

## АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМ И ПЕРЕХОДНЫЕ СОСТОЯНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА МУТАНТОВ *Synechocystis* PCC 6803 С РАЗЛИЧНЫМ РЕДОКС-СОСТОЯНИЕМ ПЛАСТОХИНОНОВОГО ПУЛА\*

© 2015 Ю.В. Большевцева<sup>1\*\*</sup>, Ф.И. Кузьминов<sup>2,4</sup>,  
И.В. Еланская<sup>3</sup>, М.Ю. Горбунов<sup>4</sup>, Н.В. Карапетян<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский проспект, 33; электронная почта: bolychev@inbi.ras.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991 Москва

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва

<sup>4</sup> Institute of Marine and Coastal Sciences, Rutgers, the State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey 08901, USA

Поступила в редакцию 24.06.14

После доработки 31.07.14

Для выяснения механизма регуляции переходных состояний фотосинтетического аппарата цианобактерий исследовали активность фотосистем адаптированных к темноте клеток дикого типа (WT) цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 и мутантов, у одного из которых ( $Ox^-$ ) вследствие отсутствия терминальных оксидаз пул пластохинонов был восстановлен, а у другого ( $SDH^-$ ) из-за отсутствия сукцинатдегидрогеназы – окислен. Измерение переменной флуоресценции и 77 К спектров флуоресценции клеток *Synechocystis* после 2 ч инкубации в темноте показало, что фотосинтетический аппарат клеток WT и мутанта  $SDH^-$  находился в состоянии 1. Переменная флуоресценция мутанта  $Ox^-$ , индуцированная светом 2 (620 нм) в присутствии диурона, была в 1,5 раза ниже, чем у дикого типа и мутанта  $SDH^-$ , что характерно для состояния 2. Высокая скорость темнового восстановления  $P700^+$  в присутствии диурона и низкий уровень  $P700^+$  на свету 2 без диурона указывали на высокую активность циклического переноса электронов через ФСII при состоянии 2 в клетках  $Ox^-$ . Освещение адаптированных к темноте клеток постоянным слабым светом 1 (440 нм) одновременно со вспышками действующего света 2 (620 нм) не влияло на активность ФСII у WT и мутанта  $SDH^-$ . У мутанта  $Ox^-$  в этих условиях наблюдалось возрастание переменной флуоресценции и содержания  $P700^+$  до уровня таковых у WT и  $SDH^-$ , что указывало на ускорение линейного переноса электронов и переход фотосинтетического аппарата  $Ox^-$  из состояния 2 в состояние 1. Таким образом, ФСII при окисленном пуле пластохинонов в состоянии 1 обнаруживала высокую активность, но была обратимо инактивирована в состоянии 2 при восстановленном пластохиноновом пуле. Эти изменения активности контролировались редокс-состоянием пластохинонов через ускорение или замедление электронного транспорта на акцепторной стороне ФСII.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** цианобактерии, мутанты, фотосистема II,  $NADP^+$ , переходные состояния, пластохиноны.

Фотосинтетические организмы обладают несколькими механизмами, позволяющими сохранять высокую эффективность биоэнергетических процессов при различных условиях освещения. Эти механизмы включают способность к

диссипации избытка энергии, поглощенной пигмент-белковыми комплексами, и структурные перестройки фотосинтетического аппарата, оптимизирующие поглощение световой энергии при изменении интенсивности и спектраль-

Принятые сокращения: WT – дикый тип;  $Ox^-$  – мутант, лишенный терминальных оксидаз;  $SDH^-$  – мутант, лишенный сукцинатдегидрогеназы; PQ – пластохинон; ФСII (ФСII) – фотосистема II (фотосистема I);  $P700$  ( $P700^+$ ) – первичный донор электрона ФСII в восстановленном (окисленном) состоянии; *cyt*  $b_6/f$  – комплекс цитохромов  $b_6/f$ ; PBS – фикобилисома; LHCII – хлорофилл-*a/b*-светособирающий комплекс; Fd – ферредоксин; DCMU – дихлорфенил-диметилмочевина;  $NAD(P)^+$ ,  $NAD(P)H$  – никотинамидадениндинуклеотид (фосфат) окисленный, восстановленный; FNR – ферредоксин:  $NADP$ -оксидоредуктаза;  $Q_A$ , ( $Q_A^-$ ),  $Q_B$ , ( $Q_B^-$ ) – первичный и вторичный акцепторы электрона хиноновой природы ФСII в окисленном (восстановленном) состоянии.

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-182, 28.12.2014.

\*\* Адресат для корреспонденции.

ного состава света [1, 2]. Механизм перераспределения поглощенной световой энергии между ФСІ и ФСІІ, позволяющий фотосинтезирующим организмам изменять скорости переноса электронов через фотосистемы в различных режимах освещения, известен как «быстрые» (short-term) изменения организации фотосинтетического аппарата (так называемые переходы между состояниями 1 и 2) [3–6]. Изменение состояния фотосинтетического аппарата зависит от редокс-состояния переносчиков электронов между фотосистемами [6–8]. При освещении светом 1 клетки переходят в состояние 1 (результат окисления PQ-пула и *cyt b<sub>6</sub>/f*), и светособирающая антенна направляет поглощенную энергию преимущественно на ФСІІ. Переход в состояние 2 вызван восстановлением переносчиков электронов между фотосистемами, которое происходит при освещении светом 2, поглощаемым ФСІІ; при этом усиливается перенос энергии от фикобилисом (PBS) к ФСІ.

Механизм процессов, регулирующих смену переходных состояний у цианобактерий, отличается от механизма, функционирующего у растений, из-за различий в организации пигментного аппарата. В фотосинтетических мембранах растений и водорослей, содержащих интегральный хлорофилл-*a/b*-светособирающий комплекс (ЛНСІІ), изменение переходных состояний происходит вследствие обратимого фосфорилирования комплекса ЛНСІІ, индуцирующего миграцию ЛНСІІ между гранами (обогащены ФСІІ) и стромальными мембранами (обогащены ФСІ). Протеинкиназа, фосфорилирующая ЛНСІІ, локализована в тилакоидной мембране, и ее активность может контролироваться редокс-состоянием пула PQ и/или цитохромного комплекса *b<sub>6</sub>/f* [6–9]. Тилакоидные мембраны цианобактерий лишены ЛНСІІ, и основным светособирающим комплексом служат немембранные фикобилипротеиновые комплексы – PBS, направляющие поглощенную световую энергию к ФСІІ и ФСІ [10–12]. В отличие от тилакоидных мембран эукариот тилакоидные мембраны цианобактерий обеднены ФСІІ [12, 13]. Наряду с фотосинтетическими компонентами (PQ, *cyt b<sub>6</sub>/f*, ФСІ, ФСІІ) тилакоидные мембраны цианобактерий содержат компоненты дыхательной цепи переноса электронов: NDH-1 и сукцинатдегидрогеназу (SDH), которые могут восстанавливать пул PQ [14–16], а также терминальные оксидазы, способствующие окислению PQ-пула при избытке восстановителя [17]. Несмотря на такие отличия, цианобактерии также способны к переходным изменениям фотосинтетического аппарата, которые зависят от редокс-состояния пула PQ и цитохромного комплекса *b<sub>6</sub>/f* [8, 18, 19].

Для объяснения природы процессов, лежащих в основе перераспределения поглощенной PBS энергии между фотосистемами, было предложено несколько механизмов: изменение эффективного сечения поглощения ФСІІ и ФСІ в результате латеральной диффузии PBS [20, 21]; изменение степени агрегации комплекса ФСІ (тример–мономер) и ФСІІ (димер–мономер) [22–25]; модель подвижности всех пигмент–белковых комплексов и передачи энергии по механизму «spillover» [26]. Однако механизм влияния редокс-состояния переносчиков электронов между фотосистемами на процессы миграции энергии у цианобактерий пока не выяснен.

В темноте пул PQ в клетках цианобактерий может быть восстановлен дыхательными дегидрогеназами NDH-1, NDH-2 и SDH, при этом фотосинтетический аппарат переходит в состояние 2 [5, 8, 18, 27]. На свету NDH-1, которая окисляет преимущественно NADPH [14, 28, 29], может восстанавливать пул PQ, обеспечивая наряду с Fd-зависимым NDH-1-зависимый путь циклического транспорта электронов через ФСІ [30, 31]. У мутанта *Synechococcus* PCC 7002 с нарушением NDH-1-зависимого восстановления пула PQ вследствие мутации по NdhF-субъединице NDH-1, а также у двойного мутанта без NdhF и PsaE-субъединицы ФСІ, у которого нарушены NDH-1- и Fd-зависимые пути циклического транспорта электронов, фотосинтетический аппарат находился преимущественно в состоянии 1 после 2 мин инкубации в темноте в присутствии DCMU. Однако в анаэробных условиях или в присутствии цианида калия (KCN) фотосинтетический аппарат этих мутантов переходил в состояние 2 [27]. Показано, что у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* переход фотосинтетического аппарата из состояния 1 в состояние 2 сопровождается переключением линейного пути переноса электронов на циклический [32]. В состоянии 2 (активен циклический путь) обратимое фотоингибирование ФСІІ более выражено, чем в состоянии 1, когда преобладает линейный перенос электронов [33]. Ускорение циклического переноса электронов у мутантов *Synechocystis* с заблокированными NDH-1- или Fd-зависимым путями наблюдали при высокой интенсивности освещения, достаточной для фотоинактивации ФСІІ [31]. Таким образом, состояние фотосинтетического аппарата у цианобактерий может регулироваться балансом между циклическим и линейным путями переноса электронов.

