

## ВЛИЯНИЕ УФ В РАДИАЦИИ НА ТИЛАКОИДНЫЕ МЕМБРАНЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Айгюн Н. Насибова, Исмет С.Ахмедов\*, Ровшан И.Халилов

Институт Радиационных Проблем Национальной Академии Наук Азербайджана,  
Университет Хазар\*

*Impact of UV-B radiation on the membrane of tylocoid of the higher plants. The given work is devoted to research of mechanisms and features of damaging impact of UV-B radiation on thylakoid membranes chloroplasts of the high plants. Structural and functional changes of photosystem 2 have been investigated at UV irradiation. Impact of UV radiation on allocation of oxygen, electron's photocarry and structural characteristics FS 2 in fragments FS 2 has been found out. It is revealed, that at big dozes of UV radiation in subchloroplasts particles FS2 simultaneously with system of photodecomposition of water there is a structural change in the most reactionary center. The new modified model which represents the mechanism of photodamage FS 2 at impact UV-B radiation is given.*

**Key words:** UV-B radiation, membrane, photosynthesis, plants

### Введение

Растения часто подвергаются воздействию неблагоприятных природных факторов, таких как высокие и низкие температуры, сильная засоленность почв, свет высокой интенсивности и УФ – радиация [1, 10,11]. УФ – радиация является одним из экологических факторов, привлекающих внимание исследователей в последние годы, в частности, в связи с антропогенными нарушениями озонового слоя [3,12]. Среди многих экологических последствий разрушения озонового слоя особое значение придается тому, что даже слабое повышение интенсивности УФ лучей в области 300-320 нм приведет к резкому увеличению образования рака кожи у людей под действием солнечного света, а также вызовет повреждение и снижение урожайности некоторых видов растений [2,8]. Отмеченные обстоятельства привели к большому интересу исследования механизмов и особенностей повреждающего действия УФ света на биологические системы.

В данной работе рассмотрено влияние УФ В радиации на растения, на их фотосинтетический аппарат. Так как фотосистема 2 (ФС 2) является самым чувствительным макрокомплексом фотосинтетического аппарата, мы изучали структурно-функциональные изменения ФС 2 при УФ облучении. Реакционный центр (РЦ) ФС 2 представляет собой гетеродимер белков D1 и D2, который несет специальную пару молекул хлорофилл *a* (Хл), P680, способную к первичному фотохимическому разделению зарядов. Синглетно-возбужденный P680 восстанавливает первичный акцептор электрона феофитин *a* (Фео) [9]. Далее происходит перенос электрона на хинонные акцепторы Q<sub>A</sub> и Q<sub>B</sub>, затем – в пул пластохинонов (PQ). Катион-радикал P680<sup>+</sup> восстанавливается редокс активным остатком тирозина-161 (Yz), локализованным на белке D1; Yz<sup>+</sup>, в свою очередь, восстанавливается марганцевым кластером КВК [13,14]. Считается, что именно образование сильных окислителей (P680<sup>+</sup>, Yz<sup>+</sup>) при фотохимическом разделении зарядов в РЦ и высокая локальная концентрация молекулярного кислорода является первопричиной индукции процессов фотоингибирования ФС 2.

### Материалы и методы

В работе использованы высокоактивные фрагменты тилакоидных мембран ФС 2 выделенных по методике [4]. Выяснено влияние УФ света на выделение кислорода, фотоперенос электронов и структурные характеристики ФС 2 во фрагментах ФС 2. Проводилась серия экспериментов для выявления первичного участка УФ ингибирования. Важнейшим показателем состояния электронного транспорта в ФС 2 является переменная флуоресценция (ДФ) (рис.1).

### Результаты и обсуждение

Облучение УФ светом субхлоропластных частиц ФС 2 приводит к резкому уменьшению величины фотоиндуцированных  $\Delta F$ , связанных с фотовосстановлением Q и к подавлению реакции Хилла, регистрируемой по фотовосстановлению дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ). При этом величина  $F_0$ , обусловленная флуоресценцией хлорофилла, под действием УФ облучения не изменяется, что демонстрирует устойчивость пигмента к УФ облучению.

