

ISSN 0027 - 1403

**БЮЛЛЕТЕНЬ**  
**МОСКОВСКОГО ОБЩЕСТВА**  
**ИСПЫТАТЕЛЕЙ**  
**ПРИРОДЫ**

**отдел**  
**биологический**

**том 112**  
**выпуск 1**

**приложение № 1**

**2007**

*к 20-летию МБЦ МГУ*



Учредители:

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. М.В. ЛОМОНОСОВА  
МОСКОВСКОЕ ОБЩЕСТВО ИСПЫТАТЕЛЕЙ ПРИРОДЫ

**БЮЛЛЕТЕНЬ  
МОСКОВСКОГО ОБЩЕСТВА  
ИСПЫТАТЕЛЕЙ ПРИРОДЫ**

отдел биологический  
том 112 выпуск 1  
2007 г.  
приложение № 1

**БИОТЕХНОЛОГИЯ. ЭКОЛОГИЯ.  
ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Москва – 2007

Редакционная коллегия:  
А.И.Садчиков (ред. сборника), П.В.Вржеш, Л.М.Захарчук,  
С.В.Котелевцев, О.Р.Кольс, А.В.Кураков, Л.А.Слепцова, К.Л.Тарасов

Бюллетень Московского общества испытателей природы  
отдел биологический  
том 112, выпуск № 1, 2007  
приложение № 1  
Биотехнология. Экология. Охрана окружающей среды.

Приложение к журналу Бюллетень МОИП посвящено 20-летию со дня основания Международного биотехнологического центра МГУ им. М.В.Ломоносова. В нем представлены материалы сотрудников и стажеров МБЦ, сотрудников подразделений МГУ и других организаций, принимающих участие в работе Центра.

Биотехнология – это комплексная область знаний, охватывающая широкий спектр дисциплин. Поэтому не удивительно, что в сборнике опубликованы статьи столь широкого диапазона – начиная от молекулярной биологии и генетики до экологических и природоохранных проблем.

Содержание статей размещено на сайте Московского общества испытателей природы (<http://www.moip-ros.ru>).

Адрес редакции: 125009, Москва, ул. Большая Никитская, дом 6

Журнал зарегистрирован в Министерстве печати и информации РФ.  
Свидетельство о регистрации № 1545 от 14 февраля 1991 г.

Журнал включен в утвержденный ВАК РФ перечень периодических научных и научно-технических изданий, выпускаемых в РФ, в которых должны публиковаться основные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук.

© Коллектив авторов, 2007

Эймса говорит об опасности длительного приема таких БАД для человека.

Последний результат ставит вопрос о необходимости более тщательного контроля пищевых продуктов и БАД как методами биотестирования, так и современными химико-аналитическими методами (в первую очередь - методом хроматомасс-спектрометрии). Нам представляется необходимым ввести в систему СанПиНа контроль БАД методы, позволяющие контролировать генетическую безопасность данных продуктов.

### **РОЛЬ ФИТИЛЬНОЙ ЦЕПИ МОЛЕКУЛЫ ХЛОРОФИЛЛА *a* В СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ АППАРАТА ФОТОСИНТЕЗА**

Шпилев А.В.<sup>1</sup>, Глазер В.М.<sup>1</sup>, Белавина Н.В.<sup>1</sup>, Гримм Б.<sup>2</sup>, Локштейн Х.<sup>2</sup>, Зинченко В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, email: vzinchenko@mail.ru

<sup>2</sup>Institut für Biologie/Pflanzenphysiologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Unter den Linden 6 (Sitz: Philippstr.13), D-10099 Berlin, Germany

#### **Введение**

Хлорофилл (Chl) *a* играет центральную роль у организмов, осуществляющих окислительный фотосинтез (растения, зеленые водоросли и цианобактерии). Субстратами для завершающих этапов биосинтеза Chl являются хлорофиллид (Chlide) и геранилгеранилфосфат (GGPP), образующиеся в биохимических путях биосинтеза тетрапирролов и изопреноидов, соответственно. На последнем этапе биосинтеза Chl *a* осуществляется эстерификация Chlide фитилпирофосфатом (PPP) или GGPP с образованием фитилированного Chl *a* или геранилгеранилированного Chl *a* (Chl *a*<sub>gg</sub>), соответственно [1, 2]. Данная реакция катализируется хлорофиллсинтазой (ChlG) (рис. 1). GGPP имеет четыре двойных углеродных связи (C=C), три из которых восстанавливаются геранилгеранилредуктазой (ChlP). Геранилгеранилредуктаза использует в качестве субстрата GGPP либо Chl *a*<sub>gg</sub> и катализирует образование PPP или Chl *a*, соответственно (рис. 1; [3]).

