

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Максимов Евгений Георгиевич

**Электронно-конформационные взаимодействия в
фоточувствительных пигмент-белковых комплексах
цианобактерий**

03.01.02 – «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научные консультанты: **Рубин Андрей Борисович**
Доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН

Пащенко Владимир Захарович
Доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Цыганков Анатолий Анатольевич**
доктор биологических наук, директор Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Горин Дмитрий Александрович
доктор химических наук, профессор центра фотоники и квантовых материалов автономной некоммерческой образовательной организации «Сколковский институт науки и технологии»

Семенов Алексей Юрьевич
доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом фотобиофизики научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «28» февраля 2022 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр. 24, МГУ, Биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/410572794/>

Автореферат разослан ____ декабря 2021 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета МГУ.03.02,
Доктор биологических наук

Страховская Марина Глебовна

Общая характеристика работы

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.

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. Важное место в регуляции первичных процессов фотосинтеза зеленых водорослей и высших растений занимает так называемое «нефотохимическое» тушение, связанное с генерацией трансмембранного потенциала, активирующего ферментативное преобразование каротиноидов и тепловую диссипацию энергии электронного возбуждения ПБК в условиях избыточного освещения. Подобный механизм осуществляется в цианобактериях при участии молекулы каротиноида в составе оранжевого каротиноидного белка (Orange Carotenoid Protein, OCP), осуществляющего направленную доставку тушителя - каротиноида к светособирающим антенным комплексам - фикобилисомам (ФБС). Этот процесс индуцируется в результате фотовозбуждения каротиноида в составе белковой матрицы, что и приводит к направленным изменениям структуры OCP и возникновению «сигнального»

состояния, ответственного за тепловую диссипацию энергии.

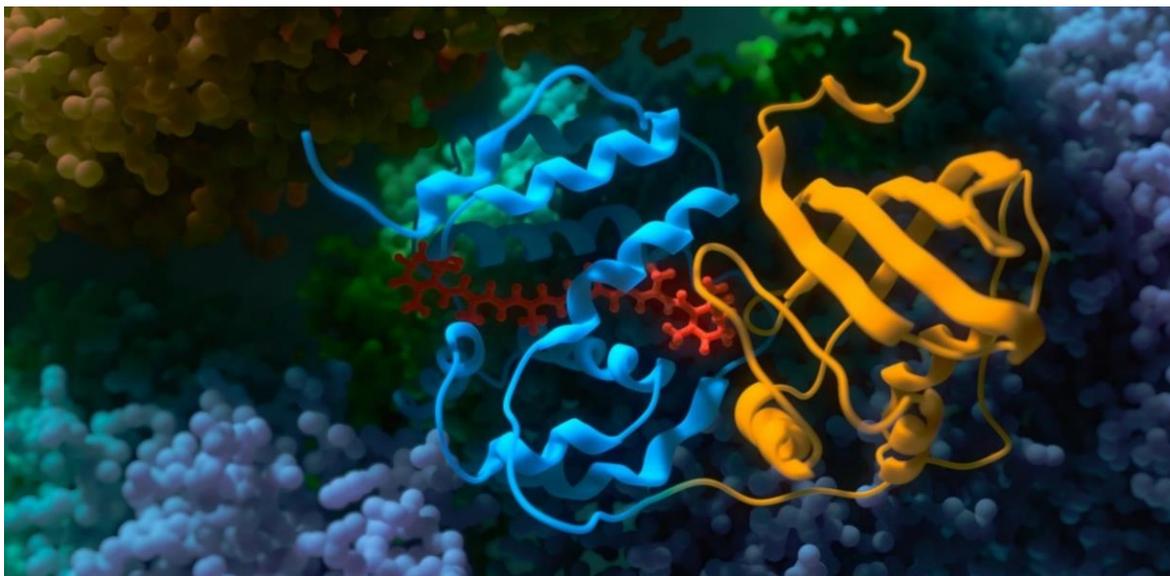


Рис. 1. Трехмерная модель активной «красной» формы ОСР.

Имеющиеся в литературе данные о механизмах фотоактивации ОСР и взаимодействии участников нефотохимического тушения носят фрагментарный характер и не раскрывают физико-химических основ функционирования ПБК. Особый интерес с этой точки зрения представляют исследования белок-хромофорных и белок-белковых взаимодействий, обеспечивающих единый направленный характер трансформации энергии и регуляции фотозащитных механизмов цианобактерий.

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. Установить основные физико-химические механизмы трансформации энергии электронного возбуждения в комплексах фикобилисома – оранжевый каротиноидный белок, и механизмы нефотохимического тушения флуоресценции в нативных и модельных комплексах.
2. Установить последовательность и динамику 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, определяющим восстановление 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

Установлена общая последовательность и механизмы электронно-конформационных переходов в фотоцикле ОСР, индуцируемые поглощением кванта света молекулой каротиноида в составе белковой матрицы. Установлены основные интермедиаты фотоцикла, оценены скорости реакций переходов между конформационными состояниями ОСР. Показано, что 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.

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.

Результаты исследований используются при подготовке студентов и аспирантов 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 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), ТЕТ21Н (human neuroblastoma) и HeLa (human cervical cancer).

Для решения поставленных экспериментальных задач был использован комплекс биофизических методов, основанных на оптической 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 накачки – зондирования с субпикосекундным временным разрешением. 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.

Основные 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 фотоактивном каротиноидном белке и регуляторном белке восстановления флуоресценции установлены структурные элементы, необходимые для взаимодействия и образования комплекса этих белков на разных этапах фотоцикла и переключения между фотосинтетическими реакциями и нефотохимическим тушением. Формирование комплекса 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 каротиноидных белков цианобактерий, 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 Пуцинские 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; Пущино, Россия, 2014; Ираклион, Греция, 2015; Пущино, 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.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 225 страницах, и состоит из обзора литературы (глава 1), материалов и методов исследования (глава 2), обсуждения результатов (глава 3), заключения и выводов. Работа иллюстрирована 58 рисунками и включает 2 таблицы. Библиографический указатель содержит 241 источник литературы.

Содержание работы

Во введении обосновывается актуальность исследований, формулируется цель и задачи работы, представлена научная новизна и практическая значимость, дана общая характеристика работы. В **главе 1** изложены современные представления о структурно-функционально организации фотосинтетических мембран цианобактерий, регуляции первичных процессов фотосинтеза и фотозащитных механизмов. В обзоре литературы приводится описание истории открытия нефотохимического тушения флуоресценции у цианобактерий, установления структуры, физиологической роли ОСР, FRP и развитие современных представлений об их взаимодействии. В **главе 2** представлены объекты исследования, а также методики исследования и анализа экспериментальных данных, использованные в диссертационной работе. В **главе 3** приведены основные результаты исследования, объединенные в 4 раздела.

Раздел 3.1. Энергетические взаимодействия каротиноидных белков с различными донорами энергии посвящен исследованиям механизмов трансформации энергии в комплексах с каротиноидными белками.

Используя флуоресцентную спектрофлуориметрию с пикосекундным временным разрешением (см. *рис. 2*), мы показали, что изменение интенсивности флуоресценции при активации и релаксации нефотохимического тушения *in vivo* и *in vitro* объясняются изменением времени жизни и, соответственно, квантового выхода флуоресценции пигмент-белковых комплексов ядра ФБС [10, 11]. Таким образом, ОСР-зависимое тушение флуоресценции ФБС является динамическим. Факт наличия в базальных цилиндрах ядра ФБС пар терминальных эмиттеров послужил основой гипотезы о взаимодействии ОСР со специфическими пигментами ядра [4, 7, 9].