Показано, что в темноте основным путем переноса электронов из стромы цианобактериальной клетки в пул PQ является восстановление пластохинонов сукцинатдегидрогеназой [29], тогда как NDH-дегидрогеназы типов I и II регу-

лируют в клетках уровень окисленных пиридин-нуклеотидов ( $\text{NADP}^+$  и  $\text{NAD}^+$  соответственно), от которого в свою очередь зависит поток электронов через SDH к пулу PQ. Поэтому у мутанта, лишённого SDH, пул PQ в темноте более окислен, чем у дикого типа [29]. В то же время выживание клеток цианобактерий в темноте в течение нескольких часов также может приводить к окислению пула PQ из-за снижения уровня восстановителя в клетках в результате темного дыхания [14, 34]. В связи с этим можно предполагать, что фотосинтетический аппарат клеток дикого типа *Synechocystis* и мутанта SDH<sup>-</sup> после инкубации в темноте должен был бы находиться в состоянии 1. В отличие от дикого типа и SDH<sup>-</sup> у мутанта, лишённого терминальных оксидаз, после темновой адаптации пул PQ восстановлен [35], и фотосинтетический аппарат должен находиться в состоянии 2.

Цель данной работы состояла в выяснении возможной роли ФСII в переходах фотосинтетического аппарата цианобактерий из одного состояния в другое. Для этого исследовали влияние редокс-состояния хиноновых компонентов акцепторной части ФСII на активность реакционных центров этой фотосистемы в клетках дикого типа *Synechocystis* PCC 6803 и мутантов SDH<sup>-</sup> [16] и Oх<sup>-</sup> [36], лишённых, соответственно, сукцинатдегидрогеназы и терминальных оксидаз (CtaI, CtaII и Cyd). Чтобы обнаружить изменение состояния фотосинтетического аппарата цианобактерий использовали свет, поглощаемый преимущественно фикобилисомами (620 нм – свет 2), и свет, поглощаемый хлорофилл-белковыми комплексами (440 и 680 нм – свет 1). Полученные данные указывают на различное исходное состояние реакционных центров ФСII и фотосинтетического аппарата в клетках исследованных штаммов цианобактерий после темновой адаптации. При использовании света 2 (620 нм) у дикого типа и мутанта SDH<sup>-</sup> наблюдалось состояние 1, тогда как у мутанта, лишённого оксидаз, обнаруживалось состояние 2. Низкий выход переменной флуоресценции в присутствии диурона в состоянии 2 и возрастание переменной флуоресценции при переходе в состояние 1 на фоне постоянного света 1 у мутанта, лишённого оксидаз, указывает на обратимую инактивацию ФСII при формировании состояния 2 фотосинтетического аппарата цианобактерий.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки дикого типа цианобактерий *Synechocystis* PCC 6803 и мутантов Oх<sup>-</sup> (*ctaCDE*<sup>-</sup>/*cydAB*<sup>-</sup>/*ctaDEII*<sup>-</sup>, лишённый оксидаз) [36] и SDH<sup>-</sup>

(*slI1625*<sup>-</sup>/*slI0823*<sup>-</sup>, лишённый сукцинатдегидрогеназы) [16] выращивали фотоавтотрофно в течение 4–5 дней при 30° при постоянном освещении дневным светом 40 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> и непрерывном перемешивании в жидкой минеральной среде BG11 [37] с добавлением соответствующих антибиотиков. Клетки собирали мягкой фильтрацией на фильтрах («Nalgene», США, размер пор 0,45 мкм, объем 150 мл) при помощи ручного вакуумного насоса («Nalgene», США) и разбавляли средой до нужной плотности суспензии. Концентрацию хлорофилла определяли в 80%-ных ацетоновых экстрактах по методу Лихтеналер [38]. Собранные клетки выдерживали 1,5–2 ч в темноте (для перевода фотосинтетического аппарата мутанта Oх<sup>-</sup> в состояние 2, а дикого типа – в состояние 1) или 30 мин на свету от лампы накаливания (25 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>) для перевода фотосинтетического аппарата Oх<sup>-</sup> в состояние 1.

Спектры флуоресценции при 77 К регистрировали с использованием спектрофлуориметра RF-5301PC («Shimadzu», Япония) при содержании хлорофилла в образцах 1,5–2 мкг/мл в кювете толщиной 0,1 см; ширина щели монохроматора для возбуждающего света 570 нм была 5 нм, а монохроматора, пропускающего испускание – 3 нм. Спектры флуоресценции исправлены на спектральную чувствительность прибора и нормированы в максимуме при 722 нм.

Чтобы перевести фотосинтетический аппарат всех штаммов *Synechocystis* после темновой адаптации (предполагаемое состояние 2 у мутанта Oх<sup>-</sup>) в состояние 1, клетки освещали непрерывным светом 680 или 440 нм (70 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>) в течение 1 мин в присутствии  $5 \times 10^{-5}$  М DCMU. Ингибитор вносили в образец за 2 мин до измерения. Индукцию флуоресценции ФСII клеток *Synechocystis* регистрировали при комнатной температуре при помощи импульсного флуориметра PAM-101 («Walz», Германия) [39]. При измерении индукции флуоресценции в качестве источника света использовали галогеновую лампу (KL 1500) и интерференционные фильтры VPF-680 с полушириной пропускания 35 нм («Фотооптик», Россия) или VPF-440/10 с полушириной пропускания 10 нм («Фотооптик», Россия) с тепловым фильтром («Balzers», Лихтенштейн).

При измерении кинетики индукции флуоресценции в импульсном режиме освещения (в отсутствие DCMU) при помощи флуориметра PAM-101 источником действующего света 620 нм (1 с, 300 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>) служила управляемая лампа (High Power Led\_Lamp, Control Unit HPL-C) на основе светодиодов («Walz», Германия); время между вспышками составляло 15 с. Кинети-

ческая кривая представляла собой среднюю из 7–10 последовательно зарегистрированных кривых. Дополнительную подсветку непрерывным светом 440 нм ( $70 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ) осуществляли при помощи галогеновой лампы (KL 1500) и интерференционного фильтра BPF 440/10 без предосвещения.

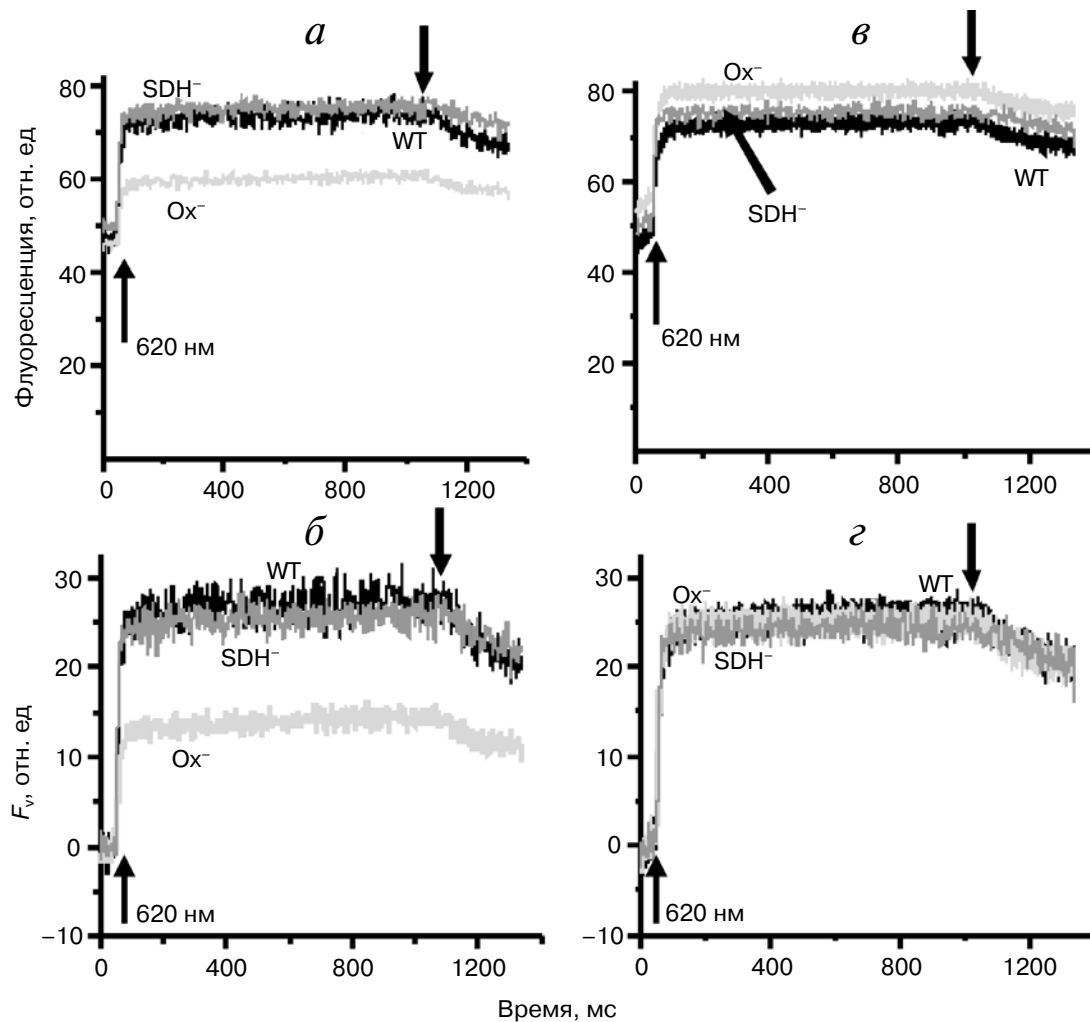
Изменение поглощения P700 при 810 нм (против 870 нм) регистрировали с использованием двухволновой приставки ED-P700DW к РАМ-101 («Walz», Германия) [40] и такого же действующего света, как и при измерении кинетики индукции флуоресценции в импульсном режиме освещения (620 нм,  $300 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ , 1 с).

