

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

Светозар Димитров Стойчев

**МАКРООРГАНИЗАЦИЯ НА ПИГМЕНТ-БЕЛТЪЧНИ КОМПЛЕКСИ
В РАЗЛИЧНИ ФУНКЦИОНАЛНИ СЪСТОЯНИЯ И ЛИПИДНО
МИКРООБКРЪЖЕНИЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация
за присъждане на образователната и научна степен
„доктор”**

**професионално направление 4.3 Биологични науки
(Биофизика)**

Научни ръководители:
**Проф. д-р Мира Бушева
Проф. Стефка Танева, дбн**

София, 2015

Светозар Димитров Стойчев

МАКРООРГАНИЗАЦИЯ НА ПИГМЕНТ-БЕЛТЪЧНИ КОМПЛЕКСИ В
РАЗЛИЧНИ ФУНКЦИОНАЛНИ СЪСТОЯНИЯ И ЛИПИДНО
МИКРООБКРЪЖЕНИЕ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация
за присъждане на образователната и научна степен
„доктор“

професионално направление 4.3 Биологични науки
(Биофизика)

Научни ръководители:
Проф. д-р Мира Бушева
Проф. Стефка Танева, дбн

София, 2015

Дисертационният труд е обсъден на разширен научен семинар на секция „Биомакромолекули и биомолекулни взаимодействия” на ИБФБМИ – БАН, проведен на 10.03.2015 г. и насочен за защита пред научно жури в състав:

1. Проф. Стефка Германова Танева, дбн, ИБФБМИ-БАН
2. Проф. д-р Виолета Борисова Великова, ИФРГ-БАН
3. Проф. д-р Цонко Деков Цонев, ИФРГ-БАН
4. Доц. д-р Анелия Георгиева Добрикова, ИБФБМИ-БАН
5. Доц. д-р Красимира Николова Идакиева, ИОХЦФ-БАН

Дисертационният труд съдържа 128 страници, включващи текст, 42 фигури и 9 таблици, цитирани са 274 литературни източници. Основните резултати от дисертацията са публикувани в 2 научни публикации и в 1 сборник с материали от научен форум.

Защитата на дисертацията ще се състои на 2015 г. от часа в залата на Института по Физиология на растенията и генетика – БАН, София, 1113, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 21, ет. 2. Материалите, свързани със защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИБФБМИ – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 105, София.

Съдържание

Увод	4
Цел и задачи	5
Материали и методи	6
Резултати и дискусия	10
Обобщение	34
Изводи	36
Приноси	37
Публикации и участия в научни форуми	39

Увод

Макромолекулната организация и междумолекулните взаимодействия във фотосинтетичните (тилакоидни) мембрани на висши растения играят важна роля за оптималното им функциониране. Основният пигмент-белтъчен комплекс в тилакоидните мембрани, светосъбиращият комплекс на фотосистема 2 (ССК2), участва в три различни типа супрамолекулни структури — свързан към двете фотосистеми (фотосистема 1, ФС1 и фотосистема 2, ФС2) и функционално и структурно отделен от тях, формиращ ССК2-домени. ФС2 притежава способността да формира подредени домени в граналните мембрани със симетрия близка до кристалната, а също и области с хаотична организация. Факторите определящи макроорганизацията на ФС2 все още са неясни. Няма данни за формиране на макродомени от ФС1.

Пигмент-белтъчните комплекси в тилакоидните мембрани играят основна роля в регулирането на фотоиндуцираните процеси, реагирайки на промените в условията на средата посредством промени в своята конформация, състояние на олигомеризация и подреденост. В частност ССК2 и ФС2 са основни компоненти на процеса нефотохимично гасене на флуоресценцията на хлорофил *a* (НФГ), основен механизъм за фотозащита, който включва серия от конформационни промени на фотосинтетичните белтъци, а вероятно и тяхната реорганизация в мембраната. Също така се знае, че липидният състав на мембраната се променя в отговор на промени на средата и влияе на функцията на фотосистемите, но все още не е напълно изяснено как съставът и количеството на липидите в мембраната влияят на макроорганизацията на пигмент-белтъчните комплекси.

Наред с това, повишената чувствителност на фотосинтетичния апарат към оксидативен стрес, особено на ниво ФС2 (поради локално завишените нива на молекулен кислород), е обект на сериозни и задълбочени изследвания. Предполага се, че някои оксидативни агенти, като пероксид например, в сублетални концентрации действат като сигнални молекули, които водят до предпазване на фотосинтетичния апарат от оксидативен стрес.

Настоящата работа изучава връзката между промените в пространствената макроорганизация на фотосинтетичните белтъчни комплекси в интактни тилакоидни мембрани и изолирани гранални фрагменти, и процеса на фотозащита на фотосинтетичния апарат. Изследвани са процесите, индуцирани при стартирането на НФГ, настъпващо с протонирането на тилакоидния лумен имитирано чрез промяна на рН на средата. Установени са измененията в организацията на тилакоидната система,

както и промените, настъпващи в макроорганизацията, конформацията и температурната стабилност на ФС2 и изолиран ССК2 в резултат от протонирането им. Представените резултати разкриват детайлна картина на началните стъпки от НФГ на наноскопско ниво.

Цел и задачи

Основната цел на работата е да се изследва зависимостта между макроорганизацията на пигмент-белтъчните комплекси и състоянието на протониране, липидното обкръжение и оксидативния стрес, за да се получи по-ясна картина за факторите обуславящи организацията на пигмент-белтъчните комплекси в различни функционални и стресови състояния.

За постигането на тази цел са дефинирани следните конкретни задачи:

- 1) Да се изследват рН-индуцираните промени в макроорганизацията на фотосинтетични системи с различна степен на комплексност — тилакоидни мембрани, изолирани гранални мембранни фрагменти, обогатени на ФС2 суперкомплекси, и ламеларни агрегати на ССК2, като модел за началните стъпки на фотозащитния механизъм нефотохимично гасене.
- 2) Да се характеризира ефекта на протониране върху температурното дестабилизиране на изолирани гранални мембранни фрагменти, обогатени на ФС2 суперкомплекси.
- 3) Да се изследва ролята на оксидативния агент паракват върху макроорганизацията на тилакоидни мембрани и да се оцени хипотетичната защитна роля на пероксид.

Материали и методи

Изолиране на нативни тилакоидни мембрани, мембранни фрагменти, обогатени на фотосистема 2 и ламеларни агрегати от ССК2

Изолирането на тилакоидни мембрани от 14 дневни растения от грах (*Pisum sativum* L.) от сортовете Мануела и Ран, отглеждани като хидропонна култура, при контролирани условия (12/12 часа фотопериод, интензитет на светлината 60 μM фотони $\text{m}^{-2}\text{сек}^{-1}$, температура 20-22 °C и 57 % влажност на въздуха) бе проведено по метода на Harrison и Melis (1992).

Мембранни фрагменти, обогатени на фотосистема 2 (BBY) бяха изолирани по метода на Berthold и съавт. (1981).

Ламеларните агрегати от ССК2 бяха получени по оптимизирана от Simidjiev и съавт. (1997) процедура на Кгура и съавт. (1987) за получаване на агрегати от ССК2 с различен липиден състав. За получаване на агрегати ССК2 тип II, с липиден състав близък до този на тилакоидни мембрани, беше използван 0.7% Triton X100, докато за силно делипидирани тип IV ССК2 агрегати, в които тOTALното количество липиди е със 70 % по-ниско от това в ССК2 тип II – 1% Triton X100.

Всички процедури при изолирането на тилакоидни мембрани, BBY и ССК2 ламеларни агрегати се провеждат на тъмно и температури от 0-4 °C.

Третиране на тилакоидни мембрани с пероксид (H_2O_2) и паракват (ПК)

Грахови растения са отглеждани и третирани с пероксид (H_2O_2) и паракват (ПК) по схемата на Moskova и съавт., (2007). Млади стръкчета разсад се залагат на хидропонна култура с $\frac{1}{2}$ хранителен разтвор "Hoagland-Arnon" в растителна камера при условия: 12/12 часа фотопериод; интензитет на светлината - 70 μM фотони $\text{m}^{-2}\text{сек}^{-1}$; температура - 25 ± 2 °C. На десетия ден растенията се третират външно с 2.5 mM воден разтвор на H_2O_2 , а 24 часа по-късно с 0.2 mM воден разтвор на ПК. Третирането с хербицид започва в края на светлинния период, когато ефектите от въздействието му са минимални (Moskova и съавт., 2007). Влиянието на ПК върху фотосинтетичния апарат се изследва след 5 часов период на осветяване в изолирани от листата тилакоидни мембрани.

Количествено определяне на хлорофилното съдържание

Концентрацията на хлорофил *a* (хл *a*) и хлорофил *b* (хл *b*) се определя спектрофотометрично в 80% ацетонов пигментен извлек по метода на Arnon (1949).

Абсорбционна спектроскопия

Абсорбционните спектри са регистрирани при стайна температура с Analytik Jena Specord 210 Plus спектрофотометър в двулъчев режим на работа и оптичен път 1 см.

Флуоресцентна спектроскопия

Спектрите на емисия и възбуждане на флуоресценцията при стайна и ниска температура (77K) са регистрирани с помощта на спектрофлуориметър Jobin Yvon JY3 с високо чувствителен в червената област фотоумножител (Hamamatsu R928) снабден с приспособление за измервания при криогенни температури.

За експериментите са използвани проби със следните концентрации: 20 мкг хл/мл за тилакоидни мембрани, 15 мкг хл/мл за BBY мембранни фрагменти и 20-25 мкг хл/мл за CCK2-макроагрегати.

Спектрите на емисия на хлорофилната флуоресценция на тилакоидни мембрани, BBY мембранни фрагменти и CCK2-макроагрегати са регистрирани при възбуждаща светлина с три различни дължини на вълната: $\lambda_{\text{exc}} = 436$ нм (хл *a*), 472 нм (хл *b*), 515 нм (каротиноиди). Ширината на процепите е 10 нм при стайна температура и 4 нм при 77K температура.

Спектрите са нормализирани към хлорофилната концентрация на пробите или към флуоресценцията при 780 нм.

Определяне на флуидитета на тилакоидни мембрани

За анализ на физическото състояние на липидния матрикс на тилакоидни мембрани бяха използвани спектралните характеристики на липоразтворимия флуоресцентен маркер мероцианин-540 (MC₅₄₀). Третирането на пробите с MC₅₄₀ (крайна концентрация 0.2 μ M) става непосредствено преди измерванията. Спектрите на възбуждане на флуоресценцията на MC₅₄₀ са измерени при дължина на емисията $\lambda = 590$ нм и ширина на процепите - 10 нм. Спектрите на третираните с MC₅₄₀ проби са

коригирани за автофлуоресценция в областта на излъчване на MC_{540} чрез изваждане на спектрите на нетретираните с MC_{540} проби.

Кръгов дихроизъм на тилакоидни мембрани, BBY-мембранны фрагменти и CCK2

КД спектрите са регистрирани с дихрограф Jobin-Yvon CD6. Измерванията са проведени при стайна температура в интервала между 450 и 700 нм, с оптичен път 1 см, процепи - 2 нм, стъпка – 1 нм, време на интегриране - 0.2 сек и отстояние на пробата от фотоумножителя – 5 см. Спектрите са нормализирани спрямо хлорофилната абсорбция на пробите при 680 нм. За проследяване на температурната зависимост BBY мембранните фрагменти са третирани три минути при температури в интервала от 25 °C до 80 °C през 5 °C стъпка. За експериментите са използвани проби с концентрация 15 мкг хл/мл.

Резонанс Раманова спектроскопия на CCK2 макроагрегати

Резонанс Раманови спектри на CCK2 при 77K бяха измерени на microRaman спектрометър Jobin-Ivon HR 800 с дифракция 600 гр/мм. Възбуждането бе осъществено с аргонов лазер (Innova 307, Coherent) при 488 и 514.5 нм и мощност на лазерната светлина 4 миливата. Разделителната способност на спектрите бе 1 cm^{-1} . Хлорофилната концентрация на CCK2 фракциите е 100 мкг хл/мл.

Диференциална сканираща калориметрия

Температурната денатурация на BBY-частици е измерена с помощта на високочувствителна микрокалориметрична система на базата на блок на Привалов ДАСМ-4, който има чувствителност $>4.10^{-6}\text{ cal.K}^{-1}$ и ниво на шума 5.10^{-7} W . Калориметърът разполага с две идентични клетки – клетка за пробата и референтна клетка, опериращи в диференциален режим. Системата се нагрява квазиадиабатно с постоянна скорост от 1°C/мин в температурен интервал от 25 °C до 95 °C.

За да се провери обратимостта на наблюдаваните конформационни преходи от нативно в денатурирано състояние, след първото сканиране системата се охлажда и нагрява втори път по същата схема. За провеждането на експериментите са използвани проби с 0.8 мг хл/мл.

Определени са следните параметри: температура, T_m и специфичен топлинен капацитет, c_p^{ex} , на последователните преходи в термограмите, и тотална енталпия (площта под термограмата) ΔH_{cal} .

