

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Максимов Евгений Георгиевич

**ЭЛЕКТРОННО-КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ФОТО-
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ
ЦИАНОБАКТЕРИЙ**

Специальность: 03.01.02 – «Биофизика»

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1 Фотосинтетические светособирающие комплексы	20
1.2 Фотоповреждение и активные формы кислорода	21
1.3 Нефотохимическое тушение флуоресценции	21
1.4 Строение антенных комплексов цианобактерий	22
1.5 Открытие нефотохимического тушения флуоресценции у цианобактерий	27
1.6 ОСР – сенсор и эффектор нефотохимического тушения флуоресценции фикобилисом.....	34
1.7 Регуляция активности ОСР за счет белка восстановления флуоресценции FRP	41
1.8 Взаимодействие ОСР с компонентами фикобилисом.....	44
1.9 Взаимодействие ОСР с FRP	48
1.10 Заключительные комментарии	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
2.1 Материалы	53
2.1.1. Культивация цианобактерий.....	53
2.1.2. Выделение рекомбинантных белковых препаратов.....	55
2.2 Методы исследования.....	60
2.2.1 Стационарная и время-разрешенная абсорбционная спектроскопия.....	60
2.2.2 Оценка выхода возбужденных состояний с помощью спектрофлуориметрии	67
2.2.3 Измерения кинетики световой индукции переменной флуоресценции хлорофилла	71
2.2.4. Измерение времен жизни возбужденных состояний	75
2.2.5 Спектроскопия и микроскопия комбинационного рассеяния света.....	79
2.2.6 Исследования структуры белков и белковых комплексов	81
2.3 Методы описания переноса энергии электронного возбуждения	86
2.3.1 Флуоресцентный резонансный перенос энергии	86
2.3.1 Оценка активационных барьеров.....	91

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	93
3.1 Энергетические взаимодействия каротиноидных белков с различными донорами энергии.....	93
3.2. Фотоцикл оранжевого каротиноидного белка	113
3.3 Белок-белковые взаимодействия в основе регуляции фотозащитных реакций	142
3.4 Белок-опосредованный транспорт каротиноидов.....	160
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	178
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	193

Список сокращений

ПБК – пигмент-белковый комплекс

ФС1 – фотосистема 1

ФС2 – фотосистема 2

ФБС – фикобилисома

ФЭ – фикоэритрин

ФЦ – фикоцианин

АФЦ – аллофикоцианин

ТЭ – терминальный эмиттер

WT – дикий тип *Synechocystis* sp. PCC 6803

СК – мутант *Synechocystis* sp. PCC 6803, лишенный фикоцианина

PAL – мутант *Synechocystis* sp. PCC 6803, лишенный фикобилисом

ОСР – оранжевый каротиноидный белок

ОСР⁰ – неактивная форма оранжевого каротиноидного белка

ОСР^R – активная форма оранжевого каротиноидного белка

РСР – «красный» каротиноидный белок

NTE – участок N-концевой последовательности ОСР с 1 по 18 аминокислотный остаток

СТТ – участок C-концевой последовательности ОСР с 305 по 311 аминокислотный остаток

АФК – активные формы кислорода

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Электронно-конформационные взаимодействия в биологических макромолекулярных комплексах лежат в основе фундаментальных механизмов их функционирования. В фоточувствительных пигмент-белковых комплексах (ПБК) фотосинтезирующих организмов протекают первичные процессы фотосинтеза. Характерной чертой этих процессов, способных эффективно адаптироваться к изменениям условий окружающей среды, является высокая скорость трансформации энергии поглощенного света и переноса электрона даже при сверхнизких температурах. На основе понимания механизмов электронно-конформационных взаимодействий в нативных системах становится возможна разработка искусственных фотосенсоров и оптогенетических конструкций. Вместе с тем фундаментальные основы многих реакций в ПБК остаются недостаточно изученными в том числе из-за разнообразия видов автотрофных организмов, а также вследствие лабильности структур ПБК, участвующих в трансформации энергии. В ПБК цианобактерий, в отличие от высших растений, индукция фотозащитных реакций обусловлена фотоактивным белком, содержащим каротиноид. Данная работа посвящена изучению молекулярных механизмов трансформации энергии в фоточувствительных ПБК цианобактерий.

Развитие методов молекулярной биологии и биохимии привели к возникновению в начале XXI века ряда новых подходов к исследованию белок-белковых взаимодействий, метаболических реакций и методов их детектирования *in vitro* и на уровне клетки. Фундаментальной основой данных подходов является глубокое понимание структурных и функциональных особенностей нативных белков и созданных на их основе химерных конструкций. Такие конструкции обычно состоят из нескольких модулей: «функционального» - отвечающего за взаимодействие с белками или лигандами и «индикаторного» - обеспечивающего возможность контроля за локализацией конструкции и осуществляемой ею

функцией. Большой интерес научного сообщества представляют генетически кодируемые конструкции, обладающие возможностью управления функциональным состоянием системы с помощью света. Такие конструкции называют «оптогенетическими», а само направление оптогенетики получило широкое признание после успешного применения фоточувствительных канальных родопсинов для активации и торможения возбудимости нейронов [1-5].

Создание молекулярных конструкций, подходящих для решения конкретных задач биофизики и нейрофизиологии, способствовало прорыву в понимании функционирования нервной системы человека, развитию новых подходов к лечению нейродегенеративных заболеваний и управлению функциями мозга [6-10]. Безусловно, эти успехи невозможны без понимания фундаментальных молекулярных принципов функционирования родопсинов, их структуры и последовательности фотоциклических реакций, важную роль в исследовании которых сыграли отечественные биофизики (О.А. Синещев, Е.Г. Говорунова, С.П. Балашов, Е.П. Лукашев и другие), исследовавшие фототаксис фотосинтетических микроорганизмов.

Именно фотосинтетические организмы обладают богатым набором разнообразных фоточувствительных и фотоуправляемых пигмент-белковых комплексов, позволяющих им успешно адаптироваться к изменениям условий окружающей среды. Из-за разнообразия видов фотоавтотрофных организмов механизмы многих фотоадаптивных реакций остаются малоизученными, хотя регуляторные белки, участвующие в этих процессах, потенциально могут быть использованы как основа для создания новых оптогенетических конструкций. Данная работа посвящена исследованию электронно-конформационных принципов функционирования фоточувствительных пигмент-белковых комплексов цианобактерий.

Степень разработанности темы исследования

За последние десятилетия были установлены основные механизмы

трансформации энергии в системе первичных процессов фотосинтеза, связанные с электронно-конформационными взаимодействиями в ПБК. Эти процессы обусловлены безызлучательным переносом энергии электронного возбуждения в светособирающих антеннах, генерацией электронного потока и туннельным переносом электрона по цепи переносчиков. Согласно современным представлениям, цианобактерии являются древнейшими фотоавтотрофными организмами, возникшими более трех с половиной миллиардов лет назад, и оказавшими значительное влияние как на геологическую историю Земли, так и на развитие жизни на нашей планете [11, 12]. Несмотря на кажущуюся простоту организации этих одноклеточных организмов, их геном содержит достаточное количество информации для реализации универсальных механизмов выживания и адаптации. Именно эти механизмы позволили цианобактериям не только занять все существующие экологические ниши, но и изменить облик нашей планеты. Переход цианобактерий к кислородному фотосинтезу привел к окислению горных пород, появлению свободного молекулярного кислорода в атмосфере, формированию ионосферы и ряду других явлений, в совокупности, называемых «Кислородной катастрофой (революцией)». Поскольку кислород является окислителем, это событие явилось катастрофой для анаэробных организмов, лишенных защитных механизмов, регулирующих уровень активных форм кислорода (АФК). Однако, у цианобактерий эти механизмы заложены в основе функционирования фотосинтетических мембран.

Совокупность первичных фотосинтетических процессов направлена на преобразование энергии квантов света в энергию химических связей акцепторов электронов. Преобразование осуществляется в реакционных центрах при возбуждении специальных пигментов, однако прямое фотовозбуждение малоэффективно, поэтому у всех фотосинтетических организмов есть антенные комплексы, осуществляющие функцию светосбора. Поскольку при отсутствии доступных акцепторов (и доноров) электронов возбуждение пигментов может привести к образованию АФК, универсальным защитным механизмом является

регулируемое введение в антенный комплекс молекул тушителей электронного возбуждения, способных быстро и эффективно конвертировать электронное возбуждение в тепло. Этот механизм реализуется, как и в клетках цианобактерий, так и у высших растений, и, несмотря на значительные различия в структурной организации антенных комплексов, осуществляется с помощью молекул каротиноидов [13-15].

Особое значение для поддержания энергетического баланса фотосинтезирующего организма имеет возможность быстрого и обратимого переключения между фотохимическим и нефотохимическим тушением возбуждения пигментов [13, 14, 16-18]. Так, у высших растений нефотохимическое тушение индуцируется при понижении рН люмена тилакоидов ферментами, осуществляющими последовательную дезоксидацию виолаксантина и превращение его в зеаксантин, способный принимать на себя энергию возбуждения молекул хлорофилла антенны. У цианобактерий светособирающая антенна представляет собой мегадальтонный комплекс из сотен водорастворимых белков и тысяч пигментов, осуществляющих перенос энергии возбуждения на хлорофилл по принципу «энергетической воронки», поэтому для тушения возбуждения достаточно всего одной молекулы каротиноида, расположенной в узком месте воронки – в непосредственной близости от терминальных эмиттеров флуоресценции.

Сложность реализации такого механизма заключается в том, что для активации нефотохимического тушения водорастворимой антенны к её ядру должна быть доставлена гидрофобная молекула каротиноида, а для инактивации тушитель должен быть удален от ядра на значительное расстояние.

Несмотря на то, что исследования каротиноидных белков цианобактерий были начаты в 80х годах XX века, первые доказательства участия каротиноидов в регуляции светосбора в клетках цианобактерий появились лишь в 2004 году (Н.В. Карапетян, И.Н. Стадничук, И.В. Еланская с соавт. [19]). Позднее было показано,

что для активации нефотохимического тушения цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 необходим фотоактивный оранжевый каротиноидный белок (Orange Carotenoid Protein, OCP, см. *рис. 1*), а для инактивации - так называемый белок восстановления флуоресценции (Fluorescence Recovery Protein, FRP). Пространственные структуры OCP и FRP были установлены с помощью рентгеноструктурного анализа (в 2003 и 2011 годах, соответственно [20, 21]), а структура антенного комплекса – фикобилисомы (ФБС) была определена с помощью криоэлектронной микроскопии (2017 [22]). Однако, имеющиеся в литературе данные о взаимодействии участников нефотохимического тушения и механизмах регуляции носят фрагментарный характер или направлены лишь на расширение представлений об особенностях протекания процесса у разных видов цианобактерий, а не установлении механизма в целом. Во многом это объясняется отсутствием до недавнего времени информации о фотоцикле OCP, в котором переход между состояниями осуществляется в масштабе времен от 10^{-12} до 10^2 секунд, а функционально активная форма представляет собой расплавленную глобулу [23]. Поэтому для изучения механизмов регуляции нефотохимического тушения в рамках данной работы использовали комбинацию экспериментальных подходов, основанных, во-первых, на использовании современных спектральных методов анализа, в том числе с высоким временным разрешением, и, во-вторых, стабилизации переходных состояний фотоактивного белка, необходимых для взаимодействия с другими участниками процесса нефотохимического тушения.

В настоящее время особый интерес представляет механизм сборки модульного водорастворимого фотоактивного каротиноидного белка из апо-формы белка, синтезируемой на рибосомах, и кето-каротиноида, располагающегося в мембранах. Данный процесс подразумевает не только переход гидрофобной молекулы каротиноида из мембраны в цитоплазму, но также и значительное изменение конформации белковой матрицы.

Понимание процессов, лежащих в основе функционирования фотоактивных

белков и регуляции фотозащитных механизмов в целом представляет интерес как с точки зрения развития фундаментальных представлений о цианобактериальном фотосинтезе и механизмах адаптации цианобактерий к различным условиям окружающей среды, так и для решения ряда прикладных задач, связанных с разработкой новых фотобиосенсоров и систем для оптогенетического контроля, основанных на фотоактивных белках, и повышении скорости продукции биомассы в биотехнологической промышленности.

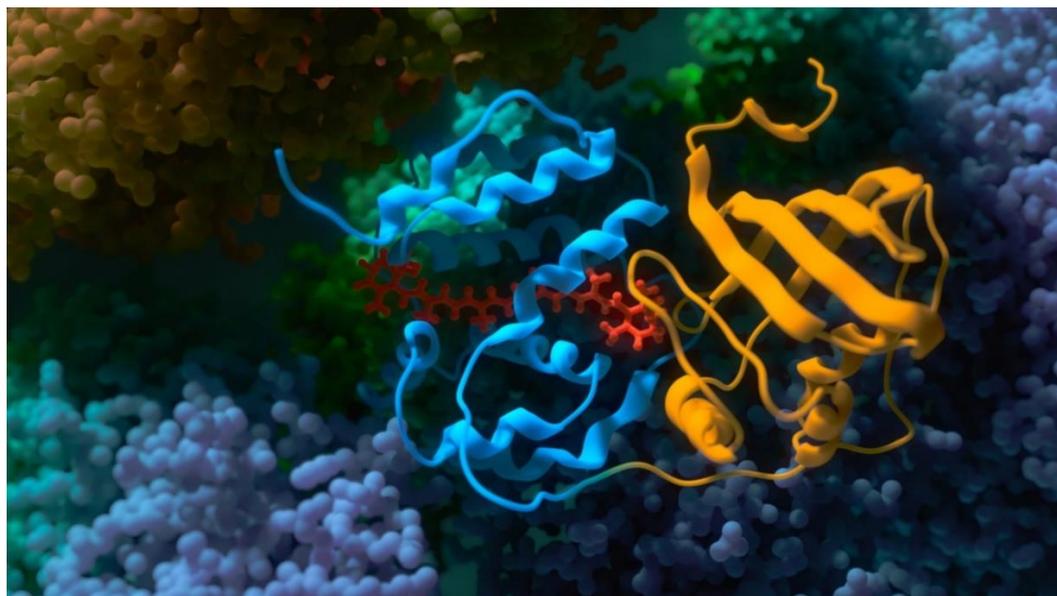


Рис. 1. Трехмерная модель активной красной формы ОСР.

Цель диссертационной работы связана с решением фундаментальной биофизической проблемы – установлением механизмов электронно-конформационных взаимодействий в макромолекулярных белковых комплексах. Основным направлением работы являлось изучение этих взаимодействий в фотосинтетических ПБК цианобактерий и механизмов их регуляции. Это предполагает определение принципов структурной и функциональной организации фотоактивных белков, механизмов их конформационной подвижности, последовательности фотоиндуцированных конформационных превращений ПБК. Для достижения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить параметры трансформации энергии электронного возбуждения в комплексах фикобилисома – оранжевый каротиноидный белок, исследовать

механизм нефотохимического тушения в нативных и модельных комплексах.

2. Установить последовательность и параметры конформационных переходов каротиноида и белковой матрицы при фотовозбуждении оранжевого каротиноидного белка. Охарактеризовать структурные и функциональные свойства интермедиатов фотоцикла оранжевого каротиноидного белка.
3. Исследовать механизм взаимодействия оранжевого каротиноидного белка с регуляторным белком восстановления флуоресценции на разных стадиях фотоцикла.
4. Изучить особенности белок-опосредованного транспорта каротиноидов на модельных системах.

Объект и предмет исследования.

Предмет исследования состоит в установлении ключевых механизмов электронно-конформационных взаимодействий хромофоров и белковой матрицы в фоточувствительных ПБК с помощью биофизических методов. Основными объектами исследования явились водорастворимые фотоактивные каротиноидные белки и модельные конструкции, созданные на их основе, антенные комплексы и их компоненты, а также белки, регулирующие фотозащитные механизмы цианобактерий.

Научная новизна работы

Установлена общая последовательность и механизмы электронно-конформационных переходов в фотоцикле ОСР, индуцируемые поглощением кванта света молекулой каротиноида в составе белковой матрицы. Выявлены основные интермедиаты фотоцикла, оценены скорости реакций переходов между конформационными состояниями ОСР. Стадии фотоцикла ОСР последовательно включают разрыв водородных связей между каротиноидом и белковой матрицей, изомеризацию каротиноида и его перемещение между структурными доменами

белка, переход белка в состояние расплавленной глобулы и образование активного сигнального состояния ОСР. Переход ОСР в состояние расплавленной глобулы обеспечивает доставку молекулы тушителя - каротиноида к антенне и образование комплекса с высокоэффективным переносом энергии электронного возбуждения между пигментами ФБС и каротиноидом. Раскрыта роль FRP как регулятора взаимодействия ОСР с ФБС, обеспечивающая необходимый уровень нефотохимического тушения флуоресценции ФБС и восстановление исходного неактивного состояния ОСР. В результате исследования особенностей структурной организации отдельных доменов ОСР открыт новый класс цианобактериальных каротиноидных белков, способных обеспечить транслокацию каротиноидов между мембранами и белками для регуляции фотозащитных механизмов.

Получен ряд мутантов, функционально соответствующих интермедиатам фотоцикла ОСР. Охарактеризованы белок-белковые взаимодействия и установлена структура одного из комплексов ОСР с белком восстановления флуоресценции (Fluorescence Recovery Protein, FRP), показано что образование комплекса с FRP способствует увеличению вероятности перемещения молекулы каротиноида в исходное положение.

Установлено, что изменение конформации хромофоров фикоцианобилинов может приводить к значительному, но обратимому снижению квантового выхода флуоресценции. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* доказано, что тушение флуоресценции пигментов фикобилисом, вызванное ОСР, является динамическим. Показано, что каротиноид в составе ОСР может являться тушителем возбужденных состояний органических красителей и флуоресцентных белков за счет индуктивно-резонансного переноса энергии возбуждения на каротиноид. Разработаны подходы для измерения локальной температуры окружения фотоактивного белка, основанные на измерении кинетики фотоциклических переходов по сигналу флуоресценции.

В результате исследования особенностей структурной организации отдельных

доменов ОСР открыт новый класс каротиноидных белков с уникальными оптическими и функциональными свойствами. Изучены природные гомологи С-домена ОСР, выявлены механизмы редокс зависимой регуляции переноса молекулы кето-каротиноида между мембранами и водорастворимыми белками. Впервые показано, что сборка и разборка активных форм ОСР, осуществляемая при взаимодействии с различными гомологами С-домена, позволяет, соответственно, активировать и инактивировать фотозащитные механизмы. Показано что цианобактериальные белки могут быть использованы в качестве модулей для высокоэффективной адресной доставки антиоксидантов в клетки млекопитающих.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе результаты раскрывают общие механизмы фотоиндуцированных электронно-конформационных взаимодействий в ПБК, содержащих каротиноид, которые участвуют в регуляции фотозащитных реакций у цианобактерий. Раскрыта роль электронно-возбужденных состояний хромофора (каротиноида), определяющих направление и последовательность индуцированных конформационных превращений белковой матрицы на пикосекундных временных интервалах, которые в результате приводят к формированию физиологически значимого состояния белка. Выявлены основные интермедиаты фотоцикла и оценены скорости реакций переходов между конформационными состояниями ОСР, включая разрыв водородных связей между каротиноидом и белковой матрицей, перемещение каротиноида между структурными доменами белка и образование активного сигнального состояния ОСР. Установлены структурные параметры, определяющие эффективность переноса энергии ПБК светособирающих антенн к каротиноиду в составе ОСР.

Результаты работы могут быть использованы для оптимизации биотехнологических штаммов цианобактерий, культивируемых в биореакторах путем направленной модификации белок-хромофорных и белок-белковых взаимодействий участников нефотохимического тушения. Полученные в ходе

выполнения работы новые виды цветных каротинодных белков обладают высокой антиоксидантной активностью, фото- и термостабильностью и могут быть использованы для решения ряда биомедицинских задач, например белок-опосредованной доставки каротиноидов в клетки млекопитающих, с целью повышения их устойчивости к окислительному стрессу. Предложены рекомендации по использованию фотоактивных белков в качестве биосенсоров для детектирования локальных изменений температуры и вязкости в клетках.

Направленная модификация структуры ОСР для изучения механизма фотоактивации ОСР с помощью оптических методов с фемтосекундным временным разрешением, позволила определить характерные времена образования первичных фотопродуктов, а также оптимизировать белок для структурных исследований с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах.

Результаты исследований используются при обучении студентов МГУ имени М.В. Ломоносова и МГУ-ППИ (Шэньчжэнь, КНР), отражены в учебных пособиях и практикумах.

Методология и методы исследования

В работе использовали цианобактерий рода *Synechocystis* и их мутанты, лишённые фотосистем, а также выделенные препараты ФБС для изучения регуляции нефотохимического тушения флуоресценции ФБС с различным составом фикобилипротеинов и терминальных эмиттеров *in vivo* и *in vitro*. Препараты ОСР были получены путем выделения из клеток цианобактерий и с помощью экспрессии рекомбинантных белков в специальном штамме *E.coli*, синтезирующем кето-каротиноиды благодаря наличию соответствующей ферментативной системы. Полный список белковых препаратов и химерных конструкций, использованных в работе, насчитывает более 30 наименований. Для изучения взаимодействия каротинодных белков с мембранами в качестве модельного объекта использовали липосомы с различным набором каротиноидов. Для исследования белок-опосредованной доставки каротиноидов в мембраны на

клеточных моделях использовали линии НЕК293Т (human embryonic kidney), ТЕТ21N (human neuroblastoma) и HeLa (human cervical cancer).

Для решения поставленных экспериментальных задач был использован комплекс биофизических методов. Измерение времен жизни возбужденных состояний проводили с помощью спектроскопии высокого временного разрешения. Для регистрации мгновенных спектров флуоресценции использовали метод время-коррелированного счета единичных фотонов с пикосекундным временным разрешением. Для определения времен жизни молекул каротиноидов в белках использовали метод абсорбционной фемтосекундной спектроскопии, разработанный сотрудниками Института химической физики имени Н. Н. Семёнова РАН. Скорость фотоциклических переходов в фотоактивных белках определяли в режиме накачка-зондирование на временах от 100 нс до 10 с. Для исследования скорости разрыва водородных связей в ОСР была собрана установка для регистрации флуоресценции триптофана в режиме накачка (2 гармоника Yb-лазера) – зондирование (4 гармоника Yb-лазера) с возможностью регулировки интервалов между импульсами с субпикосекундной точностью. Изменения конформации каротиноидов в белках и распределение каротиноидов по образцу регистрировали с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. Количество элементов вторичной структуры белков оценивали с помощью методов спектроскопии кругового дихроизма и ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием.

Структуры белков и комплексов в растворе исследовали с помощью спектроскопии малоуглового рассеяния рентгеновского и нейтронного излучения, а также спектроскопии ЯМР. Пространственные структуры высокого разрешения были получены с помощью монокристаллической рентгеновской кристаллографии. Белок-белковые взаимодействия и образование комплексов исследовали с помощью методов аналитической гель-фильтрации, нативного и SDS-электрофореза. Для моделирования влияния конформации каротиноидов на спектральные свойства белковых препаратов использовали методы квантовой

химии и молекулярной динамики.

Положения, выносимые на защиту:

1. Диссипация энергии электронного возбуждения пигментов фикобилисом цианобактерий определяется конформационной лабильностью белковой матрицы активного состояния каротиноидного белка. Образование комплекса необходимо для обеспечения высокой эффективности миграции энергии электронного возбуждения между системой хромофоров фикобилисомы и каротиноидом в составе оранжевого каротиноидного белка.
2. Фотовозбуждение каротиноида в составе оранжевого каротиноидного белка инициирует изменения электронно-конформационных взаимодействий между каротиноидом и белковой матрицей, вызывающие последовательность направленных конформационных изменений структуры, которые включают разрыв водородных связей между каротиноидом и остатками триптофана-288 и тирозина-201, изомеризацию каротиноида, его перемещение между структурными доменами белка и образование активной красной формы каротиноидного белка.
3. В структурах фотоактивного каротиноидного белка и регуляторного белка восстановления флуоресценции установлены элементы, необходимые для взаимодействия и образования комплекса этих белков на разных этапах фотоцикла, которые определяют эффективность переключения между фотосинтетическими реакциями и нефотохимическим тушением. Образование комплекса с белком восстановления флуоресценции приводит к увеличению вероятности самопроизвольного образования исходной оранжевой формы каротиноидного белка.
4. В результате исследования особенностей структурной организации отдельных доменов оранжевого каротиноидного белка открыт новый класс цианобактериальных каротиноидных белков, способных обеспечить

транслокацию каротиноидов между мембранами и белками для регуляции фотозащитных механизмов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается их публикацией в рецензируемых журналах международного уровня с высокими импакт-факторами. Результаты дополняют представления, полученные другими авторами. Материалы диссертационной работы были представлены на научных семинарах Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и института химии Технического Университета г. Берлин (Германия), а также на конференциях, конгрессах и симпозиумах, основными из которых являются: XXI Пушинские чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция "Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты" (Пушино, Россия, 2015); IV и V Съезды биофизиков России (Нижний Новгород, Россия, 2012; Ростов-на-Дону, Россия, 2015); XIV международный симпозиум по автотрофным прокариотам (Порту, Португалия, 2012); XV и XVII конгрессы европейского сообщества фотобиологов (Льеж, Бельгия, 2013 и Барселона, Испания, 2019); XI международная научно-методическая конференция «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия культурных растений» (Махачкала, Россия, 2014); LXIV международная конференция «NUCLEUS 2014». Fundamental Problems of Nuclear Physics, Atomic Power Engineering and Nuclear Technologies» (Минск, Беларусь, 2014); IV, V, VI, VII, VIII и X международные конференции «Photosynthesis Research for Sustainability» (Баку, Азербайджан, 2013; Пушино, Россия, 2014; Ираклион, Греция, 2015; Пушино, Россия, 2016, Хайдарабад, Индия 2017; Санкт-Петербург, Россия, 2019); Международный конгресс «International Coastal Biology Congress» (Янтай, Китай, 2014); V съезд Биохимиков России и V съезд физиологов стран СНГ (Дагомыс, Сочи, Россия, 2016); I международная научно-практическая конференция молодых ученых «Biophysics, Biophotonics, Biotechnology» (Москва, Россия, 2016); Международная конференция Biomembranes 2016 (Долгопрудный, Россия, 2016); Ломоносовские чтения МГУ

(Москва, Россия, 2014, 2018, 2021); XLII международный конгресс FEBS (Прага, Чехия, 2018).

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, постановке целей и планировании эксперимента, разработке новых методов исследования, анализе экспериментальных данных и результатов исследования, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы.

Публикации и патенты. По теме диссертации опубликовано 40 работ, в том числе 40 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научным консультантам А.Б. Рубину и В.З. Пащенко за помощь в подготовке данной работы, а также всем соавторам научных работ и коллегам за плодотворное сотрудничество, в особенности И.В. Еланской, Г.В. Цораеву, Н.Н. Случанко, Е.А. Ширшину, А.В. Степанову, Т.С. Гостеву, К.С. Миронову, И.А. Ярошевичу, Е.А. Протасовой, Д.В. Зленко, Р.Ю. Пищальникову, Е.П. Лукашеву, Е.Ю. Паршиной, Ю.Б. Слонимскому и Т. Фридриху. Работы, описанные в диссертации, были поддержаны рядом грантов и стипендий, в том числе, РФФ 21-44-00005, 18-44-04002, РФФИ 18-04-00554, 15-04-01930, 15-34-70007 и 12-04-31100, грантами Президента РФ МК-951.2018.4 и МК-5949.2015.4.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы представлен с использованием материалов обзора Случанко Н. Н., Слонимский Ю. Б., Максимов Е. Г. Особенности Белок-Белковых Взаимодействий в Механизме Фотозащиты Цианобактерий // *Успехи биологической химии*. — 2017. — Т. 57. — С. 71–118. В обзоре рассмотрены современные представления о структурной и функциональной организации пигмент-белковых и белок-белковых комплексов, участвующих в регуляции нефотохимического тушения антенных комплексов цианобактерий — фикобилисом.

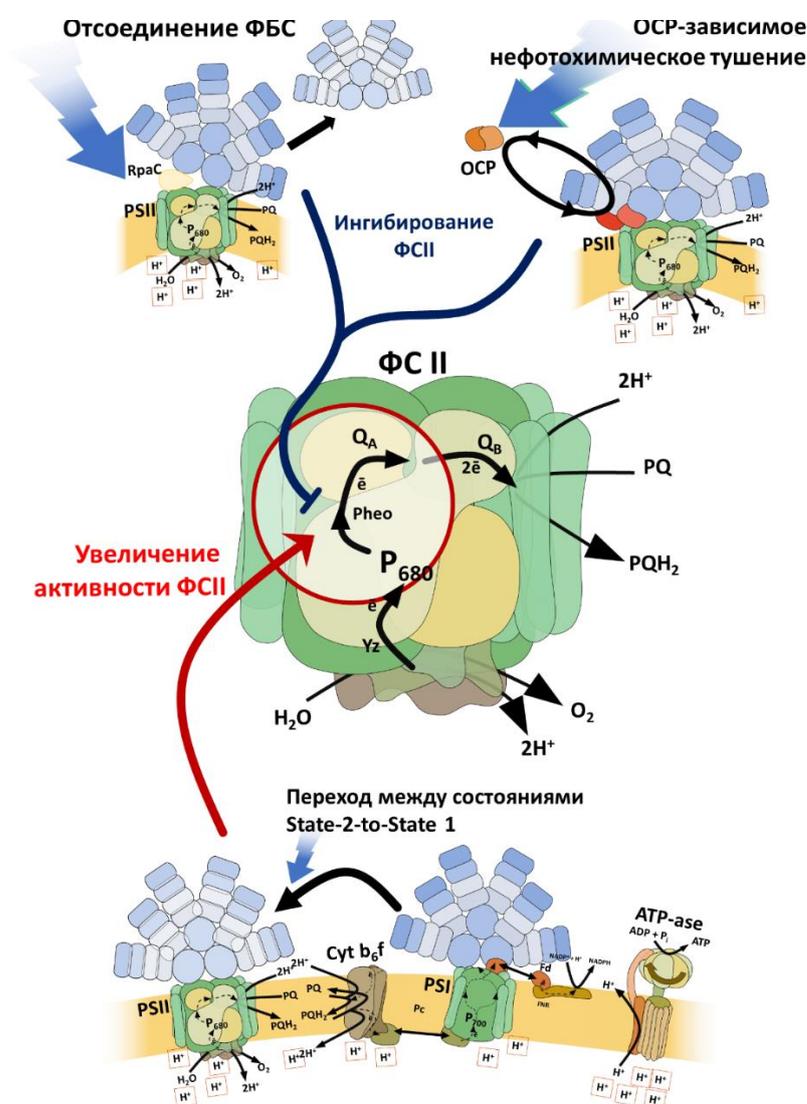


Рис. 2. Схема, показывающая основные пути изменения эффективного сечения поглощения ФС II при изменении условий освещения. Перераспределение ФБС за счет state transitions позволяет повысить выход восстановленных хнонов при умеренном уровне освещения. При избыточном уровне освещения ФБС могут отсоединяться или инактивироваться за счет регуляторных белков.

1.1 Фотосинтетические светособирающие комплексы

: «Фотосинтезу принадлежит центральная роль в энергетике живых систем, поскольку именно этот процесс служит первичным источником энергии, используемой живыми организмами. Фотосинтез представляет собой сложную совокупность реакций, происходящих за времена от 10^{-15} секунд (поглощение света) до 10^4 секунд (образование конечных продуктов фотосинтеза). Определение «первичных процессов фотосинтеза» включает фотофизические и фотохимические стадии – процессы поглощения света, миграции энергии электронного возбуждения, разделения зарядов и формирования электрохимического потенциала в реакционных центрах фотосистем. Работы последних десятилетий показали очень высокую эффективность первичных процессов фотосинтеза благодаря специфике их структурной организации [24-32].

В светособирающем, или антенном, комплексе пигменты, поглощающие свет, занимают строго определенные положения и специфически ориентированы друг относительно друга. Кроме того, благодаря взаимодействию пигментов с различными аминокислотными группами белков, в антенном комплексе присутствует большой набор различных спектральных форм, поэтому пигменты образуют широкий общий спектр поглощения [33]. В результате перекрывания спектров флуоресценции и поглощения отдельных пигментов, после поглощения кванта в антенне быстро осуществляется перераспределение электронного возбуждения, как между пигментами внутри антенны (в течение долей пикосекунд), так и между антенной и реакционным центром (сотни пикосекунд). При участии пигментов с различными спектральными характеристиками энергия направленно мигрирует к наиболее длинноволновым пигментам реакционного центра, где происходит захват энергии возбуждения и преобразование её в форму энергии разделенных зарядов [29]. Поскольку функционирование фотосинтетических пигмент-белковых комплексов сопряжено с преобразованием энергии квантов, необходима система регуляции энергетических потоков, защищающая фотосинтетический аппарат от повреждения.

1.2 Фотоповреждение и активные формы кислорода

Возбужденные состояния молекул являются реакционно активными, и многие пигменты за время жизни возбужденного состояния ($\sim 10^{-9}$ с) способны взаимодействовать с молекулярным кислородом, что приводит к образованию его активных форм (АФК) [33]. Свойства АФК, их роль в окислительных реакциях хорошо известны. Образование АФК неизбежно сопровождает фотосинтез и дыхание, однако, наряду с регуляторными функциями, АФК могут представлять собой и угрозу для живой клетки, поскольку АФК могут инициировать цепные реакции окисления липидов и белков. Для нейтрализации образующихся АФК существует ряд ферментных систем (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза и т.д.), которые способны эффективно инактивировать образующиеся свободные радикалы [14]. Фотосинтетические антенные комплексы и реакционные центры находятся в особой группе риска, поскольку через них проходит поток энергии, запасаемой в виде энергии химических связей. Более того, скорость окисления пула акцепторов электронов электрон-транспортной цепи значительно уступает скорости их восстановления [34]. Поэтому при высокой интенсивности светового потока фотосинтезирующие организмы могут оказаться в ситуации, в которой светособирающие антенные комплексы им временно не нужны. В этом случае антенные комплексы представляют угрозу для фотосинтетического аппарата и метаболизма клетки, поскольку замена поврежденных пигмент-белковых комплексов требует значительных энергетических и временных затрат. Наряду с пространственным удалением антенны от реакционного центра (так называемые *state transitions*) [35-37], могут реализоваться принципиально другие регуляторные фотозащитные механизмы. Последние позволяют временно снизить поток энергии от антенных комплексов к реакционным центрам (РЦ) фотосистем.

1.3 Нефотохимическое тушение флуоресценции

Общим принципом функционирования фотозащитных механизмов у высших растений и цианобактерий является введение в структуру антенного комплекса

особой молекулы, способной перехватывать на себя поток энергии возбуждения, осуществляя таким образом нефотохимическое тушение¹ фотосинтетических пигментов. Данный процесс снижает вероятность образования АФК, и в этом заключается принципиальное отличие фотозащитных механизмов от других антиоксидантных систем, направленных на борьбу с уже образовавшимися АФК.

Несмотря на то, что цианобактерии являются относительно простым объектом, удобным для исследований процессов фотосинтеза, механизмы электронно-конформационных взаимодействий пигмент-белковых комплексов, лежащие в основе фотозащитных реакций, а также способы их регуляции, начали изучаться менее 15 лет назад и до сих пор таят множество загадок. В данном обзоре рассмотрены современные представления о структурной и функциональной организации пигмент-белковых и белок-белковых комплексов, участвующих в регуляции нефотохимического тушения антенных комплексов цианобактерий – фикобилисом. Как и у высших растений и зеленых водорослей, у цианобактерий роль функциональной молекулы – тушителя энергии возбуждения выполняют каротиноиды, однако особенности строения водорастворимых антенных комплексов цианобактерий привели к возникновению белковой системы, обеспечивающей работу фотозащитных механизмов в цитоплазматическом пространстве.

1.4 Строение антенных комплексов цианобактерий

Фотосинтетический аппарат цианобактерий, как и многих других фотосинтетических организмов, представлен двумя взаимодействующими между собой фотосистемами (ФС1 и ФС2). Светосбор осуществляется коровыми (прим. – от англ. core) антеннами реакционных центров (РЦ), содержащими хлорофилл [38]. У цианобактерий дополнительными светосборщиками являются фикобилисомы

¹ Данный термин может применяться для описания любых процессов диссипации энергии, противоположных фотохимическому т.е. приводящему к запасанию энергии возбуждения в виде разделенных зарядов или восстановленных эквивалентов. Тем не менее, в среде физиологов растений нефотохимическое тушение часто и незаслуженно отождествляется лишь с тушением флуоресценции хлорофилла каротиноидами ксантофилового цикла вследствие тепловой диссипации энергии.

(ФБС) – мультибелковые комплексы, расположенные на поверхности тилакоидной мембраны и примыкающие к ФС1 и ФС2 [39-41]. ФБС состоят из содержащих хромофоры фикобилипротеинов и неокрашенных линкерных полипептидов [42, 43]. Молекулы фикобилипротеинов обычно содержат два вида субъединиц (α и β), каждая из которых ковалентно связана с фикобилиновым хромофором, представляющим собой линейный тетрапиррол [42]. Для цианобактерии *Synechocystis* sp. штамм PCC6803 (далее *Synechocystis* 6803) характерны ФБС полудисковидной формы, основными фикобилипротеиновыми компонентами которой служат С-фикоцианин и аллофикоцианин [39-42, 44]. Ядро ФБС, примыкающее к стромальной поверхности тилакоидной мембраны, расположено в центре полудиска и представлено в виде трех цилиндров, состоящих из состыкованных друг с другом тримеров аллофикоцианина (рис. 1). Связь ФБС с фотосинтетической мембраной обеспечивается линкерным полипептидом L_{CM} (CM обозначает “core-membrane junction”), который состоит из нескольких доменов и участвует также в сборке ядра ФБС [43, 45]. От ядра в радиальном направлении отходят шесть боковых цилиндров, каждый из которых состоит из гексамеров фикоцианина. Энергия света, поглощенного фикобилинами, передается на хлорофилл РЦ ФС1 и ФС2, что позволяет увеличить эффективность фотосинтеза за счет использования света в спектральной области, где поглощение хлорофилла неэффективно [38, 40, 41, 46, 47].

Молекулы фикобилипротеинов состоят из α и β субъединиц в соотношении 1:1 с молекулярными массами около 16 и 18 кДа, соответственно [48-50]. Фикобилипротеины относят к кислым белкам с изоэлектрической точкой в области 4.25–4.85 ед. рН. Между двумя субъединицами отсутствуют дисульфидные связи, а присутствующие в α и β субъединицах остатки цистеинов участвуют в ковалентном связывании хромофорных групп – фикобилинов с помощью тиоэфирных связей [51, 52]. В связывании хромофоров с апопротеином участвуют остатки Cys-84 и Cys-84 в α и β -субъединицах, соответственно [38]. Дополнительные хромофорные группы могут быть присоединены к α или β

субъединице около 50-го и 150-го аминокислотных остатков. Число хромофоров в $(\alpha\beta)_1$ -мономере соответствует разделению фикобилипротеинов на классы, так, например, $(\alpha\beta)_1$ -мономер аллофикоцианина содержит два хромофора. Фикобилины относятся к незамкнутым, или линейным тетрапирролам, в основе химического строения которых лежат четыре пиррольных кольца, соединенных тремя моноуглеродными мостиками (рис. 1А).

Для фикобилипротеинов характерна выраженная способность к самоассоциации [53]. В неденатурирующих условиях в растворах не удастся получить отделенные друг от друга α и β субъединицы фикобилипротеинов, образующих даже в крайне низкой концентрации ($\sim 10^{-7}$ М) $(\alpha\beta)$ -гетеродимеры, которые принято (хотя и менее корректно) называть $(\alpha\beta)_1$ -мономерами. Поверхность $(\alpha\beta)_1$ -мономеров гидрофобна, что обеспечивает их высокую стабильность только при низкой ионной силе [54]. Самопроизвольная олигомеризация сильно зависит от концентрации белка, и уже при 10^{-6} М в растворах преобладают $(\alpha\beta)_3$ -тримеры и $(\alpha\beta)_6$ -гексамеры фикобилипротеинов.

Согласно рентгеноструктурным данным, α - и β -полипептидные субъединицы содержат по две шпильки и восемь α -спиральных участков [39, 48, 55]. Хромофорные группы располагаются в промежутках (карманах) между α -спиралями. Две α -спирали и две шпильки каждой субъединицы образуют взаимодействующие домены, за счет которых происходит образование $(\alpha\beta)_1$ -мономеров. В свою очередь мономеры, которые имеют пространственную форму дуг, образуют гидрофобный контакт между α -субъединицей одного мономера и β -полипептидом следующего, замыкаясь в кольцеобразный тример. Все тримеры, независимо от типа фикобилипротеинов, имеют форму плоских дисков диаметром 11,5 и толщиной 3 нм с отверстием треугольной формы, находящимся в центре диска и также равным 3 нм [31, 35] (см. рис 1).

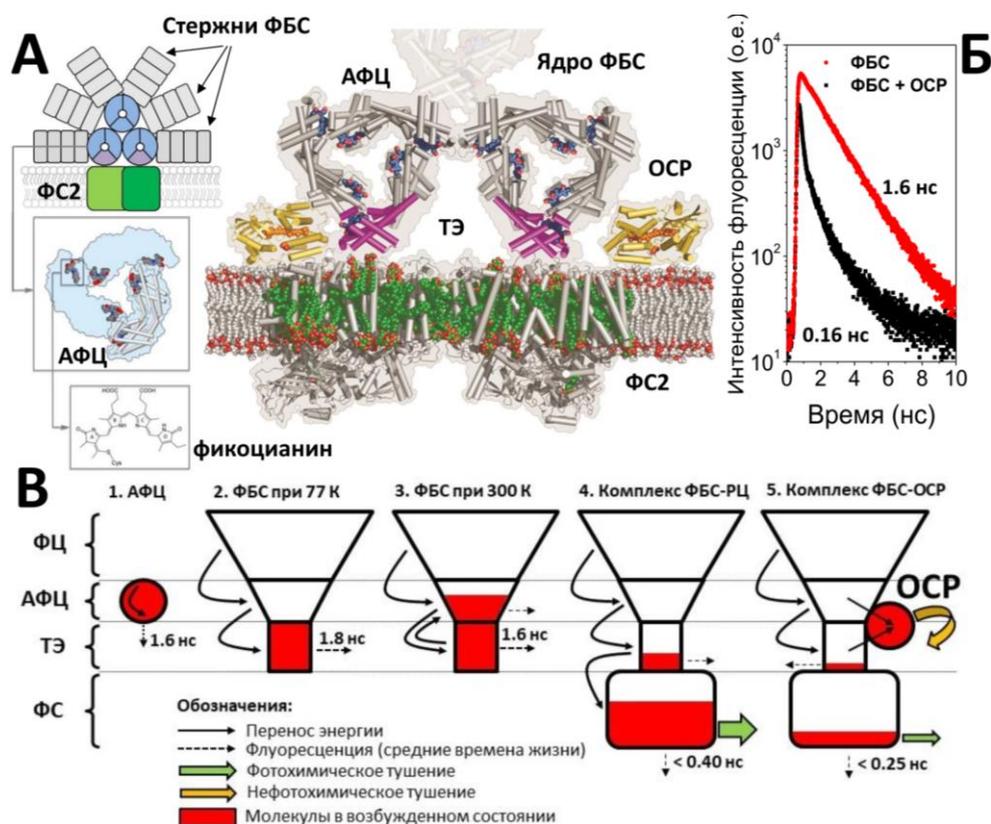


Рис. 3. А – Схематичное представление участка фотосинтетической мембраны цианобактерий, содержащего димер фотосистемы 2 (ФС2, оттенки зеленого цвета) с контактирующей фикобилисомой (стержни из фикоцианина показаны серым, компоненты цилиндров ядра – синим и пурпурным цветом). Вставки показывают строение одного из базовых цилиндров ядра и связанных хромофоров. Справа от схемы приведен «срез» ФБС на уровне расположения терминальных эмиттеров (ТЭ), хлорофиллы ФС2 показаны зеленым цветом, ОСР – желтым и оранжевым, LCM – фиолетовым. Модель носит иллюстративный характер и построена на основе кристаллографических структур ОСР, АФЦ и ФС2 (PDB 1M98, 1ALL и 3KZI, соответственно). Б – характерный для экспериментов *in vivo* (для мутантов, лишенных ФС1 и 2) и *in vitro* вид кинетик затухания флуоресценции ФБС до и после активации ОСР-зависимого нефотохимического тушения. Указаны времена жизни флуоресценции основных компонент кинетики. В – локализация энергии возбуждения в системе ФБС-РЦ-ОСР согласно модели «энергетической воронки». 1. Изолированные фикобилипротеины характеризуются временами жизни возбужденного состояния порядка 1.6 нс. 2-3. В комплексе из нескольких спектральных форм фикобилипротеинов наблюдается перенос энергии возбуждения от коротковолновых форм к длинноволновым. Малый энергетический зазор между электронными уровнями АФЦ и ТЭ приводит к тому, что при физиологических температурах происходит обратный (uphill) перенос энергии. В ядре ФБС количество ТЭ на порядок меньше, чем АФЦ. При высоких температурах именно АФЦ вносит основной вклад во флуоресценцию ФБС, в то время как при низких температурах флуоресцируют ТЭ. 4. Когда ФБС связана с ФС, осуществляющей разделение зарядов (фотохимическое тушение), энергия электронного возбуждения ФБС эффективно передается на хлорофиллы фотосистем. При увеличении интенсивности светового потока происходит быстрое восстановление акцепторов электрона доступных РЦ фотосистем и, соответственно, снижение эффективности фотохимического тушения. Одновременно происходит активация ОСР и его связывание с сайтом в ядре ФБС, в результате чего появляется дополнительный канал дезактивации возбуждения.

Особое место среди фикобилипротеинов занимают аллофикоцианины (АФЦ), поскольку их структура и фотофизические свойства обеспечивают эффективный захват энергии возбуждения от коротковолновых форм фикобилипротеинов – фикоцианина (ФЦ) и фикоэритрина и передают энергию возбуждения так называемым терминальным эмиттерам (ТЭ) и хлорофиллам реакционных центров (см. рис. 1). В ряде работ авторы отмечают сложную структуру спектров поглощения тримеров АФЦ [49, 56], а также зависимость формы спектров от температуры [54]. Основной максимум в спектре поглощения (650 нм) связывают с образованием тримеров и взаимодействием хромофоров, находящихся в соседних $(\alpha\beta)_1$ -мономерах. При повышении температуры до 45 °С взаимодействие между хромофорами нарушается, при этом в спектрах поглощения увеличивается вклад компоненты с максимумом 610 нм, что соответствует поглощению мономеров. АФЦ, как и другие фикобилипротеины, относится к классу водорастворимых белков, и важнейшим фактором, влияющим на свойства АФЦ, являются сложные взаимодействия в системе хромофор–белок–вода. Изменение температуры является важнейшим фактором, влияющим на энергию взаимодействия в таких системах [57-59].

Вышеперечисленные особенности структурной организации ФБС и фикобилипротеинов необходимо учитывать при проведении экспериментов. Например, при низких температурах образование кристаллов льда внутри полости тримера может приводить к нарушению его структуры, сопоставимому с мономеризацией, что сопровождается снижением квантового выхода флуоресценции и искажениями спектра, не связанными с изменением эффективности миграции энергии или другими физиологически-значимыми процессами [57-59]. Поэтому для правильной интерпретации и анализа низкотемпературных спектров флуоресценции ФБС *in vitro* или клеток цианобактерий необходима правильная постановка эксперимента: оптимизация скорости замораживания, добавление криопротектора, использование время-разрешенных методов для оценки времен жизни и адекватная нормировка

интенсивности сигнала флуоресценции. Следует отметить, что комплексы ФБС *in vitro* могут распадаться на отдельные структурные элементы (стержни и ядра – см. рис. 1А), например, при использовании глицерина в качестве криопротектора [60]. Нарушение целостности ФБС приводит к росту квантового выхода ФЦ, и, соответственно, снижению контраста изменений интенсивности флуоресценции при изучении нефотохимического тушения. Именно поэтому в некоторых работах исследователи используют ядра ФБС как упрощенный и более стабильный модельный объект.

1.5 Открытие нефотохимического тушения флуоресценции у цианобактерий

Полностью секвенированный геном и способность к гетеротрофному росту сделали одноклеточную цианобактерию *Synechocystis* sp. PCC6803 удобным объектом для исследования фотосинтеза и, в частности, регуляции процессов светосбора и тепловой диссипации энергии в пигмент-белковых комплексах ФБС [32]. Поскольку *in vitro* эксперименты с ФБС связаны с рядом методических ограничений, получение мутантов *Synechocystis* 6803, лишенных одного или нескольких компонентов фотосинтетического аппарата, позволило исследовать многие функции и особенности ФБС *in vivo*. Например, интересные данные были получены с помощью мутантов СК и PAL [61]. В ФБС мутанта СК, в результате делеции четырех генов, отсутствуют α - и β -субъединицы фикоцианина и два линкерных полипептида. У мутанта PAL в результате введения дополнительных делеций в гены, кодирующие субъединицы АФЦ, полностью утрачена фикобилипротеиновая антенна, что подтверждено данными иммунологического анализа и флуоресцентной спектроскопии [62]. Сравнение скорости восстановления первичного хинонного акцептора электрона в ФС2 позволило установить, что ядро ФБС увеличивает эффективное сечение поглощения ФС2 в 2,5 раза, а наличие в ФБС дополнительных цилиндров из ФЦ (т. н. стержней) увеличивает эффективность светосбора ФС2 на порядок [38, 41, 55, 61]. Однако, установление зависимости скорости восстановления хинонных акцепторов от

размера ФБС требует значительно большего количества экспериментальных точек и, соответственно, альтернативного подхода.

Идея о том, что цианобактерии так же, как и хлоропласты высших растений, способны к тепловой диссипации поглощенной энергии света, существовала давно. В частности, при изучении адаптации цианобактерий к желтому свету в 1986 году было показано, что в таких условиях наблюдается диссипация около 35 % энергии, поглощенной ФБС [63]. Однако, конкретный механизм и спектр активации этого процесса были впервые выявлены лишь спустя 20 лет.

При изучении состояния фотосинтетической ЭТЦ (state transitions) и влияния на неё текучести мембран был обнаружен процесс безызлучательной (тепловой) диссипации энергии. При воздействии интенсивным синим светом исследователи наблюдали обратимый, независимый от температуры, ингибиторов белкового синтеза и блокаторов восстановления убихинона процесс тепловой диссипации энергии [64]. Следовательно, этот процесс не был обусловлен повреждением компонентов ФС2 (поскольку был обратим даже в присутствии ингибиторов трансляции) или изменением состояния ЭТЦ (окисление пула убихинолов не влияло на процесс). Однако природа и механизм этого процесса оставались совершенно непонятными.

Следует отметить, что сильное перекрытие спектров флуоресценции хлорофилла фотосистем и ФБС (при комнатной температуре), а также наличие переходных процессов, связанных с изменением квантового выхода флуоресценции хлорофилла ФС2, затрудняют оценку влияния различных экспериментальных факторов на состояние ФБС с помощью прямого детектирования флуоресценции этих ПБК [61]. Поэтому важным этапом для изучения процессов регуляции тепловой диссипации энергии в ФБС стало создание мутантов, лишенных фотосистем. Использование мутанта *Synechocystis*, лишенного ФС2, позволило М.Г. Рахимбердиевой с соавторами из лаборатории Н.В. Карапетяна в институте биохимии им. А.Н. Баха и кафедры генетики биологического факультета МГУ, провести детальный анализ спектра действия

(активации) тепловой диссипации энергии [65, 66]. Было впервые показано, что интенсивный сине-зеленый свет вызывал обратимое 40 % тушение флуоресценции ФБС, а форма спектра действия соответствует характерным S_0 - S_2 переходам в спектре поглощения каротиноидов. Полученные данные свидетельствовали о существовании некой неизвестной формы каротиноида, взаимодействующей с водорастворимыми ФБС, и, соответственно, эта форма также должна была быть водорастворимой, что, однако, не соответствует известным физико-химическим свойствам каротиноидов и предполагает наличие белкового комплекса.

Несмотря на то, что водорастворимый каротиноидный белок, с неизвестной физиологической активностью, был открыт и охарактеризован задолго до экспериментов Рахимбердиевой с соавт., потребовалось еще несколько лет для выявления функции оранжевого каротиноид-связывающего белка (ОСР – от англ. Orange Carotenoid Protein). Этот шаг был сделан в работе группы Дианы Кириловски с соавт. [67], которая показала, что инактивация гена *slr1963*, кодирующего белок ОСР в *Synechocystis* sp. PCC6803, приводит к полному исчезновению тушения флуоресценции ФБС в клетках цианобактерий на интенсивном сине-зеленом свете. Результаты этих экспериментов, безусловно, явились прорывом в понимании регуляции фотозащитных механизмов в клетках цианобактерий.

В дальнейших работах группы Дианы Кириловски наличие или отсутствие тушения флуоресценции ФБС *in vivo* стало ключевым критерием оценки эффективности белок-белкового взаимодействия между ОСР и участком ФБС [68-70]. Однако отсутствие понимания механизма действия ОСР в итоге привело к тому, что результаты этих экспериментов в данный момент требуют серьезного переосмысления (см. следующие разделы обзора).

Еще в ранних работах отмечалось, что адаптация клеток цианобактерий к сине-зеленому свету высокой интенсивности приводит не только к снижению интенсивности флуоресценции ФБС, но также и изменению формы спектра флуоресценции. После активации механизма диссипации энергии интенсивность

флуоресценции в области 660-680 нм становится значительно ниже, что было интерпретировано как взаимодействие тушителя с неким сайтом, находящемся именно в ядре ФБС [71]. Эту идею (точнее, невозможность и неэффективность взаимодействия ОСР с фикоцианиновыми стержнями) поддержали все группы исследователей, что позволило сузить область поиска сайта белок-белкового взаимодействия ОСР и ФБС до ядра ФБС, состоящего из АФЦ и терминальных эмиттеров.

Снижение интенсивности флуоресценции АФЦ связано с высокоэффективным переносом энергии возбуждения от коротковолновых форм белков (ФЦ) к длинноволновым (ТЭ). Для изучения этих процессов были проведены исследования с помощью спектрофлуориметрии высокого временного разрешения и теоретические расчёты [72-77]. Активация ОСР-зависимого тушения в отсутствие фотосистем *in vivo*, а также в экспериментах *in vitro*, приводит к снижению интенсивности флуоресценции ФБС и сокращению ее длительности примерно на 90 %. Это свидетельствует о том, что ОСР-зависимое тушение флуоресценции обусловлено захватом энергии возбуждения ФБС молекулой тушителя (каротиноидом). Время жизни возбужденного состояния каротиноида (S_2) в органических средах или в составе ОСР не превышает 5 пс [73, 78-80], что на 2 порядка меньше характерного времени жизни возбужденного состояния фикобилипротеинов (~1.6 нс). Таким образом, перенос энергии возбуждения с хромофоров ФБС на ОСР приводит к исчезновению возбужденного состояния за счет тепловой диссипации, а скорость переноса энергии определяет эффективность тушения флуоресценции. Важно отметить, что, согласно данным [78, 80], и исходная, и фотоактивированная формы ОСР обладают практически одинаковыми временами жизни возбужденного состояния, следовательно, даже физиологически неактивная ОСР⁰ потенциально является прекрасным тушителем возбуждения. Это подчеркивает роль неизвестных пока белок-белковых взаимодействий между ОСР и ФБС как необходимого условия для активации фотозащитных механизмов, при этом триггером этих взаимодействий, в свою очередь, является изменение

белок-хромофорных взаимодействий в молекуле ОСР, которые на данный момент изучены недостаточно подробно (см. ниже).

Как отмечалось выше, энергетическое взаимодействие ОСР и ФБС можно рассматривать в рамках теории Фёрстера. Однако оценка расстояния между донором и акцептором энергии, основанный на изменениях квантового выхода донора, является нетривиальной задачей, поскольку у каротиноидов в спектрах поглощения детектируется лишь переход S_0-S_2 , а переход S_0-S_1 запрещен по правилам симметрии, поэтому о положении S_1 невозможно судить по стационарным спектрам поглощения ОСР. Однако роль состояния S_1 , как акцептирующего энергию, активно обсуждается в литературе несмотря на отсутствие дипольного момента перехода между S_1 и S_0 . Вероятно, что это связано с достижениями в исследовании фотозащитных механизмов у высших растений. Предполагается, что переход виоласкантина в зеаксантин, сопровождающийся снижением энергии уровня S_1 обуславливает переключение потока энергии от хлорофиллов к каротиноидам. Однако, в последнее время этот механизм стал подвергаться критике.

Исследования ОСР с помощью фемтосекундной абсорбционной спектроскопии позволили обнаружить уровень S_1 в районе 714 нм (1.74 эВ) [81]. В то же время уровень S_1 терминальных эмиттеров соответствует энергии ~ 1.81 эВ (685 нм), что значительно выше уровня S_2 каротиноида в $ОСР^R$ (510 нм, 2.43 эВ). Таким образом, спектр флуоресценции фикобилисомы намного лучше перекрывается с поглощением S_0-S_1 , чем S_0-S_2 ОСР, но может ли уровень S_1 почувствовать в захвате энергии возбуждения фикобилиновых пигментов остается предметом дискуссий. Опираясь на экспериментальные данные об эффективности тушения флуоресценции ФБС при взаимодействии с ОСР [75, 77] и имеющиеся модели комплексов ОСР-ФБС [82-85], теоретически можно решить обратную задачу и оценить величину интеграла перекрывания спектра поглощения ОСР и флуоресценции ядра фикобилисомы. Расчеты показывают, что наблюдаемые в эксперименте эффективности миграции энергии не могут быть достигнуты, если

осуществляется перенос исключительно на уровень S_2 каротиноида с произвольной ориентацией дипольных моментов донора и акцептора энергии. Это обусловлено малой величиной интеграла перекрывания спектра флуоресценции ядра ФБС и поглощения каротиноида S_0 - S_2 . Квантово-механические расчеты позволяют теоретически оценить вклад энергетического взаимодействия между возбужденным состоянием ФБС и электронными уровнями ОСР, а также рассчитать соответствующие константы скоростей миграции энергии [76]. Однако, к сожалению, большинство таких моделей не опираются на экспериментальные данные.

При интерпретации экспериментальных данных следует учитывать сильное перекрывание спектров поглощения и флуоресценции АФЦ и терминальных эмиттеров, которое приводит к тому, что при комнатной температуре наблюдается обратный (uphill) перенос энергии возбуждения от терминальных эмиттеров к АФЦ [74, 75]. Следует отметить, что оценка влияния ОСР-зависимого тушения флуоресценции ФБС на процессы переноса энергии внутри ФБС с помощью спектрофлуориметрии с пикосекундным временным разрешением и последующим глобальным анализом данных мало информативна, поскольку сокращение времени жизни флуоресценции терминальных эмиттеров, рассматриваемых в роли акцепторов энергии возбуждения в модели, влияет на форму фронта нарастания флуоресценции и, соответственно, на кажущиеся константы скорости переноса энергии [77], что по сути делает сравнение некорректным. Вероятно, образование комплекса ОСР с ФБС не влияет на скорость миграции энергии между различными спектральными формами ФЦ, при плотностях потоков возбуждающего света, исключающих одновременное возбуждение нескольких пигментов. Наблюдаемые в нормальных условиях эффекты (снижение длительности флуоресценции всех форм) говорят об эффективной разгрузке возбужденного состояния хромофоров в ядре ФБС, расположенных наиболее близко к месту контакта ОСР и ФБС, соответственно, сокращение длительности флуоресценции хромофоров вдали от ядра обусловлено снижением вероятности обратного переноса энергии и вклада

флуоресценции длинноволновых форм.

К сожалению, сложность измерения и интерпретации данных о временах жизни флуоресценции (как и в случае с множеством других объектов) привели к тому, что данные о наличии или отсутствии тушения ФБС *in vivo* на ряде интересных мутантов ОСР были получены с помощью методов стационарной спектроскопии [68, 70, 86]. Поэтому вопрос о способности к тушению различных спектральных форм мутантов ОСР остается открытым. Однако достоверным, судя по всему, является утверждение, что сайт взаимодействия ОСР с ФБС находится в N домене ОСР, поскольку в отсутствие C домена N-концевой фрагмент ОСР, получивший название RCP (от англ. Red Carotenoid Protein) [87], способен эффективно тушить флуоресценцию ФБС [88]. Таким образом, считается, что после активации ОСР взаимодействует с ядром ФБС [89] при помощи N домена [88, 90]. Это согласуется также с данными о том, что аминокислотный остаток N домена R155, образующий солевой мостик с E244 C домена, необходим для взаимодействия с ФБС. Замена R155L или R155E препятствовала тушению флуоресценции ФБС при фотоактивации ОСР, тогда как замена E244L не приводила к таким последствиям [90]. Любопытно, что близкая замена R155K не препятствовала тушению флуоресценции ФБС, но существенно дестабилизировала взаимодействие ОСР^R с ФБС, приводя к быстрому восстановлению флуоресценции ФБ после прекращения фотоактивации [90]. В то же время, стоит отметить, что остаток R155 не является консервативным у ОСР и может быть заменен, например, на остаток глутамина, что может объяснить менее стабильную связь между доменами у таких вариантов ОСР и большую скорость их фотоактивации *in vitro* [91].

Несмотря на высокую значимость описанных открытий, многие аспекты механизма тушения флуоресценции ФБС под действием ОСР являются непонятными до сих пор и требуют дальнейших исследований как на уровне всей системы в целом, так и на уровне отдельных ее участников.

1.6 ОСР – сенсор и эффектор нефотохимического тушения флуоресценции фикобилисом

Если сам факт участия ОСР в фотозащите ФБС на данный момент неопровержимо доказан и не вызывает сомнений, то конкретный механизм фотоактивации ОСР и его белок-белковых взаимодействий с ФБС до сих пор является объектом научных дискуссий. Поразительно, но тот факт, что ОСР является фотоактивным белком и под действием света может переходить из оранжевой (OSR^O) в красную форму (OSR^R), был установлен только через несколько лет после установления его структуры, функции и многих физико-химических свойств [68, 92], практически спустя 27 лет после его открытия и первого описания в 1981 году [87]. Хотя о существовании различных спектральных форм ОСР стало известно при первом же его выделении из клеток, по неизвестным причинам влияние света на спектральные характеристики ОСР не проверялось до 2008 года.

Безусловно, установление атомарной структуры ОСР методом рентгеноструктурного анализа [20, 93] стало важнейшим событием для исследования фотозащитных механизмов цианобактерий. Оказалось, что ОСР представляет собой водорастворимый двухдоменный белок (35 кДа), во внутренней полости которого расположена молекула асимметричного кето-каротиноида (3-гидроксиэхиненона). Структура N домена этого белка уникальна для ОСР, тогда как C домен относится к суперсемейству так называемых NTF2-подобных белков (от англ. nuclear transport factor 2). Два домена соединены протяженным линкером, образуют обширный междоменный интерфейс и дополнительно стабилизированы взаимодействием короткой N-концевой α -спирали (NTE) с C доменом (рис. 2).

Несмотря на обилие экспериментальных данных, полученных к настоящему времени, полная последовательность конформационных превращений при фотоактивации ОСР неизвестна. Обычно, рассуждая о физиологической роли ОСР, выделяют две стадии фотоцикла – (1) стабильная оранжевая форма, OSR^O , не

вызывающая тушения ФБС, и (2) красная активированная (или сигнальная) форма, ОСР^R, взаимодействие с которой приводит к тушению флуоресценции ФБС [68, 94, 95]. Поскольку эти две формы отличаются по спектрам поглощения и визуально, по цвету образца (рис. 2), в научной литературе красный цвет препарата ОСР стал отождествляться с активным состоянием, и наоборот. Однако это допущение ошибочно, поскольку цвет (поглощение) препарата ОСР зависит от длины сопряжения π -системы в полиеновой цепи каротиноида. Пространственное расположение сопряженных двойных связей определяют белок-хромофорные взаимодействия, а возможность взаимодействия с ФБС и тушения флуоресценции диктуют белок-белковые взаимодействия между ядром ФБС и ОСР. Иначе говоря, потенциально могут существовать красные формы ОСР, не вызывающие тушения флуоресценции ФБС (возможно, из-за нарушенного взаимодействия с ФБС), и оранжевые формы, способные к тушению [70, 86, 90]. Более того, вероятно, возможно существование комплекса белкового матрикса ОСР с другими каротиноидами, которые вероятно тоже могут осуществлять тушение флуоресценции ФБС. Иначе говоря, не доказана уникальность 3'-гидрокси эхиненона как акцептора энергии электронного возбуждения.

Как отмечалось выше, спектральные характеристики каротиноида принципиально не влияют на его способность к безызлучательной диссипации энергии возбуждения, поскольку длительность возбужденного состояния не превышает нескольких пикосекунд. Для индукции тушения флуоресценции ФБС необходимо сближение ОСР и сайта в ядре ФБС, то есть образование комплекса, которое возможно благодаря специфическим белок-белковым взаимодействиям. Все существующие модели комплекса ОСР-ФБС показывают, что минимальное расстояние между хромофорами составляет не менее 24 Å, что исключает возможность переноса энергии по механизму Декстера и делает малоэффективным захват возбуждения за счет диполь-дипольных взаимодействий [96].