Одним из научных направлений кафедры генетики МГУ является функциональная геномика цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (далее *Synechocystis*) – модельного объекта изучения окислительного фотосинтеза, биогенеза мембран, сигнальных систем, механизмов адаптации и других процессов, присущих фотосинтезирующим клеткам. В рамках проводимых исследований нами с помощью инсерционного

мутагенеза получен мутант  $\Delta\text{ChlP}$  с инаktivацией гена *chlP* (ORF sl11091), кодирующего геранилгеранилредуктазу ChlP. Биохимический анализ мутанта показал, что в его клетках присутствует исключительно Chl  $a_{gg}$  вместо его фитилированного аналога [4]. В данном сообщении приведены результаты физиолого-биохимического и биофизического исследования мутанта  $\Delta\text{ChlP}$ .

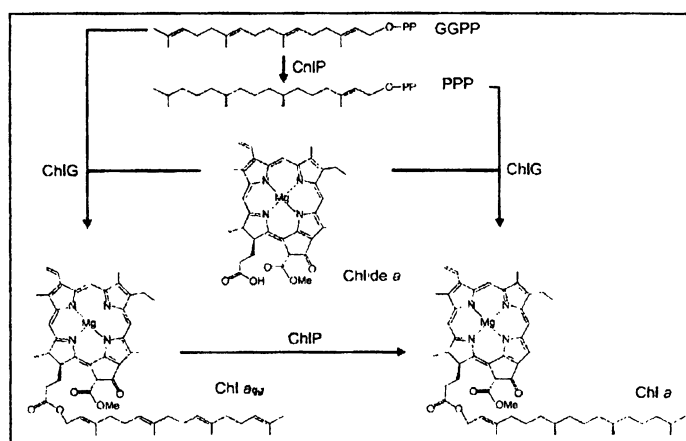


Рис. 1. Последние этапы биосинтеза хлорофилла *a*. GGPP – геранилгеранилпирофосфат; PPP – фитилпирофосфат; Chl  $a_{gg}$  – геранилгеранилированный Chl *a*; Chl *a* – фитилированный Chl *a*; ChlP – геранилгеранилредуктаза; ChlG – хлорофиллсинтаза.

## Материалы и методы

**Штаммы и условия культивирования.** Клетки *Synechocystis* штамма дикого типа (ДТ) и инсерционного мутанта  $\Delta\text{ChlP}$  выращивали фотомиксотрофно на среде BG11 [5] с добавлением глюкозы (10 мМ) при 30°C и при постоянном освещении белым светом (40 мкмоль фотонов  $\text{м}^{-2}\text{сек}^{-1}$ , за исключением случаев, указанных особо) в климатической камере KBW 720 (Binder, Германия). Плотная среда содержала 1% агара и 0,3% тиосульфата натрия. Скорость роста измеряли по оптической плотности культур при 750 нм ( $\text{OD}_{750}$ ) с использованием спектрофотометра Specord 50 (Analytic Jena, Германия).

**Анализ пигментов.** Пигменты экстрагировали из клеток 90% метанолом. Концентрацию хлорофилла и каротиноидов определяли согласно [6] с использованием спектрофотометра Specord 50.

*Спектроскопический анализ.* Спектры абсорбции целых клеток в среде BG11 были записаны на спектрофотометре Specord 50.

*Определение активностей фотосистем.* Активности фотосистем оценивали по выделению кислорода с помощью электрода Кларка при 30°C при насыщающем свете ( $3000 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ сек}^{-1}$ ), как описано [7]. Клетки ресуспендировали в среде BG11, содержащей 25 мМ HEPES–NaOH (pH 7,0) и 10 мМ глюкозу, до  $OD_{750}=1,5$ . Полную цепь транспорта электронов измеряли в присутствии 10 мМ  $\text{NaHCO}_3$ . Транспорт электронов, обусловленный фотосистемой II (ФСII), измеряли в присутствии 10 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , 1 мМ  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  и различных концентраций 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона (DCBQ).