Атомно-силова микроскопия на BBY-мембранни фрагменти

Проведени са АФМ измервания във въздушна и течна среда.

Измерванията във въздушна среда са проведени с Nanoscope V (Bruker Inc.). Използвани са силиконови остриета с радиус на кривината < 10 нм (Tap300Al-G, Budget Sensors, Innovative solutions Ltd, Bulgaria) при стайна температура. Около 100 μ l от пробата се налива върху повърхността на добре почистена имобилизираща повърхност – слюда (Structure Probe Inc./SPI Supplies, West Chester, PA) и се оставя да се адсорбира за около 20 минути. BBY мембранните фрагменти се промиват с дейонизирана вода (Purelab Option-Q) и се изсушават с N_2 -струя. Повърхността на пробата беше сканирана в динамичен режим на сканиране, при който острието трепти с честота 150 ± 75 kHz. Сканираната площ бе 2×2 мкм (брой сканирани линии – 512) и скоростта на сканиране – 0.2 Hz. Обработката на топографските изображения бе проведена със специализирания софтуер NanoScope 6.13R1. Височината на наблюдаваните обекти бе измерена спрямо повърхността на слюдата.

Топографските образи в течна среда са получени с Nanowizard II AFM (JPK Instruments, Berlin, Germany). Пробите BBY се имобилизират на тъмно при стайна температура върху слюда в адсорбиращ буфер (50 mM Tricine, 5 mM $MgCl_2$ и 0.33 M захароза, pH 7.8 или 50 mM MES, 5 mM $MgCl_2$ и 0.33 M захароза, pH 5.2). След 30 минути се промиват с измерващ буфер (10 mM Hepes, pH 7.8, 50 mM KCl или 10 mM MES, pH 5.2, 50 mM KCl) по протокола на Sznee и сътр. (2011). Сканирането (при разделителна способност 512×512 линии) в контактен или осцилиращ режим на работа, се извършва в течна камера, с използване на MSNL Si_3N_4 остриета (Veeco Instruments, Plainview, NY), при константа на осцилация от 0.1 N/m и резонансна честота от 11-12 kHz. Скоростта на сканиране на частично депротонирани и протонирани проби бе 1 Hz, докато за изображенията с по-висока разделителна способност тя бе 8-10 Hz.

Данните от сканирането бяха анализирани с помощта на JPK Image Processing софтуер.

Резултати и дискусия

Структурна организация на липидния и белтъчния матрикс на тилакоидни мембрани в различни функционални състояния

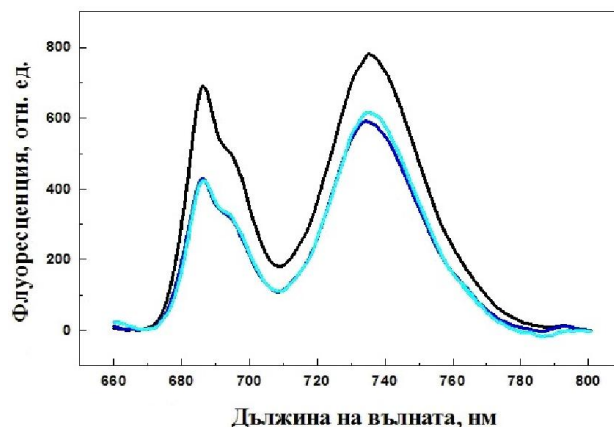
Нискотемпературни флуоресцентни емисионни спектри на тилакоидни мембрани. Ефект на рН

Флуоресценцията е високочувствителен метод за изследване преноса на енергия между ПБК в ТМ, участващи предимно в светлинния етап на процеса фотосинтеза. Промените в нискотемпературните флуоресцентни спектри на ПБК са индикатор за функционалността на фотосинтетичния електронен транспорт, както и за оценка на външни и вътреклетъчни фактори, които влияят върху преноса на енергия и структурната организация на ПБК, свързани със състоянието им на олигомеризация и структура (Krause и съавт., 1991; van Grondelle и съавт., 1994; Andreeva и съавт., 2003; Stoichkova и съавт., 2006).

Флуоресцентните емисионни спектри на ТМ при възбуждане на хл. *a* ($\lambda_{\text{exc}} = 436$ нм) са представени на Фиг. 1. Спектрите се характеризират с два ясно изразени максимума при 686 нм и 735 нм и рамо при 695 нм. Емисионните ивици при 686 и 695 нм се дължат на флуоресценция, излъчвана от ФС2 – както от вътрешната антена на ФС2, така и от ССК2, който има флуоресцентен максимум при 680 нм (Dekker и съавт., 1995; Andreeva и съавт., 2003). Ивицата при 735 нм се дължи на флуоресцентно излъчване от ФС1 (Krause и Weis, 1991; Strasser и съавт., 2004). Флуоресцентното отношение F_{735}/F_{686} отразява флуоресценцията излъчвана от ФС1 спрямо излъчваната от ФС2 и дава информация за разпределението на енергията между двете фотосистеми, както и за относителното количество на комплексите. Флуоресцентното емисионно отношение F_{695}/F_{686} характеризира преноса на енергия между пигмент-белтъчните комплекси на ФС2. Измененията в стойностите на флуоресцентните отношения позволяват да предположим наличието на промени в структурната организация на пигмент-белтъчните комплекси в тилакоидните мембрани, индуцирани при протонирането.

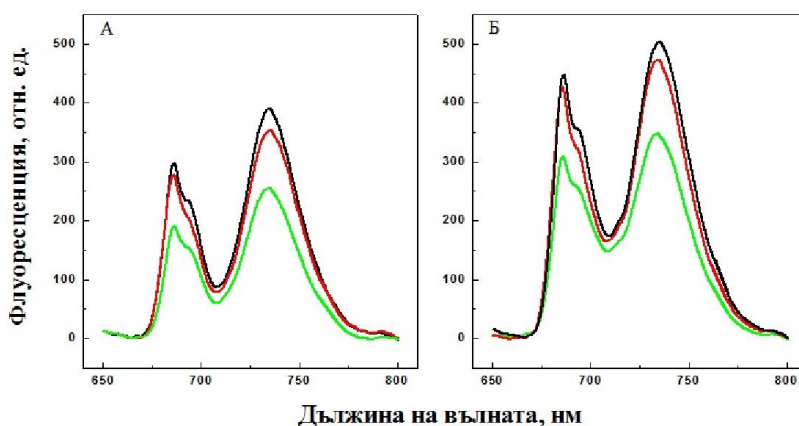
Бяха приложени два подхода за изследване на хлорофилната флуоресценция при протонирането на ПБК в изолирани и тъмнинно адаптирани тилакоидни мембрани:

- 1) индуциране на рН-скок, при което ТМ, ресуспендирани в буфер с рН 7.8, се поставят в буфер с рН 5.2 и веднага се регистрира тяхната флуоресценция (Фиг. 1);
- 2) промиване и ресуспендиране на тилакоидите в буфер с рН 5.2 и регистриране на флуоресцентните спектри (Фиг. 2).



Фигура 1. 77К флуоресцентни емисионни спектри ($\lambda_{\text{exc}} = 436$ нм) на нативни ТМ след скок на рН от 7.8 (50 mM Tricine) (—) до 5.2 (40 mM MES) и след 5 мин (—) и 30 мин (—).

Резултатите показват, че след индуцирането на рязка промяна в рН (от рН 7.8 в рН 5.2) общият интензитет на флуоресценцията чувствително се понижава. Наблюдава се нарастване (около 27%) на флуоресцентното отношение F_{735}/F_{686} от 1.1 при рН 7.8 до 1.5 при рН 5.2, както и слаб ефект на компенсиране на това отношение след скока в рН с времето (F_{735}/F_{686} на 30-тата минута е около 1.3-1.4) (Фиг. 1). Тези данни са в съгласие с резултатите на Rawal и сътр. (2010), които наблюдават индуциране на преход от състояние 1 (когато ССК2 е асоцииран с ФС2) в състояние 2 (когато ССК2 е асоцииран с ФС1) на ТМ от спанак при промени в рН (от 7.5 до 4.5).



Фигура 2. 77К флуоресцентни емисионни спектри на нативни ТМ след А) възбуждане на хл. *a* ($\lambda_{\text{exc}} = 436$ нм) и Б) възбуждане на хл. *b* ($\lambda_{\text{exc}} = 472$ нм) в 50 mM Tricine рН 7.8 (—) и рН 5.2 (—) и в 40 mM MES рН 5.2 (—).

Промиването на тилакоидите в буфери с рН 5.2 (50 mM Tricine и 40 mM MES) също води до понижаване на общия флуоресцентен интензитет, най-чувствително в MES.

Отношението между интензитетите на емисионните ивици при възбуждане със светлина с дължина на вълната 436, 472 и 515 nm, при които се възбуждат хл. *a*, хл. *b* и каротиноидите (предимно лутеин), съответно, са представени на Таблица 1.

Не се наблюдава зависимост на отношението F_{695}/F_{686} от рН и от буфера при възбуждане с трите дължини на вълната (Таблица 1). След възбуждане на хл. *a* в Tricine с рН 5.2 се наблюдава намаляване на отношението F_{735}/F_{686} в сравнение с другото рН (Таблица 1). Няма ефект на буфера и рН върху F_{695}/F_{686} след възбуждането на хл. *b* (λ_{exc} 472 nm).

Таблица 1. Отношение на интензитетите на флуоресценция F_{695}/F_{686} и F_{735}/F_{686} на ТМ в 50 mM Tricine рН 7.8 и 5.2, и 40 mM MES рН 5.2. Предствени са средни стойности, определени от 8 независими експеримента.

Буфер	рН	F_{695}/F_{686}		
		$\lambda_{exc} = 436$	$\lambda_{exc} = 472$	$\lambda_{exc} = 515$
Tricine	7.8	0.79 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.79 ± 0.03
Tricine	5.2	0.71 ± 0.09	0.79 ± 0.03	0.79 ± 0.03
MES	5.2	0.80 ± 0.03	0.81 ± 0.02	0.83 ± 0.02
F_{735}/F_{686}				
Tricine	7.8	1.33 ± 0.04	1.07 ± 0.05	1.62 ± 0.08
Tricine	5.2	1.23 ± 0.05	1.14 ± 0.07	1.66 ± 0.09
MES	5.2	1.39 ± 0.05	1.18 ± 0.04	1.75 ± 0.06

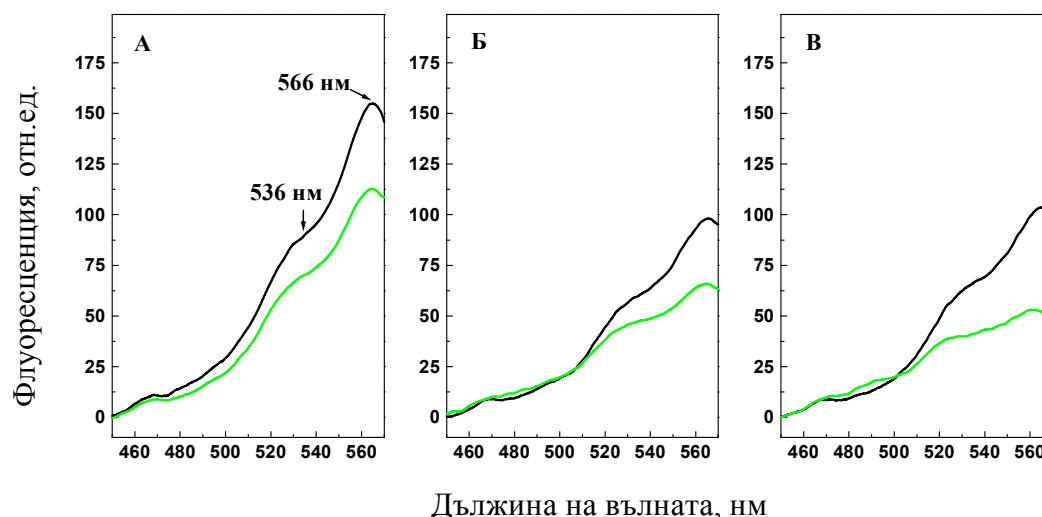
F_{735}/F_{686} има по-висока стойност при рН 5.2 от тази при рН 7.8 след възбуждане с дължина на вълната 515 nm (и в двата буфера).

Общият флуоресцентен интензитет намалява както при скок на рН от 7.8 до 5.2, така и след промиване на ТМ в буфер с рН 5.2. От друга страна, параметърът F_{735}/F_{686} след възбуждане на хл. *a* и хл. *b* не се повлиява чувствително. Не се наблюдава ефект на използваните буфери върху флуоресцентните отношения на ТМ както за F_{735}/F_{686} , така и за F_{695}/F_{686} (Таблица 1).

Тези резултати показват, че протонирането на ТМ индуцира гасене на флуоресценцията от фотосинтетичните колмплекси във ФСА (индикация за стартирало състояние на фотопротекция), но не оказва значително влияние върху разпределението на енергията между тях, особено що се отнася до ПБК на ФС2.