Образование комплекса ОСР с ФБС за счет белок-белковых контактов инициирует взаимодействие между пигментами ядра ФБС и кето-каротиноидом в составе ОСР за счет сближения молекул донора и акцептора энергии электронного возбуждения. Для объяснения наблюдаемых в эксперименте эффектов рассмотрены 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 индуцирует обратимую денатурацию пигмент-белкового комплекса и формирует центр диссипации энергии в ядре ФБС. Мы проверили эту гипотезу

вызывая денатурацию выделенных фикобилипротеинов с помощью хаотропов, воздействия температуры и низких рН [5, 8, 13]. 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. По этой причине мы считаем, что именно кето-каротиноид в составе ОСР является конечным акцептором энергии электронного возбуждения.

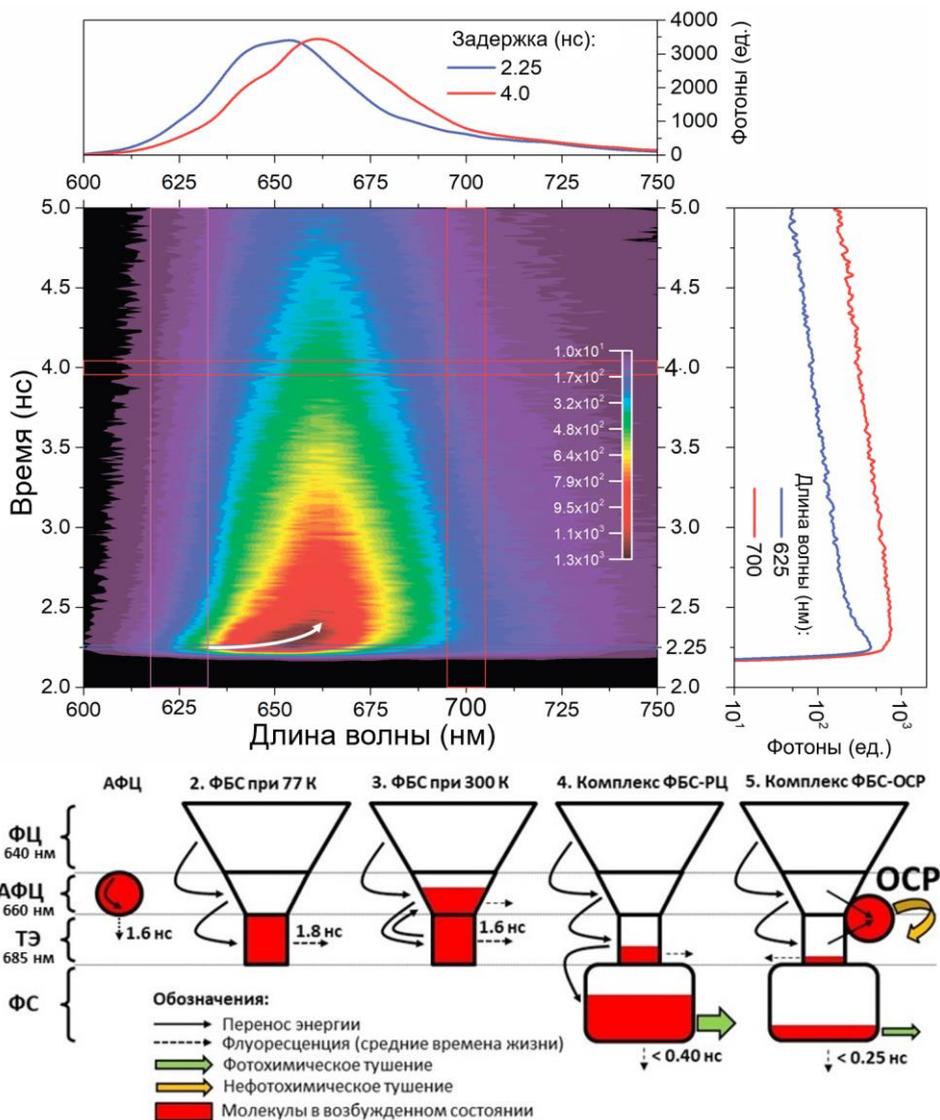


Рис. 2. Миграция энергии в фикобилисомах цианобактерий. *Сверху:* мгновенный спектр флуоресценции ФБС при возбуждении фс лазерными импульсами при 570 нм. Спектр измерен при 30 °С. Цветовая шкала показывает количество фотонов, регистрируемых в различные моменты времени при заданной длине волны регистрации 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.

В настоящее время среди многочисленных пигментов ядра ФБС не определен хромофор, передающий энергию возбуждения на каротиноид. Это обстоятельство осложняется малым энергетическим зазором между уровнями S_1 терминальных эмиттеров и аллофиоциана (~ 0.038 eV) (см *рис. 2*). Из-за этого при комнатной температуре значительная часть энергии оказывается на аллофиоцианине (АФС) за счет переноса энергии в обратном направлении (*uphill*) [3, 6, 10]. Хотя при температуре жидкого азота энергия достигает терминальных эмиттеров, мы показали, что ОСР-зависимое тушение флуоресценции ФБС 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 ФБС, 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. Охлаждение раствора до -5 °С приводит к снижению эффективности миграции энергии на каротиноид ОСР до 0. В экспериментах *in vitro* данный эффект обратим. Возможным объяснением наблюдаемых эффектов является нарушение нативной конфигурации комплекса в отсутствии динамики элементов структуры ПБК.

Для решения проблемы энергетического взаимодействия ОСР с антенной мы приступили к экспериментам на модельных объектах. 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 аллофиоцианином в растворе, мы решили проверить взаимодействует ли ОСР с терминальным эмиттером АрсЕ [7, 39]. Сложность этого эксперимента обусловлена тем, что данный белок состоит из нескольких глобулярных доменов, соединенных линкерами, и лишь один домен содержит хромофор. Такой препарат плохо растворим в воде, поэтому мы решили укоротить последовательность АрсЕ, оставив только домен с хромофором АрсЕΔ. Установлено, что добавление к АрсЕΔ мутантной формы ОСР не требующей фотоактивации (ОСР-Y201A/W288A) вызывает сокращение времени жизни АрсЕΔ до ~ 20 пс. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в АрсЕΔ могут быть сайты, обеспечивающие контакт ОСР с ядром ФБС, а энергетическое взаимодействие с фикобилипротеинами может приводить к сокращению длительности флуоресценции отдельного пигмента антенны до десятков пикосекунд, что позволяет ОСР конкурировать с фотосистемами за поток энергии от ФБС.

Другим модельным объектом стал комплекс ОСР и R-фикоэритрина из красной водоросли *Porphyra yezoensis*. Хотя R-фикоэритрин является компонентом стержней ФБС, ОСР и R-фикоэритрин представляют пигмент-белковые комплексы из разных царств, что исключает возможность специфических белок-белковых взаимодействий, что подтверждается с помощью ряда биохимических методов (SEC, нативный электрофорез). За счет сшивки белков глутаровым альдегидом нами был получен комплекс ОСР-R-фикоэритрин, в котором длительность флуоресценции R-фикоэритрина сократилась с 2.7 нс до 380 пс [30]. При этом 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 (рис. 3). 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.