Интенсивность действующего света 680 нм определяли при помощи измерителя мощности

излучения «Optical Power Meter System» («Thorlabs», Германия). Для измерения интенсивности действующего света 440 и 620 нм использовали также квантометр Quantitherm (QRT1, «Hansatech», Германия). Измерения проводили при концентрации хлорофилла 5 или  $10 \text{ мкг мл}^{-1}$  в кювете толщиной 1 см.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки мутанта  $\text{Ox}^-$ , выдержанные 2 ч в темноте, характеризовались низким выходом переменной флуоресценции в присутствии DCMU по сравнению с клетками дикого типа и мутанта  $\text{SDH}^-$  (рис. 1, а и б). Однако после 30 мин инку-



**Рис. 1.** Кинетика переменной флуоресценции клеток *Synechocystis* дикого типа (WT) и мутантов  $\text{Ox}^-$  и  $\text{SDH}^-$ , выдержанных 2 ч в темноте (а и б) или освещенных 30 мин белым светом  $25 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$  (в и г). На панелях б и г  $F_v$  – компонент переменной флуоресценции. Измерения в присутствии  $5 \times 10^{-5} \text{ М DCMU}$ ; действующий свет 620 нм ( $30 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ). Каждая кривая представляет собой среднюю из трех, полученных в трех независимых экспериментах. Содержание хлорофилла в образцах –  $10 \text{ мкг мл}^{-1}$

бации на белом свете клетки дикого типа и обо-их мутантов практически не различались по кинетике переменной флуоресценции (рис. 1, в и з). Переменная флуоресценция клеток дикого типа и  $SDH^-$ , в отличие от таковой мутанта  $Ox^-$ , почти не изменялась после 30 мин инкубации на свету (рис. 1). Судя по одинаковому выходу переменной флуоресценции после инкубации на свету, все три исследованных штамма характеризовались одинаковым относительным содержанием ФСII (рис. 1, з). Низкая величина переменной флуоресценции после 2 ч темноты у мутанта  $Ox^-$  по сравнению с таковой клеток, выдержанных на свету, могла свидетельствовать о состоянии 2 фотосинтетического аппарата, характеризующемся низкой активностью ФСII [41]. Кроме низкого выхода переменной флуоресценции выдержанные в темноте клетки  $Ox^-$  характеризовались более высокой скоростью темнового восстановления  $P700^+$  ( $\tau_{1/2} = 155 \pm 42$  мс) по сравнению с таковыми дикого типа ( $415 \pm 103$  мс) и мутанта  $SDH^-$  ( $416 \pm 110$  мс), если измерения проводили на свету 730 нм ( $4000$  мкмоль  $m^{-2} c^{-1}$ , 1 с) в присутствии DCMU. Эти данные свидетельствуют о высокой скорости циклического переноса электронов в клетках мутанта, лишённого дыхательных оксидаз.

Показано, что состояние фотосинтетического аппарата зависит от редокс-состояния переносчиков электронов между фотосистемами [8, 18, 19]. Для оценки редокс-состояния пула PQ в клетках дикого типа и мутантов *Synechocystis* были рассчитаны отношения площади над кривой индукции флуоресценции с DBMIB и аскорбатом ( $S_{DBMIB}$ ) к площади над кривой индукции флуоресценции с DCMU ( $S_{DCMU}$ ) [42]. Для адаптированных к темноте клеток дикого типа и мутанта  $SDH^-$  соотношение площадей было приблизительно одинаково, тогда как у мутанта  $Ox^-$  это соотношение было очень низким (рис. 2), что согласуется с данными о более высоком уровне восстановления пула PQ у мутанта  $Ox^-$ , лишённого терминальных оксидаз [35].

О переходе фотосинтетического аппарата мутанта  $Ox^-$  в состояние 1 после инкубации на свету свидетельствуют результаты анализа 77 К спектров флуоресценции клеток дикого типа и мутантов. Клетки адаптированного к темноте мутанта  $Ox^-$  обнаруживали самый низкий выход флуоресценции по сравнению с клетками дикого типа и мутанта  $SDH^-$  в области испускания ФСII, о чем судили по соотношению выходов флуоресценции  $F_{692}/F_{722}$  (таблица, рис. 3). После освещения в течение 30 мин у дикого типа флуоресценция ФСII возрастала незначительно (рис. 3, а), тогда как у  $Ox^-$  наблюдалось наибольшее возрастание выхода флуоресценции в

области испускания ФСII (684 и 692 нм) (рис. 3, б), а у  $SDH^-$  выход 77 К флуоресценции ФСII даже немного снижался (таблица; рис. 3, в). Увеличение выхода флуоресценции в области испускания ФСII (684 и 692 нм) характеризует переход фотосинтетического аппарата из состояния 2 в состояние 1 [23, 27].

Любой видимый свет в присутствии DCMU действует как свет 1 (возбуждает ФСI и окисляет пул PQ), переводя клетки цианобактерий в состояние 1 [27]. Для выявления состояния фотосинтетического аппарата мутантов мы исследовали индукцию флуоресценции выдержанных в течение 2 ч в темноте клеток *Synechocystis* под действием непрерывного красного света 680 нм или синего света 440 нм в присутствии DCMU. Под действием света 680 нм клетки мутанта  $Ox^-$  обнаруживали быстрое возрастание флуоресценции до уровня, совпадающего с уровнем флуоресценции при предварительной вспышке насыщающего света ( $F_{MD}$ ) (рис. 4). Затем возрастание замедлялось, достигая максимума в течение 1 мин освещения, причем этот максимальный уровень ( $F_{ML}$ ) совпадал с уровнем флуоресценции при вспышке насыщающего света, данной через 15–20 сек после выключения света 680 нм (рис. 4). Клетки дикого типа *Synechocystis*, выдержанные в темноте в течение

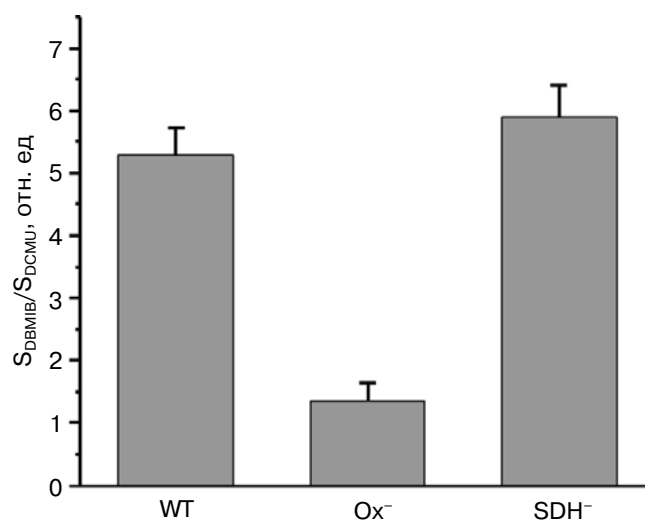
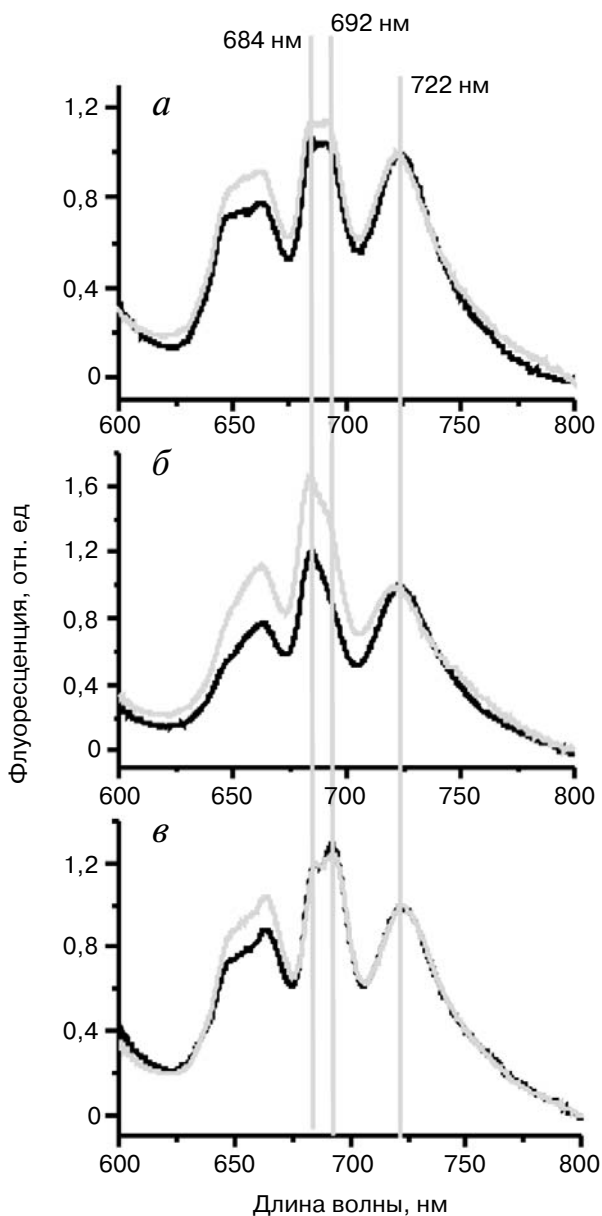


Рис. 2. Отношение площади над кривой  $F_V$ -компонента переменной флуоресценции в присутствии  $60 \mu M$  DBMIB ( $S_{DBMIB}$ ) к площади над кривой  $F_V$ -компонента переменной флуоресценции в присутствии  $5 \times 10^{-5} M$  DCMU и  $60 \mu M$  DBMIB ( $S_{DCMU}$ ), вычисленное для клеток *Synechocystis* дикого типа (WT) и мутантов  $Ox^-$  и  $SDH^-$ , выдержанных 2 ч в темноте; отношения представляют собой средние  $\pm$  s.d. из значений, полученных в пяти независимых экспериментах