Флуидитет на тилакоидни мембрани в две състояния на протониране

Опаковането на липидните молекули в ТМ в различно състояние на протониране беше изследвано с помощта на липофилния флуоресцентен маркер мероцианин 540 (MC₅₄₀), за който се знае, че е силно чувствителен към полярността на непосредственото си обкръжение и флуоресцентните му спектри отразяват промени във флуидитета на мембраните. Спектроскопските свойства на MC₅₄₀ (интензитет и максимум на излъчване) зависят от физико-химичните характеристики на липидната фаза в моделни и нативни мембрани, и са чувствителни към наличието на домени с различна степен на опаковане на липидните молекули в мембраните. Молекулите на MC₅₄₀ се вграждат в мембраната като мономери, но може да съществуват и като димери (разположени на повърхността на мембраната) или агрегати – в разтвора.



Фигура 3. Спектри на възбуждане на флуоресценцията (емисия при 590 нм) на MC₅₄₀ – 0.2 мкМ, инкорпориран в нативни ТМ от грах. А) 50 mM Tricine; (Б) 20 mM HEPES; (В) 40 mM MES, при pH 7.8 (—) и pH 5.2 (—).

От спектрите на възбуждане на MC₅₄₀, инкорпориран в тилакоидни мембрани, е определено отношението между интензитетите на флуоресценция на ивиците при 566 нм и 536 нм (E_{566}/E_{536}) (Фиг. 3, Таблица 2). Първата ивица е индикатор за наличието на мономерни форми на MC₅₄₀ инкорпориран в липидната фаза на мембраната, а втората – за наличие на MC₅₄₀ димери на повърхността на мембраната.

По-високите стойности на отношението E_{566}/E_{536} показват по-лесно инкорпориране на маркера в мембраната и следователно по-флуидна мембрана, а по-ниските му стойности са показателни за по-трудно инкорпориране на MC₅₄₀ в мембраната и отразяват по-плътна липидна фаза.

Резултатите показват, че спектрите на възбуждане на MC₅₄₀ (Фиг. 3А) имат най-високи интензитети в Tricine при двете рН (Фиг. 3Б и В). Интензитетите на спектрите са най-ниски при рН 5.2 и за трите буфера. Отношението между интензитетите на флуоресценция на ивиците при 566 нм и 536 нм (Таблица 2) намалява с понижаване на рН при трите буфера, което е индикация за промени в степента на опаковане на липидите в ТМ. Тази тенденция е по-силно изразена в HEPES и MES.

Таблица 2. Отношение на интензитетите на флуоресценция E_{566}/E_{536} на MC₅₄₀, инкорпориран в ТМ в 50 mM Tricine (рН 7.8 и 5.2), 20 mM HEPES (рН 7.8 и 5.2) и 40 mM MES (рН 7.8 и 5.2). Резултатите (средни стойности и стандартно отклонение) са обобщени от 6 независими експеримента.

рН на буфера	50 mM Tricine	20 mM HEPES	40 mM MES
7.8	1.70 ± 0.05	1.60 ± 0.08	1.52 ± 0.06
5.2	1.61 ± 0.08	1.29 ± 0.09	1.34 ± 0.10

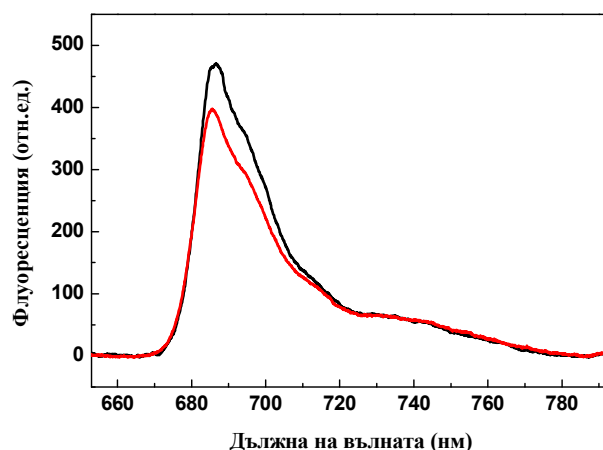
Намаляването на отношението E_{566}/E_{536} с около 21% при понижаване на рН показва по-плътна опаковка на липидната фаза при протониране на тилакоидните мембрани.

Установените промени са индикация за това, че протонирането оказва влияние върху физичното състояние на липидния матрикс на тилакоидните мембрани. Това означава, че флуитидетът на липидния матрикс има регулаторна роля за настъпващите в резултат на протонирането структурните реорганизации във фотосинтетичните комплекси.

Макроорганизация на BBY-мембранни фрагменти в две състояния на протониране

Нискотемпературни флуоресцентни емисионни спектри на BBY-мембранни фрагменти. Ефект на рН

Влиянието на протонирането върху изолирани BBY фрагменти бе изследвано чрез определяне степента на флуоресцентно гасене, регистрирайки нискотемпературни (77K) флуоресцентни емисионни спектри. На Фиг. 4 са представени типичните 77K емисионни флуоресцентни спектри на BBY мембранни фрагменти в слабо депротонирано и протонирано състояние при възбуждане в областта на хл. *a* (λ_{exc} 436 нм).



Фигура 4. 77К флуоресцентни емисионни спектри на BVY мембранни фрагменти при pH 7.8 (—) и pH 5.2 (—). Възбуждане с λ_{exc} 436 nm .

От получените спектрални данни може ясно да се види, че общият флуоресцентен интензитет на BVY фрагментите при pH 5.2 намалява средно с около $14 \pm 4.4\%$ спрямо този при pH 7.8. Тези резултати са съпроводени с намаляване на флуоресцентното отношение на емисионните ивици при 686 и 710 nm (F_{686}/F_{710}) от 3.5 при pH 7.8 до 3.1 при pH 5.2.

На Таблица 3 са представени усреднените площи под флуоресцентните криви.

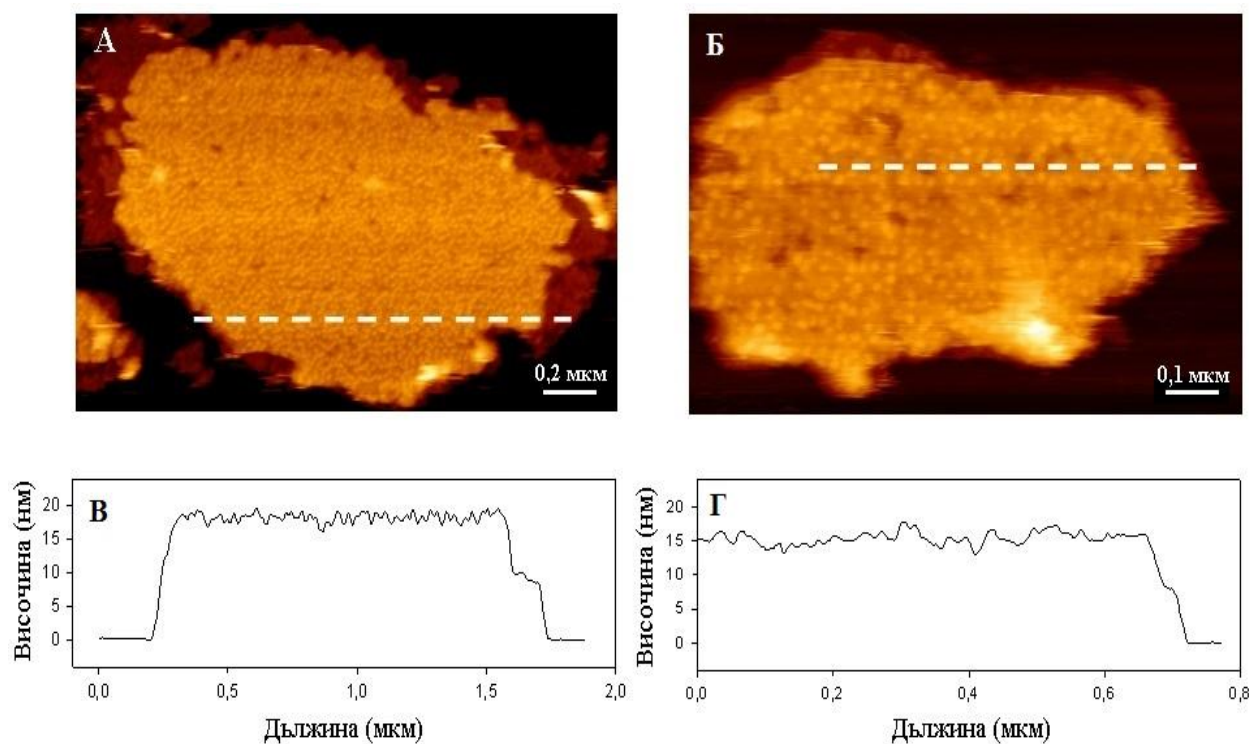
Таблица 3. Средни площи на емисионните спектри на BVY в pH 7.8 и pH 5.2, регистрирани след възбуждане на хл. а (λ_{exc} 436 nm).

pH на буфера	Площи, 1×10^{-2} отн. ед.
	λ_{exc} 436 nm
7.8	121.2 ± 9.1
5.2	104.2 ± 15.3

Регулирането на интегралната площ под флуоресцентните криви при понижаване на pH, така както и при ТМ, е индикация за pH-индуцирана промяна в конформацията и функционалното състояние на BVY-мембранните фрагменти.

Атомно-силова микроскопия на BVY-мембранни фрагменти в течна среда

Селектирани микрографии на гранални мембрани във водна среда при двете състояния на протониране са представени на фигури 5 и 6.



Фигура 5. АСМ микрографии на гранални мембранни фрагменти при рН 7.8 (А) и рН 5.2 (Б) и техните височинни профили, съответно (В) и (Г).

Частично депротонираните мембрани показват размери от порядъка на 2×3 (± 0.5) μm (Фиг. 5 А). При измерване на височинния им профил (Фиг. 5 В) се разграничават две ясно обособени нива (всяко с височина 9-10 nm), които по литературни данни отговарят на дебелината на четири стиковани мембрани (Sznee и съавт., 2011; Kirchhoff и съавт., 2008). Изображенията с по-висока разделителна способност на частично депротонираните гранални мембрани (Фиг. 6 А и Д) показват полукристалинна макроорганизация от елиптични обекти (изпъкналите овални обекти) с размери около 27×20 (± 3) nm (средна площ от 424 nm^2). Има разлика в стойностите за размера на суперкомплексите на ФС2 получени от различни автори — 32.3×18.9 nm (по Kirchhoff и съавт., 2008), 30×20 nm (по Sznee и съавт., 2011) и 33.0×16.5 nm (по Nield и съавт., 2000). Това вероятно се дължи на различните настройки и режими на работа на АСМ, на размерите на сканиращите остриета, както и на растителния вид от който са изолирани граналните мембрани. Друга причина може да бъде и различният брой на ССК2 комплексите, адсорбирани върху повърхността на твърдите подложки. От електронно-микроскопските данни за площта на единичен суперкомплекс на ФС2 (базирани на “freeze fracture” техниката) — $198 \pm 12 \text{ nm}^2$ (Johnson и съавт., 2011) следва, че изпъкналите обекти от изображенията съдържат средно по 2.1 ФС2 суперкомплекса.

От изображенията с по-висока разделителна способност (Фиг. 6 А и Д) се вижда, че по-голяма част от ФС2 комплексите в ВВУ-фрагментите контактуват посредством

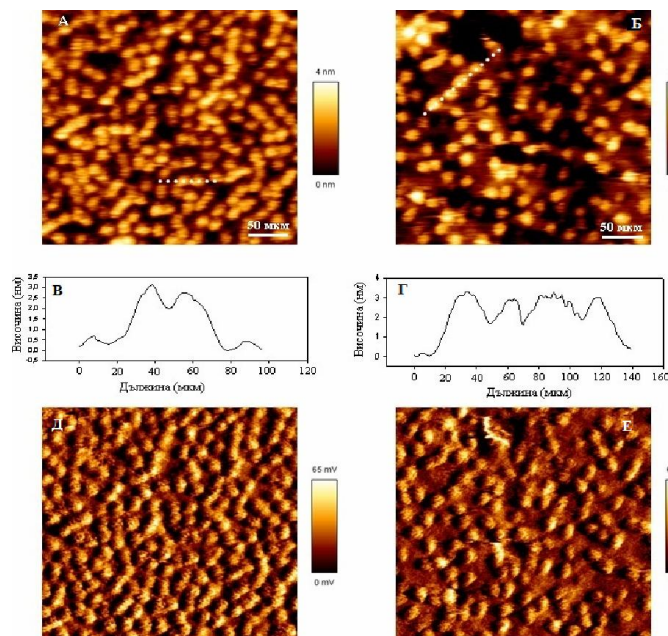
техните по-къси страни при рН 7.8, образувайки по този начин нишковидни редици с различна дължина. Подобно на представените от Sznee и съавт. (2011) профили на ВВУ-фрагменти, височините на изпъкналите обекти от топографските изображения варират между 3.0 и 3.5 нм (вж. Фиг. 6 В) и отговарят на размерите на експонираните към лумена участъци от коровия комплекс на ФС2.

