

МЕХАНИЗМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ O₂ В ХЛОРОПЛАСТАХ. ВОЗМОЖНОЕ ВЛИЯНИЕ МЕСТА ОБРАЗОВАНИЯ H₂O₂ НА ЕЕ СИГНАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ

*Б.Н. Иванов, М.М. Борисова-Мубаракшина,
М.А. Козулева, И.А. Найдов, Д.В. Ветошкина*
Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
Пушино, e-mail: ivboni@rambler.ru

Восстановление молекул кислорода, O₂, в хлоропластах происходит, в основном, в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ). Первичный продукт этого процесса – супероксидный анион радикал, O₂^{•-} (Allen and Hall, 1973). Компоненты ФЭТЦ, способные восстановить O₂, расположены на акцепторной стороне Фотосистемы 2 (ФС2), в пластохиноновом пуле (ПХ-пуле) и на акцепторной стороне Фотосистемы 1 (ФС1). Организация ФС2 и особенности переноса электронов между ее кофакторами предотвращают восстановление O₂ в этой фотосистеме в неповрежденных тилакоидах.

В работе (Khorobrykh and Ivanov, 2002) было экспериментально показано, что молекула O₂ способна восстанавливаться до O₂^{•-} в ПХ-пуле, и получены свидетельства, что это восстановление осуществляется свободным пластосемихиноном. ФС1 – часть ФЭТЦ, где протекают основные процессы восстановления O₂. Растворимый белок ферредоксин, восстанавливаемый терминальными акцепторами ФС1, часто предполагался как важный восстановитель O₂. Однако анализ имеющихся данных литературы и результаты прямых измерений показали, что его вклад в этот процесс *in vivo* незначителен, и основными восстановителями O₂ в ФС1 служат мембраносвязанные кофакторы (Kozuleva and Ivanov, 2010). Исследование восстановления O₂ комплексами ФС1, выделенными из цианобактерий дикого типа и мутантов с заблокированным синтезом филлохинона (сайт A₁), в которых филлохинон замещается на ПХ (Kozuleva *et al.*, 2014) и в которых редокс-потенциалы A₁/A₁⁻ примерно на 100 мВ более положительны, выявило разную зависимость этого процесса в указанных комплексах от интенсивности света, – при высокой интенсивности света скорость восстановления O₂ в комплексах из дикого типа становилась существенно выше. Полученные результаты свидетельствовали, что в ФС1 восстановление O₂ осуществляется как терминальными акцепторами F_A/F_B, так и филлохиноном; при этом первые играют основную роль при низких интенсивностях света, тогда как с увеличением интенсивности второй путь становится доминирующим.

С помощью детекторов O₂^{•-}, циклических гидроксиламинов, обладающих разной липофильностью, было установлено, что генерация O₂^{•-} может происходить внутри мембраны, и что увеличение общей продукции O₂^{•-} при увеличении интенсивности света – следствие, в основном, увеличения его внутримембранного образования (Kozuleva *et al.*, 2011; Borisova-Mubarakshina *et al.*, 2012). Эти результаты хорошо согласуются с участием в восстановлении O₂ филлохинона, расположенного внутри мембраны, и с увеличением вклада данного кофактора в этот процесс на высоком свете.

Супероксидные радикалы, образующиеся при восстановлении O₂ или ферредоксином (при нарушении его использования при восстановлении НАДФ⁺), или терминальными акцепторами ФС1 на поверхности мембраны, или стромальными оксидазами, превращаются в строме хлоропласта в перекись водорода, H₂O₂, в реакции, катализируемой супероксиддисмутазой (СОД), а также в результате восстановления аскорбатом. Было, однако, показано, что H₂O₂ на свету образуется и в пределах тилакоидной мембраны (Mubarakshina *et al.*, 2006), и что при увеличении интенсивности света общее образование H₂O₂ при функционировании ФЭТЦ возрастает за счет данного процесса

(Borisova-Mubarakshina *et al.*, 2012). Это соответствует возрастанию генерации $O_2^{\cdot-}$ внутри мембраны при увеличении интенсивности света. Обнаружение генерации $O_2^{\cdot-}$ внутри мембраны в присутствии ферредоксина и НАДФ⁺ свидетельствует о внутри-мембранной продукции этих радикалов и H_2O_2 в физиологических условиях (Kozuleva *et al.*, 2016).