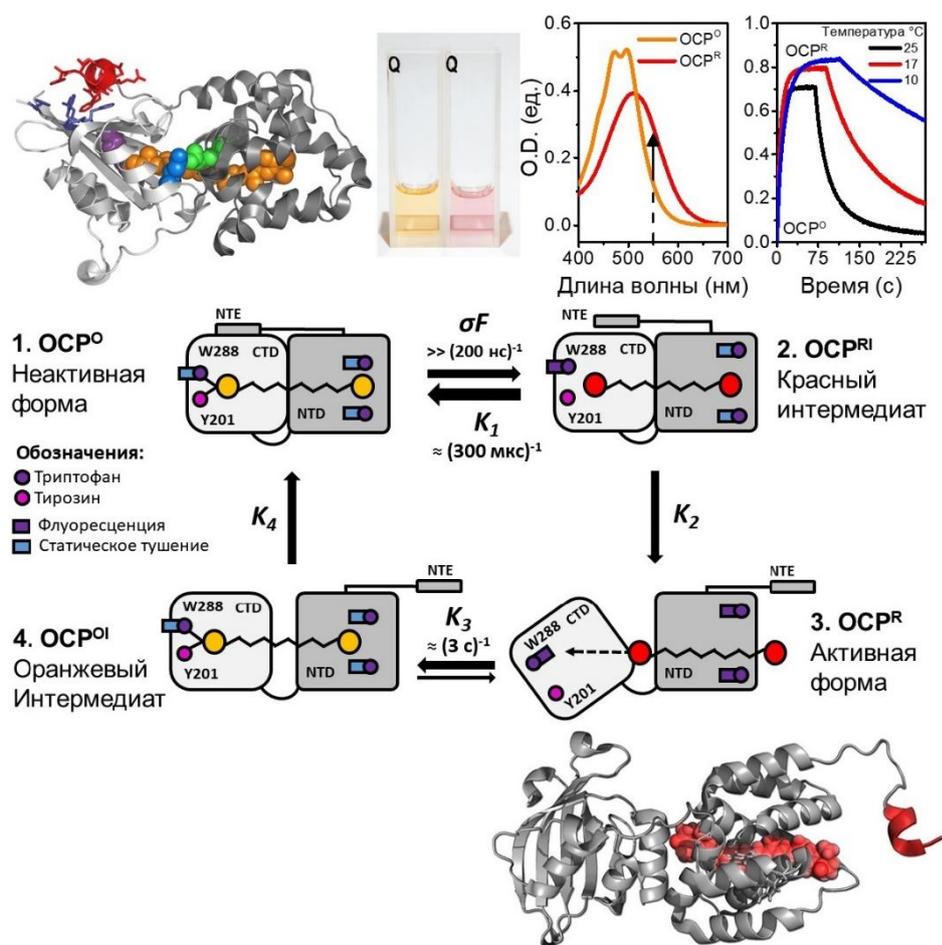


Рис. 3. Фотоциклические превращения OCP. Сверху слева направо – кристаллическая структура оранжевой формы OCP (PDB 3MG1): каротиноид показан оранжевым, NTE красным, остаток W288 – фиолетовым цветом; фотография кювет с растворами OCP до и после фотоактивации; спектры поглощения OCP до и после фотоактивации, стрелкой показано направление изменений оптической плотности при 550 нм; кинетики изменения поглощения OCP при адаптации к синему свету высокой интенсивности и после выключения света при различных температурах. В центре: схематичное представление четырех основных стадии фотоцикла OCP (см. пояснение в тексте). Снизу приведена модель красной активной формы OCP, полученная на основе структуры RCP и OCP (структуры 4XB4 и 3MG1, соответственно) и структуры OCP^R низкого разрешения, полученной на основе данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей [97].

В литературе известны мутанты OCP, которые лишены способности к фотоконверсии, но, тем не менее, у ряда таких мутантов (Y44S, E34A, R126V/Y129F) наблюдается способность вызывать тушение флуоресценции ФБС [70, 86, 90]. С другой стороны, представления о фотоцикле OCP как о двухстадийном процессе крайне упрощены, поскольку дезактивация

возбужденных состояний каротиноида происходит за десятки пикосекунд, а активная красная форма появляется лишь через 100 мс, что обусловлено сложной последовательностью значительных (и относительно медленных) конформационных изменений структуры белковой матрицы. [98-101]. Таким образом, должны существовать промежуточные стадии фотоцикла – интермедиаты, которые спектрально соответствует красной (и активной) форме ОСР, но по структуре белковой матрицы является аналогом оранжевой формы. Хотим отметить, что прямое экспериментальное доказательство этой гипотезы было получено в результате выполнения данной работы.

Сложная иерархия времен фотоцикла ОСР обусловлена двумя требованиями к фотоактивной конструкции: (1) необходимостью обеспечить стабильность неактивной формы ОСР, достаточную для того, чтобы белок не переходил в активную форму при нормальных (для фотосинтеза) уровнях инсоляции и (2) время жизни активной формы должно быть достаточным для того, чтобы найти и связаться с сайтом на ядре ФБС до того, как ОСР самопроизвольно перейдет в неактивную форму. По некоторым оценкам, квантовый выход образования активной формы не превышает $\sim 0.2\%$ [72, 92, 102]. Очевидно, стабильность оранжевой формы и время жизни активной красной важны для поддержания правильного баланса между фотосинтетическими и фотозащитными процессами и, соответственно, энергетического состояния клетки. Именно этот баланс обеспечивает возможность цианобактерий адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды.

Таблица 1. Список известных мутантов ОСР.

Название / Замена	Цвет препарата, тип каротиноида	Фото-активность	Тушение ФБС	Ссылка
W110S	Оранжевый Красный	низкая	- (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2008 Wilson, 2011
W110F	Оранжевый	средняя	+ (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2010
W288H	Оранжевый, ZEA	-	- (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2011
W288F	Красный, ECN	-	???	Bandara, 2017
W288S	Оранжевый, ZEA	-	- (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2011
Y201S	Оранжевый ECN/ β -Car	-	- (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2011
Y201H	Оранжевый, β -Car	очень низкая	- (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2011
Y44F/ W110F	???		+ (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2011
Y44F	???		???	Bandara, 2017
Y201F	???		+ (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2011
Y201F	Оранжевый, β -Car/ECN	+ (ECN)		Bandara, 2017
Y44S	Оранжевый Оранжевый???	- - -	- (<i>in vivo</i>) + (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2010 Wilson, 2011 Bandara, 2017
R155L	Оранжевый	высокая	- (<i>in vivo</i>)	Wilson, 2010
R155K	Оранжевый	высокая	+ (<i>in vitro</i>)	Wilson, 2012
R155E	Оранжевый Красный	высокая	- (<i>in vitro</i>) + (<i>in vitro</i>)	Wilson, 2012
E244L	Оранжевый	высокая	+ (<i>in vitro</i>)	Wilson, 2012
20-165 ОСР	Пурпурный (RCP) CAN	-	+ (<i>in vitro</i>)	Leverenz, 2015
C84A	Оранжевый (CAN)	+	+ (~ 40 % <i>in vitro</i>)	Leverenz, 2015
E34A	Оранжевый (ECN)	низкая	+ (~ 40 % <i>in vitro</i>)	Leverenz, 2015
P126V	Оранжевый (CAN)	средняя	+ (~ 40 % <i>in vitro</i>)	Leverenz, 2015
Y129F	Оранжевый (CAN)	средняя	- (~ 10 % <i>in vitro</i>)	Leverenz, 2015
P126V/ Y129F	Оранжевый (CAN) Оранжевый (ECN)	очень низкая -	- (~ 10 % <i>in vitro</i>) - (~ 10 % <i>in vitro</i>)	Leverenz, 2015
D6L	Оранжевый	+	+ (<i>in vitro</i>)	Thurotte, 2015
P22V	Оранжевый	+	+ (~ 50 % <i>in vitro</i>)	Thurotte, 2015
Δ2-15/20 ΔNTE	Оранжевый Пурпурный	+ -	+ (<i>in vitro</i>)	Thurotte, 2015 Sluchanko, 2017
W288A	Пурпурный (80 %) Оранжевый (20 %)	- +	+ +	Maksimov, 2016
Y201W	Оранжевый (67 %) Пурпурный (33%)	+ -	+ +	Yaroshevich, 2021
Y201A/ W288A	Пурпурный (100%)	-	+	Yaroshevich, 2021
165-317 СОСР	Фиолетовый (CAN)	-	-	Moldenhauer, 2017
165-317 СОСР	Пурпурный (CAN)	-	-	Moldenhauer, 2017

С помощью ряда методов было убедительно показано, что фотоактивация ОСР сопровождается декомпактизацией молекулы белка [97, 103, 104] и перемещением молекулы каротиноида в N домен [105, 106] (рис. 2). Вероятно, именно такие структурные изменения необходимы для стабилизации активного сигнального состояния ОСР, в котором он способен связываться с ФБС и вызывать тушение флуоресценции. По имеющейся на данный момент информации из разных лабораторий, последовательность событий, приводящих к образованию активной формы ОСР, можно выстроить следующим образом.

При поглощении кванта света молекулой каротиноида происходит её переход в возбужденное состояние. Поглощённой энергии кванта достаточно для фотоизомеризации (поворот β -иононового кольца в С домене ОСР) и выпрямления полиеновой цепи [92, 107, 108], однако механизм этой реакции не установлен. При повороте β -иононового кольца в С домене, вероятно, нарушаются водородные связи между кето-группой в кольце и остатками тирозина-201 и триптофана-288 [92, 108]. Данные аминокислотные остатки являются консервативными, вероятно, наличие водородных связей является необходимым для стабилизации оранжевой формы ОСР [103, 104]. Однако, каким образом происходит разрыв этих водородных связей остается объектом научных дискуссий.

Сопоставление структур ОСР и РСР показывает, что основные различия в этих белках, соответствующих стабильной оранжевой форме и N домену красной активной формы ОСР, показывает, что наибольшие изменения структуры наблюдаются в области между NTE и близлежащими α -спиралями [97, 105, 108, 109]. Изменение расстояния между α -спиралями в N домене, вероятно, приводит к ослаблению стэкинг взаимодействий между консервативными остатками триптофана-101 и 41 и кольцом молекулы каротиноида. Если в оранжевой форме ОСР W41 блокирует перемещение каротиноида, то в результате изменения конформации N домена и поворота α -спирали, содержащей W41, образуется тоннель, по которому каротиноид перемещается более чем на 10 Å вглубь N домена [105]. Вероятно, эти изменения дестабилизируют структуру белка, которая не

может оставаться компактной за счет отсутствия ряда водородных связей в интерфейсе между доменами, и нарушение белок-хромофорных взаимодействий приводит к увеличению взаимной подвижности N и C доменов и их расхождению. Можно предположить, что такая форма ОСР^R является физиологически активной, поскольку в этом состоянии поверхность N домена и находящийся в нем каротиноид наиболее доступны для взаимодействия с ФБС, а С домен доступен для взаимодействия с белком восстановления флуоресценции, или FRP (см. ниже).

Обратный переход из активной формы ОСР в неактивную оранжевую требует восстановления белок-хромофорных взаимодействий и также изучен недостаточно подробно. Первым событием на пути к темновой неактивной форме, вероятно, является восстановление стэкинг взаимодействий между β-кольцом молекулы каротиноида в N домене и остатками триптофана-41 и 101. Затем происходит изменение поглощения каротиноида, которое требует образования водородных связей в С домене между каротиноидом и остатками триптофана-288 и тирозина-201. Однако процесс реассоциации N и С доменов не заканчивается на этом. Заключительные стадии перехода в неактивную форму, вероятно, связаны с компактизацией белка. Обилие стадий, необходимых для восстановления неактивной формы ОСР, а также пространственная удаленность N и С доменов приводят к тому, что данный процесс идет крайне медленно, а его скорость сильно зависит от температуры. Вероятно, именно фактор взаимного расположения доменов определяет вероятность перехода красной формы ОСР в оранжевую. В данный момент нет полного понимания какие структурные факторы способны влиять на вероятность релаксации красной формы ОСР.

Так или иначе, комплекс ОСР^R–ФБС в *in vitro* системе показал значительную устойчивость [89], и спонтанное восстановление флуоресценции ФБС в этих условиях происходит крайне медленно ($\sim 10^4$ с). Следует отметить, что безызлучательный перенос энергии на каротиноид ОСР может являться альтернативным способом его возбуждения, стимулирующим переход из оранжевой формы в активную красную [106]. Соответственно, перенос энергии

возбуждения от ФБС способствует поддержанию стабильного комплекса. Вероятно, это может негативно сказываться на эффективности фотосинтетических процессов, поэтому для ускорения восстановления исходных параметров ФБС и эффективности светосбора необходим еще один регуляторный компонент, который обеспечивал бы дестабилизацию комплекса $ОСР^R$ –ФБС. Таким компонентом является белок восстановления флуоресценции FRP (Fluorescence Recovery Protein).

Перед подробным описанием свойств FRP, стоит отметить, что совсем недавно были обнаружены также особые варианты ОСР, для которых характерны более быстрые фотоактивация и спонтанная релаксация (т.н. подгруппа ОСР2, представители которой могут присутствовать в разных цианобактериях либо независимо, либо вместе с более изученными ОСР1) [91], однако в данном обзоре мы более подробно рассмотрим вариант, реализованный у *Synechocystis* (ОСР1).

1.7 Регуляция активности ОСР за счет белка восстановления флуоресценции FRP

В 2010-м году при исследовании *Synechocystis* 6803 было установлено, что ген *slr1964*, расположенный в непосредственной близости от гена ОСР (*slr1963*) отвечает за регуляцию нефотохимического тушения. Было показано, что при инактивации *slr1964* восстановление флуоресценция ФБС происходит чрезвычайно долго [110]. Продукт гена *slr1964* был назван белком восстановления флуоресценции (Fluorescence Recovery Protein, FRP). Оказалось, что FRP также непосредственно взаимодействует с ОСР *in vitro* и ускоряет его переход из фотоактивированной красной в оранжевую форму [110]. Примечательно, что долгое время стоял вопрос о длине открытой рамки считывания этого гена. У генов FRP родов *Synechocystis* и *Microcystis* методами биоинформатики была найдена дополнительная N-концевая последовательность, отсутствующая в FRP из других родов цианобактерий [110]. Такой удлинённый ген был экспрессирован, а его продукт охарактеризован, что привело к ряду ошибочных выводов. В частности, было постулировано, что FRP прочно ассоциирован с мембранами. Позднее было

экспериментально показано, что физиологически активный FRP из *Synechocystis* начинается с остатка Met26 (по нумерации продукта удлиненной рамки считывания), то есть экспрессируется и функционирует короткая форма белка. Именно эта форма встречается у многих других цианобактерий и является водорастворимым белком [111]. Повышенная экспрессия такой формы FRP в *Synechocystis* приводила к тому, что клетки не могли реагировать на повышение интенсивности света снижением интенсивности флуоресценции ФБС [111]. Это указывая на дезактивирующее действие FRP по отношению к ОСР *in vivo* и на необходимость тщательного контроля уровня экспрессии обоих белков для поддержания работоспособности фотозащитного механизма [112].

Пространственная структура FRP из *Synechocystis* была установлена в 2013 году с разрешением 2,5 Å [113]. Оказалось, что FRP является исключительно α -спиральным белком цилиндрической формы (рис. 3А), однако в кристалле присутствуют две сильно отличающихся конформации – димерная и тетрамерная, причем субъединицы в составе тетрамера уложены отличным от димерной конформации способом. Было предположено, что активной формой FRP является димер, а тетрамеры неактивны и являются формой хранения белка. Обнаружение димеров и тетрамеров FRP противоречило ранее опубликованным данным тех же авторов о том, что FRP является тримером [110]. Более того, недавно была получена новая кристаллическая структура FRP из *Tolypothrix* sp. PCC 7601 (= *Fremyella diplosiphon*) (PDB 5TZ0, [91]), которая оказалась полностью эквивалентна димерной структуре FRP из *Synechocystis* (PDB 4JDX, цепи В и D), и тетрамерной организации в этом случае обнаружить также не удалось. Несмотря на то, что FRP из *Synechocystis* и *Tolypothrix* идентичны лишь на 51%, пространственные структуры их димеров были практически эквивалентны, в них лишь незначительно отличался угол между мономерами (см. рис. 4). Это обстоятельство служит важным указанием на то, что контакт субъединиц в димере FRP не является жестким, а допускает некоторую конформационную подвижность и скольжение мономеров друг относительно друга.

Предполагалось, что область димеризации FRP непосредственно вовлечена во взаимодействие этого белка с OCP, что согласуется с консервативностью ряда остатков из этого региона и влиянием некоторых мутаций на способность FRP ускорять релаксацию OCP [113]. Эта гипотеза не является единственной, поскольку можно также предположить, что исследованные мутации влияют на стабильность интерфейса FRP, и лишь поэтому – на функционирование FRP и эффективность взаимодействия с OCP. Такая возможность требует более детального рассмотрения. Наиболее загадочными на данный момент являются данные, полученные с помощью мутанта R60K, поскольку такая замена не повлияла на фолдинг FRP (структуры FRP дикого типа (PDB 4JDX) и мутанта R60K (PDB 4JDQ) практически совпадают), однако сделала FRP практически неспособным ускорять релаксацию OCP [113].

Принципиально важно, что полностью работоспособную систему фотозащиты, состоящую из ФБС (объект тушения), OCP (индуктор тушения) и FRP (ингибитор, или выключатель тушения), удалось воссоздать *in vitro* [89]. Так, несмотря на некоторые существенные допущения и различия в процессах, протекающих *in vivo* и *in vitro*, было убедительно продемонстрировано, что наличие этих трех компонентов необходимо и достаточно для работоспособности минимального регулируемого механизма тушения ФБС. Совсем недавно обнаруженные варианты OCP2 способны быстро спонтанно релаксировать без участия FRP (гены которого могут вообще отсутствовать у некоторых цианобактерий, содержащих OCP2), и можно предположить, что они представляют собой более примитивные формы OCP по сравнению с OCP1 [91], однако требуются более систематические исследования данного вопроса.

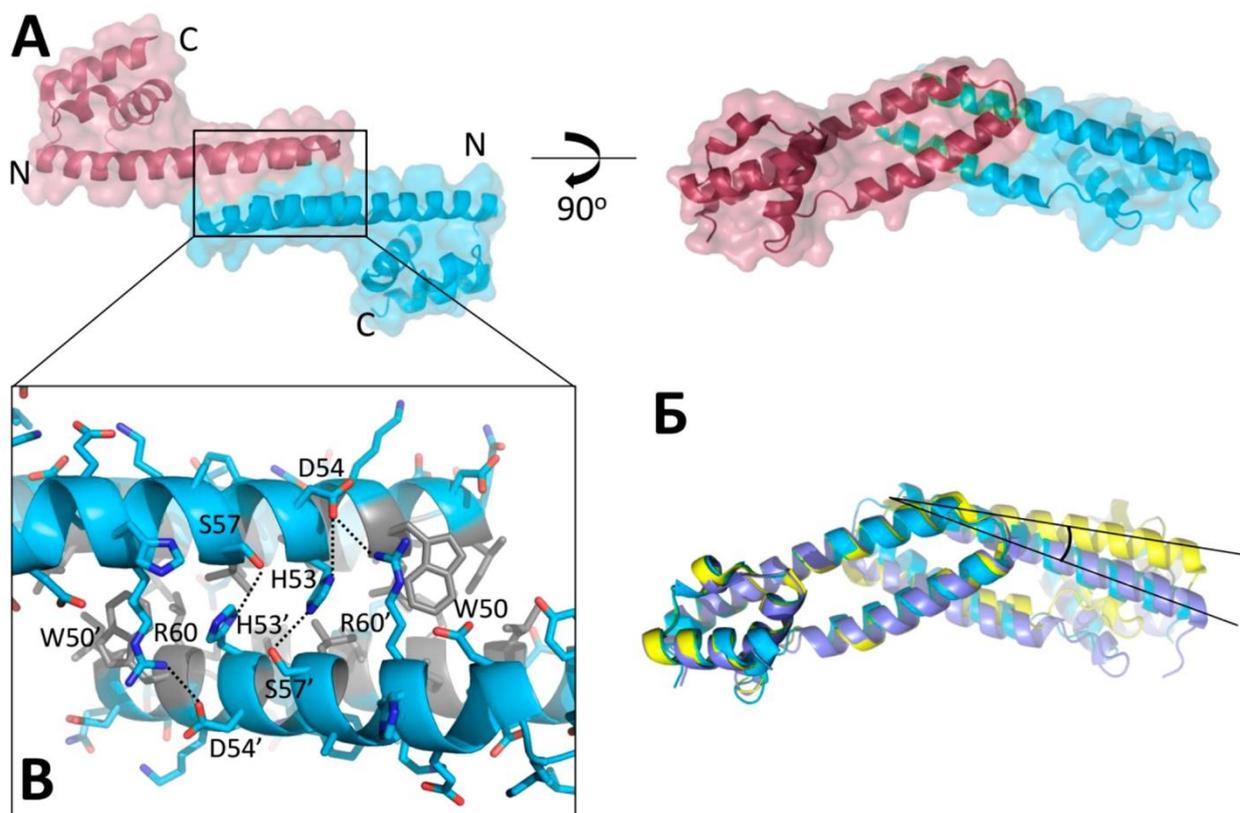


Рис. 4. Структурная организация димера FRP по данным рентгеноструктурного анализа. **А)** общий вид на модель димера FRP из *Synechocystis* (PDB 4JDY) в двух ортогональных проекциях. Мономеры обозначены разными цветами. **Б)** Наложение структур димеров FRP из *Tolypothrix* (синий, PDB 5TZ0) и *Synechocystis* (димеры, образованные разными цепями, присутствующими в кристаллической структуре, обозначены разным цветом). Отмечен угол, иллюстрирующий разницу в положении второго мономера относительно первого. **В)** Область димеризации FRP. Ключевые полярные контакты отмечены пунктирными линиями, остатки, образующие гидрофобное ядро – серым цветом.

1.8 Взаимодействие OCP с компонентами фикобилисом

Как отмечалось ранее, фотоактивация OCP в конечном счете приводит к значительным изменениям его конформации – значительному смещению каротиноида вглубь N домена и разделению доменов белка. Считается, что такие изменения в OCP обуславливают способность OCP взаимодействовать с белками в составе ФБС и обеспечивать диссипацию избыточной энергии, что экспериментально наблюдается как тушение флуоресценции ФБС. Важно, что для связывания активированной формы OCP с ФБС не требуется освещение, интенсивность сине-зеленого света определяет лишь количество образовавшейся активной формы [104, 105, 112], при этом исходный оранжевый OCP не способен

связываться с ФБС и тушить их флуоресценцию. Более того ОСР может быть активирован заранее, а потом добавлен к раствору ФБС, что приводит к постепенному тушению флуоресценции ФБС за счет образования комплекса.

Ввиду сложного строения ФБС и отсутствия прямых структурных данных о комплексах ФБС и ОСР, точный участок взаимодействия неизвестен, а многочисленные косвенные данные достаточно противоречивы. Ситуация осложняется колоссальной разницей в размерах взаимодействующих ОСР (~35 кДа) и ФБС (несколько МДа [50, 114]) и необходимостью использовать *in vitro* достаточно высокие концентрации фосфата для поддержания целостности ФБС [115], и оттого набор перспективных подходов к решению вопроса о механизме взаимодействия ОСР–ФБС весьма ограничен. Каким образом целостность ФБС обеспечивается *in vivo*, не совсем понятно.

Было показано, что физическое взаимодействие фотоактивированной красной формы ОСР с ФБС является довольно прочным, поскольку их комплекс соосаждается в градиенте сахарозы [89]. Как уже упоминалось, ОСР не способен тушить флуоресценцию ФЦ входящих в состав стержней ФБС (*рис. 2*) и, наоборот, может тушить флуоресценцию мутантных ФБС, лишенных стержней [67, 89], поэтому участок взаимодействия ОСР, по всей видимости, удален от стержней и расположен в ядре ФБС. Вероятно, реальная картина еще более сложна, поскольку мутантные ФБС, лишенные стержней, значительно слабее связывали ОСР и самопроизвольно восстанавливали свою флуоресценцию по сравнению с интактными ФБС [89]. Результаты масс-спектрометрии с использованием специфических бифункциональных агентов, ковалентно модифицирующих остатки лизина, расположенные на определенном расстоянии друг о друга, подтверждают гипотезу об образовании белок-белковых комплексов ОСР с компонентами ядра ФБС [116].

Основным объектом тушения флуоресценции согласно модели, полученной в работе Жанг с соавт., являлись коровые тримеры АРС660, а участок связывания ОСР, по мнению авторов, должен располагаться между полипептидами АрсВ и

АрсЕ [85]. Тушение АРС660 было предположено в работах Кириловски и соавт. [89, 117]. В других работах [118-120] тушения флуоресценции изолированных из ФБС тримеров АФЦ под действием красной формы ОСР выявить не удалось, в отличие от флуоресценции большого линкерного полипептида АрсЕ, или L_{СМ} (см. выше), который, так же как и АФЦ, несет фикоцианобилиновый хромофор и является одним из основных ТЭ [118-123]. Такая гипотеза о роли L_{СМ} косвенно подтверждается информацией с использованием мутантов по другим компонентам ядра – по генам *arcD* и *arcF*, и говорит в пользу того, что участок связывания ОСР находится вблизи или даже на белке L_{СМ} [124], что было также подтверждено методами молекулярного докинга *in silico* [82, 125]. К сожалению, напрямую проверить такое предположение, создав мутант, полностью лишенный гена *arcE*, не удалось, поскольку продукт этого гена, L_{СМ}, играет важнейшую структурную роль и необходим для сборки и целостности ФБС [123], тем не менее, удаление домена L_{СМ}, содержащего хромофор (остатки 13-246), привела к потере ОСР-зависимого тушения флуоресценции ФБС, что является существенным аргументом в пользу гипотезы о роли L_{СМ} в связывании с ОСР [126]. Другие же данные, полученные на белке L_{СМ}, изолированном из состава ФБС в довольно жестких условиях [45, 124], нужно интерпретировать с осторожностью, поскольку сохранение полностью интактной структуры компонентов мультибелковых комплексов при их выделении вызывает некоторые сомнения. С другой стороны, попытки получения отдельных компонентов ФБС, например белка L_{СМ}, в гетерологической системе экспрессии в штаммах *Escherichia coli*, продуцирующих фикоцианобилины [122, 127-129] для исследования взаимодействия с ОСР представляются перспективными и осуществимыми.

Согласно другой гипотезе, взаимодействие ОСР происходит в ядре ФБС на месте другого линкерного белка, L_с, с малой молекулярной массой (С обозначает регион в глубине ядра, “core”), который является продуктом гена *arcC* и лишен хромофоров. Такая гипотеза основывается на сходстве пространственной структуры L_с и С домена ОСР и подразумевает, что происходит

вытеснение/отгибание Lc под действием ОСР при его связывании с ФБС, и Lc участвует в стабилизации связывающегося ОСР [68]. Мутантные ФБС по белку Lc ($\Delta ArcS$) демонстрировали менее эффективное ОСР-зависимое тушение флуоресценции по сравнению с контрольными ФБС с интактным геном *arcS*, однако увеличение концентрации фосфата существенно нивелировало разницу между мутантом и контролем [84]. На наш взгляд, однозначная интерпретация этих результатов затруднительна, поскольку удаление важного компонента ФБС может иметь смешанное и плохо предсказуемое воздействие на их свойства.

Представления о том, какой участок ОСР отвечает за его взаимодействие с ФБС, менялись со временем. По одной из ранних версий, именно С домен ОСР считался ответственным за это взаимодействие [68, 110]. Взаимодействие с ОСР за счет N домена также рассматривалось [85], и эта гипотеза подкрепляется данными о роли остатка R155 во взаимодействии с ФБС [90] и тем фактом, что изолированный RCP, являющийся фрагментом ОСР, соответствующим его протеолизованному N домену [130], является эффективным тушителем ФБС [88]. Недавно с помощью химического сшивания глутаровым альдегидом комплексов ФБС–ОСР с последующей масс-спектрометрией продуктов протеолиза было обнаружено, что не домены, а междоменный линкер в ОСР дает наибольшее количество контактов с белками ядра ФБС. Этот факт частично согласуется с данными Zhang с соавт. [85], при этом наиболее глубоко расположенным в ФБС, согласно такой модели, является N домен, а С домен ОСР оказывается более доступным [84]. К сожалению, даже такая модель основывается на множестве допущений и оставляет некоторую свободу интерпретаций. Более того, полное отсутствие в данном исследовании «сшитых» пептидов, принадлежащих N домену ОСР и белковым компонентам ядра, находится в противоречии с общепринятым фактом, что RCP способен тушить ФБС, не имея С домена и линкерного участка. Также остается непонятным, почему при постулированной доступности С концевой домена ОСР в комплексе с ФБС Гвиздала с соавт. не могли добиться

соочищения на металлоаффинной колонке ФБС и ОСР при иммобилизации ОСР за С-концевой полигистидиновый таг [89].

Несмотря на определенные успехи при анализе взаимодействия ОСР и ФБС *in silico*, достигнутые с помощью методов молекулярной динамики и моделирования [82, 84, 85, 125], точный механизм этого взаимодействия остается далеким от понимания и нуждается в прямых экспериментальных данных с использованием структурных методов, например, рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии. Однако для этих задач необходимо получение мутантных форм ОСР, имитирующих его активированное состояние.

Однако даже в случае немутантного ОСР фотоактивация приводит к прочному взаимодействию ОСР с ФБС *in vitro*, особенно, при высокой концентрации фосфата, и такое связывание значительно стабилизирует красную форму ОСР [89, 102]. Фосфат может значительно стабилизировать комплексы и, вероятно, *in vivo* взаимодействие несколько слабее, чем *in vitro*, однако очевидно, что в условиях *in vivo* необходим фактор (или факторы), которые при снижении уровня освещенности позволяли бы сделать взаимодействие ОСР с ФБС обратимым и эффективно восстанавливали бы флуоресценцию ФБС и поток энергии на фотосистемы. Как было отмечено, одним из таких факторов, существенно ускоряющим восстановление флуоресценции ФБС *in vitro* и *in vivo*, оказался белок FRP [110].

1.9 Взаимодействие ОСР С FRP

Показано что инкубация комплексов ОСР–ФБС в присутствии FRP приводит к значительному снижению содержания ОСР во фракции ФБС, полученной при центрифугировании в градиенте сахарозы, что коррелирует с восстановлением флуоресценции ФБС, потушенной при добавлении ОСР [89]. Таким образом, было предположено, что FRP способствует диссоциации ОСР от ФБС и, тем самым, создает предпосылки для его релаксации из фотоактивированной красной в оранжевую форму. Вопрос о том, за счет чего FRP способствует восстановлению

флуоресценции ФБС, является крайне сложным и фактически сводится к выяснению того, происходит ли конкуренция FRP и OCP за связывание на ФБС, или же FRP связывается с доступными сайтами OCP прикрепленному к ФБС и активно «вытаскивает» его из комплекса.

Механизм, основанный на простой конкуренции FRP и OCP за некий участок на ФБС, диктует более высокое сродство FRP к ФБС по сравнению с таковым у OCP^R. Иначе, потребовалась бы значительная концентрация FRP, чтобы вытеснить OCP, тогда как известно, что FRP эффективно работает даже при низких молярных соотношениях FRP/OCP, однако без дополнительных исследований взаимодействия FRP и ФБС это остается лишь предметом дискуссий. Нельзя полностью исключить, что существуют еще не обнаруженные факторы, участвующие в регуляции фотозащиты наряду с OCP и FRP. Гипотетически возможен сценарий, когда FRP взаимодействует только со свободным OCP, возникающим за счет обратимости образования комплекса ФБС-OCP, об этом свидетельствует тот факт что скорость восстановления флуоресценции ФБС значительно ниже, чем скорость превращения красной в оранжевую форму [67]. В пользу такой точки зрения косвенно говорит также отсутствие необходимости в FRP для релаксации OCP₂ и спонтанного восстановления флуоресценции ФБС при снижении инсоляции [91]. Однако совсем недавно были получены данные о том, что FRP обладает двумя независимыми активностями, и механизмы взаимодействия FRP со свободным OCP и OCP, связанным с ФБС, могут отличаться. В пользу такой гипотезы свидетельствует то, что мутации как в OCP (в первую очередь, остатков F299 и D220), так и в FRP (мутация R60L), которые сильно снижали способность FRP ускорять переход красной в оранжевую форму, практически не влияли на способность FRP отделять OCP от ФБС [131].

В отличие от совершенно не охарактеризованных на данный момент комплексов FRP с OCP, связанным с ФБС, взаимодействие FRP со свободным OCP исследовано более подробно. Гены, кодирующие OCP и FRP, часто расположены недалеко друг от друга, однако находятся под контролем разных промоторов [110],

что, вероятно указывает на разные, асинхронно меняющиеся концентрации этих белков в условиях изменяющейся освещенности, что необходимо для регуляции фотозащитного механизма.

Изначально предполагалось, что FRP может взаимодействовать только с фотоактивированной красной формой ОСР, и что это взаимодействие происходит через N домен ОСР, при этом связывание FRP дестабилизирует красную форму ОСР [110], однако в последующем эти предположения были опровергнуты. Можно предположить, что помимо своей важной установленной роли в фотозащитном механизме FRP выполняет определенную роль в процессе сворачивания и созревания ОСР. В недавней работе Бланкеншипа с соавт. были получены подтверждения предположения о том, что FRP может служить мостиком, сближающим домены ОСР в процессе функционирования [132]. Было также постулировано, что в процессе функционирования происходят значительные конформационные перестройки FRP, включающие мономеризацию и частичное разворачивание С-концевой области этого белка (head domain, см. рис. 3А), что, предположительно, является необходимым условием перевода ОСР из красной в оранжевую форму [132]. Однако до недавнего времени оставался неясным вопрос о том, как устроена область контакта FRP и ОСР, и какие области задействованы во взаимодействии этих белков. Несмотря на то, что существующие данные не исключают для FRP возможность взаимодействовать с N доменом ОСР или междоменным линкером, особенно в условиях уже образованного комплекса ОСР–FRP, в результате данной работы, нам удалось установить, что основной участок взаимодействия находится именно на С домене ОСР, а важную роль в регуляции образования комплекса играет короткий α -спиральный участок, в начале N-домена ОСР (NTE). Неудивительно, что мутации в этом месте ОСР приводят к нарушению связывания и функционирования FRP [113, 131]. Более того, при анализе этой зоны становится понятно, почему фотоактивация ОСР и нарушение водородных связей кетогруппы каротиноида с W288/Y201 приводит к отсоединению NTE и дальнейшим конформационным перестройкам в ОСР [83, 92, 133].

Долгое время открытым оставался вопрос, способны ли FRP из одних организмов ускорять переход красной формы в оранжевую форму ОСР, полученного из других видов. Это должно пролить свет на ключевые участки в структуре FRP, которые важны для функционирования FRP, и те, которые определяют видоспецифичность.

К сожалению, многочисленные попытки закристаллизовать комплекс FRP с разными формами ОСР на данный момент привели к росту цветных, но не дифрагирующих кристаллов.»

1.10 Заключительные комментарии

Несмотря на схожее устройство фотосинтетического аппарата у цианобактерий и высших растений, потребовались десятилетия исследований и поисков для того, чтобы обнаружить механизмы фотозащиты специфические для цианобактерий и установить, что они связаны с уникальным водорастворимым каротиноидным белком, его способностью к фотоактивации и обратимому взаимодействию со светособирающими антеннами. Функция ОСР была установлена всего 15 лет назад. На данный момент, трудно представить, как развивалась бы область исследований цианобактериального фотосинтеза и фотозащиты, произошли бы эти события значительно раньше (ОСР был впервые выделен и описан в 1982 году).

Совершенствование многочисленных методических подходов в области биохимии, биофизики и структурной биологии, которое произошло за последнее десятилетие, значительно облегчает понимание деталей обнаруженного механизма фотозащиты, связанного с функционированием ОСР. В связи с этим, за последние годы были достигнуты значительные успехи в характеристике фотоцикла ОСР, в исследовании его способности тушить флуоресценцию ФБС и взаимодействовать с FRP. Тем не менее, несмотря на усилия нескольких лабораторий по всему миру, ряд принципиальных вопросов остаются предметом научных споров.

Так, участок взаимодействия ОСР в составе ФБС, до сих пор неизвестен. Некоторые косвенные данные на этот счет находятся в противоречии друг с другом. Также непонятно, каким образом относительно консервативный белок ОСР, последовательность которого схожа для разных цианобактерий, способен взаимодействовать с ФБС различными по архитектуре и белковому составу разными вдов цианобактерий [134])? В литературе есть определенные разногласия не только по поводу специфичности комплекса ОСР-ФБС: является ли он прочным или же наоборот – динамическим. Значительный прогресс в области структурных методов, в первую очередь, криоэлектронной микроскопии, может поспособствовать выяснению структуры гипотетических комплексов ОСР-ФБС. Но самое главное, механизм энергетического взаимодействия пигментов ФБС с каротиноидом в составе ОСР остается загадкой.

ОСР является удивительным примером того, как свет может запускать значительные, но при этом обратимые изменения белковой конформации. При фотоактивации ОСР не просто меняется локальная структура хромофора или участка белка – по современным представлениям, белок полностью преобразуется, что сопровождается изменением его поверхности и экспонированием прежде маскированных зон (интерфейс N и C доменов, сегмента NTE и участка его связывания на C домене, разупорядочивание линкера и т.д.).

Перспективными представляются сценарии использования таких фотоиндуцируемых конформационных изменений в ОСР в прикладных исследованиях при конструировании оптических сенсоров, или для нужд оптогенетики. Например, через взаимодействие ОСР с некоторым (искусственным или модифицированным природным) белковым партнером, который помогал бы в проведении такого запускаемого светом сигнала.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В главе 2 представлены объекты исследования, а также методики исследования и анализа экспериментальных данных, использованные в диссертационной работе.

2.1 Материалы

2.1.1. Культивация цианобактерий. В работе использовали способность цианобактерий рода *Synechocystis* к фотоавтотрофному и гетеротрофному росту на питательных средах с глюкозой. Это позволило использовать мутанты, лишённые фотосистем, в качестве модельного объекта для изучения регуляции нефотохимического тушения флуоресценции фикобилисом с различным составом фикобилипротеинов и терминальных эмиттеров *in vivo*. В этих экспериментах использовали клетки цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 дикого типа, а также ряд мутантов из коллекции кафедры генетики биологического факультета МГУ: В ФБС мутанта СК, в результате делеции четырех генов, отсутствуют α - и β -субъединицы фикоцианина и два линкерных полипептида. У мутанта PAL в результате введения дополнительных делеций в гены, кодирующие субъединицы АФЦ, полностью утрачена фикобилипротеиновая антенна, что подтверждено данными иммунологического анализа и флуоресцентной спектроскопии [135]. Мутанты Δ PS1/ Δ PS2, лишённые фотосистем, характеризуются высоким квантовым выходом флуоресценции фикобилисом, поскольку в них не происходит перенос энергии возбуждения с пигментов ФБС на хлорофилл реакционных центров (фотохимическое тушение флуоресценции), однако адаптация к свету высокой интенсивности вызывает обратимое тушение флуоресценции ФБС, что позволяет изучать взаимодействие ОСР с ФБС *in vivo*.

В работе использовали клетки дикого типа *Synechocystis* sp. PCC 6803,

которые выращивали в модифицированной среде BG-11 [136] при 30 °C под люминесцентными лампами белого света при постоянной освещенности 40 мкЭ м⁻² с⁻¹. Мутанты СК (*ΔcpcBAC1C2*), лишенный фикоцианина (PC⁻) и PAL (PC⁻, *ΔcpcAB*, *ΔcpcE*), лишенный фикобилисом [135] выращивали в среде BG-11, содержащей удвоенную концентрацию NaNO₃. Мутант СК выращивали в присутствии канамицина (80 мкг/мл), мутант PAL – в присутствии спектиномицина (25 мкг/мл) и хлорамфеникола (20 мкг/мл). Мутант *ΔPSI/ΔPSII* (*ΔpsaAB/ΔpsbDIC/ΔpsbDII*), лишенный ФС1 и ФС2 [137], выращивали в среде BG-11, содержащей глюкозу (10 мМ), спектиномицин (25 мкг/мл), эритромицин (20 мкг/мл) и хлорамфеникол (20 мкг/мл) при освещенности 5 мкЭ м⁻² с⁻¹.

Одноклеточные цианобактерии *Gloeobacter violaceus* выращивали в стационарных условиях в минеральной ростовой среде BG-11, согласно [138]. Культура клеток находилась при 25 °C в 100-миллилитровых колбах под люминесцентными лампами белого света при постоянной освещенности 10 мкЭ/(м² с). Фикоэритрин из *G. violaceus* выделяли согласно [139]. Собранные центрифугированием клетки *G. violaceus*, ресуспендировали в 0,65 М Na-фосфатном буфере (pH 7.5), и разрушали на Френч-прессе при 100 МПа. Фракцию белка, преимущественно содержащую фикоэритрин получали высаливанием из клеточного супернатанта разрушенных клеток 35% сульфатом аммония. Осадок растворяли в минимальном объеме дистиллированной воды и диализовали против 5 мМ Na-фосфатного буферного раствора pH 7,5. Фикоэритрин выделяли анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на колонке High Trap Q 5 ml (Amersham Biosciences), уравновешенной тем же буфером. Элюцию белков проводили плавным 0-400 мМ градиентом концентрации NaCl. Фракции элюата анализировали, проводя SDS-электрофорез по Лэммли [140] и регистрируя спектры поглощения. Фракции, имеющие характерный для фикоэритрина *G. violaceus* спектр поглощения с максимумами 498 и 565 нм и плечом при 550 нм и гомогенные по данным электрофореза, объединяли и использовали в экспериментах. Содержание фикоэритрина в растворах определяли

по молярному коэффициенту экстинкции [139].

Аллофиоцианин получали из супернатанта разрушенных во Френч-прессе клеток нитчатой цианобактерии *Arthrospira platensis* с использованием трех последовательных хроматографических процедур, подробно описанных в работе [141]. Полученный АФЦ в 0.10 М Na-фосфатном буферном растворе pH 7.0 использовали в эксперименте. Выделенный пигмент-белковый препарат, согласно контрольному SDS-электрофорезу, спектрам поглощения и флуоресценции был свободен от контаминации другими белками.

Для исследования механизма переноса энергии в антенных комплексах ФБС и регуляции нефотохимического тушения флуоресценции ФБС *in vitro* проводили выделение полноразмерных ФБС из клеток цианобактерий с помощью ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы, согласно процедурам, описанным в работе [142]. Для этого использовали клетки цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 дикого типа и ряд мутантов.

Клетки цианобактерий осаждали центрифугированием (7000 об/мин, 15 мин) и дважды промывали 0,75 М буферным раствором PBS, pH 7,6. Затем клетки обрабатывали ультразвуком (160 циклов по 5 секунд с перерывами по 5 секунд) в фосфатном буфере с добавлением Triton X-100 (2%) и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре. Затем осадок удаляли центрифугированием (15 000 об/мин, 30 мин). Супернатант загружали в линейный (0,25–1,25 М) градиент плотности сахарозы в 0,75 М фосфате (pH 7,6) для ультрацентрифугирования при 170 000 g в течение 3 ч (41 000 об / мин, Beckman 70 Ti, 20 ° C). После центрифугирования материал собирали со дна каждой пробирки с помощью тонкой иглы и роликового насоса. Концентрации сахарозы измеряли с помощью ручного рефрактометра PZO RR 11 (PZO, Варшава, Польша).

2.1.2. Выделение рекомбинантных белковых препаратов.

Препараты ОСР получали двумя принципиально различными способами: (1)

выделением из клеток цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Arthrospira* sp. и (2) с помощью экспрессии рекомбинантных белков в специально разработанном биотехнологическом штамме *E.coli* (NEBturbo), синтезирующим кетокаротиноиды благодаря наличию соответствующей ферментативной системы (плазмида pACCAR25 Δ crtXZcrtO с кластером генов *crtY*, *crtI*, *crtB*, и *crtO* из *Erwinia uredovor*). Этот подход был разработан нашими коллегами из Технического Университета г. Берлин (TU Berlin) под руководством профессора Томаса Фридриха в рамках совместного исследовательского проекта. Данный метод был использован нашими коллегами из ФИЦ «Фундаментальные Основы Биотехнологии» (группа «Белок-белковые взаимодействия», руководитель группы Н.Н. Случанко) для получения мутантов ОСР с различными точечными заменами аминокислот и значительными изменениями первичной последовательности [143]. С помощью экспрессии в клетках *E.coli* также были получены препараты FRP и его мутанты. Полный список мутантов ОСР, FRP и химерных конструкций (ОСР-TagGFP, ОСРTagRFP, АнаCTDH-TagRFP), использованных в работе, насчитывает более 30 наименований, основные представлены в *Таблице 1*.

Таблица 2. Список основных белковых препаратов и химерных конструкций на их основе, использованных в работе.

Генотип	Название	Особые свойства
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328		
Orange Carotenoid Protein, дикий тип	AmaxOCP	
Fluorescence Recovery Protein, дикий тип	AmaxFRP	
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		
Orange Carotenoid Protein, дикий тип	OCP	
OCP-W288A	OCP ^{YA}	
OCP-Y201A	OCP ^{AW}	
OCP-W288Y	OCP ^{YY}	
OCP-Y201W	OCP ^{WW}	повышенный квантовый выход фотопродукта, низкая спектральная гетерогенность
OCP-Y201A/W288A	OCP ^{AA}	активная форма, финальная стадия фотоцикла
OCP-W41F/W101F/W110F/W277H	OCP-3FH	ускорение фотоцикла
укороченный OCP, остатки 18–306	OCP ₁₈₋₃₀₆	
OCP с удаленным фрагментом 2-15	ΔNTE	основной сайт для взаимодействия с FRP открыт
OCP с удаленным фрагментом после Leu-306	ΔCTT	ускорение фотоцикла
OCP-F299C		
C-концевой домен OCP, остатки 165–317	COCP	фиолетовая форма
N-концевой домен OCP, остатки 1–164	NTD (RCP)	красная активная форма
OCP-I5C/F299C	OCP _{CC}	ускорение фотоцикла, компактная форма
Fluorescence Recovery Protein, дикий тип	FRP	
FRP-L49E		мономер FRP
FRP-K102C		
FRP-F76C		
FRP- L33C/I43C	FRP _{CC}	стабильный димер FRP
химера OCP с зеленым флуоресцентным белком	OCP-TagGFP	флуоресцентная индикация состояния
химера OCP с красным флуоресцентным белком	TagRFP-OCP	флуоресцентная индикация состояния
<i>Anabaena variabilis</i> PCC 7937		
Orange Carotenoid Protein, дикий тип	AnaOCP	
Fluorescence Recovery Protein, дикий тип	AnaFRP	
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120		
гомолог C-концевого домена OCP	AnaCTDH	фиолетовая форма
Helical Carotenoid Protein 1	AnaHCP1	
химера AnaCTDH с красным флуоресцентным белком	AnaCTDH-TagRFP	флуоресцентная индикация состояния
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>		
гомолог C-концевого домена OCP	TeCTDH	фиолетовая форма

Для подращивания трансформированных бактерий использовали жидкую бактериальную среду SOB: 2% бакто-триптон (Difco), 0,55% бакто-дрожжевой экстракт (Difco), 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ MgSO₄, 10 мМ MgCl₂. Для выращивания ночных бактериальных культур и последующего выделения ДНК и/или для наработки белков использовали жидкая среда для *E. coli* (LB): 1% бакто-триптон (Difco), 0,5% бакто-дрожжевой экстракт (Difco), 1% NaCl. Для заливки чашек и выращивания трансформированных бактериальных колоний использовали твердую питательную среду для *E. coli* LB-агар: жидкая питательная среда LB, 1,5% бакто агар (Difco). Клонирование генно-инженерных конструкций, проводили по протоколу модульного клонирования MoClo [144, 145].

Для экспрессии белков, клетки *E. coli* (Zymo Research) были трансформированы экспрессионными векторами pQE (Evrogen), содержащими последовательности соответствующих белков и последовательность, кодирующую 6 остатков гистидина, в той же рамке считывания, на 5'-конце.

Выделение белковых препаратов проводили с помощью металл-аффинной хроматографии TALON Metal Affinity Resin (Clontech). Для некоторых белковых препаратов после хроматографической очистки проводили контролируемое удаление полигистидиновой последовательности за счет С3 риновирусных протеаз, для этого соответствующий сайт вводился в структуру генетической конструкции. Элюат фильтровали и собирали в пробирки по 1 мл. Концентрацию белка измеряли на микроспектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000c. Следует отметить, что коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный по первичной последовательности на основе количества ароматических аминокислотных остатков (тирозин, триптофан, фенилаланин) может быть использован только для апо-форм белков. В случае холо-форм необходимо учитывать дополнительное поглощение хромофора (каротиноид) в УФ области. Для расчёта соответствующих поправочных коэффициентов были определены коэффициенты молярной экстинкции каротиноидов в видимой области для белков

с известной стехиометрией связывания каротиноидов. Выделенные белки хранили при 4°C.

Введение дополнительных цистеиновых остатков в структуру OCP и FRP использовали для подтверждения белок-белковых контактов в комплексах и модификации фотоцикла OCP (метод «disulfide trapping») [146].

Для изучения конформационных переходов в белках использовали флуоресцентные зонды (гидрофобные красители (Nile Red, Bis-ANS)), а также селективную модификацию цистеиновых остатков белка с помощью методов малеимидной химии (TMR) [106].

Для изучения структуры гомолога C-домена OCP (AnaCTDH) с помощью ЯМР спектроскопии был использован белковый препарат, который был получен в результате культивации *E.coli* на минимальной среде M9, содержащей глюкозу с изотопом ^{13}C и сульфат аммония с ^{15}N .

Для изучения взаимодействия каротинидных белков с мембранами в качестве модельного объекта использовали липосомы, полученные из яичного фосфатидилхолина с различным набором каротиноидов [147].

Для исследования белок-опосредованной доставки каротиноидов в мембраны на клеточных моделях использовали культуру клеток эмбриональной почки человека HEK293T (human embryonic kidney), нейробластомы TET21N (human neuroblastoma) и рака шейки матки HeLa (human cervical cancer). Все клеточные культуры, использованные в данной работе, выращивали на культуральных матрасах площадью 25 см² в 6 мл среды DMEM с 2 mM глутамином и 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, Thermo Scientific) и 100 мкг/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко) в CO₂ инкубаторе при 37°C, 5% CO₂.

2.2 Методы исследования.

Для решения поставленных экспериментальных задач был использован комплекс биофизических методов.

2.2.1 Стационарная и время-разрешенная абсорбционная спектроскопия

Интенсивность светового потока при его прохождении через исследуемую среду уменьшается вследствие превращения энергии излучения в различные формы внутренней энергии вещества и (или) в энергию вторичного излучения. Способность вещества поглощать свет зависит главным образом от электронного строения атомов и молекул, а также от длины волны падающего света, толщины слоя, концентрации вещества, температуры, наличия электрических и магнитных полей. Для измерения поглощательной способности используют различные варианты спектрофотометров - оптических приборов, состоящих из источника света, камеры для образцов, монохроматора (призма или дифракционная решетка) и детектора. В зависимости от применяемой схемы прибора возможна регистрация спектра в режиме сканирования длины волны при использовании монохроматора или единовременная регистрация интенсивностей световых потоков на разных длинах волн при использовании дифракционных решеток и ПЗС-матриц в качестве детектора. Применение быстрых детекторов и импульсных источников света позволяет регистрировать не только стационарные (steady-state) спектры поглощения, но и кинетику изменения оптических спектров с временным разрешением до десятков фемтосекунд, что позволяет исследовать динамику возбужденных состояний молекул. Вне зависимости от временного разрешения установки, применение абсорбционной спектроскопии основано на следующих законах [148]:

I. Закон Бугера - Ламберта: если среда однородна и слой вещества перпендикулярен падающему параллельному световому потоку, то:

$$I = I_0 e^{-kd}, \quad (1)$$

где I_0 и I - интенсивности падающего и прошедшего через вещество света, d - толщина слоя, k - коэффициент поглощения, который не зависит от толщины поглощающего слоя и интенсивности падающего излучения. Для характеристики поглощения широко используют коэффициент экстинкции, или светопоглощения $k' = k/2.303$ (в см^{-1}), и оптическую плотность $A = \lg(I_0/I)$, а также величину пропускания $T = I/I_0$. Отклонения от закона известны для световых потоков чрезвычайно большой интенсивности (для лазерного излучения). Коэффициент k зависит от длины волны падающего света, т. к. его величина определяется электронной конфигурацией молекул и атомов и вероятностями переходов между их электронными и колебательными уровнями. Совокупность переходов создает спектр поглощения (абсорбции), характерный для данного вещества.

II. Закон Бера: каждая молекула или атом независимо от относительного расположения других молекул или атомов поглощает одну и ту же долю энергии излучения:

$$k = c\varepsilon, \quad (2)$$

где c - концентрация вещества. Если c выражена в моль/л, ε называют молярным коэффициентом поглощения (экстинкции). Отклонения от этого закона свидетельствуют об образовании димеров, полимеров, ассоциатов или химическом взаимодействии поглощающих частиц.

III. Объединенный закон Бугера – Ламберта – Бера:

$$I = I_0 e^{-c\varepsilon d} \quad (3)$$

Спектр вещества в конденсированной фазе определяется не только природой составляющих его молекул, но и межмолекулярными взаимодействиями, влияющими на структуру электронных уровней. Обычно такой спектр состоит из ряда широких полос различной интенсивности. Иногда в нем проявляется

структура колебательных уровней (особенно у кристаллов при охлаждении). По спектрам поглощения проводят качественный и количественный анализ веществ. Абсорбционная спектроскопия широко применяется для изучения строения вещества. Она особенно эффективна при исследовании процессов в жидких средах; по изменениям положения, интенсивности и формы полос поглощения судят об изменениях состава и строения поглощающих свет частиц без их выделения из растворов.

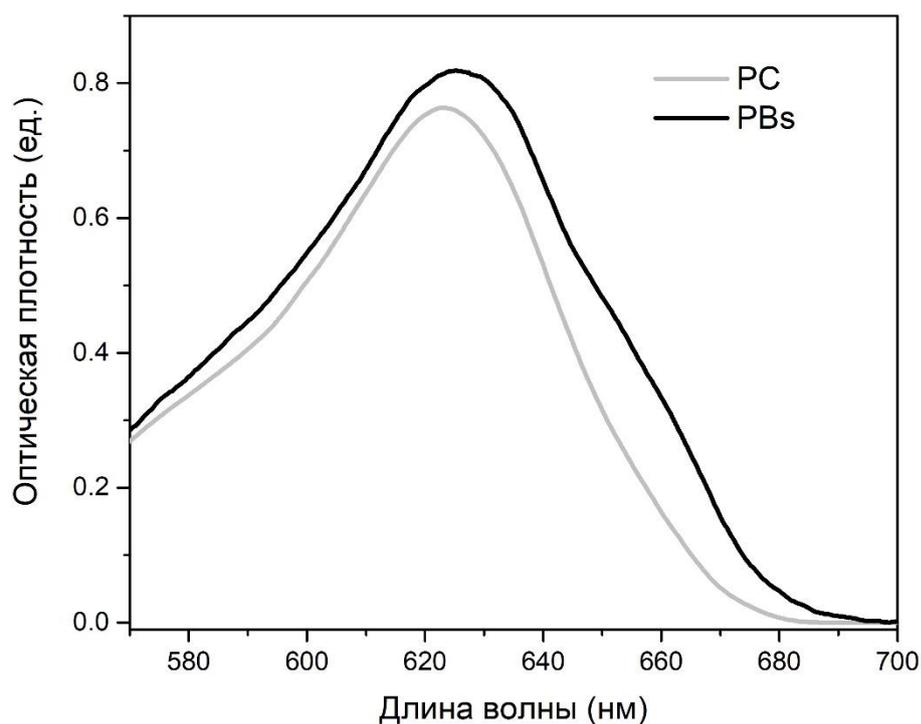


Рис. 6. Спектр поглощения фикоцианина (PC) и фикобилисом (PBs) из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803.

В данной работе спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра с интегрирующей сферой, собранного на базе спектрометра Maya 2000 Pro (Ocean Optics, США). В качестве источника белого света использовали стабилизированную дейтериевую лампу (SL S204, Thorlabs, USA) с выходом в многомодовое оптическое волокно. Стабилизацию температуры в диапазоне температур от -10 до 100 °C и перемешивание образца обеспечивались за счет кюветного отделения с водяным охлаждением элемента Пельтье Qrod 2e (Quantum Northwest, США). Использование интегрирующей сферы было необходимо для минимизации эффекта рассеяния света на крупных частицах

(клетках и липосомах), который приводит к увеличению оптической плотности в синей части спектра и, соответственно, искажениям формы спектра. Измерения проводили в 10 мм кварцевых кюветах, а также в микрокюветах объемом 700 и 100 мкл (Thorlabs, США) в которых, в зависимости от положения кюветы, оптический путь составлял 10 или 2 мм. В качестве образца сравнения в экспериментах на клетках цианобактерий использовали среду культивирования BG-11, а для белковых препаратов соответствующие буферные растворы. Кюветы располагали вплотную к интегрирующей сфере и на расстоянии 3 мм. Затем учитывали светорассеяние по формуле:

$$D(\lambda) = D_{far}(\lambda) - \frac{D_{far}(800\text{ nm})}{D_{far}(800\text{ nm}) - D_{near}(800\text{ nm})} \times [D_{far}(\lambda) - D_{near}(\lambda)] \quad (4)$$

где D – оптическая плотность на длине волны λ , индексы обозначают расположение кюветы относительно интегрирующей сферы [148].

Для записи кинетики изменения оптической плотности при фотостимуляции объектов лазерными (InTop) или диодными источниками света (Solis, Thorlabs, США) или в результате смешения растворов взаимодействующих веществ использовали режим strip-chart приложения SpectraSuite (Ocean Optics, США), позволяющий за время интегрирования порядка 10-100 мс детектировать изменение оптической плотности на каждой длине волны (рис. 7).

Питание светодиодов осуществлялось за счёт драйвера (DC2200, Thorlabs, США), который также генерировал сигналы TTL для синхронизации, что обеспечивало длительность вспышек от 3 мкс до 5 секунд в экспериментах и синхронность циклов стимуляции образца и записи данных.

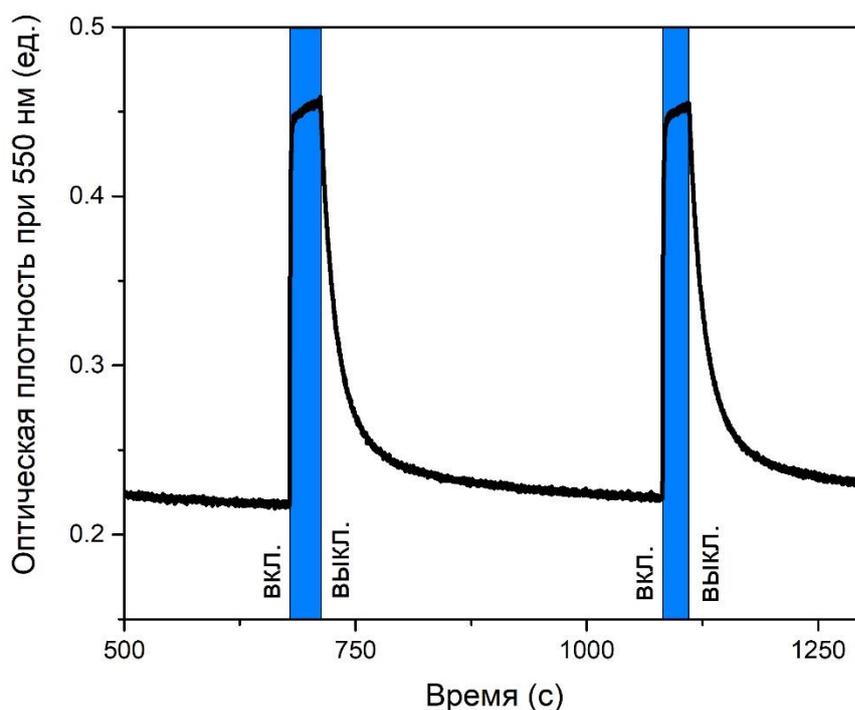


Рис. 7. Характерные изменения оптической плотности препарата оранжевого каротиноидного белка (ОСП) при 550 нм в результате периодической адаптации к синему свету (455 нм, 200 мВт), вызывающей накопление красной формы ОСП^R. Температура 20 °С.

Изменения поглощения, вызванные короткими вспышками света, исследовали с помощью самодельной установки для флеш-фотолиза. Инициация фотоувствительной реакции осуществлялась второй гармоникой лазера с модуляцией добротности Nd – YAG LS-2131M (LOTIS ТП, Беларусь) с использованием импульсов длительностью 7 нс на длине волны 532 нм. Детектирование изменений оптической плотности проводили с помощью монохроматического света при 550 нм и полушириной 6 нм, который выделяли с помощью двух монохроматоров (до и после образца) от галогенной лампы (OSRAM, Германия) со стабилизированной мощностью 100 Вт. За изменениями сигнала поглощения следили с помощью фотоумножителя 9658 В (Electron Tubes Ltd., Великобритания) с широкополосным усилителем 300 МГц и аналого-цифровым преобразователем Octopus CompuScope 8327 (Gage, Канада). Для получения более высокого соотношения сигнал / шум усредняли до 500 индивидуальных кинетик. Интервал между вспышками был установлен в диапазоне от 1 до 5 с, чтобы обеспечить завершение фотоцикла и релаксацию образца. Кинетические кривые обрабатывали с помощью суммы затухающих

экспонент с помощью пакетов программ Mathematica (Wolfram Research, США) или OriginPro 2015 (Originlab, США).

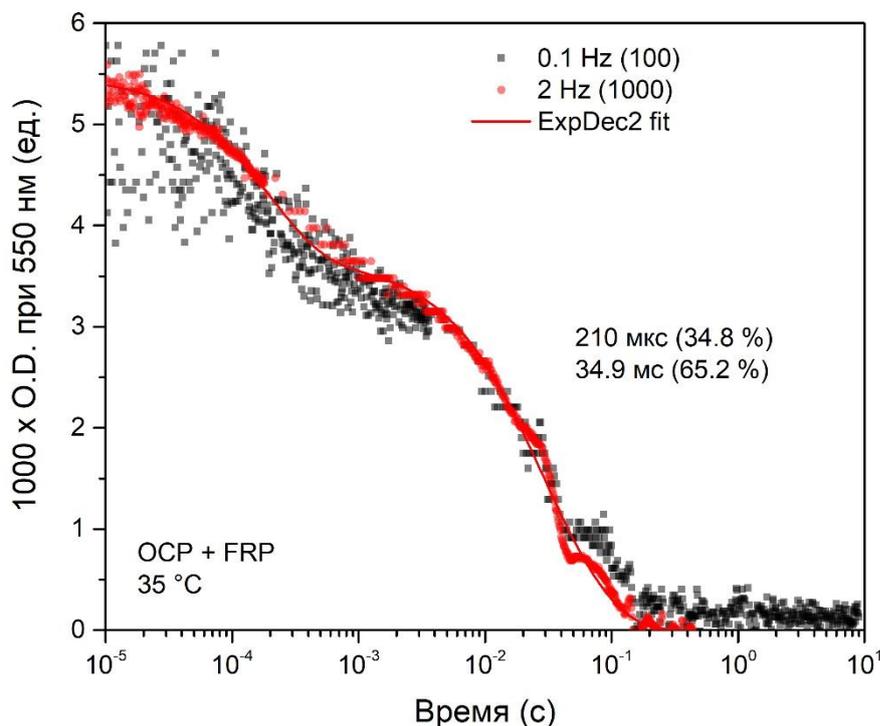


Рис. 8. Кинетика изменения оптической плотности оранжевого каротиноидного белка при 550 нм полученная при возбуждении образца 7 нс лазерным импульсом на длине волны 532 нм.

Для определения времен жизни возбужденных состояний молекул каротиноидов в белках использовали уникальный метод абсорбционной фемтосекундной спектроскопии, разработанный сотрудниками Института химической физики имени Н. Н. Семёнова РАН. Выходной сигнал генератора Ti: Sapphire (800 нм, 80 МГц, 80 фс, «Tsunami», Spectra-Physics, США) усиливался регенеративным усилителем («Spitfire», Spectra-Physics, США). Частота следования усиленных лазерных импульсов была установлена на уровне 100 Гц. Усиленные импульсы (800 нм, 100 Гц, 1,2 мДж, 80 фс) разделялись на два луча. Один из лучей ослабляли до 0,4 мДж и направлялся на неколлинеарный оптический параметрический усилитель (Clark-MXR), излучение которого использовалось в качестве импульса накачки. Импульс накачки имел гауссову форму с центром на длине волны 520 нм, длительность 26 фс на полувысоте и энергию импульса 50 нДж. Второй пучок ослабляли до 1 мкДж и фокусировался

в кварцевую кювету 3 мм с водой для создания зондирующего импульса суперконтинуума в диапазоне длин волн 400-900 нм.