По литературни данни граналните фрагменти до голяма степен са лишени от липидно съдържание и тяхната площ се заема основно от суперкомплексите на ФС2, както и от “свободните” ССК2 белтъци, откъснали се от суперкомплексите на ФС2 (Kirchhoff и съавт., 2008). Приблизителният брой изпъкнали обекти на единица площ (100×100 нм) е средно 16.5 ± 0.8 за всяко топографско изображение. Имайки предвид установената средна площ на суперкомплексите на ФС2 (424 нм^2), бе оценена общата площ на изпъкналите обекти, както и относителната площ, която заемат (% от общата площ на изображението, заета от комплексите). Въз основа на това за частично депротонираните гранални мембрани бе установена 70 % плътност на опаковане на димерните ФС2 суперкомплекси, а останалите ~30 % са представени предимно от свободни ССК2 тримери.

Микрографиите на протонираните грани показват по-малки по размер мембранни фрагменти – 1×0.5 (± 0.5) мкм (Фиг. 5 Б) в сравнение с частично депротонираните. В този случай също се наблюдава стиковане на две двойни мембрани, адсорбирани върху повърхността на слюдата, но те са по-тънки от тези в частично депротонираните грани — с размер $7 \div 8$ нм всяка. Съществена разлика с депротонираните грани е подредбата на комплексите в плоскостта на мембраната. В случая с протонираните грани комплексите нямат вид на нишки, а изглеждат случайно разпръснати и по-рехави (Фиг. 6 Б и Е).

Изображенията с по-висока разделителна способност на Фиг. 6 Б и Е показват наличието на обширни области лишени от суперкомплекси на ФС2 (средно 47% от площта на изображенията) най-вероятно заети от отцепили се периферни антенни комплекси (ССК2), образуващи самостоятелни ССК2-домени. Ясно различимите изпъкнали обекти са с размери 33×21 (± 2.2) нм (596 нм^2 средна площ) и височина от $3.0 \div 3.5$ нм (Фиг. 6 Г) и заемат около 53 ± 8 % от площта на изображението. За да се определи приблизителния брой на ФС2 суперкомплексите в изпъкналите обекти като референтна бе използвана измерената площ на суперкомплексите от осветени хлоропласти по метода на “freeze fracture” електронна микроскопия – $148 \pm 13 \text{ нм}^2$ (Johnson и съавт., 2011). Оценката в случая с протонирани ВВУ фрагменти показва

наличието на 4 ФС2 суперкомплекса на всеки отделен изпъкнал обект. Както изглежда, отделните суперкомплекси са по-плътно опаковани в протонирани гранални мембрани, отколкото в частично депротонирани и следователно заемат по-малка (от 22 %) площ в мембраната.



Фигура 6. Микрографии на отделни участъци от мембранните фрагменти, получени при сканиране на 50x50 мкм площ в течна среда. Микрографии на мембранните фрагменти при рН 7.8 (А, Д) и рН 5.2 (Б и Е). Височинни профили на съседно разположени изпъкнали обекти за рН 7.8 (В) и за рН 5.2 (Г).

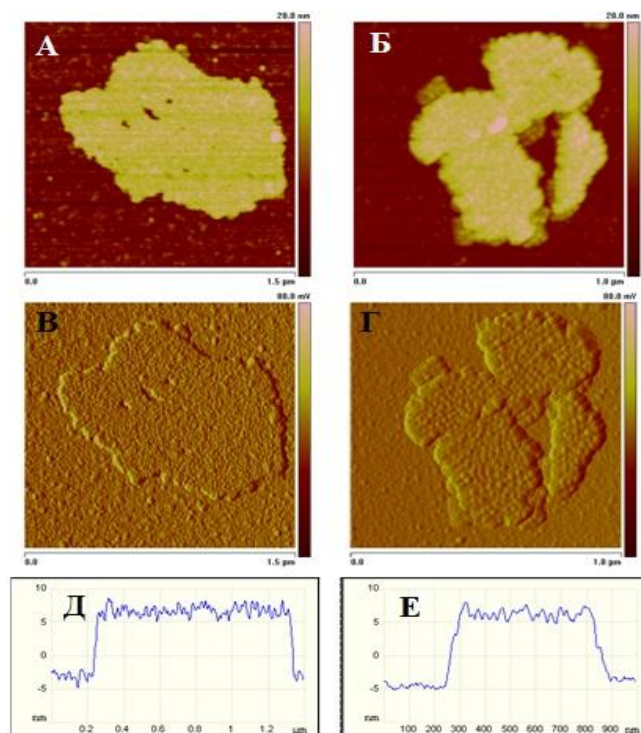
От площта на един ССК2 тример с диаметър 10 нм (определена чрез електронна микроскопия (Ruban и съавт., 1997) и AFM (Kirchhoff и съавт., 2008.) и площта на самостоятелните ССК2 домени в частично депротонирани и протонирани гранални фрагменти, може да се пресметне, че на единица площ от 100x100 нм при рН 7.8 има 38.2 ± 4.3 свободни ССК2 тримери, несвързани със суперкомплексите на ФС2, докато броят им се увеличава до 60.0 ± 10.5 при рН 5.2.

Следователно, 16.5 ± 0.8 димерни ФС2 комплекси (които са разположени на площ 100x100 нм) освобождават около 21.8 ССК2 тримери при протониране, или ~ 1.3 ССК тримери се откъсват от 1 ФС2 суперкомплекс.

Резултатите от АСМ показват свиване на мембрания бислой, придружено с рандомизация и редуциране на размера на ФС2 суперкомплексите (което се дължи на отцепването на антенни комплекси) в резултат от протонирането на граналните мембрани (Stoichev и съавт., 2015).

Атомно-силова микроскопия на ВВУ-мембранни фрагменти във въздушна среда

На Фигура 7 са представени типични 2D топографски изображения на гранални мембрани разположени с лумена към сканиращото острие, при рН 7.8 (А, В) и рН 5.2 (Б, Г) и съответстващите им височинни профили.



Фигура 7. АСМ микрографии на гранални мембранни фрагменти при рН 7.8 (А, В) и рН 5.2 (Б, Г) и техните височинни профили (Д, Е) измерени във въздушна среда.

АСМ изображенията на изолирани гранални мембрани, измерени във въздушна среда, както тези в течна среда показваха, че повърхността на слюдата е покрита с адсорбирани гранални мембранни фрагменти и с множество изпъкнали структури в полукристален тип на подредба. Изпъкналите обекти, наблюдавани в частично депротонираните гранални фрагменти са с приблизителни размери $20\text{-}22 \times 22$ нм (средна площ 363 нм^2). При сравнение с резултатите от анализа в течна среда се забелязва отклонение с около 5 нм към по-ниски стойности. Това би могло да се обясни със страничния ефект от отстраняването на солватната обвивка около мембранните молекули след изсушаването на пробите (Kirchhoff и съавт., 2008).

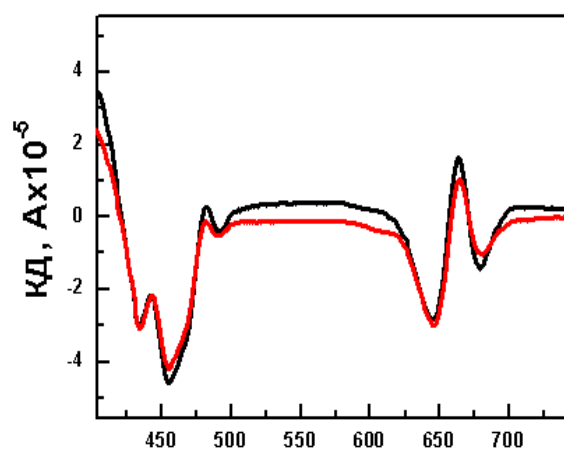
Изображенията на протонираните грани подобно на тези в течна среда показват по-големи по размер обекти – $26\text{-}28 \times 22$ нм, площ 466 нм^2 (Фиг. 7 Б, Г), в сравнение с частично депротонираните. Тенденцията към по-голям размер на изпъкналите обекти в

протонираните гранални мембрани, отколкото в частично депротонираните, би могла да се обясни с ефекта на протонирането върху макроорганизацията на суперкомплексите по време на НФГ – откачане на ССК2 от ФС2, съпроводено с допълнително агрегиране на ФС2 суперкомплекси, но с редуцирана периферна антена.

Кръгов дихроизъм на ВВУ-мембранни фрагменти

Промените в структурната организацията на ФС2 суперкомплексите в гранални мембранни фрагменти при промяна на протонирането бяха проследени с помощта на кръгов дихроизъм. КД спектрите на ФС2 частиците при рН 7.8 и 5.2 са представени на Фиг. 8.

И при двете рН ясно се разграничава КД ивица при: 1) (-)646 нм, произлизаща от близки междупигментни взаимодействия между молекулите на хл. **б** в състава на ССК2 мономерите, както в изолирано състояние, така и в ВВУ фрагменти и нативни ТМ (Hemelrijk и съавт., 1992; Dobrikova и съавт., 2003; Lambrev и съавт., 2007). Следователно ивицата при 610/646 нм може да бъде използвана като отличителна



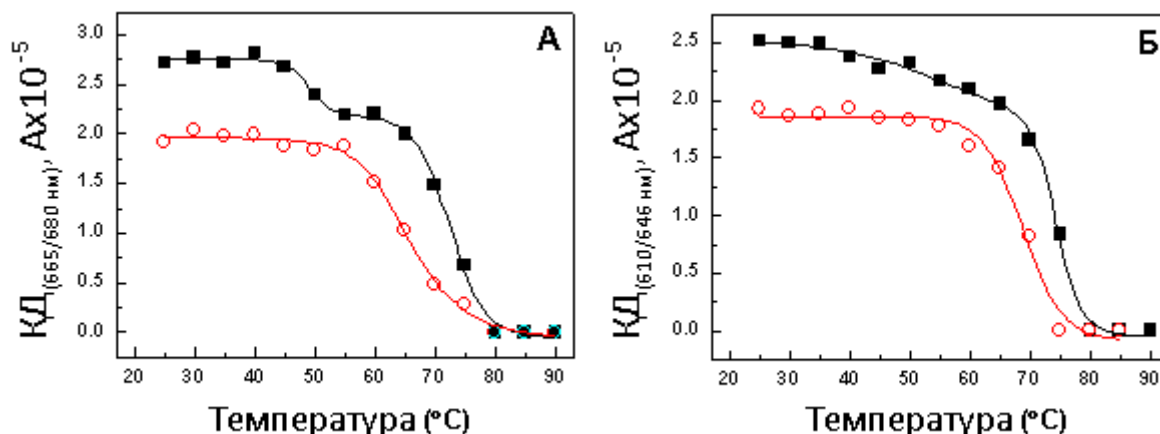
Фигура 8. КД спектри на гранални мембрани при рН 7.8 (—) и рН 5.2 (—).

характеристика за стабилността на ССК2 комплексите в изследваните ВВУ фрагменти; 2) (+)482/(-)470 нм, дължаща се на пигмент-пигментни взаимодействия (хл. **б** и неоксантин) между ССК2 мономерите в рамките на ССК2 тримерите. Тя е чувствителна към агрегационното състояние на ССК2 молекулите (взаимодействие тример/тример) (Lambrev и съавт., 2007) и мономеризирането на тримерите в ТМ (Dobrikova и съавт., 2003); 3) (+)446/(-)457 нм, произлизаща от молекулите на хл. **а**, най-вероятно в сърцевинния комплекс на ФС2 и 4) (-)686 нм, отново дължаща се на взаимодействия между хл. **а** молекулите.

КД спектрите на ФС2 мембранните фрагменти показват редуциране на основните ивици при протониране. Ивицата при (-)652 нм и двойката ивици при (+)482/(-)470 нм не се повлияват значително и следователно третичната структура на мономерните антенни комплекси и ССК2-тримерите не е засегната в следствие на протонирането им. Значителни разлики между рН 7.8 и 5.2 се установяват единствено в областта на

ивицата при 686 нм, което означава, че протонирането най-вероятно води до структурни промени в хл. *a*-съдържащите домени, вероятно на сърцевинния комплекс на ФС2 (Фиг. 8).

На Фиг. 9 и Таблица 4 са представени температурните зависимости и преходи на основните КД ивици в гранални мембранны фрагменти.



Фигура 9. Температурна дестабилизация на КД ивиците 665/680 нм (А) и 610/646 нм (Б) при рН 7.8 (черни символи) и рН 5.2 (червени символи). Зависимостите са фитвани с Гаусова (рН 5.2) или бисигмоидална (рН 7.8) функция.