*Измерение флуоресценции хлорофилла.* Флуоресценцию хлорофилла измеряли с помощью флуорометра с пульсовой модуляцией амплитуды PAM101/102/103 (Walz, Германия). Для измерения образцы клеток концентрировали до содержания хлорофилла 20 мкг/мл. Все эксперименты проводили при 30°C. Темновой уровень флуоресценции ( $F_0$ ) определяли на клетках, адаптированных к темноте в течение 10 мин, с помощью модулированного света с интенсивностью  $0,05 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ сек}^{-1}$ . После достижения стабильного уровня  $F_0$  клетки облучали актиническим светом с интенсивностью  $50 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ сек}^{-1}$  до достижения стабильного уровня флуоресценции. Максимальный уровень флуоресценции ( $F_m$ ) определяли после добавления в измерительную кювету 10 мкМ 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевины (DCMU). Максимальную переменную флуоресценцию ( $F_v$ ) рассчитывали как разницу между уровнем  $F_m$ , полученным после добавления DCMU, и уровнем  $F_0$  при темновой адаптации.

## Результаты и обсуждение

*Ростовые характеристики мутанта.* Мутант  $\Delta\text{ChlP}$  неспособен к фотоавтотрофному росту (Табл. 1). В фотомиксотрофных условиях (в присутствии 10 мМ глюкозы в среде) при освещенности 2-4 или 40 мкмоль фотонов  $\text{м}^{-2} \text{ сек}^{-1}$  время удвоения мутанта сходно с таковым для ДТ (Табл. 1). Однако мутант неспособен расти при освещенности выше  $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ сек}^{-1}$  даже в присутствии глюкозы.

*Содержание пигментов.* Культуры мутанта  $\Delta\text{ChlP}$ , выращенные при умеренных или низких условиях освещения, были более синего цвета, чем культуры ДТ. Различие в окраске подтверждается спектрами абсорбции целых клеток (Рис. 2). Пики при 440 и 680 нм, соответствующие абсорбции хлорофилла, снижены у мутанта  $\Delta\text{ChlP}$ , тогда как пик при 625 нм, соответствующий поглощению фикоцианина,

главного компонента фикобилизом, увеличен (Рис. 2). Количественное определение пигментов в метанольных экстрактах выявило снижение

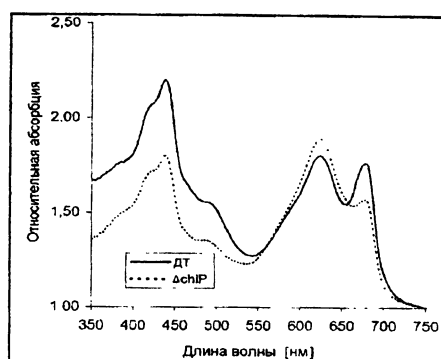


Рис. 2. Спектры абсорбции целых клеток *Synechocystis* штамма ДТ и мутанта ΔChlP. Спектры нормализованы на 1,0 при 750 нм.

Таблица 1  
Скорости роста, содержание пигментов и параметры флуоресценции хлорофилла в клетках *Synechocystis* штамма ДТ и мутанта ΔChlP

	ДТ	ΔChlP
<i>Фотоавтотрофный рост, время удвоения (час)</i>		
$2 \text{ сек}^{-1}$	2–4 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}$ 47,1 $\pm 3,1$	Нет роста
$2 \text{ сек}^{-1}$	40 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}$ 11,2 $\pm 1,1$	Нет роста
<i>Фотомиксотрофный рост, время удвоения (час)</i>		
$2 \text{ сек}^{-1}$	2–4 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}$ 17,3 $\pm 1,8$	16,0± 1,4
$2 \text{ сек}^{-1}$	40 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}$ 9,4± 0,9	9,2±0 ,7
$2 \text{ сек}^{-1}$	100 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}$ 8,8± 0,6	Нет роста
<i>Содержание хлорофилла (мкг <math>\text{мл}^{-1}</math> <math>\text{OD}_{750}^{-1}</math>)<sup>а</sup></i>		
	2,61 $\pm 0,27$	1,93± 0,18
<i>Количественное соотношение фикобилизом к</i>		
	1,05	1,58