Импульсы накачки и зондирования задерживались друг относительно друга управляемой компьютером линией задержки в диапазоне 0-500 пс с разрешением от 3,3 фс до 1 пс. Затем импульсы ослабляли, рекомбинировали и фокусировали в проточной ячейке для образцов с оптическим путем 0,5 мм. Диаметр пучка накачки и зондирования составляли 200 и 80 мкм соответственно. Относительная поляризация пучков накачки и зондирования была установлена на $54,7^\circ$ («магический угол»). Эксперименты проводили при 293 К. Скорость циркуляции в проточной ячейке составляла 8 мл / мин.

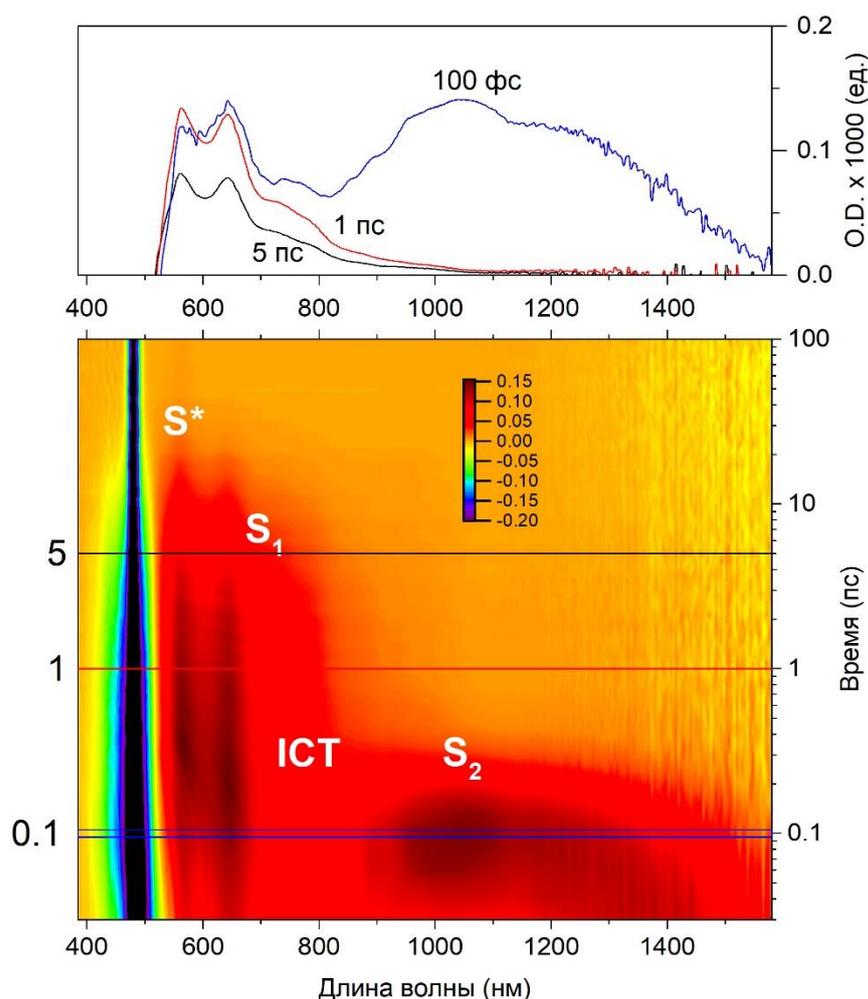


Рис. 9. Характерный вид дифференциальных спектров поглощения оранжевого каротиноидного белка через 100 фс, 1 и 5 пс после возбуждения 30 фс импульсом при 480 нм (сверху) и соответствующий массив данных для всех доступных временных задержек (снизу). Цветовая шкала показывает изменения оптической плотности в mO.D.

Зондирующей импульс суперконтинуума прошедший через образец направляли на полихроматор («Acton SP-300», Roper Scientific, США) и регистрировали ПЗС-камерой («Newton», Андор, США). Быстрые изменения спектров поглощения $\Delta A(t, \lambda)$ регистрировали в диапазоне 400–900 нм.

Измеренные дифференциальные спектры были скорректированы с учетом дисперсии групповой задержки суперконтинуума. Обработку экспериментальных данных проводили с помощью методов глобального и таргетного анализа в пакете программ Glotaran [149]. При глобальном анализе кинетики при всех длинах волн анализировались одновременно с набором общих констант скоростей.

2.2.2 Оценка выхода возбужденных состояний с помощью спектрофлуориметрии

При поглощении фотона электрон в молекуле переходит на одну из свободных орбиталей, и молекула оказывается в возбужденном состоянии [150]. Таких уровней может быть несколько (S_1, S_2, \dots, S_N) и электрон может оказаться на любом из них, в зависимости от того, какой была энергия поглощенного излучения. Обратный переход электрона на основной энергетический уровень приводит к уменьшению энергии системы, которая может растрачиваться по следующим каналам:

- испускаться в виде кванта флуоресценции с вероятностью пропорциональной соответствующей константе скорости k^{fl} ;
- растрачиваться на колебательные движения ядер и поступательное движение молекулы вещества k^d ;
- растрачиваться при взаимодействии возбужденной молекулы с молекулой тушителя флуоресценции k^q ;
- расходоваться при переходе молекулы в триплетное состояние k^{st} ;
- растрачиваться при осуществлении фотохимических реакций k^{PC} .

Квантовый выход процесса дезактивации возбужденного состояния в общем виде определяется соотношением [148]:

$$\varphi_i = \frac{k_i}{\sum_i k_i} \quad (5)$$

Квантовый выход флуоресценции, отражающий вероятность дезактивации возбужденного состояния по излучательному пути определяется отношением констант скоростей излучательной и безызлучательной дезактивации возбужденного состояния:

$$\varphi^{fl} = \frac{k^{fl}}{\sum_i k_i} = \frac{k^{fl}}{k^{fl} + k^d + k^q + k^{st} + k^{PC}} \quad (6)$$

Исследование спектров флуоресценции – зависимости интенсивности излучения от длины волны $I^{fl} = f(\lambda)$ - позволяет проводить качественный и количественный анализ различных компонентов в биологических и модельных системах, изучать их взаимодействие друг с другом.

Качественный люминесцентный анализ основан на сравнении формы спектров исследуемой смеси веществ с формой спектра индивидуальных соединений, которые могут входить в состав смеси. Для люминесцентного анализа используются растворы с низкой оптической плотностью, в противном случае возникает необходимость учитывать эффекты экранирования и реабсорбции [148]. Важной особенностью спектра флуоресценции многокомпонентных систем является зависимость его формы от длины волны возбуждения (т.к. при разных длинах волн могут возбуждаться разные соединения).

Количественный люминесцентный анализ проводится в соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бера, согласно которому количество поглощаемой световой энергии: $I = I_0 e^{-c\epsilon d}$. Интенсивность флуоресценции пропорциональна интенсивности возбуждающего света I_0 , квантовому выходу флуоресценции, и коэффициенту поглощения $(1 - T)$ [148]:

$$I^{fl} = I_0 \varphi^{fl} K (1 - T) = I_0 \varphi^{fl} K (1 - 10^{-c\epsilon d}) \quad (7)$$

Константа K зависит от следующих условий эксперимента:

- от телесного угла, в пределах которого детектируется излучение от исследуемого образца
- ширины спектрального интервала, вырезаемого монохроматором,
- пропускания монохроматора,
- чувствительности детектора.

Из выражения для I^{fl} видно, что интенсивность флуоресценции не пропорциональна концентрации, но при малой оптической плотности ($D < 0,1$ ед.) можно использовать выражение, которое получается при разложении выражения для I^{fl} в степенной ряд и учете только первого члена этого ряда:

$$I^{fl} = 2.3 I_0 \varphi^{fl} K c \epsilon d \quad (8)$$

Таким образом, при низких концентрациях флуоресцирующего вещества интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации вещества. На этом основан количественный флуоресцентный анализ.

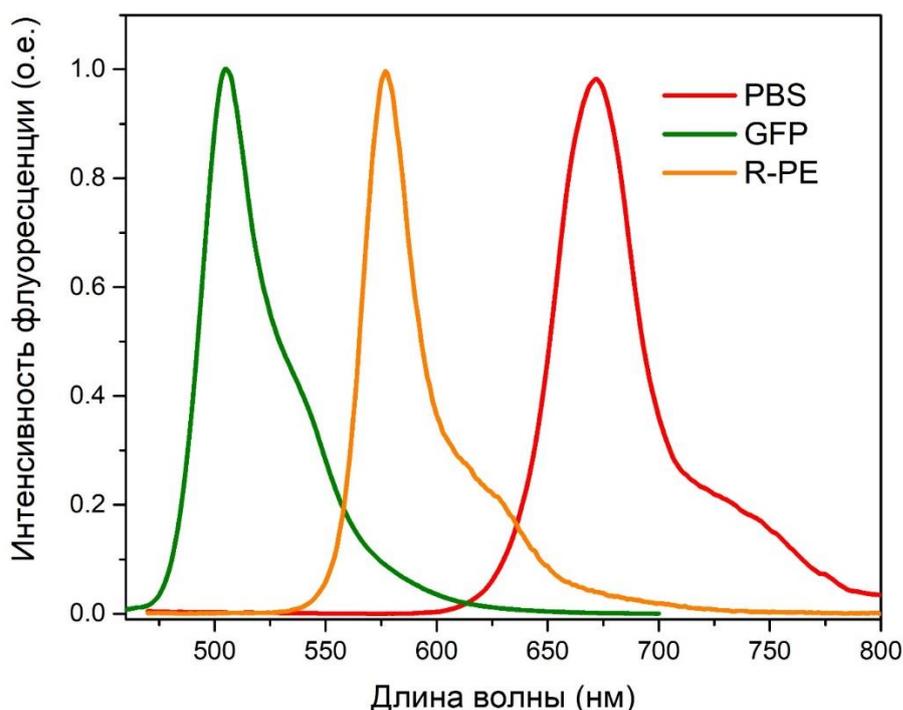


Рис. 10. Спектры флуоресценции фикобилисом (ФБС) *Synechocystis* sp. PCC6803, R-фикоэритрина (R-PE) и зеленого флуоресцентного белка при возбуждении 405 нм. Спектры нормированы на значения максимальной интенсивности флуоресценции.

В данной работе стационарные спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Horiba Fluoromax 4 (Франция), оснащённого монохроматором, и спектрометров на основе ПЗС-матриц Flame и Maya 2000 PRO, (Ocean Optics, США). Для измерений образцы разводили средой культивирования или буфером до оптической плотности, не превышающей 0.05 единиц оптической плотности в максимуме интенсивности полосы поглощения. Оптическая полуширина щелей возбуждающего и измеряющего монохроматоров равнялась 5 нм. Для приборов на основе ПЗС-матриц использовали входные щели 50, 100 и 200 мкм. Измерения изменений интенсивности флуоресценции с временным разрешением порядка 10-100 мс проводили с использованием кинетического режима Fluoromax 4 или режима strip-chart приложения SpectraSuite (Ocean Optics, США).

2.2.3 Измерения кинетики световой индукции переменной флуоресценции хлорофилла

Флуоресценция хлорофилла (*Chl*) чувствительна к большому количеству фотосинтетических процессов, предоставляя важную информацию о функциональном состоянии фотосинтетического аппарата, в частности ФС II. Существует множество подходов, основанных на флуоресценции *Chl*, применяемых для изучения преобразования энергии электронного возбуждения и электронного транспорта в ФС II. Для изучения этих процессов разработаны и используются различные спектроскопические методы (см. обзоры Мамедова с соавт. [151] и Мирковича с соавт. [152]). Одним из наиболее мощных инструментов для исследования влияния стрессовых факторов на ФС II является индукция флуоресценции хлорофилла, измеряемая во время перехода объекта из состояния, адаптированного к темноте, к состоянию адаптированному к свету [153]. Регистрируемая кинетика изменения интенсивности флуоресценции представляет собой сложную многокомпонентную кривую, форма которой обусловлена устройством фотосинтетической системы, включающей в себя процессы, различающиеся по своим характерным временам (см. рис. 2), которые влияют на квантовый выход флуоресценции хлорофилла. Эффект увеличения интенсивности флуоресценции ФС2 объясняют восстановлением первичных хинонных акцепторов и переходом РЦ в так называемое «закрытое» состояние [154, 155]. Иначе говоря, рост переменной флуоресценции от минимального уровня F_0 до максимального F_M характеризует динамику накопления продуктов фотохимической реакции.

Каждый этап индукционной кривой можно использовать для анализа связанной стадии переноса электронов после реакции первичного разделения заряда в реакционном центре ФС II. Первую фазу, переход О-*J*, обычно связывают с насыщением восстановления Q_A - первичного акцептора электронов хинона в ФС II [156]. После возбуждения, разделения зарядов и генерации радикальной пары $P680 + Pheo^-$, молекула $Pheo^-$ восстанавливает Q_A за 200 пс,

который, в свою очередь, восстанавливает вторичный акцептор электронов хинон Q_B примерно за 0.5 мс [155]. Эти первичные фотохимические реакции определяют скорость увеличения интенсивности флуоресценции в фазе OJ, которая насыщается примерно за 2 мс и сильно зависит от интенсивности света и размера светособирающей антенны [157], но не зависит от температуры [158, 159].

Для количественного описания индукционных кривых флуоресценции высших растений и зеленых водорослей Штрассером (Strasser) был предложен подход, названный в последствии JР-тест [160], позволяющий с помощью достаточно простых арифметических преобразований получать около десяти различных характеристик первичных процессов фотосинтеза в ФС II. Однако, для цианобактерий данный подход не применим из-за значительного вклада флуоресценции ФБС, перекрывающейся с флуоресценцией хлорофилла в красной части спектра.

Как отмечалось ранее (см. раздел 1.4), квантовый выход компонентов светособирающих антенн цианобактерий - фикобилинов достигает 0.6, а их концентрация в клетке значительно превышает концентрацию любых других пигментов. В таких условиях затруднительным становится корректное определение и интерпретация начального уровня флуоресценции F_0 с помощью РЕА, FIRE и подобных приборов [161, 162], регистрирующих индукционные кривые флуоресценции хлорофилла. Поэтому, известное отношение $(F_M - F_0)/F_M$ в данном случае не отражает истинной активности фотосинтетической цепи, как и другие параметры JР-теста. Поэтому для исследования таких систем необходимо использование альтернативных аналитических методов.

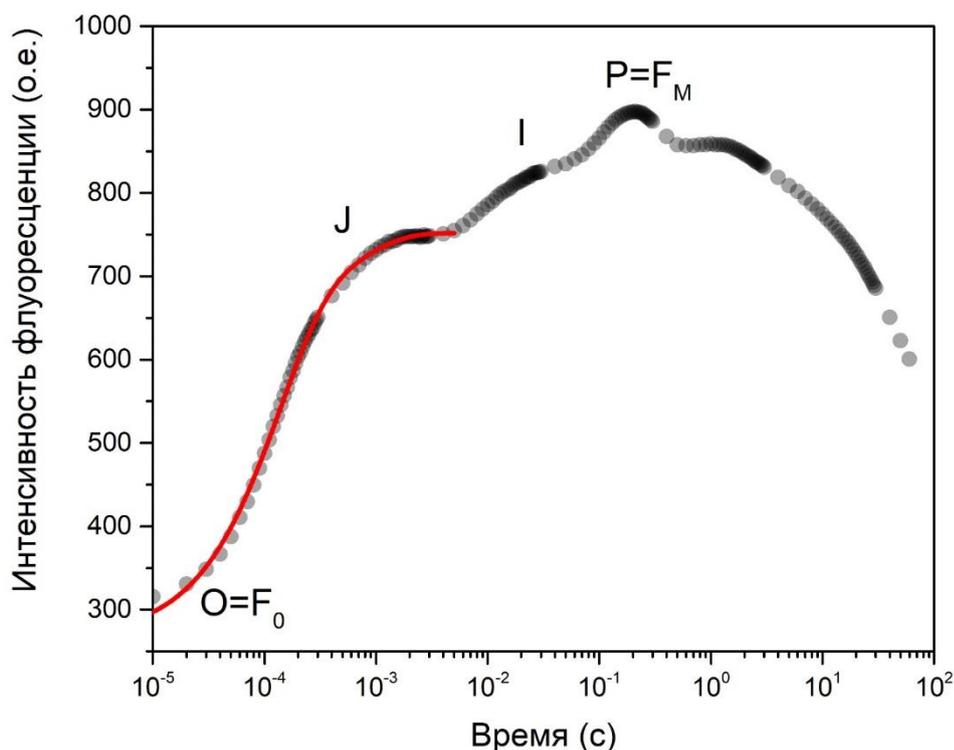


Рис. 10. Характерный вид кинетики световой индукции переменной флуоресценции хлорофилла. Красным показана аппроксимация начального участка индукционной кривой (OJ) с помощью экспоненциально затухающей функции.

Анализ индукционных кривых, предложенный Фальковски (Falkowski), заключается в том, что индукционные кривые флуоресценции аппроксимируют суммой экспонент [163]:

$$X(t) = 1 - \left[\sum_i A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \right], \quad (9)$$

где A_i - амплитуды компонент, τ_i - соответствующие им временные постоянные. Обычно, τ_2 более чем на порядок превосходит τ_1 , таким образом, экспоненциальные составляющие функции $X(t)$ не перекрываются во времени [164]. Если принять минимальное значение флуоресценции F_0 равным нулю, а максимальное F_M - равным единице, то значение функции $X(t)$ будет соответствовать доле РЦ в закрытом состоянии в момент времени t . Таким образом, нормировка индукционных кривых позволяет анализировать изменение флуоресценции хлорофилла, исключив постоянный вклад флуоресценции антенных комплексов фикобилисом.

Константа скорости фотохимической реакции пропорциональна плотности потока фотонов возбуждающего импульса I_0 и эффективному сечению флуоресценции РЦ ФС II $\sigma_{ФСII}$ [164]. Поэтому доля РЦ ФС2 в закрытом состоянии $X(t)$ может быть определена следующим образом:

$$X(t) = 1 - e^{-\sigma_{ФСII}I_0t} \quad (10)$$

Таким образом, данный подход к анализу индукционных кривых позволяет оценить эффективную величину антенного комплекса, в результате измерения сечения флуоресценции РЦ ФС II $\sigma_{ФСII}$.

Для исследования процессов переноса энергии в природных и гибридных системах регистрировали кривых индукции флуоресценции с помощью приборов: Handy-PEA (Plant Efficiency Analyzer) Hansatech (Великобритания) с длиной волны возбуждающего света 655 нм; FRe (США) возбуждение 470 и 590 нм; FL-3000 с возможностью температурной стабилизации образца и возбуждением флуоресценции при 635 нм PSI (Чехия); а также флуориметр высокого временного разрешения, разработанный на кафедре биофизики биологического факультета МГУ, возбуждение 455 нм [161].

2.2.4. Измерение времен жизни возбужденных состояний проводили с помощью спектроскопии высокого временного разрешения.

Как известно, интенсивность флуоресценции I^{fl} прямо пропорциональна квантовому выходу флуоресценции φ^{fl} , но также зависит от ряда других параметров, которые могут меняться в эксперименте: $I^{fl} \sim \varphi^{fl} I_0 \varepsilon_{\lambda} c K$ [148]. Поэтому изменения интенсивности флуоресценции можно однозначно связывать с изменениями квантового выхода лишь в системах, для которых все прочие параметры постоянны.

С другой стороны, квантовый выход флуоресценции φ^{fl} определяется простым отношением констант скоростей излучательной и безызлучательной дезактивации возбужденного состояния, и пропорционален времени жизни возбужденного состояния τ [148]:

$$\varphi^{fl} = \frac{k^{fl}}{\sum_i k_i} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (11)$$

Очевидно, любые изменения квантового выхода флуоресценции сопровождаются изменениями времени жизни флуоресценции τ . Иначе говоря, измерение времени жизни позволяет получить оценку квантового выхода флуорофора вне зависимости от его концентрации.

Для регистрации мгновенных спектров флуоресценции ФБС, флуоресцентных белков, триптофановых остатков в белках и белков, меченых флуоресцентными красителями, в данной работе использовали метод время-коррелированного счета единичных фотонов (Time Correlated Single Photon Counting, TCSPC), реализованный на детекторах и платах Becker&Hickl (Германия).

Метод счета фотонов позволяет регистрировать кинетики затухания флуоресценции различных соединений и определять не только интенсивность флуоресценции I_{fl} , но и время жизни возбужденного состояния τ . Возбуждение флуоресценции осуществляется фемто- и пикосекундными лазерами с низкой

интенсивностью, что позволяет предотвратить фотодеградацию образца. Единичные кванты флуоресценции, попадающие на детектор, регистрируются как отдельное событие, поэтому соотношение сигнал-шум зависит от времени накопления сигнала, что позволяет регистрировать кинетики затухания флуоресценции сильно разбавленных растворов и единичных молекул. Использование мегагерцовых лазеров позволяет накапливать информацию о большом количестве фотонов за короткие временные интервалы.

Поскольку время жизни флуоресценции не зависит от геометрии образца, метод счета фотонов позволяет работать как с растворами, так и с твердыми телами.

На данный момент, нами разработан измерительный комплекс, основанный на платах SPC-130, DCC-100 и 16 канальном детекторе с полихроматором PLM-16-C (Becker & Hickl, Германия), позволяющий одновременно регистрировать до 16 кинетик затухания флуоресценции в спектральном диапазоне от 250 до 800 нм с пикосекундным временным разрешением. Для возбуждения флуоресценции в работе использовали набор пикосекундных лазеров – 270 и 280 нм (Edinburgh Instruments, Великобритания), 405 и 510 нм (InTop, Россия) и 635 нм (Becker & Hickl, Германия), а также параметрический фемтосекундный генератор световых импульсов TOPOL-1050-C (Avesta Ltd., Россия) с возможностью плавной перестройки длины волны излучения в диапазонах от 680 до 1000 нм (signal) и от 1100 до 2300 нм (idler). При помощи гальвано-сканера DSC-120 (Becker&Hickl, Германия) измерительный комплекс совместим с флуоресцентным микроскопом, что позволяет получать конфокальные флуоресцентные изображения микроскопических объектов в режиме регистрации времени жизни возбужденных состояний (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM). Данный комплекс использовали для исследования энергетических взаимодействий каротиноидов с различными пигментами в составе белковых комплексов.

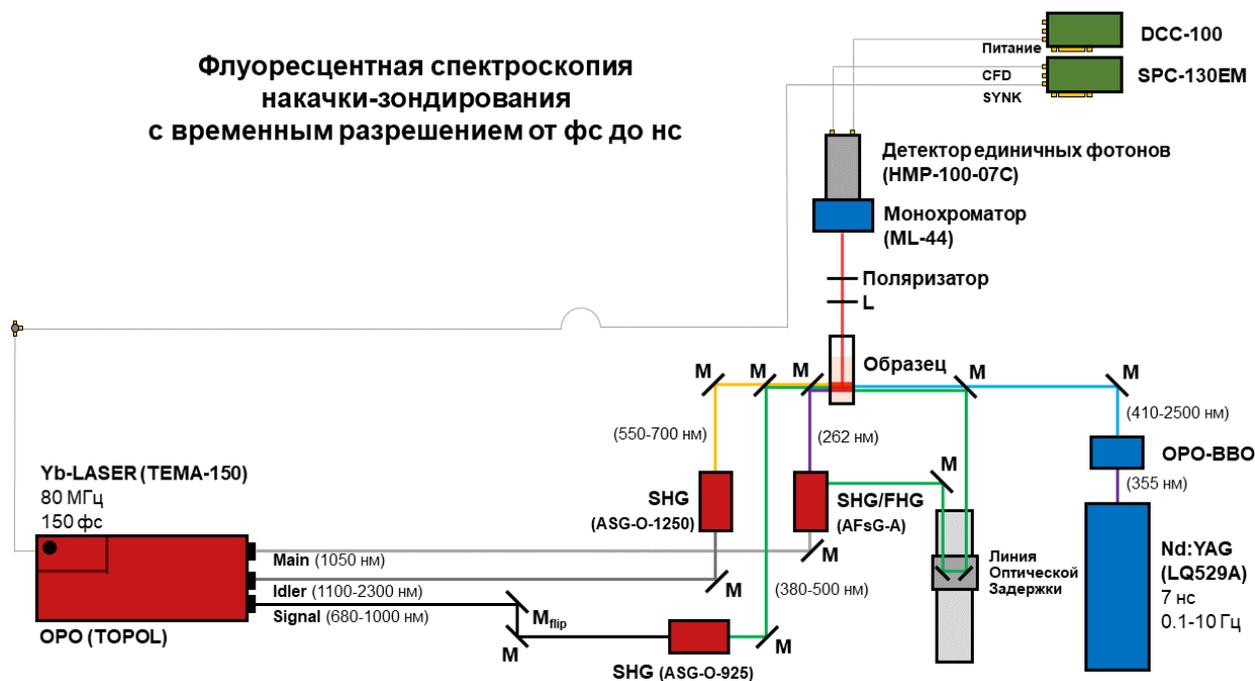


Рис. 11. Схема установки для проведения экспериментов по регистрации флуоресценции в режиме фемто-, пико- и наносекундной накачки и зондирования.

В экспериментах с фотоактивными белками на шкале времени от миллисекунд до секунд фотоактивацию запускали синим светодиодом (SOLIS-445C, Thorlabs, США), излучение которого дополнительно корректировали полосовым фильтром (450 нм, ширина 40 нм, Thorlabs, США). и сфокусировали на образце в кювете из кварцевого стекла. Температуру образца стабилизировали с помощью кюветодержателя Qpod 2e с элементом Пельтье (Quantum Northwest, США) и магнитной мешалкой. Собственную - триптофановую и триазиновую флуоресценцию белка возбуждали импульсным субнаносекундным (700 пс) УФ-светодиодом при частоте следования импульсов 20 МГц (EPLD 265, Edinburgh Instruments, Шотландия) с максимальной эмиссией при 270 нм и средней мощностью 0.6 мкВт, скорректированной с помощью металлического полосового фильтра (270 нм, ширина 15 нм, Chroma, США). Такая малая мощность зондирующего света не вызывала изменений уровня излучения триптофана и тирозина в ходе длительных экспериментов. Флуоресценцию образцов в диапазоне 300-400 нм собирали перпендикулярно пути возбуждающего луча через коллимационную линзу, соединенную со световодом 16-канального детектора

одиночных фотонов (PML-SPEC, Becker & Hickl, Германия). Спектрограф оснащен детектором PML-16-C и дифракционной решеткой 1200 линий / мм, что обеспечивало разрешение 6,25 нм для каждого отдельного спектрального канала. Флуоресценцию в 16 спектральных каналах одновременно регистрировали с помощью системы коррелированного по времени и длине волны однофотонного счета, основанной на модуле TCSPC (SPC-130EM, Becker & Hickl GmbH, Германия). Синий светодиод управляется драйвером светодиода (DC2200, Thorlabs, США), который также обеспечивает сигналы TTL для синхронизации с системой TCSPC. Аппаратное обеспечение TCSPC использовали в режиме FIFO, таким образом записывая поток спектрально разрешенных одиночных фотонов. В программном обеспечении для измерений (SPCM 9.82, <https://www.becker-hickl.com/products/category/software/> Becker & Hickl GmbH, Германия) использовался так называемый режим MCS_TA (многоканальное триггерное накопление), который использовал сигнал TTL от драйвера светодиода в качестве опорного триггера. Это позволило проводить последовательное усреднение и увеличение отношения сигнал-шум при записи кинетики изменений интенсивности флуоресценции триптановых остатков в белке при действии коротких (~ мс) актинических вспышках.

Для исследования скорости разрыва водородных связей в OCP в режиме фемтосекундной накачки и зондирования флуоресценцию триптофана возбуждали на длине волны 262 нм фемтосекундными импульсами, полученными от 4-й гармоники (FHG) фемтосекундного лазера на Yb (TEMA-150 и AFsG-A, Avesta Ltd., Россия), при частоте следования 150 фс импульсов 80 МГц. Вторая гармоника (SHG) от того же оптического генератора (525 нм) использовалась в качестве импульса накачки, поскольку ее излучение хорошо перекрывается с поглощением каротиноида в составе OCP. Временные задержки между импульсами накачки и зондирования контролировали оптической линией задержки (GCD-302002M, DHS, Китай). Мощность лазера регулировали с помощью нейтральных светофильтров и обычно в экспериментах не превышала 10 мВт для зондирующего импульса и 500

мВт для накачки. Схема установки показана на рис. 11.

Кинетику флуоресценции аппроксимировали затухающей экспонентой с учетом аппаратной функции в пакете программ SPCImage (Becker & Hickl GmbH, Германия). В случаях, когда использование моноэкспоненциальной модели не позволяло удовлетворительно описать затухание флуоресценции исследуемых образцов, использовали двух и трехэкспоненциальную модель, что позволяло значительно сократить значение χ^2 .

2.2.5 Спектроскопия и микроскопия комбинационного рассеяния света

использовалась для изучения конформации каротиноидов в белках и распределения каротиноидов по образцу. Для этого в работе использовали конфокальный микроскоп Ntegra Spectra (NTMDT, Россия) для которого была разработана система проточной циркуляции образца в стеклянных капиллярах. Линейно поляризованный свет от лазера фокусировали на объекте с помощью 20X (NA=0.4) или 50X (NA=0.8) объективов. Средняя мощность лазера на выходе из объектива составляла около 0.5 мВт. Время накопления одиночных спектров варьировали от 10 секунд до 2 минут в зависимости от типа измерений. Измерения КР спектров включали в себя одиночные спектры, спектры, зарегистрированные вдоль линии, или двумерные изображения.

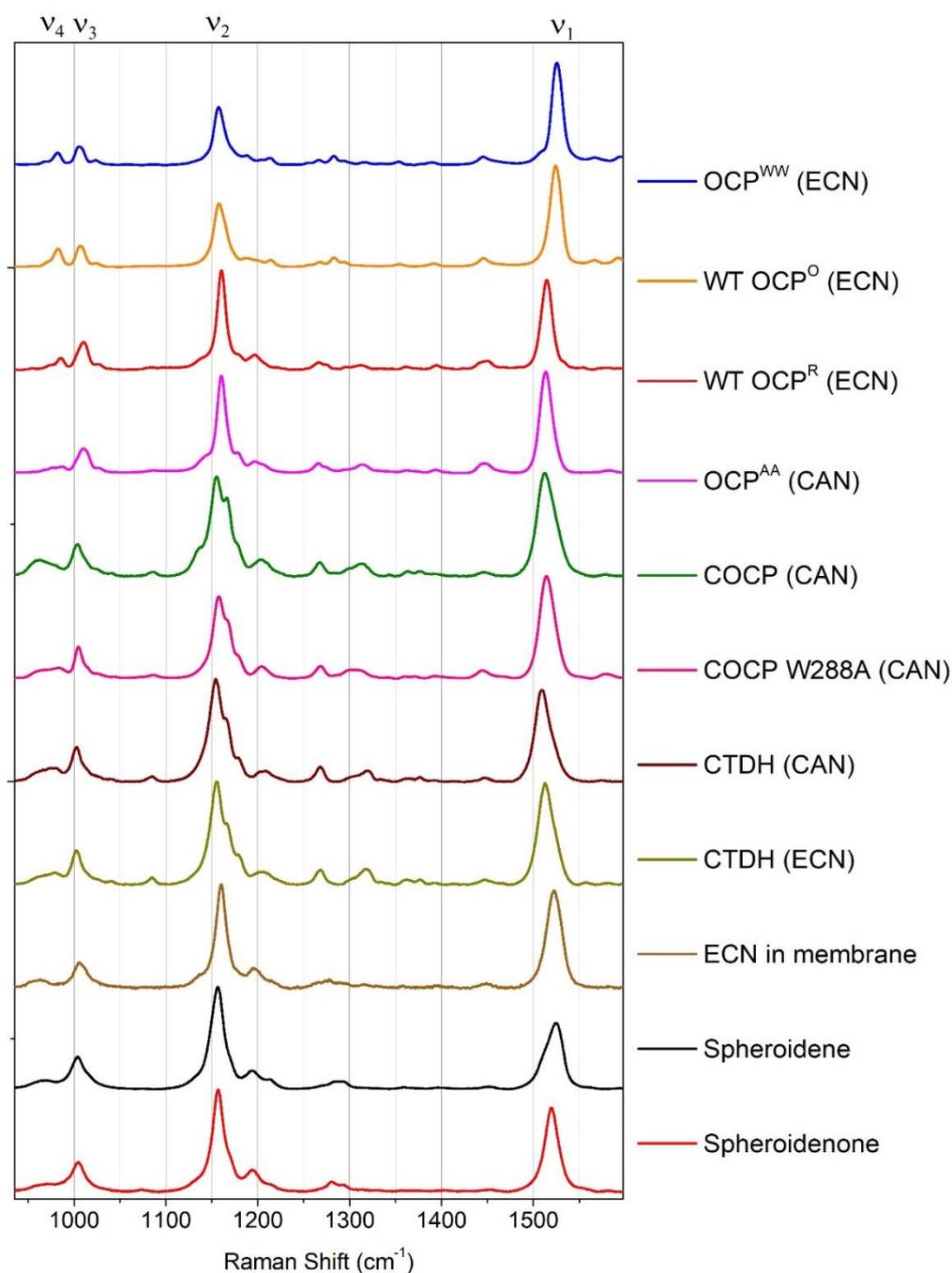


Рис. 12. Пример спектров комбинационного рассеяния различных каротиноидов в органических растворителях и в составе пигмент-белковых комплексов.

Спектр КР каротиноидов в диапазоне $800\text{-}1600\text{ см}^{-1}$ содержит 4 основные полосы (см. рис. 12), природа которых хорошо известна благодаря многочисленным экспериментальным работам [165-168] и теоретическом описанию с помощью методов квантовой химии (теория функциональной плотности) [169, 170]. К основным колебаниям относятся: ν_1 – колебания двойных связей (1520 см^{-1}), ν_2 – колебания одинарных связей (1160 см^{-1}), ν_3 - колебания

метильных групп (1010 см^{-1}), и ν_4 – колебания атомов водорода вне плоскости полиеновой цепи (hydrogen out of the plane, HOOP, 980 см^{-1}). Оценка положения частотных сдвигов в спектрах КР является удобным инструментом для изучения конфигурации молекулы каротиноида, поскольку основные оптические свойства данной молекулы определяются эффективной длиной сопряжения π -электронов.

Изменения элементов вторичной структуры белков исследовали с помощью методов спектроскопии кругового дихроизма (спектрометры Chirascan dichroism spectrophotometer (Applied Photophysics) и J-1100 CD spectrometer (Jasco, Германия)) [171] и ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием (спектрометр PerkinElmer Spectrum-2) [172].

2.2.6 Исследования структуры белков и белковых комплексов в растворе были выполнены с помощью: (1) дифрактометрии малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (Small Angle X-ray Scattering, SAXS) на синхротроне DESY - PETRA III – P12 (Гамбург, Германия); (2) дифрактометрии малоуглового рассеяния нейтронов (MLZ, Гархинг-бай-Мюнхен, Германия). Пространственные структуры ОСР и АнаСТДН высокого разрешения были получены с помощью анализа дифракции рентгеновских лучей на синхротронах DESY Petra III (P14 beamline, Гамбург, Германия) и European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, beamline ID 30-A1, Гренобль, Франция).

Интенсивность малоуглового рассеяния I от пространственной координаты q (пропорциональной углу рассеяния θ , см. рис. 13.) на разбавленном растворе монодисперсных частиц в общем виде подчиняется уравнению [173]:

$$I(q) \approx Mc\Delta\rho^2V^2P(q)S(q) \quad (12)$$

где M – молекулярный вес частицы, c - концентрация частиц, Δ - разница плотностей длин рассеяния образца и растворителя, V - объем рассеивающей частицы, $P(q)$ – форм фактор, который является функцией усредненной формы и размера рассеивающих частиц, $S(q)$ - эффективный структурный фактор, который

равен единице для разбавленных растворов в отсутствии взаимодействия между отдельными частицами. Эти параметры определяют возможности метода для изучения формы биологических макромолекул, их взаимодействия при образовании комплексов и конформационную подвижность [174].

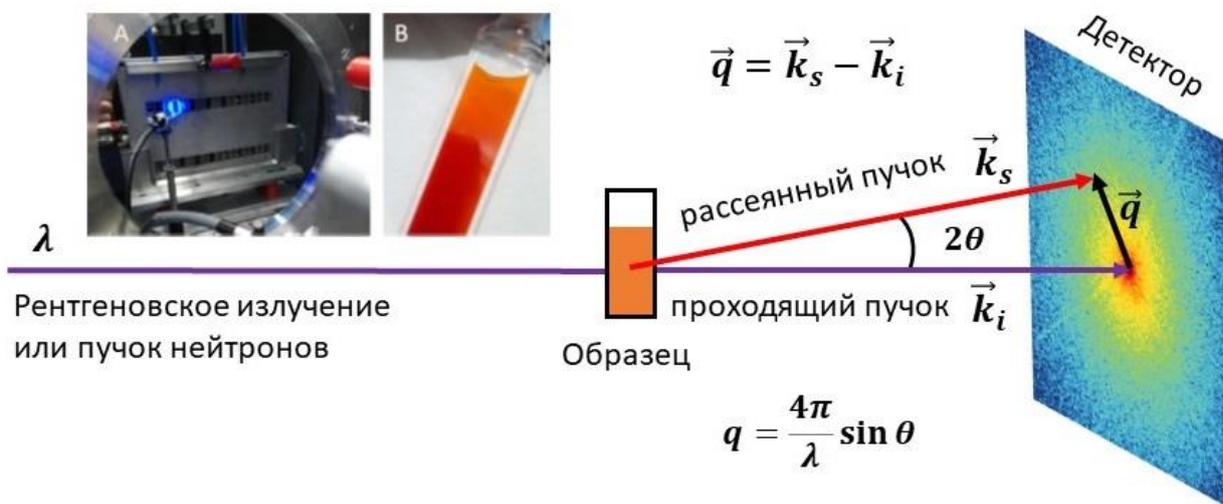


Рис. 13. Принципиальная схема экспериментов по измерению интенсивности рассеяния на растворах белков. Фотографии показывают установку для облучения образца каротиноидного белка в процессе регистрации малоуглового рассеяния нейтронов и образец ОСР после облучения синим светом.

Функция парной корреляции $p(r)$ и максимальный размер частицы D_{max} были определены путем аппроксимации экспериментальных данных с использованием метода преобразования Фурье (Indirect Fourier Transform, IFT), реализованного в программе GNOM [175]. Структуры с низким разрешением были получены с использованием функции DAMMIN пакета программ ATSAS [176], разработанного под руководством Д.И. Свергуна. Структурные модели, полученные в рамках одного исследования, обычно усреднялись по 20 итерациям. Данные SAXS и SANS были проанализированы с помощью программного пакета CORAL (COmplexes with RANdom Loops), который позволяет учитывать гибкие части в известной кристаллической структуре, в то время как оставшаяся часть молекулы моделируется как твердое тело. В анализе, проведенном для красной формы ОСР^R, структурные домены NTD (остатки 19-163) и CTD (остатки 171-311)

были представлены как твердые тела на основе структуры 3MG1. В свою очередь, N-конец, соответствующий первым 18 остаткам, и линкерная область (остатки 164-170) были подвижными.

Программы CRY SOL и CRYSON [177] использовали для расчета теоретических кривых SAXS и SANS, соответственно, на основе кристаллических структур и моделей, полученных в результате анализа DAMMIN и CORAL [178].

SANS-эксперименты на образцах OCP и OCPW288A проводились на малоугловом дифрактометре KWS-1 (JCNS, MLZ, Гархинг, Германия). KWS-1 идеально подходит для выполнения измерений с высоким разрешением благодаря малому разбросу длин волн. Длина волны нейтронов, использованная в эксперименте, составляла 5 Å. Измерения проводили на двух расстояниях между образцом и детектором равным 8 и 20 м, что позволило покрыть диапазон q от 0,006 до 0,45 Å⁻¹. Процедура обработки данных включала коррекцию по маске чувствительности детектора. Обработка первичных данных осуществлялась с помощью программы QtiKWS (<https://www.qtisas.com/qtikws>).

SAXS-данные были получены с помощью синхротронного излучения PETRA III – P12 (DESY, Гамбург, Германия) с длиной волны 1.24 Å при 10 °C. Для каждого образца собирали не менее 20 кадров с экспозицией порядка 50 мс, контролируя наличие или отсутствие повреждений образца связанных с облучением рентгеном.

Методы рентгеноструктурного анализа были использованы для получения модели мутанта OCP с заменой тирозина-288 на триптофан. Для этого методом «висящей капли» были получены кристаллы белка размером порядка 100 мкм. Данные дифракции рентгеновских лучей были собраны при температуре 100 К на установке P14 синхротрона DESY-Hamburg (Petra III, Германия) с использованием детектора Dectris EIGER 16M. Дифракционные данные обрабатывали с помощью программы XDS. Структуры были расшифрованы с использованием молекулярного замещения в MOLREP [179] и структуры PDB ID 4XB5 в качестве

модели для поиска. Перед уточнением молекула кантаксантина, присутствующая в структуре 4XB5, была удалена, чтобы избежать систематической ошибки при моделировании структуры белка с эхиненоном. Затем эхиненон был вручную достроен в соответствующей электронной плотности в программе Coot и использован для уточнения с помощью REFMAC [180]. Координаты атомов и структурные факторы были депонированы в базу данных белков (PDB).

Для изучения конформационной динамики каротиноидного белка AnaSTDH в растворе были измерены гомоядерные и гетероядерные спектры ЯМР. Работа была выполнена в рамках сотрудничества с Лабораторией магнитной томографии и спектроскопии ФФМ МГУ. Полученные результаты были использованы для определения вторичной структуры и подвижности белковой цепи AnaSTDH. Отнесение сигналов ^1H , ^{13}C и ^{15}N белковой цепи проводили путем анализа 3D спектров ЯМР. Расчеты были выполнены с помощью программы TALOS+ [181].

Спектры ЯМР димера STDH измерены на спектрометре Bruker AVANCE 850 МГц, оборудованном трехканальным (^1H , ^{13}C , ^{15}N) криодатчиком. Измерение было выполнено на оборудовании Центра высокопольного ЯМР академии наук Тайваня (High-Field Nuclear Magnetic Resonance Center, Academia Sinica). Для измерения был использован образец димерной формы STDH, обогащенного изотопами ^{13}C и ^{15}N в комплексе с кантаксантином (с природным содержанием изотопов ^{13}C и ^{15}N). Концентрация белка (в пересчете на мономер) составляла 0.2 мМ. Спектры измерены в растворе 90% H_2O , 10% D_2O . Температура измерения спектров ЯМР – 40 °С.

Были измерены 2D спектры гетероядерной корреляции ^{13}C - ^1H HSQC и ^{15}N - ^1H HSQC, а также 3D спектры ^{13}C - ^1H NOESY-HSQC и ^{15}N - ^1H NOESY-HSQC (время смешения 120 мс) [182]. Отнесение сигналов белка в спектрах основано на сравнении с аналогичными спектрами мономера STDH. Во всех случаях было проведено сравнение не только положения резонансов амидных сигналов в спектрах ^{15}N - ^1H NOESY-HSQC и СН резонансов в спектрах ^{13}C - ^1H NOESY-HSQC,

но и кросс-пиков в 3D спектрах NOESY, характеризующих пространственную близость протонов групп NH или CH (CH₂, CH₃) к другим протонам. Наблюдение характеристических паттернов кросс-пиков позволило сделать однозначное отнесение для большинства амидных сигналов.

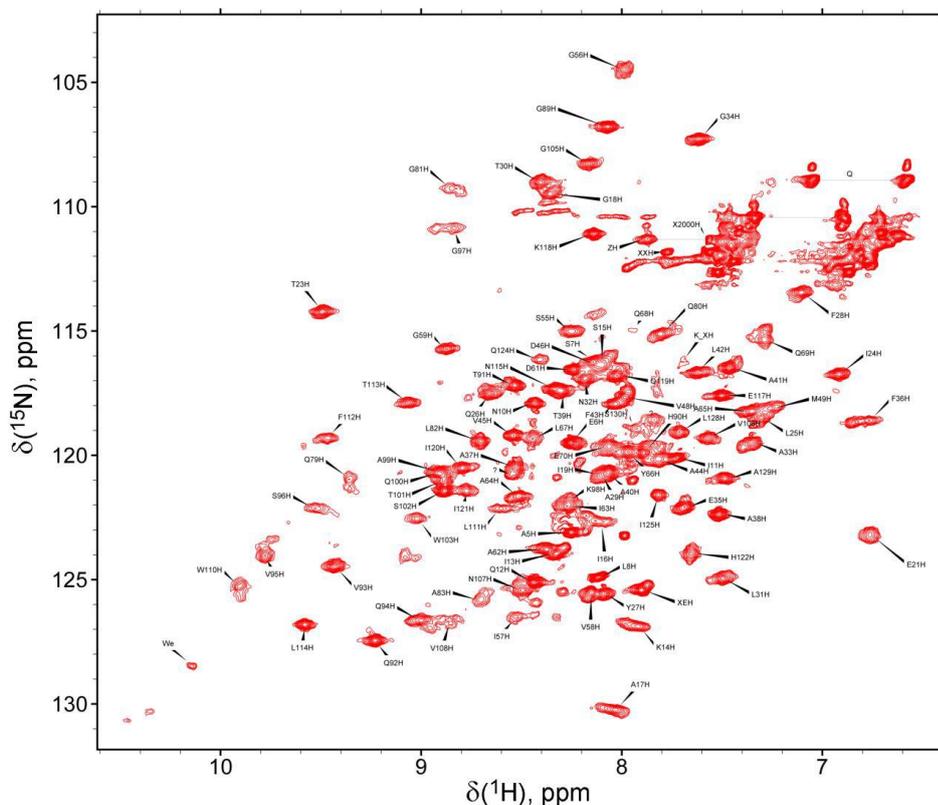


Рис. 14. Спектр ¹⁵N-¹H HSQC белка аро-CTDH, измеренный при частоте 800 MHz и температуре 35 °C. Концентрация белка 0.5 mM. Показано отнесение сигналов амидных групп белковой цепи.

Белок-белковые взаимодействия и образование комплексов изучали с помощью методов аналитической гель-фильтрации (AnSEC) с возможностью регистрации спектров поглощения и флуоресценции исследуемых образцов [183], нативного и SDS-электрофореза [140].

Для моделирования влияния конформации каротиноидов на спектральные свойства белковых препаратов использовали методы квантовой химии (теория функциональной плотности, DFT) [184-186] и молекулярной динамики с использованием пакета программ GROMACS 5.0.6 [187].

2.3 Методы описания переноса энергии электронного возбуждения

Поскольку при обсуждении результатов далее будет часто использоваться терминология, принятая при описании процессов миграции энергии, в данном разделе рассмотрены основы методов и условия их применения для исследования систем донор-акцептор.

2.3.1 Флуоресцентный резонансный перенос энергии

Разработка феноменологической теории резонансной миграции энергии была начата в работах С. И. Вавилова [188]. В них было учтено существенное обстоятельство, что вероятность передачи энергии определяется всеми молекулами, окружающими данную, т.е. явление носит статистический характер. В дальнейшем эта теория переноса энергии возбуждения получила развитие в работах Ферстера [189], Галанина и Декстера [188, 190-192]. Полученные в них результаты позволили связать вероятности переноса энергии от одной молекулы к другой с вероятностями электронно-колебательных переходов в каждой молекуле, т.е. с оптическими характеристиками взаимодействующих молекул. Ферстеровский (иногда Флуоресцентный) резонансный перенос энергии (Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer, FRET) — это перенос энергии возбужденного состояния от донора к акцептору, происходящий без промежуточного испускания фотонов и является результатом диполь-дипольных взаимодействий между донором и акцептором. Скорость переноса энергии зависит от степени перекрытия спектра испускания донора со спектром поглощения акцептора, относительной ориентации дипольных моментов переходов и расстояния между молекулами [189]. Именно это привело к широкому использованию FRET для измерения расстояний между донорами и акцепторами [192, 193]. Следует отметить, что для измерений необходимо, чтобы донорно-акцепторная пара была разделена расстоянием, которое не изменялось бы за время жизни возбужденного состояния донора.

Рассмотрим донор и акцептор, находящиеся на фиксированном расстоянии R . Константа скорости переноса энергии от донора к акцептору k_t определяется выражением:

$$k_t = \frac{9000 \cdot \ln 10 \cdot k^2 \varphi_d}{2^7 \cdot \pi^5 \cdot n^4 \cdot N_A \cdot R^6 \cdot \tau_d} \int_0^\infty \frac{F_d(\nu) \cdot \varepsilon_a(\nu)}{\nu^4} d\nu, \quad (13)$$

где k^2 – фактор, описывающий взаимную ориентацию в пространстве дипольных моментов переходов донора и акцептора (пример на *рис. 15*), который может быть вычислен по формуле $k^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_d \cdot \cos\theta_a)^2$ (см. *рис. 5*), φ_d – квантовый выход донора в отсутствие акцептора, n – показатель преломления среды, N_A – число Авогадро, R – расстояние между донором и акцептором, τ_d – время жизни возбужденного состояния донора в отсутствие акцептора, ν – волновое число, $F_d(\nu)$ – нормированный спектр флуоресценции донора в шкале волновых чисел в диапазоне от ν до $\nu + \Delta\nu$ (суммарная интенсивность принимается равной единице), $\varepsilon_a(\nu)$ – коэффициент экстинкции акцептора, соответствующий волновому числу ν [194, 195].

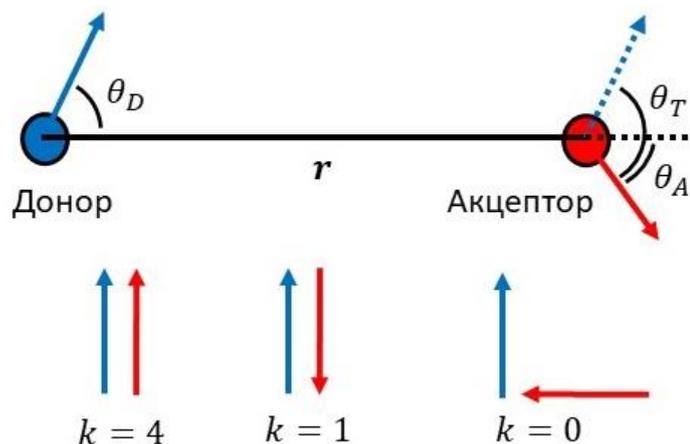


Рис. 15. Дипольные моменты переходов донора (D) и акцептора (A), находящиеся на фиксированном расстоянии R . (θ_T , - угол между диполем испускания донора и диполем поглощения акцептора, θ_d и θ_a — углы между этими диполями и вектором, соединяющим донор и акцептор).

Если обозначить φ_d / τ_d φ_d как λ_d (константа скорости испускания донора), а интеграл по волновому числу как J (интеграл перекрывания спектров) и подставить все константы, выражение для константы скорости примет следующий вид:

$$k_t = 8.71 \cdot \frac{J \cdot k^2 \cdot \lambda_d}{n^4 \cdot R^6} \cdot 10^{23} \quad (14)$$

Интеграл перекрывания, отражающий степень спектрального перекрывания между испусканием донора и поглощением акцептора, может быть также записан в другой форме в шкале длин волн (λ):

$$J = \int_0^\infty F_d(\lambda) \cdot \varepsilon_a \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (15)$$

Также для упрощения уравнения (13) можно объединить постоянные члены. При этом вводится понятие ферстеровского радиуса (R_0) как расстояния, на котором константа скорости переноса энергии (k_t) равна константе скорости затухания флуоресценции донора в отсутствие акцептора (τ_d^{-1}). На этом расстоянии половина молекул донора дезактивируется за счет переноса энергии, а половина – по обычным излучательным или безызлучательным механизмам. Из уравнения (13) и условия $k_t = \tau_d^{-1}$ получаем:

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot \ln 10 \cdot k^2 \cdot \varphi_d}{2^7 \cdot \pi^5 \cdot n^4 \cdot N_A} \int_0^\infty \frac{F_d(\nu) \cdot \varepsilon_a(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad (16)$$

Подставив это выражение в уравнение (13) получаем простое выражение для константы скорости переноса энергии:

$$k_t = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (17)$$

Обычно Ферстеровский радиус находится в пределах 20-100 Å. Этот диапазон расстояний сравним с диаметром большинства белков и толщиной биологических мембран, что приводит к многочисленным применениям методов

регистрации переноса энергии в биологических исследованиях [148, 196-198]. Любые явления, которые оказывают влияние на расстояние между донором и акцептором, будут влиять на скорость переноса энергии, что позволяет охарактеризовать их количественно с помощью время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии.

Часто в экспериментах стремятся измерить эффективность переноса энергии E , которая определяется как доля экситонов, передающихся от донора к акцептору безызлучательно:

$$E = \frac{k_t}{\tau_d^{-1} + k_t} \quad (18)$$

Возможность оценки эффективности переноса энергии основана на измерении абсолютного или относительного квантового выхода флуоресценции в присутствии F_{da} и в отсутствие F_d акцептора или времен затухания в этих же условиях (τ_{da} и τ_d соответственно):

$$E = 1 - \frac{\varphi_{da}}{\varphi_d} = 1 - \frac{F_{da}}{F_d} = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d} \quad (19)$$

Однако, как уже отмечалось равенство между отношением интенсивностей флуоресценции и квантовых выходов соблюдается далеко не для всех экспериментальных условий, поэтому определение времен жизни возбужденных состояний является более точным и прямым методом оценки эффективности миграции энергии.

Если подставить уравнение (17) в (18), то эффективность переноса энергии можно непосредственно связать с расстоянием:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6} \quad (20)$$

Итак, скорость переноса энергии зависит от ферстеровского радиуса R_0 , который, в свою очередь, определяется величинами k , n , φ_d и J . Значения этих

величин должны быть известны для вычисления расстояния. Показатель преломления обычно известен из состава растворителя, φ_d определяют путем сравнения со стандартными соединениями [56] или интенсивностью полосы комбинационного рассеяния воды [57], а интеграл перекрытия для пары донор-акцептор должен быть вычислен из стационарных спектров поглощения и флуоресценции акцептора и донора, соответственно.

Важно отметить, что в уравнениях, приведенных выше, предполагается, что при связывании с акцептором время жизни флуоресценции донора не изменяется по каким-либо иным причинам кроме безызлучательного переноса энергии. Однако относительный квантовый выход донора может значительно сокращаться не только из-за процессов тушения второго рода (по классификации Вавилова), связанных с переносом энергии. При взаимодействии молекул могут образовываться нефлуоресцирующие комплексы. В таком случае степень тушения флуоресценции тушителем может быть выражена уравнением Штерна-Фольмера [148]:

$$\frac{\varphi}{\varphi_q} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (21)$$

где φ_q - квантовый выход в присутствии тушителя, τ_0 - излучательное время жизни флуоресценции, $[Q]$ - концентрация молекул тушителя, k_q - константа скорости тушения флуоресценции. Таким образом, снижение интенсивности флуоресценции донора, регистрируемое с помощью методов стационарной спектроскопии, не во всех случаях свидетельствует о переносе энергии возбуждения донора к акцептору (т.е. динамическом тушении флуоресценции). Особенностью динамического тушения является параллельное снижение φ и τ донора по мере увеличения концентрации тушителя (акцептора), в то время как при статическом тушении τ донора не изменяется [148]. Таким образом, регистрация времени жизни флуоресценции донора позволяет определить тип тушения.

Если молекулы акцептора обладают флуоресценцией, то увеличение её интенсивности, одновременно с сокращением времени жизни флуоресценции донора служит доказательством миграции энергии.

2.3.1 Оценка активационных барьеров.

В химической кинетике и теории активных соударений часто используется представление констант скоростей реакций в так называемых координатах Аррениуса [199]. Такой график показывает зависимость логарифма константы скорости реакции $\ln(k)$ от обратной величины температуры $1/T$. Такое представление используют для анализа влияния температуры на скорость химических реакций. Для термически активируемого процесса с ограниченной скоростью график Аррениуса дает прямую линию, по которой можно определить как энергию активации, так и предэкспоненциальный множитель [200].

Уравнение Аррениуса можно представить в виде:

$$k = Ae^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad (22)$$

где k – константа скорости реакции, A – предэкспоненциальный фактор, E_a – энергия активации, R – универсальная газовая постоянная, T – температура. Логарифмирование уравнения получает получить выражение:

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{R}\right) \quad (23)$$

При построении графика данной функции её значение в точке пересечения с осью Y (при температуре, стремящейся к бесконечности) будет соответствовать логарифму предэкспоненциального фактора $\ln(A)$, а наклон прямой будет равен $-E_a/R$. Определение этих величин из экспериментальных данных проводят путем аппроксимации температурной зависимости линейной функцией.

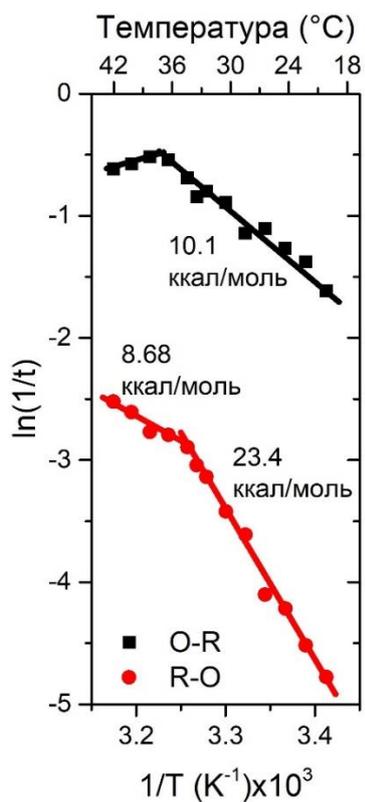


Рис. 16. Пример температурной зависимости скорости фотоиндуцированного накопления (O-R) и релаксации (O-R) активной формы ОСР в координатах Аррениуса. Скорости были определены по фотоциклическим изменениям интенсивности флуоресценции флуоресцентной метки, ковалентно пришитой к ОСР и передающей энергию на каротиноид.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Энергетические взаимодействия каротиноидных белков с различными донорами энергии

Перенос энергии электронного возбуждения лежит в основе многих фотосинтетических процессов. Антенная функция фикобилисом цианобактерий обусловлена строением этого мегадальтонного пигмент-белкового комплекса, содержащего различные спектральные формы билиновых пигментов в стержнях и ядре. Пигменты расположены в белках таким образом, что между идентичными соседними билинами в составе тримеров и гексамеров возможен перенос энергии по экситонному механизму, а на большие расстояния энергия передается по индуктивно-резонансному механизму (Förster resonance energy transfer, FRET). Различия в спектрах поглощения и флуоресценции фикобилинов определяют направление миграции энергии от «синих» пигментов стержней фикобилисомы (фикоцианин) к «красным» пигментам ядра (аллофикоцианин и терминальные эмиттеры).

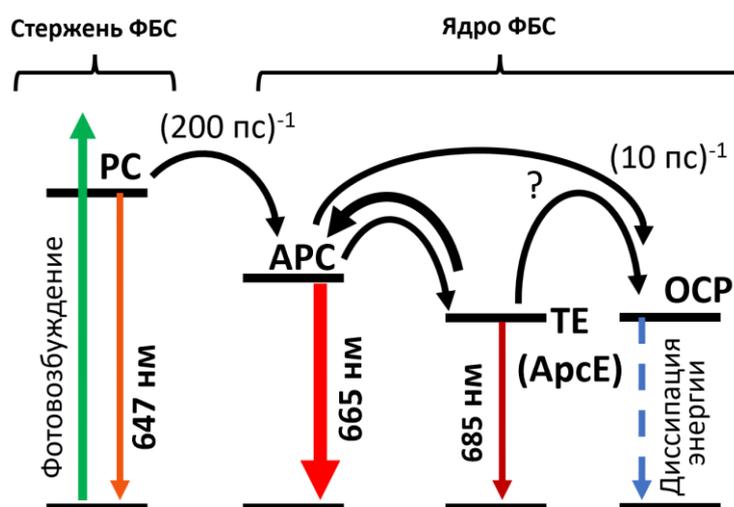


Рис. 17. Схема возможных энергетических взаимодействий между пигментами фикобилисомы и каротиноидом ОСР.

Однако, различия в положении уровней S_1 между терминальными эмиттерами и аллофикоцианином малы и составляют приблизительно 15 нм (~

0.038 eV) (см *рис. 17*). Из-за этого при комнатной температуре (0.025 eV) значительная часть энергии электронного возбуждения пигментов ядра оказывается на аллофикоцианине (APC) за счет переноса энергии в обратном направлении (*uphill*). Это явление в совокупности с фотохимическим тушением флуоресценции фикобилисом за счет переноса энергии возбуждения на хлорофилл реакционных центров, значительно осложняет исследование механизмов ОСР-зависимого нефотохимического тушения флуоресценции *in vivo*.

В значительной степени само открытие нефотохимического тушения у цианобактерий стало возможным благодаря созданию мутантов *Synechocystis* лишенных фотосистемы 2 (и 1) и, соответственно, отсутствию фотохимического тушения флуоресценции фотосинтетическими реакционными центрами. Наблюдение за тушением флуоресценции фикобилисом при облучении клеток сине-зеленым светом высокой интенсивности в мутантах $\Delta PS1/\Delta PS2$ и сравнение эффектов с данными экспериментов *in vitro* позволили нам установить, тепловые эффекты взаимодействия 3х компонент регуляторной – фикобилисомы, ОСР и FRP. Было показано что продукты генов *apcD* и *apcF* влияют на энергию активации реакции восстановления флуоресценции после активации ОСР-зависимого нефотохимического тушения [201]. Что говорит о возможном прямом взаимодействии FRP с неким участком в ядре ФБС. Это стимулировало наш дальнейший интерес к изучению системы нефотохимического тушения у цианобактерий. Однако, выяснению механизма тушения флуоресценции мешает недостаток данных как о строении фикобилисомы, так и комплексов ОСР-фикобилсома и ОСР-FRP. Несмотря на успехи, достигнутые в исследовании структуры фикобилисом красных водорослей с помощью метода крио-электронной микроскопии [22], к сожалению, структура комплекса фикобилисомы с ОСР до сих пор остается неустановленной.

Используя флуоресцентную спектрофлуориметрию с пикосекундным временным разрешением, мы показали, что изменение интенсивности

флуоресценции и положения максимума интенсивности флуоресценции в ответ на пикосекундное возбуждение при активации и релаксации нефотохимического тушения *in vivo* и *in vitro* объясняются изменением времени жизни и, соответственно, квантового выхода флуоресценции пигмент-белковых комплексов ядра фикобилисомы [201, 202]. Таким образом, ОСР-зависимое тушение флуоресценции фикобилисом является динамическим и обусловлено энергетическим взаимодействием в системе донор-акцептор.

Организация фикобилисомы в форме «энергетической воронки», создает оптимальные условия для регуляции потока энергии в области с наименьшим количеством пигментов и наибольшей вероятности её локализации – ядре фикобилисомы [119]. Действительно, наличие фикоцианиновых стержней не является обязательным для активации нефотохимического тушения, что подтверждается как *in vivo*, так и *in vitro* в экспериментах на клетках и выделенных фикобилисомах мутантов СК. Однако, факт наличия в базальных цилиндрах ядра фикобилисомы пар так называемых терминальных эмиттеров, осуществляющих перенос энергии на хлорофилл реакционных центров фотосистем, послужил основой гипотезы о взаимодействии ОСР со специфическими пигментами ядра [119, 120].

Следует отметить, что образование комплекса ОСР с фикобилисомой за счет белок-белковых взаимодействий лишь инициирует взаимодействие между пигментами ядра фикобилисомы и кето-каротиноидом в составе ОСР за счет сближения молекул донора и акцептора энергии электронного возбуждения. Природа этих энергетических взаимодействий пока остается неясной, однако мы можем рассматривать следующие гипотезы:

1. Конечным акцептором энергии электронного возбуждения в комплексе является хромофор ОСР - каротиноид, характеризующаяся коротким временем жизни возбужденного состояния (~ 3-5 пс).

2. Образование комплекса с ОСР приводит к нарушению нативной конформации хромофора в составе одного из фикобилинов и сокращению его времени жизни до единиц пикосекунд.