Температурната дестабилизация на интензитета на КД ивиците разкрива ясно изразени разлики в стабилността на комплексите в двете състояния на протониране. Зависимостта на интензитета на двойките КД ивици при (+)665/(-)680 нм и (+)610/(-)646 нм (Фиг. 9) и (+)482/(-)470 нм на частично депротонирани проби (рН 7.8) от температурата може да се опише чрез бисигмоидална функция, разкриваща двустепенна дестабилизация на ВВУ-частиците.

КД ивицата при (+)482/(-)470 нм е най-чувствителна към топлинна денатурация, с температури на преходите T_m при 36.8 °C и 68.2 °C (Таблица 4). Независимо, че двата температурни прехода не могат да се асоциират с конкретни структурни изменения в суперкомплексите на ФС2, изглежда, че първото температурно индуцирано събитие в граналните мембрани е разпадането на олигомерните ССК2 агрегати в тримери. Тенденцията на дестабилизиране на интензитета в две фази е особено изразена за ивицата (+)665/(-)680, за която се наблюдават два ясно изразени температурни прехода при 49.4 °C и 70.6 °C (Фиг. 9, Таблица 4). Това може да се дължи на настъпили структурни изменения, засягащи коровите и/или антенните комплекси. КД ивиците за протонирани проби показват еднофазова топлинна дестабилизация и имат по-ниска стабилност с 2 до 5 °C в сравнение с частично депротонирани проби (Таблица 4). Изключение прави ивицата при (+)482/(-)470 нм, където липсва съществена разлика

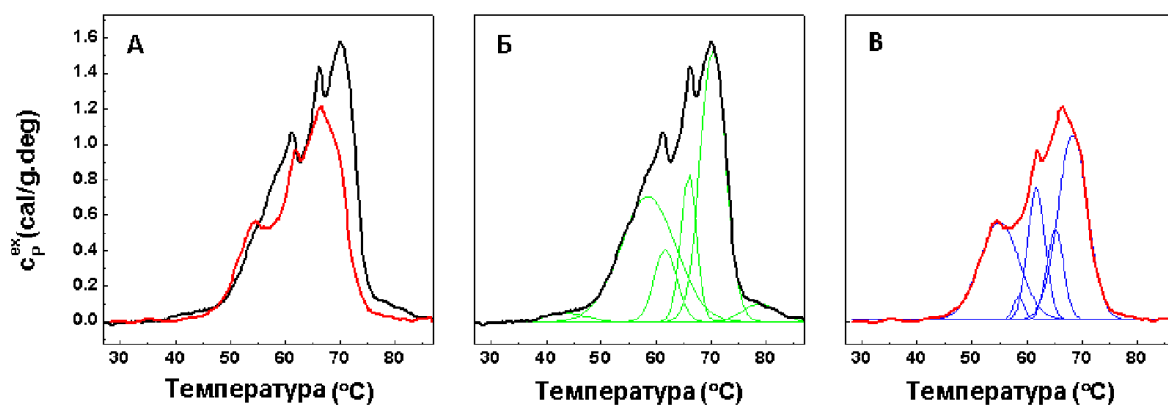
между втория температурен преход при рН 7.8 и този при рН 5.2 (Таблица 4). Разликата в температурната дестабилизация на интензитета на КД ивиците на ВВУ-фрагментите е резултат от индуцираното от рН изменение на стабилността на компоненти от структурата на суперкомплексите ФС2-ССК2 (коров димер на ФС2, мономерни антенни комплекси) (Stoichev и съавт., 2015).

Таблица 4. Средни стойности на температурите на прехода на основните КД-ивици на ВВУ чатици при рН 7.8 и рН 5.2.

КД ивица	рН 7.8	рН 5.2
	T_m (°C)	
665/680 нм	49.4 ± 1.3	-
	70.6 ± 0.6	66 ± 1.1
610/646 нм	56.3 ± 0.9	-
	72.8 ± 0.3	69 ± 0.2
482/470 нм	36.8 ± 3.3	-
	68.2 ± 0.9	66.2 ± 0.8
446/456 нм	71.3 ± 1.3	66.6 ± 1.4

Диференциална сканираща калориметрия на ВВУ-мембранны фрагменти

Термограмите на гранални мембранны фрагменти, представени на Фиг. 10, също ясно показват, че протонираното им състояние (рН 5.2) е термодинамично по-нестабилно от частично депротонираното (рН 7.8). Могат да се разграничат три главни прехода в термограмите на граналните фрагменти и в двете състояния на протониране над 50 °C — за частично депротонираните мембранны фрагменти те се характеризират с температури на последователните преходи при 61 °C, 66 °C и 70 °C, докато при протонираните ВВУ, температурите им са отместени с 2 до 6 градуса към по-ниски температури (Фиг. 10, Таблица 5). Два допълнителни по-слабо изразени прехода/рамена при 48 °C и 80 °C се наблюдават само при рН 7.8.



Фигура 10. Термограми на частично дерпотонирани (рН 7.8, панел А, (—)) и протонирани (рН 5.2, панел А, (—)) ВВУ мембрани и съответните им математически разлагания – за рН 7.8 (панел Б (—)) и за рН 5.2 (панел В (—)). Скорост на сканиране – 1 °С/мин.

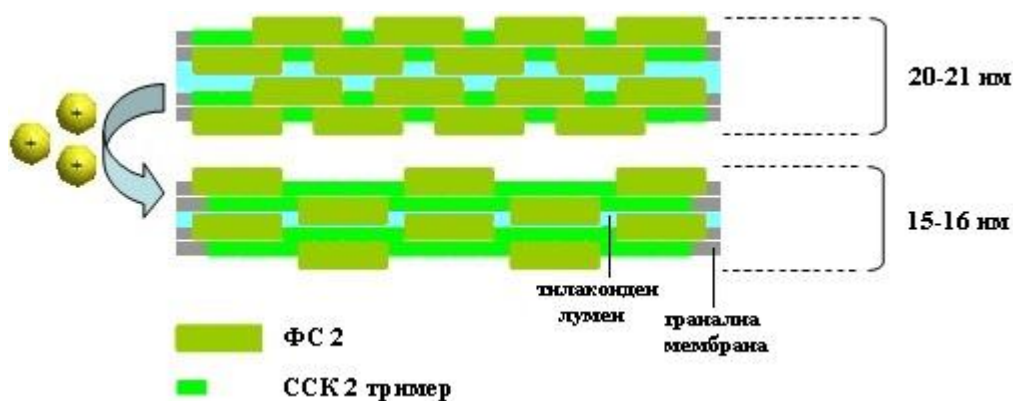
Разлагането на термограмите чрез Гаусова функция (Фиг. 10 Б и В) показва седем ендотермични прехода (пика) в интервала от 47 °С до 80 °С за частично депротонираното състояние, докато при протонираното състояние се наблюдават пет прехода (пика) (Фиг. 10 Б и В, Таблица 5). Прилагането на този математически подход позволи и по-доброто разграничаване на двете рамена при 48 °С и 80 °С при депротонираните проби (Фиг. 10 Б).

Таблица 5. Оновни калориметрични параметри: температури на преходите (T_m) и тотална енталпия на термограмите (ΔH_{cal}), определени от основните ендотермични преходи в ДСК-термограмите на ВВУ-частици при рН 7.8 и рН 5.2.

ВВУ	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)	T_{m4} (°C)	T_{m5} (°C)	ΔH_{cal} (cal/g)
рН 7.8	45.6 ± 1.7	61.2 ± 1.4	66.2 ± 0.2	70.2 ± 0.8	80 ± 1.3	20.4 ± 1.8
рН 5.2	-	53.4 ± 1.2	64.1 ± 2.4	68.2 ± 1.8	-	18.7 ± 0.4

И четирите приложени метода (КД, 77К флуоресценция, ДСК и АСМ) за изследване на структурната организация на гранални фрагменти показват структурни разлики, които могат да се дължат на модификации в подредбата на ФС2 и ССК2 комплексите в двете състояния на протониране (Stoichev и съвт., 2015). 77К флуоресценцентните спектри на граналните мембрани, подобно на регистрираните за интактни тилакоидни мембрани, показаха значителен спад в общия флуоресцентен интензитет. Това би могло да се дължи на активирани в резултат на протонирането процеси на безизлъчвателна дисипация на част от погълнатата енергия (вместо тя да се излъчи във вид на флуоресценция). АСМ изображенията разкриха значителни изменения в макроорганизацията на суперкомплексите на ФС2 в ВВУ мембраните, които се индуцират при понижаването на рН от 7.8 до 5.2. Тези изменения включват

увеличаване на областите заемани от самостоятелни домени на ССК2 (ССК2 домени) и по-плътно опаковане на ФС2 суперкомплексите (с редуцирани периферни антени). На базата на площта на наблюдаваните от нас ССК2 домени в частично депротонирани и протонирани гранални мембрани, може да се изчисли, че на площ от 100x100 нм при рН 7.8 се поместват около 40 свободни (дисоциирали от суперкомплексите на ФС2) ССК2 тримери, докато броят им при рН 5.2 нараства до около 60. Освен латерално разместване на белтъчните комплекси, друг наблюдаван от нас ефект в резултат на протонирането на граналните мембрани бе тяхната дезинтеграция (на около 12 пъти по-малки фрагменти) и изтъняване, подобно на това, което се наблюдава при светлинно адаптиране на гранални мембрани (Kirchhoff и съавт., 2013). Индуцираното изтъняване на мембраните в резултат на протонирането също така може да се дължи на различната подредба на комплексите на ФС2 в две срещуположни една на друга контактуващи мембрани (Фиг. 11).



Фигура 11. Схематичен модел на ефекта на протониране върху макроорганизацията на пигмент-белтъчните комплекси в гранални мембрани.

По-ниската плътност на изпъкналите обекти при рН 5.2 дава възможност за „шахматно” разположение на срещуположно отстоящите луменални участъци от ФС2 комплексите, докато по-плътната опаковка на суперкомплексите в частично депротонирани мембрани предполага фронтално разположение. Наблюдаваните от нас ефекти (по-ясно изразени при топографските изображения във водна среда) са изцяло в съответствие с предложения от Johnson и сътр. (2011) модел за НФГ. Освен това, за първи път бяха визуализирани самостоятелни домени от ССК2 в граналните мембрани и беше демонстрирана зависимостта на размерите им от промяната на рН на средата. От АСМ микрографиите се вижда, че основният наблюдаван ефект при протониране на комплексите е увеличаването на броя на ССК2 агрегатите и намаляване на агрегатите на ФС2-суперкомплексите. Получените данни са в съответствие с модела

за НФГ и потвърждават, че процесът на НФГ е съпроводен с отцепване на ССК2 от ФС2 суперкомплексите и агрегиране на ССК2. В допълнение нашите данни демонстрират, че ССК2 агрегирането настъпва още преди стартирането на ксантофиловия цикъл и протича паралелно с разпадането на агрегатите, формирани от ФС2-суперкомплексите. И в двата типа структури (ССК2 и ФС2 суперкомплекси), наблюдавани при рН 5.2, екситонните пигментни взаимодействия са по-слаби в сравнение с тези при рН 7.8.

Калориметричният профил на ВВУ фрагментите при рН 7.8 се характеризира с три ясно обособени температурни прехода, позиционирани при 61°C, 66°C и 70°C, и два по-слабо изразени (рамена) при 45°C и 80°C. Тези резултати са сходни с предишни резултати за ДСК на ВВУ в присъствие на Mg^{2+} йони (Krumova и съавт., 2010; Thompson и сътр., 1989; Shutilova и сътр., 1995). Знае се, че ендотермичните пикове в ДСК профилите на ТМ са в строга зависимост от рН на средата, типа буфер, йонната сила на разтвора, метода на изолиране и растителния вид (обобщено в Krumova и съавт., 2010). Установено е, че температурно-индуцираните преходи се приписват главно на денатурирането на основните пигмент-белтъчни комплекси в ТМ, а именно ФС2, ССК2 и ФС1, като се повлияват и от тяхното състояние на олигомеризация (Krumova и съавт., 2010, 2014). Първото ендотермично събитие в термограмите на ВВУ (при около 45°C при рН 7.8) е свързано с мономеризирането на коровия комплекс на ФС2 и разпадането на кислород отделящата система (Krumova и съавт., 2010; Nagy и съавт., 2011). Този преход липсва в протонирани ВВУ фрагменти, вероятно заради индуцираното от ниското рН частично откъсване на белтъчни молекули от кислород отделящата система. Това е в съответствие с по-ранни данни докладвани от Schen и сътр. (1991) за откъсване на 17 kDa субединицата от комплекса при рН 5.

Преходът около 57°C произхожда от разрушаване на коровия комплекс на ФС2, този при 62°C се дължи на денатурация на периферните антенни белтъци, а изолираните ССК2 денатурират при 69°C (Krumova и съавт., 2005, 2010).