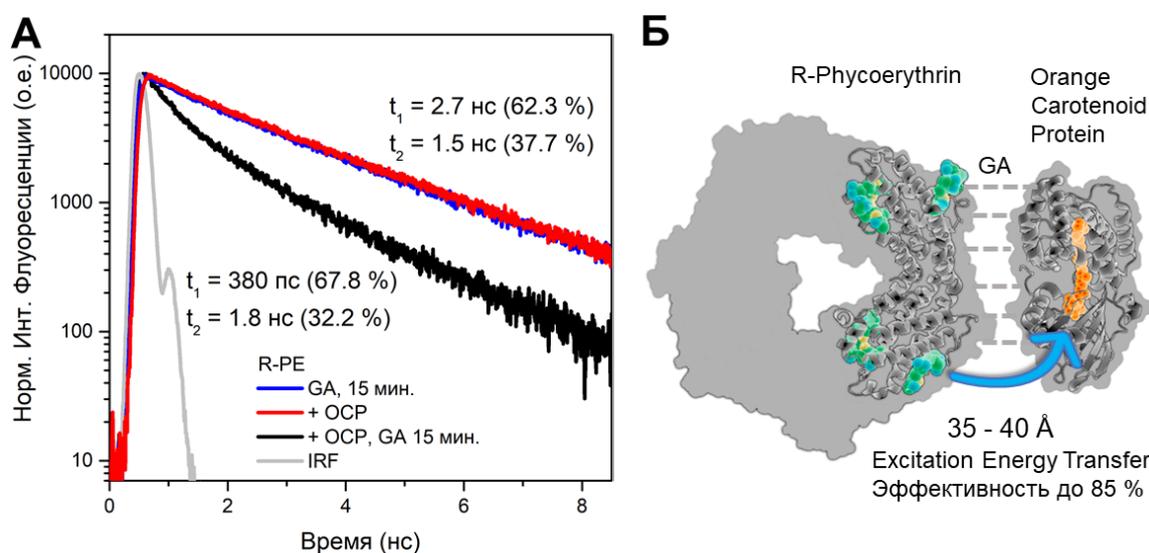


Рис. 3. Тушение флуоресценции R-фикоэритрина из красной водоросли в комплексе с ОСР. **А** – кинетики затухания флуоресценции раствора R-фикоэритрина и его комплекса с ОСР, стабилизированного за счет глутарового альдегида. **Б** – оценка расстояния между хромофорами R-фикоэритрина и каротиноидом в составе ОСР на основе эффективности FRET.

Мы обобщили доступные данные о структуре ядра и ОСР и оценили интеграл перекрытия спектра флуоресценции ФБС и поглощения ОСР (S_0 - S_2). Расстояние между центрами масс кето-каротиноида в составе ОСР и ближайшим пигментом 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 % 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 приводит к незначительному снижению эффективности тушения флуоресценции ФБС. Более того, лишь расстояния свыше 5 нм 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 ФБС.

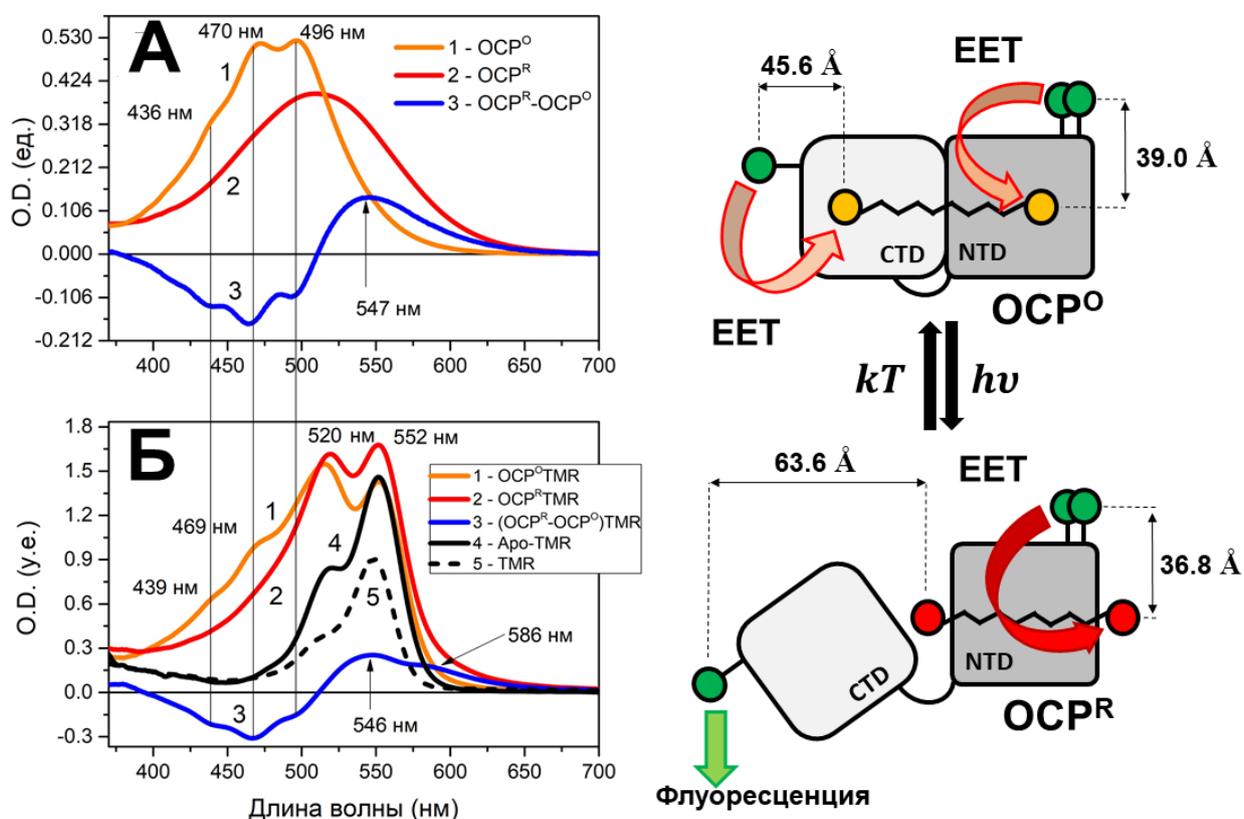


Рис. 4. Перенос энергии между тетраметилродамином (TMR) и каротиноидом в комплексе с ОСР. **А** – спектры поглощения ОСР в оранжевой и красной форме, полученной в результате фотоактивации. **Б** – спектры поглощения ОСР в комплексе с тремя молекулами TMR, пришитыми к белку через цистеиновые остатки. Черная линия показывает поглощение апо-формы ОСР меченой TMR. Справа: схема, показывающая изменение расстояний между группами меток и каротиноидом в составе ОСР при фотоактивации. Расстояния оценивали с помощью время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии по изменению времени жизни флуоресценции TMR.

Изменения эффективности переноса энергии использовали для оценки внутримолекулярных расстояний при фотоактивации и релаксации ОСР. Для этого проводили мечение цистеиновых остатков (84, 95 и 245) тетраметилродамином (TMR) [15]. Наличие меток с различными временами жизни в разных доменах ОСР позволило нам определить

расстояния между ними и каротиноидом, а также наблюдать как при фотоактивации увеличивается расстояние между меткой в С-доме и каротиноидом, в то время как в N-доме расстояние уменьшается. Это позволило нам подтвердить гипотезу о перемещении кето-каротиноида из С-доме в N-доме на 12 Å и диссоциации структурных доменов белка при образовании красной активной формы OCP^R (рис. 4).

С помощью абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии нами была исследована температурная зависимость скорости перехода OCP из оранжевой формы в красную [12]. Высокий энергетический барьер для релаксации красной формы означает, что небольшие изменения температуры среды сильно влияют на скорость реакции, что позволяет рассматривать OCP как фото-сенсор локальной температуры.