Во втором случае ОСР, по сути, индуцирует обратимую денатурацию пигмент-белкового комплекса и создает тушащий центр в самом ядре фикобилисомы. Мы проверили эту гипотезу проведя денатурацию выделенных фикобилипротеинов с помощью хаотропов, воздействия температуры и низких рН [203]. Поскольку билин связан с белком ковалентно лишь в одной точке, для обеспечения высокой эффективности переноса энергии необходимо поддержание планарной структуры хромофора, обеспечивающее высокую протяженность сопряжённой π -системы и высокий квантовый выход флуоресценции. Соответственно, нарушение нативной конформации белка сопровождается изменением конформации хромофора и сокращением времени жизни флуоресценции фикобилипротеина за счет увеличения вероятности колебательной релаксации (см. *рис. 18*). Однако, во всех случаях денатурация приводила к появлению хромофоров с временем жизни порядка нескольких сотен пикосекунд. Такая скорость релаксации возбужденного состояния мала чтобы конкурировать с переносом энергии на хлорофилл ($\sim (60 \text{ пс})^{-1}$). По этой причине мы считаем, что именно кето-каротиноид в составе ОСР является конечным акцептором энергии электронного возбуждения.

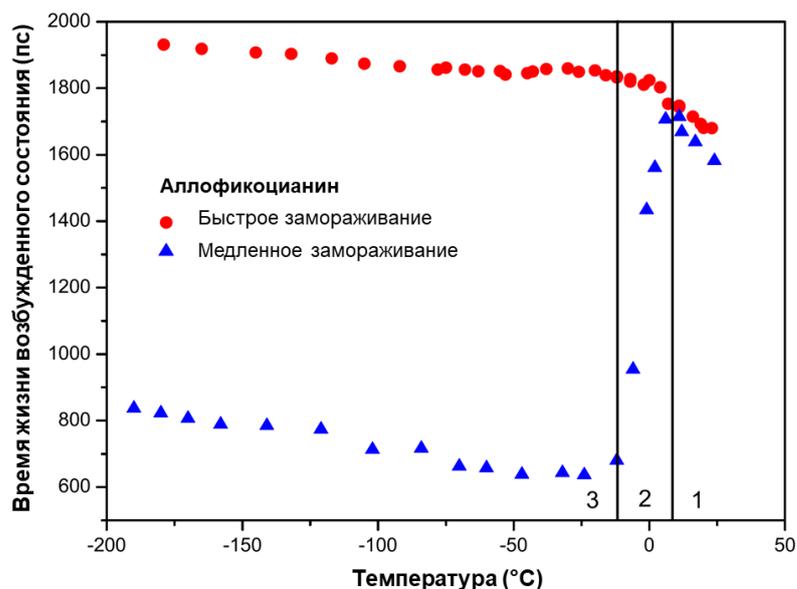


Рис. 18. Температурная зависимость времени жизни флуоресценции аллофикоцианина при медленном и быстром замораживании раствора белка.

В литературе обсуждаются различные механизмы переноса энергии электронного возбуждения на каротиноид, в том числе экситонный [76]. Для реализации этого механизма требуется, во-первых, строгое соответствие электронных уровней донора и акцептора, и, во-вторых, крайне малое ($<10 \text{ \AA}$) расстояние между хромофорами. На данный момент ни одного экспериментального доказательства этой гипотезы не существует, не только из-за отсутствия структуры комплекса, но и из-за четких представлений о положении оптически-запрещенного уровня S_1 каротиноида [204-206]. Более того, не определен и непосредственный донор энергии возбуждения среди многочисленных (более 60) пигментов ядра ФБС.

С помощью гелиевого криостата нам удалось исследовать спектрально-временные характеристики отдельных фикобилипротеинов, фикобилисом и их ядер при температурах от 4 до 300 К [202]. Низкотемпературные эксперименты часто используются для изучения систем с переносом энергии, т.к. позволяют повысить квантовый выход флуоресценции, снизить влияние уширения спектральных линий и избавиться от эффектов, связанных с uphill переносом энергии. В условиях низких и сверхнизких температур положение основного

максимума в спектре флуоресценции ФБС соответствует терминальным эмиттерам ядра ФБС (6 хромофоров), а пикосекундная кинетика в области 685 нм характеризуется задержкой порядка 150 пс относительно прямого возбуждения синих пигментов (650-660 нм).

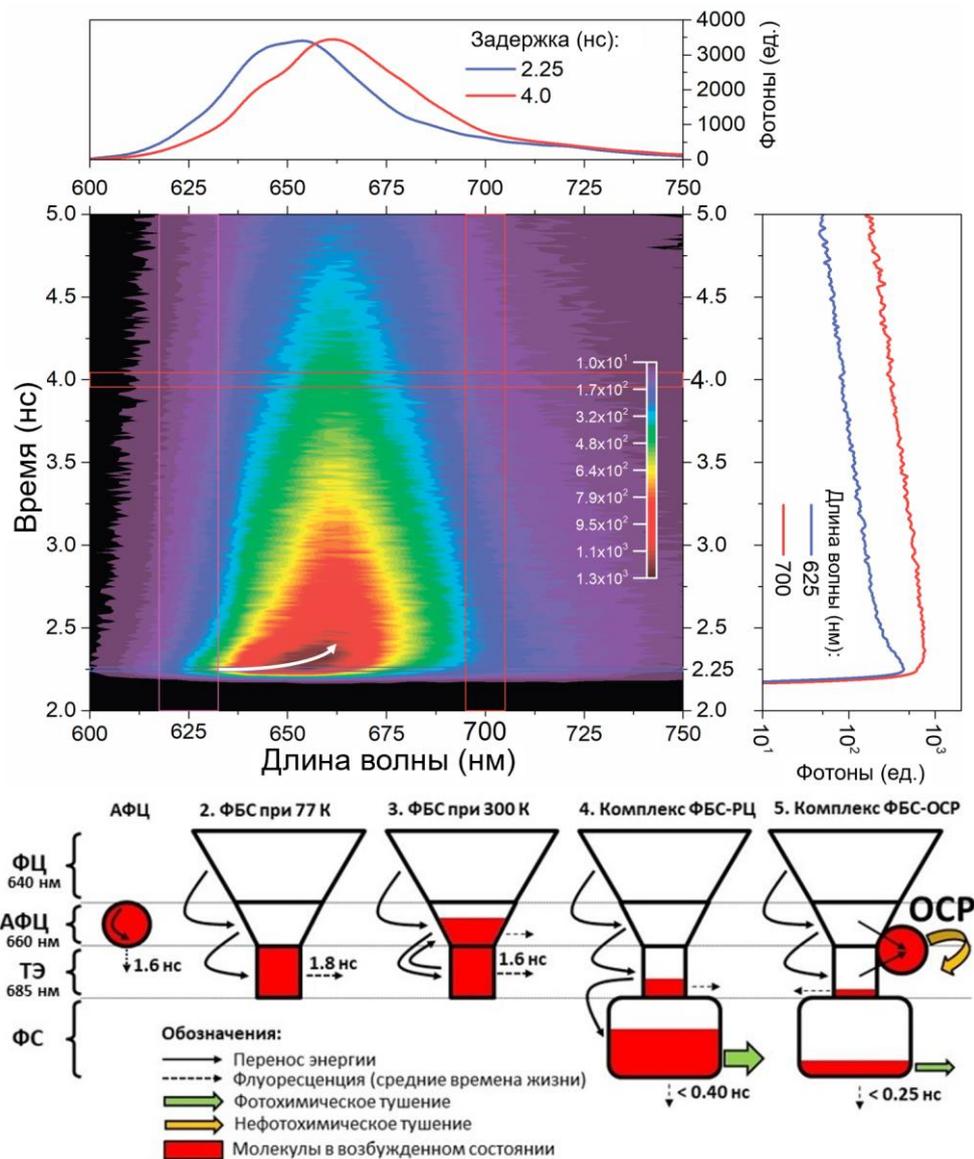


Рис. 17. Миграция энергии в фикобилисомах цианобактерий. *Сверху:* мгновенный спектр флуоресценции ФБС при возбуждении фс лазерными импульсами при 570 нм. Спектр измерен при 30 °С. Цветовая шкала показывает количество фотонов, регистрируемых в различные моменты времени при заданной длине волны регистрации флуоресценции. Горизонтальные линии показывают сечения мгновенного спектра, соответствующие спектру флуоресценции в начальный момент (синяя линия) и через 1.75 нс (красная линия). Вертикальные линии показывают сечения спектра при заданных длинах волн, т.е. кинетики затухания флуоресценции. Белая линия со стрелкой показывает постепенный батохромный сдвиг спектра флуоресценции ФБС за счет переноса энергии от коротковолновых пигментов к длинноволновым. *Снизу:* схема, показывающая вероятность локализации возбужденных состояний пигментов ФБС в различных условиях (см. текст).

Однако, при низких температурах нам не удалось обнаружить признаков тушения флуоресценции не только терминальных эмиттеров, но и аллофикоцианина ядра ФБС, как *in vivo* так и *in vitro*, при том что при комнатной температуре активация ОСР вызывала значительные изменения интенсивности флуоресценции ФБС. Несмотря на то, что при температуре жидкого азота (и гелия) удается отчетливо наблюдать как энергия электронного возбуждения синих пигментов (фикоцианин и аллофикоцианин) передается на терминальные эмиттеры (см. рис. 17), мы показали, что ОСР-зависимое тушение флуоресценции фикобилисом в таких условиях не реализуется. Мгновенные спектры флуоресценции клеток мутанта $\Delta PS1/\Delta PS2$, адаптированного к сине-зеленому свету при комнатной температуре и затем охлажденные до 77К, не отличаются от спектров клеток, адаптированных к темноте. Аналогичные результаты были получены нами *in vitro*, на выделенных фикобилисомах, флуоресценция которых была потушена за счет взаимодействия с диким типом ОСР, а также на функциональных аналогах красной активной формы – мутанте ОСР-Y201A/W288A и РСР при комнатной температуре. Мы обнаружили, что охлаждение раствора до -5 °С приводит к снижению эффективности миграции энергии на каротиноид ОСР до 0. В экспериментах *in vitro* данный эффект обратим и при повышении температуры вновь наблюдается тушение флуоресценции. Возможным объяснением наблюдаемых эффектов, свидетельствующих об отсутствии энергетических взаимодействий ФБС и ОСР при низкой температуре, является нарушение нативной конфигурации комплекса в отсутствии тепловых движений, что говорит о сложной структурной организации комплекса.

Таким образом, показать, что ОСР взаимодействует с конкретным пигментом на интактных фикобилисомах пока не представляется возможным. Для решения проблемы энергетического взаимодействия ОСР с антенной мы приступили к экспериментам на модельных объектах. Для достижения цели мы предложили редуцировать размер антенны, заменив её на хромофор, способный энергетически взаимодействовать с каротиноидом в составе ОСР.

Убедившись, что ОСР не образует комплексов с фикоцианином и аллофикоцианином в растворе, мы решили проверить взаимодействует ли ОСР с терминальным эмиттером АрсЕ [118-120, 207]. Сложность этого эксперимента обусловлена тем, что данный терминальный эмиттер состоит из нескольких глобулярных доменов, соединенных протяженными линкерами, и лишь один домен содержит хромофор. Такая структура делает белок плохо растворимым, поэтому мы решили укоротить последовательность АрсЕ, оставив только домен с хромофором АрсЕΔ. Несмотря на значительное сокращение времени жизни АрсЕΔ по сравнению с нативными фикобилипротеинами (300 пс и 1.6 нс соответственно), мы установили, что добавление к ФБС мутантной формы ОСР не требующей фотоактивации (ОСР-У201А/У288А) вызывает дальнейшее сокращение времени жизни до предела временного разрешения нашей установки (~ 20 пс, см. рис. 18). Этот эксперимент показывает, что в АрсЕΔ могут быть сайты, обеспечивающие контакт ОСР с ядром фикобилисомы, а энергетическое взаимодействие с фикобилипротеинами может приводить к сокращению длительности флуоресценции отдельного пигмента антенны до десятков пикосекунд. Очевидно, что из-за малого количества терминальных эмиттеров (4-6) по сравнению с общим числом аллофикоцианинов в ядре фикобилисомы (66-68) и тем более фикоцианинов (324), детектировать на их фоне компонент с временем жизни короче 20 пс практически невозможно. Иначе говоря, «остаточный» сигнал флуоресценции фикобилисомы, потушенной красной формой ОСР (см. рис. 18), является функцией накачки ядра фикобилисомы за счет переноса энергии от фикоцианиновых стержней (~ 160 пс), а не характеристикой возбужденных состояний терминальных эмиттеров. Таким образом, эффективность тушения пигмента, ключевого для передачи энергии к хлорофиллам, за счет образования комплекса с ОСР может достигать 99 %.

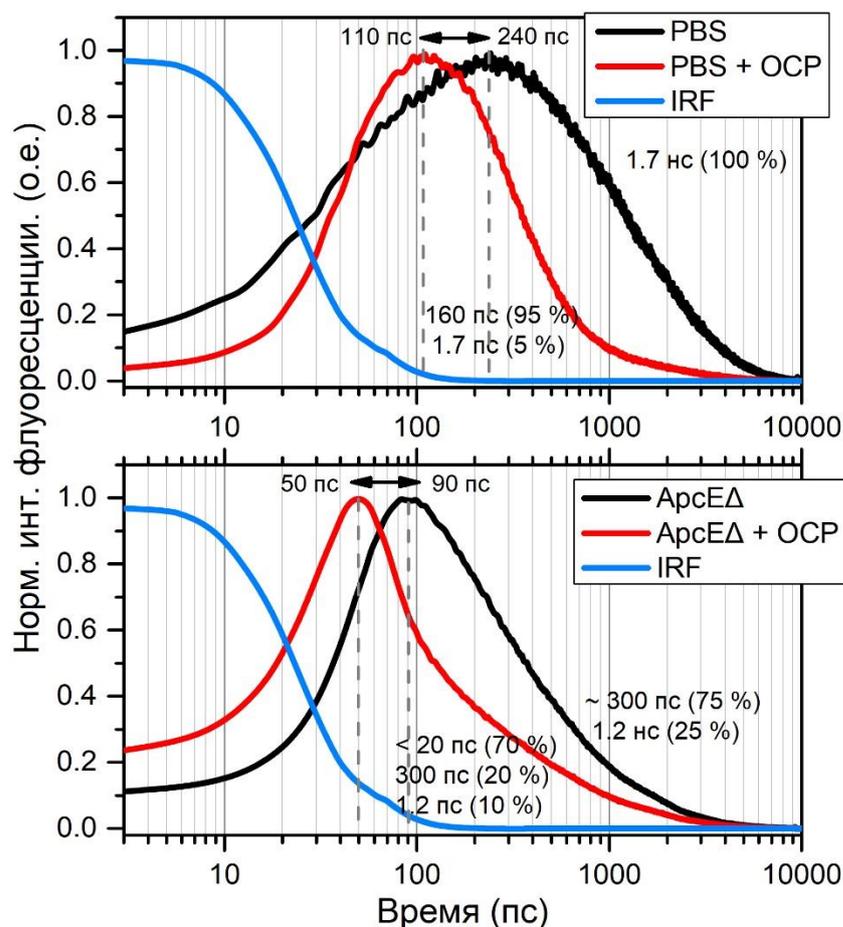


Рис. 18 Кинетики затухания флуоресценции фикобилисом (сверху) и РВ-домена терминального эмиттера АрсЕΔ (снизу) в комплексе с ОСР (красные линии). Регистрация флуоресценции производилась при 670 нм. Синие линии показывают форму аппаратной функции детектора единичных фотонов в ответ на вспышку лазера длительностью 150 фс при 570 нм.

Поскольку активация ОСР и последующее образование комплекса с фикобилисомой приводит к прекращению переноса энергии электронного возбуждения на хлорофилл реакционных центров, скорость первичных фотосинтетических процессов должна снижаться. Мы решили проверить как активация ОСР влияет на скорость восстановления Q_A в реакционных центрах ФС2, которая, как известно, пропорциональна плотности потока фотонов и эффективному сечению поглощения ФС2. Для этого нами была получена зависимость скорости восстановления Q_A от размера антенны для цианобактерий с различным набором фикобилипротеинов за счет мутаций и азотного голодания. Установлено, что при культивации культуры клеток *Synechocystis* дикого типа в нормальных условиях активация ОСР приводит к снижению скорости восстановления Q_A примерно на 30 % что эквивалентно снижению размера

антенны на 50 % (см. рис. 19). Эти эксперименты говорят о том, что в нормальных условиях концентрация ОСР в клетке недостаточно высока для инактивации всех фикобилисом, что хорошо согласуется с оценками концентраций, полученными нами при моделировании кинетик активации нефотохимического тушения.

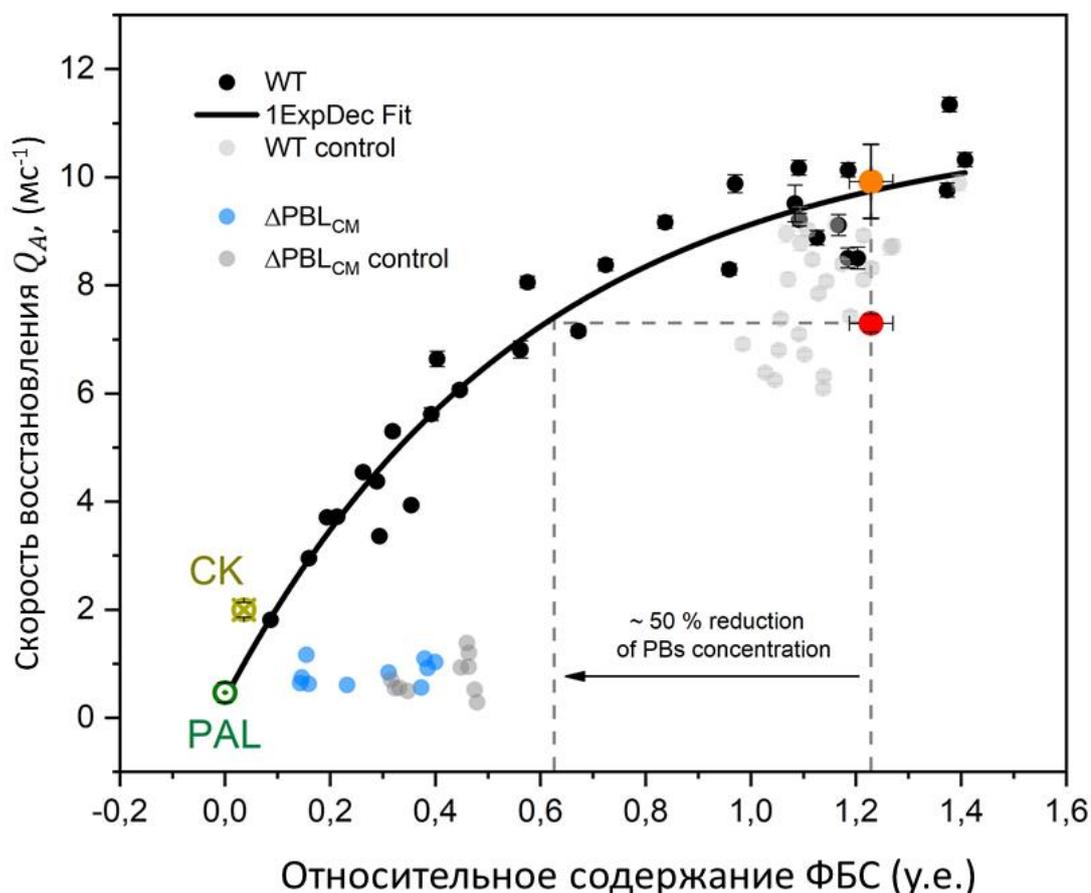


Рис. 19 Зависимость скорости восстановления Q_A от количества антенных комплексов – фикобилисом в клетках *Synechocystis* sp. PCC6803. Оценка скорости восстановления Q_A проведена согласно процедурам, описанным в разделе 2.2.3.

Таким образом, при нормальных условиях общий «энергетический» эффект от активации ОСР на скорость фотосинтетических реакций невелик по сравнению с влиянием ОСР на длительность возбужденных состояний пигментов фикобилисомы. Однако, очевидно, что за счет увеличения экспрессии соответствующих генов, в стрессовых условиях влияние ОСР на фотосинтетические реакции может значительно возрасти. Вероятно, задачи, связанные с защитой фикобилисом от фотоповреждения являются приоритетными, поскольку их содержание в клетке достигает 50 % (от сухой массы) и данные

пигмент-белковые комплексы выполняют не только антенную функцию, но и служат в качестве «депо» минеральных элементов, которые могут расходоваться в стрессовых ситуациях, сохраняя жизнеспособность культуры и её ростовые качества. Вероятно, это особенно актуально для фикобилисом не связанных с фотосистемами.

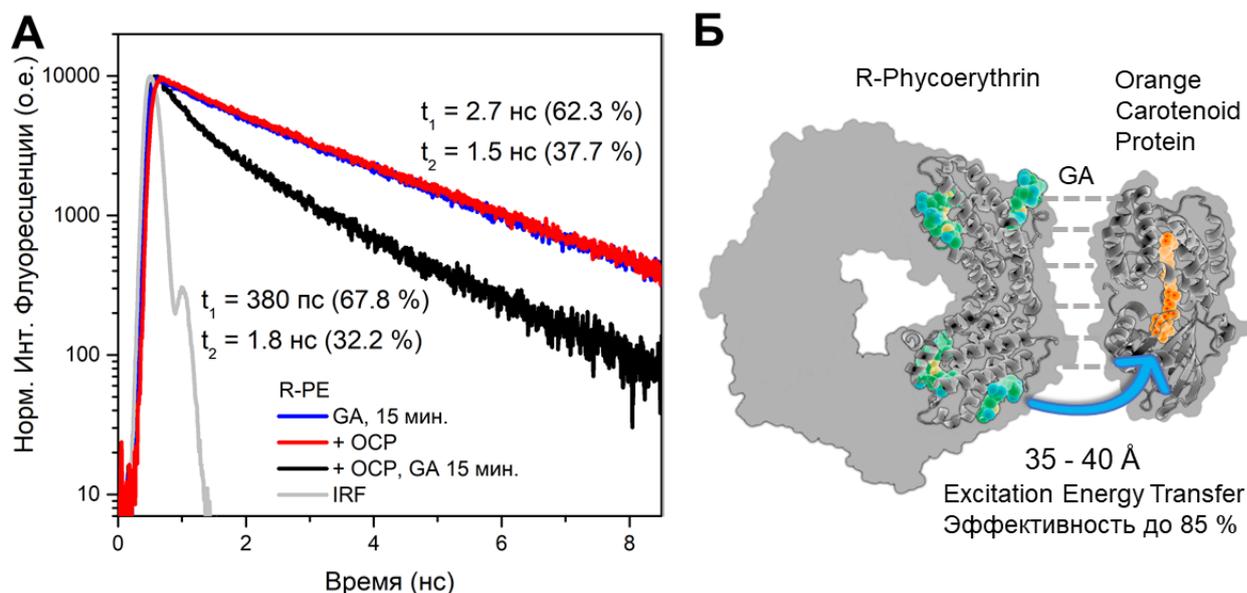


Рис. 20. Тушение флуоресценции R-фикоэритрина из красной водоросли в комплексе с OCP. **А** – кинетики затухания флуоресценции раствора R-фикоэритрина и его комплекса с OCP, стабилизированного за счет глутарового альдегида. **Б** – оценка расстояния между хромофорами R-фикоэритрина и каротиноидом в составе OCP на основе эффективности FRET.

Как уже отмечалось, исследование механизма преобразования энергии в комплексе OCP с фикобилисом осложняется наличием огромного количества пигментов, напрямую не взаимодействующих с OCP. Одним из возможных способов решения этой проблемы и повышения контраста между состояниями является редукция размеров комплекса (или пигментов в его составе) до 1 донора и 1 акцептора энергии. Поскольку модификация последовательность АрсЕ влияет на спектрально-временные характеристики этого нативного донора энергии, мы решили использовать другие более стабильные объекты в качестве доноров энергии в искусственных комплексах с OCP.

Одним из таких объектов стал комплекс OCP и R-фикоэритрина из красной водоросли *Porphyra yezoensis*. Хотя R-фикоэритрин и является компонентом

стержней фикобилисом, ОСР и R-фикоэритрин представляют пигмент-белковые комплексы из разных царств, что исключает возможность специфических белок-белковых взаимодействий и образование комплекса. Данное утверждение было подтверждено нами с помощью ряда биохимических методов (SEC, нативный электрофорез). Однако, за счет сшивки белков глутаровым альдегидом нами был получен комплекс ОСР-R-фикоэритрин, в котором длительность основного компонента кинетики затухания флуоресценции R-фикоэритрина сократилась с 2.7 нс до 380 пс [208]. При этом важно отметить, что в отсутствие ОСР или при образовании комплекса с апо-формой ОСР время жизни R-фикоэритрина не менялось. Кроме того, сшивка не приводила к образованию красной формы ОСР. На основе доступных структур ОСР и R-фикоэритрина, мы оценили расстояние между донором и акцептором энергии в комплексе приблизительно в 35–40 Å (см. *рис. 20*). Наблюдаемая эффективность миграции энергии (до 85 %) обусловлена индуктивно-резонансными взаимодействиями (FRET) донора и акцептора с учетом их спектральных характеристик и возможного взаимного расположения. Используя эту модельную систему, мы показали, что даже оранжевая неактивная форма ОСР способна тушить флуоресценцию фикобилинов при достаточно близком расположении донора и акцептора энергии. Это наблюдение является важным для понимания принципа регуляции нефотохимического тушения.

Каротиноиды являются эффективными тушителями возбуждения за счет быстрой дезактивации возбужденных состояний. Характерные времена жизни состояний S_2 и S_1 возбужденного кето-каротиноида в оранжевой и в красной форме практически не отличаются, поэтому, очевидно, что кето-каротиноид в оранжевой форме может быть тушителем, если он расположен достаточно близко от донора энергии. Вероятно, этого не происходит из-за отсутствия у оранжевой неактивной формы ОСР сайтов доступных для образования белок-белковых контактов с ядром фикобилисомы. Мы обобщили доступные данные о структуре ядра и ОСР и оценили интеграл перекрытия спектра флуоресценции фикобилисомы и поглощения ОСР (S_0 - S_2). По нашим оценкам расстояние между центрами масс

кето-каротиноида в составе ОСР и ближайшим билином составляет порядка 25 Å, что обеспечивает эффективность переноса энергии порядка 85 % для красной формы ОСР при случайной ($k^2=2/3$) ориентации дипольных моментов переходов. Для достижения эффективности переноса энергии 99 % (время жизни донора менее 20 пс) позволяющего конкурировать с переносом энергии на хлорофилл, расстояние должно быть не более 20 Å, а фактор ориентации дипольных моментов не менее 2, что, вероятно может достигаться за счет специфической пространственной организации белок-белковых контактов. Расчёты позволяют показать, что переход ОСР в оранжевую форму без изменения конфигурации комплекса приведет к незначительному снижению эффективности тушения флуоресценции фикобилисомы. Более того, можно оценить, что лишь расстояния свыше 5 нм при случайной ориентации дипольных моментов переходов могут исключить перенос энергии на каротиноид в составе оранжевой формы ОСР. Однако в таком случае константа скорости миграции энергии на ОСР мала, что не позволяет ОСР конкурировать с хлорофиллами реакционных центров за энергию возбуждения пигментов антенны. Таким образом, ОСР способен тушить флуоресценцию фикобилинов даже без образования специфических белок-белковых контактов, но только при определенной структурной организации комплекса можно достичь скоростей миграции энергии, позволяющих снижать эффективное сечение поглощения фотосистем.

Поскольку регистрация эффективности переноса энергии электронного возбуждения по индуктивно-резонансному механизму часто используется для оценки меж- и внутримолекулярных расстояний, мы решили использовать данный подход для наблюдения за фотоактивацией и релаксацией ОСР. Для этого мы провели мечение цистеиновых остатков (84, 95 и 245) в структуре ОСР малеимидным производным тетраметилродамина (TMR) [106]. Остатки цистеинов 84 и 95 расположены очень близко, поэтому в результате мечения ОСР в N-домене образуется димер TMR, отличающийся от мономера формой спектра поглощения и коротким по сравнению с мономером временем жизни.

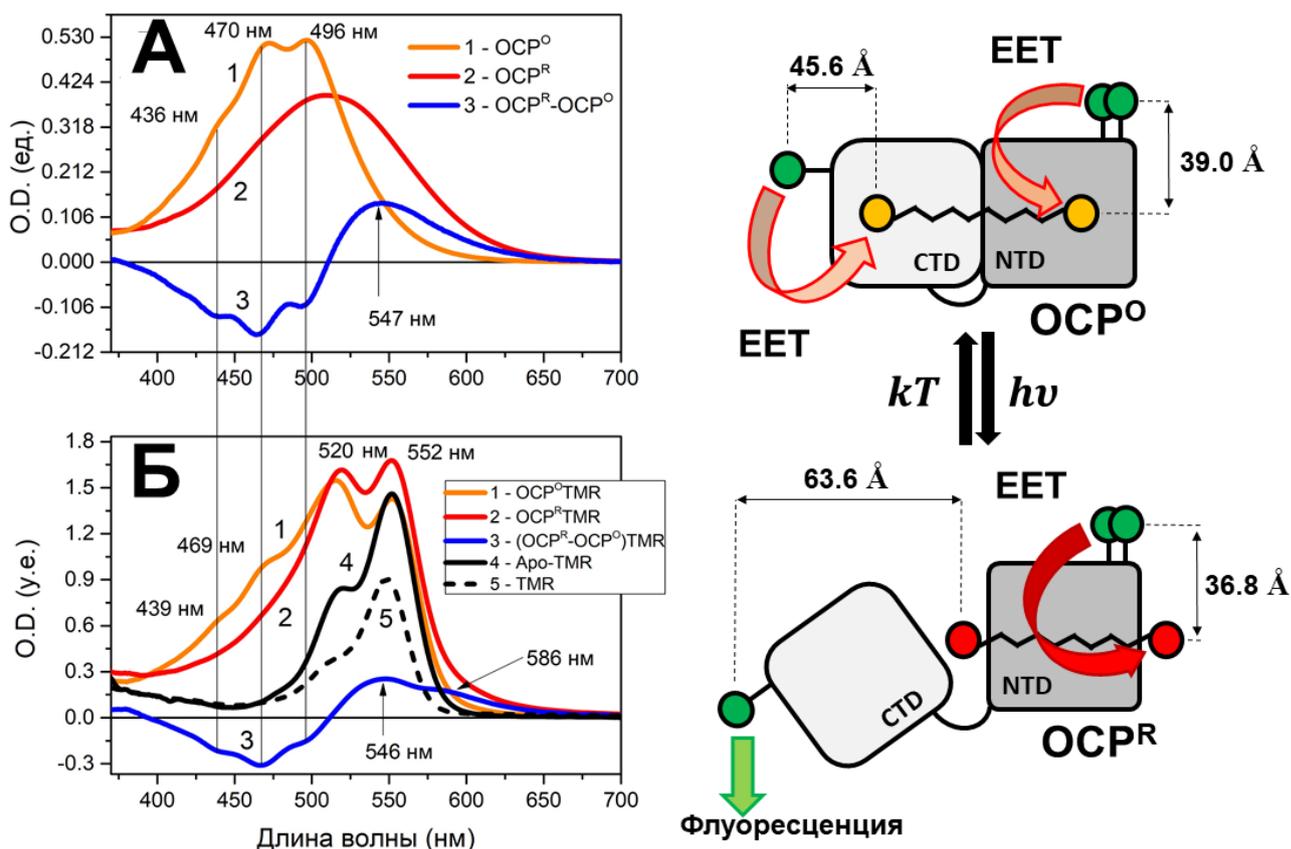


Рис. 21. Перенос энергии между родамином (TMR) и каротиноидом в комплексе с OCP. **А** – спектры поглощения OCP в оранжевой и красной форме, полученной в результате фотоактивации. **Б** – спектры поглощения OCP в комплексе с тремя молекулами TMR, пришитыми к белку через цистеиновые остатки. Черная линия показывает поглощение апо-формы OCP меченой TMR. Справа: схема показывающая изменение расстояний между группами меток и каротиноидом в составе OCP при фотоактивации. Расстояния оценивали с помощью время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии по изменению времени жизни флуоресценции TMR.

Наличие двух меток с различными временами жизни, расположенных на разных доменах OCP позволило нам не только определить расстояния между ними и каротиноидом, но и наблюдать как при фотоактивации увеличивается расстояние между меткой в С-доме и каротиноидом, в то время как в N-доме расстояние уменьшается. Такой способ измерения внутримолекулярных расстояний позволил нам подтвердить гипотезу о перемещении кето-каротиноида из С-доме в N-домен [105] на 12 Å и диссоциации структурных доменов белка при образовании красной активной формы OCP^R. Следует отметить, что возбуждение флуоресцентной метки приводило к активации OCP и переходу белка в красную форму, т.е. активация OCP возможна не только за счет прямого поглощения

квантов молекулой кето-каротиноида в составе ОСР, но и за счет переноса энергии возбуждения от молекулы донора на каротиноид. Вероятно, это явление может играть роль и в нативных системах: если фотоактивация ОСР может инициироваться переносом энергии от фикобилисомы, то при высоких интенсивностях светового потока вероятность диссоциации комплекса ОСР-ФБС за счет релаксации ОСР может быть значительно ниже, чем при низкой интенсивности.

Поскольку флуоресцентное мечение позволило нам наблюдать за фотоциклом ОСР по флуоресценции, а результаты были успешно интерпретированы в рамках формализма теории индуктивно-резонансного переноса энергии мы продолжили исследования гибридных систем на основе ОСР.

С помощью абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии нами была установлена температурная зависимость скорости перехода ОСР из оранжевой формы в красную [92, 104]. Высокий энергетический барьер (32 ккал/моль) для релаксации красной формы означает, что небольшие изменения температуры среды должны сильно влиять на скорость реакции, что потенциально позволяет рассматривать ОСР как сенсор температуры. Для определения локальной температуры в окружении ОСР необходимо измерить скорость релаксации красной формы и далее, зная зависимость скорости реакции от температуры, можно решить обратную задачу. Нас заинтересовали возможности применения ОСР для решения прикладных задач, связанных с измерением локальной температуры, в том числе внутри живых клеток.

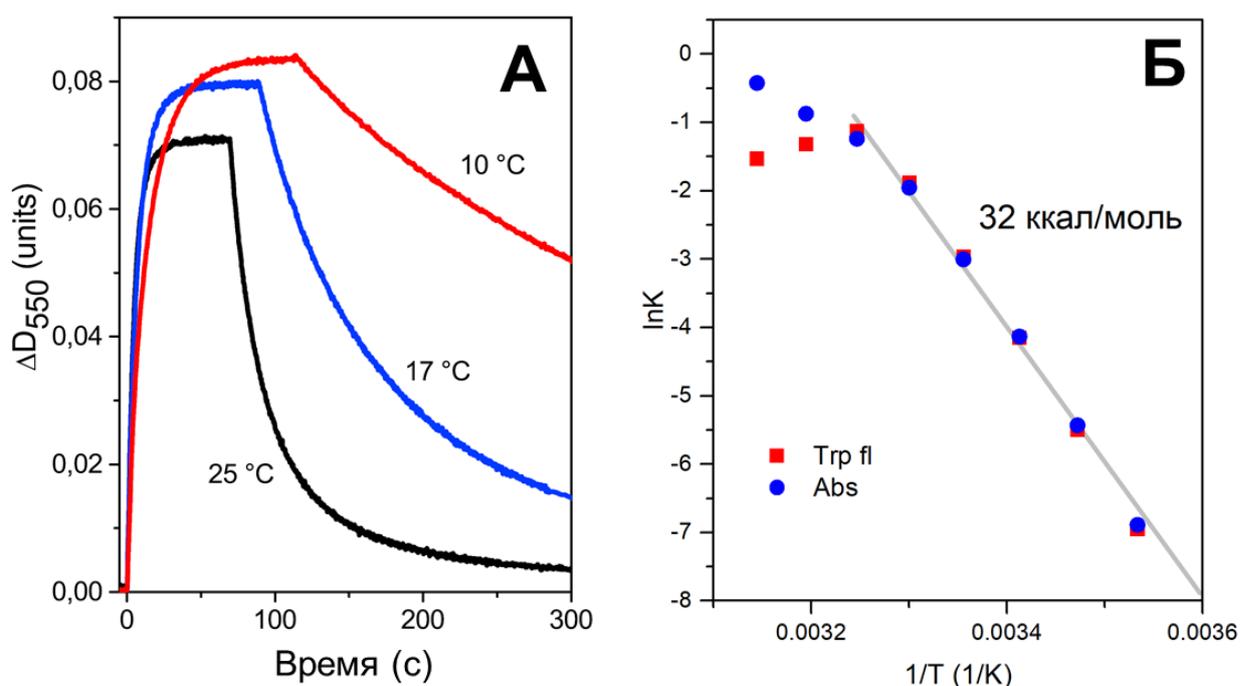


Рис. 22 Влияние температуры на скорость образования и релаксации красной формы ОСР. **А** – зависимости поглощения раствора ОСР при 550 нм от времени при адаптации препарата к синему свету высокой интенсивности. **Б** – зависимость скорости релаксации красной формы ОСР от температуры в координатах Аррениуса.

Внутриклеточная температура является ключевым параметром для живой клетки, поскольку от неё зависит скорость протекания биохимических реакций. Известны работы [209], в которых с помощью введения в клетку флуоресцентных красителей удалось показать гетерогенность распределения температуры и её локальное увеличение в области работающих митохондрий. Однако такие сенсоры обладают рядом недостатков, в том числе, их необходимо доставлять в клетку. В этом плане очевидным преимуществом обладают генетически кодируемые сенсоры. Обнаружив, что за фотоциклом ОСР можно наблюдать по флуоресценции, мы решили создать химерную конструкцию, состоящую из ОСР и флуоресцентного белка и исследовать её свойства. Были получены два типа химер на основе дикого типа ОСР из *Synechocystis*: в первом TagGFP был присоединен к С-концу (см. *рис. 23*), а во втором TagRFP к N-концу. Такое положение флуоресцентных модулей на концах подвижных элементов структуры ОСР обеспечило возможность сборки холо-формы ОСР в составе химерной

конструкции. Обе конструкции оказались фотоактивными, что подтверждалось обратимым изменением спектра поглощения каротиноида в составе ОСР.

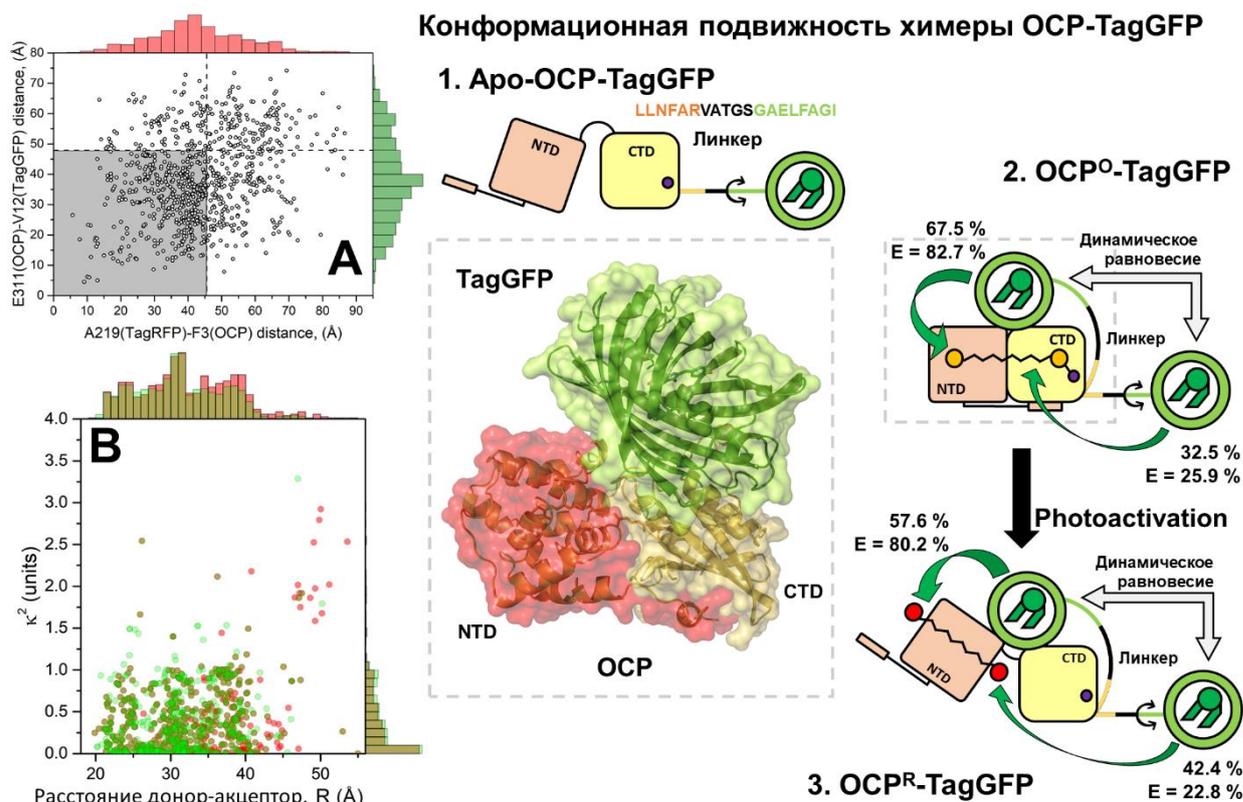


Рис 23. Модель комплекса ОСР-флуоресцентный белок на примере химеры ОСР-TagGFP. Возможное расположение ОСР и TagGFP в комплексе было определено на основе результатов молекулярного докинга, позволивших определить расстояния (А) и ориентационный фактор (В) для каротиноида и хромофора флуоресцентного белка, и уточненных за счет экспериментальных данных об эффективности переноса энергии электронного возбуждения хромофора флуоресцентного белка на каротиноид в составе ОСР.

Мы показали, что за фотоциклическими переходами ОСР в составе химерных конструкций можно наблюдать не только по изменению поглощения каротиноида, но и за счет изменений квантового выхода флуоресценции флуоресцентных белков. Оптические свойства и характеристики фотоциклических переходов химерных конструкций были изучены с помощью флуоресцентной спектроскопии с высоким временным разрешением. Для описания энергетического взаимодействия донора и акцептора энергии (флуоресцентный белок – каротиноид) использовали теорию индуктивно-резонансного переноса энергии возбуждения. В совокупности с рядом расчётных методов это позволило определить структуру химерной конструкции на

разных этапах фотоцикла (см. рис. 23).

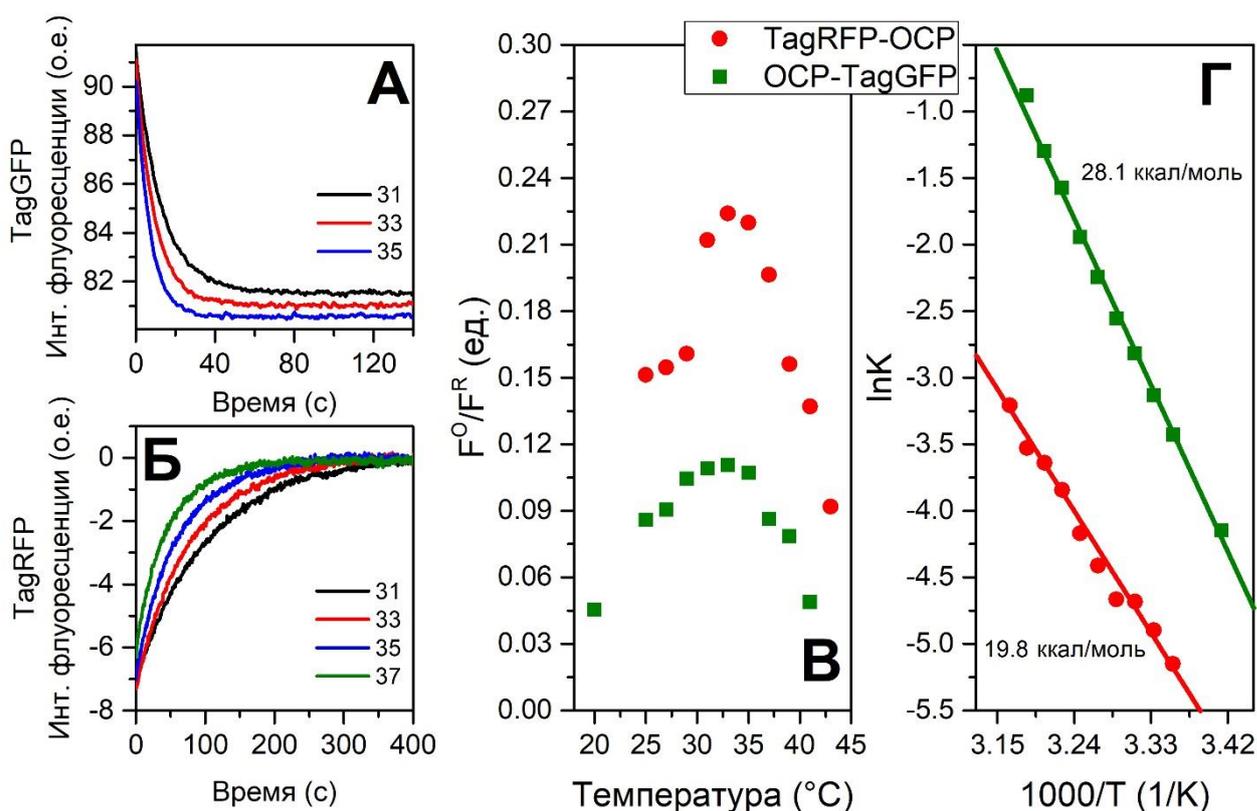


Рис. 24. Изменения интенсивности флуоресценции химерных конструкций OCP-TagGFP (А) и OCP-TagRFP (Б) при релаксации OCP после фотоактивации при разных температурах. В – относительная амплитуда изменений интенсивности флуоресценции при фотоактивации химерных конструкций на основе OCP и флуоресцентных белков. Г – зависимость скорости релаксации красной формы OCP от температуры в координатах Аррениуса.

Мы показали, что в химерных комплексах существует 2 популяции белковых конструкций, эффективность миграции энергии в которых значительно отличается (~80 и 25 % для химеры с TagGFP), что обусловлено подвижностью флуоресцентного модуля, соединенного с OCP гибким линкером. При фотоактивации OCP эффективность миграции энергии в химерах с зеленым флуоресцентным белком снижается (TagGFP), а с красным (TagRFP), напротив, увеличивается, что объясняется изменением величины интеграла перекрытия спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора (переход S_0 - S_2 каротиноида), а также изменением расстояния при перемещении каротиноида из C-домена OCP в N домен. Эти изменения эффективности миграции энергии определяют форму зависимости интенсивности флуоресценции от времени при

фотоактивации ОСР и последующей релаксации. Однако, во всех случаях скорость релаксации красной формы ОСР, измеренная по флуоресценции, зависит от температуры (энергия активации – 28.1 ккал/моль для химеры ОСР-TagGFP и 19.8 для ккал/моль для ОСР-TagRFP), что потенциально позволяет использовать данные конструкции для измерения локальной температуры (см. *рис. 24*). Однако для использования данных конструкций в клетках необходима реконструкция холо-формы ОСР, т.е. встраивание каротиноида в белковую матрицу. Решению этой проблемы посвящен раздел 3.4.

Таким образом, используя флуоресцентную спектроскопию с высоким временным разрешением, нам удалось доказать, что в результате индуктивно-резонансного переноса энергии ОСР эффективно тушит флуоресценцию фикобилинов, ряда флуоресцентных красителей и флуоресцентных белков, что говорит об универсальности принципа, реализованного в фотозащитных механизмах цианобактерий. Понимание этих принципов позволяет создавать на основе ОСР химерные конструкции, чувствительные к наличию каротиноида, форме его спектра поглощения и фотоиндуцированным изменениям структуры ОСР.

Выводы к разделу 3.1 Энергетические взаимодействия каротиноидных белков с различными донорами энергии электронного возбуждения

1. Каротиноид в составе ОСР является эффективным акцептором энергии электронного возбуждения не только для нативных пигментов цианобактериальных антенных комплексов, но и для ряда флуоресцентных белков и красителей.
2. Перенос энергии электронного возбуждения в комплексах различных пигментов и ОСР обусловлен диполь-дипольными взаимодействиями и может быть описан в рамках формализма теории Ферстера.
3. Флуоресцентное мечение ОСР позволяет детектировать расстояние между

донором и акцептором энергии и перемещение молекулы каротиноида между доменами ОСР при фотоактивации.

4. Чувствительность фотоциклических переходов ОСР к температуре среды позволяет создавать на его основе флуоресцентные датчики локальной температуры.

3.2. Фотцикл оранжевого каротиноидного белка

Еще в первых исследованиях каротиноидных белков цианобактерий [87] в спектрах поглощения белка ОСР были обнаружены две спектральные формы – оранжевая и красная, однако природа этих состояний долгое время оставалась без объяснений. S_0 - S_2 поглощение молекулы кето-каротиноида (3'-гидрокси-эхиненон, эхиненон или кантаксантин) в составе так называемой неактивной оранжевой формы $ОСР^0$ существенно отличается от спектра поглощения данного пигмента в органических растворителях и характеризуется ярко выраженной вибронной структурой (см. рис. 25).

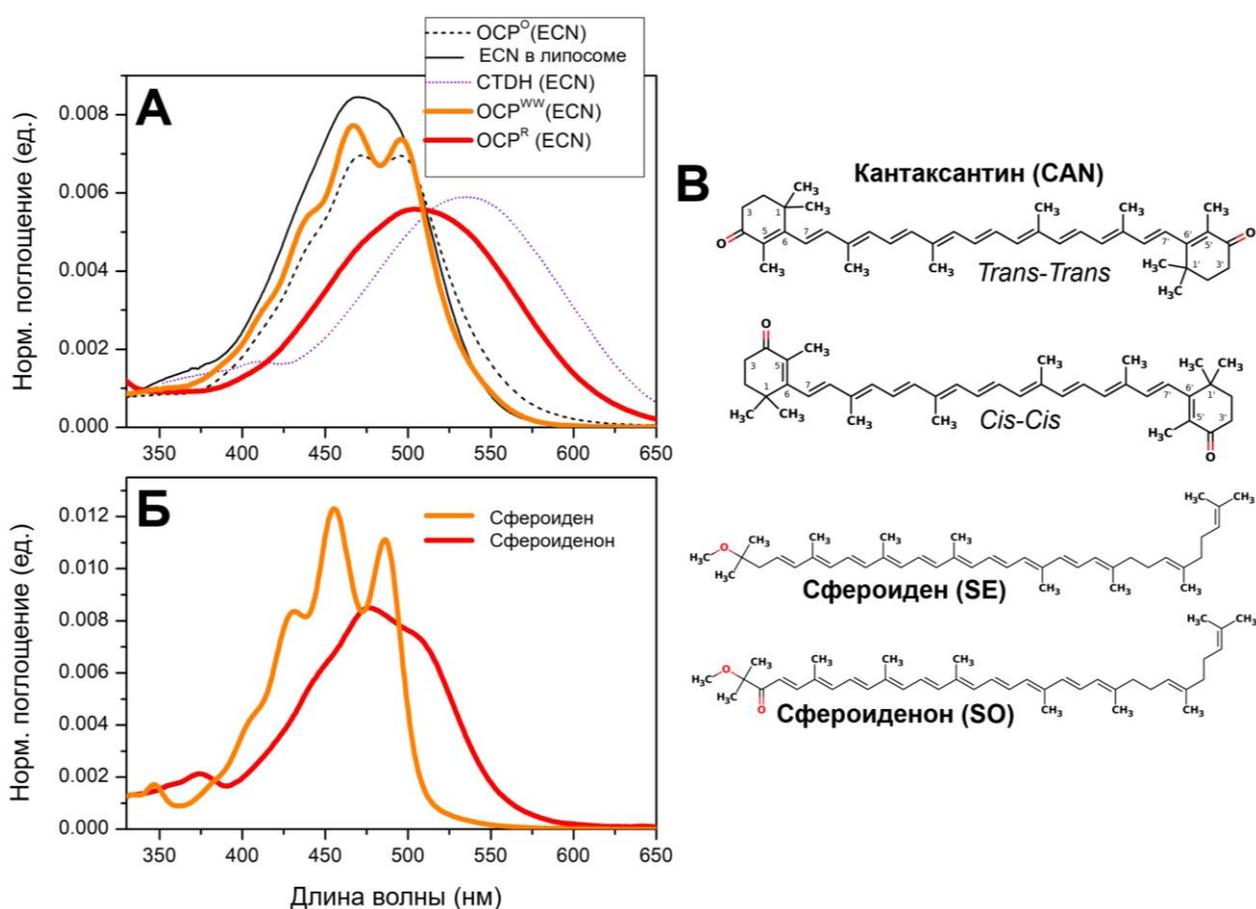


Рис. 25. Химическая структура и спектры поглощения кето-каротиноидов в полярном окружении. (А) – поглощение эхиненона в оранжевой и красной формах ОСР, мутанте $ОСР^{WW}$ и липосомах. (Б) – поглощение сфероидена (SE) и сфероиденона (SO) в ацетоне. (В) – структура транс и цис изомеров кантаксантина, а также структура сфероидена (SE) и сфероиденона (SO). Рисунок из статьи [210] с изменениями.

Известно, что энергия 0-0 перехода в спектре поглощения каротиноида и частота колебания двойных связей обратно пропорциональны количеству двойных

связей (N) в сопряженной π -электронной системе (длина сопряжения). Для линейных каротиноидов (ликопин, нейроспорен) характерно наличие ярко выраженной вибронной структуры спектра поглощения, которая обусловлена взаимодействием электронных и колебательных состояний молекулы. Основной вклад в колебания таких молекул вносят колебания одинарных и двойных связей ($C=C$ -, мода ν_1) с характерными частотами порядка 1150 и 1520 cm^{-1} , что отчетливо проявляется в форме тонкой структуры спектров поглощения (зазор между полосами 0-0 и 0-1 равен $(\nu_1 + \nu_2)/2$). На поглощение каротиноида также влияет поляризуемость среды, с ростом которой наблюдается пропорциональное снижение энергии 0-0 перехода и характерной частоты колебания двойных связей. Эти правила выполняются и в случае циклических каротиноидов (бета-каротин, лютеин, зеаксантин и т.д.) для которых также характерно наличие выраженной вибронной структуры спектра поглощения [204, 211-215].

У каротиноидов с β -иононовыми кольцевыми группами (производные бета-каротина) дополнительные π -электроны могут входить в сопряжение с π -системой основной полиеновой цепи в транс конформации. Таким образом эффективная длина сопряжения (N) π -системы может изменяться в результате поворота кольцевых групп относительно полиеновой цепи, что, безусловно, влияет на положение 0-0 перехода и частоту колебания двойных связей [169].

Среди линейных и циклических каротиноидов кето-каротиноиды выделяются в особую группу. В кето-каротиноидах симметрия молекулы нарушается за счет сопряжения карбонильной группы с π -электронной системой основной цепи, и фотофизические свойства значительно изменяются по сравнению с аналогичными каротиноидами, не имеющими карбонильной группы. Парциальный отрицательный заряд, локализованный на кислороде, обуславливает диполь-дипольные взаимодействия молекулы каротиноида с окружением. В литературе зависимость стационарных спектров поглощения кето-каротиноидов от природы растворителя объясняют наличием состояний с внутримолекулярным переносом заряда (Intramolecular Charge Transfer, ICT) [214]. Это явление

обеспечивает быстрое перераспределение электронной плотности молекулы в возбужденном состоянии.

Изменение окружения кето-каротиноида с неполярного на полярное приводит к значительным модификациям спектра поглощения, что хорошо видно на примере - сфероидена и сфероиденона (см. *рис. 25B*). Единственное различие в химической структуре этих двух каротиноидов — это наличие кето-группы у сфероиденона. Спектры этих молекул в неполярных растворителях практически не отличаются. Однако в полярном окружении у сфероиденона, наряду с увеличением эффективной длины сопряжения, сопровождающимся батохромным сдвигом 0-0 перехода, наличие кето-группы, взаимодействующей с растворителем, приводит к значительному уширению полос в спектре поглощения.

Таким образом, взаимодействие π -электронов кето-группы с π -электронной системой основной цепи полиеновой цепи приводит к тому, что поглощение каротиноида смещается в красную область, а переходы между вибранными состояниями уширяются, за счет чего спектр поглощения теряет тонкую структуру.

Все вышеперечисленные эффекты сказываются на спектрах поглощения ОСР при переходе оранжевого ОСР красную форму (*рис. 25A*), который не связан с химической модификацией каротиноида. Причины этих различий обусловлены структурными отличиями этих пигмент-белковых комплексов. В оранжевой неактивной форме ОСР локальное белковое окружение кето-каротиноида оказывает влияние на конформацию каротиноида, искривляя полиеновую цепь относительно равновесной конфигурации. Однако важнейшими структурными факторами, определяющими необычные спектральные характеристики кето-каротиноида, и стабильность оранжевой неактивной формы ОСР являются остатки тирозина-201 (Y201) и триптофана-288 (W288), выступающие донорами водородных связей для кето-группы каротиноида. Наличие этих водородных связей, по сути, изолирует кислород кето-группы каротиноида от полиеновой цепи, что приводит к проявлению тонкой структуры в спектре поглощения неактивной формы ОСР (см. *рис. 25A*). Наоборот, разрыв водородных связей и последующая

релаксация конформации молекулы каротиноида приводит к взаимодействию кето-группы с π -системой полиеновой цепи, что сопровождается батохромным сдвигом и значительным уширением полосы S_0 - S_2 спектра поглощения. Аналогичные спектральные изменения происходят при частичном протеолизе белковых препаратов ОСР, полученных в работе Kay Holt, T., (1981), и приводит к появлению так называемого красного каротиноидного белка RCP, однако лишь спустя 27 лет было показано [68], что идентичными спектральными характеристиками обладает и физиологически активная форма ОСР^R, которая образуется в результате фотоактивации белка.

Согласно современным представлениям, при фотоактивации каротиноид теряет связь с С-доменом белка, изомеризуется и перемещается примерно на 12 Å вглубь N-домена, после чего структурные домены ОСР теряют оставшиеся белок-белковые контакты и удаляются друг от друга на расстояние, ограниченное лишь длиной междоменного линкера. Следует отметить, что само явление обратимой фотоконверсии ОСР было описано только спустя 4 года после установления фоторегуляторной роли данного белка в клетке. До середины 2017 года, когда к исследованию фотоцикла ОСР подключилась наша группа, в фотоцикле ОСР выделяли лишь 2 состояния (активное и неактивное), а механизм фотоактивации оставался невыясненным. Решению этих проблем посвящена серия экспериментов, описанных в данной главе.

Поскольку именно организация локального белкового окружения кето-каротиноида определяет его спектральные характеристики, а основными контактами хромофора и белка являются водородные связи с остатками Y201 и W288, мы исследовали роль этих связей и приступили к конструированию мутантов с точечными заменами этих аминокислотных остатков. Мы показали, что двойной мутант Y201A/W288A не способен образовывать оранжевую форму ОСР^O, что очевидно объясняется отсутствием водородных связей между кето-каротиноидом и белком. Однако, в препаратах мутантов с одиночными заменами Y201A или W288A была выявлена минорная фракция оранжевой формы белка,

спектр которой отличался от спектра дикого типа ОСР ярко выраженной вибронной структурой (рис. 25А).

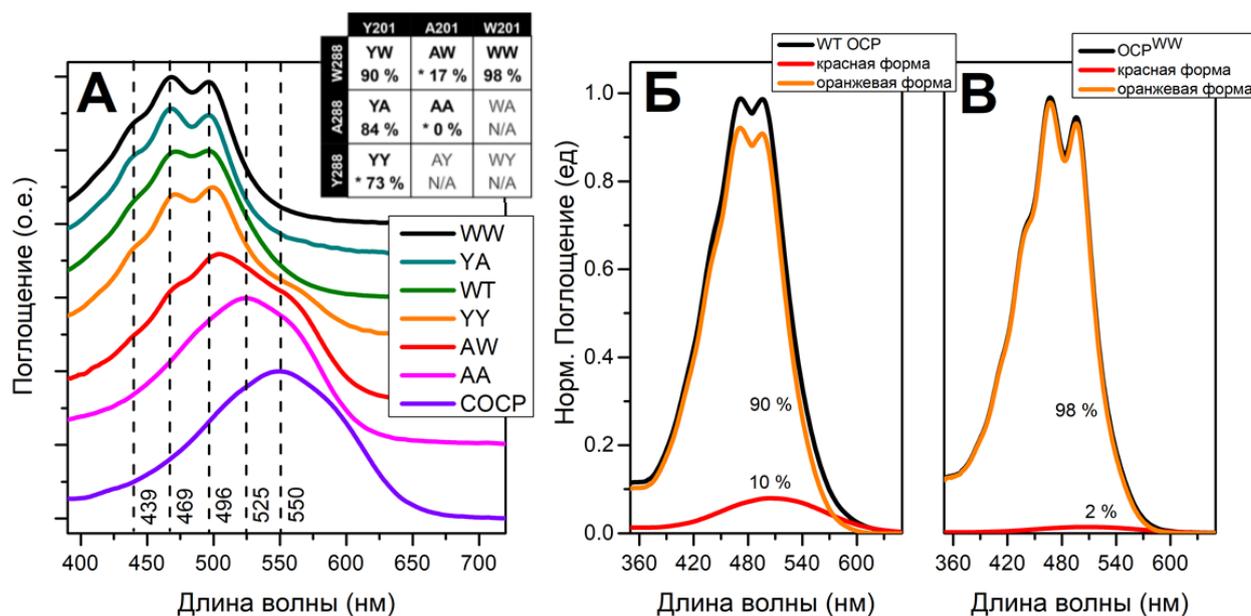


Рис. 26. Влияние точечных мутаций в локальном окружении кето-группы каротиноида на форму спектров поглощения белковых препаратов ОСР. **А** – спектры поглощения мутантных форм ОСР в 0.8 М фосфатном буфере. Таблица показывает выход оранжевой фотоактивной формы в препарате. Знак * указывает что при выделении оранжевая форма отсутствовала и её удалось получить только за счет инкубации препарата белка в фосфатном буфере. Разложение спектров поглощения дикого типа (**Б**) и мутанта ОСР^{WW} (**В**) на компоненты путем вычитания поглощения красной формы, получаемой в результате фотоконверсии образца.

Этот результат свидетельствует о том, что наличие сразу двух водородных связей с Y201 и W288 не является обязательным для образования оранжевой формы ОСР (см. рис. 26). Мутации не только снижали активационный барьер реакции фотопревращения препарата в красную форму примерно на 5 ккал/моль, что соответствует энергии одного моля водородных связей, но также снижали стабильность компактной оранжевой формы белка, из-за чего фракционировать препарат и выделить оранжевые формы в чистом виде не представлялось возможным. Поэтому нами был сконструирован мутант с заменой тирозина-201 на триптофан (ОСР^{WW}), который оказался стабилен в оранжевой форме, а его спектр поглощения также характеризовался хорошо выраженной вибронной структурой (см. рис. 26 В). Нам удалось получить дифрагирующие кристаллы ОСР^{WW} и исследовать организацию пигмент-белкового комплекса с разрешением до 1.39 Å с

помощью рентгеноструктурного анализа, что на данный момент является лучшим разрешением среди всех исследованных структур ОСР и его производных (см. PDB ID 6T6K, 6T6M, 6T6O [216]).