По-ниска температурна стабилност (с около 2-5°C) на протонирани гранални мембрани (в сравнение с депротонирани) бе установена и чрез КД. Ивиците при 665/680, 610/650 и 482/470 показаха различна температурна зависимост за двете състояния на протониране на ВВУ мембраните – двуфазно поведение при рН 7.8 и монофазно (отсъства първата фаза) при рН 5.2. Вероятно първата фаза е свързана по-скоро с топлинно-индуцирани структурни пренареждания на комплексите, а не с денатурация на белтъците. Такова ремоделиране на мембраната очевидно не се случва

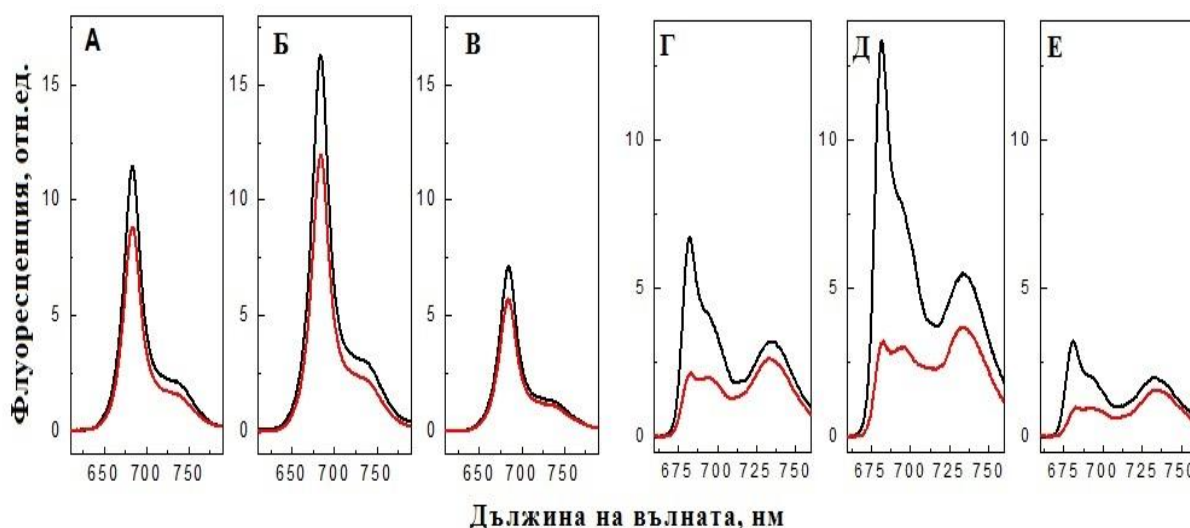
при рН 5.2, както следва от липсващата първа фаза от профила на протонираниите ВВУ мембрани.

Структурна организация на ССК2 с различно липидно съдържание. Ефект на състоянието на протониране на комплекса

Флуоресценция на ламеларни ССК2 агрегати

На Фиг. 12 са сравнени флуоресцентните спектри на ССК2 тип II макорагрегати, регистрирани при две състояния на протониране на комплекса (при рН 7.8 и 5.2), имитиращи светосъбиращо и фотопротективно функционално състояние, съответно (Andreeva и съавт., 2013).

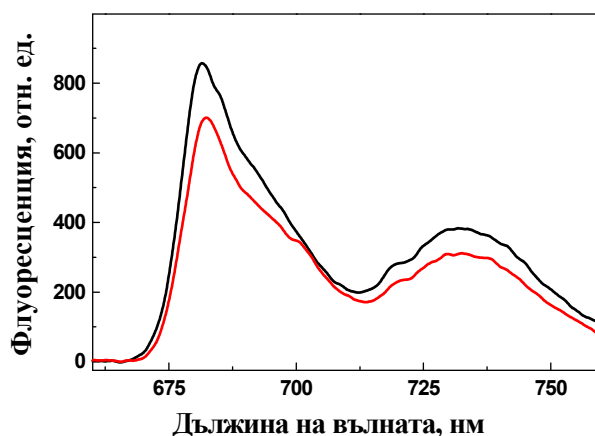
Флуоресцентните емисионни спектри бяха измерени при стайна и при ниска (77K) температура и при селективно възбуждане на хл. *a* (440 нм), хл. *b*, неоксантин (480 нм) и лутеин (515 нм) (Фиг. 12). Основната ивица в спектрите при стайна и ниска температура има максимум при 680 нм (F680), свързана с тримерните форми на ССК2. Математическото разлагането на нискотемпературните флуоресцентни спектри разкрива приноса и на ивица с максимум при 700 нм (F700), дължаща се на агрегати на ССК2 (Андреева и съавт., 2009).



Фигура 12. Флуоресцентни емисионни спектри на ССК2 (тип II) при стайна температура (А, Б, В) и 77K (Г, Д, Е) при рН 7.8 (—) и рН 5.2 (—), нормализирани към оптичната плътност на хлорофилите (при 680 нм), при възбуждане на хл. *a* (А, Г); хл. *b* (Б, Д) и („червен” лутеин) (В, Е).

Квантовият добив на флуоресценцията намалява при по-ниското рН за всички използвани дължини на вълната на възбуждане. Силното редуциране на отношението F_{680}/F_{700} показва, че протонирането на ССК2 (рН 5.2) оказва значително влияние върху

състоянието на олигомеризация на ССК2. Гасенето на флуоресценцията е най-голямо при възбуждането на хл. *б* (Фиг. 12 Б и Д) в сравнение с възбуждането на хл. *а* и каротиноидите. Квантовият добив от измерената флуоресценция при стайна и ниска температура (77К) на делипидираните форми на ССК2 тип IV също се понижава при рН 5.2, но ефектът е по-слаб от този наблюдаван за ССК2 тип II (Фиг. 13).



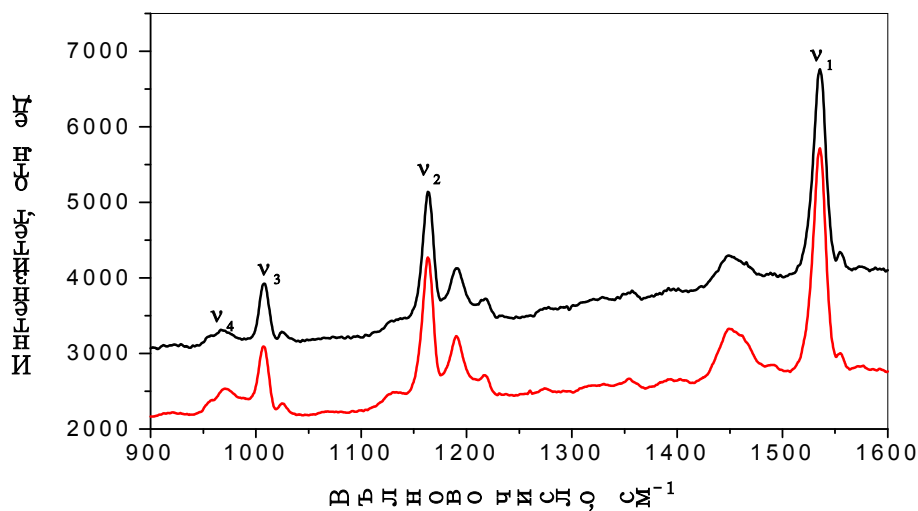
Фигура 13. 77К флуоресцентни емисионни спектри на ССК2 (тип IV) при рН 7.8 (—) и рН 5.2 (—), нормализирани към оптичната плътност на хлорофилите (при 680 нм). Спектрите са регистрирани при възбуждане с дължина на вълната 440 нм.

Раманова спектроскопия на ламеларни ССК2 структури

За да регистрираме евентуални структурни промени в свързаните със ССК2 ксантофилни молекули при понижаване на рН на средата и в случаите на агрегирани форми на антенните комплекси, използвахме нискотемпературна резонанс Раманова спектроскопия. Методът позволява да се разграничи сигнал от един единствен вид каротиноиди в многопигментна система, каквато е ССК2 (Ruban и съавт., 2001). Възбуждането с 488 нм специфично детектира наличието на 9-цис неоксантин, докато това с 514.5 нм – така наречения "червен" лутеин, който според структурния модел на ССК2 е свързан с една молекула хлорофил (Standfuss и съавт., 2005). На Фиг. 14 са сравнени типични нискотемпературни резонанс Раманови спектри на неоксантин в ССК2 тип II в две различни състояния на протониране.

Спектрите съдържат четири групи ивици, отговарящи на четири честотни области (означени от ν_1 до ν_4), характерни за каротиноидите (Ruban и съавт., 2001). Показано е, че ν_1 (около 1530 cm^{-1}) съответства на валентни симфазни движения на $\text{C}=\text{C}$ връзките на спрегнатата верига; ν_2 ($1120\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$) – на комбинация от валентни движения на $\text{C}_{14}\text{--C}_{15}$ и $\text{C}=\text{C}$ връзките на спрегнатата верига с $\text{C}_{15}\text{--H}$ деформационно равнинно огъване; ν_3 (около 1000 cm^{-1}) – на деформационно равнинни трептения на C -

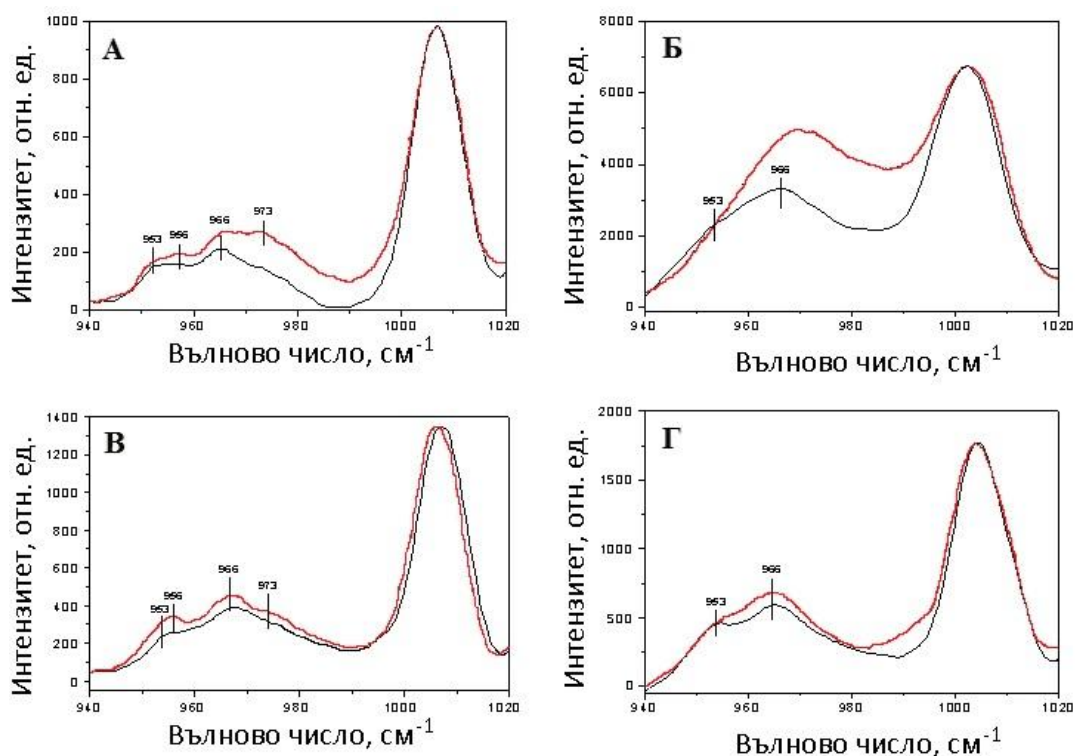
СН₃ връзките; ν_4 (940-980 cm^{-1}) – на извънравнинно огъване на С-Н връзките, забранено за планарни молекули (Ruban и съавт., 2001).



Фигура 14. Резонансни Раманови спектри на ССК2 при рН 7.8 (—) и рН 5.2 (—), специфично възбудени с дължина на вълната 488 нм.

Разлики между Раман спектрите на неоксантина и лутеина се наблюдават главно в областта на ν_4 ивиците. Това се вижда от Фиг. 15 А и Б, на която са сравнени спектрите на молекулите на неоксантина и „червения“ лутеин, ивиците на който бяха нормализирани спрямо интензитета на ν_3 ивицата. Преходите в ν_4 честотната област са забранени за планарни молекули и нарастват значително в условия, при които каротиноидите претърпяват молекулно изкривяване, вследствие на взаимодействието им с обкръжението (Ruban и съавт., 2001).

Интензитетът на ивиците при 953, 956, 966 и 973 cm^{-1} в ν_4 областта на Раман спектрите на неоксантина в ССК2 тип II е по-висок при рН 5.2 в сравнение с този при рН 7.8 (Фиг. 15). Това показва, че индуцираната от протонирането агрегация на комплекса силно влияе върху структурата на молекулите на неоксантин. Раман спектърът на лутеина в ССК2 тип II (Фиг. 15 Б) показва, че протонирането води до по-малки промени в ивиците при 953, 956 cm^{-1} и по-значителни такива в областта около 966 и 973 cm^{-1} .



Фигура 15. Резонанс Раман спектри на неоксантин (А, В) и лутеин (Б, Г) за ССК2 тип II (А и Б) и тип IV при pH 7.8 (—) и pH 5.2 (—) в ν_4 честотния район. Ивиците са нормализирани спрямо максимума на ν_3 -ивицата.