Отношение выхода 77 К флуоресценции при 692 нм ( $F_{692}$ ) или 684 нм ( $F_{684}$ ) к таковому при 722 нм ( $F_{722}$ ). Данные иллюстрируют рис. 3

Условия адаптации клеток	WT		Ox <sup>-</sup>		SDH <sup>-</sup>	
	$F_{692}/F_{722}$	$F_{684}/F_{722}$	$F_{692}/F_{722}$	$F_{684}/F_{722}$	$F_{692}/F_{722}$	$F_{684}/F_{722}$
Темнота, 2 ч	1,03	1,06	0,94	1,20	1,29	1,19
Освещение, 30 мин	1,15	1,14	1,41	1,65	1,24	1,19

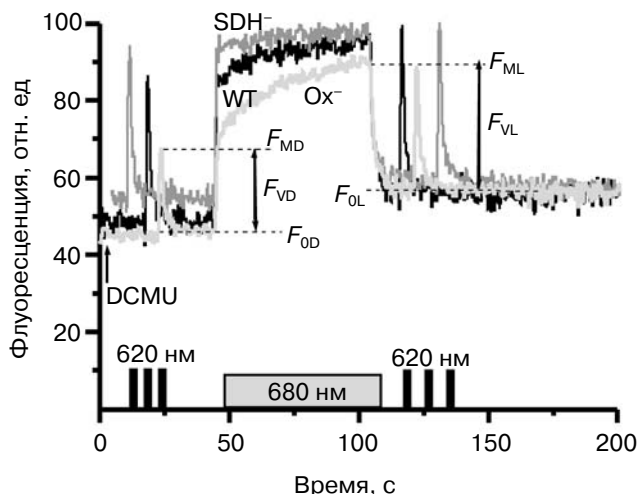


**Рис. 3.** Типичные 77 К спектры флуоресценции клеток дикого типа *Synechocystis* (а) и мутантов Ox<sup>-</sup> (б) и SDH<sup>-</sup> (в), адаптированных к темноте (черная линия) или освещенных в течение 30 мин белым светом (серая линия). К освещенным образцам добавляли  $5 \times 10^{-5}$  М DCMU за 5 мин до замораживания для получения состояния 1 фотосинтетического аппарата;  $\lambda_{возб}$  – 570 нм, спектры нормированы при 722 нм

2 ч, лишь в незначительной степени демонстрировали изменение флуоресценции под действием света 680 нм (рис. 4). У мутанта SDH<sup>-</sup> медленная фаза нарастания флуоресценции практически исчезла, причем показатели  $F_{MD}$  и  $F_{ML}$  мало отличались и почти совпадали с максимальным уровнем флуоресценции после освещения насыщающим светом 620 нм (рис. 4).

Поскольку свет, проходящий через светофильтр 680 нм, частично поглощается PBS, состояние которых могло бы определять состояние фотосинтетического аппарата цианобактерий, то для сравнения в качестве действующего был использован свет 440 нм, который поглощается лишь хлорофиллами и каротиноидами. Кинетика переменной флуоресценции клеток дикого типа и мутантов *Synechocystis* при освещении светом 440 нм не отличалась существенно от таковой, измеренной на свету 680 нм (рис. 5, а). Очевидно, свет 440 нм, не поглощаемый PBS, в присутствии диурона вызывал такое же изменение состояния фотосинтетического аппарата, как и свет 680 нм, частично поглощаемый PBS. Несмотря на то, что свет 680 нм (частично «фикобилиновый») и свет 440 нм («хлорофильный») вызывали одинаковые изменения флуоресценции ФСII, свет 680 нм оказался примерно в 2 раза более эффективным для достижения максимального выхода флуоресценции, чем свет 440 нм (рис. 5, б).

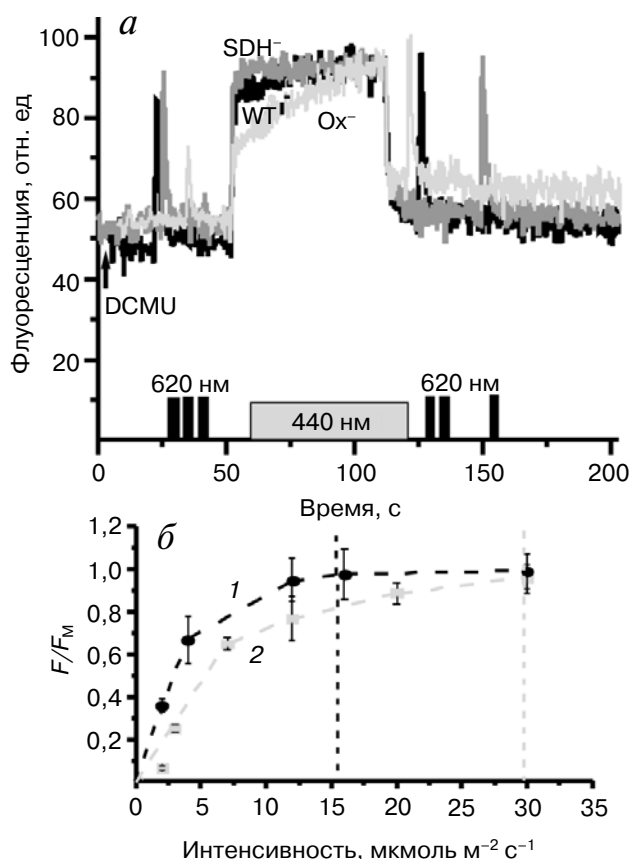
Ранее было показано, что изменение состояний фотосинтетического аппарата цианобактерий можно оценить по относительному возрастанию флуоресценции ФСII ( $F_{ML} - F_{MD}$ )/ $F_{MD}$  после освещения светом в присутствии DCMU [27]. На рис. 6, а в виде диаграммы представлены показатель изменения состояния пигментного аппарата ( $F_{ML} - F_{MD}$ )/ $F_{MD}$  и показатели, характеризующие квантовый выход активности ФСII до ( $F_{MD} - F_{0D}$ )/ $F_{MD}$  и после ( $F_{ML} - F_{0L}$ )/ $F_{ML}$  освещения 680 нм. Клетки мутанта Ox<sup>-</sup> характеризовались самым высоким показателем изменения состояний фотосинтетического аппарата после освещения клеток *Synechocystis*, инкубированных в темноте (рис. 6, а). При этом квантовый выход активности ФСII до и после освеще-



**Рис. 4.** Кинетика переменной флуоресценции клеток *Synechocystis* дикого типа WT (черная линия), мутантов Oх<sup>-</sup> (светло-серая линия) и SDH<sup>-</sup> (серая линия), выдержанных 2 ч в темноте. Измерения в присутствии  $5 \times 10^{-5}$  M DCMU; измерительный свет 650 нм ( $<1$  мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>, 1,6 кГц), действующий свет 680 нм (70 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>, 1 мин). До и после освещения действующим светом 680 нм клетки кратковременно (1 с) освещали вспышкой насыщающего света 620 нм (4800 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>). На рисунках обозначены выходы фоновой ( $F_0$ ) и переменной ( $F_V$ ) и максимальной ( $F_M$ ) флуоресценции до ( $F_{0D}$ ,  $F_{VD}$ ,  $F_{MD}$ ) и после ( $F_{0L}$ ,  $F_{VL}$ ,  $F_{ML}$ ) освещения клеток светом 680 нм. Каждая кривая представляет собой среднюю из трех, полученных в трех независимых экспериментах. Содержание хлорофилла во всех образцах – 10 мкг мл<sup>-1</sup>

щения светом 680 нм достоверно не отличался ни у мутантов, ни у дикого типа. На диаграмме (рис. 6, б) видно, что прирост максимальной флуоресценции ( $F_M$ ) у мутанта Oх<sup>-</sup> происходил за счет возрастания  $F_0$  (на 15–20%), испускаемой преимущественно PBS, и увеличения  $F_V$  (на 50–60%), отражающей активность реакционного центра ФСII. По-видимому, после освещения действующим светом в течение 1 мин в присутствии DCMU у мутанта Oх<sup>-</sup> возросло относительное содержание активных (определяемых по переменной флуоресценции) реакционных центров ФСII. В отличие от Oх<sup>-</sup> ни у дикого типа, ни у мутанта SDH<sup>-</sup>, адаптированных к темноте, не наблюдалось значительного возрастания  $F_V$  после действующего света 680 нм; напротив, у SDH<sup>-</sup> наблюдалось даже некоторое (на 5–10%) уменьшение этого параметра (рис. 6, б). Эти данные свидетельствуют о том, что исходное функциональное состояние ФСII мутанта Oх<sup>-</sup> отличалось от такового дикого типа и мутанта SDH<sup>-</sup> и изменялось под действием непрерывного света в присутствии DCMU.