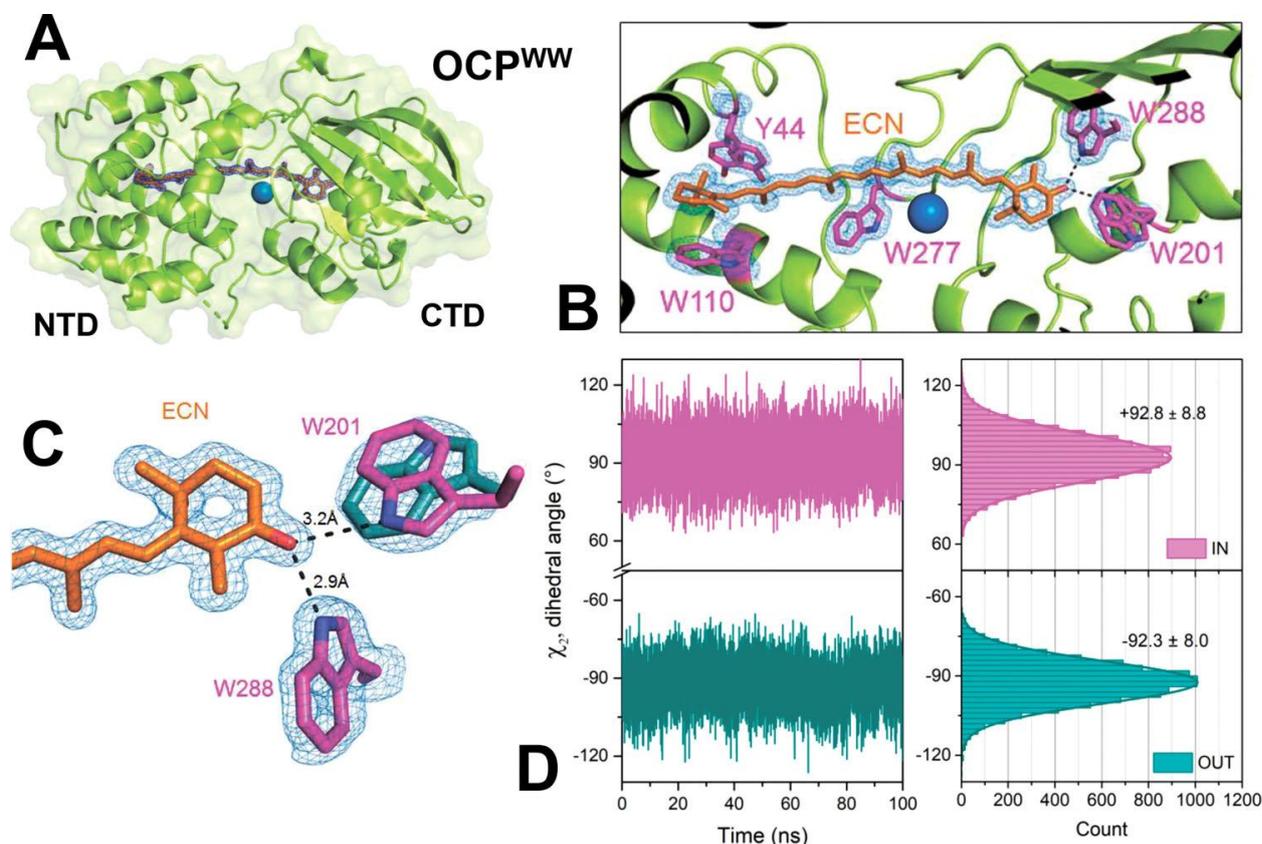


Рис. 27. Исследование пространственной структуры мутанта OCP^{WW} с помощью рентгеноструктурного анализа и молекулярной динамики. **А** – общий вид структур ОСР PDB ID 6T6O. **В** – область контактов кето-каротиноида с гидрофобной областью внутри белка. Указаны ключевые аминокислотные остатки. **С** – область связывания β -иононового кольца молекулы эхинонена в С-доме ОСР за счет образования водородной связи с остатком триптофана-288. **Д** – моделирование подвижности конформеров остатка триптофана-201. Длина траектории 100 нс.

Анализ кристаллической структуры OCP^{WW} показал, что дополнительный триптофан, введенный вместо тирозина-201, может находиться в двух конфигурациях, ни одна из которых не образует водородных связей с кето-каротиноидом. Это приводит к более сильному эффекту взаимодействия кислорода кето-группы каротиноида с единственным оставшимся донором водородной связи - триптофаном-288, что отражается в сходстве спектров поглощения OCP^{WW} и других мутантов, обладающих единственной водородной связью (см. *Таблицы 1 и 2*). В отличие от мутантов с заменами Y201A или W288A спектр поглощения

препарата ОСР^{WW} оказался гомогенным - без примесей спонтанно образующихся красных форм с большим по сравнению с компактной оранжевой формой гидродинамическим радиусом, и чрезвычайно низким вкладом красной формы (не более 2 %) в компактном состоянии, даже по сравнению с диким типом ОСР (более 10 %).

Большая спектральная гетерогенность и уширение спектра дикого типа ОСР по сравнению с мутантами (ОСР^{WW} и подобные, см. *рис. 26*) свидетельствует о возможной конкуренции двух аминокислотных остатков (Y201 и W288) за водородную связь с кето-группой каротиноида, что, вероятно, увеличивает конформационную подвижность молекулы каротиноида за счет поворотов β -иононового кольца, содержащего кето-группу. Эти предположения подтверждаются результатами, полученными нами с помощью методов молекулярной динамики, которые показывают, что в мутанте ОСР^{WW} водородная связь между триптофаном-288 и кислородом каротиноида сохраняется вдоль всей траектории молекулярной динамики, в то время как в диком типе ОСР эта связь может отсутствовать при сохранении связи с тирозином-201. Мы обнаружили, что выход активной красной формы при фотоактивации ОСР увеличивается у мутантов с одной водородной связью (вероятно, за счет снижения активационного барьера реакции примерно на 5 ккал/моль) для дальнейшего изучения механизмов фотоактивации ОСР мы решили исследовать динамику возбужденных состояний молекулы каротиноида в составе дикого типа ОСР и ряда мутантов с помощью методов фемтосекундной абсорбционной спектроскопии (*рис. 27*).

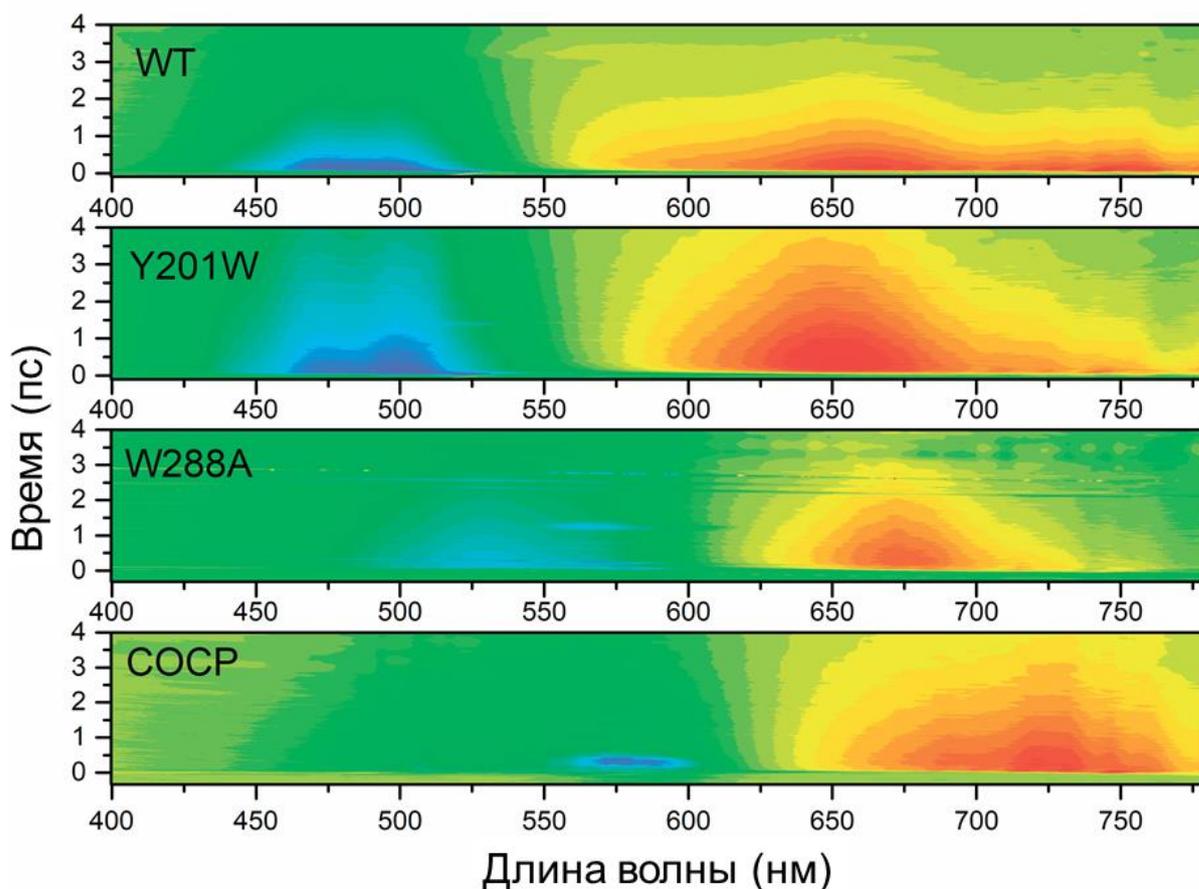


Рис. 28. Дифференциальные спектры поглощения препаратов дикого типа ОСР и ряда мутантов измеренные с помощью лазерной абсорбционной спектроскопии зондирования-накачки с фс временным разрешением. Просветление полос поглощения показано синим цветом, поглощение, возникающее в возбужденном состоянии - красным. Концентрация белковых препаратов 200 мкМ. Возбуждение каротиноида импульсом накачки осуществляли при 520 нм (WT Y201W) и 580 нм (W288A и СОСР).

Поскольку переходы S_0 - S_1 в каротиноидах запрещены правилами симметрии, при поглощении кванта заселяется уровень S_2 . Далее, происходит быстрая релаксация S_2 (характерное время жизни возбужденного состояния ~ 100 фс) и заселение уровня S_1 (время жизни 3-5 пс). Для кето-каротиноидов в полярных средах характерны также состояния, возникающие за счет перераспределения электронной плотности молекулы в возбужденном состоянии – так называемые состояния с переносом заряда (intramolecular charge transfer states, ICT, время жизни от 300 до 800 фс). Поскольку эти состояния обладают отличающимися временами жизни и проявляются в различных областях разностного спектра поглощения каротиноида (см *рис. 27*), методы глобального и таргетного анализа позволяют наблюдать за эволюцией возбужденных состояний. Следует отметить, что данный

подход применялся к изучению возбужденных состояний каротиноида в ОСР еще до установления физиологической роли белка (Polívka, T. et al. (2005) [78]), но не позволил выявить образования первичного фотопродукта из-за крайне низкого квантового выхода (~ 1.5 %). Эти параметры фотоконверсии ОСР затрудняли исследование связи между возбужденными состояниями кето-каротиноида и начальными стадиями фотоцикла. Высокая разрешающая способность фемтосекундной спектроскопии позволило Konold, P.E. et al. (2018) [217] обнаружить в динамике возбужденных состояний ОСР еще один компонент – S^* с характерным временем жизни порядка 12 пс и выходом менее 5 %. Природа состояния S^* каротиноидов на данный момент остается объектом научных дискуссий, однако известно, что его возникновение характерно исключительно для кето-каротиноидов в полярных средах и, предположительно, оно соответствует молекулам с неравновесной конфигурацией или «горячему» основному состоянию каротиноида [214]. Konold, P.E. et al. предположили, что S^* может играть роль в фотоактивации ОСР, однако низкий выход данного состояния не позволил определить пути его возникновения.

Исследуя динамику возбужденных состояний дикого типа ОСР и мутанта ОСР^{WW}, мы обнаружили, что выход S^* в белке с единственной водородной связью между триптофаном-288 и кето-каротиноидом увеличивается до 26 % (см рис. 29), т.е. более чем в 5 раз по сравнению с диким типом ОСР, в котором наблюдается гетерогенность конформации каротиноида из-за взаимодействия кислорода с двумя донорами водородных связей. Используя глобальный анализ массива спектрально-кинетических данных нами установлено, что состоянию S^* предшествует образование «смешанного» возбужденного состояния, характеризующееся переносом заряда. Таким образом, перераспределение электронной плотности в возбужденной молекуле кето-каротиноида приводит к появлению неравновесных конформаций хромофора (S^*), которые вероятно обеспечивают разрыв водородных связей и инициацию фотоцикла ОСР.

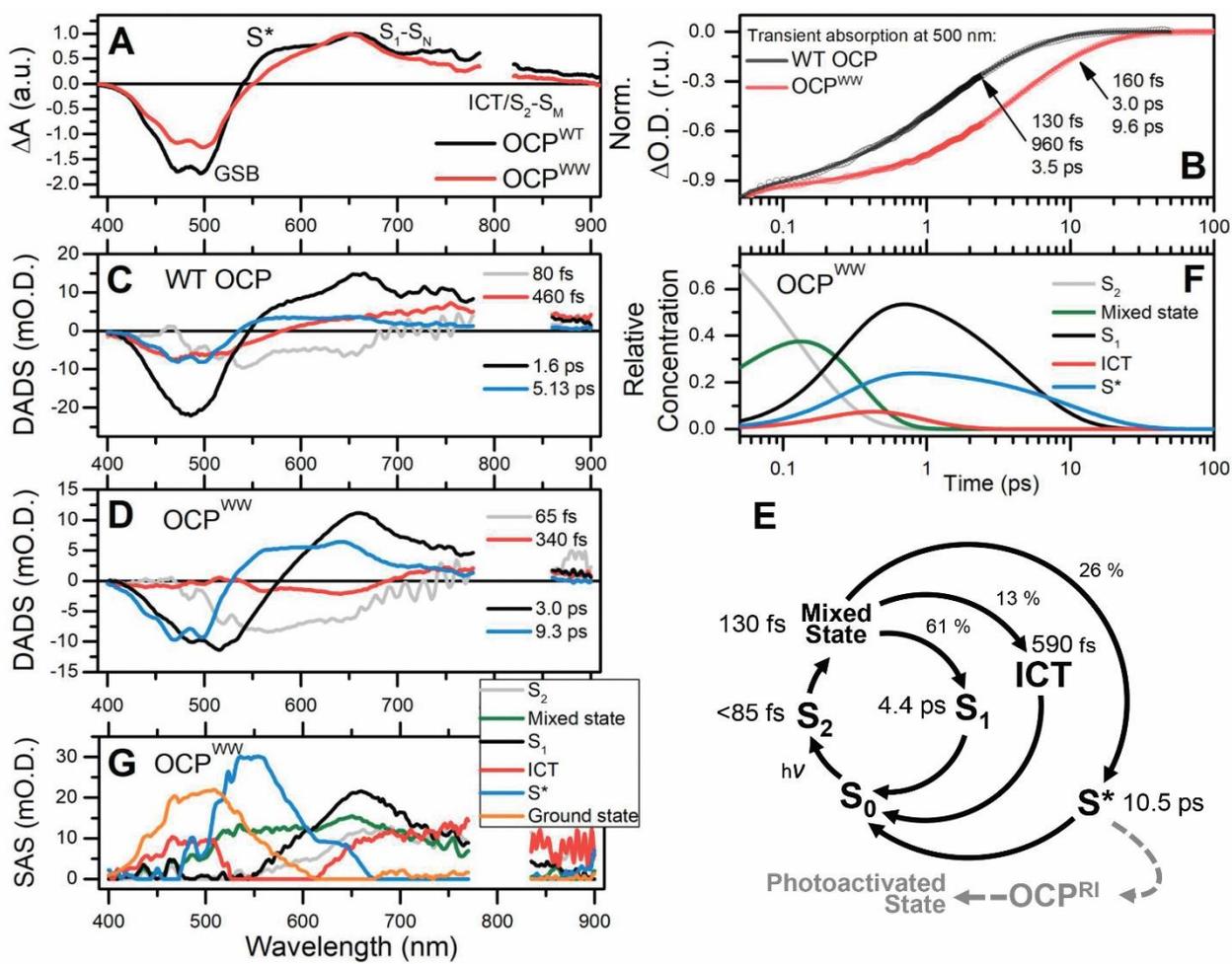


Рис. 29. Исследование динамики возбужденных состояний молекулы кето-каротиноида в ОСР. **А** – дифференциальные спектры поглощения дикого типа ОСР (WT) и мутанта ОСР^{WW} через 1 пс после возбуждения каротиноида 30 фс лазерным импульсом при 520 нм. **В** – кинетика восстановления поглощения в области 500 нм, характеризующая появление основного состояния каротиноида S₀ в препаратах дикого типа ОСР и мутанта ОСР^{WW}. **С** и **Д** – спектры кинетических компонент (Decay Associated Spectra, DAS) дифференциального поглощения дикого типа ОСР и мутанта ОСР^{WW}. **Е** – модель переходов между состояниями каротиноида в составе ОСР^{WW} после поглощения фотона. **Ф** – кинетики изменений относительной концентрации состояний и соответствующие спектры (**Г**) восстановленные путем аппроксимации массива экспериментальных данных с помощью модели, представленной на схеме (**Е**). Рисунок из статьи [216].

Для проверки гипотезы об участии состояния S* в фотоцикле ОСР нами была проведена серия экспериментов по изучению скорости разрыва водородной связи между кето-кислородом каротиноида и остатком триптофана-288. Исследуя фотоцикл ОСР мы обнаружили, что переходы между состояниями пигмент-белкового комплекса можно наблюдать не только по изменению спектра поглощения каротиноида при обратимом переходе белка из оранжевой формы в

красную, но также и по изменению интенсивности флуоресценции триптофановых остатков в составе ОСР. Известно, что флуоресценция триптофана крайне чувствительна к изменению локального окружения этого аминокислотного остатка в белке [148]. Это явление лежит в основе многих биохимических и биофизических методов оценки белок-белковых и белок-лигандных взаимодействий, а также исследований конформационной подвижности белковой матрицы [218]. Мы показали, что фотоактивация ОСР и переход белка в красную форму приводит к многократному увеличению интенсивности флуоресценции его триптофановых остатков [92, 219].

Анализ мгновенных спектров флуоресценции ОСР в УФ диапазоне доказал, что в оранжевой форме ОСР флуоресценция остатков триптофана W288, W41, W110 и W110 потушена статически, а интенсивность флуоресценции W101 снижена за счет эффективного переноса энергии электронного возбуждения на молекулу каротиноида (рис. 30) [219]. Мы предположили, что наблюдаемое в эксперименте увеличение интенсивности флуоресценции остатка W288 происходит при разрыве водородной связи между триптофаном и кето-каротиноидом что, соответственно, может быть использовано для измерения скорости разрыва водородной связи. Очевидно, что наличие других триптофановых остатков в белке затрудняет наблюдению за специфическим взаимодействием W288 и кето-каротиноида. В связи с этим мы решили удалить все триптофановые остатки ОСР кроме W288, образующего водородную связь с кето-каротиноидом. В результате был получен мутант ОСР-W41F/W101F/W110F/W277H (далее ОСР-3FH), который несмотря на замену 4 консервативных остатков оказался способным связывать кето-каротиноид, образуя компактную оранжевую форму, отличающуюся от дикого типа лишь меньшим поглощением в УФ части спектра [220].

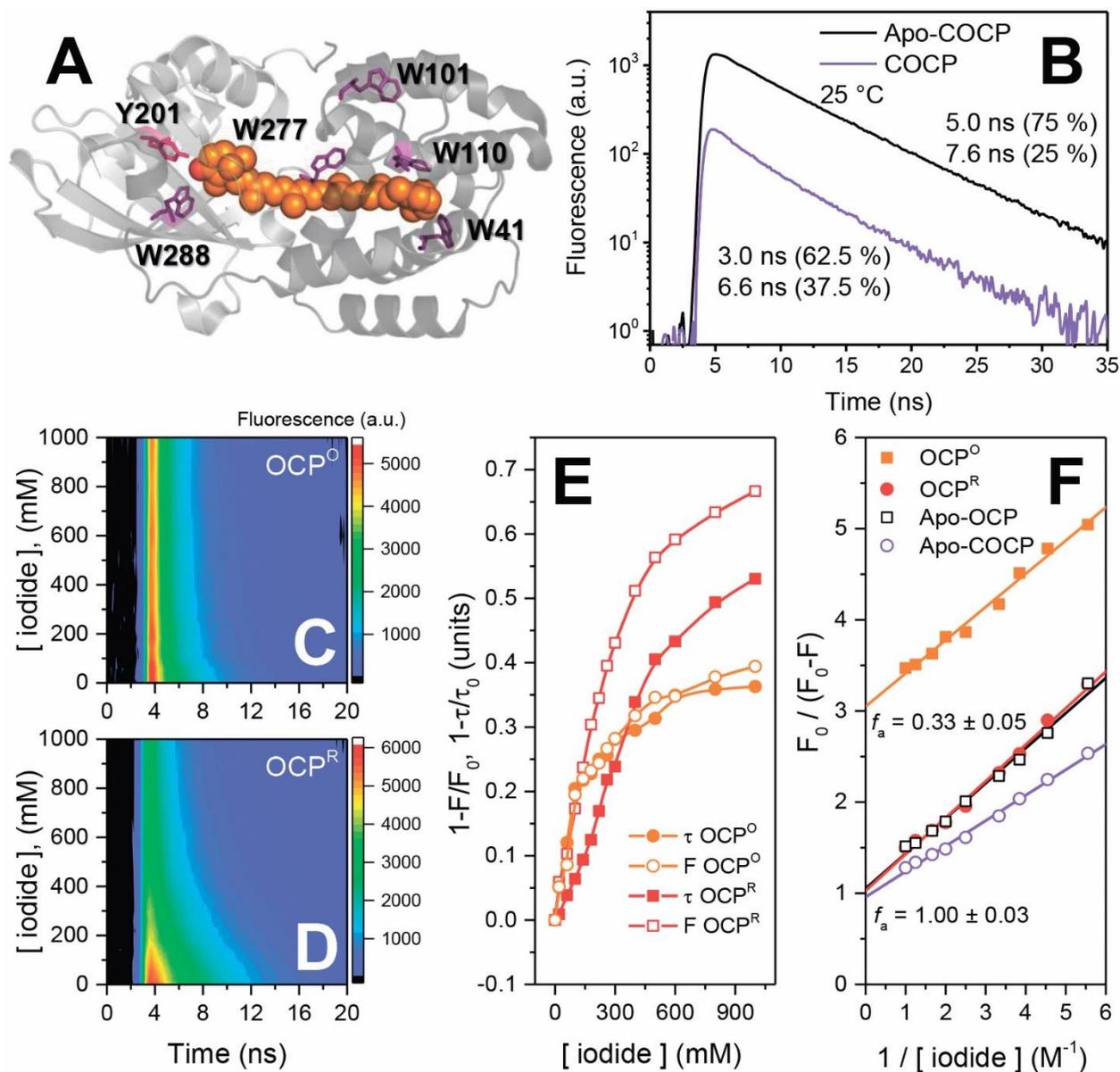


Рис. 30. Определение триптофановых остатков в молекуле OCP доступных для тушения за счет взаимодействия с каротиноидом и иодид-ионами. **A** – положение всех остатков триптофана в структуре OCP. **B** – кинетики затухания флуоресценции триптофановых остатков (W277 и W288) апо- и холо форм С-домена OCP. **C** и **D** – тушение флуоресценции триптофановых остатков в оранжевой компактной (**C**, OCP^O) и фотоактивированной красной (**D**, OCP^R) формах при увеличении концентрации иодид-иона в растворе. Измерения проводили при 2 °С для снижения скорости релаксации красной формы. Изменения интенсивности (F) и среднего времени жизни (τ) флуоресценции триптофановых остатков в оранжевой и красной формах OCP в обычных (**E**) и модифицированных (**F**) координатах Штерна-Фольмера. Пересечение с осью ординат определяет обратные значения доли (f_a) доступных для тушения остатков триптофана. Концентрации белка были одинаковыми во всех образцах. Рисунок из статьи [219].

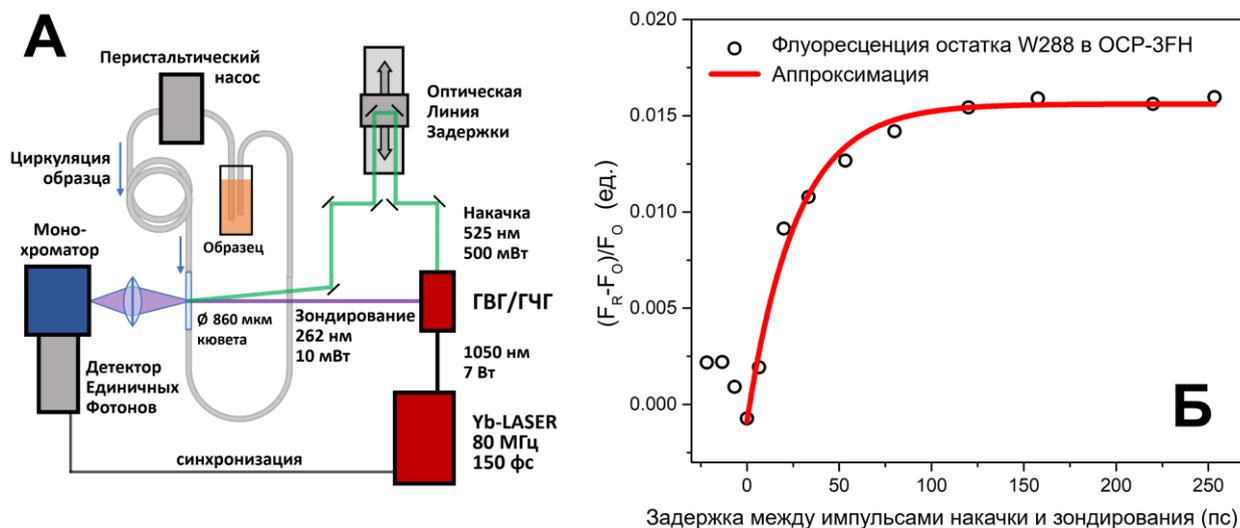


Рис. 31. Измерение кинетики разрыва водородной связи между триптофаном-288 и кето-каротиноидом в мутанте OCP-W41F/W101F/W110F/W277H (OCP-3FH) с помощью флуоресцентной фемтосекундной спектроскопии. А – схема установки для спектродиффузиометрии в режиме накачки-зондирования с суб-пикосекундным временным разрешением. Б – кинетика изменения интенсивности флуоресценции остатка W288 в белке OCP-3FH в ответ на 150 фс вспышку 525 нм, 500 мВт. Рисунок из статьи [220] с изменениями.

В ходе освещения OCP-3FH сине-зеленым светом мы детектировали обратимое образование красной активной формы, что свидетельствует о сохранении фотоактивности OCP даже при значительных модификациях белковой матрицы. Для регистрации изменений интенсивности триптофановой флуоресценции OCP-3FH в режиме накачки-зондирования, мы использовали 4 гармонику Yb-лазера (262 нм) с длительностью импульса 150 фс для возбуждения триптофановой флуоресценции, а для фотоактивации образец облучали 2 гармоникой этого же лазера (525 нм), что позволило, используя линию оптической задержки и систему время-коррелированного счета фотонов, добиться суб-пикосекундного временного разрешения (см. рис. 31). Мы обнаружили, что интенсивность флуоресценции W288 в ответ на фс лазерную вспышку, возбуждающую каротиноид, увеличивается с характерным временем порядка 23 пс (рис. 31). Получив оценку времени, необходимого для разрыва водородной связи между кето-каротиноидом и триптофаном-288 при фотоактивации OCP, мы сравнили её с временами жизни возбужденных состояний кето-каротиноида. Очевидно, что состояния S_2 , ICT и S_1 с временами жизни 85 фс, 590 фс и 4.4 пс

соответственно, не могут напрямую инициировать процесс, длительность которого значительно превышает их времена жизни. Поэтому среди всех известных нам возбужденных состояний кето-каротиноида состояние S^* , время жизни которого превышает 10 пс, является наиболее вероятным предшественником первого стабильного интеремедиата фотоцикла ОСР, в котором молекула кето-каротиноида освобождена от главного фактора, стабилизирующего неактивное состояние белка - водородной связи с триптофаном-288. Таким образом мы показали, что поглощении кванта молекулой кето-каротиноида в составе ОСР приводит к перераспределению электронной плотности каротиноида и возникновению за времена порядка нескольких сотен фс неравновесной конформации кето-каротиноида, которая не образует водородных связей с белковым окружением и инициирует последующие изменения структуры ОСР. Для объяснения наблюдаемых эффектов нами был предложен механизм разрыва водородных связей за счет обратимого протонирования молекулы кето-каротиноида в возбужденном состоянии.

Известно, что активация ОСР может происходить без непосредственного фотовозбуждения каротиноида. В результате некоторые мутантные формы ОСР с пониженной стабильности компактной формы балансируют между оранжевым и активным красным состоянием. Очевидно, в них могут происходить процессы спонтанного разрыва водородных связей под действием сил, возникающих в белковой матрице без непосредственного действия света. Но, поскольку ОСР является фоторецептором, ответ на вопрос, как энергия возбуждения, поглощенная каротиноидом, может вызвать разрыв водородных связей, имеет решающее значение для понимания функционирования данного пигмент-белкового комплекса. Расчёты, выполненные нами с помощью методов квантовой химии [216], показывают, что с учетом белкового окружения энергия водородных связей между кето-каротиноидом и остатками тирозина и триптофана составляет порядка 8 ккал/моль, что хорошо согласуется с нашими оценками, полученными в экспериментах *in vitro* [216]. Оценки энергии водородных связей для каротиноида

в возбужденном состоянии показывают, что в S_2 энергия увеличивается на 3.5 ккал/моль, а в S_1 практически не меняется. Таким образом, переход молекулы каротиноида в возбужденные состояния S_2 и S_1 не приводит к повышению вероятности разрыва водородной связи. Более того, расчеты показывают, что исчезновение водородной связи при сохранении конформации каротиноида, безусловно, должно сопровождаться батохромным сдвигом спектра поглощения, что не находит подтверждения в экспериментах (см. *рис. 28* и *рис. 29*).

В связи с этим мы рассматриваем альтернативный механизм разрыва водородных связей - обратимое протонирование кето-каротиноида и образование иона оксакарбения за счет переноса протона от одного из доноров водородной связи (W288 или Y201) к кислороду кето-группы каротиноида. Квантово-химические оценки протонной аффинности комплексов каротиноида показывают, что возможность данной реакции определяется неоднородностью распределения зарядов в локальном окружении каротиноида [216]. Особенностью сопряженных молекул является их высокая поляризуемость, связанная с делокализацией π -электронов. Распределение заряженных групп в белке формирует градиент электростатического потенциала на поверхности полости связывающей каротиноид. Примечательно, что распределение заряда в полости сильно асимметрично, при этом положительно заряженные остатки сосредоточены в основном в C-домене, именно там, где расположены доноры водородных связей и происходит связывание кето-группы каротиноида, а отрицательно заряженные остатки преобладают в N-домене (см. *рис. 32*). Мы предполагаем, что эти заряды, локализованные вблизи с полиеновой цепью каротиноида, оказывают заметное влияние на сродство каротиноида к протону даже на значительном расстоянии от кислорода в составе кето-группы каротиноида из-за поляризации сопряженной системы.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы выполнили расчеты протонной аффинности для кето-каротиноида в нескольких модельных потенциалах на основе пространственной структуры ОСР и обнаружили что вдоль молекулы каротиноида существует значительная неоднородность распределения электростатического потенциала. Таким образом, мы предполагаем, что разрыв водородной связи обеспечивается асимметричным распределением зарядов белкового окружения. Очевидно, также локально распределенные заряды должны взаимодействовать с возбужденными состояниями каротиноида, в которых происходит перераспределение электронной плотности (см. *рис. 32*). Иначе говоря, фотовозбуждение кето-каротиноида в ОСР, приводящее к образованию состояний с переносом заряда, вызывает дополнительный сдвиг электронной плотности в

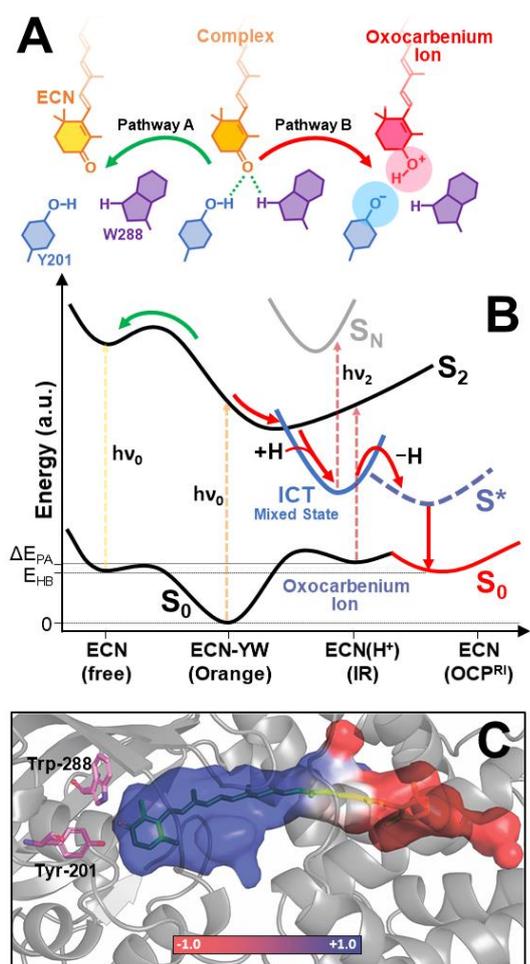


Рис. 32. Возможный механизм разрыва водородных связей между белком и каротиноидом в ОСР. Пояснения к рисунку в тексте.

сторону кето-кислорода, тем самым увеличивая его отрицательный заряд. Мы предполагаем, что этот эффект, стимулируемый электрическим полем белкового окружения, вызывает обратимую ионизацию одного из доноров водородных связей с образованием очень нестабильного иона оксокарбения. Чтобы оценить свойства протонированного кето-каротиноида, мы выполнили квантово-химические расчеты и модельные эксперименты с помощью стационарной абсорбционной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния. Нами обнаружен значительный (~ 400 нм) батохромный сдвиг спектра поглощения иона оксокарбения кето-каротиноида и снижение вклада колебаний -C-C- связей в спектре комбинационного рассеяния, что объясняется перераспределением электронной плотности, которое, в свою очередь,

влияет на эффективные длины связей в сопряженной системе. Иначе говоря, в результате протонирования молекула кето-каротиноида оказывается в неравновесной конформации, релаксация которой приводит к значительному изменению взаимного расположения кето-группы каротиноида и доноров водородных связей (W288 и Y201). Таким образом, после депротонирования каротиноид вновь оказывается в неравновесном состоянии с измененной конформацией (S^*), в которой расстояние между кислородом кето-группы и остатками W288 и Y201 не обеспечивает образование водородной связи. Последующие изменения структуры каротиноида, освободившегося от водородных связей в компактном белковом окружении, связаны с самопроизвольной изомеризацией – поворотом β -иононового кольца в C-домене ОСР.

С помощью комбинации методов молекулярной динамики и спектроскопии комбинационного рассеяния мы установили, что в отсутствие водородных связей двугранный угол между полиеновой цепью и β -иононовым кольцом меняется от 132° (в кристалле ОСР) до $80-50^\circ$ без значительных изменений структуры белка [92]. Это сопровождается увеличением эффективной длины сопряжения π -системы каротиноида и характерными изменениями в спектрах комбинационного рассеяния (положение полосы колебаний $-C=C-$). Примечательно, что, находясь в компактном белковом окружении, полиеновая цепь каротиноида остается искривленной, о чем свидетельствует высокая интенсивность полосы колебаний атомов водорода вне плоскости полиеновой цепи (Hydrogen Out Of Plane, HOOP $\sim 980\text{ см}^{-1}$).

Таким образом, мы определили как фотовозбуждение молекулы кето-каротиноида в составе ОСР приводит к образованию фотопродукта – переходного состояния, в котором отсутствуют важнейшие белок-хромофорные взаимодействия, стабилизирующие оранжевую неактивную форму белка. Поскольку данное состояние образуется за десятки пикосекунд, а белковая матрица не способна так быстро отреагировать на изменение состояния хромофора, велика вероятность, что данное состояние релаксирует с восстановлением исходной

оранжевой неактивной формы. Действительно, хотя выход первого фотопродукта составляет примерно 1.5 %, квантовый выход активной красной формы ОСР не превышает 0.2 %. Вероятно, это необходимо для выполнения ОСР фотозащитных функций только при высоких интенсивностях света. В случае если бы ОСР конвертировался в физиологически активную форму с большей эффективностью, работа фотосинтетического аппарата цианобактерий ингибировалась бы уже при относительно низких уровнях инсоляции, безопасных для клетки цианобактерии, что очевидно негативно сказывалось бы на скорости роста культуры.

Итак, группа белок-хромофорных и белок-белковых контактов стабилизируют компактную оранжевую форму ОСР для защиты от спонтанной активации, а переход к активной красной форме подразумевает последовательность конформационных переходов белковой матрицы. Для понимания сути этих конформационных перестроек нам необходимо подробнее рассмотреть структуру оранжевой формы ОСР (рис. 33).

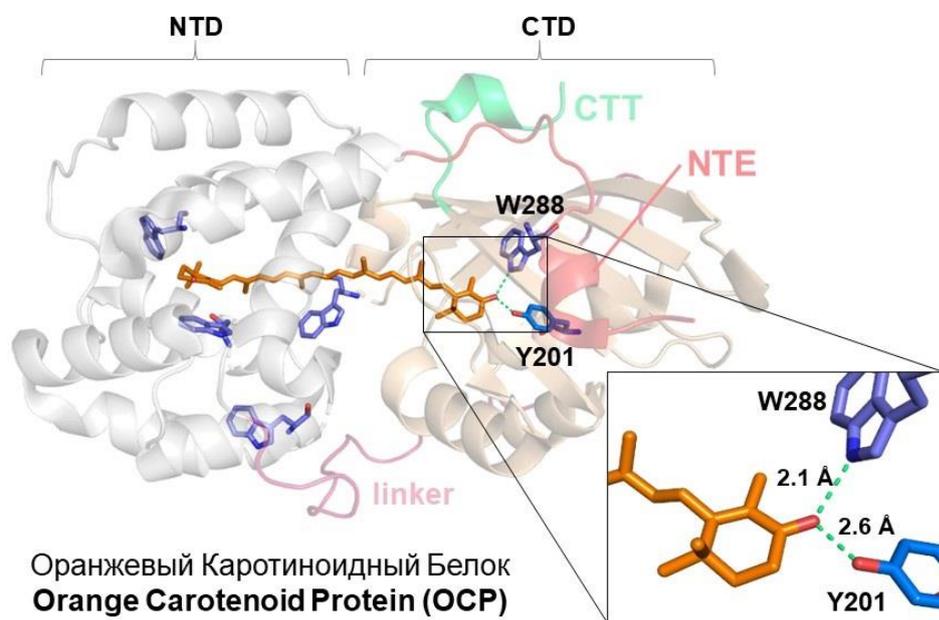


Рис. 33. Структура неактивной формы Оранжевого Каротиноидного Белка (OCP, PDB ID 3MG1). N- и C- домены ОСР показаны серым и бежевым цветом, соответственно; ключевые ароматические аминокислотные остатки показаны фиолетовым; междуомный линкер показан розовым; каротиноид – оранжевым; водородные связи между кето-каротиноидом и белком зелеными пунктирными линиями.

Анализ кристаллической структуры ОСР в оранжевой неактивной форме

показывает, что белок состоит из двух плотно контактирующих структурных доменов: N-концевого (NTD), состоящего исключительно из α -спиралей (см. *рис. 33*) и C-концевого (CTD), вторичная структура которого содержит β -складчатый участок. Домены образуют «тоннель», в котором располагается молекула кето-каротиноида и ряд белок-белковых контактов: аминокислотный остаток N-домена R155 образует солевой мостик с E244 C-домена; короткая α -спираль в самом начале N-концевого домена (N-Terminal Extension, NTE) образует группу водородных связей с β -складчатым участком C-домена; еще одна короткая α -спираль в конце C-домена (C-Terminal Tail, CTT) контактирует с элементами структуры NTD и CTD. Но, как мы показали, ни один из этих элементов структуры ОСР не способен удерживать белок в компактной форме и в отсутствии кето-каротиноида апо-форма ОСР структурно не отличается от красной активной формы: в результате активации N- и C-домены ОСР удаляются друг от друга на расстояние, ограниченное длиной междоменного линкера. Несмотря на то, что в активной (и в апо-) форме ОСР все основные элементы вторичной структуры сохраняются, наличие неструктурированных элементов приводит к большей конформационной подвижности структурных доменов. С этой точки зрения активную форму ОСР можно считать «расплавленной глобулой». Это подчеркивает значимость белок-хромофорных контактов, возникающих при образовании водородных связей с Y201 и W288. При разрыве водородных связей белка с кето-каротиноидом энергии среды достаточно для стохастического перехода белковой матрицы в состояние расплавленной глобулы. Однако во время этого перехода водородные связи с кето-каротиноидом могут быть восстановлены, что в конечном итоге стабилизирует переходные конформационные состояния белка.

Несмотря на высокую скорость разрыва водородной связи между каротиноидом и белком, реорганизация белковой матрицы ОСР протекает значительно медленнее. Так, например при комнатной температуре релаксация финальной красной формы ОСР происходит за времена порядка 10 секунд [92, 106, 109, 143, 219, 221]. Следует отметить, что для изучения свойств активной красной

формы ОСР её низкий квантовый выход не является принципиальной проблемой, поскольку при длительном квазинепрерывном освещении практически весь ОСР конвертируется в форму с максимальным временем жизни. Однако, для обнаружения промежуточных конформационных состояний белка необходимо импульсное возбуждение и высокое временное разрешение. В связи с этим для изучения интермедиатов фотоцикла ОСР мы использовали флеш-фотолиз и флуоресцентную спектроскопию в режиме накачки-зондирования (см. *рис. 34*).

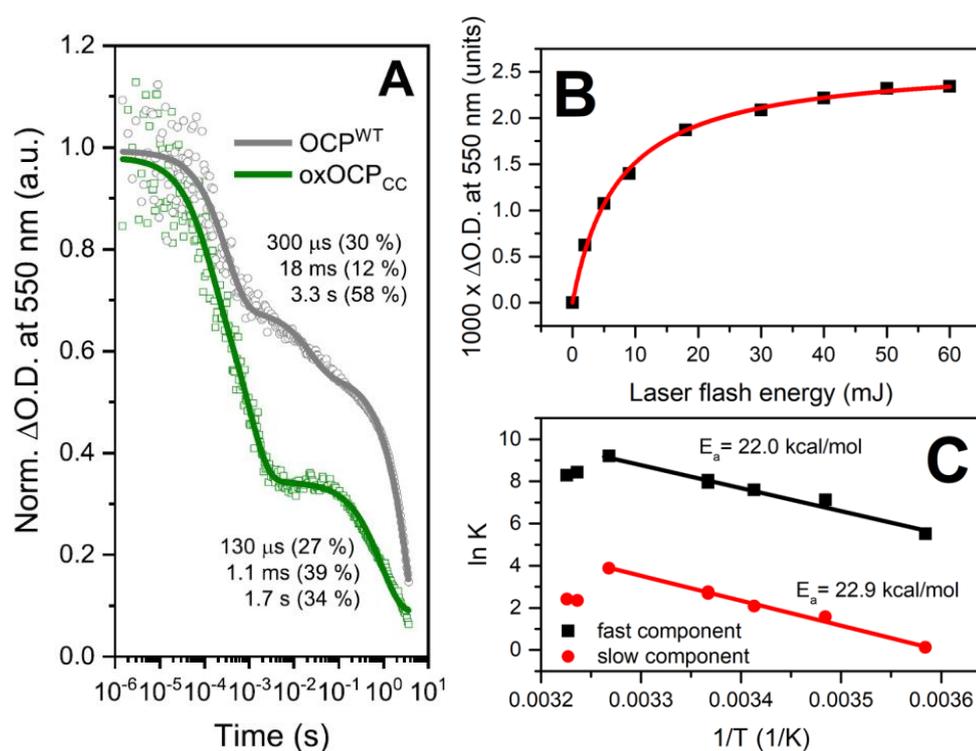


Рис. 34. Релаксация красных форм ОСР после возбуждения наносекундными лазерными импульсами. **А** – кинетика изменения оптической плотности при 550 нм ОСР дикого типа (серая линия) и мутанта ОСР_{CC} в окисленной форме (зеленая линия), характеризующейся ковалентной связью между NTE и участком в С-домене ОСР. **В** - зависимость амплитуды изменений оптической плотности при 550 нм от мощности наносекундной лазерной вспышки. **С** – температурная зависимость констант скоростей релаксации красной формы ОСР в координатах Аррениуса. Оценки констант скоростей получены путем анализа данных, представленных на панели **А**. Линейные участки зависимости аппроксимировали линейной зависимостью для определения энергии активации E_a .

В данной серии экспериментов при возбуждении ОСР вспышками Nd:YAG-лазера с длительностью 7 нс мы регистрировали изменения оптической плотности в области 550 нм. Поскольку длительность вспышки (7 нс) и аппаратная функция детектора превышают характерное время разрыва водородной связи (23 пс) данный

метод не позволяет разрешить кинетику накопления красной формы белка, однако уже на временах порядка 1-10 мкс наблюдается резкое увеличение поглощения, свидетельствующее о появлении красной формы ОСР, концентрация которой затем постепенно снижается до исходного уровня (см. *рис. 34*). Для дикого типа ОСР при 36 °С кинетика изменения оптической плотности характеризуется наличием как минимум трех компонент с временами релаксации 300 мкс, 18 мс и 3.3 с с вкладками 31, 12 и 57 %, соответственно. Медленная компонента кинетики, очевидно, соответствует релаксации ОСР с наибольшими изменениями конформации белковой матрицы – финальной физиологически активной красной формы ОСР^R.

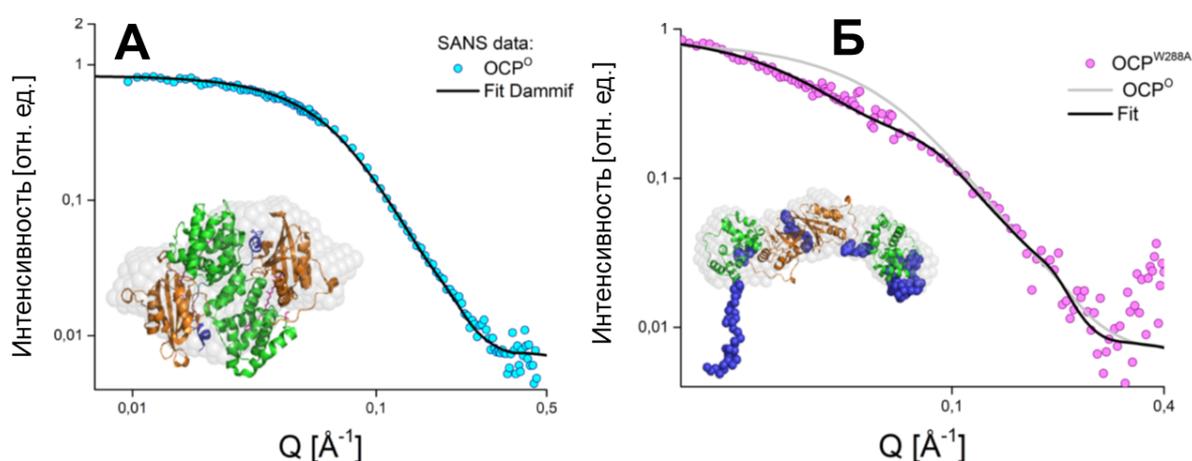


Рис. 35. А - анализ данных SANS для препарата ОСР 1 мг/мл, измеренных в темноте при 15 °С (голубые точки). Модель (черная линия) соответствующая реконструированной структуре ОСР в растворе (показана сферами серого цвета на вставке), получена с помощью пакета программ DAMMIF и кристаллической структуры димера ОСР^O (PDB ID 3MG1). Б - анализ данных SANS для мутанта ОСР^{W288A} (фиолетовые кружки, также 1 мг/мл, при 15 °С). Модель (черная линия), соответствующая структуре активного красного состояния ОСР^R в растворе (показана сферами серого цвета на вставке), получена с помощью программного комплекса DAMMIN. Соответствующая модели структура была получена с использованием CORAL. Гибкие области в структуре ОСР^{W288A} обозначены синим цветом, а NTD и CTD - зеленым и оранжевым. Для сравнения серая линия показывает кривую SANS, рассчитанную для димера ОСР^O (панель А).

Согласно структурным данным, полученным нами с применением методов малоуглового рентгеновского рассеяния (Small Angle X-Ray Scattering, SAXS) [222], малоуглового рассеяния нейтронов (Small Angle Neutron Scattering, SANS) (см. *рис. 35*) и квазиэластического рассеяния нейтронов (Quasielastic Neutron Scattering, QENS) [223], а также эксклюзионной хроматографии (SEC) [143] и флуоресцентной корреляционной спектроскопии (Fluorescence Correlation

Spectroscopy, FCS) [224] финальная красная форма ОСР^R характеризуется большим (по сравнению с оранжевой формой) гидродинамическим радиусом, большей подвижностью элементов вторичной структуры и боковых заместителей за счет нарушения контактов между N- и C-доменами.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа холо-формы N-домена ОСР и нашим экспериментам по флуоресцентному мечению белка (см. раздел 3.1), в результате фотоактивации каротиноид может целиком переместиться в N-домен ОСР. Поэтому для восстановления контактов с донорами водородных связей, находящимися в C-домене, необходимо чтобы N- и C-домены были специфически ориентированы друг относительно друга формируя «тоннель», по которому молекула каротиноида возвращается к исходному положению. Поскольку в активной красной форме движения N- и C-доменов ОСР ограничены лишь протяженным междоменным линкером, подходящая для релаксации конфигурация встречается крайне редко, что и определяет большое (секунды) время жизни данного состояния. Релаксация красных форм ОСР, которая происходит на два (18 мс) и четыре (300 мкс) порядка быстрее релаксации финальной формы ОСР^R, соответствует состояниям белковой матрицы, в которых структурные домены ОСР не расходятся и целостность каротиноидного «тоннеля» не нарушается, вероятно, за счет сохранения ряда белок-белковых контактов. Это предположение подтверждается экспериментами, в которых нам несколькими способами удалось ограничить подвижность структурных доменов: за счет введения ковалентных связей между областями белок-белковых контактов (ОСР-I5C/F299C, см *рис. 34*), за счет высоких концентраций космотропов и, наконец, за счет специфических взаимодействий с FRP – белком, регулирующим активность ОСР в клетке. Во всех случаях ограничение подвижности структурных элементов ОСР способствовало значительному увеличению скорости релаксации красных форм и снижению квантового выхода долгоживущих состояний (см. *рис. 34*).

Важно отметить, что долгое время в литературе красную форму ОСР отождествляли с физиологически активной – способной взаимодействовать с

антенными комплексами и регуляторными белками, однако наши экспериментальные данные, основанные на время-разрешенной спектроскопии, свидетельствуют, что это верно только в отношении финальной формы ОСР^R, лишенной контактов между N- и C-доменами. Важно, что состояния, характеризующиеся быстрой релаксацией красных форм, мало отличаются своей структурой от оранжевой формы ОСР^O так же, как и их функциональная активность.

Рассматривая структуру оранжевой и красной форм ОСР в целом (см. *рис. 33*) и строение отдельных элементов, участвующих в белок-белковых взаимодействиях, нам удалось значительно модифицировать фотоцикл ОСР, учитывая последовательность конформационных изменений белковой матрицы. Так, например, при анализе кристаллической структуры апо-формы гомолога C-домена ОСР мы обнаружили, что короткая α -спираль (СТТ), расположенная в самом конце последовательности, находится в нетипичной для оранжевой формы ОСР конформации. В отсутствие кето-каротиноида СТТ блокирует вход в каротиноидный «тоннель». Анализ ЯМР спектров позволил нам показать, что данный элемент вторичной структуры обладает значительной конформационной подвижностью на нс шкале времен [225]. Эксперименты с мутантом ОСР (Δ СТТ) показали, что релаксация финальной красной формы происходит примерно в два раза быстрее и с меньшим энергетическим барьером в отсутствие α -спирали C-концевого домена (см. *рис. 36*). Следовательно конформационная подвижность СТТ приводит к блокировке каротиноидного «тоннеля» при образовании ОСР^R, мешая каротиноиду вернуться в C-домен даже при подходящем взаимном расположении N- и C-доменов. Вероятно, этот эффект может иметь важное физиологическое значение, поскольку за счет него в диком типе ОСР достигается еще большее время жизни функционального состояния и, соответственно, большая эффективная концентрация формы, оказывающей физиологические эффекты.

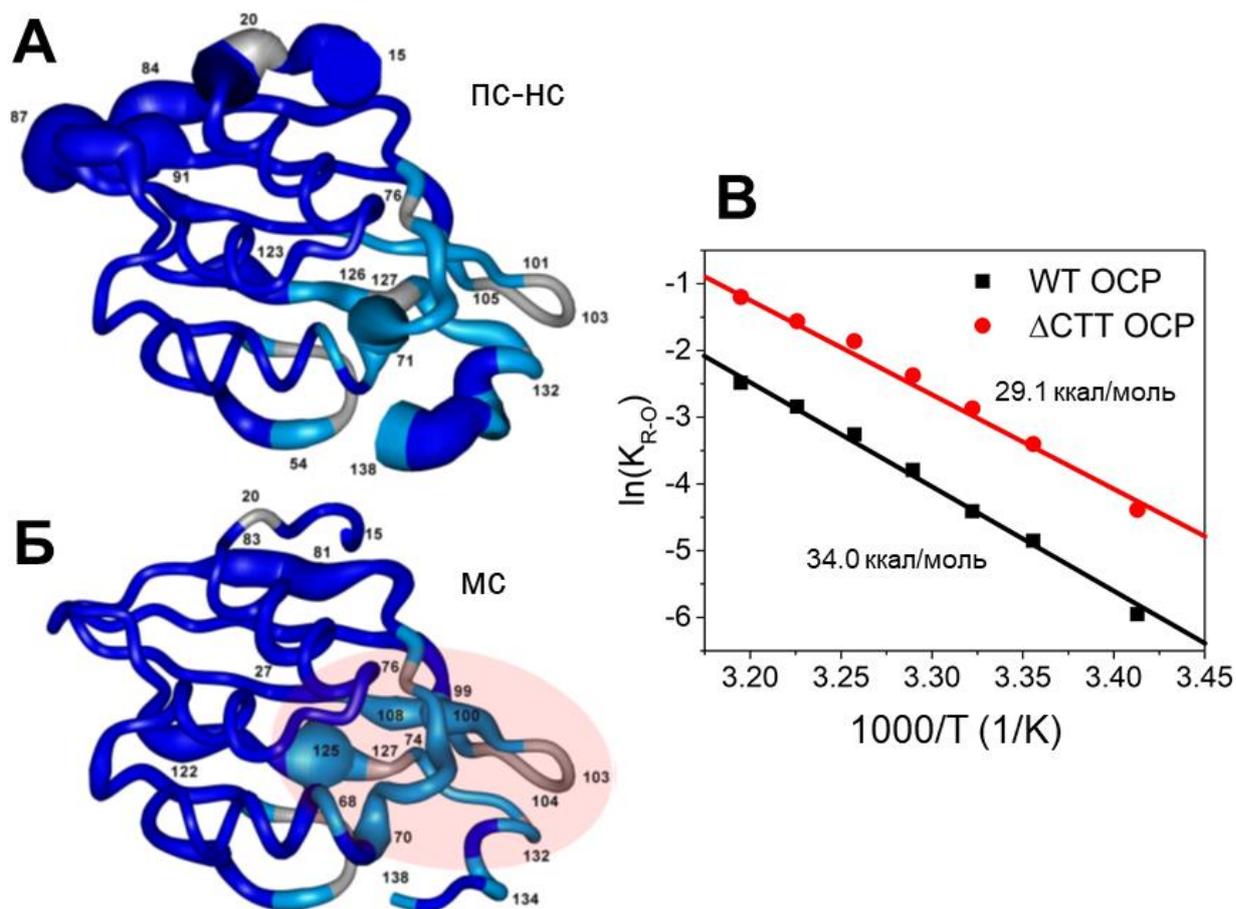


Рис. 36. Модель, основанная на структуре AnaSTDH (PDB 6FEJ) представляющая подвижность аминокислотных остатков на пс-нс (А) и мс (Б) шкале времени. Помечены репрезентативные аминокислотные остатки. Серый цвет показывает остатки, не отнесенные в ЯМР-спектрах; светло-голубой цвет представляет собой остатки с пониженной интенсивностью в спектрах ^{15}N - ^1H HSQC. Толщина цилиндра пропорциональна подвижности элементов структуры. В – температурные зависимости скорости релаксации красной формы OCP дикого типа (черная линия) и мутанта, лишённого С-концевой петли (СТТ, красная линия). Оценку скоростей проводили по изменениям оптической плотности при 550 нм после фотоактивации OCP. Красный овал показывает участок связывания каротиноида в белке.

Другой структурный элемент OCP, выполняющий важную физиологическую функцию в регуляции взаимодействия с FRP представляет собой короткую α -спираль в начале N-домена (NTE), которая, как оказалось, также обладает значительной конформационной подвижностью. По данным Gupta et al. (2015) при фотоактивации OCP происходит анфолдинг NTE и в финальной красной форме OCP (в отличие от оранжевой) этот структурный элемент не контактирует с С-доменом (см. рис. 33). Мы показали, что NTE не образует контактов с апо-формой OCP и отдельными С-доменами OCP (COCP), не содержащими каротиноид.

Вероятно, наличие каротиноида в С-домене ОСР влияет на структуру β -складки, в которой локализована область контактов с NTE. Соответственно, NTE хотя и стабилизирует оранжевую форму в неактивном состоянии, само по себе это не способствует релаксации красной формы. Таким образом, NTE отсоединяется от своего участка взаимодействия с С-доменом ОСР после того, как каротиноид перемещается вглубь N-домена, но до того, как происходит разделение NDT и STD и образование финальной формы ОСР^R.

Несмотря на большие различия характерных времен релаксации различных обнаруженных нами красных состояний ОСР, механизм элементарной реакции релаксации одинаков для всех форм. В пользу этого утверждения говорит идентичность величин активационных барьеров для быстрых и медленных стадий (см. *рис. 34*). Эта реакция релаксации красной формы, требует энергозатратных конформационных изменений в молекуле кето-каротиноида, поскольку при разрыве водородных связей она изомеризуется с увеличением эффективной длины сопряжения π -системы, а также сопровождается группой конформационных изменений в С-домене ОСР. Иначе говоря, элементарный акт превращения любой красной формы ОСР в оранжевую требует формирования водородной связи между кето-каротиноидом и хотя бы одним из остатков Y201 или W288. Начальные конфигурации хромофора и белковой матрицы могут значительно отличаться для различных красных форм, это влияет лишь на количество попыток (в теории активных соударений), необходимых для осуществления данной реакции, но не на механизм. Так, например, количество попыток, необходимых для возврата в оранжевое состояние из компактной красной формы ОСР примерно в 10 000 раз меньше по сравнению с релаксацией финальной красной формы ОСР^R.

Используя комбинацию оптических методов, мы сопоставили скорости изменения различных параметров хромофора и белковой матрицы и показали, что фотоцикл ОСР сопровождается асинхронными изменениями конформаций кето-каротиноида и его белкового окружения. В связи с этим большое значение для понимания физиологических эффектов, оказываемых ОСР и для правильной

интерпретации результатов экспериментов имеет тривиальный на первый взгляд факт: изменения конформации кето-каротиноида при фотоактивации и последующей релаксации ОСР значительно опережают конформационные перестройки в белковой матрице. Иначе говоря, спектр поглощения ОСР не является индикатором функционального состояния белка. Поскольку возможность взаимодействия ОСР с антенными комплексами и регуляторными белками определяется белок-белковыми контактами и специфическими сайтами, доступность этих сайтов зависит, в первую очередь, от конформационного состояния белковой матрицы. В результате фотоактивации ОСР сайты для взаимодействия с другими белками открываются на финальных стадиях фотоцикла, а закрываются уже после того, как каротиноид возвращается в исходное положение в С-домене. Таким образом, потенциально ОСР может проявлять функциональную активность находясь как в красном, так и в оранжевом состоянии.

Обобщив всю доступную на данный момент информацию о структурных изменениях кето-каротиноида и его белкового окружения, а также данные о скоростях переходов между различными состояниями ОСР, мы предлагаем схему последовательных реакций фотоцикла ОСР, который включает 11 состояний (см. *рис. 37*), 7 из которых впервые охарактеризованы нами с помощью комбинации биофизических методов. Последовательность событий, происходящих в ОСР после поглощения кето-каротиноидом кванта, нам представляется следующим образом:

- благодаря неоднородному распределению зарядов в белковом окружении в возбужденной молекуле кето-каротиноида за несколько сотен фс происходит перераспределение электронной плотности таким образом, что отрицательный заряд концентрируется в районе кислорода кето-группы
- увеличение эффективного отрицательного заряда на кислороде индуцирует перенос протона на кето-каротиноид от одного из доноров (Y201 или W288) и образование нестабильного иона оксокарбения,

равновесная геометрия которого сильно отличается от исходной конфигурации каротиноида

- депротонирование иона оксокарбения после релаксации его атомных координат приводит к появлению неравновесной конформации кето-каротиноида (S^*), которая не подходит для восстановления водородной связи
- после релаксации S^* возможна изомеризация кето-каротиноида за счет поворота β -иононового кольца, стабилизирующая каротиноид в состоянии с увеличенной эффективной длиной сопряжения π -системы и характерным «красным» цветом (**P1**)
- в результате стохастических изменений структуры N-домена (поворот α -спирали C на 6° , состояние **P2**), открывается дополнительное пространство в N-доме для смещения каротиноида из C-домена примерно на 12 Å, которое происходит за $\sim 1-10$ мкс (**P2'**)
- при разрыве соляного мостика между остатками R155 и E244 структурные домены ОСР приобретают возможность поворачиваться друг относительно друга (**P_N**), оставаясь скрепленными за счет контактов NTE и C-домена
- в междоменную область проникает вода, занимая в том числе часть «тоннеля» в C-доме, ранее занятую кето-каротиноидом (**P_M**)
- NTE и СТТ теряют контакты с доменами белка и частично утрачивают вторичную структуру (**P_X**)
- в отсутствие стабилизирующих факторов N- и C-домены ОСР расходятся, оставаясь соединенными неструктурированным междоменным линкером, с образованием финальной формы (**ОСР^R**)

Полученные нами представления о механизме фотоактивации и

промежуточных состояниях фотоцикла ОСР позволяют не только лучше понять основы фотозащитных адаптивных реакций цианобактерий, но и дают ключ к пониманию способов управления данным фоторецептором. Это необходимо для изучения специфических взаимодействий ОСР с другими белками, участвующими в регуляции фотосинтетических процессов, а также для создания новых биосенсоров и фотопереключаемых конструкций на основе водорастворимых белков. В заключение подчеркнем, что полученные нами результаты открывают возможность для изучения механизма фотоактивации ОСР с помощью современных методов время-разрешенной кристаллографии с применением фемтосекундных рентгеновских лазеров на свободных электронах (X-ray Free Electron Laser). Применение этого подхода мотивируется высокой скоростью образования первичного фотопродукта, и становится выполнимо благодаря открытому нам способу увеличения квантового выхода фотохимической реакции.

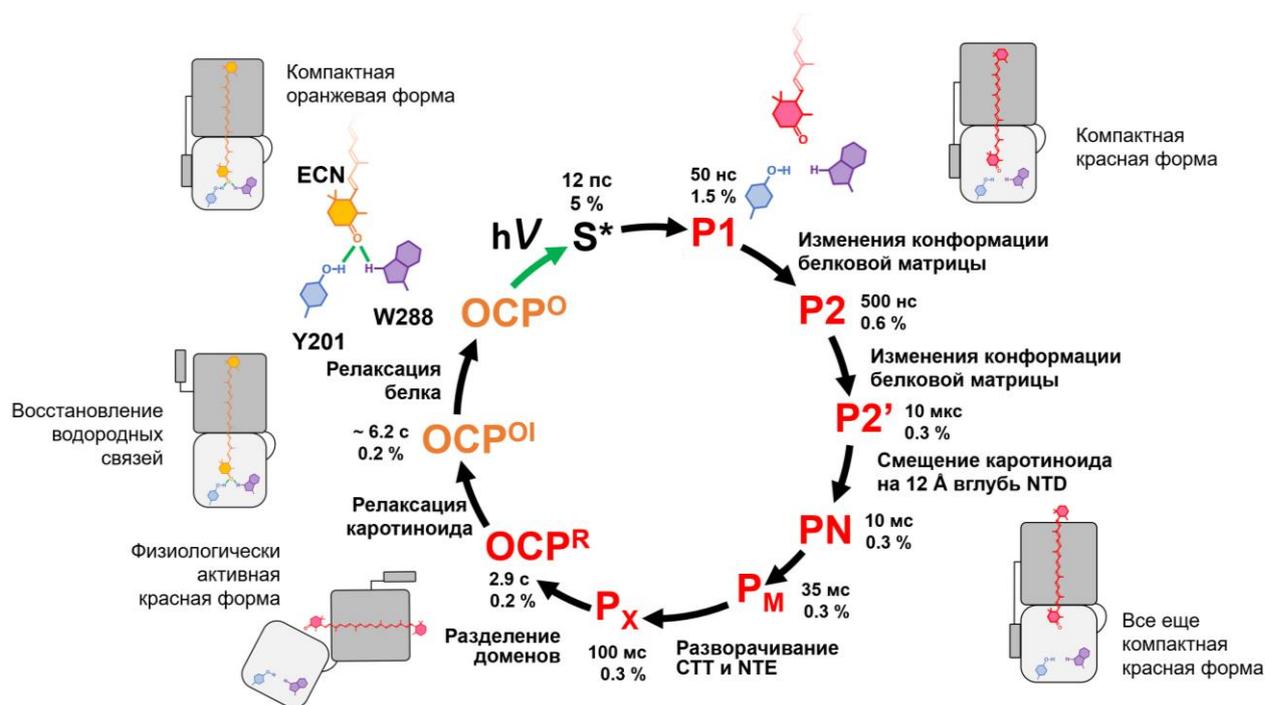


Рис. 37. Фотоцикл Оранжевого Каротиноидного Белка.

Выводы к разделу 3.2. Фотоцикл оранжевого каротиноидного белка

1. Фотоактивация ОСР требует разрыва водородных связей. Реакция обусловлена перераспределением электронной плотности каротиноида в

возбужденном состоянии, сопряженным с обратимым протонированием кето-группы каротиноида.