Както във флуоресцентните (Фиг. 13) така и в Раман спектрите се наблюдават значително по-слабо изразени промени след протонирането на делипидираните тип IV ССК2 в сравнение с тип II ССК2 ламеларни агрегати (Фиг. 15 В и Г). Изследванията показват, че протонирането на ССК2 индуцира конформационни промени свързани с изменения в планарността на каротиноидите неоксантин и лутеин (Busheva и съавт., 2012).

Структурни промени в тилакоидни мембрани при оксидативен стрес. Роля на водородния пероксид (H_2O_2) срещу токсичното действие на хербицида паракват

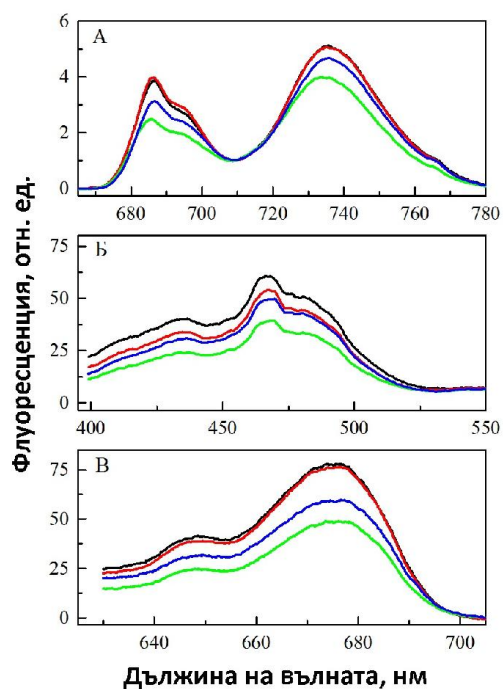
Паракват е един от използваните хербициди при моделни системи. Наскоро Rodrigues и съавт. (2012) демонстрираха, че ПК силно повлиява и в крайна сметка разрушава структурата на хлоропластите. За да придобием по-ясна представа за конкретното действие на ПК върху структурната организация на тилакоидни мембрани,

както и за ролята на H_2O_2 като протективна сигнална молекула, приложихме 77K флуоресценция и кръгов дихроизъм.

На Фиг. 16А са представени характерни емисионни спектри (при $\lambda_{\text{exc}} = 436$ nm) на изолирани тилакоиди – от контролни и третиран с H_2O_2 , с ПК, и тяхната комбинация, растения, 5 часа след активиране на светлинния режим (Moskova и съавт., 2007).

Третирането с 0.2 mM ПК води до цялостно понижаване на флуоресцентния интензитет/квантов добив, по-значително на ФС2 суперкомплексите, докато предварителното третиране с H_2O_2 води до редуциране на част от ефекта на ПК върху флуоресцентните характеристики от двете фотосистеми (Фиг. 16А). За оценка на относителната активност на фотосинтетичния апарат, бяха пресметнати площите на флуоресцентните спектри (Таблица 6). Данните са представени като относителни стойности за възбуждането при $\lambda_{\text{exc}} = 436, 472$ и 515 nm на Таблица 6 и като процентно изменение спрямо контролата (само за $\lambda_{\text{exc}} = 436$ nm) на Фиг. 17. Резултатите за третираните растения следват тенденцията, представена на Фиг. 16А. Флуоресцентните спектри на предварително третираните с H_2O_2 растения са много подобни на тези на контролата (отклонението на интензитета е околное 5% спрямо контролата). Фотосинтетичната емисия в случаите на растения третиран с ПК спада с $18 \pm 4\%$ спрямо контролите, а комбинираното действие на ПК и H_2O_2 води до значително по-малък ефект (спад с 6% от контролата). Гасенето на флуоресценцията при въздействие с ПК корелира с установеното намаляване на фотохимичната ефективност на ФС2 (F_v/F_m) в хлоропласти третиран с ПК (Rodrigues и съавт., 2012; Laskay и Lakos, 2011).

Фигура 16. 77K флуоресцентни спектри на тилакоидни мембрани. (А) Емисионни спектри, регистрирани при възбуждане с 436 nm; (Б) Спектри на възбуждане, регистрирани при емисия 686 nm; (В) Спектри на възбуждане, регистрирани при емисия 735 nm. Спектрите са нормализирани към оптичната плътност на хлорофилите (при 680 nm). Контрола (—); тилакоиди, изолирани от растения, третиран с 2.5 mM H_2O_2 (—); 0.2 mM ПК (—) и 2.5 mM H_2O_2 + 0.2 mM ПК (—).

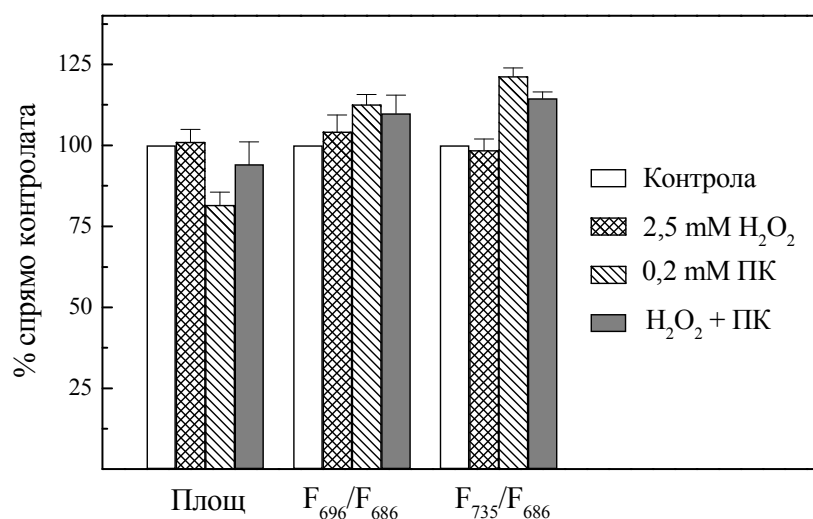


На базата на данните от характеристичните флуоресцентни отношения – F_{735}/F_{686} и F_{695}/F_{686} (Таблица 7), беше проследено разпределението на уловената от ФСА енергия между двете фотосистеми (F_{735}/F_{686}) и в рамките на ФС2 (F_{695}/F_{686}), в следствие от третирането с H_2O_2 , ПК и тяхната комбинация. ПК оказва значителен ефект върху тези два параметъра – F_{695}/F_{686} достигна $113 \pm 3\%$ спрямо контролата, а увеличението на F_{735}/F_{686} отношението бе по-ясно изразено и нараства до $121 \pm 3\%$. H_2O_2 почти не променя F_{695}/F_{686} и F_{735}/F_{686} отношенията, но в комбинация с ПК проявява протектиращ ефект спрямо разпределението на енергията между ФС2 и ФС1. F_{735}/F_{686} се променя само с $14 \pm 2\%$ спрямо контролата, а F_{695}/F_{686} нараства едва с $9 \pm 3\%$ от контролата.

Таблица 6. Средни площи на емисионните спектри, регистрирани при възбуждане на хл. **а** (λ_{exc} 436 нм), хл. **б** (λ_{exc} 472 нм) и каротиноидите (λ_{exc} 515 нм).

Проба	Площи		
	λ_{exc} 436 нм	λ_{exc} 472 нм	λ_{exc} 515 нм
Контрола	245.2 ± 17.8	376.03 ± 17.8	172.8 ± 10.4
+ 2.5 mM H_2O_2	253.2 ± 10.5	394.6 ± 40.6	172.1 ± 3.6
+ 0.2 mM паракват	207.0 ± 6.9	177.7 ± 19.8	138.8 ± 4.5
+ 0.2 mM паракват и 2.5 mM H_2O_2	225.3 ± 4.4	328.2 ± 18.5	149.05 ± 5.8

За по-задълбочено изследване на защитната роля на H_2O_2 от токсичността на ПК измерихме и спектрите на възбуждане при две характеристични дължини на вълната – 686 нм (ФС2 емисия) и 735 нм (ФС1 емисия). В сравнение с контролните тилакоиди, всички третирани варианти показват по-нисък интензитет (до около 20%) при избраните емисионни дължини на вълната (Фиг. 16 Б, В), което може да се дължи на нарушения в преноса на енергия от периферните антени към РЦ на двете фотосистеми. H_2O_2 няма ефект върху емисията на ФС1 (Фиг 16 В), а тази на ФС2 беше само слабо намалена (Фиг. 16 Б). Комбинираното действие на H_2O_2 и ПК води до значително по-малък ефект в сравнение с ПК третирането, което разкрива протективната роля на H_2O_2 (Stoichev и съавт., 2014).

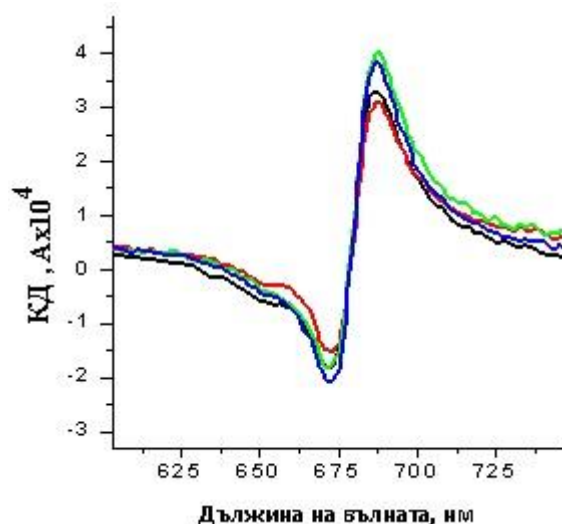


Фигура 17. Усреднена площ на 77К флуоресцентните емисионни спектри (λ_{exc} 436 нм) и отношенията на интензитетите F_{695}/F_{686} и F_{735}/F_{686} , представени като % спрямо контролата.

Таблица 7. Отношение на интензитетите на флуоресценция (F_{695}/F_{686}) и (F_{735}/F_{686}) от ТМ на растения преди (контроли) и след третиране с 2.5 mM H_2O_2 и 0.2 mM паракват.

Проби	F_{695}/F_{686}			F_{735}/F_{686}		
	λ_{exc} 436 нм	λ_{exc} 472 нм	λ_{exc} 515 нм	λ_{exc} 436 нм	λ_{exc} 472 нм	λ_{exc} 515 нм
Контрола	0.71 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.73 ± 0.02	1.31 ± 0.07	1.10 ± 0.08	1.55 ± 0.03
+ H₂O₂	0.74 ± 0.02	0.76 ± 0.02	0.73 ± 0.01	1.29 ± 0.04	1.12 ± 0.07	1.58 ± 0.12
+ ПК	0.80 ± 0.04	0.82 ± 0.04	0.80 ± 0.02	1.61 ± 0.15	1.30 ± 0.10	1.83 ± 0.02
+ ПК и H₂O₂	0.78 ± 0.03	0.81 ± 0.05	0.78 ± 0.02	1.51 ± 0.05	1.28 ± 0.10	1.81 ± 0.13

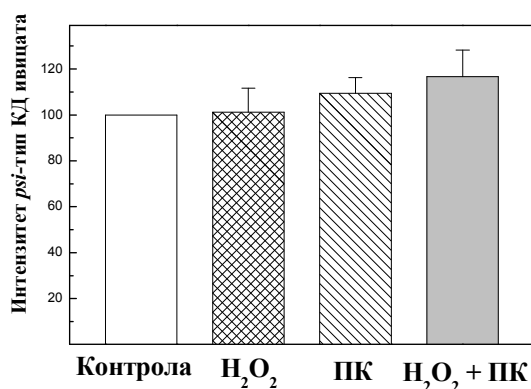
Наблюдаваните промени в F_{735}/F_{686} отношението могат да се дължат на инхибиране на ФС2 (и следователно намаляване на относителния й флуоресцентен добив) и/или на изменения в макроорганизацията на пигмент-белтъчни комплекси в ТМ, водещи до промени в преразпределението на светлинната енергия между фотосистемите. За да проверим тази хипотеза регистрирахме КД спектрите на ТМ при различните схеми на третиране (Фиг. 18).



Фигура 18. Типична серия от КД спектри на ТМ в областта на 688/672 нм ивицата. ТМ са изолирани от контролни и третиран с H_2O_2 , ПК и ПК+ H_2O_2 растения, 5 ч. след активиране на светлинната фаза. Контрола (—), растения, третиран с H_2O_2 (—), с ПК (—) и с H_2O_2 + ПК (—) .

КД сигналът е много чувствителен към структурни промени в ПБК (Garab, 1989). Промените в макроорганизцията на ТМ най-силно се отразяват на 688/672 нм КД ивицата, която произлиза от хирални макромолекулни структури на ССК2 и ФС2-ССК2 суперкомплексите в граналните области (Garab и съавт., 2002; Dobrikova и съавт., 2003; Cseh и съавт., 2000; Kovacs и съавт., 2006).