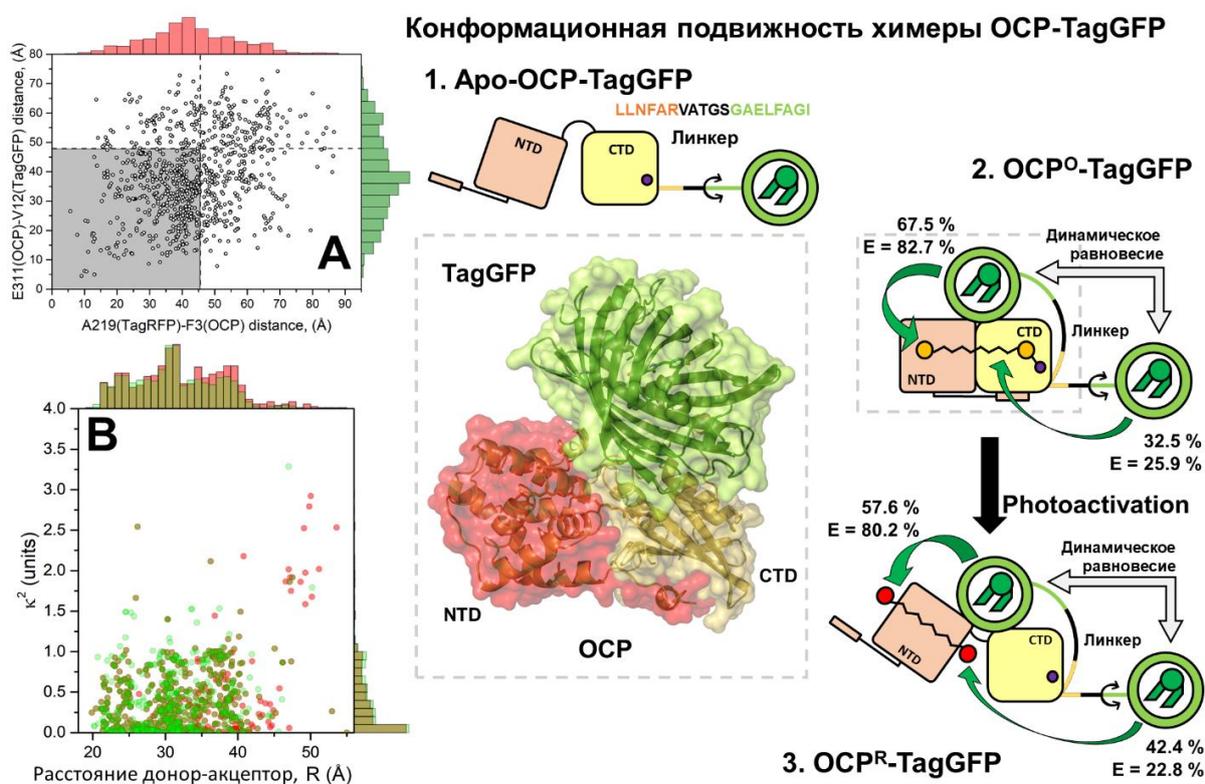


Рис 5. Модель комплекса OCP-флуоресцентный белок на примере химеры OCP-TagGFP. Возможное расположение OCP и TagGFP в комплексе было определено на основе результатов молекулярного докинга, позволивших определить расстояния (A) и ориентационный фактор (B) для каротиноида и хромофора флуоресцентного белка, и уточненных за счет экспериментальных данных об эффективности переноса энергии электронного возбуждения хромофора флуоресцентного белка на каротиноид в составе OCP.

Для разработки сенсора внутриклеточной температуры мы создали генетически кодируемую химерную конструкцию из OCP и флуоресцентного белка. Были получены два типа химер на основе дикого типа OCP из *Synechocystis*: в первом случае TagGFP был присоединен к С-концу (рис. 7), а во втором TagRFP к N-концу. Обе конструкции оказались фотоактивными, что подтверждалось обратимым изменением спектра поглощения

каротиноида в составе ОСР. Установлено, что за фотоциклическими переходами ОСР в составе химерных конструкций можно наблюдать по изменению поглощения каротиноида и квантового выхода флуоресценции флуоресцентных белков [31]. 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. 5*).

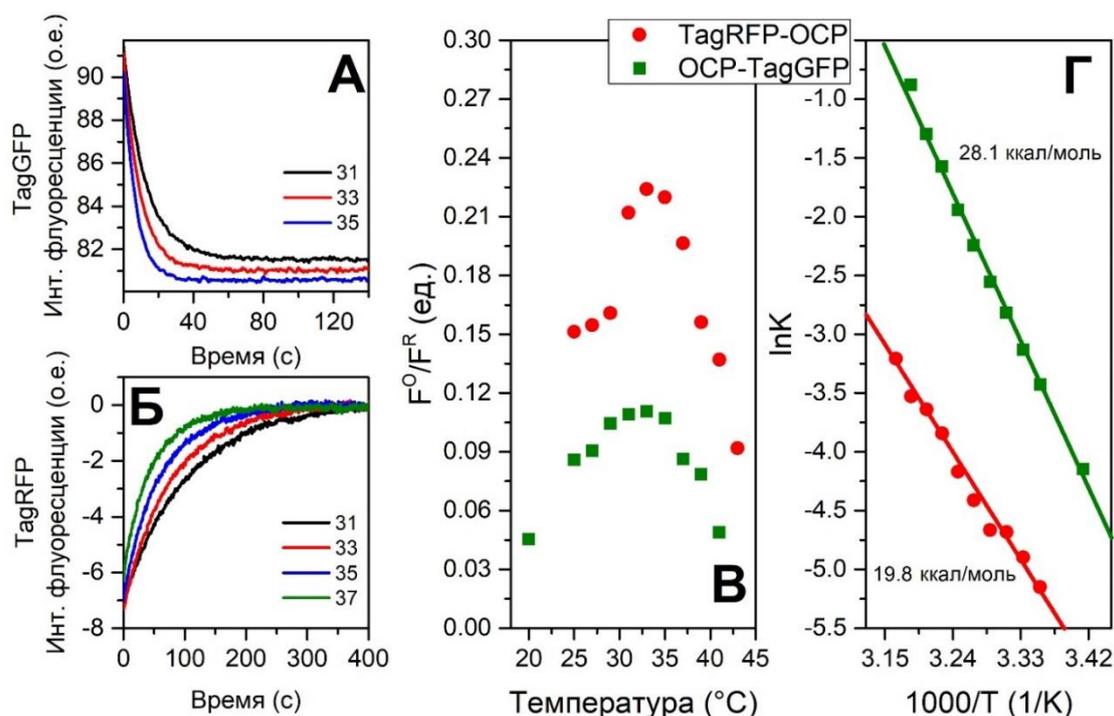


Рис. 6. Изменения интенсивности флуоресценции химерных конструкций OCP-TagGFP (A) и OCP-TagRFP (Б) при релаксации ОСР после фотоактивации при разных температурах. В – относительная амплитуда изменений интенсивности флуоресценции при фотоактивации химерных конструкций на основе ОСР и флуоресцентных белков. Г – зависимость скорости релаксации красной формы ОСР от температуры в координатах Аррениуса.

При фотоактивации ОСР эффективность миграции энергии в химерах с зеленым флуоресцентным белком снижается (TagGFP), а с красным (TagRFP), напротив, увеличивается (см. *рис. 6*), что объясняется изменением величины интеграла перекрытия спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора (S_0 - S_2), а также изменением расстояния при перемещении каротиноида из С-домена ОСР в N домен. Для экспериментов на клетках необходима реконструкция холо-формы ОСР, т.е. встраивание каротиноида в белковую матрицу. Решению этой проблемы посвящен раздел диссертации 3.4.