хлорофиллу <sup>б</sup>		
Тотальное содержание каротиноидов (мкг мл <sup>-1</sup> OD <sub>750</sub> <sup>-1</sup> ) <sup>а</sup>	0,69 ±0,06	0,54± 0,04
Параметры флуоресценции (относительные единицы)		
<i>F<sub>o</sub></i>	20,1	32,0
<i>F<sub>m</sub></i>	40,2	61,2
<i>F<sub>v</sub></i>	20,1	29,2
<i>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub></i>	0,50	0,48

<sup>а</sup> Пигменты экстрагировали из клеток, выросших фотомиксотрофно при интенсивности света 40 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup> сек<sup>-1</sup>.

<sup>б</sup> Соотношение определяли в интактных клетках согласно формуле [8].

содержания хлорофилла на 26% и снижение общего содержания каротиноидов на 22% у мутанта по сравнению с ДТ (Табл. 1).

Возможный вклад Chlide *a* в абсорбцию хлорофилла у мутанта оценивали после удаления Chl *a*<sub>gg</sub> с помощью *n*-гексана. Спектрофотометрический анализ не выявил присутствия Chlide в экстрактах мутанта. Следовательно, пики при 440 и 680 нм в абсорбционном спектре мутанта соответствуют исключительно Chl *a*<sub>gg</sub>.

*Транспорт электронов и флуоресценция хлорофилла.* С целью функциональной характеристики ФСІ и ФСІІ мутанта определяли транспорт электронов по выделению кислорода в светонасыщающих условиях. Как следует из данных, представленных в Табл. 2, уровень транспорта электронов в полной цепи (от Н<sub>2</sub>О к СО<sub>2</sub>) в клетках мутанта ΔChlP увеличен на 34% по сравнению с таковым в клетках ДТ. Это свидетельствует о наличии у мутанта полностью функциональных ФСІ и ФСІІ. Транспорт электронов, обусловленный ФСІІ, определяли в присутствии искусственных акцепторов электронов, DCBQ и 1 мМ К<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. В клетках ДТ уровень выделения кислорода при концентрации DCBQ в 0,5 мМ был примерно на 38% выше, чем при определении активности полной цепи. Напротив, в этих же условиях в клетках мутанта ΔChlP выделение кислорода осуществлялось на существенно более низком уровне, и было даже ниже уровня, соответствующего полной цепи (Табл. 2). Последний факт свидетельствует об ингибирующем влиянии DCBQ на активность ФСІІ мутанта. Природа ингибирующего влияния DCBQ в настоящее время остается неясной и требует дальнейшего исследования. Одно из возможных объяснений может быть связано с тем, что хиноновые акцепторы электронов, такие как DCBQ, могут выступать в качестве нефотохимических гасителей возбужденных состояний хлорофилла, особенно в структурно измененных антенных системах ФСІІ [9] и,



следовательно, снижать энергию возбуждения у мутанта  $\Delta\text{ChlP}$ , доступную для фотохимии.

Кроме повышенной активности фотосинтетической цепи транспорта электронов, мутант  $\Delta\text{ChlP}$  характеризуется также повышенным уровнем дыхания, о чем свидетельствуют данные экспериментов по измерению поглощения кислорода в темноте в присутствии глюкозы (данные не приведены). Принимая во внимание сходные скорости роста мутанта  $\Delta\text{ChlP}$  и ДТ в умеренных световых условиях, эти данные свидетельствуют о наличии в клетках мутанта дополнительных процессов, связанных с затратой энергии.

Таблица 2

Уровни транспорта электронов в клетках *Synechocystis* штамма ДТ и мутанта  $\Delta\text{ChlP}$

Выделение $\text{O}_2$ ( $\mu\text{моль O}_2 \text{ h}^{-1}$ $\text{OD}_{750}^{-1}$ )	Д Т <sup>б</sup>	$\Delta$ ChlP <sup>б</sup>
Полная цепь <sup>а</sup>	57	7
0,2 мМ DCBQ <sup>в</sup>	6 <sup>б</sup>	74
0,5 мМ DCBQ <sup>в</sup>	77	4
0,8 мМ DCBQ <sup>в</sup>	8	63
1,0 мМ DCBQ <sup>в</sup>	79	2
	5	93
	69	1
	4	74
	64	1
	5	46

<sup>а</sup> В присутствии 10 мМ  $\text{NaHCO}_3$ .