Сопоставление характеристик образования H_2O_2 внутри мембраны с данными об участии ПХ-пула в продукции H_2O_2 при функционировании полной ФЭТЦ привело к предположению об образовании H_2O_2 внутри мембраны в реакции $O_2^{\cdot-}$ с молекулами пластогидрохинона, ПХН₂ (Иванов, 2008; Mubarakshina and Ivanov, 2010). Возможность протекания этой реакции в тилакоидной мембране была проверена путем изучения влияния на окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула подачи $O_2^{\cdot-}$ в мембрану извне. Было найдено, что в изолированных тилакоидах такая подача $O_2^{\cdot-}$ от системы ксантин-ксантиноксидаза приводила к увеличению доли открытых центров ФС2 (Vetoshkina *et al.*, 2017), к увеличению площади над кривой ОЛР-кинетики флуоресценции хлорофилла при высокой интенсивности света (рис. 1), и к существенному замедлению возрастания флуоресценции хлорофилла при низкой интенсивности, что во всех случаях свидетельствовало об окислении молекул ПХН₂ в мембране.

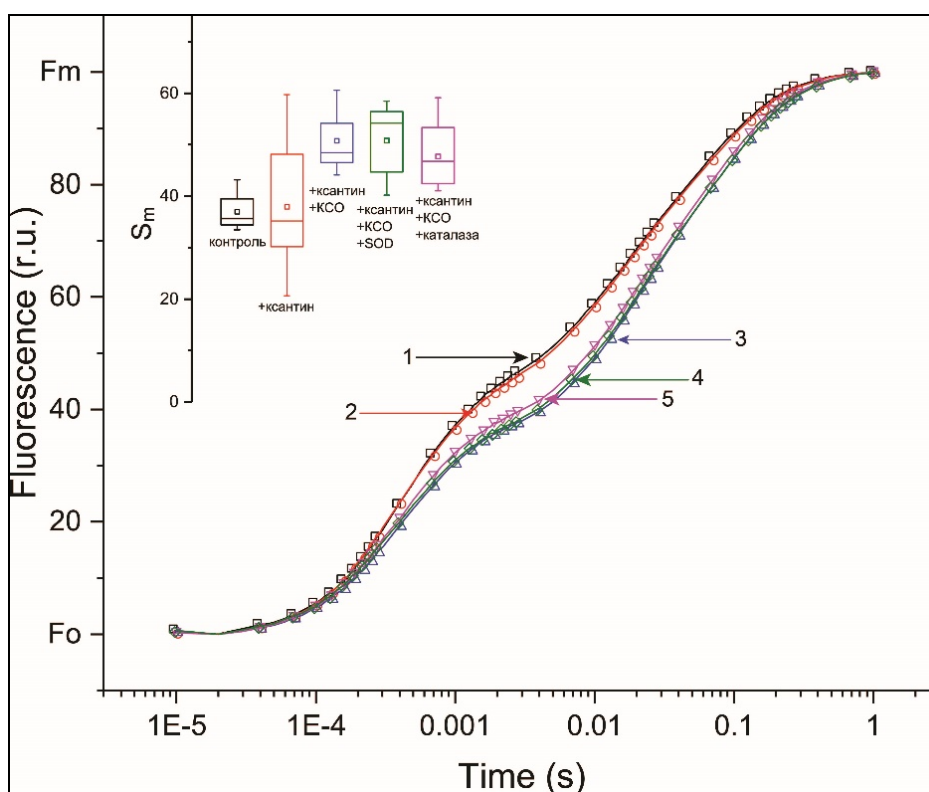


Рис. 1. ОЛР-кинетики флуоресценции хлорофилла *a* суспензии изолированных тилакоидов.

1) без добавок, 2) + ксантин, 3) + ксантин, +ксантин оксидаза, 4) +ксантин, + ксантин оксидаза, +супероксиддисмутаза (SOD), 5) + ксантин, + ксантин оксидаза, + каталаза.

Данные о механизмах формирования H_2O_2 в хлоропласте, позволяют оценить, как изменения в условиях окружающей среды влияют на сигнал, передаваемый с помощью H_2O_2 , системам клетки, обеспечивающим акклимацию фотосинтетического аппарата растения к новым условиям. Мы предполагаем, что место формирования H_2O_2 , а именно, в пределах или вне тилакоидной мембраны, важно для специфичности ее сигнального действия. Образование H_2O_2 за счет ФЭТЦ вне мембраны на высоком свете относительно общей ее продукции невелико (Borisova-Mubarakshina *et al.*, 2012). Замедление цикла Кальвина должно приводить к возрастанию продукции H_2O_2 в строме и ее влияния на экспрессию хлоропластных генов. Геном хлоропласта сохранил контроль

над компонентами ФЭТЦ, которые определяют скорость фотосинтетического переноса электронов (Allen *et al.*, 2011), и поэтому сигнал стромальной H_2O_2 может способствовать быстрому приспособлению цикла Кальвина к новым условиям.