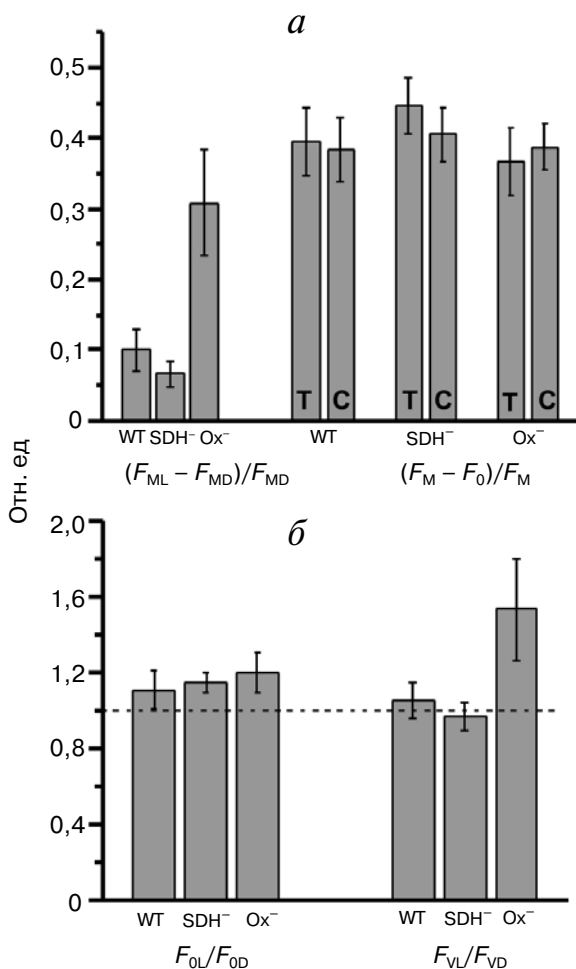
Для выяснения состояния реакционных центров ФСII в клетках *Synechocystis* измеряли индукцию флуоресценции под действием импульсного (1 с) света 620 нм интенсивностью 300 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> в отсутствие DCMU (рис. 7). Действительно, на рис. 7, а хорошо видно, что кинетика переменной флуоресценции клеток Oх<sup>-</sup> существенно отличается от таковой клеток дикого типа и SDH<sup>-</sup>. В классической секундной кинетике переменной флуоресценции выделя-



**Рис. 5.** а – Типичная кинетика переменной флуоресценции клеток *Synechocystis* дикого типа WT (черная линия), мутантов Oх<sup>-</sup> (светло-серая линия) и SDH<sup>-</sup> (серая линия), выдержанных 2 ч в темноте. Измерения в присутствии  $5 \times 10^{-5}$  M DCMU; измерительный свет 650 нм ( $<1$  мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>, 1,6 кГц), действующий свет 440 нм (70 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>). До и после действующего света 440 нм клетки кратковременно (1 с) освещали вспышкой насыщающего света 620 нм (4800 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>); б – зависимость выхода флуоресценции клеток Oх<sup>-</sup> от интенсивности действующего света 680 нм (1) и 440 нм (2);  $F$  – выход флуоресценции через 50 с после начала освещения светом данной интенсивности,  $F_M$  – максимальный выход флуоресценции при насыщающей интенсивности действующего света. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  s.d. из трех независимых экспериментов; содержание хлорофилла в образцах – 10 мкг мл<sup>-1</sup>

ют фазы O—J—I—P. Фаза J связана с восстановлением первичного хинонового акцептора  $Q_A$ , находящегося в динамическом равновесии с пулом PQ, фаза I отражает возрастание концентрации восстановленного  $Q_B$ , а фаза P обусловлена накоплением  $Q_A^-Q_B^{2-}$  и  $PQH_2$  [43–45]. В клетках мутанта  $Ox^-$ , выдержанных 2 ч в темноте, в отличие от дикого типа и  $SDH^-$  наблюдалось снижение флуоресценции после фазы J, тогда как у

дикого типа и  $SDH^-$  в тех же условиях происходило лишь нарастание флуоресценции (рис. 7, а). На рис. 7, б показаны редокс-превращения  $P700$ , измеренные в тех же условиях, что и индукция флуоресценции. Пунктирная линия показывает, что появление фазы I (примерно 50 мс от начала освещения) в клетках дикого типа и мутанта  $SDH^-$  совпадает с началом ревосстановления  $P700^+$ , отражающим исчерпание акцепторов ФСИ, вероятно, из-за инактивации FNR в процессе длительной темновой адаптации клеток [46]. При одинаковом относительном содержании реакционных центров ФСИ во всех штаммах (рис. 1, в и г) у  $Ox^-$  наблюдалось более быстрое ревосстановление  $P700^+$  в первые 200 мс освещения (рис. 7, б). Одновременно с высокой скоростью ревосстановления  $P700^+$  в клетках  $Ox^-$  наблюдалось падение выхода переменной флуоресценции (редукция фазы I) сразу после фазы J. При дополнительном освещении клеток  $Ox^-$  непрерывным светом 440 нм кинетика переменной флуоресценции становилась похожей на таковую клеток дикого типа и мутанта  $SDH^-$  (рис. 7, в). В то же время кинетика переменной флуоресценции, измеренная у клеток дикого типа и мутанта  $SDH^-$ , при подсветке непрерывным светом 440 нм мало отличалась от исходной. Отметим, что на фоне непрерывного света 440 нм кинетика редокс-превращений  $P700$  у всех типов клеток также была одинакова (рис. 7, г). Полученные данные указывают на то, что свет 2 (620 нм), поглощаемый преимущественно PBS, активировал циклический перенос электронов в ФСИ мутанта  $Ox^-$ , при этом активность ФСИ была подавлена, и фотосинтетический аппарат находился в состоянии 2. Освещение светом 1 (440 нм) смещало баланс потока электронов в сторону линейного переноса, при этом повышался выход флуоресценции ФСИ в клетках  $Ox^-$ , и фотосинтетический аппарат переходил из состояния 2 в состояние 1.



**Рис. 6.** Показатели флуоресценции до и после освещения клеток *Synechocystis* действующим светом 680 нм. а – Показатель изменения состояния фотосинтетического аппарата  $(F_{ML} - F_{MD})/F_{MD}$  и показатели, характеризующие квантовый выход ФСИ  $(F_M - F_0)/F_M$  до ( $T = (F_{MD} - F_{0D})/F_{MD}$ ) и после ( $C = (F_{ML} - F_{0L})/F_{ML}$ ) освещения клеток дикого типа (WT) и мутантов  $SDH^-$  и  $Ox^-$ ; б – отношение фоновой флуоресценции до освещения к таковой после освещения светом 680 нм ( $F_{0L}/F_{0D}$ ) и переменной флуоресценции до освещения к таковой после освещения 680 нм ( $F_{VL}/F_{VD}$ ). Условия измерения и обозначения параметров кинетики флуоресценции, использованные в расчетах, – как на рис. 4. Диаграммы построены по средним значениям параметров  $\pm$  s.d. из 5–7 независимых экспериментов

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

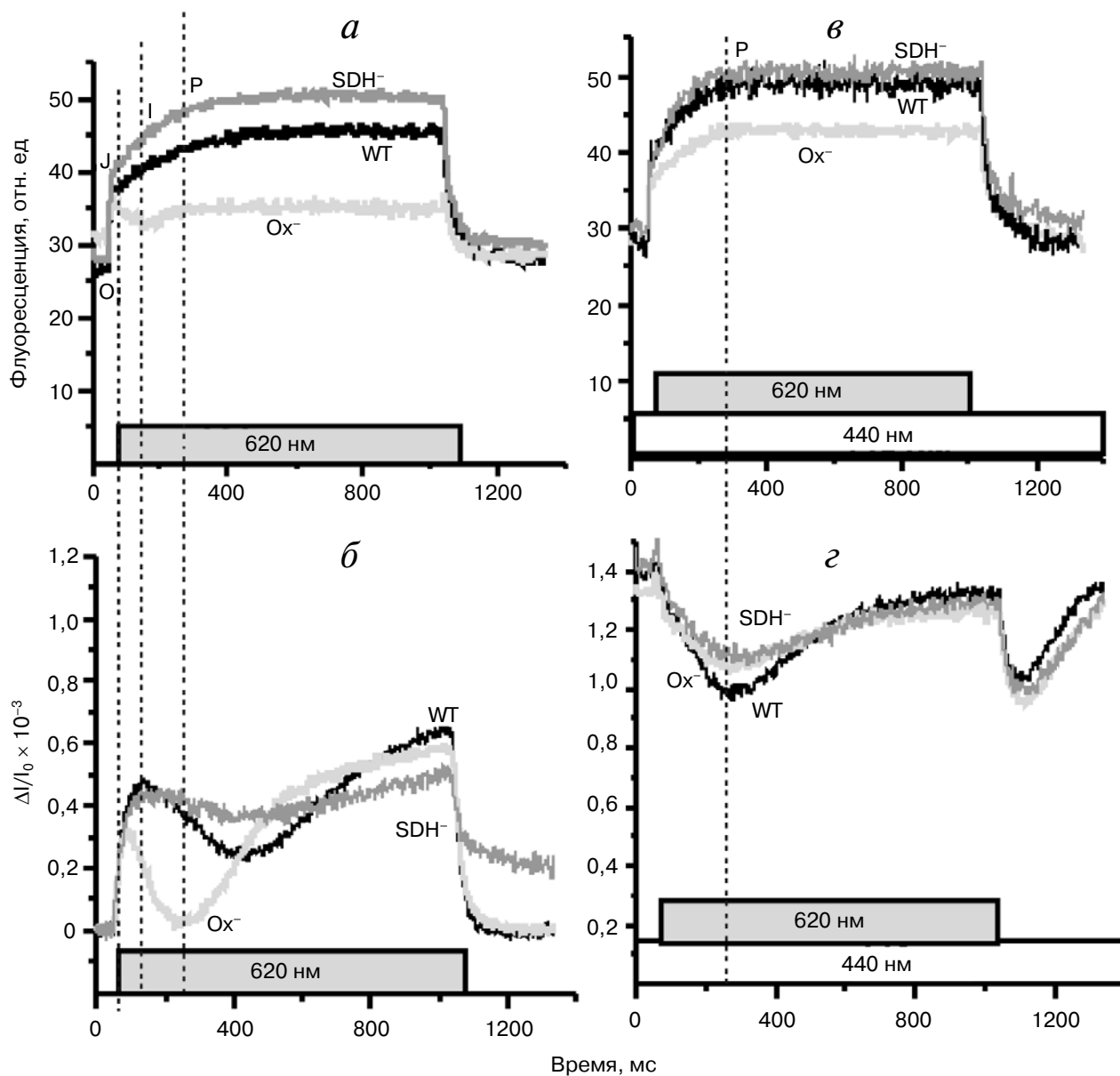
Сравнительное исследование переменной флуоресценции ФСИ и 77 К спектров флуоресценции адаптированных к темноте клеток дикого типа и мутантов *Synechocystis* выявило состояние 2 фотосинтетического аппарата у лишённого терминальных оксидаз мутанта  $Ox^-$  с восстановленным пулом PQ [35] и состояние 1 у клеток дикого типа и мутанта  $SDH^-$  с нарушенным восстановлением пула PQ [16]. Действующий свет 1 в присутствии или в отсутствие DCMU переводил фотосинтетический аппарат мутанта  $Ox^-$  из состояния 2 в состояние 1. В состоянии 1



