксида водорода в адаптации фотосинтетического аппарата к условиям освещения.

При освещении адаптированных к темноте растений светом низкой интенсивности увеличивается уровень восстановления ПХ-пула, и происходит активация каталитического домена STN7 киназы при связывании киназы с пластогидрохинон-окисляющим сайтом цитохромного b6/f комплекса. Киназа фосфорилирует Lhcb белки L-тримера, что приводит к миграции L-тримера от ФС2 к ФС1 и переходу в состояние 2. Уменьшение размера антенны ФС2 и увеличение размера антенны ФС1 приводит к оптимизации работы двух фотосистем и окислению ПХ-пула. Окисление ПХ-пула, в свою очередь, приводит к дефосфорилированию белков L-тримера с помощью TAP38/PPH1 фосфатазы и возвращению в состояние 1.

При высокой интенсивности света, при которой state transitions еще происходит, протекание всех вышеописанных событий не приводит к снижению степени восстановления ПХ-пула из-за высокой плотности падающих квантов. Поддержание высокой степени восстановления ПХ-пула

приводит к накоплению пероксида водорода в тилакоидной мембране. Можно предположить, что механизм участия пероксида водорода в регуляции state transitions заключается в регуляции активности STN7 киназы за счет окисления цистеиновых остатков, что приводит к накоплению фосфорилированных Lhcb1 белков и блокированию светособирающей антенны в связанном с ФС1 состоянии. При длительном воздействии повышенной освещенности накопление пероксида водорода служит сигналом для запуска долговременной адаптации, в результате которой происходит уменьшение уровня экспрессии *lhcb* генов.

## ВЫВОДЫ

1. Найдено, что образование  $H_2O_2$  внутри тилакоидной мембраны изолированных тилакоидов происходит при скоростях электронного транспорта, близких к физиологическим, и получены свидетельства, что  $H_2O_2$  в этом случае образуется в реакции между супероксидным радикалом и пластогидрохиноном.
2. Показано, что уменьшение размера антенны фотосистемы 2, происходящее путем подавления биосинтеза белков внешней антенны, при адаптации растений к долговременной повышенной освещенности коррелирует с уменьшением транскрипции генов этих белков.
3. Установлено, что нахождение растений в условиях долговременной повышенной освещенности при экспериментальном снижении содержания  $H_2O_2$  в листьях предотвращает адаптационное уменьшение размера антенны фотосистемы 2 даже при высоком уровне восстановления пула пластохинона. В то же время, при низкой освещенности растений экспериментальное увеличение содержания  $H_2O_2$  в листьях приводит к уменьшению размера антенны фотосистемы 2 при низком уровне восстановления пула пластохинона.
4. Разработан экспериментальный подход оценки протекания процесса state transitions в листьях: на основании различий в кинетике релаксации нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* в растениях арабидопсиса дикого типа и мутантных растениях, нокаутированных по гену *stn7*, а также в растениях ячменя, инкубированных в присутствии и в отсутствие NaF, выявлена часть релаксации этого тушения, которая отражает state transitions. Установлено, что для выявления процесса state transitions продолжительность освещения листьев действующим светом должна составлять не менее 20 минут, что принципиально важно, поскольку ранее для выяснения наличия или отсутствия этого процесса использовали, преимущественно, 5-ти минутное освещение.
5. Было показано, что в листьях арабидопсиса и ячменя увеличение интенсивности действующего света по-разному влияет на протекание state transitions: у растений арабидопсиса полное протекание state transitions происходило при низкой интенсивности света (60 мкмоль квантов/ $m^2c$ ), а у растений ячменя - одинаково при низкой и при высокой интенсивностях света (до 600 мкмоль квантов/ $m^2c$ ).
6. Найдено, что при адаптации растений к долговременной повышенной освещенности процесс state transitions не происходит в начальный период адаптации (в 1-ый день), и вновь может наблюдаться через 5 дней адаптации; при этом отсутствие state transitions коррелирует с повышенным содержанием  $H_2O_2$  в листьях.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в реферируемых журналах:

1. Borisova-Mubarakshina M. M., Ivanov B. N., Vetoshkina D. V., Lubimov V. Y., Fedorchuk T. P., Naydov I. A., Kozuleva M.A., Rudenko N.N., Dall'Osto L., Cazzaniga S. and Bassi, R. (2015). Long-term acclimatory response to excess excitation energy: evidence for a role of hydrogen peroxide in the regulation of photosystem II antenna size. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 7151-7164.
2. Козулева М. А., Ветошкина Д. В., Петрова А. А., Борисова-Мубаракшина М. М., Иванов Б. Н. (2014) Исследование восстановления кислорода в фотосистеме I высших растений с применением доноров электронов для этой фотосистемы в целых тилакоидах (Investigation of oxygen reduction in photosystem I using electron donors for the photosystem in thylakoids). *Биологические мембраны (Biological membranes)*. 31, 427-434.
3. Борисова-Мубаракшина М.М., Ветошкина Д.В., Руденко Н.Н., Ширшикова Г.Н., Федорчук Т.П., Найдов И.А., Иванов Б.Н. (2014) The Size of the Light-Harvesting Antenna of Higher Plant Photosystem II Is Regulated by Illumination Intensity through Transcription of Antenna Protein Genes. *Biochemistry* 79, 661–665.

### Статьи в других журналах:

1. Vetoshkina D.V., Borisova-Mubarakshina M.M., Naydov I.A., Kozuleva M.A., Ivanov B.N. (2015) Impact of high light on reactive oxygen species production within photosynthetic biological membranes. *Journal of Biology and Life Science* 6(2), 50-60.
2. Ветошкина Д.В., Борисова-Мубаракшина М.М., Руденко Н.Н., Иванов Б.Н. (2013) Влияние освещенности растений на уровень экспрессии генов белков светособирающего комплекса и карбоангидразы. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук* 12, 21-23.

### Основные материалы и тезисы конференций:

1. D. Vetoshkina, M. Kozuleva, B. Ivanov, M. Borisova-Mubarakshina. A new attempt to evaluate state transitions by non-photochemical quenching measurements on whole leaves. *The 17th International Congress on Photosynthesis Research*. Maastricht, The Netherlands. 2016. Abstract, p. 268.
2. Vetoshkina D.V., Kozuleva M.A., Ivanov B.N., Borisova-Mubarakshina M.M. Occurrence of the state transitions in Arabidopsis and barley plants under various illumination. 4<sup>th</sup> International Symposium Plant signaling and behavior. St. Petersburg. 2016. Abstract, p. 86.
3. Vetoshkina D., Borisova-Mubarakshina M., Rudenko N., Ivanov B. Correlation of the plastoquinone pool redox state and the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in thylakoid membranes. Influence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the *Lhcb* gene transcription. *12th International conference on reactive oxygen and nitrogen species in the plants: from model systems to field*. Verona, Italy. 2015. Abstract, p. 100.
4. Иванов Б.Н., Борисова-Мубаракшина М.М., Найдов И.А., Козулева М.А., Руденко Н.Н., Ветошкина Д.В. Продукция перекиси водорода в хлоропластах: механизмы образования и диффузии и сигнальная роль. *Всероссийская научная конференция «Механизмы регуляции функций растительных органелл»*. Иркутск, Россия. 2014. Материалы конференции с. 27-29.

5. Ветошкина Д.В., Борисова-Мубаракшина М.М., Руденко Н.Н., Иванов Б.Н. Регуляция количества белков ССК2 при увеличении освещенности растений и роль перекиси водорода в этом процессе. *VII съезд Российского фотобиологического общества*. Шепси. 2014. Тезисы с. 36.
6. Vetoshkina D.V., Borisova-Mubarakshina M.M., Rudenko N.N., Ivanov B.N. Regulation of the peripheral LHC II proteins biosynthesis upon higher plants acclimation to long-term light stress conditions. *Oxidative stress conference*, Parador de Oropesa, Spain. 2014. Abstract p. 81.
7. Иванов Б.Н., Козулева М.А., Руденко Н.Н., Ветошкина Д.В., Федорчук Т.П., Борисова-Мубаракшина М.М. Механизм образования перекиси водорода в хлоропластах и ее сигнальная роль в регулировании величины светособирающей антенны фотосистемы 2. *Первый международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс метаболизма растений»*. Казань. 2013. Тезисы с. 36.