Выводы главы 3.1 Энергетические взаимодействия каротиноидных белков с различными донорами энергии электронного возбуждения. 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, что свидетельствует об универсальности принципа, реализованного в фотозащитных механизмах цианобактерий. Перенос энергии электронного возбуждения в комплексах различных пигментов и ОСР обусловлен диполь-дипольными взаимодействиями и может быть описан в рамках формализма теории Ферстера. Флуоресцентное мечение ОСР позволяет детектировать расстояние между донором и акцептором энергии и перемещение молекулы каротиноида между доменами ОСР при фотоактивации. Чувствительность фотоциклических переходов ОСР к температуре среды позволяет создавать на его основе флуоресцентные датчики локальной температуры.

До середины 2017 года, когда к исследованию фотоцикла ОСР подключилась наша группа, в фотоцикле ОСР выделяли лишь 2 состояния (активное красное и неактивное оранжевое), а механизм фотоактивации оставался невыясненным. Решению этих проблем посвящена серия экспериментов, описанных в главе 3.2. **Фотоцикл оранжевого каротиноидного белка.**

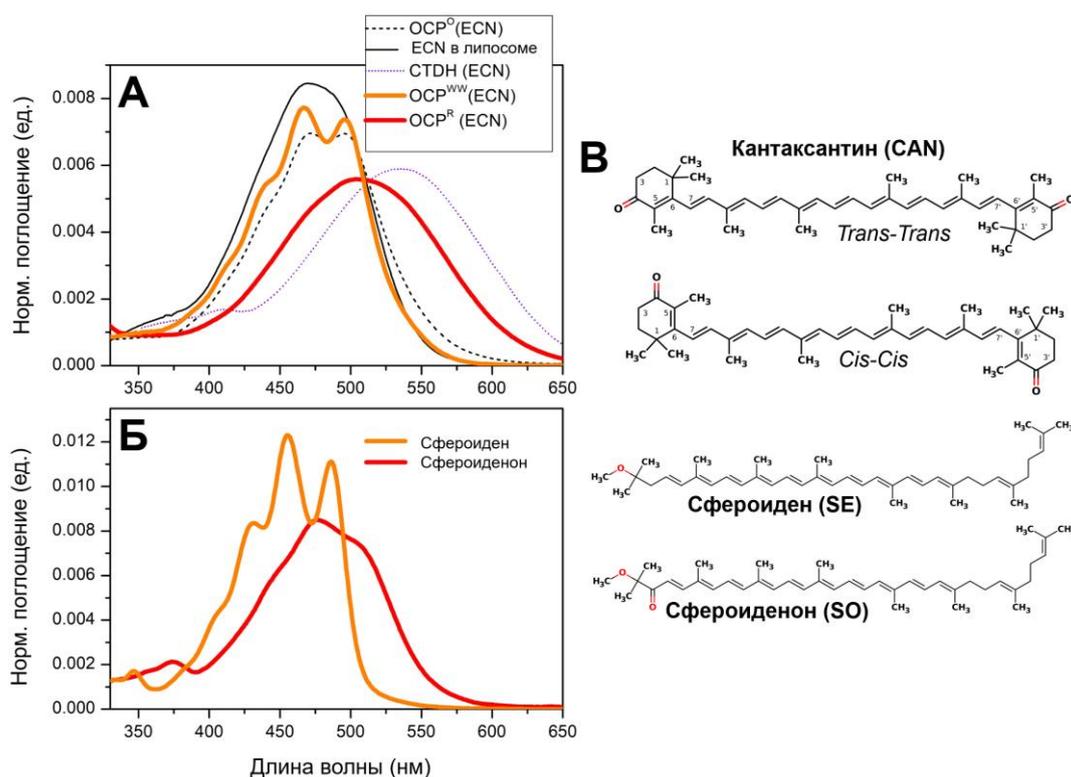


Рис. 7. Химическая структура и спектры поглощения кето-каротиноидов в полярном окружении. (А) – поглощение эхиненона в оранжевой и красной формах ОСР, мутанте OCP^{WW} и липосомах. (Б) – поглощение сфероидена (SE) и сфероиденона (SO) в ацетоне. (В) – структура транс и цис изомеров кантаксантина, а также структура сфероидена (SE) и сфероиденона (SO). Рисунок из статьи [32] с изменениями.

В спектрах поглощения ОСР обнаружены две спектральные формы – оранжевая и

красная. S₀-S₂ поглощение молекулы кето-каротиноида в составе неактивной оранжевой формы ОСР⁰ существенно отличается от спектра поглощения в органических растворителях и характеризуется ярко выраженной вибронной структурой. Взаимодействие π-электронов кето-группы с π-электронной системой основной цепи полиеновой цепи приводит к батохромному сдвигу спектра поглощения каротиноида, переходы между вибронными состояниями уширяются, а спектр поглощения теряет тонкую структуру. Эти эффекты обнаружены нами при фотоактивации ОСР и обусловлены конформационными изменениями [32]. Важнейшими структурными факторами, определяющими спектральные характеристики кето-каротиноида, и стабильность оранжевой формы ОСР⁰ являются остатки тирозина-201 (Y201) и триптофана-288 (W288), выступающие донорами водородных связей для кето-группы каротиноида. Наличие этих водородных связей способствует повороту β-иононового кольца, который изолирует кислород кето-группы каротиноида от полиеновой цепи, что приводит к проявлению тонкой структуры в спектре поглощения ОСР⁰ (см. рис. 7).

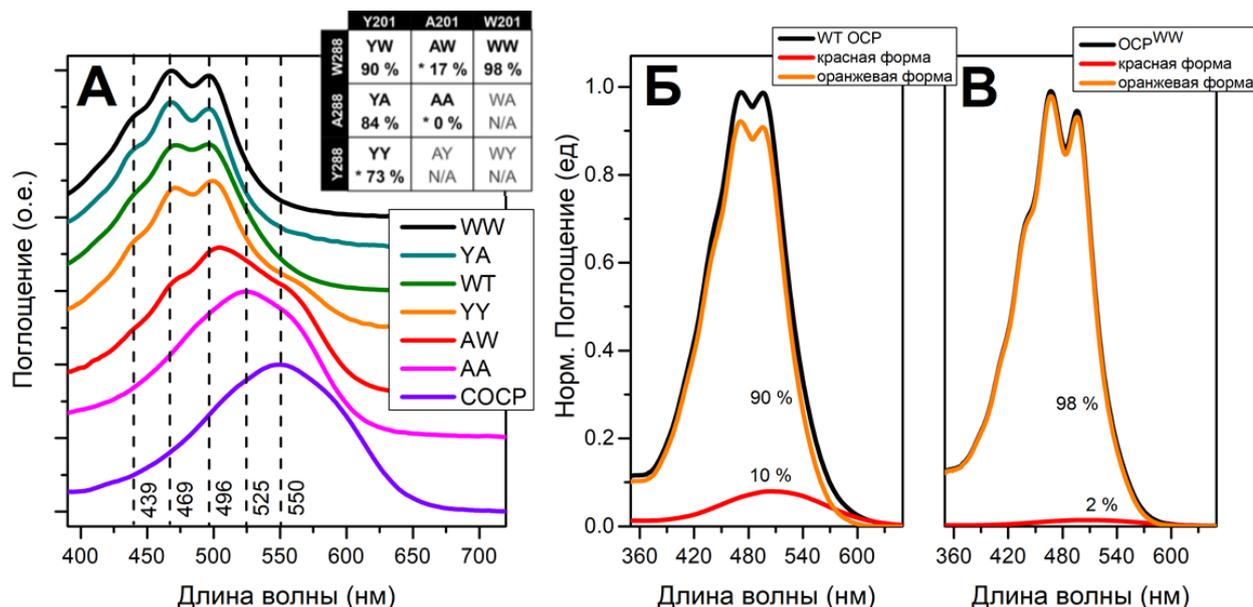


Рис. 8. Влияние точечных мутаций в локальном окружении кето-группы каротиноида на форму спектров поглощения белковых препаратов ОСР. А – спектры поглощения мутантных форм ОСР в 0.8 М фосфатном буфере. Таблица показывает выход оранжевой фотоактивной формы в препарате. Знак * указывает что при выделении 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. Рисунок из статьи [40] с изменениями.