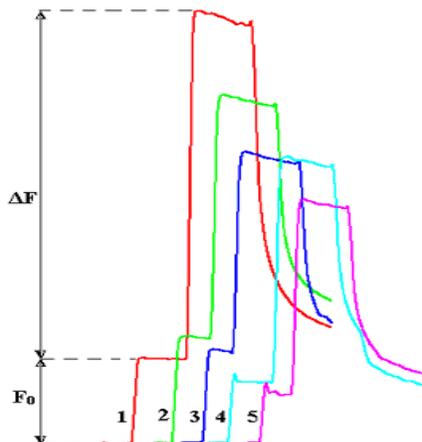


Рис.1. Кинетика изменений переменной флуоресценции в тилакоидных мембранах хлоропластов. 1-контроль, 2 - 10 мин. УФ, 3 – 10 мин. УФ + 10 мин. ожидание, 4- 10 мин. УФ + 20 мин. ожидание. 5- 10 мин. УФ + 10 мин. белый свет + 20 мин. ожидание.

При последующем добавлении  $Mn^{2+}$  к облученным частицам ФС 2 не происходит восстановления параметров этих фотореакций. Замена  $Mn^{2+}$  на дифенилкарбозид (ДФК) при измерении фотовосстановления ДХФИФ приводит к их некоторой реактивации (60%). Необходимо отметить, что добавление дитионита к УФ облученным частицам ФС 2 приводит к увеличению  $F_0$  до уровня, равного сумме  $F_0$  и  $\Delta F$  этих частиц, но не до уровня  $F_{max}$ , равного сумме  $F_0 + \Delta F$  исходных препаратов. Для исключения роли кислородных радикалов при УФ инактивации препараты облучались в анаэробных условиях. Анаэробные условия достигались путем продувания плотно закрытой кюветы аргоном. Были получены следующие результаты: облучение препаратов ФС 2 в анаэробных условиях замедляло уменьшение  $F_{max}$ . Если в аэробных условиях в результате облучения УФ светом  $F_{max}$  уменьшалась на 50% относительно контроля через 9 мин ( $10^7$  эрг/см<sup>2</sup>), то в анаэробных условиях  $F_{max}$  не достигал этого уровня через 30 мин ( $4 \cdot 10^7$  эрг/см<sup>2</sup>). За 30 мин облучения частиц ФС 2 в анаэробных условиях происходит уменьшение  $F_{max}$  только на 40 % относительно контрольного. Чтобы экспериментально проверить действие УФ света на донорную часть ФС2, исследовалось изменение скорости выделения кислорода при облучении субхлоропластных частиц УФ светом. Опыты проводились в присутствии искусственных акцепторов электронов феррицианида и дихлорбензохинона. Была обнаружена экспоненциальная зависимость между дозой УФ облучения и уменьшением скорости выделения кислорода (рис.2-а).

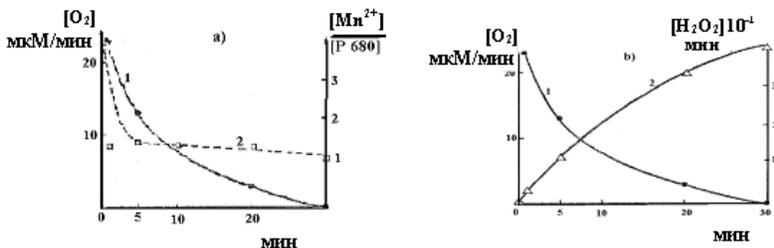


Рис.2. Действие УФ облучения а) на выделение кислорода (1), и концентрацию связанного марганца (2); б) на выделение кислорода (1) и образование перекиси водорода (2) во фрагментах ФС 2.

За 6-7 минут облучения (доза  $\sim 10^7$  эрг/см<sup>2</sup>) скорость выделения кислорода уменьшилась наполовину – 50%. В специальных экспериментах мы облучали частицы ФС 2 при различных температурах (2-32°C). Было получено, что зависимость степени действия УФ света на скорость выделения кислорода от температуры невелика. Было проведено исследование действия УФ радиации на частицы ФС 2 при температуре 10° С в анаэробных условиях. В результате получилось, что в анаэробных условиях скорость выделения кислорода падает значительно медленнее, чем в аэробных условиях. На основании этого можно предположить, что повреждающее действие УФ радиации связано с образованием в аэробных условиях высоко активных форм кислорода (АФК) типа  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH$ . Ослабление действия УФ радиации на препараты ФС 2 в анаэробных условиях может быть связано с отсутствием АФК.