На Фиг. 18 са представени КД спектри на ТМ в областта на ивицата 688/672 нм, а на Фиг. 19 – процентното отклонение на интензитета ѝ при ТМ, изолирани от третираните групи растения, спрямо това на контролата.



Фигура 19. Процентно изменение на интензитета на 688/672 нм КД ивицата на ТМ, третиран с 2.5 mM H_2O_2 , 0.2 mM паракват и в комбинация спрямо контролния вариант.

Липсата на разлики в интензитета на 688/672 нм ивицата след третирането с 2.5 mM пероксид може да се тълкува като отсъствие на ефект на пероксида върху организацията и структурата на ССК2 и ФС2-ССК2 суперкомплексите (поне при приложеното третиране). Третирането с ПК показва слабо нарастване на интензитета на

тази ивица спрямо контролния спектър, като претретирането с H_2O_2 не оказва допълнителен статистически различим ефект (Фиг. 19). Изглежда ПК индуцира формирането на по-големи хирални макродомени в тилакоидните мембрани и H_2O_2 не оказва протектиращ ефект спрямо този процес. Тези данни показват, че ПК влияе не само локално върху структурата на ФС2, но и върху макроорганизацията на комплексите.

Обобщение

Латералното сегрегиране на фотосинтетичните комплекси в тилакоидни мембрани от висши растения и триизмерната организация на тилакоидите са фактори оптимизиращи процеса на фотосинтеза. Макроорганизацията на пигмент-белтъчните комплекси се определя от специфични белтък-белтъчни и белтък-липидни взаимодействия, водещи до формирането на супрамолекулни структури (ФС2 суперкомплекси, разположени или в полукристалинни домени (с далечен порядък) или в неопределени домени), ФС1 суперкомплекси (без далечен порядък) и ССК2 домени (с неизвестна до момента организация). Тези молекулни взаимодействия са много динамични – силно зависят от условията на средата и са определящ фактор за процесите на адаптация и отговор към стрес. Така например сегрегирането на фотосистемите в граналните и стромалните области на мембраната силно зависи от степента на стикованост на тилакоидите, която от своя страна подлежи на регулация – в тъмнинно състояние тилакоидите до голяма степен са разстиковани, а при светлинна адаптация – граните са ясно дефинирани (Pfeiffer и Krupinska, 2005). Светлинният интензитет също регулира пространствената структура на мембраните – при субоптимален (нисък или висок) интензитет също се наблюдава структурна реорганизация на мембраната, включваща разкъсване и създаване на нови липидни контакти в нея, реорганизация на гранални и стромални сегменти и миграция на ССК2 от ФС2 суперкомплексите към ФС1 (Chuartzmann и съавт., 2008; Tikkanen и съавт., 2008). Освен това е установено, че при фотоинхибиращи интензитети разстикването на мембраните води до разрушаване на хиралните макродомени, съдържащи ФС2 и ССК2 комплексите, и до мономеризиране на ССК2 комплекса, както и че тези процеси осигуряват локална флексибилност на мембраната (Dobrikova и съавт., 2003).

Механизмите за фотопротекция при висши растения са много комплексни. Установени са редица структурни промени свързани с тях – конформационни промени на белтъчните молекули от фотосинтетичните комплекси, настъпващи в резултат от

светлинно-индуцирания поток на протони в лумена, ензимни реакции като фосфорилиране на белтъци, разграждане на повредени белтъци и синтез на нови такива, деепоксидиране на свързания с антенните комплекси виолаксантин. Всички тези промени са компоненти от фотозащитния механизъм, наречен най-общо НФГ, посредством който растенията обезвреждат излишъка от светлинна енергия.

Структурните промени, свързани с НФГ (по-конкретно тези, засягащи ксантофиловия цикъл и миграцията на ССК2 между двете фотосистеми) са обстойно изучавани, но тези, индуцирани при първата стъпка на НФГ, а именно след протонирането на тилакоидния лумен, все още не са изяснени напълно. Резултатите, представени в дисертационния труд разкриват, че гасенето на флуоресценцията (маркер за НФГ) настъпва още при протонирането на комплексите (при рН 5.2) в тилакоидни мембрани, в изолирани ССК2 ламеларни агрегати и в изолирани мембранни фрагменти, обогатени на ФС2 суперкомплекси. Тоест, протонирането на ССК2 води до «превключването» му във фотопротективна конформация още преди задействането на другите компоненти на НФГ (ксантофиловия цикъл и миграцията на ССК2).

Протонирането на фотосинтетичните комплекси в изолирани гранални мембрани води и до ясно изразени промени в макроорганизацията им. Установихме прегрупиране на ФС2 суперкомплексите от клъстери/агрегати, съдържащи 2 комплекса при рН 7.8 до такива, съдържащи 4 комплекса при рН 5.2, съпроводено с отцепване на ССК2 тримери и формиране на ССК2 домени, както и със структурна дестабилизация на ФС2 компонентите и ССК2 тримерите.

В основата на наблюдаваните от нас пространствени пренареждания вероятно стои мобилната субединица на ФС2 – PsbS. Известно е, че тази субединица е особено чувствителна към протонирането на тилакоидния лумен и функционира като своеобразен сензор на рН. В резултат на понижаването на рН в лумена PsbS изменя кофромацията си, което индуцира структурни и пространствени реорганизации в ПБК с които контактува – ФС2 и ССК2, а така отключва и дисипативната им функция.

Нашите данни демонстрират и ролята на липидното обръжение за осъществяването на рН-индуцираните структурни промени – установено беше, че запазването на липидния състав и количество в ламеларни агрегати от ССК2 комплекси близки до нативните е необходимо условие за превключването във фотозащитна конформация на ССК2. Оказва се, че липидната фаза е силно повлияна от преминаването във фотозащитно състояние и при интактни тилакоидни мембрани. Намалването на флуидитета на мембраните при рН 5.2 би могло да се дължи на

структурните реорганизации на белтъчните компоненти и последвалите от това промени в липид-белтъчните взаимодействия.

В заключение, протонирането на фотосинтетичните комплекси, действа като сигнал за значителни структурни реорганизации на белтъчните и липидни компоненти на тилакоидната мембрана. Наблюдаваните ефекти са предпоставка за пълното осъществяване на многокомпонентния процес НФГ.

Структурно-модулираща роля е предложена и за сигналната молекула H_2O_2 . За пръв път в дисертационния труд се изследва хипотетичната ѝ роля да предпазва тилакоидните мембрани от оксидативен стрес на ниво структурна организация. Нашите данни разкриват, че екзогенно добавеният H_2O_2 действително има известен протективен ефект по отношение на разпределението на енергията на възбуждане между ФС2 и ФС1, и намаляването на ефективния размер на светосъбиращата антена на двете фотосистеми при действие на хербицида паракват. Паракватът има по-силно изразено действие върху енергетичния пренос към ФС1, отколкото върху ФС2 в съответствие с данните, представени от други автори (Wong, 2000; Laskay и Lakos, 2011) и съответно защитната роля на H_2O_2 е по-силно насочена към процесите, протичащи във ФС1. Вероятно това е и причината за това, че H_2O_2 не оказва протектиращ ефект по отношение на уголемяването на хиралните макроагрегати, изградени от компоненти на ФС2, при въздействие с параквата.

Обобщаването на получените данни разкрива, че макроорганизацията на фотосинтетичните комплекси е важен фактор за функционалността на тилакоидните мембрани в различни физиологични и стресови състояния. Тази регулаторна роля се определя от конформацията и пространствената подредба на пигмент-белтъчните комплекси и от опаковането на липидните молекули.

Изводи

1. Установено е структурно ремоделиране на пигмент-белтъчните комплекси и липидния матрикс на тилакоидни мембрани и субмембранни фрагменти (изолирани гранални мембрани и ламеларни агрегати на ССК2) при преход от светосъбиращо във фотопротективно състояние, индуциран чрез протониране.

2. Структурните реорганизации в тилакоидни мембрани, настъпващи при протониране, са свързани с намаляване на флуидитета на липидния матрикс.

3. Двете функционални състояния на ФС2 суперкомплексите се характеризират с различна макроорганизация – при светосъбиращото (слабо депротонирано) състояние комплексите се организират в полукристалинни структури с нишковиден профил, а при фотопротективното (протонирано) състояние в домени с ниска степен на подреденост. Протонирането води и до изтъняване на граналните мембрани и увеличаване на склонността им да се дезинтегрират.

4. Индуцираната от протонирането промяна в макроорганизацията на суперкомплексите на ФС2 е свързана със значителното ѝ температурно дестабилизиране.

5. Протонирането на ламеларни ССК2-макроагрегати индуцира конформационни промени, свързани с планарността на каротиноидите неоксантин и лутеин.

6. Хербицидът паракват влияе върху макроорганизацията на тилакоидните мембрани като индуцира формирането на по-големи хирални макродомени. Сигналната молекула водороден пероксид не оказва защитен ефект спрямо този процес.

Приноси

1. Представена е детайлна картина на процесите, настъпващи при протониране на фотосинтетичните комплекси в тилакоидни мембрани и изолирани мембранни фрагменти (гранални мембрани и ламеларни агрегати от ССК2). Установени са промените във физичното състояние на липидния матрикс, в структурната организация и температурната стабилност на инкорпорираните в тилакоидните мембрани пигмент-белтъчни комплекси при преминаването от светосъбиращо във фотопротективно състояние.

2. За пръв път са визуализирани обогатени на ССК2 мембранни домени в гранални мембрани и е установено, че протонирането на фотосинтетичните мембрани е сигнал за тяхното формиране.
3. Установена е конфигурацията на пигментните молекули неоксантин и лутеин в ламеларни агрегати на ССК2, при две функционални състояния - светосъбиращо и фотозащитно.
4. Демонстрирана е структурно-модулиращата роля на хербицида паракват за макроорганизацията на тилакоидни мембрани.

Публикации и участия в научни форуми

Публикации:

1. **S. Stoichev**, S.B. Krumova, T. Andreeva, J.V. Busto, S. Todinova, K. Balashev, M. Busheva, F.M. Goñi, and S.G. Taneva, Low pH Modulates the Macroorganization and Thermal Stability of PSII Supercomplexes in Grana Membranes, *Biophysical Journal*, **2015**, 108, pp. 844-853.
2. **S. Stoichev**, I. Tzonova, I. Moskova, S. Krumova, M. Busheva, Exogenous H₂O₂ partially prevents the paraquat induced oxidative stress in thylakoid membranes, *Compt. Rend. Acad. Sci. Bulg.*, **2014**, 67(2), 237-242.
3. M. Busheva, S. Krumova, **S. Stoichev**, I. Tzonova, I. Karadjov, K. Stoitchkova, A. Andreeva, Effect of pH on the aggregation of the major light harvesting complex of photosystem II, In: *Scientific Research of the Union of Scientists in Bulgaria – Plovdiv, series B. Natural Sciences and Humanities*, Vol. XIII, **2012**, pp.133-137, ISSN 1311-9192.

Участия в научни форуми:

1. **S. Stoichev**, S.B. Krumova, T. Andreeva, J.V. Busto, S. Todinova, K. Balashev, M. Busheva, F.M. Goñi, and S.G. Taneva, Макроорганизация и температурна стабилност на фотосистема 2 суперкомплекси в протонирано и частично депротонирано състояние. Научна сесия за

докторанти и млади учени „Биомедицина и качество на живот”, по повод 145-годишнината на Българската академия на науките, ИБФБМИ, 2 октомври 2014, направление „Фотобиология и фотовъзбудими мембрани, Доклад.

- 2. Светозар Стойчев**, Тоня Андреева, Йон Бусто, Сашка Крумова, Константин Балашев, Мира Бушева и Стефка Танева, Прилагане на атомно-силова микроскопия за изследване на промени в структурната организация на фотосинтетичния апарат във висши растения, Младежка научна конференция „Младите изследователи и съвременните научни предизвикателства”, 24-25.10.2014, постер No. 9.
- 3. S. Stoichev**, I. Tzonova, I. Moskova, V. Aleksieva, M. Busheva, Protective role of preliminary treatment with H₂O₂ against the toxic action of the herbicide paraquat on the photosystem integrity in pea thylakoids. „СЕМИНАР ПО ЕКОЛОГИЯ – 2013“, СЕКЦИЯ „БИОЛОГИЯ“, ИБЕИ – БАН, 25–26 април 2013, София, Постер P3_02.
- 4.** M. Busheva, S. Krumova, **S. Stoichev**, I. Tzonova, I. Karadjov, K. Stoitchkova, A. Andreeva, Effect of pH on the aggregation of the major light harvesting complex of photosystem II, IV International Conference of Young Scientists – 23rd – 25th June 2011, Plovdiv, Bulgaria, Poster 5. - награден с грамота за най-добре представил се млад презентатор в научната си секция.
- 5. С. Стойчев**, С. Крумова, М. Бушева, Влияние на ресуспендиращ буфер върху флуидитета на тилакоидни мембрани, Poster 15, 21st INT. SCI. CONFER, 2-3 june 2011, Stara Zagora, Bulgaria, Section: Natural and mathematical science, p. 27.