2. Спектральная гетерогенность поглощения неактивной оранжевой формы ОСР обусловлена конкуренцией между остатками Tyr-201 и Trp-288 за водородную связь с кето-каротиноидом, которая снижает квантовый выход первичного фотопродукта.
3. Разрыв водородной связи происходит за времена порядка 23 пс, что свидетельствует об определяющей роли состояния S^* в фотоактивации ОСР.
4. Фотоцикл ОСР характеризуется многочисленными интермедиатами, асинхронностью изменений конфигурации каротиноида и белковой матрицы, а также низким квантовым выходом активной формы (0.2 % для дикого типа ОСР).
5. Точечные замены аминокислот в областях ключевых белок-белковых и белок-каротиноидных контактов позволяют контролировать фотоцикл ОСР.

3.3 Белок-белковые взаимодействия в основе регуляции фотозащитных реакций

Рациональное использование фотосинтетического аппарата требует баланса между эффективным светосбором и защитой от фотоповреждения. У цианобактерий фотозащита антенных комплексов фикобилисом связана с функционированием фотоактивного оранжевого каротиноидного белка (ОСР), который при интенсивном освещении активируется, переходя в красную форму ОСР^R, и обеспечивает тушение флуоресценции светособирающей антенны. В комплексе фикобилисома с ОСР энергия электронного возбуждения пигментов антенны передается на кето-каротиноид ОСР и эффективно конвертируется в тепло за счет колебательной релаксации. Фактически ОСР в комплексе с антенной конкурирует с фотосистемой за потоки энергии, и благодаря высокой скорости переноса энергии на каротиноид приводит к инактивации антенны и снижению эффективного сечения поглощения фотосистемы. Такая реакция является необходимой и оправданной мерой при изменении уровня освещения, которое может происходить, например при смене погодных условий, перемешивании культуры клеток цианобактерий за счет тепловой конвекции и т.д. Однако, при снижении уровня инсоляции для восстановления фотосинтетической активности необходимы механизмы позволяющие разобрать комплекс фикобилисома-ОСР и инактивировать красную форму ОСР^R для предотвращения её взаимодействия с антенными комплексами.

Очевидно, что для достижения наибольшей эффективности первичных фотосинтетических реакций, концентрация комплексов фикобилисома-ОСР должна изменяться во времени в строгом соответствии с уровнем освещенности клеток. Это важно для обеспечения высокой скорости прироста биомассы, особенно в биореакторах, в том числе промышленных. В противном случае клетки могут испытывать стресс из-за образования активных форм кислорода при избыточном освещении или, напротив, дефицит энергетических ресурсов при недостаточной активности фотосинтетического аппарата.

В экспериментах с фикобилисомами и ОСР *in vitro* было показано, что фотоактивация ОСР приводит к образованию комплекса с ФБС, что сопровождается тушением её флуоресценции, однако при выключении актиничного света комплекс остается стабильным и интенсивность флуоресценции фикобилисомы практически не меняется в течение нескольких часов [67, 68, 89, 226]. В таких же условиях *in vivo* интенсивность флуоресценции фикобилисом восстанавливается до исходного уровня примерно за 10 минут. Эти наблюдения привели исследователей физиологии фотозащитных реакций цианобактерий к пониманию что в клетках есть по крайней мере еще один регулятор тушения флуоресценции фикобилисом [226]. Направленная делеция в гене *slr1964*, который в геноме *Synechocystis* PCC 6803 находится по соседству с геном, кодирующим ОСР, привела к резкому снижению скорости восстановления флуоресценции фикобилисом в клетках цианобактерий, адаптированных к сине-зеленому свету. Идентифицированный таким образом белок был назван белком восстановления флуоресценции (Fluorescence Recovery Protein, FRP). Повышение уровня экспрессии *slr1964* приводит к увеличению скорости восстановления флуоресценции фикобилисом. Однако, молекулярный механизм функционирования FRP до недавних пор оставался малоизученным. Во многом это связано с рядом систематических ошибок, допущенных группой французских исследователей. Из-за неправильного определения длины рамки считывания гена *slr1964*, был экспрессирован удлинённый ген, а его продукт, содержащий дополнительную N-концевую последовательность, привел к выводу, что FRP является мембранным белком. Долгое время олигомерное состояние FRP также вызывало вопросы. Эксперименты по изучению взаимодействия FRP с фотоактивированным ОСР *in vitro* хотя и показали ускорение релаксации красной формы ОСР^R, однако не позволили сделать однозначных выводов о структуре комплекса.

Из-за большой подвижности элементов третичной структуры активной красной формы ОСР (что характерно для так называемой расплавленной глобулы)

и самопроизвольного перехода в оранжевую неактивную форму изучение свойств активного состояния ОСР и его взаимодействия с другими белками является нетривиальной задачей. Более того, использование многих экспериментальных подходов несовместимо с фотостимуляцией, необходимой для поддержания высокой концентрации активного красного состояния ОСР. Поэтому нами была предпринята попытка получить стабильную красную форму ОСР [143].

Поскольку важными для фотоактивности ОСР аминокислотами являются тирозин-201 и триптофан-288 расположенные в С-доме, мы решили провести замены этих аминокислот на аланин (см. *Таблица 2*). Следует отметить, что в работе Wilson et al. (2011) [86] авторами были получены мутанты с заменой триптофана 288 на гистидин и серин, однако мутанты с таким генотипом оказались неспособными вызывать тушение фикобилисом *in vivo*, а *in vitro* их свойства не изучались. Полученный нами мутант ОСР-Y201A/W288A (ОСР^{AA}) обладает спектральными характеристиками, схожими с красной формой ОСР, образующейся в результате фотоконверсии или с помощью так называемой «химической активации» ОСР, которая происходит в растворах с высокой концентрацией хаотропов (1.5 M NaSCN) [227]. Данный мутант не способен к фотоактивации, и постоянно находится в красной форме. Проверка функциональной активности данного препарата показала его полное соответствие физиологически активной красной форме ОСР^R. При добавлении к раствору фикобилисом мутант ОСР^{AA} вызывает необратимое тушение их флуоресценции. Однако, схожими свойствами обладали и другие мутанты ОСР. Как мы уже отмечали, при экспрессии в *E.coli* мутантные формы ОСР-Y201A и ОСР-W288A характеризуются двумя фракциями - минорной оранжевой (менее 10 %) и основной красной формы, которая, по всей видимости, представляет собой белок с ошибками фолдинга, возникающими в результате изменения первичной последовательности. Мы обнаружили интересную особенность, характерную для красной фракции препарата ОСР-W288A и ряда других мутантов, но несвойственную двойному мутанту ОСР-Y201A/W288A. Оказалось что в растворах с высоким содержанием

космотропов (например от 500 мМ фосфата натрия) спектр поглощения красной фракции OCP-W288A постепенно меняется, приобретая форму характерную для оранжевой фракции и, соответственно, неактивного состояния OCP. Вместе с таким переходом красной формы в оранжевую возвращается и фотоактивность препарата (см. рис. 38) [219].

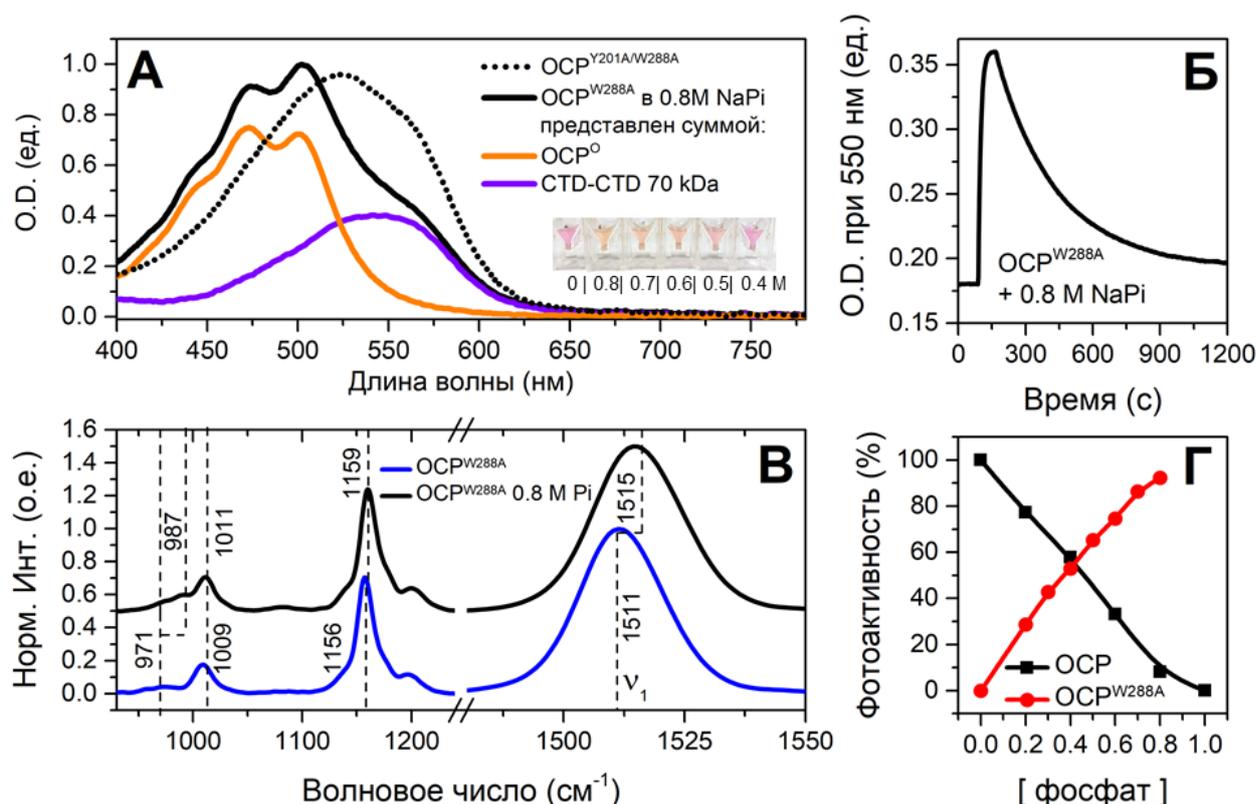


Рис. 38. Влияние фосфата на оптические свойства и фотоактивность OCP-W288A. **А** – спектр поглощения мутантов OCP лишенных одного (W288A) и двух (Y201A/W288A) аминокислот, образующих водородные связи с кето-каротиноидом, в 0.8 М фосфатном буфере. Фото показывает изменение цвета препарата при увеличении концентрации фосфата. **Б** – фотоциклические изменения поглощения препарата OCP-W288A при 550 нм в результате адаптации образца к синему свету. **В** – спектры комбинационного рассеяния OCP-W288A в 0.1 и 0.8 М фосфатном буфере. **Г** – нормированная амплитуда фотоциклических переходов при 550 нм препаратов OCP-W288A и OCP дикого типа при различных концентрациях фосфата в среде.

Таким образом факторы, стабилизирующие белок-белковые взаимодействия способствуют компактизации красных форм и восстановлению водородных связей между белком и каротиноидом. Важно отметить, что буферные растворы с высокой концентрацией солей фосфатов используются для работы с выделенными фикобилисомами, поскольку эти пигмент-белковые комплексы *in vitro* крайне нестабильны и распадаются на отдельные компоненты в растворах с низкой ионной

силой. Немаловажно также и то, что выход красной формы OCP^R у дикого типа OCP при повышении концентрации фосфатов снижается практически до нуля (см. рис. 38), что в итоге не позволяет ему эффективно взаимодействовать с фикобилисом, поэтому в экспериментах *in vitro* требуется 100-кратный избыток OCP для достижения эффектов, сравнимых с тушением фикобилисом *in vivo*. Мутант OCP-Y201A/W288A лишен этого недостатка, а у мутантов OCP-W288A и OCP-Y201A выход красной формы и её эффективное время жизни значительно выше по сравнению с OCP^R дикого типа. Вероятно, высокие концентрации фосфата, действуя на белковую структуру OCP-W288A неспецифически, способствуют рефолдингу, однако схожие эффекты нам удалось обнаружить и при взаимодействии красной фракции OCP-W288A с регуляторным белком FRP.

Получив ряд рекомбинантных препаратов FRP из разных видов цианобактерий, характеризующихся низкой степенью гомологичности первичной последовательности [228], мы приступили к изучению их свойств и взаимодействию с OCP.

Нами было показано, что красная фракция OCP-W288A способна не только эффективно тушить флуоресценцию фикобилисом, но и взаимодействовать с белком FRP *in vitro*, образуя комплекс. В результате взаимодействия красной формы дикого типа OCP с FRP образовавшийся комплекс быстро распадается т.к. FRP ускоряет переход из красной формы в оранжевую, а с оранжевым компактным OCP FRP практически не взаимодействует [104]. Комплекс OCP-W288A - FRP оказался стабильным, и мы смогли охарактеризовать его размер и стехиометрию с помощью набора биохимических и биофизических методов [104, 219, 224, 229, 230].

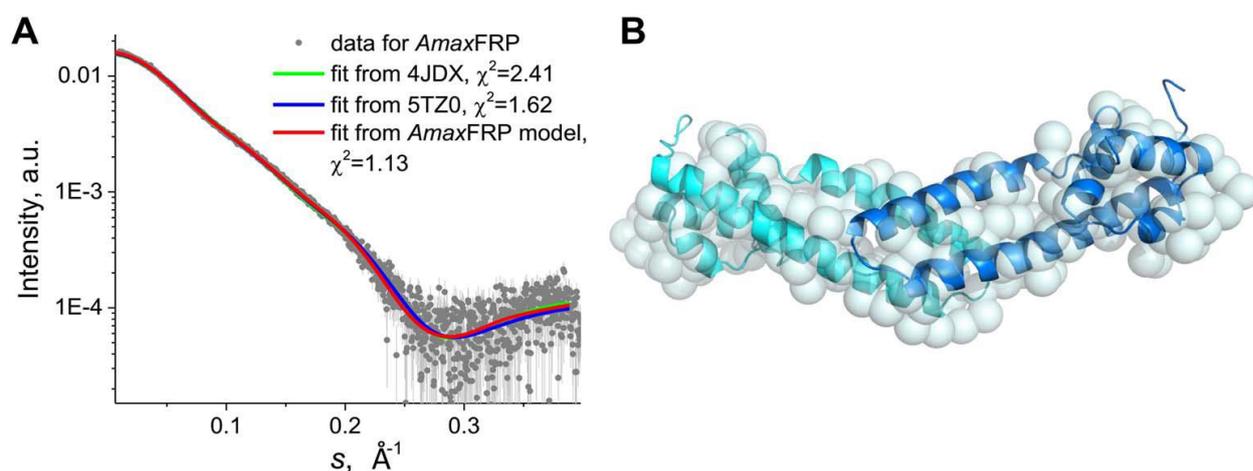


Рис. 39. Аппроксимация кривой SAXS (А), полученной для FRP из *Arthrospira maxima* с помощью модели димера AmaxFRP (В), построенной по гомологии с помощью iTASSER. Рисунок из статьи [228].

С помощью хроматографии нами впервые было показано, что FRP, являясь в растворе стабильным димером, мономеризуется при взаимодействии с активированным OCP, а гидродинамический размер образующегося комплекса значительно меньше, чем суммарный размер двух мономеров OCP-W288A и FRP, т.е. происходит компактизация и, вероятно, упорядочивание структуры OCP-W288A, что выражается в характерном для OCP⁰ смещении спектра поглощения каротиноида в синюю часть спектра и восстановлением вибронной структуры. Поскольку мы знаем, что переход красной формы OCP-W288A в оранжевую форму требует восстановления водородной связи с остатком Y201, которое невозможно без правильной взаимной ориентации N- и C-доменов OCP, мы предположили, что FRP, связываясь с физиологически активной красной формой OCP, способствует сближению доменов и восстановлению структуры гидрофобной области внутри OCP - каротиноидного «тоннеля».

С момента открытия FRP в 2011 году и до публикации нашей работы [104], в литературе довольно часто FRP называли ферментом, катализирующим реакцию релаксации красной активной формы OCP. Однако, как мы показали, использование данного термина неоправданно, поскольку FRP не снижает энергетический барьер для перехода OCP в оранжевое состояние (см. рис. 40).

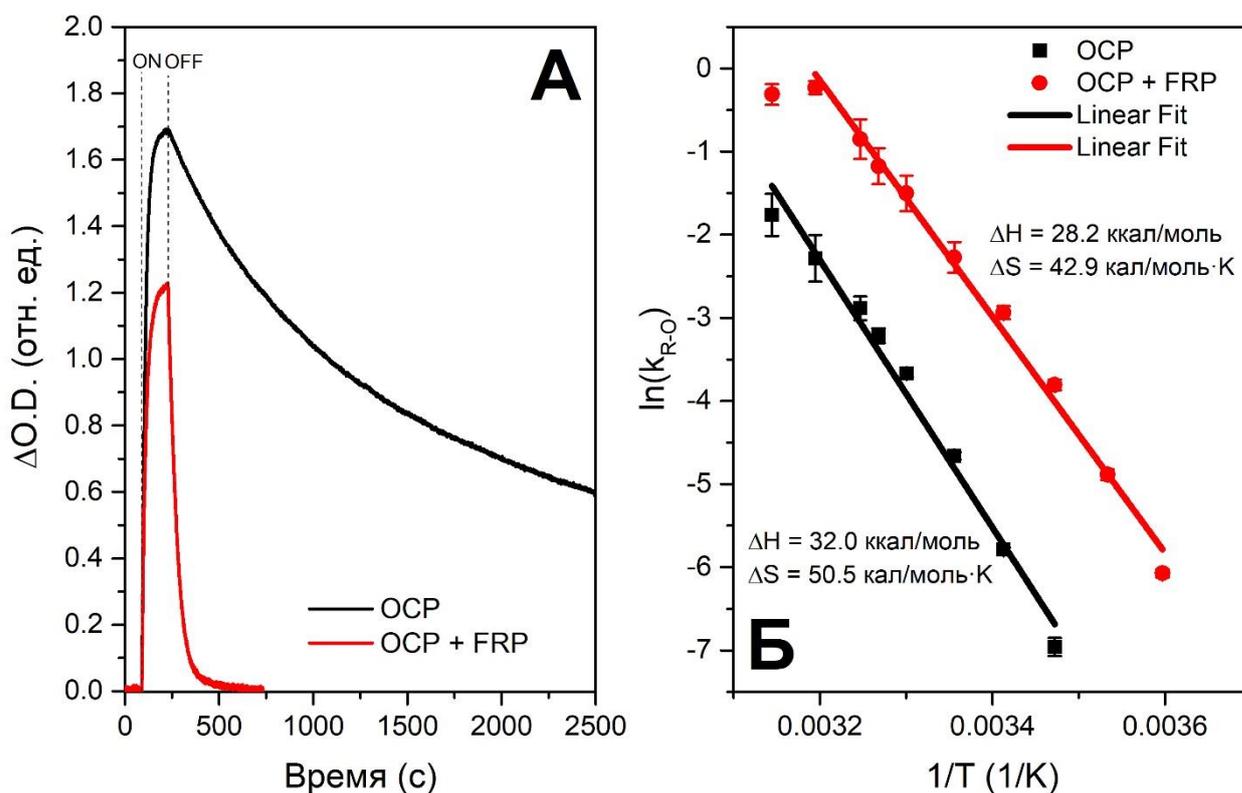


Рис. 40. Влияние FRP на фотоиндуцированное образование и термодинамику релаксации красной формы OCP. **А** – кинетики фотоиндуцированных изменений оптической плотности при 550 нм препарата OCP в отсутствие (черная линия) и в присутствии FRP (красная линия) при 15 °С. Моменты включения и выключения синего диода отмечены пунктирными линиями. **Б** – температурные зависимости скорости релаксации красной формы OCP в отсутствие (черная линия) и в присутствии FRP (красная линия) в координатах Аррениуса.

Несмотря на многократное увеличение скорости релаксации красной формы OCP^R в присутствии FRP, изменения энтальпии и энтропии переходов не превышали 15 %. Таким образом, эффект, оказываемый FRP на OCP, не влияет на механизм реакции релаксации красной формы, а лишь снижает количество попыток, необходимых для восстановления водородной связи между кето-каротиноидом и специфическим остатком в С-домене OCP. Мы предположили, что FRP выполняет роль стабилизатора («scaffold»), ограничивая конформационную подвижность С- и N-концевых доменов OCP. Для доказательства этой гипотезы нам необходимо было определить участки взаимодействия OCP и FRP.

Используя комбинацию оптических и хроматографических методов, мы установили, что FRP способен взаимодействовать с оранжевой неактивной формой OCP, однако с гораздо меньшим сродством по сравнению с фотоактивированной

формой OCP^R или красной фракцией OCP-W288A, при этом кажущиеся константы диссоциации составляли около 35 и 2.3 мкМ, соответственно [104]. Таким образом, мы предположили, что в красной форме OCP открывается основной сайт взаимодействия FRP с OCP, который по каким-то причинам недоступен в оранжевой компактной форме OCP, поэтому взаимодействие с ней осуществляется неэффективно. Однако, впоследствии мы установили что FRP образует комплекс с апо-формой OCP с эффективностью, сравнимой с его взаимодействием с OCP^R или красной фракцией OCP-W288A [224]. Таким образом, взаимодействие FRP с OCP определяется белок-белковыми взаимодействиями и не связано с состоянием хромофора и его наличием.

Далее мы проверили способность FRP взаимодействовать с отдельными фрагментами OCP и установили, что FRP практически не взаимодействует с N-доменом OCP независимо от наличия или отсутствия в нем каротиноида. Однако стабильный комплекс образуется между C-доменом и FRP. Эти наблюдения указывают на то, что первичный сайт взаимодействия OCP с FRP располагается именно в C-домене, но закрыт в оранжевой компактной форме OCP. Анализ пространственной структуры компактной оранжевой формы OCP (см. *рис. 33* и *рис. 41*) показывает, что несколько областей в C-домене образуют контакты с другими элементами структуры OCP, которые могут открываться в результате фотоактивации OCP. Кроме обширного междоменного интерфейса и неструктурированного линкера (27 аминокислотных остатков), соединяющего структурные домены, часть поверхности C-домена закрыта C-концевым «хвостом» (СТТ), обладающим значительной конформационной подвижностью, и короткой α -спиралью (NTE), связывающей N-домен и β -складчатый участок C-домена.

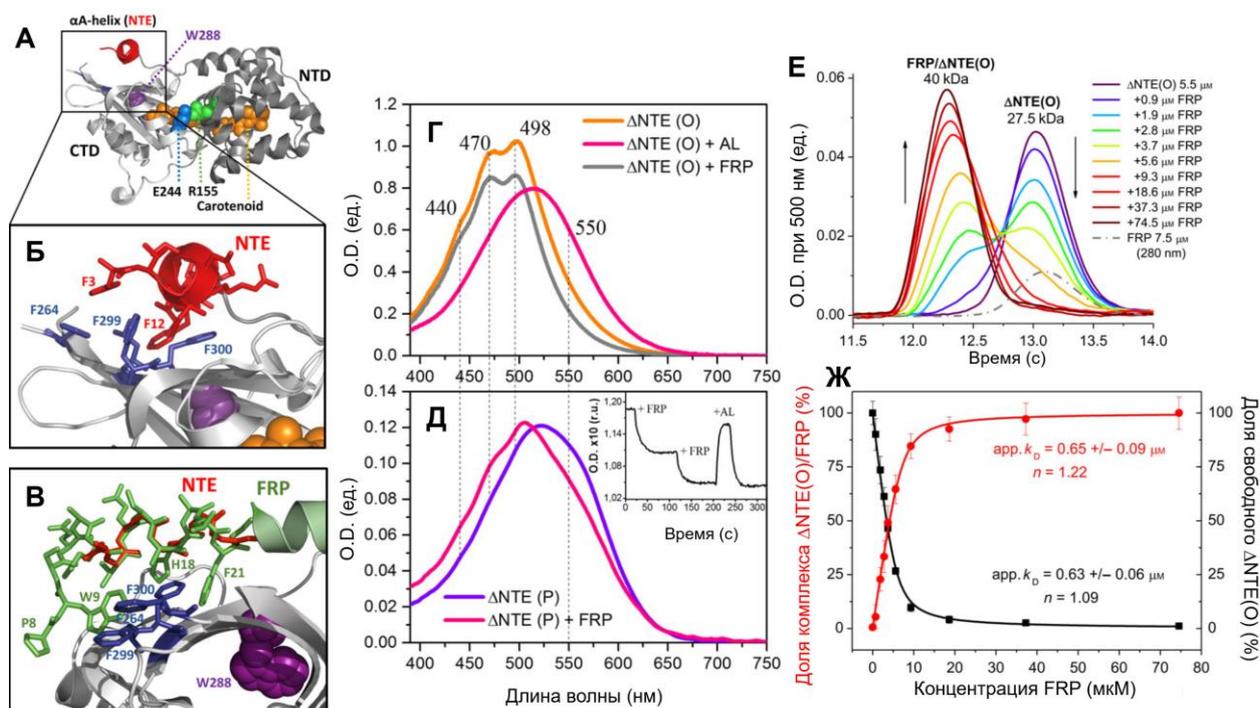


Рис. 41. Роль специфического участка в С-доме ОСР в регуляции взаимодействий с FRP. **А, Б** и **В** - сравнение элементов структуры ОСР и FRP, отвечающих за взаимодействие с С-доме ОСР. Влияние FRP на спектр поглощения оранжевой (**Г**) и красно-пурпурной (**Д**) фракции ОСР Δ NTE. Вставка показывает, как добавление FRP к красно-пурпурной фракции постепенно снижает оптическую плотность препарата при 550 нм за счет образования оранжевой формы. **Е** – хроматографические профили элюции Δ NTE(O), FRP и их комплексов при различных концентрациях FRP. **Ж** – кривые связывания, построенные по изменениям интенсивностей пиков Δ NTE(O) и FRP на хроматограммах, позволившие определить кажущуюся константу диссоциации комплекса k_D .

Анализ последовательности FRP и сравнение её с ОСР позволил нам выявить сходства как первичной структуры, так и укладки пептидов 12 AETQSAHALFR 22 в последовательности FRP и пептида 3 FTIDSARGIFP 13 ОСР, расположенного в NTE. Это стимулировало наш интерес к исследованию свойств мутанта, лишённого NTE. Ранее мутант Δ NTE был получен в работе Thurotte, A., et al., (2015) [131], однако из-за гетерогенности белкового препарата авторы сделали ряд ошибочных выводов о функциональных особенностях этого объекта. Нам удалось разделить препарат Δ NTE на две фракции с различными спектральными характеристиками и функциональными особенностями (см. рис. 41Г и Д). Основная фракция Δ NTE(O) — это оранжевый белок, полностью соответствующий оранжевой форме дикого типа ОСР. Минорной является красно-пурпурная Δ NTE(P) фракция белка, которая отличается по гидродинамическим свойствам от компактной оранжевой формы и

поэтому отделяется от неё с помощью хроматографии. Вероятно, $\Delta\text{NTE(P)}$ представляет собой аналог красной активной формы OCP^{R} , которая образуется в результате спонтанной активации мутантной формы белка и/или ошибок фолдинга при экспрессии в *E.coli*. Именно этим обусловлена способность $\Delta\text{NTE(P)}$ тушить флуоресценцию фикобилисом без предварительной фотоактивации, аналогично мутантам OCP^{AA} и др., что Thurotte, A., et al., (2015) ошибочно приписали и оранжевой форме $\Delta\text{NTE(O)}$. Мы обнаружили, что общим свойством для $\Delta\text{NTE(O)}$ и $\Delta\text{NTE(P)}$ является взаимодействие с FRP с образованием комплекса 1 к 1, константа диссоциации которого составляла около 0.6 мкМ. Таким образом, мы показали, что отсутствие NTE определяет возможность взаимодействия FRP с OCP даже в оранжевой форме.

По своей сути препарат $\Delta\text{NTE(O)}$ представляет собой интермедиат фотоцикла OCP, у которого короткая αA -спираль отсоединилась от C-домена или еще не вернулась в исходное положение после релаксации кето-каротиноида и восстановления водородной связи в C-доме. Аналогичный по структуре белковой матрицы красный интермедиат фотоцикла (P_x , см *рис. 37*) возникает непосредственно перед образованием функционально активной красной формы OCP^{R} , взаимодействующей с фикобилисом. Однако, эффективное взаимодействие с FRP снижает вероятность перехода данного интермедиата в активное состояние, что безусловно позволяет предотвратить образование комплекса OCP^{R} с фикобилисом. Эти заключения подтверждены результатами серии экспериментов *in vitro* (см. *рис 42*), и показывают высокую эффективность FRP как модулятора фотозащитных механизмов.

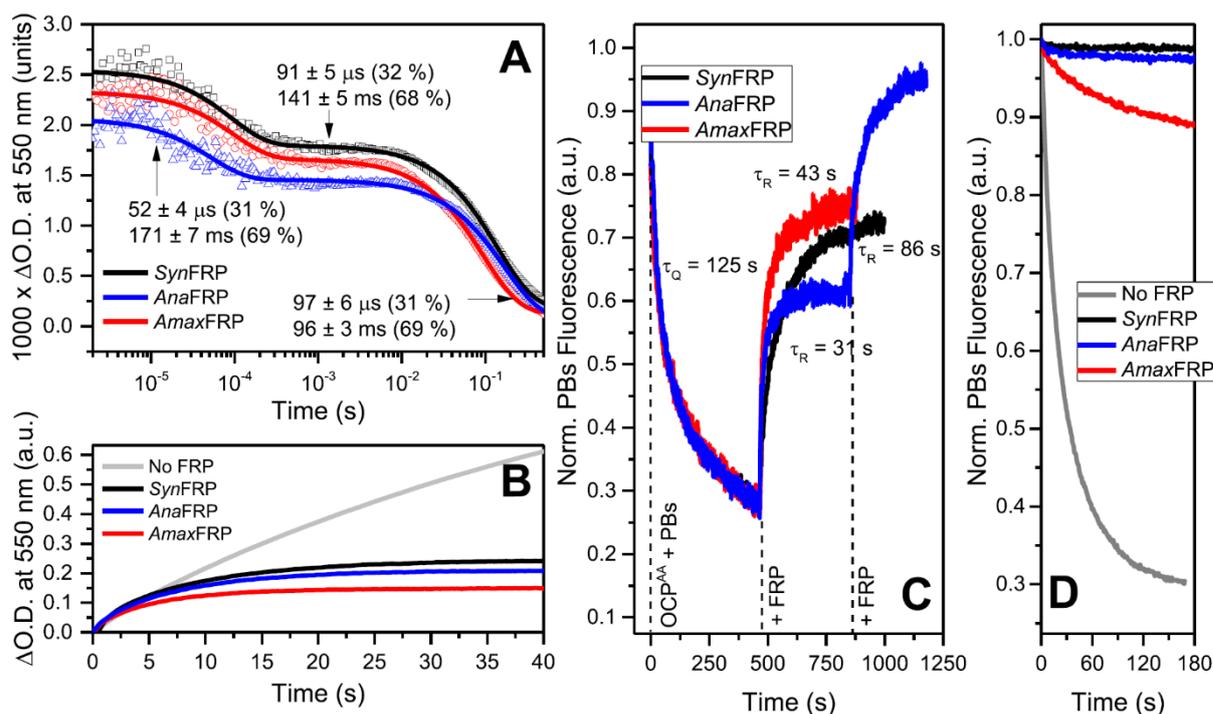


Рис. 42. Влияние FRP из разных видов цианобактерий на способность OCP Δ NTE из *Synechocystis* к образованию активной красной формы OCP^R и взаимодействию с фикобилисомами *in vitro*. **A** – изменения оптической плотности препарата OCP при 550 нм в присутствии FRP под действием 7 нс вспышек актиничного света (532 нм). **B** - накопление красной формы OCP^R под действием непрерывного облучения синим светом в присутствии различных FRP при 5 °С. **C** – последовательные изменения интенсивности флуоресценции фикобилисом в результате добавления OCP и FRP. **D** – тушение флуоресценции фикобилисом за счет фотоактивации OCP Δ NTE в отсутствии и в присутствии FRP разных видов.

Причина, по которой происходит отсоединение NTE от С-домена, вероятно, связана с изменением свойств β -складчатого участка после того, как каротиноид покидает С-домен и его место занимает вода. Нарушение водородных связей в С-доме приводит к изменению гидрофобности локального окружения Y201 и, в особенности, W288, который, находясь во внутренней полости С-домена фактически сопряжен с гидрофобными остатками, образующими интерфейс взаимодействия С-домена с α -спиральным NTE, стабилизирующим взаимодействие N и С-доменов. Поэтому изменения в окружении W288, по всей видимости, передаются на внешнюю сторону С-домена, что и приводит к нарушению контакта NTE с С-домеом. Возможно, что после возврата каротиноида в С-домен и восстановления водородных связей с остатками Y201 и W288 сродство NTE к β -складчатому участку увеличивается. Вероятно, FRP,

напротив, обладает большим сродством к С-домену ОСР в отсутствие каротиноида, что подтверждается экспериментами с апо- и холо-формами С-доменов ОСР. Таким образом, FRP и NTE могут конкурировать за один и тот же сайт в С-доме ОСР, свойства которого зависят от наличия или отсутствия каротиноида и, соответственно, функционального состояния ОСР,

Мы показали, что FRP в растворе является димером, однако при взаимодействии с Δ NTE(O) и Δ NTE(P), а также ОСР-Y201A/W288A и всеми прочими аналогами активной красной формы ОСР^R, образуется комплекс ОСР-FRP с стехиометрией 1 к 1. Учитывая, что в кристалле FRP (PDB ID: 4JDX) встречается в различных конформациях, разумно предположить, что данный белок в результате взаимодействия с ОСР претерпевает значительные изменения третичной и четвертичной структуры.

Для изучения свойств мономерной и димерной формы FRP нами были сконструированы мутанты: FRP-L49E в котором замена незаряженного лейцина на отрицательно заряженную глутаминовую кислоту мешает контакту двух α -спиралей; и FRP-L33C/I43C с дополнительными цистеинами в области контакта α -спиралей в димере FRP. Замены L33C/I43C были выбраны с учетом структуры димера FRP из-за того, что расстояние между C β атомами лейцина-33 и изолейцина-43 не превышает 6.5 Å, что обеспечивает образование двух ковалентных связей между цистеинами, введенными в контактирующие α -спирали. В окисленном состоянии FRP-L33C/I43C, как и предполагалось, оказался стабильным димером, а в восстановленном образовывал димеры даже при низких концентрациях белка, точно так же как дикий тип FRP, что говорит о том, что белок-белковый интерфейс, отвечающий на образование димера, сохранил свой функционал. Напротив, мутант FRP-L49E оказался мономерным.

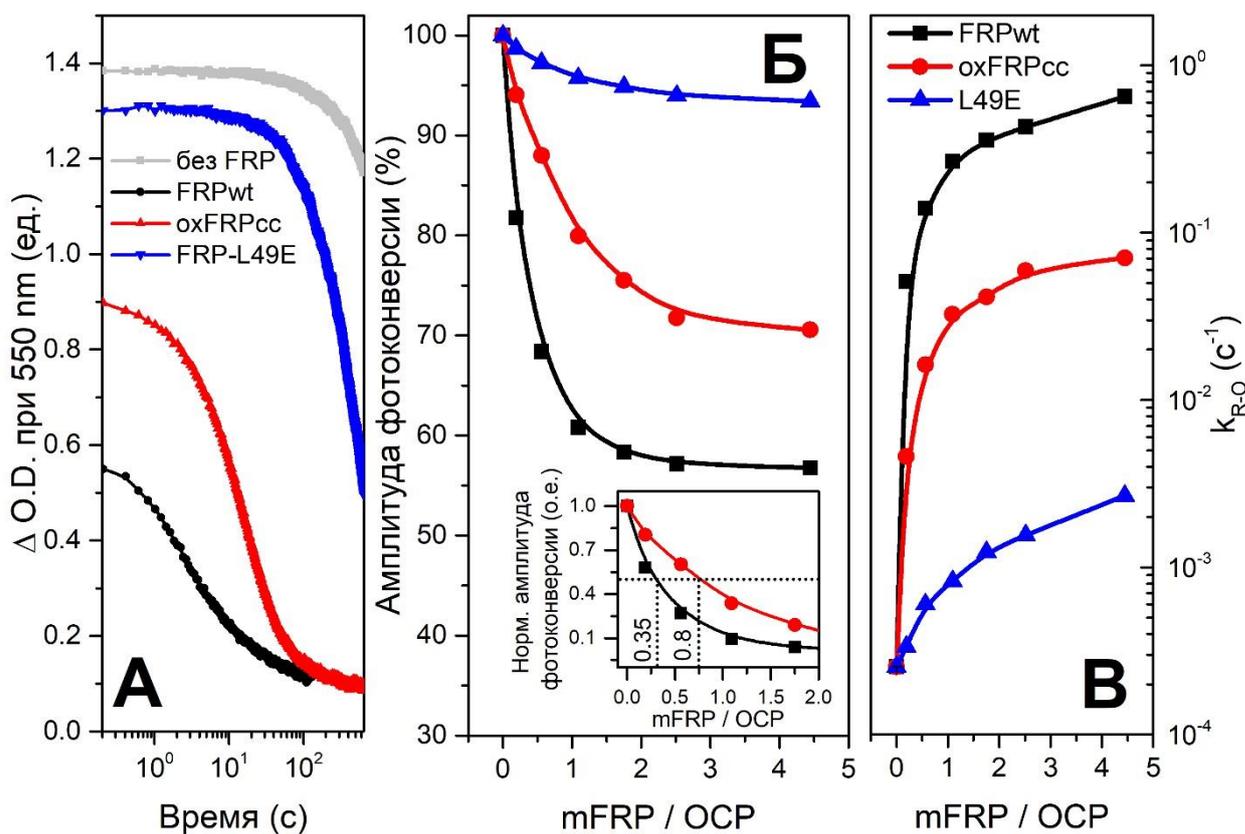


Рис. 43. А – кинетики изменения поглощения препаратов ОСР при 550 нм в присутствии стабильных мономерного FRP-L49E и димерного ssFRP-L33C/I43C . Б – влияние мономерного и димерного FRP на выход красной формы ОСР. На вставке: концентрационные зависимости нормированы для демонстрации соотношений FRP/OCP, необходимых для полунасыщения эффекта. В – зависимость константы скорости релаксации красной формы ОСР от концентрационного соотношения FRP/OCP.

Исследование взаимодействия стабильного мономерного и димерного FRP с ОСР с помощью эксклюзионной хроматографии показало, что FRP связывается с ОСР именно в димерной форме. С использованием препаратов ssFRP-L33C/I43C , $\Delta\text{NTE(O)}$ и глутарового альдегида были получены комплексы со стехиометрией 2 FRP к 2 ОСР, что подтверждает наличие в составе димера FRP сразу двух сайтов для взаимодействия с С-доменом ОСР. Связывание с FRP-L49E было неэффективным для всех использованных вариантов ОСР. Однако исследования взаимодействия с фотоактивируемым ОСР показали, что как димерный, так и мономерный варианты FRP способны увеличивать скорость релаксации красной формы OCP^R (см. рис. 43). Это, во-первых, подтверждает работоспособность димерной формы FRP и показывает, что мономеризация FRP не является обязательной для увеличения скорости релаксации красной формы OCP^R , и, во-

вторых, показывает, что димерный интерфейс FRP (см. *рис. 39*) не является единственным участком взаимодействия с ОСР. Эти данные совместно с результатами исследования пространственной структуры комплекса Δ NTE(O)-ccFRP-L33C/I43C с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS, см *рис. 44*) позволили нам установить, какие области димера FRP могут контактировать с β -складчатым участком в С-доме ОСР.

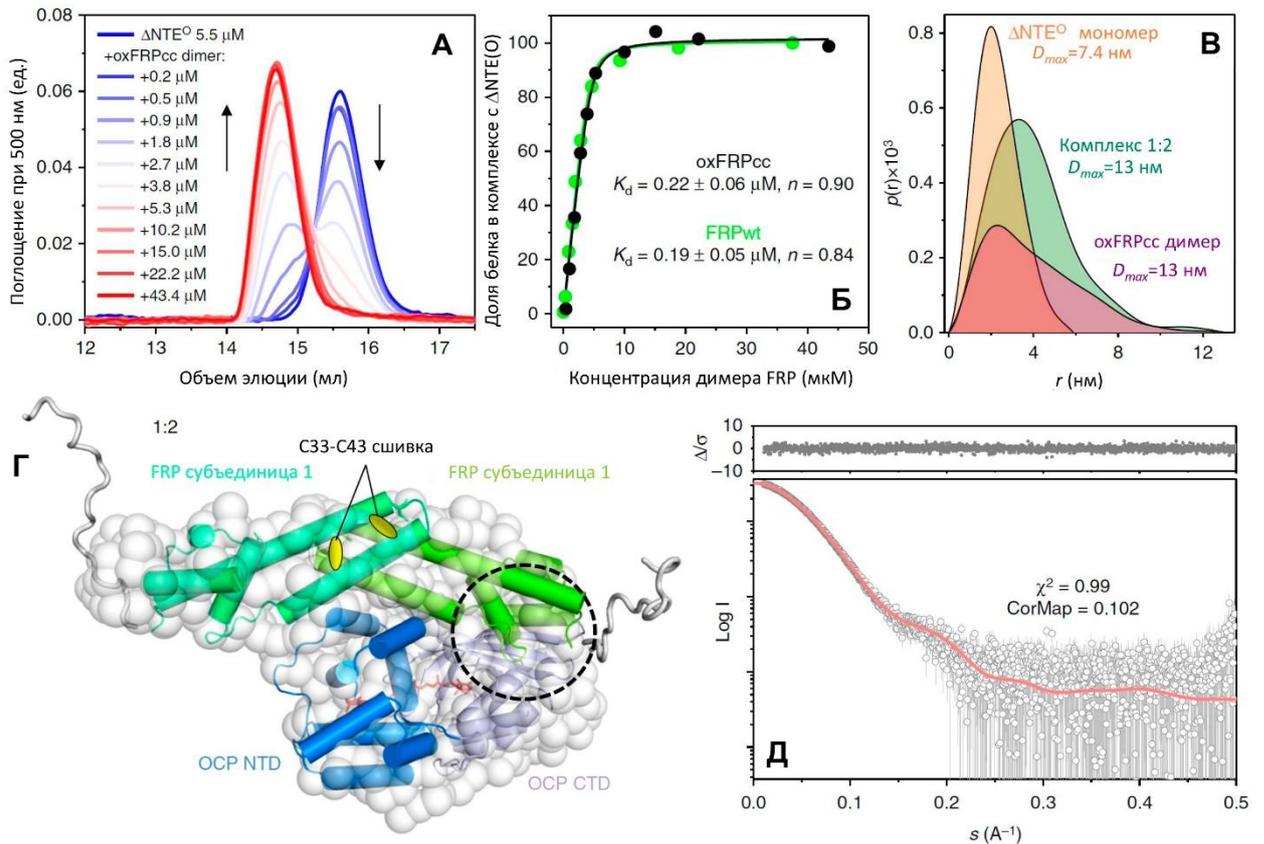


Рис. 44. Исследование взаимодействия ОСР Δ NTE с димерным FRP. **А** - хроматографические профили элюции Δ NTE(O), димерного oxFRPcc и их комплексов при различных концентрациях FRP. **Б** - кривые связывания, построенные по изменениям интенсивностей пиков Δ NTE(O) и FRP на хроматограммах. Указаны соответствующие кажущиеся константы диссоциации комплекса k_D . **В** – функции парного распределения расстояний для Δ NTE(O), димера oxFRPcc и их комплексов, полученные в результате анализа интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния с помощью GNOM. **Г** – возможная конформация комплекса ОСР с димерным oxFRPcc полученная на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния. Показано наложение атомарной модели полученной с помощью программы CORAL и *ab initio* модели, рассчитанной с помощью GASBOR. **Д** – аппроксимация данных малоуглового рентгеновского рассеяния с помощью атомарной модели комплекса ОСР с димерным oxFRPcc. Рисунок из статьи [230].

Анализ структуры различных FRP и комплекса Δ NTE(O)-ccFRP-L33C/I43C

низкого разрешения, полученного с помощью SAXS, и данных о взаимодействии точечных мутантов, показал, что область взаимодействия белков, образующих обширную зону контакта между β -складчатым участком С-домена OCP и группой α спиралей FRP, может быть ограничена областью расположения остатков фенилаланина-299 в составе OCP и двух остатков FRP: фенилаланина-76 и лизина-102. Для проверки этой гипотезы и валидации модели комплекса, полученной с помощью SAXS, были сконструированы мутанты FRP-K102C, FRP-F76C и OCP-F299C. Оба мутанта FRP оказались способными взаимодействовать с OCP-F299C, увеличивая скорость релаксации красной формы, а в окислительных условиях FRP-K102C не только образовывал комплекс с OCP-F299C, но и ковалентную связь между дополнительными цистеинами, что подтверждает близкое ($\sim 5 \text{ \AA}$) расположение остатков фенилаланина-299 и лизина-102 в комплексе OCP-FRP.

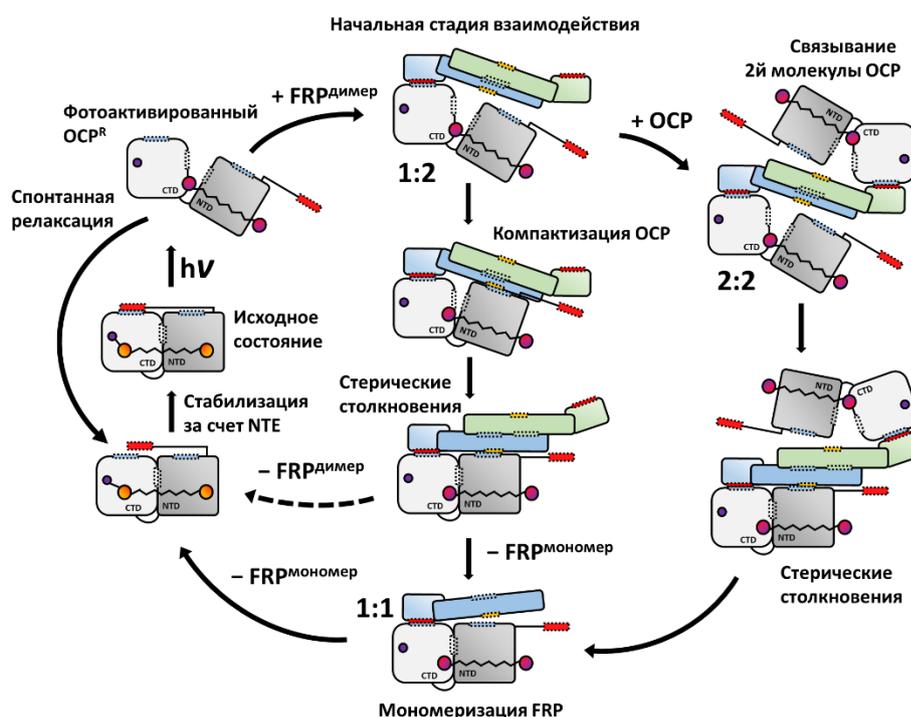


Рис. 45. Образование и диссоциация комплексов OCP с FRP. В зависимости от концентраций белков взаимодействие димерного FRP с фотоактивированным OCP может приводить к появлению комплексов с различной стехиометрией.

Таким образом, мы установили структуру одного из возможных комплексов FRP с OCP, который, вероятно, образуется на ранних этапах взаимодействия этих белков. Очевидно, что при обилии стадий фотоцикла OCP (см. рис. 37) существуют

и другие комплексы, как например с активной красной формой ОСР^R. Однако, хотим отметить, что у комплекса FRP с интермедиатом P^X, вероятно, может быть физиологическое значение. Полученные нами экспериментальные данные позволили построить математическую модель, описывающую взаимодействия ОСР, FRP и фикобилисом *in vitro* и *in vivo*. Модель позволила нам оценить внутриклеточные концентрации ОСР и FRP и показать, что при нормальных условиях культивирования в клетках *Synechocystis* PCC 6803 количество ОСР примерно в 2 раза меньше, чем количество фикобилисом, а FRP примерно в 10 раз меньше, чем ОСР. Эти результаты хорошо согласуются с данными об экспрессии соответствующих генов [231].

Интересным следствием проведенного анализа является также предположение об отсутствии прямого взаимодействия между FRP и комплекса ОСР^R-фикобилисома. Данное предположение основано, во-первых, на том, что *in vitro* комплекс ОСР^R-фикобилисома спонтанно распадается и освобожденный ОСР^R может инактивироваться FRP; во-вторых, при фотоактивации концентрация активной формы ОСР может эффективно снижаться за счет взаимодействия FRP с интермедиатом фотоцикла ОСР P^X. На данный момент, к сожалению, нет не только структуры комплекса ОСР^R-фикобилисома, но и структуры самой фикобилисомы *Synechocystis*, что оставляет открытым вопрос о доступности сайтов для взаимодействия с FRP.

Используя фрагмент С-домена ОСР, обладающий открытым участком для связывания FRP, мы показали, что образование любого комплекса ОСР-FRP, (см. *рис. 45*) является обратимым даже в отсутствие NTE способной конкурировать за участок связывания FRP. Для этого мы использовали способность FRP стабилизировать красно-пурпурную фракцию ОСР ΔNTE(P) и восстанавливать оранжевую форму с выраженной вибронной структурой спектра поглощения (см. *рис. 41*). Мы предположили, что если связывание FRP является обратимым, то добавление в среду белка, содержащего доступные сайты для связывания FRP, приведет к снижению доли образца в оранжевой форме. Действительно, даже при

двукратном избытке FRP добавление апо-формы С-домена ОСР приводит к тому, что часть FRP выходит из комплекса с ОСР Δ NTE(P), лишая его стабилизирующего фактора (рис. 46). Таким образом, при описании белок-белковых взаимодействий регуляторных белков необходимо учитывать динамическую природу образующихся комплексов.

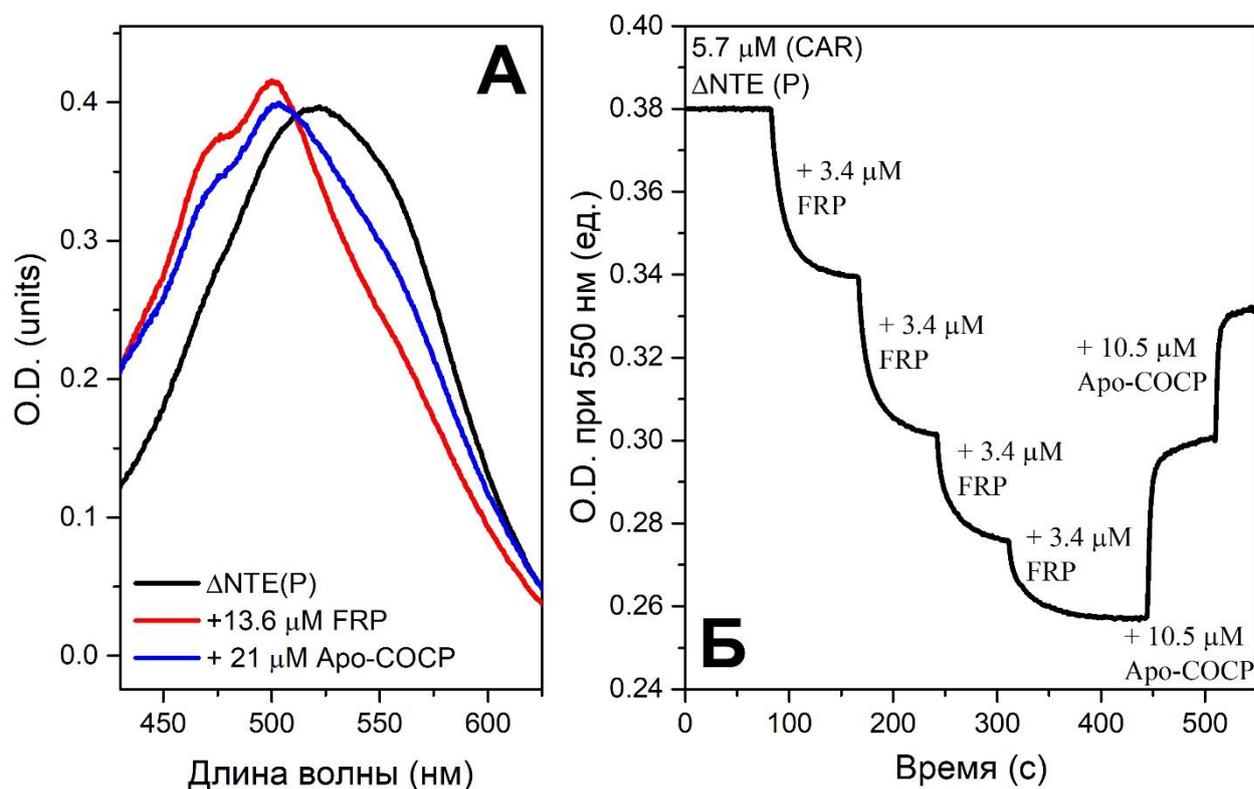


Рис. 46. Обратимое связывание FRP с Δ NTE(P)-ОСР и апо-формой С-домена ОСР (Апо-СОСР). А – взаимодействие FRP с пурпурно-красной формой Δ NTE(P) приводит к восстановлению компактного оранжевого состояния ОСР с выраженной вибронной структурой в спектре поглощения. Данный эффект обратим при добавлении к раствору апо-формы С-домена ОСР (Б), которое приводит к постепенному исчезновению вибронной структуры.

Природное многообразие форм ОСР (т.н. ОСР1, ОСР2, ОСРХ) и FRP обеспечивает цианобактериям необходимые скорости и уровни защиты фотосинтетического аппарата для адаптации к различным условиям среды. Несмотря на разнообразие этих белков и значительную вариативность первичной структуры, их объединяет общий принцип функционирования и механизм элементарных стадий, что, как мы показали, позволяет ОСР, FRP и фикобилисомам из разных видов эффективно взаимодействовать между собой *in vitro*. Это, в совокупности с пониманием структурных особенностей взаимодействия данных

регуляторных белков, открывает новые возможности для создания новых штаммов цианобактерий для использования в промышленных установках.

Выводы к разделу 3.3. Белок-белковые взаимодействия в основе регуляции фотозащитных реакций цианобактерий

1. FRP примерно на два порядка увеличивает скорость релаксации активной красной формы ОСР за счет ограничения конформационной подвижности С- и N-концевых доменов ОСР и снижения числа попыток, необходимых для восстановления водородной связи между кето-каротиноидом и одним из ключевых остатков Tyr-201 и Trp-288.
2. Удаление короткой N-концевой α -спирали ОСР (как за счет мутаций, так и при фотоактивации) открывает область β -складчатого участка в С-домене ОСР, являющуюся основным сайтом взаимодействия между ОСР и димером FRP.
3. Димерная структура FRP обеспечивает последовательное связывание двух мономерных ОСР, что индуцирует мономеризацию FRP при образовании комплексов 1 к 1 и последующее освобождение ОСР от FRP.
4. Способность FRP к эффективному взаимодействию с интермедиатами ОСР, предшествующими образованию активных форм, позволяет ингибировать нефотохимическое тушение фикобилисом даже при низких концентрациях FRP.

3.4 Белок-опосредованный транспорт каротиноидов

Функционирование ОСР как фотоактивной конструкции, чувствительной к интенсивности света и эффектора нефотохимического тушения флуоресценции фикобилисом невозможно без кето-каротиноида в составе пигмент-белкового комплекса. ОСР является водорастворимым белком, каротиноиды, напротив, в воде не растворяются, поэтому обычно локализованы в клеточных мембранах. Очевидно, что для сборки холо-формы ОСР необходимо, чтобы гидрофобный каротиноид переместился в соответствующую область белковой матрицы водорастворимой апо-формы ОСР. Механизм данной реакции долгое время оставался загадкой и не обсуждался в научной литературе.

Прогресс в понимании свойств ОСР стал возможен благодаря переносу генов, кодирующих белковую часть ОСР и синтез кето-каротиноидов в *E.coli*. Это позволило нашей группе за относительно короткий срок получить и охарактеризовать большое количество мутантов ОСР с точечными заменами, а также белки со значительными изменениями в первичной структуре. В результате мы установили последовательность изменений структуры пигмент-белкового комплекса при фотоактивации ОСР. Одной из важных промежуточных стадий фотоцикла ОСР является внутримолекулярный перенос каротиноида, в результате которого каротиноид смещается примерно на 12 Å и оказывается в N-домене белка. Поскольку частичный протеолиз молекулы ОСР приводил к тому, что каротиноид оказывался исключительно в N-концевом домене [88], который сохранял функциональную активность, особое внимание придавалось изучению именно этой части белковой молекулы – RCP [105]. О роли C-домена ОСР (СОСР) практически ничего не было известно до тех пор, пока мы не синтезировали этот фрагмент ОСР в каротиноидных штаммах *E.coli*.

Было показано, что СОСР (в отсутствие N-домена) способен связывать различные каротиноиды – эхиненон, кантаксантин и зеаксантин. Во всех случаях спектры поглощения СОСР значительно отличались от спектров каротиноидов в липидной мембране или органических растворителях. Более того, спектры

поглощения СОСР отличались от красной формы ОСР, а также мутанта ОСР-Y201A/W288A с аналогичным кето-каротиноидом, значительным (более 30 нм) сдвигом максимума поглощения в красную область спектра, что объясняет пурпурно-фиолетовый цвет раствора СОСР.

Как известно, спектральные характеристики кето-каротиноида зависят от длины сопряжения π -системы, в которую входят электроны не только из полиеновой цепи, но и из β -иононовых колец, содержащих кето-группу [214, 215, 232]. Мы предположили, что планарная структура кантаксантина в СОСР может поддерживаться за счет образования двух пар водородных связей с каждой кето-группой каротиноида. Это возможно в случае образования димера, в котором каротиноид расположен между двумя одинаковыми С-доменами ОСР, образующими между собой гидрофобную полость. Данное предположение было подтверждено с помощью эксклюзионной хроматографии (см. *рис. 47*), показавшей, что холо-форма СОСР является стабильным димером, в то время как апо-форма стремится к димерному состоянию только при высоких концентрациях белка. Это означает, что белок-хромофорные взаимодействия стабилизируют димерные формы СОСР. Создав мутант СОСР-W288A (нумерация в соответствии с полноразмерным ОСР), мы показали, что водородные связи действительно участвуют в образовании белок-хромофорных контактов и определяют спектральные свойства каротиноида и стабильность димера. Спектр поглощения мутанта СОСР-W288A, связывающего кантаксантин с двумя кето-группами, практически не отличался от спектра поглощения СОСР с эхиненоном, обладающим только одной кето-группой.

Наличие водородных связей между кето-каротиноидом и белком является основой фотоактивности полноразмерного ОСР, однако препараты СОСР не изменяют своих спектральных характеристик при облучении светом. Анализ изменений поглощения в ответ на фемтосекундные импульсы света не выявил состояний с переносом зарядов в препарате СОСР, в спектральном диапазоне 600-800 нм наблюдается лишь поглощение перехода S_1-S_N , релаксирующее за 3.2 пс

(см. рис. 28). Вероятно, симметрия распределения зарядов в идентичных белковых субъединицах СОСР не позволяет обеспечить перераспределения электронной плотности в молекуле симметричного кето-каротиноида, необходимое для разрыва водородных связей (см. обсуждение механизма разрыва водородных связей в разделе 3.2).

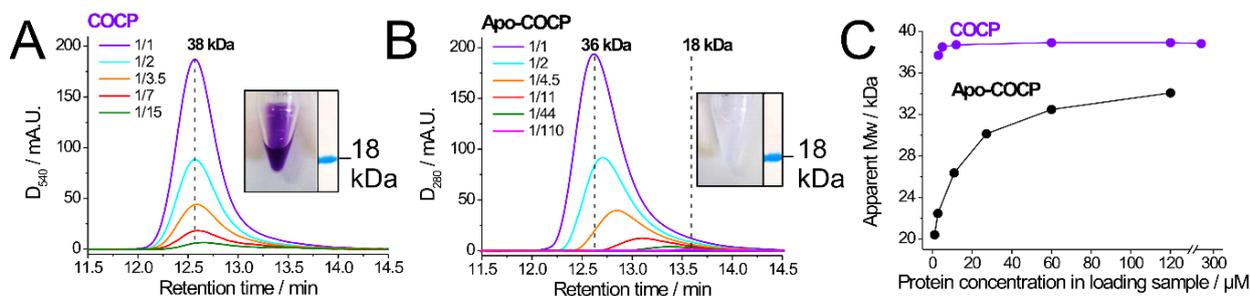


Рис. 47. Определение олигомерного статуса холо-СОСР и апо-СОСР методом эксклюзионной хроматографии. Профили элюции СОСР (А) и апо-СОСР (В), регистрируемые по поглощению каротиноида и белка, соответственно, при разных разведениях белковых препаратов. Фотографии показывают пробирки с растворами белков. С – зависимости кажущихся молекулярных масс белков СОСР и апо-СОСР, рассчитанных по положению пика элюции, от концентрации белка. Рисунок из статьи [221].

Несмотря на отсутствие фотоактивности, препараты СОСР представляют интерес с точки зрения новых возможностей для исследования белок-белковых взаимодействий. С помощью препарата СОСР нами был установлен основной сайт взаимодействия ОСР с FRP (см. раздел 3.1). Пожалуй, самой интересной оказалась способность холо-формы СОСР взаимодействовать с апо-формой RCP (N-домен ОСР). Мы обнаружили, что при смешении растворов фиолетового СОСР и бесцветной апо-формы N-домена ОСР спектр поглощения кантаксантина меняется, приобретая признаки характерные для оранжевой формы ОСР (см. рис. 48). Мы показали, что такая оранжевая гетеродимерная форма способна к фотоактивации с образованием на свету холо-формы RCP и апо-формы СОСР, которые при выключении света рекомбинируют с образованием оранжевого состояния. Таким образом, возникновение состояния, соответствующего оранжевой фотоактивной форме ОСР⁰, не требует соединения доменов линкером, а при фотоактивации домены могут удаляться друг от друга на значительное расстояние (см. рис. 49).

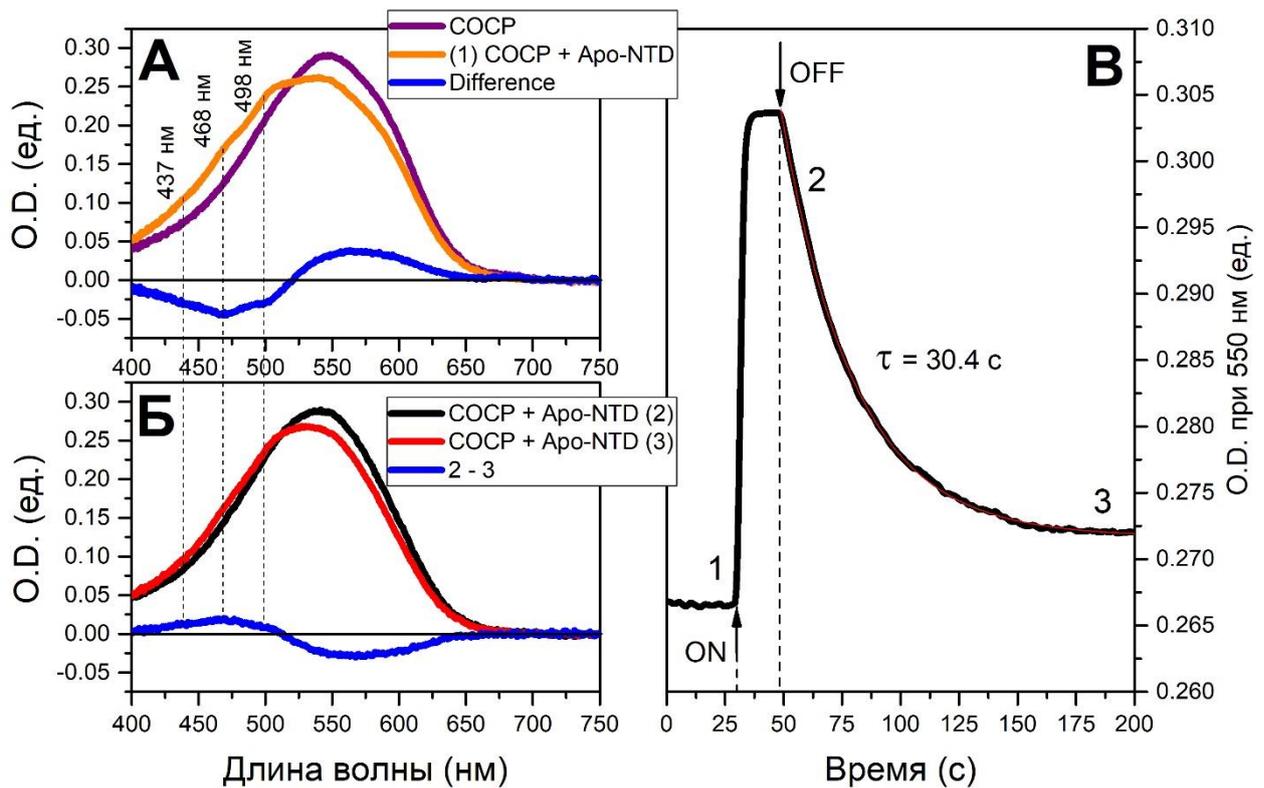


Рис. 48. А - взаимодействия между СОСР и апо-формой N-домена ОСР приводят к образованию нового состояния, характеризующегося схожим с оранжевым ОСР спектром поглощения (1). Б и В – освещение раствора СОСР и апо-формой N-домена ОСР синим светом приводит к обратимым изменениям оптической плотности, характерным для накопления активной красной формы ОСР^R (2). Однако, после выключения актиничного света наблюдается лишь частичная релаксация красной формы (3). Рисунок из статьи [221].