В нашей работе роль водородных связей каротиноида с остатками Y201 и W288 исследовали с помощью точечных замен аминокислотных остатков. Показано, что двойной мутант Y201A/W288A не способен образовывать оранжевую форму ОСР⁰. В препаратах мутантов с одиночными заменами Y201A или W288A была обнаружена минорная фракция оранжевой формы белка, спектр которой отличался от спектра дикого типа ОСР ярко

выраженной вибронной структурой (рис. 8). Следовательно, для образования оранжевой формы ОСР достаточно одной водородной связи [40]. Замены Y201A или W288A 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. Для получения стабильной оранжевой формы нами был сконструирован мутант Y201W (ОСР^{WW}). Нам удалось установить структуру ОСР^{WW} с разрешением до 1.39 Å (см. рис. 9B), что на данный момент является лучшим разрешением среди всех структур ОСР и его производных.

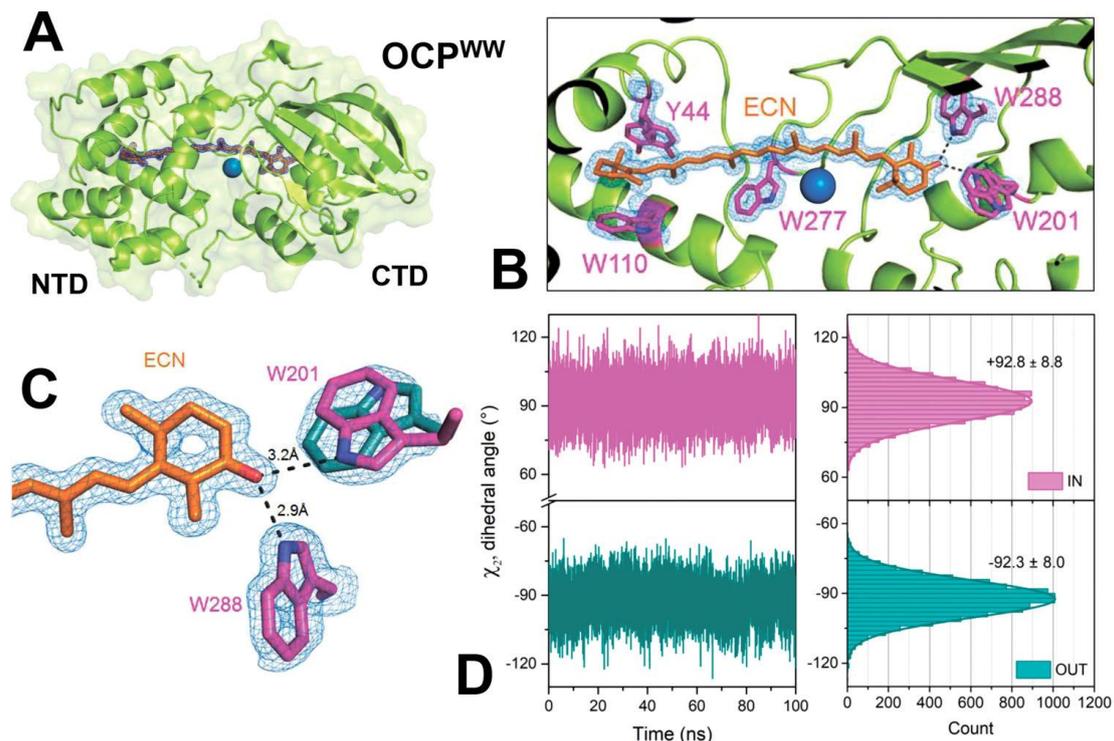


Рис. 9. Исследование пространственной структура мутанта ОСР^{WW} с помощью рентгеноструктурного анализа и молекулярной динамики. **А** – общий вид структур ОСР PDB ID 6T6O. **В** – область контактов кето-каротиноида с гидрофобной областью внутри белка. Указаны ключевые аминокислотные остатки. **С** – область связывания β-иононового кольца молекулы эхиненона в С-домеене ОСР за счет образования водородной связи с остатком триптофана-288. **Д** – моделирование подвижности конформеров остатка триптофана-201. Длина траектории 100 нс. Рисунок из статьи [40].

W201 может находиться в двух конфигурациях, ни одна из которых не образует водородных связей с кето-каротиноидом, что приводит к усилению взаимодействия кислорода кето-группы каротиноида с единственным оставшимся донором водородной связи - W288. Значительная спектральная гетерогенность и уширение спектра дикого типа ОСР по сравнению с мутантами (ОСР^{WW} и др., см. рис. 8) свидетельствует о конкуренции двух аминокислотных остатков (Y201 и W288) за водородную связь с кето-группой каротиноида, что увеличивает конформационную подвижность каротиноида за счет поворотов β-иононового кольца. Это подтверждается результатами молекулярной динамики и

спектроскопии комбинационного рассеяния, которые показали, что в мутанте $ОСР^{WW}$ водородная связь между W288 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 Y201, а двугранный угол между полиеновой цепью и β -иононовым кольцом меняется от 132° (в кристалле $ОСР$) до $80\text{-}50^\circ$ без значительных изменений структуры белка [15, 32].