Для определения АФК использовали хемилюминесценцию люминола с  $\lambda_{\text{макс}} = 450$  нм. Под действием УФ радиации во фрагментах ФС 2 наблюдается активация хемилюминесценции, т.е. процессов, во время которых образуются АФК. На рис.2(б) приведена зависимость выделения перекиси водорода в субхлоропластных частицах ФС 2 от длительности времени облучения УФ радиацией в аэробных условиях. Как видно из рис.2(б) с повышением дозы УФ радиации образование перекиси водорода также увеличивается. Это поставило вопрос о роли перекисного окисления липидов мембран и антиокислительных систем во время облучения клетки УФ радиацией. Наши эксперименты, проведенные методами спиновых зондов показали, что в тилакоидных мембранах даже большие дозы УФ облучения ( $10^8$  эрг/см<sup>2</sup>) не приводят к каким-либо существенным изменениям в липидной части мембран [1].

В работе [1] было изучено действие УФ радиации на белковые компоненты ФС 2. Электрофоретическим анализом полипептидного состава мы установили, что основными апобелками фрагментов ФС 2 являются полипептиды с молекулярной массой 47, 40, 33, 32, 30, 10 и 4,8 кДа, т.е. полипептиды, характерные для кислород выделяющего ядра ФС 2. В препарате частиц ФС 2 также присутствует белковая полоса в области 28-29 кДа, соответствующая апобелку светособирающего пигмент-белок-липидного комплекса. Следует отметить, что эта полоса является основной зоной на электрофореграмме и денситограмме субхлоропластных фрагментов ФС 2. Электрофоретический анализ показал, что под действием УФ радиации в субхлоропластных частицах ФС 2 происходит линейное снижение полосы 33 кДа и исчезновение ее при 30 минутном УФ облучении ( $5 \cdot 10^7$  эрг/см<sup>2</sup>).

Анализ супернатантов ФС 2 в следующих опытах показал, что в первые минуты УФ облучения частиц ФС 2 они способствуют «выбросу» в супернатант периферических полипептидов водоокисляющего комплекса (33 кДа, 23 кДа, 18 кДа). Дальнейшее облучение приводит не только к экстракции белка 33 кДа, но и к ее деградации.

Полипептид с молекулярной массой 33 кДа входит в структуру кислород выделяющего комплекса (КВК). В работах [3,5] было показано, что этот полипептид играет ключевую роль в сохранении функционально связанного марганца и в поддержании кислород выделяющей функции ядра ФС 2. Марганец удерживается в нем специфическими координационными связями.

Если происходит деградация белка 33 кДа, то возможен выход марганца в среду. Это предположение было проверено следующим экспериментом. Облученные частицы ФС 2 центрифугировали. Отделяли осадок и супернатант. Содержание  $Mn^{2+}$  в осадке и супернатанте определяли на пламенном атомно-абсорбционном спектрофотометре с использованием калибровочных растворов  $MnCl_2$ . В результате данного анализа мы получили следующие данные: в результате действия УФ радиации происходит выход марганца в среду; первые минуты облучения частиц ФС2 приводят к потере на каждом РЦ ФС2 двух атомов  $Mn^{2+}$  (рис.2-а). Дальнейшее облучение не изменяет этого соотношения.

После 10 минут УФ облучения ( $1,2 \cdot 10^7$  эрг/см<sup>2</sup>) в денситограмме наблюдается уменьшение полос 32 и 30 кДа. Хинонсвязывающие полипептиды с молекулярной массой 30 и 32 кДа составляют белковую основу реакционного центра ФС 2. Уменьшение полос D1 и D2 под действием УФ радиации сопровождается увеличением полипептида с молекулярной массой в области 55-58 кДа, представляющего собой, по-видимому, гетеродимер полипептида D1/D2. Облучение фрагментов ФС2 УФ радиацией в аэробных условиях большими дозами ( $5 \cdot 10^7$  эрг/см<sup>2</sup>) приводит к незначительному уменьшению полипептидов с молекулярной массой 47 и 43 кДа. Согласно общепринятой точке зрения эти полипептиды являются апобелками, несущими хлорофилл антенны ядра ФС2.