Открытые нами фиолетовые формы димеров С-домена и реакция переноса каротиноида между белками вызвало резонанс в сообществе исследователей фотозащитных реакций цианобактерий и каротиноидных белков. Поскольку мы знали, что у многих цианобактерий в геноме существуют отдельные гены, кодирующие гомологи N- и С-доменов ОСР, то предположили, что реакция переноса каротиноида может использоваться некоторыми видами цианобактерий для сборки активной формы, вызывающей тушение флуоресценции фикобилисом за счет доставки в нее каротиноида белками, гомологичными С-домену ОСР. Однако до этого их свойства как и роль в клетке не исследовались. Впервые получить холо-формы этих белков удалось экспрессировав соответствующие гены в каротиноидных штаммах *E.coli*. Гомологи N-домена получили название НСР (Helical Carotenoid Protein), а гомологи С-домена СТДН (C-Terminal Domain Homolog).

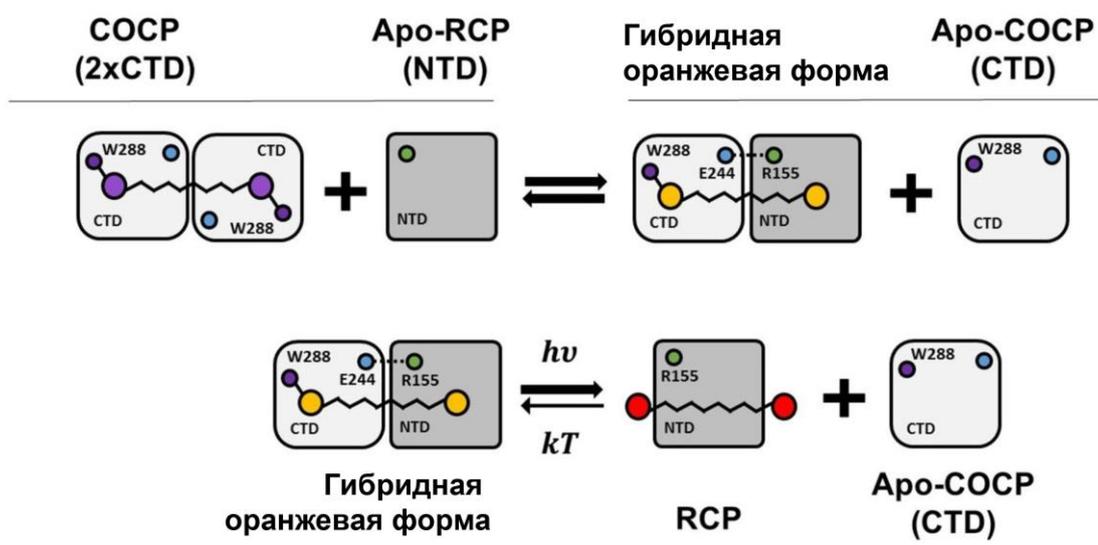


Рис. 49. Схема взаимодействия между COCP и апо-формой N-домена OCP: реконструкция фотоактивного оранжевого гетеродимера из отдельных доменов OCP.

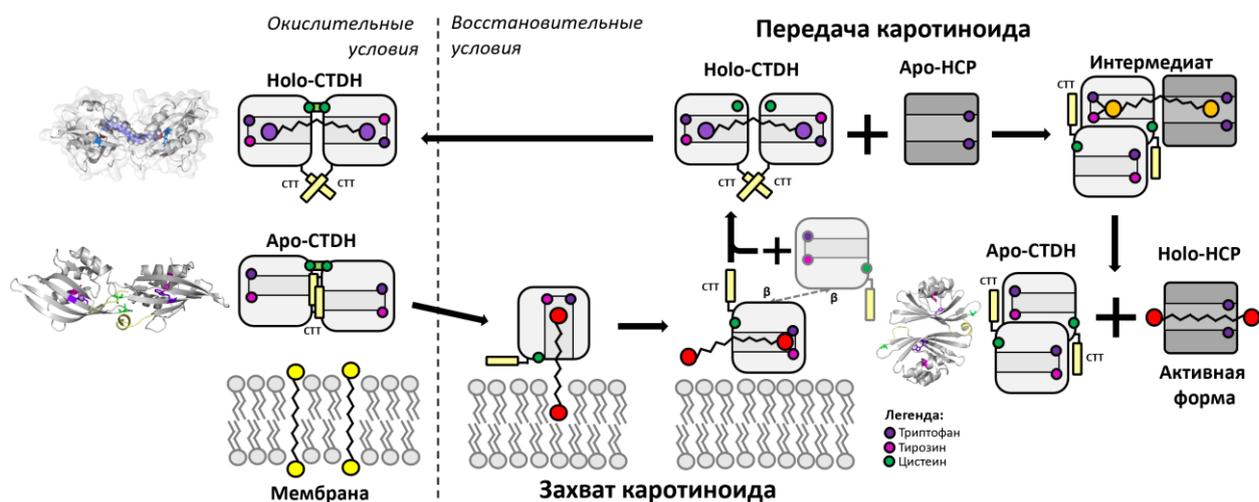


Рис. 50. Перенос каротиноидов между липидной мембраной и белками. В условиях, когда цистеины-104 окислены и STDH находится в мономерном состоянии возможен захват каротиноида из мембраны за счет образования водородных связей между кето-группой и остатками тирозина и триптофана в белке. Димерная форма STDH, образующаяся при связывании кето-каротиноида, может стабилизироваться за счет дисульфидных связей. В присутствии апо-форм белков гомологичных N-домену OCP (HCP) происходит образование переходного «оранжевого» состояния и перенос каротиноида, приводящий к появлению холо-формы HCP. Холо-формы HCP могут быть необходимы для активации тушения флуоресценции фикобилисом. Такой фотозащитный механизм не требует фотоактивации.

Несмотря на разнообразие природных гомологов N-домена OCP, которые теперь разделяют на 5 классов (HCP1-5) их структура, спектральные характеристики и функциональные свойства мало отличаются от RCP. Практически все известные HCP способны взаимодействовать с фикобилисомами, вызывая тушение её флуоресценции, аналогично RCP или другим аналогам

красной формы ОСР^R – без предварительной фотоактивации. Апо-форма НСР, как и РСР, способна взаимодействовать с СОСР и её природными гомологами, однако в результате этих взаимодействий чаще всего образуется холо-форма НСР. Вероятно, это объясняется большим сродством к каротиноиду у НСР. Таким образом, оранжевый гетеродимер является промежуточной стадией при передаче каротиноида из С-домена в НСР (см. *рис. 50*).

Среди представителей гомологов С-домена ОСР для исследования нами был выбран белок СТДН из *Anabaena* (AnaСТДН), который интересен тем, что в его структуре есть цистеин-104, отсутствующий в других СТДН. Мы показали, что AnaСТДН способен связывать эхиненон или кантаксантин, образуя гомодимеры, а наличие цистеина в 104 положении позволяет стабилизировать димер за счет образования ковалентной связи в окислительных условиях. Таким образом, функциональное состояние AnaСТДН может зависеть от редокс состояния клетки. В экспериментах *in vitro* на липосомах с кето-каротиноидами с помощью оптических методов нами было показано, что AnaСТДН способен экстрагировать кантаксантин с 90% эффективностью, что приводит к образованию стабильных гомодимеров. При взаимодействии холо-формы AnaСТДН с апо-формой НСР1 происходит перенос каротиноида в НСР1, однако эта реакция обратима и при увеличении концентрации апо-формы AnaСТДН происходит перенос каротиноида обратно в AnaСТДН. Таким образом положение каротиноида в том или ином гомологе структурных доменов ОСР может определяться концентрацией соответствующих белков и редокс состоянием среды, что потенциально открывает возможность для регуляции фотозащитных механизмов без участия фотоактивных белков (см. *рис. 50*).

Несмотря на высокую кажущуюся стабильность димеров AnaСТДН с каротиноидами, кристаллизовать этот белок в холо форме не удастся. С помощью рентгеноструктурного анализа мы показали, что структура апо-формы AnaСТДН (PDB ID 6FEJ) отличается от структуры С-домена рядом важных особенностей [233]. Во-первых, в апо форме AnaСТДН димеры могут образовываться не только

за счет ориентации доменов «лицом к лицу» - конфигурации, в которой два цистеина-104 контактируют друг с другом, но и за счет контактов β -складчатых участков (см. *рис. 50*). Возможность реализации такой конфигурации в растворе была подтверждена нами с помощью методов малоуглового рассеяния рентгена (SAXS). Во-вторых, С-концевая петля (СТТ) AnaCTDH обладает значительной подвижностью (что подтверждается ЯМР исследованиями, см. *рис 36* и обсуждение в разделе 3.2) и может перемещаться между внешней поверхностью белка и внутренней полостью, блокируя её и тем самым мешая каротиноиду добраться до остатков тирозина и триптофана, которые расположены точно также как и в полноразмерном ОСР и обеспечивают образование водородных связей с кето-каротиноидом. В-третьих, расстояние между двумя остатками триптофана-110 в соседних доменах не превышает 25 Å, что значительно меньше расстояния между атомами кислорода кето-групп в кантаксантине. Это означает, что каротиноид не может быть полностью экранирован белком от растворителя, оставаясь в all-trans конформации. Последнее утверждение подтверждается результатами молекулярной динамики [221].

Роль СТТ была дополнительно исследована в экспериментах по переносу каротиноидом между холо-формой AnaCTDH и НСР1 и НСР4. Перенос каротиноидов осуществлялся быстрее в отсутствие СТТ, однако это негативно сказывалось на способность AnaCTDH забирать каротиноиды из мембран [234]. Следует отметить, что НСР1 не способен забирать каротиноид из мембраны самостоятельно, что повышает значимость AnaCTDH как переносчика каротиноида между мембранами и белками (см. *рис. 50*).

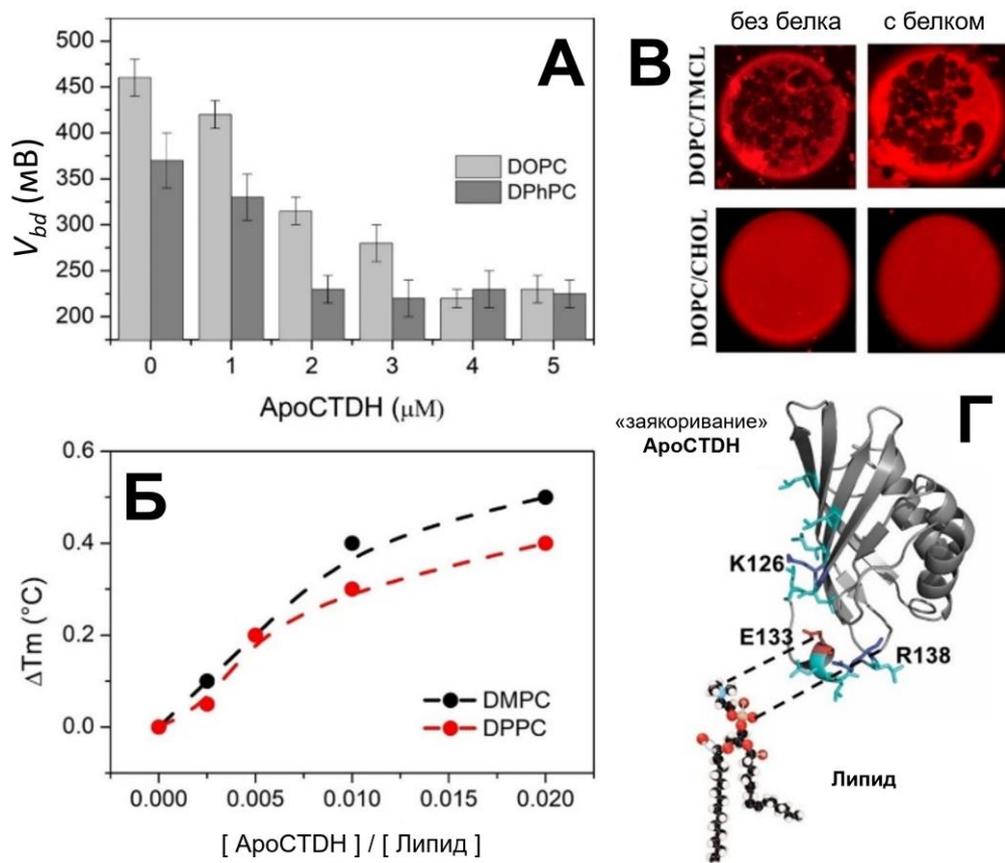


Рис. 51. Взаимодействие ApoSTDH с модельными мембранами. **А** – пороговые значения напряжения пробоя мембран из диолеил фосфатидилхолина (DOPC) и дифитаноил фосфатидилхолина (DPhPC) в присутствии различных концентраций апо-формы STDH. **Б** – зависимость температуры фазового перехода липосом из димиристойл фосфатидилхолина (DMPC) и дипальмитойл фосфатидилхолина (DPPC) при увеличении концентрации апо-формы ApoSTDH в растворе. **В** – флуоресцентные микрофотографии мембран различного состава в отсутствии и в присутствии апо-формы ApoSTDH в растворе. **Г** – модель взаимодействия апо-формы ApoSTDH с фосфатидилхолином. Показаны заряженные аминокислотные остатки.

Для исследования взаимодействия ApoSTDH с мембранами нами была проведена серия дополнительных экспериментов. Мы показали, что апо-форма ApoSTDH способна контактировать с мембранами, снижая пороговое напряжение пробоя мембраны с 460 до 230 мВ, а также достоверно увеличивая температуру фазового перехода на 0.5 °C (см. рис. 51) [147]. Это говорит о том, что апо-форма ApoSTDH, вероятно, образует контакты с полярными головками соседних мембранных липидов в модельных мембранах вследствие электростатических взаимодействий. Вероятно, что СТТ, содержащий заряженные остатки глутаминовой кислоты-133 и аргинина-138, может действовать как якорь для образования временных контактов с мембраной и увеличения вероятности

экстракции каротиноидов (см. рис 51).

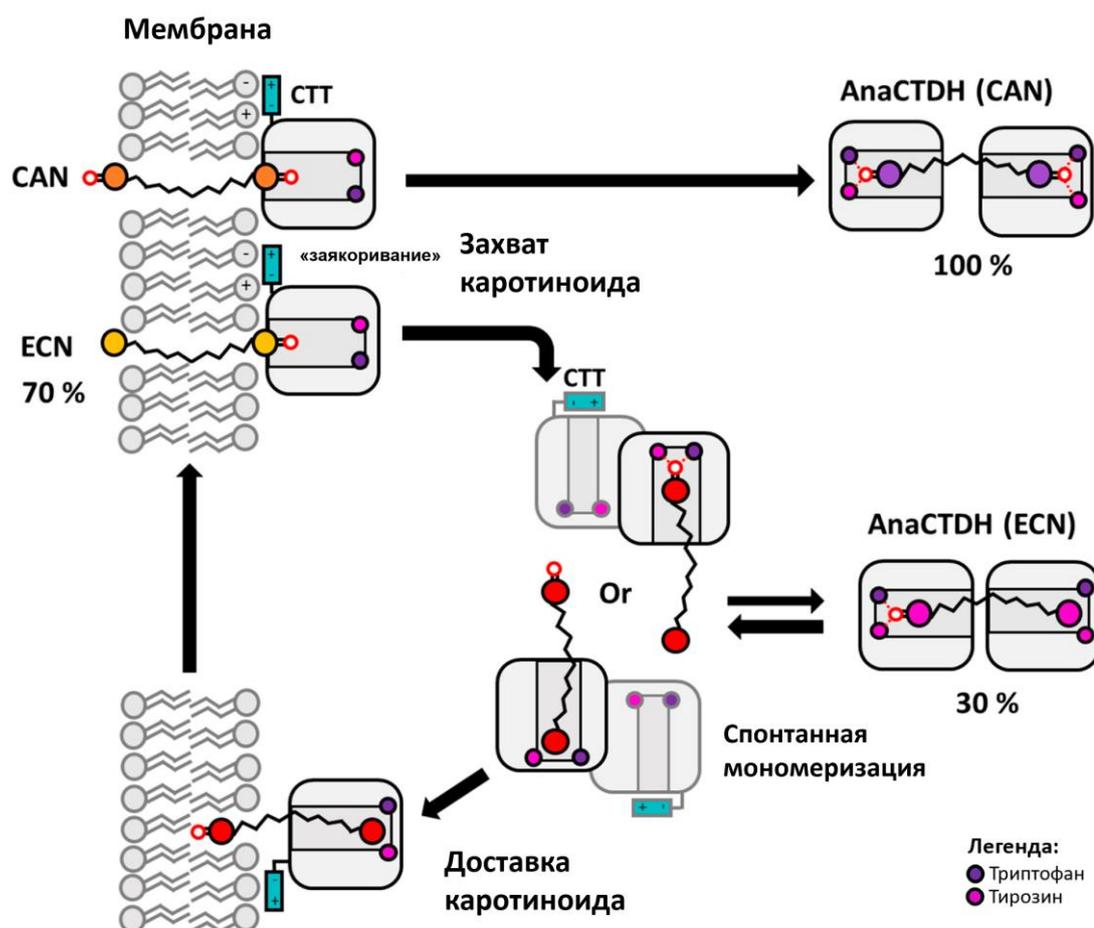


Рис. 52. Белок-опосредованный перенос каротиноидов. Апо-форма AnaCTDH с мембранами. Каротиноиды с двумя кето-группами образуют стабильные комплексы с AnaCTDH в виде димеров. Комплексы с моно-кетолитрованными каротиноидами, напротив, не стабильны из-за меньшего количества водородных связей между белком и каротиноидом. Меньшая стабильность димера AnaCTDH (ECN) обеспечивает спонтанную мономеризацию, которая приводит к переносу каротиноида в более гидрофобное окружение – мембрану или другой белок.

Как мы показали, направление переноса каротиноидов между белками может меняться в зависимости от их концентраций и аффинности к различным каротиноидам, зависящей от структуры белковой матрицы. Поскольку скорость образования холо-формы белка очевидным образом зависит от произведения концентраций реагентов, то при высоком содержании каротиноидов в мембранах и высокой концентрации белка в цитоплазме равновесие будет смещено в сторону образования холо-формы белкат (см. рис. 52). Однако, возможна и обратная реакция, именно поэтому при наработке белковых препаратов в каротиноидных штаммах *E.coli* даже при избытке каротиноидов выделяются фракции апо- и холо-

форм белков. Поскольку современные биохимические методы позволяют эффективно разделить препарат на фракции, холо-формы белков могут быть получены в чистом виде, что в итоге позволило нам исследовать реакции переноса каротиноидов из белков в липидную мембрану (см. *рис. 52*).

Добавление AnaCTDH с эхиненоном к раствору липосом приводило к постепенному уменьшению поглощения на 530 нм и одновременному увеличению поглощения на 460 нм. Этот процесс сопровождался изменением цвета раствора от фиолетового до желтого, что указывает на доставку каротиноида из белка в липосомы. Это подтверждается также повышением концентрации апо-формы AnaCTDH и изменениями формы спектров комбинационного рассеяния эхиненона (см. *рис. 53*). После титрования липосомами мы достигли насыщения, соответствующего ~ 70% эффективности доставки каротиноидов. Показав, что белки AnaCTDH способны доставлять эхиненон в модельные мембраны мы решили испытать эту систему на культурах стволовых клеток HEK293 и линиях HeLa, Tet21N (нейробластома) и карциномы яичников. С помощью конфокальной микроскопии в режиме регистрации спектров комбинационного рассеяния мы обнаружили что добавление AnaCTDH с эхиненоном в культуральные среды с клетками приводит к встраиванию каротиноидов в плазматическую мембрану и последующему распределению каротиноидов по внутриклеточным мембранам.

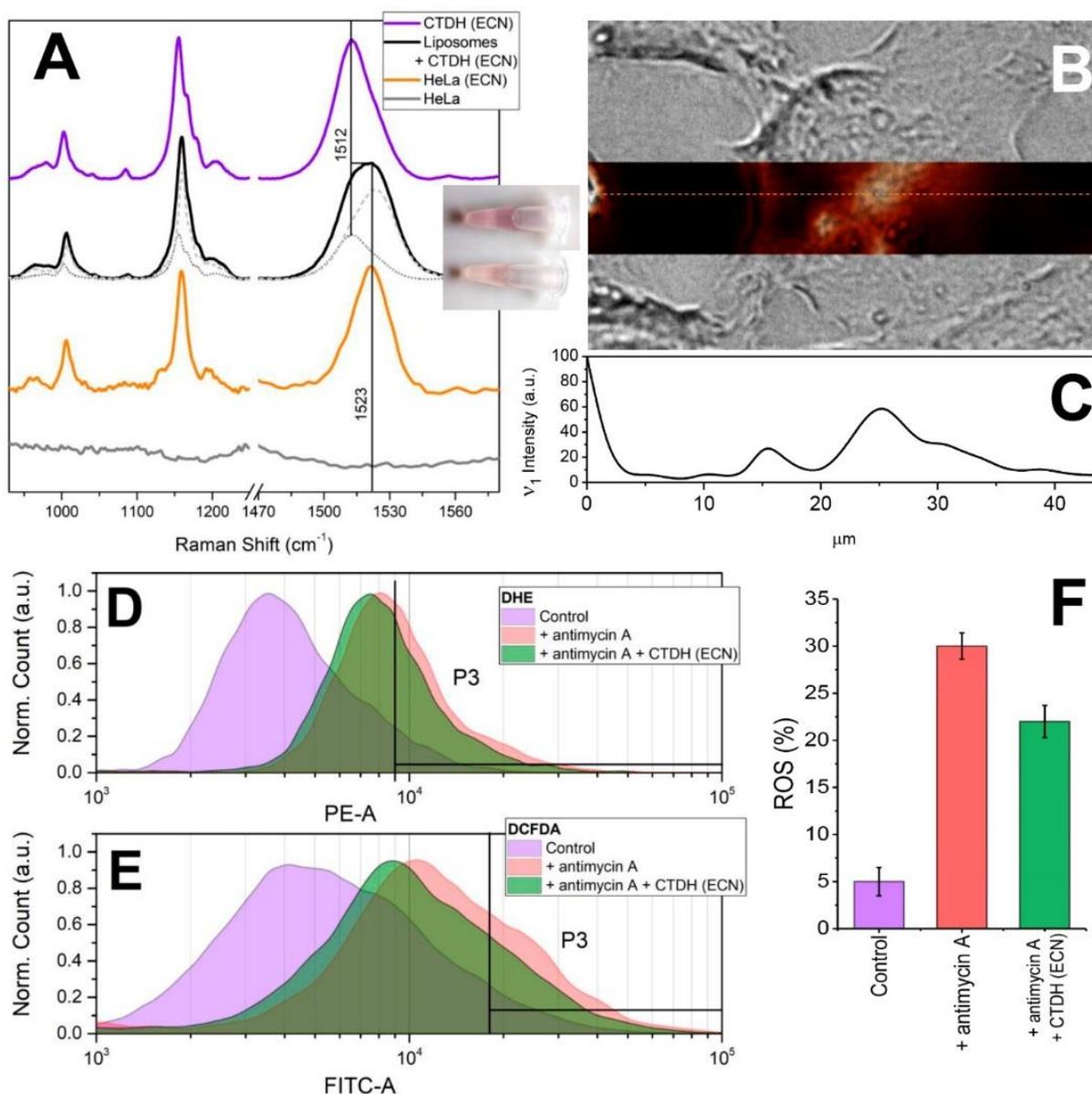


Рис. 53. Доставка эхиненона в клеточные мембраны при добавлении АнаСТДН в культуральную среду. **А** – спектры комбинационного рассеяния эхиненона в составе белкового препарата АнаСТДН (фиолетовая линия), после инкубации АнаСТДН в растворе липосом (черная линия) и после инкубации в среде с клетками HeLa (оранжевая линия). **В** – набложение изображения клетки HeLa в проходящем свете и полученного с помощью микроскопии в режиме регистрации спектров комбинационного рассеяния. **С** – сечение вдоль пунктирной линии на **В**, показывающее интенсивность полосы 1520 см^{-1} в спектрах комбинационного рассеяния. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации каротиноидов. **Д** и **Е** - интенсивность флуоресценции клеток Tet21N, окрашенных дигидроэтидием (DHE) и диацетатом дихлордигидрофлуоресцином (DCFDA), чувствительных к содержанию активных форм кислорода по данным проточной цитофлуориметрии. Окислительный стресс вызывали добавлением антимициана А в среду культивации. **Ф** – изменение выхода активных форм кислорода при добавлении в среду АнаСТДН с эхиненоном. Рисунок из статьи [147].

Доставка каротиноида в плазматическую мембрану осуществляется за счет образования временных контактов между АнаСТДН и мембраной. Для

визуализации этих контактов мы решили создать химерную конструкцию из AnaCTDH и красного флуоресцентного белка TagRFP. Полученная нами конструкция оказалась чувствительной к наличию каротиноида в локальном окружении TagRFP за счет переноса энергии электронного возбуждения на кето-каротиноид. Используя метод конфокальной флуоресцентной микроскопии с регистрацией времени жизни возбужденных состояний (FLIM), мы показали, что, во-первых, AnaCTDH-TagRFP не проникает в клетки, и, во-вторых, не наблюдается повышения локальной концентрации AnaCTDH-TagRFP в области плазматической мембраны, что говорит об отсутствии продолжительных контактов AnaCTDH с мембраной. Таким образом, AnaCTDH способна доставлять кето-каротиноиды в плазматическую мембрану, а последующее перераспределение каротиноидов по внутриклеточным органоидам осуществляется за счет клеточных механизмов транспорта (см. рис. 53).

Поскольку каротиноиды являются природными антиоксидантами, их доставка в клетки с помощью AnaCTDH влияет на редокс состояние клетки и позволяет защищаться от окислительного стресса. Эта возможность была показана нами в модельных экспериментах на клетках нейробластомы (Tet21N), в которых с помощью антимицина А индуцировали образование активных форм кислорода (АФК) в дыхательной цепи митохондрий, которые затем детектировали по флуоресценции красителей, чувствительных к АФК, с помощью проточной цитометрии (см. рис. 53). Мы обнаружили что добавление в культуральную среду 1 мкМ AnaCTDH с эхиненоном приводит к снижению выхода АФК на 25 %. Эти эксперименты показывают что белковые системы доставки каротиноидов обладают потенциалом для ряда био-медицинских приложений. Белковые системы доставки интересны тем, что в отличие от липосом белок может быть специфически модифицирован для взаимодействия с рецепторами на поверхности определенных клеток и, соответственно, оптимизирован для адресной доставки антиоксиданта. Также разработанный нами подход для доставки каротиноидов открывает возможность для самосборки каротиноидных белков и генетически

кодируемых конструкций на их основе внутри клетки, например для применения химерных конструкций на основе ОСР для измерения локальной температуры клетки (см. *рис. 23*, раздел 3.1 и [235]).

Наше дальнейшее исследование переноса каротиноидов между белками и мембранами *in vitro* показало что этот процесс может играть роль в регуляции фотозащитных механизмов и управляться светом. Мы показали, что при взаимодействии холо-формы СОСР (или AnaCTDH) с апо-формой полноразмерного ОСР из *Synechocystis* (и *Anabaena*) происходит образование холо-формы ОСР с эффективностью до 75 %. Этот процесс происходит в несколько стадий и требует образования промежуточного комплекса апо-ОСР – холо-СОСР и, очевидно, мономеризации С-доменного переносчика каротиноида. Нам удалось детектировать появление переходных комплексов (интермедиатов), используя химерные конструкции на основе ОСР и зеленого флуоресцентного белка (GFP). Сближение СОСР и GFP в комплексе с ОСР сопровождается изменением времени жизни флуоресценции хромофора GFP, которое происходит из-за переноса энергии электронного возбуждения на каротиноид в составе СОСР. Используя, мутант ОСР, лишенный короткой α -спирали в начале N-домена (ОСР- Δ NTE), мы показали, что этот структурный элемент важен для переноса каротиноида между белками. Из-за идентичности структуры С-доменов в СОСР и полноразмерном ОСР (а также высокой степени гомологии этих участков в AnaCTDH и ОСР из *Anabaena*), NTE может участвовать в стабилизации контактов в промежуточном комплексе (см. *рис. 54*). Далее мы наблюдали изменения спектра поглощения кето-каротиноида, связанные с мономеризацией СОСР и переносом каротиноида в апо-форму полноразмерного ОСР. Было установлено, что реакция переноса каротиноида из фиолетового СОСР в ОСР характеризуется значительным активационным барьером – 37 ккал/моль, однако для мутанта СОСР W288A, с вдвое меньшим количеством водородных связей между кето-каротиноидом и белковой матрицей (по сравнению с СОСР), данная реакция требует всего 24 ккал/моль. Очевидно, что прочность связывания кето-каротиноида в димерном пигмент-белковом комплексе

влияет на способность этого комплекса к мономеризации. Поэтому реакция переноса каротиноида идет быстрее с мутантными формами С-домена. Однако, мы не можем исключить что СОСР может мономеризоваться до образования комплекса с апо-формой ОСР.

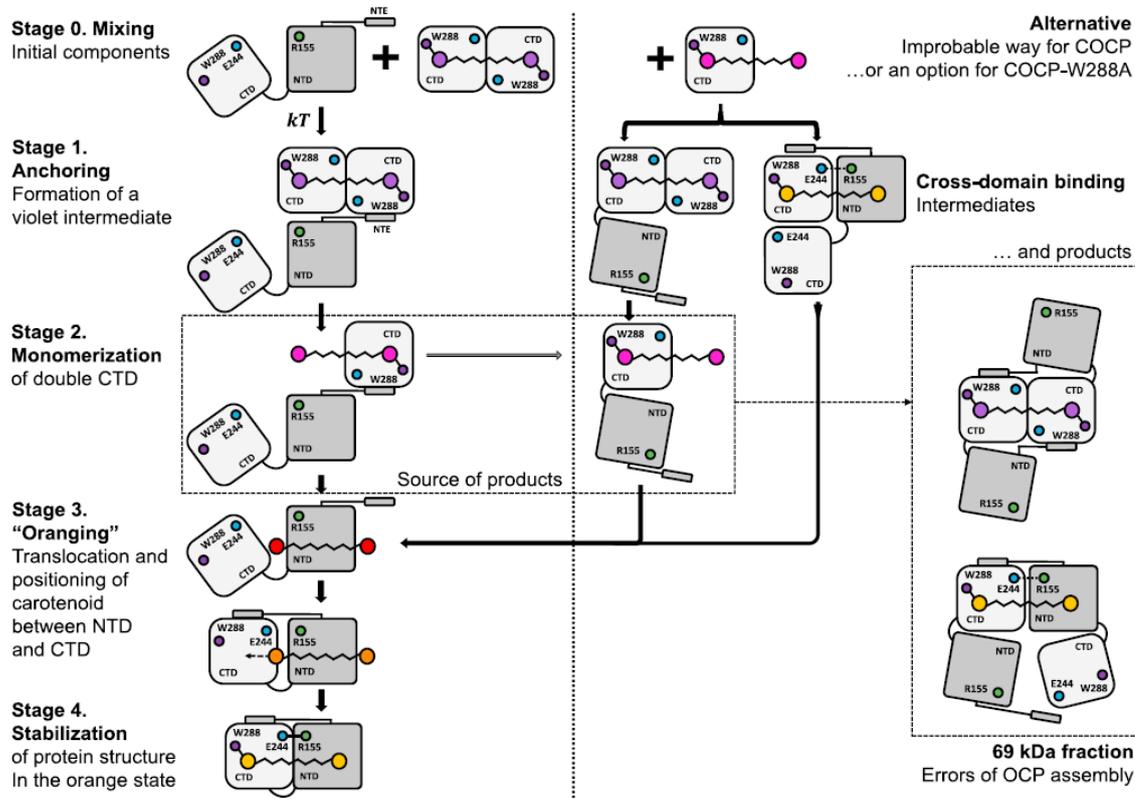


Рис. 54. Сборка фотоактивного ОСР за счет переноса каротиноида между холо-формой СОСР и апо-формой ОСР. После смешивания растворов холо-формы СОСР и апо-формы ОСР, в зависимости от олигомерного состояния СОСР образуются промежуточные комплексы, в которых NTE играет роль стабилизатора белок-белковых взаимодействий, увеличивающих вероятность передачи каротиноида. Взаимодействие интермедиатов, образующихся на стадии 2 (каротиноид располагается в С-домене ОСР), с еще одной молекулой апо-формы ОСР может приводить к образованию стабильных димеров ОСР, в которых каротиноид располагается между двумя разными белками. Если этого не происходит, то каротиноид перемещается в N-домен ОСР, после чего происходит релаксация красной формы и образование компактной мономерной оранжевой формы ОСР. Рисунок из статьи [109].

Как мы отмечали ранее, сродство NTE больше именно к С-домену, содержащему каротиноид. Это служит причиной диссоциации комплекса после того, как кето-каротиноид оказывается в полноразмерном ОСР, но также может объяснять наличие минорной (~ 25 %) фракции с массой, вдвое превышающей массу ОСР (см. рис. 54). Анализ спектров поглощения фракции с массой порядка 69 кДа показал, что она состоит из «фиолетовой» части (50 %), в которой

каротиноид находится между двумя С-доманами и «оранжевой» фотоактивной формы (50 %), в которой, кето-каротиноид расположен как в гетеродимерном ОСР (см. *рис. 49*). Таким образом, мы установили, что при взаимодействии холо-формы СОСР с апо-формой полноразмерного ОСР *in vitro* образуются продукты, в которых взаимодействие N- и С-доменов ОСР стабилизируется за счет контактов NTE и β -складчатого участка в С-домене. Основным продуктом является оранжевая форма ОСР, которая ничем не отличается от холо-формы ОСР, получаемой при наработке белка в *E.coli*.

Оранжевая форма ОСР не взаимодействует с апо-формами СОСР и AnaSTDH *in vitro*. Однако, мы установили, что гомологичная ей апо-форма AnaSTDH способна забирать кето-каротиноид из РСР и любых других аналогов красной активной формы ОСР^R [234]. Иначе говоря, нарушение компактной структуры оранжевой формы ОСР приводит к тому что каротиноид оказывается менее прочно связан с белковой матрицей и может быть передан в другое белковое окружение с большей афинностью к кето-каротиноиду. Мы показали, что эта реакция может быть инициирована фотоактивацией ОСР в присутствии апо-формы AnaSTDH (см. *рис. 55*). Анализ изменений спектра поглощения кето-каротиноида при фотоактивации показывает, что сначала происходит образование красной активной формы ОСР^R, которая, взаимодействуя с апо-формой AnaSTDH, передает ей эхиненон и в результате образуется димерная холо-форма AnaSTDH. При выключении света реакция полностью обратима и вновь образуются холо-форма ОСР и апо-форма AnaSTDH. Поскольку ранее мы установили, что AnaSTDH может передавать эхиненон в мембраны (см. *рис. 52* и *рис. 53*), мы повторили эксперимент с фотоактивацией ОСР в присутствии апо-формы AnaSTDH и липосом. В этих экспериментах мы продемонстрировали что AnaSTDH значительно ускоряет перенос кето-каротиноида в мембрану липосом при фотоактивации ОСР.

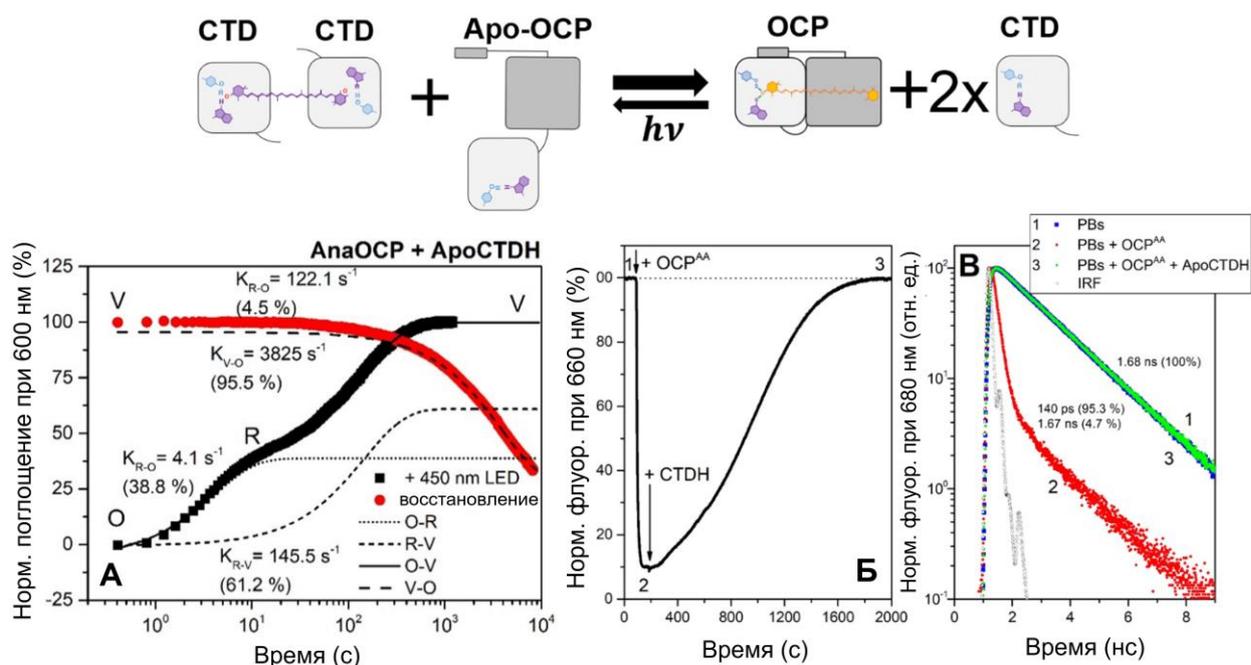


Рис. 55. Сверху: схема обратимого фотоиндуцируемого переноса каротиноида из OCP в АнаCTDH. **А** – черные квадраты показывают изменения поглощения при 600 нм (область наименьших значений коэффициента молярной экстинкции оранжевой формы OCP) при освещении раствора апо-формы гомолога С-домена OCP (CTDH) и оранжевого OCP из Анабены. Шкала времени в логарифмическом масштабе. Быстрая фаза изменений оптической плотности (O-R) соответствует накоплению красной формы OCP при фотоактивации. Медленная фаза (R-V) характеризует перенос каротиноида из красной формы OCP в CTDH и образование фиоетового гомодимера. После выключения света происходит постемпенное восстановление оранжевой формы в результате переноса каротиноида из CTDH в OCP. **Б** и **В** – изменения интенсивности и времени жизни флуоресценции фикобилисомы в результате добавления активной формы OCP^{AA} обратимы при добавления в среду апо-формы CTDH.

Способность АнаCTDH взаимодействовать с красной активной формой OCP^R и её аналогами открывает еще одно интересное свойство этих каротиноидных белков. При активации нефотохимического тушения флуоресценции фикобилисом за счет красной формы OCP добавление апо-формы АнаCTDH приводит к постепенному восстановлению флуоресценции фикобилисомы (см. *рис. 55Б* и *В*). Данный эффект сопоставим с влиянием FRP на взаимодействие красной формы и фикобилисомы (см. раздел II). Однако в данном случае механизм восстановления флуоресценции не связан с релаксацией красной формы и предотвращением её взаимодействия с антенной. По сути АнаCTDH «отнимает» каротиноид у красной формы OCP, снижая эффективную концентрацию активной формы, вызывающей тушение флуоресценции фикобилисомы. Поскольку нами была показана

возможность таких взаимодействий *in vitro* для видоспецифичных ОСР и СТДН из *Anabaena*, мы считаем, что такие реакции возможны и в клетке и, вероятно, могут играть роль в регуляции фотозащитных реакций у некоторых видов цианобактерий, не имеющих FRP.

Таким образом, исследование свойств отдельных структурных доменов ОСР позволило нам открыть реакции переноса каротиноидов. Эти реакции обеспечивают водорастворимым белкам возможность осуществлять транспорт гидрофобных молекул между различными цитоплазматическими белками и мембранами. Разнообразие обнаруженных нами реакций, вероятно, имеет значение для регуляции фотозащитных реакций цианобактерий, которые еще предстоит описать *in vivo*. Однако уже сейчас очевидно, что эти реакции могут стать основой управления функциональным состоянием белковых систем, регулировки олигомерного состояния и/или фотоактивности конструкций на основе ОСР и его ГОМОЛОГОВ.

Выводы к разделу 3.4. Белок-опосредованный транспорт каротиноидов:

1. С-домен ОСР и его природные гомологи способны связывать молекулу каротиноида с образованием димеров, характеризующихся уникальными оптическими свойствами.
2. С-домены ОСР и их гомологи способны с высокой эффективностью осуществлять реакции переноса каротиноидов между мембранами и различными белками, что, вероятно, может являться регуляторным механизмом *in vivo*.
3. Направление реакции переноса каротиноида между белками и мембранами определяется химическим строением каротиноида и набором белок-хромофорных и белок-белковых контактов и, в некоторых случаях, может модулироваться светом.
4. Образование оранжевой компактной фотоактивной формы ОСР возможно в результате взаимодействия отдельных доменов или их гомологов и не требует соединения их междоменным линкером.
5. Установленные реакции позволяют создавать фотоуправляемые генетически кодируемые (оптогенетические) системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность создания новых молекулярных инструментов на базе природных пигмент-белковых комплексов и их практического применения для решения прикладных задач во многом зависит от нашего понимания взаимосвязанности функциональных свойств и структурной организации этих систем. Сейчас мы можем с уверенностью сказать, что за последние 10 лет наше понимание механизмов, лежащих в основе фотозащитных реакций цианобактерий, значительно улучшилось. Это стало возможным в результате определения основных участников этого процесса, изучения их структуры и взаимодействий *in vitro* и *in vivo*.

Единственным известным водорастворимым фотоактивным белком с кето-каротиноидом в качестве хромофора является оранжевый каротиноидный белок (ОСР). Кристаллическая структура его оранжевой компактной формы отражает лишь одну комбинацию электронно-конформационных взаимодействий белковой матрицы и хромофора среди множества возможных конформаций, возникающих на пути к активному состоянию. В результате анализа совокупности кинетических и структурных данных в работе предложена схема фотоциклических переходов ОСР (см. раздел 3.2). На этой схеме показана детальная картина фотоиндуцированных певращений ОСР, времена жизни промежуточных состояний, квантовые выходы и структуры основных интермедиатов. Поглощение кванта света молекулой кето-каротиноида приводит к разрыву водородных связей между каротиноидом и белком и появлению первого стабильного фотопродукта и последующих стадии фотоцикла, на которых происходят изменения конформации белка, значимые для взаимодействий с участниками нефотохимического тушения. Важно подчеркнуть, что все эти изменения необходимы для выполнения основной биологической функции, а именно нефотохимического тушения электронного возбуждения пигментов ФБС.

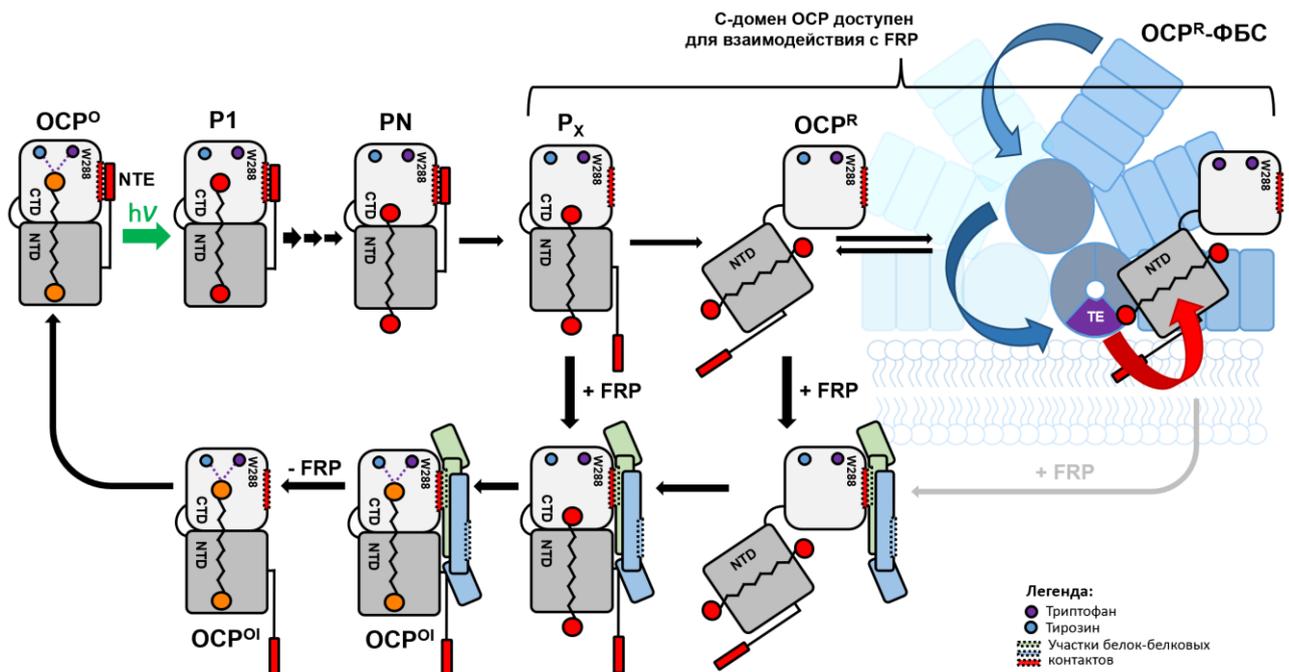


Рис. 56. Регуляция OCP-зависимого нефотохимического тушения ФБС цианобактерий за счет взаимодействия OCP с FRP.

На рис. 56 представлена общая схема процессов, объединяющая фотохимические превращения OCP (см. раздел 3.2) и взаимодействия участников нефотохимического тушения. Согласно схеме (рис. 56), фотовозбуждение каротиноида в составе OCP⁰ за несколько сотен фс приводит к направленному перераспределению электронной плотности в молекуле каротиноида, за счет асимметричного расположения зарядов в локальном белковом окружении. Согласно выдвинутой в работе гипотезе, в результате происходит обратимый перенос протона на каротиноид, изменение равновесной геометрии и разрыв водородных связей за 20 пс (P1). Затем происходит изомеризация каротиноида (стадии P2, см раздел 3.2) и его перемещение между доменами OCP (PN). Это влияет на стабильность контактов между структурными элементами белковой матрицы и приводит к отсоединению короткой α -спирали (NTE). В результате открывается главный участок белок-белковых контактов для взаимодействия OCP с FRP (стадия P_x). Таким образом, комплекс OCP-FRP может образоваться еще до нарушения белок-белковых контактов между структурными доменами OCP (NTD и CTD) и появления активного состояния OCP^R, взаимодействующего с ФБС. Тем самым образование комплекса OCP-ФБС и нефотохимическое тушение ФБС может

быть предотвращено. Компактизация ОСР в комплексе с FRP в силу ограниченной подвижности структурных доменов ОСР, ускоряет восстановление водородных связей (OSR^{OI}) и релаксацию каротиноида в исходные положение и конфигурацию в С-домене (OSR^{O}). Последующее отсоединение FRP и восстановление контактов С-домена с NTE завершает релаксацию белковой структуры ОСР. Таким образом, становится ясной роль FRP - регулятора взаимодействия фотоактивированного ОСР с ФБС, одновременно обеспечивающая как необходимый уровень нефотохимического тушения флуоресценции ФБС, так и ускорение восстановления исходного неактивного состояния ОСР (см. *рис. 56*).

В диссертации показано, как путем модификации белковой структуры ОСР можно управлять его фотоциклом, увеличивать выход фотопродукта, изолировать определенные стадии фотоцикла, ускорять и замедлять переходы между состояниями (см. разделы 3.2 и 3.3). Эта информация необходима для превращения природного ОСР в удобный молекулярный фотоуправляемый инструмент. Понимание модульного принципа организации структуры ОСР и белок-каротиноидных контактов позволило открыть новый класс каротиноидных белков (см. раздел 3.4), механизмы регуляции фотозащитных реакций за счет белок-опосредованного транспорта каротиноидов и разработать метод высокоэффективной доставки природных антиоксидантов в клетки. Этот метод может быть востребован при терапии патологий, вызванных и сопровождающихся окислительным стрессом, и для регенеративной медицины. Эти подходы в совокупности с пониманием фотоцикла ОСР позволили сконструировать флуоресцентный сенсор температуры.

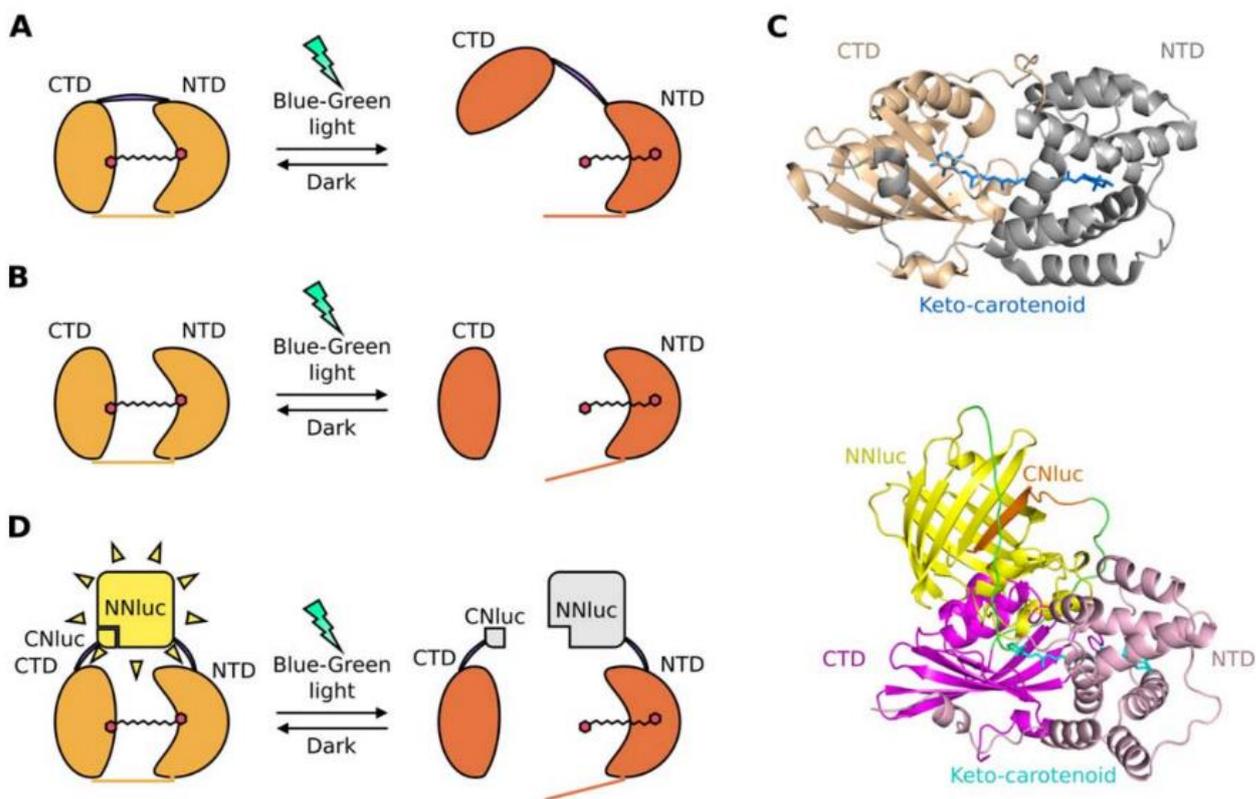


Рис. 57. Фотоуправляемая люцифераза на базе разделяемых доменов ОСР. Рисунок из Piccinini L. et al. (2021), см. раздел 3.4 и *рис. 49*.

Понимание модульного принципа организации ОСР позволило нам открыть новый класс каротиноидных белков и новые принципы управления фотозащитными реакциями за счет белок-опосредованного транспорта каротиноидов. Исследование механизмов переноса каротиноидов между белками и мембранами позволило нам разработать принципиально новый подход для высокоэффективной доставки природных антиоксидантов в ткани и клетки, что, как мы надеемся, может быть востребовано в медицинских приложениях для борьбы с патологиями, вызванными окислительным стрессом, и для регенеративной медицины. Эти же подходы в совокупности с пониманием фотоцикла ОСР позволили нам сконструировать флуоресцентный сенсор внутриклеточной температуры.

Хотим отметить, что наши открытия побудили некоторые научные группы приступить к созданию оптогенетических переключателей на базе ОСР. Так, например, под руководством профессора Оксфордского университета Франческо

Ликаузи в 2021 году были созданы трансгенные растения с фотоуправляемыми люциферазами (см. *рис. 57*). Мы уверены, что подобные принципы управления олигомерным состоянием белков могут быть использованы для изучения и управления различными метаболическими реакциями *in vivo*.

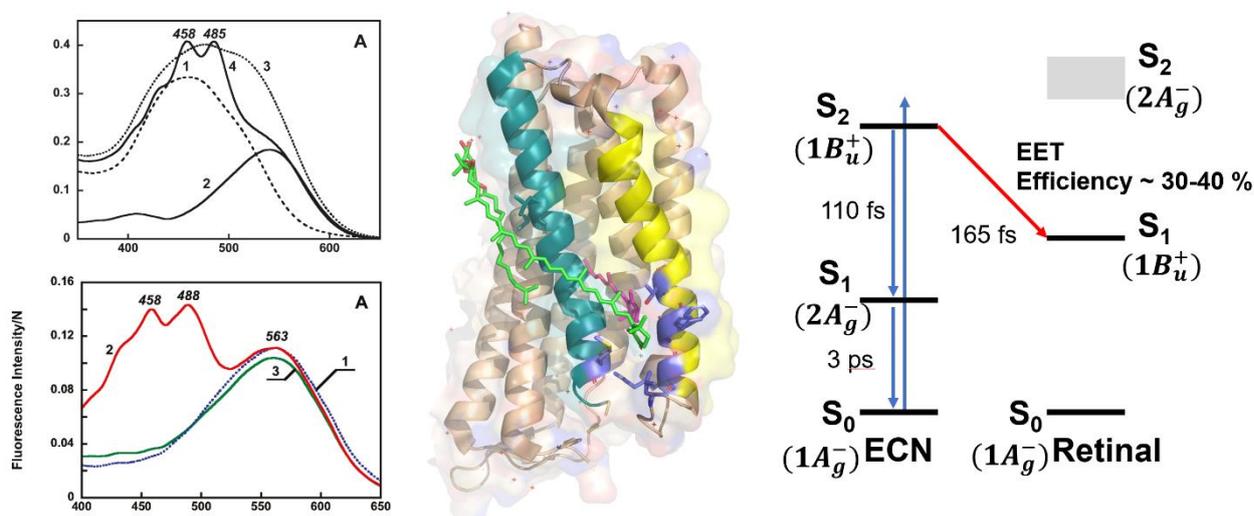


Рис. 58. Слева: спектры возбуждения флуоресценции родопсина, содежащего дополнительную антенну из кето-каротиноида. В центре: структура протонного насоса XR с дополнительной антенной из кето-каротиноида. Справа: взаимодействия между электронными состояниями эхиненона и ретиналя.

Разработанные нами методы доставки кето-каротиноидов в клеточные мембраны позволяет по новому взглянуть на свойства ряд известных протонных и натриевых насосов (XR, GR, NaR и т.д.) [236-241]. Невозможная ранее в клетках реконструкция этих оптогенетических конструкций с дополнительным хромофором теперь становится доступной благодаря белок-опосредованной доставке кето-каротиноида (см. *рис. 58*). Использование таких систем может иметь ряд преимуществ за счет антиоксидантных свойств каротиноида, расширения спектра действия и принципиально новых способов управления активностью оптогенетической конструкции.

Основные выводы работы

По результатам работы можно сформулировать следующие выводы:

1. В процессах нефотохимического тушения флуоресценции эффективным акцептором энергии электронного возбуждения пигментов антенных комплексов цианобактерий является каротиноид в составе оранжевого каротиноидного белка, вызывающий сокращение времен жизни терминальных пигментов антенны до 10 пс. Перенос энергии электронного возбуждения происходит с участием конформационных степеней свободы.
2. Фотоактивация оранжевого каротиноидного белка вызывает разрыв водородных связей между каротиноидом и остатками тирозина-203 и триптофана-288, который происходит за времена порядка 23 пс. Реакция обусловлена перераспределением электронной плотности каротиноида в возбужденном состоянии, сопряженным с обратимым переносом протона от аминокислотного остатка. Квантовый выход образования физиологически активной формы не превышает 0.2 %.
3. Электронно-конформационные взаимодействия каротиноида и белковой матрицы на разных стадиях фотоцикла оранжевого каротиноидного белка приводят к образованию набора интермедиатов фотоцикла. Точечные замены аминокислот в областях ключевых белок-белковых и белок-каротиноидных контактов позволяют контролировать скорость отдельных этапов фотоцикла.
4. Белок восстановления флуоресценции примерно на два порядка увеличивает скорость релаксации активной красной формы каротиноидного белка за счет взаимной ориентации С- и N-концевых доменов. Эффективное взаимодействие с интермедиатами фотоцикла, предшествующими образованию активных форм каротиноидного белка, позволяет ингибировать нефотохимическое тушение фикобилисом даже при низких концентрациях белка восстановления флуоресценции.

5. С-домены оранжевого каротиноидного белка и их гомологи способны с высокой эффективностью осуществлять реакции переноса каротиноидов между мембранами и различными белками, что может являться регуляторным механизмом *in vivo*. Направление реакции переноса каротиноида между белками и мембранами определяется химическим строением каротиноида и набором белок-хромофорных и белок-белковых контактов и, в некоторых случаях, может модулироваться светом. Установленные реакции позволяют создавать фотоуправляемые генетически кодируемые (оптогенетические) системы.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты по специальности 03.01.02 - биофизика:

1. **Maksimov E. G.**, Gostev T. S., Kuz'minov F. I., Sluchanko N. N., Stadnichuk I. N., Pashchenko V. Z., Rubin A. B. Hybrid systems of quantum dots mixed with the photosensitive protein phycoerythrin // *Nanotechnologies in Russia*. – 2010. – Т. 5, № 7. – С. 531-537.
2. **Maksimov E. G.**, Kuzminov F. I., Konyuhov I. V., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2011. – Т. 104, № 1. – С. 285-291.
3. Schmitt F. J., **Maksimov E. G.**, Suedmeyer H., Jeyasangar V., Theiss C., Paschenko V. Z., Eichler H. J., Renger G. Time resolved temperature switchable excitation energy transfer processes between CdSe/ZnS nanocrystals and phycobiliprotein antenna from *Acaryochloris marina* // *Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications*. – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 190-195.
4. Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., Zharmukhamedov S. K., **Maksimov E. G.**, Muronets E. M., Pashchenko V. Z. Quenching of phycobilisome fluorescence by orange carotenoid protein // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2011. – Т. 439, № 1. – С. 167.
5. **Maksimov E. G.**, Tsoraev G. V., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The nature of anomalous temperature dependence of the fluorescence lifetime of allophycocyanin // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2012. – Т. 443, № 1. – С. 86-90.

6. Schmitt F. J., **Maksimov E. G.**, Hätti P., Weißenborn J., Jeyasangar V., Razjivin A. P., Paschenko V. Z., Friedrich T., Renger G. Coupling of different isolated photosynthetic light harvesting complexes and CdSe/ZnS nanocrystals via Förster resonance energy transfer // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2012. – T. 1817, № 8. – C. 1461-1470.
7. Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., **Maksimov E. G.**, Lukashev E. P., Zharmukhamedov S. K., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2012. – T. 1817, № 8. – C. 1436-1445.
8. **Maksimov E. G.**, Schmitt F. J., Hätti P., Klementiev K. E., Paschenko V. Z., Renger G., Rubin A. B. Anomalous temperature dependence of the fluorescence lifetime of phycobiliproteins // *Laser Physics Letters*. – 2013. – T. 10, № 5. – C. 055602.
9. Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., Bernát G., Zlenko D. V., Krasilnikov P. M., Lukashev E. P., **Maksimov E. G.**, Paschenko V. Z. Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 detected in vivo and in vitro // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2013. – T. 125. – C. 137-145.
10. **Maksimov E. G.**, Schmitt F. J., Shirshin E. A., Svirin M. D., Elanskaya I. V., Friedrich T., Fadeev V. V., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The time course of non-photochemical quenching in phycobilisomes of *Synechocystis* sp. PCC6803 as revealed by picosecond time-resolved fluorimetry // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2014. – T. 1837, № 9. – C. 1540-1547.

11. **Maksimov E. G.**, Klementiev K. E., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Features of temporal behavior of fluorescence recovery in *Synechocystis* sp. PCC6803 // *Photosynthesis Research*. – 2015. – T. 125, № 1. – C. 167-178.

12. **Maksimov Eugene G.**, Shirshin Evgeny A., Sluchanko Nikolai N., Zlenko Dmitry V., Parshina Evgenia Y., Tsoraev Georgy V., Klementiev Konstantin E., Budylin Gleb S., Schmitt F.-J., Friedrich T., Fadeev Victor V., Paschenko Vladimir Z., Rubin Andrew B. The Signaling State of Orange Carotenoid Protein // *Biophysical Journal*. – 2015. – T. 109, № 3. – C. 595-607.

13. Karpulevich A. A., **Maksimov E. G.**, Sluchanko N. N., Vasiliev A. N., Paschenko V. Z. Highly efficient energy transfer from quantum dot to allophycocyanin in hybrid structures // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2016. – T. 160. – C. 96-101.

14. **Maksimov E. G.**, Moldenhauer M., Shirshin E. A., Parshina E. A., Sluchanko N. N., Klementiev K. E., Tsoraev G. V., Tavraz N. N., Willoweit M., Schmitt F. J., Breitenbach J., Sandmann G., Paschenko V. Z., Friedrich T., Rubin A. B. A comparative study of three signaling forms of the orange carotenoid protein // *Photosynthesis Research*. – 2016. – T. 130, № 1. – C. 389-401.

15. **Maksimov E. G.**, Sluchanko N. N., Mironov K. S., Shirshin E. A., Klementiev K. E., Tsoraev G. V., Moldenhauer M., Friedrich T., Los D. A., Allakhverdiev S. I., Paschenko V. Z., Rubin A. B. Fluorescent Labeling Preserving OCP Photoactivity Reveals Its Reorganization during the Photocycle // *Biophysical Journal*. – 2017. – T. 112, № 1. – C. 46-56.

16. **Maksimov E. G.**, Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Mironov K. S., Klementiev K. E., Moldenhauer M., Friedrich T., Los D. A., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The Unique

Protein-to-Protein Carotenoid Transfer Mechanism // *Biophysical Journal*. – 2017. – T. 113, № 2. – C. 402-414.

17. **Maksimov E. G.**, Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Slutskaya E. A., Stepanov A. V., Argentova-Stevens A. M., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Klementiev K. E., Slatinskaya O. V., Lukashev E. P., Friedrich T., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 15548.

18. Moldenhauer M., Sluchanko N. N., Buhrke D., Zlenko D. V., Tavraz N. N., Schmitt F.-J., Hildebrandt P., **Maksimov E. G.**, Friedrich T. Assembly of photoactive orange carotenoid protein from its domains unravels a carotenoid shuttle mechanism // *Photosynthesis Research*. – 2017. – T. 133, № 1. – C. 327-341.

19. Shirshin E. A., Nikonova E. E., Kuzminov F. I., Sluchanko N. N., Elanskaya I. V., Gorbunov M. Y., Fadeev V. V., Friedrich T., **Maksimov E. G.** Biophysical modeling of in vitro and in vivo processes underlying regulated photoprotective mechanism in cyanobacteria // *Photosynthesis Research*. – 2017. – T. 133, № 1. – C. 261-271.

20. Sluchanko N. N., Klementiev K. E., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Friedrich T., **Maksimov E. G.** The purple Trp288Ala mutant of *Synechocystis* OCP persistently quenches phycobilisome fluorescence and tightly interacts with FRP // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2017. – T. 1858, № 1. – C. 1-11.

21. Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., **Maksimov E. G.** Features of Protein-Protein Interactions in the Cyanobacterial Photoprotection Mechanism // *Biochemistry (Mosc)*. – 2017. – T. 82, № 13. – C. 1592-1614.

22. Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Moldenhauer M., Friedrich T., **Maksimov E. G.** Deletion of the short N-terminal extension in OCP reveals the main site for FRP binding // *FEBS Letters*. – 2017. – T. 591, № 12. – C. 1667-1676.
23. Harris D., Wilson A., Muzzopappa F., Sluchanko N. N., Friedrich T., **Maksimov E. G.**, Kirilovsky D., Adir N. Structural rearrangements in the C-terminal domain homolog of Orange Carotenoid Protein are crucial for carotenoid transfer // *Communications Biology*. – 2018. – T. 1, № 1. – C. 125.
24. Moldenhauer M., Sluchanko N. N., Tavraz N. N., Junghans C., Buhrke D., Willoweit M., Chiappisi L., Schmitt F.-J., Vukojević V., Shirshin E. A., Ponomarev V. Y., Paschenko V. Z., Gradzielski M., **Maksimov E. G.**, Friedrich T. Interaction of the signaling state analog and the apoprotein form of the orange carotenoid protein with the fluorescence recovery protein // *Photosynthesis Research*. – 2018. – T. 135, № 1. – C. 125-139.
25. Slonimskiy Y. B., **Maksimov E. G.**, Lukashev E. P., Moldenhauer M., Jeffries C. M., Svergun D. I., Friedrich T., Sluchanko N. N. Functional interaction of low-homology FRPs from different cyanobacteria with *Synechocystis* OCP // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2018. – T. 1859, № 5. – C. 382-393.
26. Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Shirshin E. A., Moldenhauer M., Friedrich T., **Maksimov E. G.** OCP–FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria // *Nature Communications*. – 2018. – T. 9, № 1. – C. 3869.
27. Golub M., Moldenhauer M., Schmitt F.-J., Feoktystov A., Mändar H., **Maksimov E.**, Friedrich T., Pieper J. Solution Structure and Conformational Flexibility in the Active State of the Orange Carotenoid Protein: Part I. Small-Angle Scattering // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2019. – T. 123, № 45. – C. 9525-9535.

28. Golub M., Moldenhauer M., Schmitt F.-J., Lohstroh W., **Maksimov E. G.**, Friedrich T., Pieper J. Solution Structure and Conformational Flexibility in the Active State of the Orange Carotenoid Protein. Part II: Quasielastic Neutron Scattering // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2019. – T. 123, № 45. – C. 9536-9545.
29. Klementiev K. E., **Maksimov E. G.**, Gvozdev D. A., Tsoraev G. V., Protopopov F. F., Elanskaya I. V., Abramov S. M., Dyakov M. Y., Ilyin V. K., Nikolaeva N. A., Moisenovich M. M., Moisenovich A. M., Slonimskiy Y. B., Sluchanko N. N., Lebedev V. M., Spassky A. V., Friedrich T., Maksimov G. V., Paschenko V. Z., Rubin A. B. Radioprotective role of cyanobacterial phycobilisomes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2019. – T. 1860, № 2. – C. 121-128.
30. **Maksimov E. G.**, Li W.-J., Protasova E. A., Friedrich T., Ge B., Qin S., Sluchanko N. N. Hybrid coupling of R-phycoerythrin and the orange carotenoid protein supports the FRET-based mechanism of cyanobacterial photoprotection // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2019. – T. 516, № 3. – C. 699-704.
31. **Maksimov E. G.**, Yaroshevich I. A., Tsoraev G. V., Sluchanko N. N., Slutskaya E. A., Shamborant O. G., Bobik T. V., Friedrich T., Stepanov A. V. A genetically encoded fluorescent temperature sensor derived from the photoactive Orange Carotenoid Protein // *Scientific Reports*. – 2019. – T. 9, № 1. – C. 8937.
32. Pishchalnikov R. Y., Yaroshevich I. A., Slastnikova T. A., Ashikhmin A. A., Stepanov A. V., Slutskaya E. A., Friedrich T., Sluchanko N. N., **Maksimov E. G.** Structural peculiarities of keto-carotenoids in water-soluble proteins revealed by simulation of linear absorption // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2019. – T. 21, № 46. – C. 25707-25719.

33. Slonimskiy Y. B., Muzzopappa F., **Maksimov E. G.**, Wilson A., Friedrich T., Kirilovsky D., Sluchanko N. N. Light-controlled carotenoid transfer between water-soluble proteins related to cyanobacterial photoprotection // *The FEBS Journal*. – 2019. – T. 286, № 10. – C. 1908-1924.
34. **Maksimov E. G.**, Protasova E. A., Tsoraev G. V., Yaroshevich I. A., Maydykovskiy A. I., Shirshin E. A., Gostev T. S., Jelzow A., Moldenhauer M., Slonimskiy Y. B., Sluchanko N. N., Friedrich T. Probing of carotenoid-tryptophan hydrogen bonding dynamics in the single-tryptophan photoactive Orange Carotenoid Protein // *Scientific Reports*. – 2020. – T. 10, № 1. – C. 11729.
35. **Maksimov E. G.**, Zamaraev A. V., Parshina E. Y., Slonimskiy Y. B., Slastnikova T. A., Abdrakhmanov A. A., Babaev P. A., Efimova S. S., Ostroumova O. S., Stepanov A. V., Slutskaya E. A., Ryabova A. V., Friedrich T., Sluchanko N. N. Soluble Cyanobacterial Carotenoprotein as a Robust Antioxidant Nanocarrier and Delivery Module // *Antioxidants*. – 2020. – T. 9, № 9. – C. 869.
36. Slonimskiy Y. B., **Maksimov E. G.**, Lukashev E. P., Moldenhauer M., Friedrich T., Sluchanko N. N. Engineering the photoactive orange carotenoid protein with redox-controllable structural dynamics and photoprotective function // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2020. – T. 1861, № 5. – C. 148174.
37. Slonimskiy Y. B., **Maksimov E. G.**, Sluchanko N. N. Fluorescence recovery protein: a powerful yet underexplored regulator of photoprotection in cyanobacteria // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2020. – T. 19, № 6. – C. 763-775.
38. **Maksimov E. G.**, Laptev G. Y., Blokhin D. S., Klochkov V. V., Slonimskiy Y. B., Sluchanko N. N., Friedrich T., Chang C.-F., Polshakov V. I. NMR resonance assignment and backbone dynamics of a C-terminal domain homolog of orange carotenoid protein // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2021. – T. 15, № 1. – C. 17-23.

39. Protasova E. A., Antal T. K., Zlenko D. V., Elanskaya I. V., Lukashev E. P., Friedrich T., Mironov K. S., Sluchanko N. N., Ge B., Qin S., **Maksimov E. G.** State of the phycobilisome determines effective absorption cross-section of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2021. – T. 1862, № 12. – C. 148494.

40. Yaroshevich I. A., **Maksimov E. G.**, Sluchanko N. N., Zlenko D. V., Stepanov A. V., Slutskaya E. A., Slonimskiy Y. B., Botnarevskii V. S., Remeeva A., Gushchin I., Kovalev K., Gordeliy V. I., Shelaev I. V., Gostev F. E., Khakhulin D., Poddubnyy V. V., Gostev T. S., Cherepanov D. A., Polívka T., Kloz M., Friedrich T., Paschenko V. Z., Nadtochenko V. A., Rubin A. B., Kirpichnikov M. P. Role of hydrogen bond alternation and charge transfer states in photoactivation of the Orange Carotenoid Protein // *Communications Biology*. – 2021. – T. 4, № 1. – C. 539.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deisseroth K. Optogenetics // *Nature Methods*. – 2011. – Т. 8, № 1. – С. 26-29.
2. Tye K. M., Prakash R., Kim S.-Y., Fenno L. E., Grosenick L., Zarabi H., Thompson K. R., Gradinaru V., Ramakrishnan C., Deisseroth K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety // *Nature*. – 2011. – Т. 471, № 7338. – С. 358-362.
3. Kato H. E., Zhang F., Yizhar O., Ramakrishnan C., Nishizawa T., Hirata K., Ito J., Aita Y., Tsukazaki T., Hayashi S., Hegemann P., Maturana A. D., Ishitani R., Deisseroth K., Nureki O. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel // *Nature*. – 2012. – Т. 482, № 7385. – С. 369-374.
4. Liu X., Ramirez S., Pang P. T., Puryear C. B., Govindarajan A., Deisseroth K., Tonegawa S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall // *Nature*. – 2012. – Т. 484, № 7394. – С. 381-385.
5. Bryson J. B., Machado C. B., Crossley M., Stevenson D., Bros-Facer V., Burrone J., Greensmith L., Lieberam I. Optical control of muscle function by transplantation of stem cell-derived motor neurons in mice // *Science*. – 2014. – Т. 344, № 6179. – С. 94-7.
6. Kravitz A. V., Freeze B. S., Parker P. R. L., Kay K., Thwin M. T., Deisseroth K., Kreitzer A. C. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry // *Nature*. – 2010. – Т. 466, № 7306. – С. 622-626.
7. Govorunova E. G., Sineshchekov O. A., Janz R., Liu X., Spudich J. L. NEUROSCIENCE. Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics // *Science*. – 2015. – Т. 349, № 6248. – С. 647-50.
8. Sineshchekov O. A., Govorunova E. G., Li H., Spudich J. L. Gating mechanisms of a natural anion channelrhodopsin // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2015. – Т. 112, № 46. – С. 14236-41.

9. Ermakova Y. G., Lanin A. A., Fedotov I. V., Roshchin M., Kelmanson I. V., Kulik D., Bogdanova Y. A., Shokhina A. G., Bilan D. S., Staroverov D. B., Balaban P. M., Fedotov A. B., Sidorov-Biryukov D. A., Nikitin E. S., Zheltikov A. M., Belousov V. V. Thermogenetic neurostimulation with single-cell resolution // *Nature Communications*. – 2017. – T. 8, № 1. – C. 15362.

10. Roshchin M., Ermakova Y. G., Lanin A. A., Chebotarev A. S., Kelmanson I. V., Balaban P. M., Zheltikov A. M., Belousov V. V., Nikitin E. S. Thermogenetic stimulation of single neocortical pyramidal neurons transfected with TRPV1-L channels // *Neuroscience Letters*. – 2018. – T. 687. – C. 153-157.

11. Schirrmeister B. E., de Vos J. M., Antonelli A., Bagheri H. C. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – T. 110, № 5. – C. 1791-1796.

12. Schirrmeister B. E., Gugger M., Donoghue P. C. J. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils // *Palaeontology*. – 2015. – T. 58, № 5. – C. 769-785.

13. Paerl H. W. Cyanobacterial carotenoids: their roles in maintaining optimal photosynthetic production among aquatic bloom forming genera // *Oecologia*. – 1984. – T. 61, № 2. – C. 143-149.

14. Pascal A. A., Liu Z., Broess K., van Oort B., van Amerongen H., Wang C., Horton P., Robert B., Chang W., Ruban A. Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting // *Nature*. – 2005. – T. 436, № 7047. – C. 134-137.

15. Kirilovsky D., Kerfeld C. A. The Orange Carotenoid Protein: a blue-green light photoactive protein // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2013. – T. 12, № 7. – C. 1135-1143.

16. Müller P., Li X.-P., Niyogi K. K. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy // *Plant Physiology*. – 2001. – T. 125, № 4. – C. 1558-1566.
17. Holt N. E., Fleming G. R., Niyogi K. K. Toward an Understanding of the Mechanism of Nonphotochemical Quenching in Green Plants // *Biochemistry*. – 2004. – T. 43, № 26. – C. 8281-8289.
18. Karapetyan N. V. Non-photochemical quenching of fluorescence in cyanobacteria // *Biochemistry (Moscow)*. – 2007. – T. 72, № 10. – C. 1127.
19. Rakhimberdieva M. G., Stadnichuk I. N., Elanskaya I. V., Karapetyan N. V. Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem II-deficient mutant of *Synechocystis* sp // *FEBS Letters*. – 2004. – T. 574, № 1-3. – C. 85-88.
20. Kerfeld C. A. Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins of cyanobacteria // *Photosynth Res*. – 2004. – T. 81, № 3. – C. 215-25.
21. Liu T., Shuai Y., Zhou H. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of fluorescence recovery protein from *Synechocystis* PCC 6803 // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. – 2011. – T. 67, № Pt 12. – C. 1627-9.
22. Zhang J., Ma J., Liu D., Qin S., Sun S., Zhao J., Sui S.-F. Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica* // *Nature*. – 2017. – T. 551. – C. 57.
23. Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Maksimov E. G. Features of Protein-Protein Interactions in the Cyanobacterial Photoprotection Mechanism // *Biochemistry (Mosc)*. – 2017. – T. 82, № 13. – C. 1592-1614.
24. Guerrero F., Zurita J. L., Roncel M., Kirilovsky D., Ortega J. M. The role of the high potential form of the cytochrome b559: Study of *Thermosynechococcus elongatus* mutants // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2014. – T. 1837, № 6. – C. 908-919.

25. Herbert S. K., Martin R. E., Fork D. C. Light adaptation of cyclic electron transport through Photosystem I in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 // *Photosynthesis Research*. – 1995. – T. 46, № 1. – С. 277-285.
26. Mullineaux C. W. Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2014. – T. 1837, № 4. – С. 503-511.
27. Mullineaux C. Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria // *Frontiers in Plant Science*. – 2014. – T. 5, № 7.
28. Trubitsin B. V., Ptushenko V. V., Koksharova O. A., Mamedov M. D., Vitukhnovskaya L. A., Grigor'ev I. A., Semenov A. Y., Tikhonov A. N. EPR study of electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Oxygen-dependent interrelations between photosynthetic and respiratory electron transport chains // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2005. – T. 1708, № 2. – С. 238-249.
29. Ardelean I. I., Peschek G. A. The Site of Respiratory Electron Transport in Cyanobacteria and Its Implication for the Photoinhibition of Respiration // *Bioenergetic Processes of Cyanobacteria: From Evolutionary Singularity to Ecological Diversity* / Peschek G. A. и др. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. – С. 131-136.
30. Allakhverdiev S. I., Kinoshita M., Inaba M., Suzuki I., Murata N. Unsaturated Fatty Acids in Membrane Lipids Protect the Photosynthetic Machinery against Salt-Induced Damage in *Synechococcus* 1 // *Plant Physiology*. – 2001. – T. 125, № 4. – С. 1842-1853.
31. Mironov K. S., Sidorov R. A., Trofimova M. S., Bedbenov V. S., Tsydendambaev V. D., Allakhverdiev S. I., Los D. A. Light-dependent cold-induced fatty acid unsaturation, changes in membrane fluidity, and alterations in gene expression in *Synechocystis* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2012. – T. 1817, № 8. – С. 1352-1359.

32. Maksimov E. G., Mironov K. S., Trofimova M. S., Nechaeva N. L., Todorenko D. A., Klementiev K. E., Tsoraev G. V., Tyutyayev E. V., Zorina A. A., Feduraev P. V., Allakhverdiev S. I., Paschenko V. Z., Los D. A. Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria // *Photosynthesis Research*. – 2017. – T. 133, № 1. – C. 215-223.

33. He J.-A., Hu Y.-Z., Jiang L.-J. Photodynamic action of phycobiliproteins: in situ generation of reactive oxygen species // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 1997. – T. 1320, № 2. – C. 165-174.

34. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2011. – T. 104, № 1. – C. 236-257.

35. Mullineaux C. W., Allen J. F. Fluorescence induction transients indicate dissociation of Photosystem II from the phycobilisome during the State-2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 1988. – T. 934, № 1. – C. 96-107.

36. Mullineaux C. W., Emllyn-Jones D. State transitions: an example of acclimation to low-light stress // *Journal of Experimental Botany*. – 2004. – T. 56, № 411. – C. 389-393.

37. Kirilovsky D. Modulating energy arriving at photochemical reaction centers: orange carotenoid protein-related photoprotection and state transitions // *Photosynthesis Research*. – 2015. – T. 126, № 1. – C. 3-17.

38. Liu H., Zhang H., Niedzwiedzki D. M., Prado M., He G., Gross M. L., Blankenship R. E. Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria // *Science*. – 2013. – T. 342, № 6162. – C. 1104-1107.

39. de Marsac N. T., Cohen-bazire G. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1977. – T. 74, № 4. – C. 1635-1639.
40. Gantt E. Phycobilisomes // *Annual Review of Plant Physiology*. – 1981. – T. 32, № 1. – C. 327-347.
41. Glazer A. N. Light Harvesting by Phycobilisomes // *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. – 1985. – T. 14, № 1. – C. 47-77.
42. Samsonoff W. A., MacColl R. Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat // *Archives of Microbiology*. – 2001. – T. 176, № 6. – C. 400-405.
43. Liu L.-N., Chen X.-L., Zhang Y.-Z., Zhou B.-C. Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: An overview // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2005. – T. 1708, № 2. – C. 133-142.
44. Bryant D. A., Guglielmi G., de Marsac N. T., Castets A.-M., Cohen-Bazire G. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model // *Archives of Microbiology*. – 1979. – T. 123, № 2. – C. 113-127.
45. Mimuro M., Gantt E. A high molecular weight terminal pigment (“anchor polypeptide”) and a minor blue polypeptide from phycobilisomes of the cyanobacterium *Nostoc* sp. (MAC): Isolation and characterization // *Photosynthesis Research*. – 1986. – T. 10, № 3. – C. 201-208.
46. Maksimov E. G., Kuzminov F. I., Konyuhov I. V., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2011. – T. 104, № 1. – C. 285-291.

47. Adir N. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant // *Photosynthesis Research*. – 2005. – T. 85, № 1. – C. 15-32.

48. Betz M. One century of protein crystallography: the phycobiliproteins // *Biological chemistry*. – 1997. – T. 378, № 3-4. – C. 167-176.

49. McGregor A., Klartag M., David L., Adir N. Allophycocyanin Trimer Stability and Functionality Are Primarily Due to Polar Enhanced Hydrophobicity of the Phycocyanobilin Binding Pocket // *Journal of Molecular Biology*. – 2008. – T. 384, № 2. – C. 406-421.

50. Sonani R. R., Gupta G. D., Madamwar D., Kumar V. Crystal Structure of Allophycocyanin from Marine Cyanobacterium *Phormidium* sp. A09DM // *PLOS ONE*. – 2015. – T. 10, № 4. – C. e0124580.

51. Zuber H. Structure of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1986. – T. 11, № 10. – C. 414-419.

52. MacColl R. Cyanobacterial Phycobilisomes // *Journal of Structural Biology*. – 1998. – T. 124, № 2. – C. 311-334.

53. Maksimov E. G., Gostev T. S., Kuz'minov F. I., Sluchanko N. N., Stadnichuk I. N., Pashchenko V. Z., Rubin A. B. Hybrid systems of quantum dots mixed with the photosensitive protein phycoerythrin // *Nanotechnologies in Russia*. – 2010. – T. 5, № 7. – C. 531-537.

54. Karpulevich A. A., Maksimov E. G., Sluchanko N. N., Vasiliev A. N., Paschenko V. Z. Highly efficient energy transfer from quantum dot to allophycocyanin in hybrid structures // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2016. – T. 160. – C. 96-101.

55. Holzwarth A. R. Structure-function relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae // *Physiologia Plantarum*. – 1991. – T. 83, № 3. – C. 518-528.

56. MacColl R. Allophycocyanin and energy transfer // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2004. – T. 1657, № 2. – C. 73-81.

57. Schmitt F. J., Maksimov E. G., Suedmeyer H., Jeyasangar V., Theiss C., Paschenko V. Z., Eichler H. J., Renger G. Time resolved temperature switchable excitation energy transfer processes between CdSe/ZnS nanocrystals and phycobiliprotein antenna from *Acaryochloris marina* // *Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications*. – 2011. – T. 9, № 2. – C. 190-195.

58. Maksimov E. G., Tsoraev G. V., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The nature of anomalous temperature dependence of the fluorescence lifetime of allophycocyanin // *Dokl Biochem Biophys*. – 2012. – T. 443. – C. 86-90.

59. Maksimov E. G., Schmitt F. J., Hätti P., Klementiev K. E., Paschenko V. Z., Renger G., Rubin A. B. Anomalous temperature dependence of the fluorescence lifetime of phycobiliproteins // *Laser Physics Letters*. – 2013. – T. 10, № 5. – C. 055602.

60. Mao H.-B., Li G.-F., Li D.-H., Wu Q.-Y., Gong Y.-D., Zhang X.-F., Zhao N.-M. Effects of glycerol and high temperatures on structure and function of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *FEBS Letters*. – 2003. – T. 553, № 1-2. – C. 68-72.

61. Maksimov E. G., Kuzminov F. I., Konyuhov I. V., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants // *J Photochem Photobiol B*. – 2011. – T. 104, № 1-2. – C. 285-91.

62. Ajlani G., Vernotte C. Construction and characterization of a phycobiliprotein-less mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Plant Molecular Biology*. – 1998. – T. 37, № 3. – C. 577-580.

63. Manodori A., Melis A. Cyanobacterial Acclimation to Photosystem I or Photosystem II Light // *Plant Physiology*. – 1986. – T. 82, № 1. – C. 185-189.
64. El Bissati K., Delphin E., Murata N., Etienne A. L., Kirilovsky D. Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2000. – T. 1457, № 3. – C. 229-242.
65. Rakhimberdieva M. G., Stadnichuk I. N., Elanskaya I. V., Karapetyan N. V. Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem II-deficient mutant of *Synechocystis* sp // *FEBS Lett*. – 2004. – T. 574, № 1-3. – C. 85-8.
66. Rakhimberdieva M. G., Bolychevtseva Y. V., Elanskaya I. V., Karapetyan N. V. Protein-protein interactions in carotenoid triggered quenching of phycobilisome fluorescence in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *FEBS Lett*. – 2007. – T. 581, № 13. – C. 2429-33.
67. Wilson A., Ajlani G., Verbavatz J.-M., Vass I., Kerfeld C. A., Kirilovsky D. A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related Energy Dissipation in Cyanobacteria // *The Plant Cell*. – 2006. – T. 18, № 4. – C. 992-1007.
68. Wilson A., Punginelli C., Gall A., Bonetti C., Alexandre M., Routaboul J.-M., Kerfeld C. A., van Grondelle R., Robert B., Kennis J. T. M., Kirilovsky D. A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – T. 105, № 33. – C. 12075-12080.
69. Punginelli C., Wilson A., Routaboul J. M., Kirilovsky D. Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the orange carotenoid protein // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – T. 1787, № 4. – C. 280-8.
70. Wilson A., Kinney J. N., Zwart P. H., Punginelli C., D'Haene S., Perreau F., Klein M. G., Kirilovsky D., Kerfeld C. A. Structural determinants underlying

photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria // *J Biol Chem.* – 2010. – T. 285, № 24. – C. 18364-75.

71. Rakhimberdieva M. G., Vavilin D. V., Vermaas W. F., Elanskaya I. V., Karapetyan N. V. Phycobilin/chlorophyll excitation equilibration upon carotenoid-induced non-photochemical fluorescence quenching in phycobilisomes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – T. 1767, № 6. – C. 757-65.

72. Gorbunov M. Y., Kuzminov F. I., Fadeev V. V., Kim J. D., Falkowski P. G. A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – T. 1807, № 12. – C. 1591-9.

73. Berera R., van Stokkum I. H., Gwizdala M., Wilson A., Kirilovsky D., van Grondelle R. The photophysics of the orange carotenoid protein, a light-powered molecular switch // *J Phys Chem B.* – 2012. – T. 116, № 8. – C. 2568-74.

74. Tian L., Gwizdala M., van Stokkum I. H., Koehorst R. B., Kirilovsky D., van Amerongen H. Picosecond kinetics of light harvesting and photoprotective quenching in wild-type and mutant phycobilisomes isolated from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 // *Biophys J.* – 2012. – T. 102, № 7. – C. 1692-700.

75. Maksimov E. G., Schmitt F. J., Shirshin E. A., Svirin M. D., Elanskaya I. V., Friedrich T., Fadeev V. V., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The time course of non-photochemical quenching in phycobilisomes of *Synechocystis* sp. PCC6803 as revealed by picosecond time-resolved fluorimetry // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – T. 1837, № 9. – C. 1540-7.

76. Krasilnikov P. M., Zlenko D. V., Stadnichuk I. N. Efficiency of non-Photochemical Fluorescence Quenching of Phycobilisomes by the Orange Carotenoid Protein // *Biofizika.* – 2015. – T. 60, № 5. – C. 914-21.

77. Maksimov E. G., Klementiev K. E., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Features of temporal behavior of fluorescence recovery in *Synechocystis* sp. PCC6803 // *Photosynth Res.* – 2015. – T. 125, № 1-2. – C. 167-78.

78. Polívka T., Kerfeld C. A., Pascher T., Sundström V. Spectroscopic Properties of the Carotenoid 3'-Hydroxyechinenone in the Orange Carotenoid Protein from the Cyanobacterium *Arthrospira maxima* // *Biochemistry.* – 2005. – T. 44, № 10. – C. 3994-4003.

79. Chabera P., Durchan M., Shih P. M., Kerfeld C. A., Polivka T. Excited-state properties of the 16kDa red carotenoid protein from *Arthrospira maxima* // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – T. 1807, № 1. – C. 30-5.

80. Slouf V., Kuznetsova V., Fuciman M., de Carbon C. B., Wilson A., Kirilovsky D., Polivka T. Ultrafast spectroscopy tracks carotenoid configurations in the orange and red carotenoid proteins from cyanobacteria // *Photosynth Res.* – 2017. – T. 131, № 1. – C. 105-117.

81. Polívka T., Chábera P., Kerfeld C. A. Carotenoid–protein interaction alters the S1 energy of hydroxyechinenone in the Orange Carotenoid Protein // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* – 2013. – T. 1827, № 3. – C. 248-254.

82. Zlenko D. V., Krasilnikov P. M., Stadnichuk I. N. Role of inter-domain cavity in the attachment of the orange carotenoid protein to the phycobilisome core and to the fluorescence recovery protein // *J Biomol Struct Dyn.* – 2016. – T. 34, № 3. – C. 486-96.

83. Liu H., Zhang H., King j D., Wolf N. R., Prado M., Gross M. L., Blankenship R. E. Mass spectrometry footprinting reveals the structural rearrangements of cyanobacterial orange carotenoid protein upon light activation // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – T. 1837, № 12. – C. 1955-63.

84. Harris D., Tal O., Jallet D., Wilson A., Kirilovsky D., Adir N. Orange carotenoid protein burrows into the phycobilisome to provide photoprotection // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. – T. 113, № 12. – C. E1655-62.

85. Zhang H., Liu H., Niedzwiedzki D. M., Prado M., Jiang J., Gross M. L., Blankenship R. E. Molecular mechanism of photoactivation and structural location of the cyanobacterial orange carotenoid protein // *Biochemistry.* – 2014. – T. 53, № 1. – C. 13-9.

86. Wilson A., Punginelli C., Couturier M., Perreau F., Kirilovsky D. Essential role of two tyrosines and two tryptophans on the photoprotection activity of the Orange Carotenoid Protein // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – T. 1807, № 3. – C. 293-301.

87. Kay Holt T., Krogmann D. W. A carotenoid-protein from cyanobacteria // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* – 1981. – T. 637, № 3. – C. 408-414.

88. Leverenz R. L., Jallet D., Li M. D., Mathies R. A., Kirilovsky D., Kerfeld C. A. Structural and functional modularity of the orange carotenoid protein: distinct roles for the N- and C-terminal domains in cyanobacterial photoprotection // *Plant Cell.* – 2014. – T. 26, № 1. – C. 426-37.

89. Gwizdala M., Wilson A., Kirilovsky D. In vitro reconstitution of the cyanobacterial photoprotective mechanism mediated by the Orange Carotenoid Protein in *Synechocystis* PCC 6803 // *Plant Cell.* – 2011. – T. 23, № 7. – C. 2631-43.

90. Wilson A., Gwizdala M., Mezzetti A., Alexandre M., Kerfeld C. A., Kirilovsky D. The essential role of the N-terminal domain of the orange carotenoid protein in cyanobacterial photoprotection: importance of a positive charge for phycobilisome binding // *Plant Cell.* – 2012. – T. 24, № 5. – C. 1972-83.

91. Bao H., Melnicki M. R., Pawlowski E. G., Sutter M., Agostoni M., Lechno-Yossef S., Cai F., Montgomery B. L., Kerfeld C. A. Additional families of orange

carotenoid proteins in the photoprotective system of cyanobacteria // *Nat Plants*. – 2017. – T. 3. – C. 17089.

92. Maksimov E. G., Shirshin E. A., Sluchanko N. N., Zlenko D. V., Parshina E. Y., Tsoraev G. V., Klementiev K. E., Budylin G. S., Schmitt F. J., Friedrich T., Fadeev V. V., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The Signaling State of Orange Carotenoid Protein // *Biophys J*. – 2015. – T. 109, № 3. – C. 595-607.

93. Kerfeld C. A., Sawaya M. R., Brahmamdam V., Cascio D., Ho K. K., Trevithick-Sutton C. C., Krogmann D. W., Yeates T. O. The Crystal Structure of a Cyanobacterial Water-Soluble Carotenoid Binding Protein // *Structure*. – 2003. – T. 11, № 1. – C. 55-65.

94. Kirilovsky D. The photoactive orange carotenoid protein and photoprotection in cyanobacteria // *Adv Exp Med Biol*. – 2010. – T. 675. – C. 139-59.

95. Kirilovsky D., Kerfeld C. A. The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – T. 1817, № 1. – C. 158-66.

96. Stadnichuk I. N., Krasilnikov P. M., Zlenko D. V., Freidzon A. Y., Yanyushin M. F., Rubin A. B. Electronic coupling of the phycobilisome with the orange carotenoid protein and fluorescence quenching // *Photosynth Res*. – 2015. – T. 124, № 3. – C. 315-35.

97. Gupta S., Guttman M., Leverenz R. L., Zhumadilova K., Pawlowski E. G., Petzold C. J., Lee K. K., Ralston C. Y., Kerfeld C. A. Local and global structural drivers for the photoactivation of the orange carotenoid protein // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2015. – T. 112, № 41. – C. E5567-74.

98. Shakhnovich E. I., Finkelstein A. V. Theory of cooperative transitions in protein molecules. I. Why denaturation of globular protein is a first-order phase transition // *Biopolymers*. – 1989. – T. 28, № 10. – C. 1667-1680.

99. G. V. SEMISOTNOV N. A. R., . RAZCULYAEV, V. N. UVERSKY,, A. F. CRIPAS a. R. C. Study of the “Molten Globule” Intermediate State in Protein

Folding by a Hydrophobic Fluorescent Probe // . – 1991.

100. Frauenfelder H., Fenimore P. W., Chen G., McMahon B. H. Protein folding is slaved to solvent motions // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – T. 103, № 42. – C. 15469-15472.

101. J. Hagen S. Solvent Viscosity and Friction in Protein Folding Dynamics // Current Protein and Peptide Science. – 2010. – T. 11, № 5. – C. 385-395.

102. Maksimov E. G., Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Stepanov A. V., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Klementiev K. E., Slatinskaya O. V., Lukashev E. P., Friedrich T., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components // bioRxiv. – 2017.10.1101/167478.

103. Maksimov E. G., Moldenhauer M., Shirshin E. A., Parshina E. A., Sluchanko N. N., Klementiev K. E., Tsoraev G. V., Tavraz N. N., Willoweit M., Schmitt F.-J., Breitenbach J., Sandmann G., Paschenko V. Z., Friedrich T., Rubin A. B. A comparative study of three signaling forms of the orange carotenoid protein // Photosynthesis Research. – 2016. – T. 130, № 1. – C. 389-401.

104. Sluchanko N. N., Klementiev K. E., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Friedrich T., Maksimov E. G. The purple Trp288Ala mutant of Synechocystis OCP persistently quenches phycobilisome fluorescence and tightly interacts with FRP // Biochim Biophys Acta. – 2017. – T. 1858, № 1. – C. 1-11.

105. Leverenz R. L., Sutter M., Wilson A., Gupta S., Thurotte A., de Carbon C. B., Petzold C. J., Ralston C., Perreau F., Kirilovsky D. A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection // Science. – 2015. – T. 348, № 6242. – C. 3.

106. Maksimov E. G., Sluchanko N. N., Mironov K. S., Shirshin E. A., Klementiev K. E., Tsoraev G. V., Moldenhauer M., Friedrich T., Los D. A., Allakhverdiev S. I., Paschenko V. Z., Rubin A. B. Fluorescent Labeling Preserving OCP Photoactivity Reveals Its Reorganization during the Photocycle // *Biophysical Journal*. – 2017. – T. 112, № 1. – C. 46-56.
107. Kish E., Pinto M. M., Kirilovsky D., Spezia R., Robert B. Echinenone vibrational properties: From solvents to the orange carotenoid protein // *Biochim Biophys Acta*. – 2015. – T. 1847, № 10. – C. 1044-54.
108. Bandara S., Ren Z., Lu L., Zeng X., Shin H., Zhao K.-H., Yang X. Photoactivation mechanism of a carotenoid-based photoreceptor // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017.10.1073/pnas.1700956114.
109. Maksimov E. G., Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Mironov K. S., Klementiev K. E., Moldenhauer M., Friedrich T., Los D. A., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The unique protein-to-protein carotenoid transfer mechanism // *Biophysical Journal*. – 2017.10.1016/j.bpj.2017.06.002. – C. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.06.002.
110. Boulay C., Wilson A., D'Haene S., Kirilovsky D. Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – T. 107, № 25. – C. 11620-11625.
111. Gwizdala M., Wilson A., Omairi-Nasser A., Kirilovsky D. Characterization of the *Synechocystis* PCC 6803 Fluorescence Recovery Protein involved in photoprotection // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – T. 1827, № 3. – C. 348-54.
112. Shirshin E. A., Nikonova E. E., Kuzminov F. I., Sluchanko N. N., Elanskaya I. V., Gorbunov M. Y., Fadeev V. V., Friedrich T., Maksimov E. G. Biophysical modeling of in vitro and in vivo processes underlying regulated photoprotective mechanism in cyanobacteria // *Photosynthesis Research*. – 2017. – T. 133(1-3). – C. 261-271.

113. Sutter M., Wilson A., Leverenz R. L., Lopez-Igual R., Thurotte A., Salmeen A. E., Kirilovsky D., Kerfeld C. A. Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – T. 110, № 24. – C. 10022-10027.
114. Dagnino-Leone J., Figueroa M., Mella C., Vorphal M. A., Kerff F., Vásquez A. J., Bunster M., Martínez-Oyanedel J. Structural models of the different trimers present in the core of phycobilisomes from *Gracilaria chilensis* based on crystal structures and sequences // PLOS ONE. – 2017. – T. 12, № 5. – C. e0177540.
115. Gantt E., Lipschultz C. A. PHYCOBILISOMES OF *PORPHYRIDIUM CRUENTUM* // I. Isolation. – 1972. – T. 54, № 2. – C. 313-324.
116. Zhang H., Liu H., Lu Y., Wolf N. R., Gross M. L., Blankenship R. E. Native Mass Spectrometry and Ion Mobility Characterize the Orange Carotenoid Protein Functional Domains // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.015>.
117. Thurotte A., Lopez-Igual R., Wilson A., Comolet L., Bourcier de Carbon C., Xiao F., Kirilovsky D. Regulation of Orange Carotenoid Protein Activity in Cyanobacterial Photoprotection // Plant Physiol. – 2015. – T. 169, № 1. – C. 737-47.
118. Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., Zharmukhamedov S. K., Maksimov E. G., Muronets E. M., Pashchenko V. Z. Quenching of phycobilisome fluorescence by orange carotenoid protein // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2011. – T. 439, № 1. – C. 167-170.
119. Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., Maksimov E. G., Lukashev E. P., Zharmukhamedov S. K., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. – 2012. – T. 1817, № 8. – C. 1436-1445.

120. Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., Bernát G., Zlenko D. V., Krasilnikov P. M., Lukashev E. P., Maksimov E. G., Paschenko V. Z. Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 detected in vivo and in vitro // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2013. – T. 125. – C. 137-145.

121. Gao X., Wei T.-D., Zhang N., Xie B.-B., Su H.-N., Zhang X.-Y., Chen X.-L., Zhou B.-C., Wang Z.-X., Wu J.-W., Zhang Y.-Z. Molecular insights into the terminal energy acceptor in cyanobacterial phycobilisome // *Molecular Microbiology*. – 2012. – T. 85, № 5. – C. 907-915.

122. Tang K., Ding W.-L., Höppner A., Zhao C., Zhang L., Hontani Y., Kennis J. T. M., Gärtner W., Scheer H., Zhou M., Zhao K.-H. The terminal phycobilisome emitter, LCM: A light-harvesting pigment with a phytochrome chromophore // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – T. 112, № 52. – C. 15880-15885.

123. Houmard J., Capuano V., Colombano M. V., Coursin T., Tandeau de Marsac N. Molecular characterization of the terminal energy acceptor of cyanobacterial phycobilisomes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1990. – T. 87, № 6. – C. 2152-2156.

124. Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., Maksimov E. G., Lukashev E. P., Zharmukhamedov S. K., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – T. 1817, № 8. – C. 1436-45.

125. Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., Bernat G., Zlenko D. V., Krasilnikov P. M., Lukashev E. P., Maksimov E. G., Paschenko V. Z. Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 detected in vivo and in vitro // *J Photochem Photobiol B*. – 2013. – T. 125. – C. 137-45.

126. Elanskaya I. V., Kononova I. A., Lukashev E. P., Bolychevtseva Y. V., Yanushin M. F., Stadnichuk I. N. Functions of chromophore-containing domain in the large linker LCM- polypeptide of phycobilisome // *Dokl Biochem Biophys.* – 2016. – T. 471, № 1. – C. 403-406.
127. Gambetta G. A., Lagarias J. C. Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – T. 98, № 19. – C. 10566-71.
128. Miao D., Ding W. L., Zhao B. Q., Lu L., Xu Q. Z., Scheer H., Zhao K. H. Adapting photosynthesis to the near-infrared: non-covalent binding of phycocyanobilin provides an extreme spectral red-shift to phycobilisome core-membrane linker from *Synechococcus* sp. PCC7335 // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – T. 1857, № 6. – C. 688-94.
129. Ma Q., Zhou N., Zhou M. Energy transfer between fusion biliproteins co-expressed with phycobiliprotein in *Escherichia coli* // *Protein Expr Purif.* – 2016. – T. 126. – C. 84-88.
130. Wu Y. P., Krogmann D. W. The orange carotenoid protein of *Synechocystis* PCC 6803 // *Biochim Biophys Acta.* – 1997. – T. 1322, № 1. – C. 1-7.
131. Thurotte A., Bourcier de Carbon C., Wilson A., Talbot L., Cot S., Lopez-Igual R., Kirilovsky D. The cyanobacterial Fluorescence Recovery Protein has two distinct activities: Orange Carotenoid Protein amino acids involved in FRP interaction // *Biochim Biophys Acta.* – 2017. – T. 1858, № 4. – C. 308-317.
132. Lu Y., Liu H., Saer R., Li V. L., Zhang H., Shi L., Goodson C., Gross M. L., Blankenship R. E. A Molecular Mechanism for Nonphotochemical Quenching in Cyanobacteria // *Biochemistry.* – 2017. – T. 56(22). – C. 2812-2823.
133. Liu H., Zhang H., Orf G. S., Lu Y., Jiang J., King J. D., Wolf N. R., Gross M. L., Blankenship R. E. Dramatic Domain Rearrangements of the Cyanobacterial Orange

Carotenoid Protein upon Photoactivation // *Biochemistry*. – 2016. – T. 55, № 7. – C. 1003-1009.

134. Watanabe M., Ikeuchi M. Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex // *Photosynth Res.* – 2013. – T. 116, № 2-3. – C. 265-76.

135. Arteni A. A., Ajlani G., Boekema E. J. Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2009. – T. 1787, № 4. – C. 272-279.

136. Zhao K.-H., Su P., Tu J.-M., Wang X., Liu H., Plösch M., Eichacker L., Yang B., Zhou M., Scheer H. Phycobilin:cystein-84 biliprotein lyase, a near-universal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – T. 104, № 36. – C. 14300-14305.

137. Zhao K.-H., Su P., Böhm S., Song B., Zhou M., Bubenzer C., Scheer H. Reconstitution of phycobilisome core–membrane linker, LCM, by autocatalytic chromophore binding to ApcE // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2005. – T. 1706, № 1. – C. 81-87.

138. Rippka R., Waterbury J., Cohen-Bazire G. A cyanobacterium which lacks thylakoids // *Archives of Microbiology*. – 1974. – T. 100, № 1. – C. 419-436.

139. Guglielmi G., Cohen-Bazire G., Bryant D. A. The structure of *Gloeobacter violaceus* and its phycobilisomes // *Archives of Microbiology*. – 1981. – T. 129, № 3. – C. 181-189.

140. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – T. 227, № 5259. – C. 680-685.

141. Gottschalk L., Lottspeich F., Scheer H. RECONSTITUTION OF ALLOPHYCOCYANIN FROM *Mastigocladus laminosus* WITH ISOLATED LINKER

POLYPEPTIDE // Photochemistry and Photobiology. – 1993. – T. 58, № 5. – C. 761-767.

142. Elanskaya I. V., Zlenko D. V., Lukashev E. P., Suzina N. E., Kononova I. A., Stadnichuk I. N. Phycobilisomes from the mutant cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 missing chromophore domain of ApcE // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2018. – T. 1859, № 4. – C. 280-291.

143. Maksimov E. G., Moldenhauer M., Shirshin E. A., Parshina E. A., Sluchanko N. N., Klementiev K. E., Tsoraev G. V., Tavraz N. N., Willoweit M., Schmitt F. J., Breitenbach J., Sandmann G., Paschenko V. Z., Friedrich T., Rubin A. B. A comparative study of three signaling forms of the orange carotenoid protein // *Photosynth Res*. – 2016. – T. 130, № 1-3. – C. 389-401.

144. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs // *PLOS ONE*. – 2011. – T. 6, № 2. – C. e16765.

145. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability // *PLOS ONE*. – 2008. – T. 3, № 11. – C. e3647.

146. Sadowsky J. D., Burlingame M. A., Wolan D. W., McClendon C. L., Jacobson M. P., Wells J. A. Turning a protein kinase on or off from a single allosteric site via disulfide trapping // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – T. 108, № 15. – C. 6056-6061.

147. Maksimov E. G., Zamaraev A. V., Parshina E. Y., Slonimskiy Y. B., Slastnikova T. A., Abdrakhmanov A. A., Babaev P. A., Efimova S. S., Ostroumova O. S., Stepanov A. V., Slutsкая E. A., Ryabova A. V., Friedrich T., Sluchanko N. N. Soluble Cyanobacterial Carotenoprotein as a Robust Antioxidant Nanocarrier and Delivery Module // *Antioxidants*. – 2020. – T. 9, № 9. – C. 869.

148. Principles of fluorescence spectroscopy. / Lakowicz J. R.: Springer Science & Business Media, 2013.

149. Berera R., van Grondelle R., Kennis J. T. M. Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems // Photosynthesis Research. – 2009. – T. 101, № 2. – С. 105-118.

150. Introduction to Spectroscopy. / Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., Vyvyan J. A.: Cengage Learning, 2014.

151. Mamedov M., Govindjee, Nadtochenko V., Semenov A. Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms // Photosynthesis Research. – 2015. – T. 125, № 1. – С. 51-63.

152. Mirkovic T., Ostroumov E. E., Anna J. M., van Grondelle R., Govindjee, Scholes G. D. Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms // Chem Rev. – 2017. – T. 117, № 2. – С. 249-293.

153. Stirbet A., Lazár D., Papageorgiou G. C., Govindjee. Chapter 5 - Chlorophyll a Fluorescence in Cyanobacteria: Relation to Photosynthesis☆ // Cyanobacteria / Mishra A. K. и др. Academic Press, 2019. – С. 79-130.

154. Kana R., Prasil O., Komarek O., Papageorgiou G. C., Govindjee. Spectral characteristic of fluorescence induction in a model cyanobacterium, *Synechococcus* sp. (PCC 7942) // Biochim Biophys Acta. – 2009. – T. 1787, № 10. – С. 1170-8.

155. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient // J Photochem Photobiol B. – 2011. – T. 104, № 1-2. – С. 236-57.

156. Stirbet A., Govindjee. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise // Photosynth Res. – 2012. – T. 113, № 1-3. – С. 15-61.

157. Maksimov E. G., Kuzminov F. I., Konyuhov I. V., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2011. – T. 104, № 1-2. – C. 285-291.

158. Janssen L. H. J., Wams H. E., van Hasselt P. R. Temperature Dependence of Chlorophyll Fluorescence Induction and Photosynthesis in Tomato as Affected by Temperature and Light Conditions During Growth // *Journal of Plant Physiology*. – 1992. – T. 139, № 5. – C. 549-554.

159. Georgieva K., Yordanov I. Temperature Dependence of Chlorophyll Fluorescence Parameters of Pea Seedlings // *Journal of Plant Physiology*. – 1993. – T. 142, № 2. – C. 151-155.

160. Rai M. K., Shende S., Strasser R. J. JIP test for fast fluorescence transients as a rapid and sensitive technique in assessing the effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in *Zea mays*: Analysis of chlorophyll a fluorescence // *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. – 2008. – T. 142, № 2. – C. 191-198.

161. Antal T. K., Matorin D. N., Ilyash L. V., Volgusheva A. A., Osipov V., Konyuhov I. V., Krendeleva T. E., Rubin A. B. Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer // *Photosynthesis Research*. – 2009. – T. 102, № 1. – C. 67-76.

162. Gorbunov M. Y., Falkowski P. G. Using chlorophyll fluorescence kinetics to determine photosynthesis in aquatic ecosystems // *Limnology and Oceanography*. – 2021. – T. 66, № 1. – C. 1-13.

163. Kolber Z., Falkowski P. G. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ // *Limnology and Oceanography*. – 1993. – T. 38, № 8. – C. 1646-1665.

164. Kolber Z. S., Prášil O., Falkowski P. G. Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 1998. – T. 1367, № 1. – C. 88-106.

165. Koyama Y., Long R. A., Martin W. G., Carey P. R. The resonance Raman spectrum of carotenoids as an intrinsic probe for membrane potential. Oscillatory changes in the spectrum of neurosporene in the chromatophores of *Rhodospseudomonas sphaeroides* // *Biochim Biophys Acta*. – 1979. – T. 548, № 1. – C. 153-60.

166. Weesie R. J., Merlin J. C., Lugtenburg J., Britton G., Jansen F. J., Cornard J. P. Semiempirical and Raman spectroscopic studies of carotenoids // *Biospectroscopy*. – 1999. – T. 5, № 1. – C. 19-33.

167. Tomar V. Raman Spectroscopy of Algae: A Review // *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. – 2012. – T. 03, № 02.

168. GaufresE, Tang N. Y. W., LapointeF, CabanaJ, Nadon M. A., CottenyeN, RaymondF, SzkopekT, MartelR. Giant Raman scattering from J-aggregated dyes inside carbon nanotubes for multispectral imaging // *Nat Photon*. – 2014. – T. 8, № 1. – C. 72-78.

169. Wei-Long Liu Z.-G. W., Zhi-Ren Zheng, Ai-Hua Li, and Wen-Hui Su,. Effect of β -Ring Rotation on the Structures and Vibrational Spectra of β -Carotene: Density Functional Theory Analysis // *J. Phys. Chem. A*. – 2008. – T. 112,. – C. 10580–10585.

170. Lin Y.-S., Li G.-D., Mao S.-P., Chai J.-D. Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Improved Dispersion Corrections // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2013. – T. 9, № 1. – C. 263-272.

171. Circular Dichroism and Linear Dichroism. / Rodger A., Nordén B., Rodger U. L. D. C. A., Nordén P. P. C. D. P. C. B.: Oxford University Press, 1997.

172. Chittur K. K. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces // *Biomaterials*. – 1998. – T. 19, № 4. – C. 357-369.

173. Brunner-Popela J., Glatter O. Small-Angle Scattering of Interacting Particles. I. Basic Principles of a Global Evaluation Technique // *Journal of Applied Crystallography*. – 1997. – T. 30, № 4. – C. 431-442.

174. Jenkins P. J., Donald A. M. Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study // *Carbohydrate Research*. – 1998. – T. 308, № 1. – C. 133-147.

175. Semenyuk A. V., Svergun D. I. GNOM - a program package for small-angle scattering data processing // *Journal of Applied Crystallography*. – 1991. – T. 24, № 5. – C. 537-540.

176. Franke D., Petoukhov M. V., Konarev P. V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H. D. T., Kikhney A. G., Hajizadeh N. R., Franklin J. M., Jeffries C. M., Svergun D. I. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions // *Journal of Applied Crystallography*. – 2017. – T. 50, № 4. – C. 1212-1225.

177. Petoukhov M. V., Franke D., Shkumatov A. V., Tria G., Kikhney A. G., Gajda M., Gorba C., Mertens H. D. T., Konarev P. V., Svergun D. I. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis // *Journal of Applied Crystallography*. – 2012. – T. 45, № Pt 2. – C. 342-350.

178. Franke D., Svergun D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering // *Journal of Applied Crystallography*. – 2009. – T. 42, № Pt 2. – C. 342-346.

179. Vagin A., Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP // *Acta Crystallographica Section D*. – 2010. – T. 66, № 1. – C. 22-25.

180. Murshudov G. N., Skubák P., Lebedev A. A., Pannu N. S., Steiner R. A., Nicholls R. A., Winn M. D., Long F., Vagin A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. – 2011. – T. 67, № Pt 4. – C. 355-367.

181. Shen Y., Delaglio F., Cornilescu G., Bax A. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2009. – T. 44, № 4. – C. 213-223.

182. Gutmanas A., Jarvoll P., Orekhov V. Y., Billeter M. Three-way decomposition of a complete 3D 15N-NOESY-HSQC // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2002. – T. 24, № 3. – C. 191-201.

183. Hong P., Koza S., Bouvier E. S. P. A REVIEW SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY FOR THE ANALYSIS OF PROTEIN BIOTHERAPEUTICS AND THEIR AGGREGATES // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2012. – T. 35, № 20. – C. 2923-2950.

184. Becke A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior // *Physical Review A*. – 1988. – T. 38, № 6. – C. 3098-3100.

185. Adamo C., Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model // *The Journal of Chemical Physics*. – 1999. – T. 110, № 13. – C. 6158-6170.

186. Casanova-Páez M., Dardis M. B., Goerigk L. ω B2PLYP and ω B2GPPLYP: The First Two Double-Hybrid Density Functionals with Long-Range Correction Optimized for Excitation Energies // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2019. – T. 15, № 9. – C. 4735-4744.

187. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. – 2015. – T. 1-2. – C. 19-25.

188. Compendium of Biophysics. / Rubin A. B.: Wiley, 2017.
189. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz // Annalen der Physik. – 1948. – T. 437, № 1-2. – C. 55-75.
190. Skourtis S. S., Liu C., Antoniou P., Virshup A. M., Beratan D. N. Dexter energy transfer pathways // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – T. 113, № 29. – C. 8115-8120.
191. Lin S. H., Xiao W. Z., Dietz W. Generalized Förster-Dexter theory of photoinduced intramolecular energy transfer // Physical Review E. – 1993. – T. 47, № 5. – C. 3698-3706.
192. Olaya-Castro A., Scholes G. D. Energy transfer from Förster–Dexter theory to quantum coherent light-harvesting // International Reviews in Physical Chemistry. – 2011. – T. 30, № 1. – C. 49-77.
193. Piston D. W., Kremers G.-J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly // Trends in Biochemical Sciences. – 2007. – T. 32, № 9. – C. 407-414.
194. Edidin M. Fluorescence Resonance Energy Transfer: Techniques for Measuring Molecular Conformation and Molecular Proximity // Current Protocols in Immunology. – 2003. – T. 57, № 1. – C. 18.10.1-18.10.18.
195. Clegg R. M. The History of Fret // Reviews in Fluorescence 2006 / Geddes C. D., Lakowicz J. R. – Boston, MA: Springer US, 2006. – C. 1-45.
196. Stadnichuk I. N., Tropin I. V. Phycobiliproteins: Structure, functions and biotechnological applications // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – T. 53, № 1. – C. 1-10.
197. Mertens Haydyn D. T., Piljić A., Schultz C., Svergun Dmitri I. Conformational Analysis of a Genetically Encoded FRET Biosensor by SAXS // Biophysical Journal. – 2012. – T. 102, № 12. – C. 2866-2875.

198. Jares-Erijman E. A., Jovin T. M. FRET imaging // *Nature Biotechnology*. – 2003. – T. 21, № 11. – C. 1387-1395.

199. Nowick A. S., Dienes G. J. On the Inherent Curvature of the Arrhenius Plot in Diffusion Experiments // *physica status solidi (b)*. – 1967. – T. 24, № 2. – C. 461-467.

200. Peleg M., Normand M. D., Corradini M. G. The Arrhenius Equation Revisited // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2012. – T. 52, № 9. – C. 830-851.

201. Maksimov E. G., Klementiev K. E., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Elanskaya I. V., Paschenko V. Z. Features of temporal behavior of fluorescence recovery in *Synechocystis* sp. PCC6803 // *Photosynthesis Research*. – 2015. – T. 125, № 1-2. – C. 167-178.

202. Maksimov E. G., Schmitt F. J., Shirshin E. A., Svirin M. D., Elanskaya I. V., Friedrich T., Fadeev V. V., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The time course of non-photochemical quenching in phycobilisomes of *Synechocystis* sp. PCC6803 as revealed by picosecond time-resolved fluorimetry // *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. – 2014. – T. 1837, № 9. – C. 1540-1547.

203. Maksimov E. G., Schmitt F. J., Hätti P., Klementiev K. E., Paschenko V. Z., Renger G., Rubin A. B. Anomalous temperature dependence of the fluorescence lifetime of phycobiliproteins // *Laser Physics Letters*. – 2013. – T. 10, № 5.

204. Chábera P., Fuciman M., Hříbek P., Polívka T. Effect of carotenoid structure on excited-state dynamics of carbonyl carotenoids // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2009. – T. 11, № 39. – C. 8795-8803.

205. Polívka T., Sundström V. Dark excited states of carotenoids: Consensus and controversy // *Chemical Physics Letters*. – 2009. – T. 477, № 1. – C. 1-11.

206. Enriquez M. M., Fuciman M., LaFountain A. M., Wagner N. L., Birge R. R., Frank H. A. The Intramolecular Charge Transfer State in Carbonyl-Containing Polyenes

and Carotenoids // The Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – T. 114, № 38. – C. 12416-12426.

207. Protasova E. A., Antal T. K., Zlenko D. V., Elanskaya I. V., Lukashev E. P., Friedrich T., Mironov K. S., Sluchanko N. N., Ge B., Qin S., Maksimov E. G. State of the phycobilisome determines effective absorption cross-section of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2021. – T. 1862, № 12. – C. 148494.

208. Maksimov E. G., Li W.-J., Protasova E. A., Friedrich T., Ge B., Qin S., Sluchanko N. N. Hybrid coupling of R-phycoerythrin and the orange carotenoid protein supports the FRET-based mechanism of cyanobacterial photoprotection // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2019. – T. 516, № 3. – C. 699-704.

209. Okabe K., Inada N., Gota C., Harada Y., Funatsu T., Uchiyama S. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy // *Nature Communications*. – 2012. – T. 3. – C. 705.

210. Pishchalnikov R. Y., Yaroshevich I. A., Slastnikova T. A., Ashikhmin A. A., Stepanov A. V., Slutskaya E. A., Friedrich T., Sluchanko N. N., Maksimov E. G. Structural peculiarities of keto-carotenoids in water-soluble proteins revealed by simulation of linear absorption // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2019. – T. 21, № 46. – C. 25707-25719.

211. Hashimoto H., Koyama Y. Raman spectra of all-trans- β -carotene in the S₁ and T₁ states produced by direct photoexcitation // *Chemical Physics Letters*. – 1989. – T. 163, № 2. – C. 251-256.

212. Polívka T., Herek J. L., Zigmantas D., Åkerlund H.-E., Sundström V. Direct observation of the (forbidden) S₁ state in carotenoids // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – T. 96, № 9. – C. 4914-4917.

213. Greco J. A., LaFountain A. M., Kinashi N., Shinada T., Sakaguchi K., Katsumura S., Magdaong N. C. M., Niedzwiedzki D. M., Birge R. R., Frank H. A. Spectroscopic Investigation of the Carotenoid Deoxyperidin: Direct Observation of the Forbidden $S_0 \rightarrow S_1$ Transition // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – T. 120, № 10. – C. 2731-2744.

214. Hashimoto H., Uragami C., Yukihiro N., Gardiner A. T., Cogdell R. J. Understanding/unravelling carotenoid excited singlet states // *Journal of the Royal Society, Interface*. – 2018. – T. 15, № 141. – C. 20180026.

215. Wei T., Balevicius V., Polivka T., Ruban A. V., Duffy C. D. P. How carotenoid distortions may determine optical properties: lessons from the Orange Carotenoid Protein // *Phys Chem Chem Phys*. – 2019. – T. 21, № 41. – C. 23187-23197.

216. Yaroshevich I. A., Maksimov E. G., Sluchanko N. N., Zlenko D. V., Stepanov A. V., Slutskaya E. A., Slonimskiy Y. B., Botnarevskii V. S., Remeeva A., Gushchin I., Kovalev K., Gordeliy V. I., Shelaev I. V., Gostev F. E., Khakhulin D., Poddubnyy V. V., Gostev T. S., Cherepanov D. A., Polivka T., Kloz M., Friedrich T., Paschenko V. Z., Nadtochenko V. A., Rubin A. B., Kirpichnikov M. P. Role of hydrogen bond alternation and charge transfer states in photoactivation of the Orange Carotenoid Protein // *Communications Biology*. – 2021. – T. 4, № 1. – C. 539.

217. Konold P. E., van Stokkum I. H. M., Muzzopappa F., Wilson A., Groot M. L., Kirilovsky D., Kennis J. T. M. Photoactivation mechanism, timing of protein secondary structure dynamics and carotenoid translocation in the Orange Carotenoid Protein // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018.10.1021/jacs.8b11373.

218. Zhdanova N. G., Shirshin E. A., Maksimov E. G., Panchishin I. M., Saletsky A. M., Fadeev V. V. Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin // *Photochemical and Photobiological Sciences*. – 2015. – T. 14, № 5. – C. 897-908.

219. Maksimov E. G., Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Slutskaya E. A., Stepanov A. V., Argentova-Stevens A. M., Shirshin E. A., Tsoraev G. V., Klementiev K. E., Slatinskaya O. V., Lukashev E. P., Friedrich T., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 15548.

220. Maksimov E. G., Protasova E. A., Tsoraev G. V., Yaroshevich I. A., Maydykovskiy A. I., Shirshin E. A., Gostev T. S., Jelzow A., Moldenhauer M., Slonimskiy Y. B., Sluchanko N. N., Friedrich T. Probing of carotenoid-tryptophan hydrogen bonding dynamics in the single-tryptophan photoactive Orange Carotenoid Protein // *Scientific Reports*. – 2020. – T. 10, № 1. – C. 11729.

221. Moldenhauer M., Sluchanko N. N., Buhrke D., Zlenko D. V., Tavraz N. N., Schmitt F.-J., Hildebrandt P., Maksimov E. G., Friedrich T. Assembly of photoactive orange carotenoid protein from its domains unravels a carotenoid shuttle mechanism // *Photosynthesis Research*. – 2017.10.1007/s11120-017-0353-3. – C. 1-15.

222. Golub M., Moldenhauer M., Schmitt F.-J., Feoktystov A., Mändar H., Maksimov E., Friedrich T., Pieper J. Solution Structure and Conformational Flexibility in the Active State of the Orange Carotenoid Protein: Part I. Small-Angle Scattering // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2019. – T. 123, № 45. – C. 9525-9535.

223. Golub M., Moldenhauer M., Schmitt F.-J., Lohstroh W., Maksimov E. G., Friedrich T., Pieper J. Solution Structure and Conformational Flexibility in the Active State of the Orange Carotenoid Protein. Part II: Quasielastic Neutron Scattering // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2019. – T. 123, № 45. – C. 9536-9545.

224. Moldenhauer M., Sluchanko N. N., Tavraz N. N., Junghans C., Buhrke D., Willoweit M., Chiappisi L., Schmitt F.-J., Vukojević V., Shirshin E. A., Ponomarev V. Y., Paschenko V. Z., Gradzielski M., Maksimov E. G., Friedrich T. Interaction of the signaling state analog and the apoprotein form of the orange carotenoid protein with the

fluorescence recovery protein // *Photosynthesis Research*. – 2017.10.1007/s11120-017-0346-2. – C. 1-15.

225. Maksimov E. G., Laptev G. Y., Blokhin D. S., Klochkov V. V., Slonimskiy Y. B., Sluchanko N. N., Friedrich T., Chang C.-F., Polshakov V. I. NMR resonance assignment and backbone dynamics of a C-terminal domain homolog of orange carotenoid protein // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2021. – T. 15, № 1. – C. 17-23.

226. Boulay C., Wilson A., D'Haene S., Kirilovsky D. Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – T. 107, № 25. – C. 11620-11625.

227. King J. D., Liu H., He G., Orf G. S., Blankenship R. E. Chemical activation of the cyanobacterial orange carotenoid protein // *FEBS Lett*. – 2014. – T. 588, № 24. – C. 4561-5.

228. Slonimskiy Y. B., Maksimov E. G., Lukashev E. P., Moldenhauer M., Jeffries C. M., Svergun D. I., Friedrich T., Sluchanko N. N. Functional interaction of low-homology FRPs from different cyanobacteria with *Synechocystis* OCP // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2018. – T. 1859, № 5. – C. 382-393.

229. Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Moldenhauer M., Friedrich T., Maksimov E. G. Deletion of the short N-terminal extension in OCP reveals the main site for FRP binding // *FEBS Letters*. – 2017. – T. 591(12). – C. 1667-1676.

230. Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Shirshin E. A., Moldenhauer M., Friedrich T., Maksimov E. G. OCP–FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria // *Nature Communications*. – 2018. – T. 9, № 1. – C. 3869.

231. Kirilovsky D. Modulating Energy Transfer from Phycobilisomes to Photosystems: State Transitions and OCP-Related Non-Photochemical Quenching //

Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms / Larkum A. W. D. и др. – Cham: Springer International Publishing, 2020. – С. 367-396.

232. Balevičius Jr V., Wei T., Di Tommaso D., Abramavicius D., Hauer J., Polívka T., Duffy C. D. P. The full dynamics of energy relaxation in large organic molecules: from photo-excitation to solvent heating // *Chemical Science*. – 2019. – Т. 10, № 18. – С. 4792-4804.

233. Harris D., Wilson A., Muzzopappa F., Sluchanko N. N., Friedrich T., Maksimov E. G., Kirilovsky D., Adir N. Structural rearrangements in the C-terminal domain homolog of Orange Carotenoid Protein are crucial for carotenoid transfer // *Commun Biol*. – 2018. – Т. 1. – С. 125.

234. Slonimskiy Y. B., Muzzopappa F., Maksimov E. G., Wilson A., Friedrich T., Kirilovsky D., Sluchanko N. N. Light-controlled carotenoid transfer between water-soluble proteins related to cyanobacterial photoprotection // *The FEBS Journal*. – 2019. – Т. 286, № 10. – С. 1908-1924.

235. Maksimov E. G., Yaroshevich I. A., Tsoraev G. V., Sluchanko N. N., Slutskaya E. A., Shamborant O. G., Bobik T. V., Friedrich T., Stepanov A. V. A genetically encoded fluorescent temperature sensor derived from the photoactive Orange Carotenoid Protein // *Scientific Reports*. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 8937.

236. Balashov S. P., Lanyi J. K. Xanthorhodopsin: Proton pump with a carotenoid antenna // *Cell Mol Life Sci*. – 2007. – Т. 64, № 18. – С. 2323-8.

237. Balashov S. P., Imasheva E. S., Wang J. M., Lanyi J. K. Excitation energy-transfer and the relative orientation of retinal and carotenoid in xanthorhodopsin // *Biophys J*. – 2008. – Т. 95, № 5. – С. 2402-14.

238. Luecke H., Schobert B., Stagno J., Imasheva E. S., Wang J. M., Balashov S. P., Lanyi J. K. Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton

pump with a dual chromophore // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – T. 105, № 43. – C. 16561-16565.

239. Polívka T., Balashov S. P., Chábera P., Imasheva E. S., Yartsev A., Sundström V., Lanyi J. K. Femtosecond carotenoid to retinal energy transfer in xanthorhodopsin // Biophysical journal. – 2009. – T. 96, № 6. – C. 2268-2277.

240. Bogachev A. V., Bertsova Y. V., Verkhovskaya M. L., Mamedov M. D., Skulachev V. P. Real-time kinetics of electrogenic Na⁺ transport by rhodopsin from the marine flavobacterium *Dokdonia* sp. PRO95 // Scientific Reports. – 2016. – T. 6, № 1. – C. 21397.

241. Mamedov M. D., Mamedov A. M., Bertsova Y. V., Bogachev A. V. A single mutation converts bacterial Na⁺-transporting rhodopsin into an H⁺ transporter // FEBS Letters. – 2016. – T. 590, № 17. – C. 2827-2835.