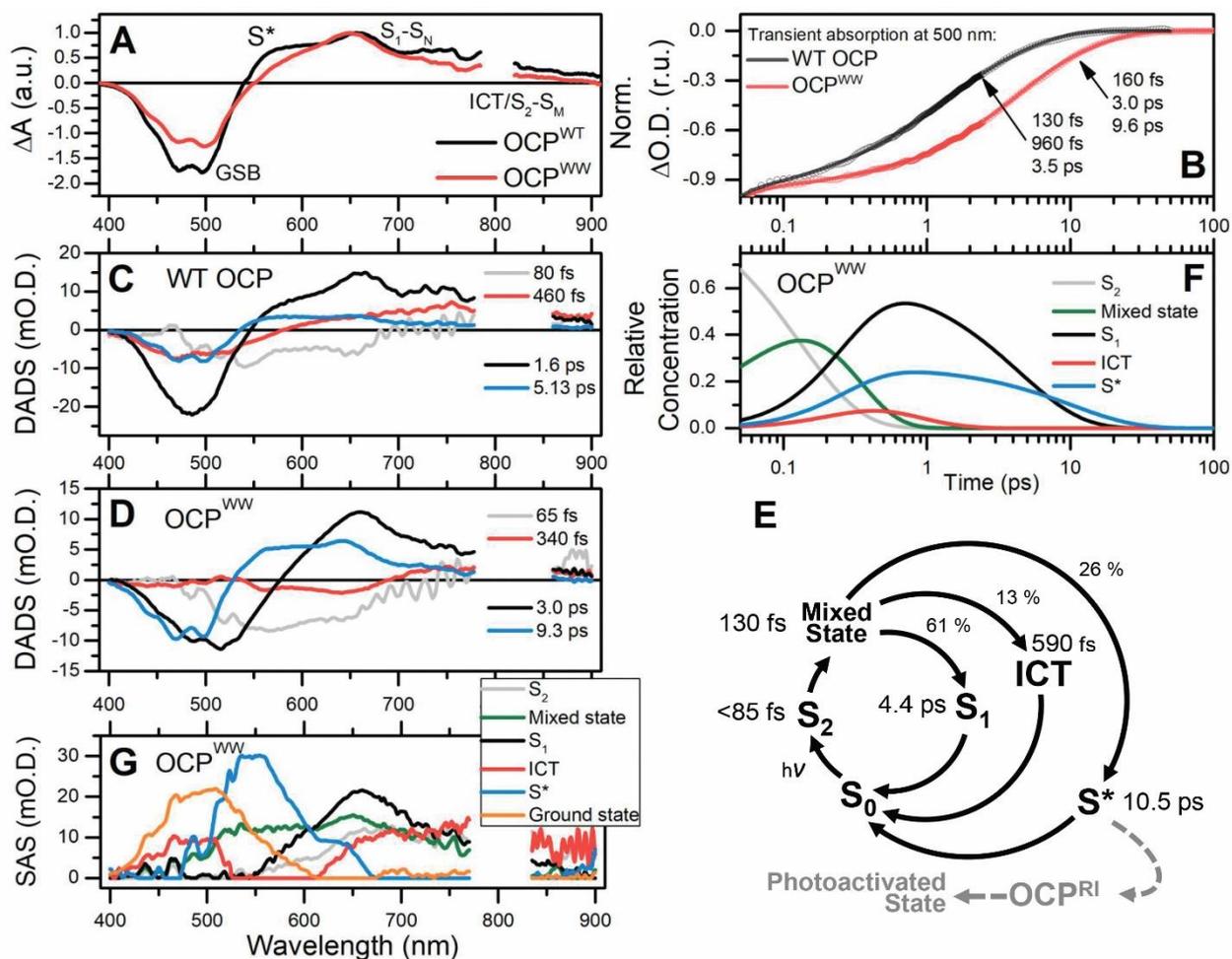


Рис. 10. Исследование динамики возбужденных состояний молекулы кето-каротиноида в $ОСР$. **А** – дифференциальные спектры поглощения дикого типа $ОСР$ (WT) и мутанта $ОСР^{WW}$ через 1 пс после возбуждения каротиноида 30 фс лазерным импульсом при 520 нм. **В** – кинетика восстановления поглощения в области 500 нм, характеризующая появление основного состояния каротиноида S_0 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 [40].

Мы обнаружили, что выход активной красной формы при фотоактивации $ОСР$ увеличивается у мутантов с одной водородной связью. Для объяснения этих эффектов мы исследовали динамику возбужденных состояний молекулы каротиноида в составе $ОСР$ с

помощью фемтосекундной абсорбционной спектроскопии (рис. 10). Переходы S_0 - S_1 в каротиноидах запрещены правилами симметрии, поэтому при поглощении кванта заселяется уровень S_2 . Затем, за ~ 100 фс происходит релаксация S_2 и заселение уровня S_1 (время жизни 3-5 пс). Для кето-каротиноидов в полярных средах характерны состояния, возникающие за счет перераспределения электронной плотности молекулы в возбужденном состоянии – т.н. состояния с переносом заряда (intramolecular charge transfer states, ICT, время жизни от 300 до 800 фс). А также состояние S^* с характерным временем жизни порядка 12 пс, которое соответствует молекулам с неравновесной конфигурацией или «горячему» основному состоянию каротиноида. Методы глобального и таргетного анализа позволили наблюдать эволюцию возбужденных состояний в ОСР. Мы обнаружили, что выход S^* в ОСР^{WW} увеличивается более чем в 5 раз по сравнению с диким типом ОСР. Появлению S^* предшествует образование «смешанного» возбужденного состояния, характеризующееся переносом заряда. Следовательно, перераспределение электронной плотности в возбужденной молекуле кето-каротиноида приводит к появлению неравновесных конформаций хромофора (S^*), которые обеспечивают разрыв водородных связей и инициацию фотоцикла ОСР [40].

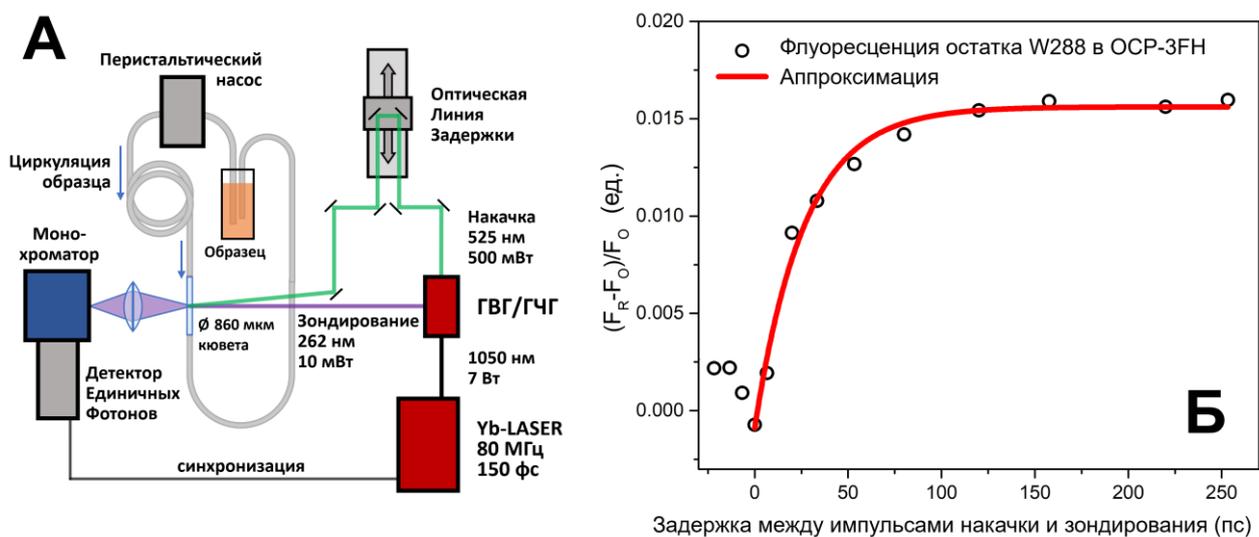


Рис. 11. Измерение кинетики разрыва водородной связи между триптофаном-288 и кето-каротиноидом в мутанте ОСР-W41F/W101F/W110F/W277H (ОСР-3FH) с помощью флуоресцентной фемтосекундной спектроскопии. **А** – схема установки для спектродиффузиометрии в режиме накачки-зондирования с субпикосекундным временным разрешением. **Б** – кинетика изменения интенсивности флуоресценции остатка W288 в белке ОСР-3FH в ответ на 150 фс вспышку 525 нм, 500 мВт. Рисунок из статьи [34] с изменениями.

Проведена серия экспериментов по изучению скорости разрыва водородной связи между кето-кислородом каротиноида и остатком W288. Установлено, что увеличение интенсивности флуоресценции остатка W288 происходит при разрыве ключевой водородной связи, что может быть использовано для измерения скорости данной реакции. Поскольку наличие других

триптофановых остатков в белке затрудняет наблюдению за специфическим взаимодействием W288 и кето-каротиноида, был сконструирован мутант OCP-W41F/W101F/W110F/W277H (OCP-3FH) [34]. Для регистрации изменений интенсивности триптофановой флуоресценции OCP-3FH в режиме накачки-зондирования позволила установить, что интенсивность флуоресценции W288 в ответ на фс лазерную вспышку увеличивается с характерным временем порядка 23 пс (рис. 11). Следовательно, 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 интермедиата фотоцикла OCP.