Увеличение интенсивности света стимулирует продукцию молекул H_2O_2 в тилакоидной мембране. Диффундируя в люмен, где отсутствует система нейтрализации H_2O_2 , они могут затем поступать в цитоплазму с возможностью передачи сигнала в ядро. Так как внутри мембраны H_2O_2 формируется с участием ПХ-пула, ее количество может отражать состояние этого пула, которое, как неоднократно показано, контролирует адаптивные изменения фотосинтетического аппарата (Pfannschmidt *et al.*, 1999). Было найдено, что накопление H_2O_2 в листьях моделирует влияние увеличенной интенсивности света на экспрессию ядерных генов, кодирующих антенные белки фотосинтетического аппарата (Borisova-Mubarakshina *и др.*, 2015). Мы предполагаем, что H_2O_2 , сформированная в пределах мембраны тилакоидов с участием ПХ-пула, обеспечивает ретроградную сигнализацию об условиях окружающей среды, выступая мессенджером между окислительно-восстановительным состоянием ПХ-пула и системами адаптации фотосинтезирующих клеток.

Литература

- Иванов Б.Н.* Кооперация Фотосистемы I и пула пластохинона в восстановлении кислорода в хлоропластах высших растений // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – С. 137–144.
- Allen J.F., de Paula W.B.M., Puthiyaveetil S., Nield J.* A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis // Trends in Plant Science. – 2011. – V. 16. – P. 645–655.
- Allen J.F., Hall D.O.* Superoxide reduction as a mechanism of ascorbate-stimulated oxygen-uptake by isolated chloroplasts // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1973. – V. 52. – P. 856–862.
- Borisova-Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., Vetoshkina D.V. et al.* 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. – 2015. – V. 66. – P. 7151–7164.
- Khorobrykh S.A., Ivanov B.N.* Oxygen reduction in a plastoquinone pool of isolated pea thylakoids // Photosynthesis Research. – 2002. – V. 71. – P. 209–219.
- Kozuleva M., Goss T., Twachtmann M. et al.* Ferredoxin: NADP (H) oxidoreductase abundance and location influences redox poise and stress tolerance // Plant Physiology. – 2016. – V. 172. – P. 1480–1493.
- Kozuleva M., Klenina I., Proskuryakov I., Kirilyuk I., Ivanov B.* Production of superoxide in chloroplast thylakoid membranes: ESR study with cyclic hydroxylamines of different lipophilicity // FEBS Letters. – 2011. – V. 585. – P. 1067–1071.
- Kozuleva M.A., Ivanov B.N.* Evaluation of the participation of ferredoxin in oxygen reduction in the photosynthetic electron transport chain of isolated pea thylakoids // Photosynthesis Research. – 2010. – V. 105. – P. 51–61.
- Kozuleva M.A., Petrova A.A., Mamedov M.D., Semenov A.Yu., Ivanov B.N.* O_2 reduction by photosystem I involves phyloquinone under steady-state illumination // FEBS Letters. – 2014. – V. 588. – P. 4364–4368.
- Mubarakshina M., Khorobrykh S., Ivanov B.* Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane // Biochimica Biophysica Acta. – 2006. – V. 1757. – P. 1496–1503.
- Mubarakshina M.M., Ivanov B.N.* The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes // Physiol. Plantarum. – 2010. – V. 140. – P. 103–110.
- Mubarakshina M.M., Kozuleva M.A., Rudenko N.N. et al.* The photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins // Biochimica Biophysica Acta. – 2012. – V. 1817. – P. 1314–1321.
- Pfannschmidt T., Nilsson A., Allen J.F.* Photosynthetic control of chloroplast gene expression // Nature. – 1999. – V. 397. – P. 625–628.
- Vetoshkina D.V., Ivanov B.N., Khorobrykh S.A., Proskuryakov I.I., Borisova-Mubarakshina M.M.* Involvement of the chloroplast plastoquinone pool in the Mehler reaction // Physiologia Plantarum. – 2017. – V. 161. – P. 45–55.