При больших дозах ( $5 \cdot 10^7$  эрг/см<sup>2</sup>) УФ радиации в субхлоропластных частицах ФС 2 одновременно с системой фоторазложения воды происходит структурное изменение в самом реакционном центре (РЦ). На это указывают следующие факты: 1) изменение реакции фотоокисления Р680 и уменьшение сигнала ЭПР во фрагментах ФС 2 в присутствии кремниймалебдата (КМ) на свету, свидетельствующее об утрате способности РЦ к фоторазделению зарядов; 2) уменьшение в денситограмме полос хинонсвязывающих полипептидов с молекулярной массой 30 кДа и 32 кДа (белок D1 и D2) и увеличение полипептида с молекулярной массой в области 55-58 кДа, представляющего собой гетеродимер полипептидов D1 и D2.

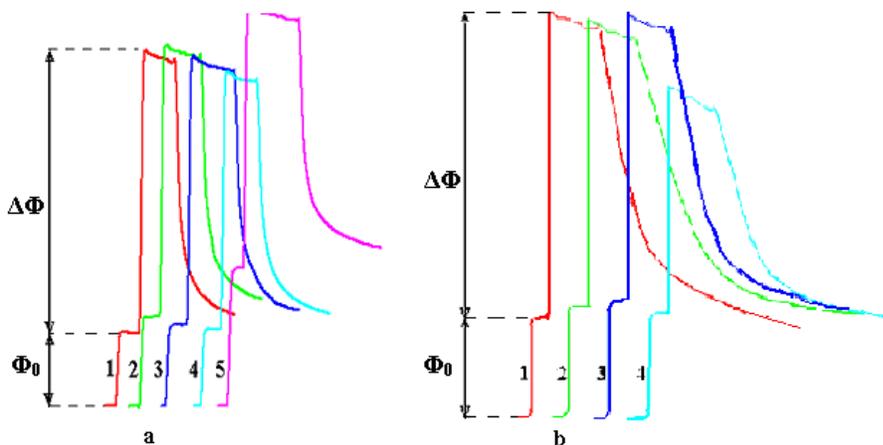


Рис.3. Кинетические изменения переменной флуоресценции а) в хлоропластах, б) во фрагментах ФС 2. 1-контроль; 2-30 сек. УФ; 3-30 сек. УФ + 10 мин. ожидание; 4- 30 сек. УФ + 20 мин. ожидание; 5- 30 сек. УФ + 20 мин. ожидание + 10 мин. белый свет.

Проводилась серия экспериментов для выявления первичной мишени в ФС 2 при УФ-В радиации. На рис. 3 показаны результаты экспериментов переменной флуоресценции, которые проводились тилакоидными мембранами и их фрагментами. Как видно, 30 секундное УФ облучение тилакоидных мембран приводит к увеличению  $\Phi_0$ . После облучения  $\Phi_0$  продолжает увеличиваться. 10 минутное освещение белым светом способствует увеличению  $\Phi_0$  примерно на 30% (рис.3 а-5). Такая же картина наблюдается и на облученных фрагментах ФС 2. Однако при этом  $\Delta\Phi$  практически не меняется. Известно, что молекулы хинонов поглощают УФ радиацию непосредственно в области длинных волн 300-330 нм. Исходя из этого можно предполагать что хиноносодержащие белки D1 и D2 являются первичными хромофорами для УФ-В света. Эксперименты по флуоресценции подтверждают это.

Семихиноновые формы хинонов  $Q_A$ ,  $Q_B$  находясь в триплетном состоянии взаимодействуя с молекулами молекулярного кислорода переводят их в активные состояния. АФК ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH$ ) в свою очередь меняют структурную функцию макрокомплекса ФС 2. В первую очередь изменение происходит в чувствительно уязвимом участке системы фоторазложения воды (КВК). Нарушение целостности КВК наблюдается с выходом на среду шестикомпонентного сигнала  $Mn^{2+}$ .

При последующим действии УФ света на фрагменты ФС 2 повреждение КВК вызывает дополнительную генерацию АФК. На схеме (рис.4) показано действие УФ на макрокомплекс ФС 2. Эта схема отличается от предыдущей модели (Мурата), которая основана на то, что первичной мишенью фотоповреждения ФС 2 является КВК, прежде всего, марганец содержащий кластер.