(у мутанта  $SDH^-$  или мутанта  $Ox^-$  после освещения светом 1) более выражен линейный перенос электронов, чем в состоянии 2. Состояние 2 (у адаптированного к темноте мутанта  $Ox^-$ ) характеризовалось высокой скоростью циклического переноса электронов, что подтверждает полученные ранее данные на клетках других цианобактерий [8, 23].

Судя по одинаковому выходу переменной флуоресценции ( $F_v$ ) в присутствии DCMU (рис. 1, з),

клетки дикого типа и мутантов не отличались по содержанию ФСII. Поэтому возрастание выхода максимальной флуоресценции у мутанта  $Ox^-$  после 30 мин инкубации на свету могло быть связано с переходом фотосинтетического аппарата из состояния 2, характеризующегося низкой активностью ФСII после выдерживания в темноте [27, 41], в состояние 1. Более низкий выход флуоресценции при 77 К в области испускания ФСII (684 и 692 нм) у мутанта  $Ox^-$ , адап-



**Рис. 7.** Кинетика переменной флуоресценции (а и б) и фотоиндуцированные изменения поглощения П700 (б и з) клеток *Synechocystis* дикого типа (WT) и мутантов ( $Ox^-$ ) и ( $SDH^-$ ), выдержанных 2 ч в темноте. Измерения проводили в отсутствие DCMU: а и б – с действующим светом 620 нм ( $300 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ , 1 с), б и з – с действующим светом 620 нм на фоне непрерывного света 440 нм ( $70 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ). Кривые представляют собой средние из трех независимых экспериментов. O–J–I–P – фазы флуоресценции; содержание хлорофилла в образцах –  $5 \text{ мкг мл}^{-1}$

тированного к темноте, по сравнению с таковым после освещения (таблица, рис. 3, б), также свидетельствовал о состоянии 2 фотосинтетического аппарата [8, 23, 27, 41].

Анализ кинетики переменной флуоресценции клеток *Synechocystis*, выдержанных в темноте в течение 2 ч, показал, что у мутанта  $Ox^-$  активность реакционных центров ФСII в присутствии диурана в 1,5 раза ниже, чем у дикого типа и мутанта  $SDH^-$  (рис. 1, 4 и 5, а). При освещении действующим светом 680 или 440 нм клеток  $Ox^-$  переменная флуоресценция постепенно возрастала, достигая за 1 мин уровня переменной флуоресценции клеток дикого типа и мутанта  $SDH^-$  (рис. 4 и 5, а). Подобную кинетику флуоресценции регистрировали ранее в клетках дикого типа цианобактерии *Cyanothece* sp. и объяснили эти изменения выхода флуоресценции переходом фотосинтетического аппарата клеток цианобактерии из состояния 2 в состояние 1 [23]. В клетках дикого типа и мутанта  $SDH^-$  не наблюдались столь выраженные изменения активности ФСII после освещения в присутствии DCMU. Поскольку переходные изменения фотосинтетического аппарата цианобактерий зависят от редокс-состояния пула PQ [8, 18, 19], то полученные нами данные указывают на отличие редокс-состояния акцепторной части ФСII мутанта  $Ox^-$  от такового акцепторной части ФСII дикого типа и мутанта  $SDH^-$  после инкубации всех штаммов в темноте. Это предположение подтверждается более низким отношением площади над кривой индукции флуоресценции с DVMIB и аскорбатом ( $S_{DVMIB}$ ) к площади над кривой индукции флуоресценции с DCMU ( $S_{DCMU}$ ) у мутанта  $Ox^-$  по сравнению с диким типом и мутантом  $SDH^-$  (рис. 2), что свидетельствует о более восстановленном пуле PQ у мутанта  $Ox^-$ .

Низкий выход переменной флуоресценции коррелировал с высокой скоростью как темнового восстановления  $P700^+$  в присутствии диурана, так и восстановления  $P700^+$  на начальном этапе (~200 мс) освещения в клетках мутанта  $Ox^-$  без диурана (рис. 1; 7, а и б). При одинаковом относительном содержании реакционных центров ФСII во всех штаммах клеток (рис. 1, в) более быстрое ревосстановление  $P700^+$ , наблюдаемое в течение первых 200 мс освещения у мутанта  $Ox^-$  по сравнению с клетками дикого типа и  $SDH^-$  (рис. 7, б), может указывать на большую скорость циклического переноса электронов у этого мутанта из-за более восстановленного пула PQ и, возможно, из-за ингибирования FNR при длительной темновой адаптации клеток.

Кроме высокой скорости восстановления  $P700^+$  в клетках  $Ox^-$  наблюдалось падение выхода переменной флуоресценции (редукция фазы I)

сразу после фазы J в секундной кинетике индукции флуоресценции (рис. 7, а) и появление этой фазы на фоне непрерывного света 440 нм (рис. 7, в). Предполагается, что снижение выхода переменной флуоресценции сразу после J-фазы под действием интенсивного света может быть связано с обратимым ингибированием донорной части ФСII, а появление фаз I и P переменной флуоресценции ФСII может отражать обратимое восстановление акцепторной стороны ФСI [46]. В связи с этим снижение выхода переменной флуоресценции сразу после J-фазы (редукция фазы I, рис. 7, а) у клеток  $Ox^-$  может отражать подавление донорной части ФСII. Появление фаз I и P у этого мутанта при дополнительном непрерывном освещении 440 нм (рис. 7, в) может указывать на ускорение линейного транспорта электронов между фотосистемами и восстановление всех переносчиков электронов цепи до акцепторной части ФСI (Fd). Вероятно, у мутанта  $Ox^-$ , имеющего после длительной темновой инкубации восстановленный PQ-пул и низкую активность FNR, реокисление восстановленного Fd в прямой реакции было замедлено во время вспышки «фикобилисомного» света (620 нм). Это могло приводить к ускорению циклических реакций через ФСI и/или увеличению вероятности рекомбинации заряда в ФСI (схема, а). Следствием этого могло быть замедление связывания окисленного хинона из пула PQ с  $Q_B^-$ -сайтом и снижение скорости реокисления  $Q_A^-$  как на свету 2, так и в темновые интервалы между вспышками (схема, а). Очевидно, дополнительный непрерывный слабый синий свет замещал периоды темноты между импульсами света 2 (620 нм), но не мог индуцировать столь быстрые циклические и/или обратные реакции в ФСI, как свет 2, поэтому реокисление  $Q_A^-$  и  $Q_B^-$  существенно ускорялось. Мы предполагаем, что различие в действии света 1 и 2 связано не только с режимом освещения, но и с разным размером светособирающей антенны ФСII для света 2 и света 1. На рис. 5, б видно, что свет 680 нм, поглощаемый хлорофиллом и лишь частично фикобилисомами, был вдвое эффективнее для возбуждения ФСII, чем свет 1 (440 нм), поглощаемый только хлорофиллом. Эти данные объясняются тем, что содержание хлорофилла в ФСII цианобактерий в 3–4 раза ниже такового в ФСI, и PBS, поглощающие в области 570–650 нм, существенно увеличивают эффективное сечение поглощения ФСII, что позволяет цианобактериям поддерживать баланс поглощения энергии и электронного транспорта между фотосистемами [12, 13].

В условиях накопления восстановленного  $Q_A$  (при ингибировании электронного транспорта

между  $Q_A$  и  $Q_B$ ) возможно тушение флуоресценции реакционных центров ФСИ при рекомбинации заряда между  $Q_A^-$  и  $P680^+$  [43, 47–49]. Показано, что освещение тилакоидов вспышками инактивирует ФСИ гораздо сильнее, чем освещение эквивалентным количеством энергии в виде постоянного освещения [50, 51]. Это объяснялось тем, что в темновых интервалах между вспышками в тилакоидах происходит обратный перенос электронов с хиноновых акцепторов на  $P680^+$ , что, возможно, сопровождается безизлучательной рекомбинацией заряда с S-состояниями донорной части ФСИ. Эти процессы могут быть причиной обратимого тушения флуоресценции реакционных центров ФСИ при фотоингибировании [51]. Тушение флуоресценции при фотоингибировании коррелирует со снижением выхода 77 К флуоресценции ФСИ при 692 нм [52]. Низкий выход флуоресценции при 692 нм наблюдался в спектрах 77 К флуоресценции адаптированного к темноте мутанта  $Ox^-$  и заметно возрастал после освещения (рис. 3; таблица). У дикого типа после освещения флуоресценция при 692 нм возрастала лишь незначительно, а у  $SDH^-$  такого возрастания не наблюдалось (таблица).