<sup>б</sup> Стандартные отклонения не превышали  $\pm 10\%$ .

<sup>в</sup> В присутствии 10 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , DCBQ и 1,0 мМ  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ .

Темновой уровень флуоресценции хлорофилла  $F_0$  в клетках мутанта примерно в 1,5 раза выше по сравнению с клетками ДТ (Табл. 1). Это может быть связано с более высоким количественным отношением фикобилипротеинов к реакционным центрам ФСII в клетках мутанта, о чем свидетельствует увеличенное соотношение фикобилисом к хлорофиллу (Табл. 1). Однако фотохимическая активность ФСII в том случае, когда все реакционные центры находятся в открытой конфигурации (что определяется по показателю  $F_v/F_m$ ), у

обоих исследованных штаммом оказалась сходной. Эти данные подтверждают вывод, сделанный выше на основе анализа уровня транспорта электронов, о наличии у мутанта  $\Delta\text{ChlP}$  полностью функциональных фотосистем.

#### *Нестабильность фотосистем у мутанта $\Delta\text{ChlP}$*

Ранее описанный мутант *R.capsulatus*, накапливающий  $\text{BChl } a_{gg}$ , проявлял сниженную фотосинтетическую активность вследствие нестабильности фотосинтетического аппарата [10]. Сходное влияние может оказывать и накопление  $\text{Chl } a_{gg}$  у мутанта  $\Delta\text{ChlP}$ . Для проверки этого предположения культуры ДТ и мутанта  $\Delta\text{ChlP}$  лишали экзогенного источника глюкозы. С этой целью клетки, выросшие фотомиксотрофно, собирали с помощью центрифугирования и переносили в среду, не содержащую глюкозу. За содержанием в клетках пигментов следили с помощью абсорбционной спектрофотометрии с параллельным определением концентрации хлорофилла. С целью выявления возможного влияния такого дополнительного фактора как освещение, проводили сравнительный анализ деградации хлорофилла на свету и в темноте.

После переноса в фотоавтотрофные условия мутант  $\Delta\text{ChlP}$ , в отличие от ДТ, продолжал расти только в течение 1 суток (рис. 3А), после чего его рост полностью останавливался. В клетках ДТ, инкубированных в темноте, содержание хлорофилла изменялось незначительно (Рис. 3Б), что свидетельствует о стабильности его ФС I и ФС II. Напротив, при инкубации в темноте в клетках мутанта  $\Delta\text{ChlP}$  с течением времени происходило постоянное снижение содержания хлорофилла, что указывает на прогрессивную деградацию фотосистем у мутанта (Рис. 3Б). Свет стимулировал деградацию хлорофилла у мутанта  $\Delta\text{ChlP}$ . Это наблюдение подтверждается быстрым падением содержания хлорофилла в клетках мутанта при его инкубации в среде, содержащей глюкозу, при повышенной интенсивности света ( $500 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ сек}^{-1}$ , данные не приведены).

Наиболее вероятно, что нестабильность фотосистем у мутанта  $\Delta\text{ChlP}$  обусловлена нарушением связывания  $\text{Chl } a_{gg}$  с соответствующими апопротеинами из-за сниженной подвижности изопреноидной цепи. Три дополнительных связи  $\text{C}=\text{C}$  должны затруднять вращение атомов углерода в шести позициях и, следовательно, ограничивать число возможных конформаций изопреноидного хвоста. Ранее было установлено, что фитильная хвостовая часть необходима для стабильной сборки комплексов D1 и PsaA [11]. Кроме того, нарушение связывания  $\text{Chl } a_{gg}$  с апопротеинами, в частности с вспомогательными свето-

поглощающими пигментами, может приводить к нарушению переноса энергии возбуждения к реакционным центрам фотосистем и, следовательно, к более продолжительному времени жизни возбужденного состояния, что должно увеличивать образование долгоживущих форм возбужденных триплетов хлорофилла. Последние, как известно, быстро реагируют с кислородом, что приводит к фотоповреждению пигмент-белковых комплексов и фотосинтетических мембран. Правильное связывание молекул хлорофилла с апопротеинами также может быть необходимым для эффективной фотозащиты.