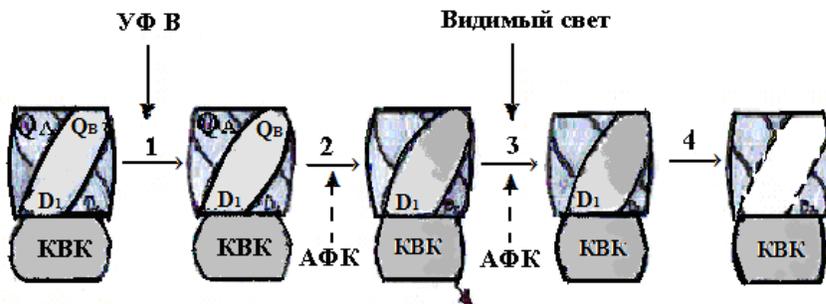


Рис.4. Новая модель механизма фотоповреждения ФС2.

Модифицированная модель показывает, что при низкой интенсивности (дозе) УФ света молекулы  $Q_A$ ,  $Q_B$  генерируют АФК и происходит инактивация КВК. В дальнейшем вторичная генерация АФК повреждает белок D1. По-видимому механизмы действия УФ света на ФС 2 в случаях *in vivo* и *in vitro* отличаются.

#### Литература.

[1] Халилов Р.И., Хомутов Г.Б., Тихонов А.Н. Влияние ультрафиолетового излучения на структурно-функциональные характеристики тилакоидной мембраны. // Физиология растений. Т.40, №.3,1993, с.373-378.

[2] Халилов Р.И., Гольдфельд М.Г. Влияние ультрафиолетового излучения на электрон – транспортные реакции фотосинтеза. // ДАН СССР, т.325, №3, 1992, с.609-612.

[3] Халилов Р.И., Тихонов А.Н. Ингибирование фотохимической активности ФС 2 хлоропластов высших растений под действием УФ облучения // Биофизика. 1992, т.37, №.5, с. 935-938.

[4] Шутилова Н.И. О принципах молекулярной организации и функционирования кислородвыделяющего комплекса фотосистемы 2 хлоропластов // Успехи современной биологии. 1999, т. 119, №1, с. 42-55.

[5] Allakhverdiev S.I., Nishiyama Y., Miyairi S., Yamamoto H., Inagaki N., Kanesaki Yu., Murata N. Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem 2 by suppressing the transcription and translation of *psb A* genes in *Synechocystis* // Plant Physiol. 2002.V. 130. P.1443—1453.

[6] Asada K. The water – water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999. V.50. P.601—639.

[7] Bukhov N.G., Carpentier R. Heterogeneity of photosystem 2 reaction centers as influenced by heat treatment of barley leaves // Physiol.Plant. 2000. V.110. P.279—285.

[8] Keren N., Berg A., van Kan P.J.M., Levanon H., Ohad I. Mechanisms of photosystem 2 photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow // Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 1997. V.94. P. 1579—1584.

[9] Klimov V.V., Klevanik A.V., Shuvalov V.A., Krasnovsky A.A. Reduction of Pheophytin in the Primary Light Reaction of Photosystem 2 // FEBS Lett. 1977.V.82. P. 183-186.

[10] Kovacs E., Keresztes A. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. // Micron., Vol. 33, Issue 2, 2002. P. 199-210.

[11] Murata N., Nishiyama Y. Molecular mechanisms of the low – temperature tolerance of the photosynthetic machinery // Stress responses of photosynthetic organisms. /Eds Satoh K., Murata N. Amsterdam, Tokyo: Elsevier, 1998. P.93—112.

[12] Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I., Murata N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem 2. // Biochimica et Biophysica Acta. 2006. P 742-749.

[13] Vass I. Styring S., Hundall T., Koivuniemi A., Aro E.-M., Andersson B. Reversible and Irreversible Intermediates during Photoinhibition of Photosystem 2: Stable Reduced  $Q_A$  Species Promote Chlorophyll Triplet Formation // Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 1992. V.89. P.1408-1412.

[14] Zhang L., Aro E.-M. Synthesis, Membrane Insertion and Assembly of the Chloroplast-Encoded D1 Protein into Photosystem 2 // FEBS Lett. 2002.V.512. P.13-18.

**Для контакта:**

Насибова Айгюн Намик кызы – мл. научный сотрудник лаборатории «Радиоэкология» Института Радиационных Проблем НАН Азербайджана. Телефон: 99412 510 26 81,  
E-mail – aygun-nasibova@rambler.ru