При переходе из состояния 2 в состояние 1 клеток  $Ox^-$  после освещения непрерывным светом 680 или 440 нм с DCMU зарегистрировано

одновременное возрастание выхода фоновой  $F_0$  (15–20%), испускаемой преимущественно PBS (на свету 650 нм), и выхода  $F_V$  (50–60%) реакционных центров ФСИ (рис. 6, б). Ранее высказывалось предположение о том, что в состоянии 2 кор-комплексы ФСИ и PBS меняют взаиморасположение [20, 21], а также сообщалось о корреляции между редокс-состоянием  $Q_A$  и движением PBS при изменении состояний фотосинтетического аппарата *Synechocystis* [53]. Учитывая более высокую чувствительность реакционных центров ФСИ клеток  $Ox^-$  к DCMU в состоянии 1 по сравнению с состоянием 2 (рис. 4 и 5, а), можно предполагать, что переход одного состояния в другое осуществляется благодаря изменению активности ФСИ, сопряженному с изменением взаиморасположения белков  $D_1$  и  $D_2$  ФСИ и комплекса PBS.

Анализ полученных нами результатов приводит к выводу о том, что при освещении адаптированных к темноте клеток  $Ox^-$  «фикобилисомным» светом (620 нм) восстановленный пул PQ и, возможно, низкая активность FNR после длительной темновой инкубации могут приводить к смещению динамического равновесия между  $Q_B$ -сайтом и пулом PQ в сторону восстановленного  $Q_B$  и, следовательно, к замедлению скорости окисления  $Q_A^-$ , что в свою очередь вызывает изменение активности ФСИ (подавление

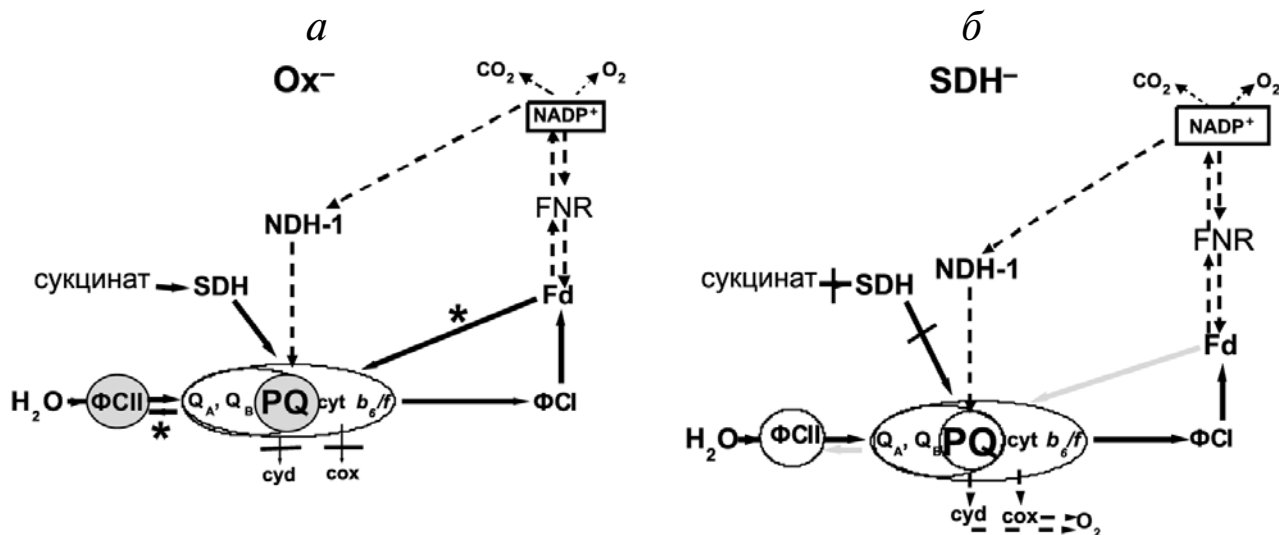


Схема. Пути линейного и циклического переноса электронов в клетках адаптированных к темноте мутантов *Synechocystis*: лишённого оксидаз –  $Ox^-$  (а) и лишённого сукцинатдегидрогеназы –  $SDH^-$  (б). Панель а: PQ на сером фоне – восстановленный пул пластохинонов, ФСИ на сером фоне – инактивированная ФСИ. Панель б: PQ на светлом фоне – окисленный пул пластохинонов, ФСИ на светлом фоне – ФСИ, активная, как в диком типе. Черными стрелками со звездочками отмечены обратные реакции, протекающие с высокой скоростью и приводящие к инактивации ФСИ при возбуждении фотосистем импульсным светом 620 нм, серыми стрелками отмечены обратные реакции, скорость которых недостаточна для инактивации ФСИ, прерывистыми стрелками показаны реакции, протекающие с низкой скоростью. *Cyd* и *cox* (*ctaI*) – терминальные оксидазы

донорной части, кооперативное изменение конформации белков D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub> и комплекса PBS) (схема, а). Поскольку в адаптированных к темноте клетках дикого типа и мутанта SDH<sup>-</sup> PQ-пул значительно более окислен, чем у Oх<sup>-</sup> (рис. 2), то в таких клетках свет 620 нм данной интенсивности даже при низкой активности FNR не приводит к замедлению ре-окисления Q<sub>A</sub><sup>-</sup> и последующего восстановления Q<sub>B</sub> и пула PQ (рис. 7; схема, б).

Совокупность полученных данных по кинетике и низкотемпературным спектрам флуоресценции указывает на то, что после выдерживания клеток *Synechocystis* в темноте в течение 2 ч фотосинтетический аппарат мутанта Oх<sup>-</sup> находился в состоянии 2, тогда как у мутанта SDH<sup>-</sup> — в состоянии 1 и у клеток дикого типа — в состоянии, близком к состоянию 1. Состояние 2 фотосинтетического аппарата у мутанта Oх<sup>-</sup> характеризовалось низкой переменной флуоресцен-

цией и низким выходом 77 К флуоресценции при 692 нм, которые возрастали при переходе фотосинтетического аппарата в состояние 1. Полученные данные указывают на обратимую инактивацию ФСII в состоянии 2 цианобактерий, вызванную восстановленным состоянием PQ-пула. Мы предполагаем, что соотношение скоростей прямого и циклического потоков электронов через ФСI, которое может регулировать состояние фотосинтетического аппарата, определяется не только уровнем восстановления PQ-пула и активностью FNR, но и эффективным сечением поглощения светособирающей антенны ФСII, которое у цианобактерий зависит от длины волны действующего света.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (гранты 12-04-00603а и 14-04-00148а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horton, P., Ruban, A.V., and Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 655–684.
- Карапетян Н.В. (2007) Нефотохимическое тушение флуоресценции у цианобактерий, *Биохимия*, **72**, 1385–1395.
- Bonaventura, C., and Myers, J. (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*, *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 366–383.
- Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 242–251.
- Fork, D.C., and Satoh, K. (1983) State I – state II transitions in the thermophilic blue-green alga (cyanobacterium) *Synechococcus lividus*, *Photochem. Photobiol.*, **37**, 421–427.
- Allen, J.F. (2003) State transitions – a question of balance, *Science*, **299**, 1530–1532.
- Allen, J.F., Bennett, J., Steinback, K.E., and Arntzen, C.J. (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems, *Nature*, **291**, 25–29.
- Mullineaux, C.W., and Allen, J.F. (1990) State 1 – state 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between photosystems I and II, *Photosynth. Res.*, **23**, 297–311.
- Allen, J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1098**, 275–335.
- Tsinoremas, N.F., Hubbard, J.A.M., Evens, M.C.W., and Allen, J.F. (1989) P700 photooxidation in state 1 and state 2 in cyanobacteria upon flash illumination with phycobilin- and chlorophyll-absorbed light, *FEBS Lett.*, **256**, 106–110.
- Mullineaux, C.W. (1992) Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterium, *Biochim. Biophys. Acta*, **1100**, 285–292.
- Rakhimberdieva, M.G., Boichenko, V.A., Karapetyan, N.V., and Stadnichuk, I.N. (2001) Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochemistry*, **40**, 15780–15788.
- Melis, A., Mullineaux, C.W., and Allen, J.F. (1989) Acclimation of the photosynthetic apparatus to photosystem I or photosystem II light: evidence from quantum yield measurements and fluorescence spectroscopy of cyanobacterial cells, *Z. Naturforsch.*, **44**, 109–118.
- Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., Ogawa, T., and Asada, K. (1992) Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Physiol.*, **33**, 1233–1237.
- Howitt, C.A., Smith, G.D., and Day, D.A. (1993) Cyanide-insensitive oxygen uptake and pyridine nucleotide dehydrogenases in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120, *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**, 313–320.
- Cooley, J.W., Howitt, C.A., and Vermaas, W.F.J. (2000) Succinate:quinol oxidoreductase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: presence and function in metabolism and electron transport, *J. Bacteriol.*, **182**, 714–722.
- Pils, D., and Schmetterer, G. (2001) Characterization of three bioenergetically active respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *FEMS Microbiol. Lett.*, **203**, 217–222.
- Mullineaux, C.W., and Allen, J.F. (1986) The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool, *FEBS Lett.*, **205**, 155–160.
- Mao, H.-B., Li, G.-F., Ruan, X., Wu, Q.-Yu, Gong, Y.-D., Zhang, X.-F., and Zhao, N.-M. (2002) The redox state of plastoquinone pool regulates state transitions via cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *FEBS Lett.*, **519**, 82–86.
- Mullineaux, C.W., and Holzwarth, A.R. (1990) A proportion of photosystem II core complexes are decoupled from the phycobilisome in light-state 2 in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301, *FEBS Lett.*, **260**, 245–248.