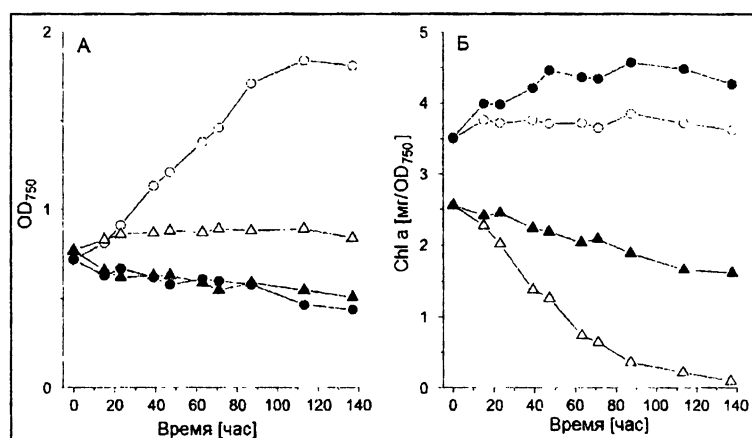


Рис. 3. Рост (А) и содержание хлорофилла (Б) в клетках *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамма ДТ (кружки) и мутанта  $\Delta$ ChlP (треугольники). Культуры выращивали в умеренных световых условиях ( $40 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{сек}^{-1}$ ; открытые символы) или в темноте (заполненные символы) в отсутствии глюкозы.

Повышенная скорость оборота фотосистем в клетках мутанта  $\Delta$ ChlP является, по-видимому, следствием их нестабильности. Потребность в глюкозе и более интенсивное дыхание клеток мутанта указывает на более интенсивную метаболическую активность, необходимую для поддержания на необходимом уровне фотосистем, подверженных деградации.

В заключении следует отметить, что мутант  $\Delta$ ChlP является удобной системой для дальнейшего исследования различных аспектов взаимодействия хлорофилла с апопротеинами, биогенеза и функционирования фотосистем, а также для изучения регуляции фотосинтетической и дыхательной активностей.

*Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 07-04-00117-а) и "Ведущие научные школы" (№ НШ-4202.2006.4).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Beale S. In: Bryant D.A. (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, pp. 519-558.
2. Rüdiger W. (1997) *Phytochemistry* 46: 1151-1167.
3. Rüdiger W. and Schoch S. In: Scheer H. (Ed.), *Chlorophylls*, CRC Press, Boca Raton, 1991, pp. 451-464.
4. Shpilyov A.V., Zinchenko V.V., Shestakov S.V., Grimm B. and Lokstein H. (2005) *Biochim. Biophys. Acta.* 1706: 195-203.
5. Rippka R., Deruelles D. E., Waterbury J.B., Herdman M. and Stanier R.Y. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
6. Lichtenthaler H.K. (1987) *Methods Enzymol.* 148: 350-382.
7. Mannan R.M. and Pakrasi H.B. (1993) *Plant Physiol.* 103: 971-977.
8. Richaud C., Zabulon G., Joder A. and Thomas J-C. (2001) *J. Bacteriol.* 183: 2989-2994.
9. Renger G. Z. (1979) *Naturforsch.* 34c: 1010-1014.
10. Bollivar D.W., Wang S., Allen J.P. and Bauer C.E. (1994) *Biochemistry* 33: 12763-12768.
11. Kim J., Eichacker L.A., Rüdiger W. and Mullet J. (1994) *Plant Physiol.* 104: 907-916.

**БЮЛЛЕТЕНЬ  
МОСКОВСКОГО ОБЩЕСТВА  
ИСПЫТАТЕЛЕЙ ПРИРОДЫ**

**отдел биологический  
том 112 выпуск 1  
2007 г.  
приложение № 1**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ. ЭКОЛОГИЯ.  
ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 13.03.2007 г.

Формат 60x90 1/16. Усл.печ.л. 13,25. Тираж 100 экз. Заказ 123.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,  
2-й учебный корпус, 627 к.  
Тел. 939-3890, 939-3891. Тел./Факс 939-3891.