21. Mullineaux, C.W., Tobin, M.J., and Jones, G.R. (1997) Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes, *Nature*, **390**, 421–424.
22. Schluchter, W.M., Shen, G., Zhao, J., and Bryant, D.A. (1996) Characterization of *psaI* and *psaL* mutants of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002: a new model for state transitions in cyanobacteria, *Photochem. Photobiol.*, **64**, 53–66.
23. Meunier, P.C., Colon-Lopez, M.S., and Sherman, L.A. (1997) Temporal changes in state transitions and photosystem organization in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51 142, *Plant Physiol.*, **115**, 991–1000.
24. Ivanov, A.G., Krol, M., Sveshnikov, D., Selstam, E., Sandstrom, St., Koochek, M., Park, Y.-I., Vasil'ev, S., Bruce, D., Oquist, G., and Huner, N.P.A. (2006) Iron deficiency in cyanobacteria causes monomerization of photosystem I trimers and reduces the capacity for state transitions and the effective absorption cross section of photosystem I *in vivo*, *Plant Physiol.*, **141**, 1436–1445.
25. Zhang, R., and Zhao, J.X.J. (2009) The mobility of PSI and PQ molecules in *Spirulina platensis* cells during state transition, *Photosynth. Res.*, **99**, 107–113.
26. McConnell, M.D., Koop, R., Vasil'ev, S., and Bruce, D. (2002) Regulation of the distribution of chlorophyll and phycobilin-absorbed excitation energy in cyanobacteria. A structure-based model for the light state transition, *Plant Physiol.*, **130**, 1201–1212.
27. Huang, Ch., Yuan, X., Zhao, J., and Bryant, D.A. (2003) Kinetic analyses of state transitions of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 and its mutant strains impaired in electron transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **1607**, 121–130.
28. Mi, H., Klughammer, Ch., and Schreiber, U. (2000) Light-induced dynamic changes of NADPH fluorescence in *Synechocystis* PCC 6803 and its *ndhB*-defective mutant M55, *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1129–1135.
29. Cooley, J.W., and Vermaas, W.F.J. (2001) Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: capacity comparisons and physiological function, *J. Bacteriol.*, **183**, 4251–4258.
30. van Thor, J.J., Jeanjean, R., Havaux, M., Sjollem, K.A., Joset, F., Hellingwerf, K.J., and Matthijs, H.C.P. (2000) Salt shock-inducible photosystem I cyclic electron transfer in *Synechocystis* PCC6803 relies on binding of ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase to the thylakoid membranes via its CpcD phycobilisome-linker homologous N-terminal domain, *Biochim. Biophys. Acta*, **1457**, 129–144.
31. Thomas, D.J., Thomas, J., Youderian, Ph.A., and Herbert, St.H. (2001) Photoinhibition and light-induced cyclic electron transport in *ndhB*<sup>-</sup> and *psaE*<sup>-</sup> mutants of *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Physiol.*, **42**, 803–812.
32. Finazzi, G., Rappaport, F., Furia, A., Fleischmann, M., Rochaix, J.-D., Zito, F., and Forti, G. (2002) Involvement of state transition in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*, *EMBO Rep.*, **3**, 280–285.
33. Barbagallo, R.P., Bergo, E., Barbato, R., and Forti, G. (2001) Photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* in state 1 and state 2, *J. Biol. Chem.*, **276**, 22251–22257.
34. Большевцева Ю.В., Еланская И.В., Карапетян Н.В. (2011) Регуляция циклического транспорта электронов через фотосистему I в клетках мутантов цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, лишенных дыхательных дегидрогеназ, *Биохимия*, **76**, 526–537.
35. Howitt, C.A., Cooley, J.W., Wiskich, J.T., and Vermaas, W.F.J. (2001) A strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803 without photosynthetic oxygen evolution and respiratory oxygen consumption: implications for the study of cyclic photosynthetic electron transport, *Planta*, **214**, 46–56.
36. Howitt, C.A., and Vermaas, W.F.J. (1998) Quinol and cytochrome oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, *Biochemistry*, **37**, 17944–17951.
37. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., and Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 1–61.
38. Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes (Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., eds), Academic Press, San Diego, *Methods Enzymol.*, **148**, 350–382.
39. Schreiber, U., Schliwa, U., and Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer, *Photosynth. Res.*, **10**, 51–62.
40. Schreiber, U., Klughammer, C., and Neubauer, C. (1988) Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system, *Z. Naturforsch.*, **43**, 686–698.
41. Mullineaux, C.W., and Allen, J.F. (1988) Fluorescence induction transients indicate dissociation of Photosystem II from the phycobilisome during the State-2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301, *Biochim. Biophys. Acta*, **934**, 96–107.
42. Berry, S., Schneider, D., Vermaas, W.F.J., and Roegner, V. (2002) Electron transport routes in whole cells of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: the role of the cytochrome *bd*-type oxidase, *Biochemistry*, **41**, 3422–3429.
43. Zhu, X.-G., Govindjee, Baker, N.R., de Sturler, E., Ort, D.R., and Long, S.P. (2005) Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II, *Planta*, **223**, 114–133.
44. Toth, S.Z., Schansker, G., and Strasser, R.J. (2007) A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient, *Photosynth. Res.*, **93**, 193–203.
45. Tsimilli-Michael, M., Stamatakis, K., and Papageorgiou, G.C. (2009) Dark-to-light transition in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells studied by fluorescence kinetics assesses plastoquinone redox poise in the dark and photosystem II fluorescence component and dynamics during state 2 to state 1 transition, *Photosynth. Res.*, **99**, 243–255.
46. Schansker, G., Toth, S.Z., and Strasser, R.J. (2006) Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: the qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 787–797.
47. van Wijk, K.J., and van Hasselt, Ph.R. (1993) Photoinhibition of photosystem II *in vivo* is preceded by down-regulation through light-induced acidification of the lumen: Consequences for the mechanism of photoinhibition *in vivo*, *Planta*, **189**, 359–368.
48. Ivanov, A.G., Sane, P.V., Hurry, V., Oquist, G., and Huner, N.P.A. (2008) Photosystem II reaction centre quenching: mechanisms and physiological role, *Photosynth. Res.*, **98**, 565–574.
49. Vass, I., and Cser, K. (2009) Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition, *Trends Plant Sci.*, **14**, 200–205.
50. Keren, N., Berg, A., van Kan, P.J.M., Levanon, H., and Ohad, I. (1997) Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1579–1584.

51. Ohad, I., Berg, A., Berkowicz, S.M., Kaplan, A., and Keren, N. (2011) Photoinactivation of photosystem II: is there more than one way to skin a cat, *Physiol. Plant.*, **142**, 79–86.
52. Demmig, B., and Bjorkman, O. (1987) Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77 K) and photon yield of O<sub>2</sub> evolution in the leaves of higher plants, *Planta*, **171**, 171–184.
53. Ma, W., Mi, H., and Shen, Yu. (2010) Influence of the redox state of Q<sub>A</sub> on phycobilisome mobility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803, *J. Luminescence*, **130**, 1169–1173.

**PHOTOSYSTEM ACTIVITY AND STATE  
TRANSITIONS OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS  
IN CYANOBACTERIUM *Synechocystis* PCC 6803  
MUTANTS WITH DIFFERENT REDOX STATE  
OF THE PLASTOQUINONE POOL**

**Y. V. Bolychevtseva<sup>1\*</sup>, F. I. Kuzminov<sup>2,4</sup>, I. V. Elanskaya<sup>3</sup>,  
M. Y. Gorbunov<sup>4</sup>, N. V. Karapetyan<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy  
of Sciences, Leninsky prosp. 33, Moscow 119071, Russia;  
E-mail: bolychev@inbi.ras.ru*

<sup>2</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics,  
Moscow 119991, Russia*

<sup>3</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,  
Moscow 119991, Russia*

<sup>4</sup> *Institute of Marine and Coastal Sciences, Rutgers, the State University  
of New Jersey, New Brunswick, New Jersey 08901, USA*

Received June 24, 2014

Revision received July 31, 2014

To clarify the mechanism of state transitions in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, the activities of the photosystems were investigated for dark-adapted wild-type (WT) cells and its mutants, in one of which (Ox<sup>-</sup>) the plastoquinone pool was reduced because of lack of terminal oxidases, and in another one (SDH<sup>-</sup>) deficient in succinate dehydrogenase plastoquinone pool was oxidized. Room temperature variable fluorescence and 77K fluorescence spectra of *Synechocystis* cells after 2 h dark incubation revealed that the photosynthetic apparatus in WT and in the SDH<sup>-</sup> mutant was in State 1. The yield of variable fluorescence in the Ox<sup>-</sup> mutant under light 2 (620 nm) illumination in the presence of DCMU was 1.5 times lower than that in WT and the SDH<sup>-</sup> mutant indicating State 2. High rate of P700<sup>+</sup> dark reduction in the presence of DCMU and low level of P700<sup>+</sup> under light 2 without DCMU indicated fast cyclic electron transport around PSI in the Ox<sup>-</sup> mutant. Illumination with continuous light 1 (440 nm) along with flashes of light 2 (620 nm) did not affect PSII activity in dark-adapted WT and the SDH<sup>-</sup> mutant, while in the Ox<sup>-</sup> mutant it promoted variable fluorescence yield and P700<sup>+</sup> content to the level typical for WT and the SDH<sup>-</sup> mutant, indicating acceleration of linear electron transport and transition of the photosynthetic apparatus of the Ox<sup>-</sup> mutant to State 1. Thus, we show that PSII of cyanobacteria has a higher photosynthetic activity in State 1, while it is partially inactivated in State 2. This process is controlled by the redox state of PQ in cyanobacteria through enhancement/inhibition of electron transport on the acceptor side of PSII.

**Key words:** cyanobacteria, mutants, photosystem II, NADP<sup>+</sup>, state transitions, plastoquinone