Нами был предложен механизм разрыва водородных связей за счет обратимого протонирования молекулы кето-каротиноида в возбужденном состоянии. Особенностью сопряженных молекул является их высокая поляризуемость, связанная с делокализацией π -

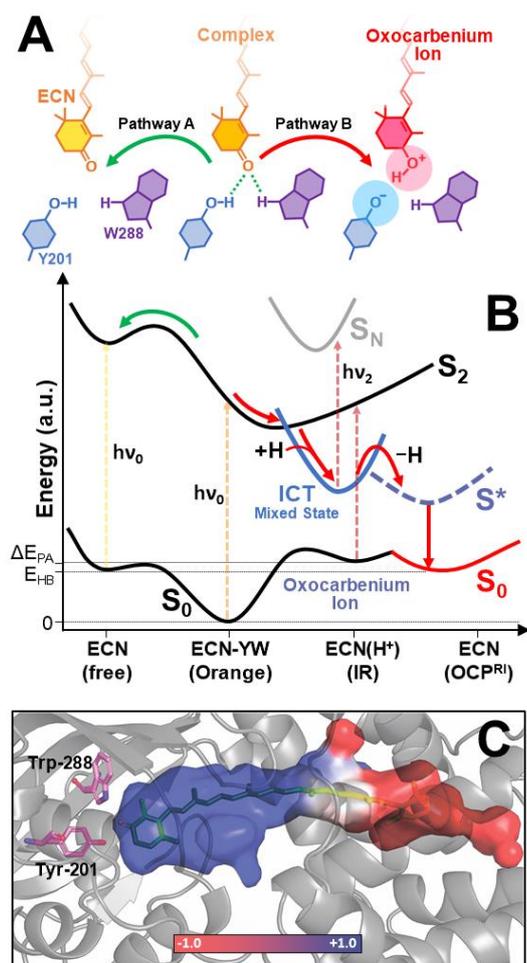


Рис. 12. Возможный механизм разрыва водородных связей между белком и каротиноидом в OCP. Пояснения к рисунку в тексте. Рисунок из статьи [40].

электронов молекулы каротиноида. Показано, что асимметричное распределение заряженных групп в белке формирует градиент электростатического потенциала, при этом положительно заряженные остатки сосредоточены там, где расположены доноры водородных связей и происходит связывание кето-группы каротиноида, а отрицательно заряженные остатки преобладают в N-домене (см. рис. 12). Заряды, локализованные вблизи с полиеновой цепью каротиноида, оказывают влияние на сродство каротиноида к протону даже на значительном расстоянии от кислорода в составе кето-группы каротиноида из-за поляризации сопряженной системы. Локально распределенные заряды взаимодействуют с возбужденными состояниями каротиноида, в которых происходит перераспределение электронной плотности. Иначе говоря, фотовозбуждение кето-каротиноида в OCP, вызывает дополнительный сдвиг электронной плотности в сторону кислорода, тем самым увеличивая его отрицательный заряд. Мы

предполагаем, что этот эффект, вызывает обратимую ионизацию одного из доноров водородных связей с образованием нестабильного иона оксокарбения.

Для оценки свойства протонированного кето-каротиноида, мы выполнили квантово-химические расчеты и провели модельные эксперименты с помощью стационарной абсорбционной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния. Показан значительный (~ 400 нм) батохромный сдвиг спектра поглощения иона оксокарбения и снижение вклада колебаний -C-C- связей в спектре комбинационного рассеяния, в результате перераспределения электронной плотности, которое влияет на эффективные длины связей в сопряженной системе. Следовательно, 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). После депротонирования каротиноид вновь оказывается в неравновесном состоянии с измененной конформацией (S*), в которой расстояние между кислородом кето-группы и остатками W288 и Y201 велико и не обеспечивает образование водородной связи. Последующие изменения структуры каротиноида, освободившегося от водородных связей, связаны с самопроизвольной изомеризацией – поворотом β -иононового кольца в С-домене ОСР.

Установлено, что квантовый выход первого фотопродукта составляет 1.5 %, а активной красной формы ОСР не превышает 0.2 % [17, 34]. Вероятно, это необходимо для выполнения ОСР фотозащитных функций только при высоких интенсивностях света, иначе работа фотосинтетического аппарата цианобактерий ингибировалась бы при безопасных для клетки уровнях инсоляции, что негативно сказывалось бы на скорости роста культуры. Несмотря на высокую скорость разрыва водородной связи между каротиноидом и белком, реорганизация белковой матрицы ОСР протекает значительно медленнее. Для обнаружения промежуточных конформационных состояний белка мы использовали флеш-фотолиз и флуоресцентную спектроскопию в режиме накачки-зондирования (см. *рис. 13*). Для дикого типа ОСР кинетика изменения оптической плотности характеризуется наличием как минимум трех компонент с временами релаксации 300 мкс, 18 мс и 3.3 с с вкладами 31, 12 и 57 %, соответственно [17]. Медленная компонента кинетики соответствует релаксации ОСР с наибольшими изменениями конформации белковой матрицы – финальной физиологически активной красной формы ОСР^R. Согласно структурным данным, полученным нами с применением методов малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) [27], рассеяния нейтронов (SANS) (см. *рис. 14*) и квазиэластического рассеяния нейтронов (QENS) [28], а также эксклюзионной хроматографии (SEC) [14] и флуоресцентной корреляционной спектроскопии [24] финальная красная форма ОСР^R характеризуется большим (по сравнению с ОСР^O) гидродинамическим

радиусом, большей подвижностью элементов вторичной структуры.

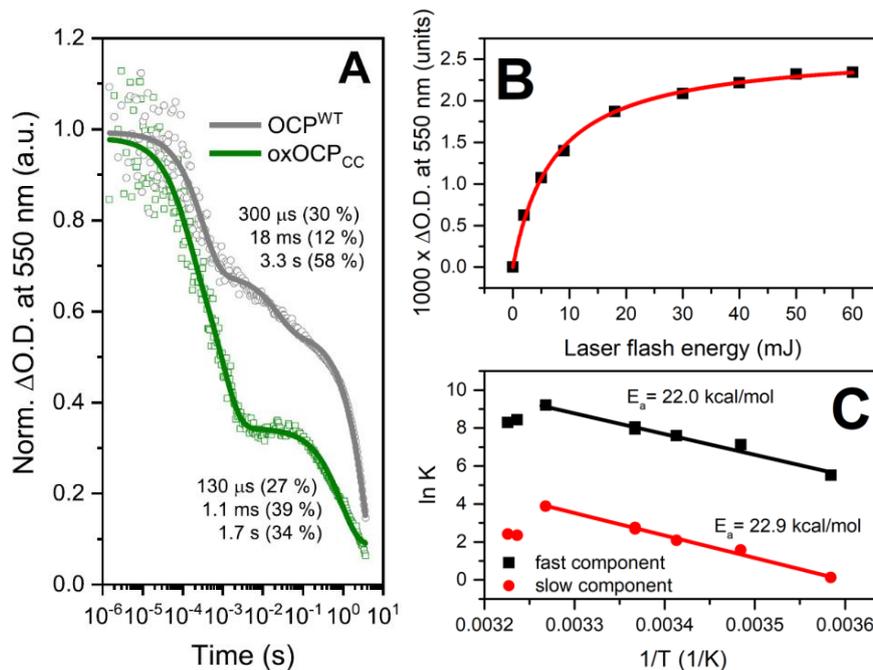


Рис. 13. Релаксация красных форм ОСР после возбуждения наносекундными лазерными импульсами. **А** – кинетика изменения оптической плотности при 550 нм ОСР дикого типа (серая линия) и мутанта ОСР_{CC} в окисленной форме (зеленая линия), характеризующейся ковалентной связью между NTE и участком в С-доме 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 для определения энергии активации E_a . Рисунки из статей [17, 36]

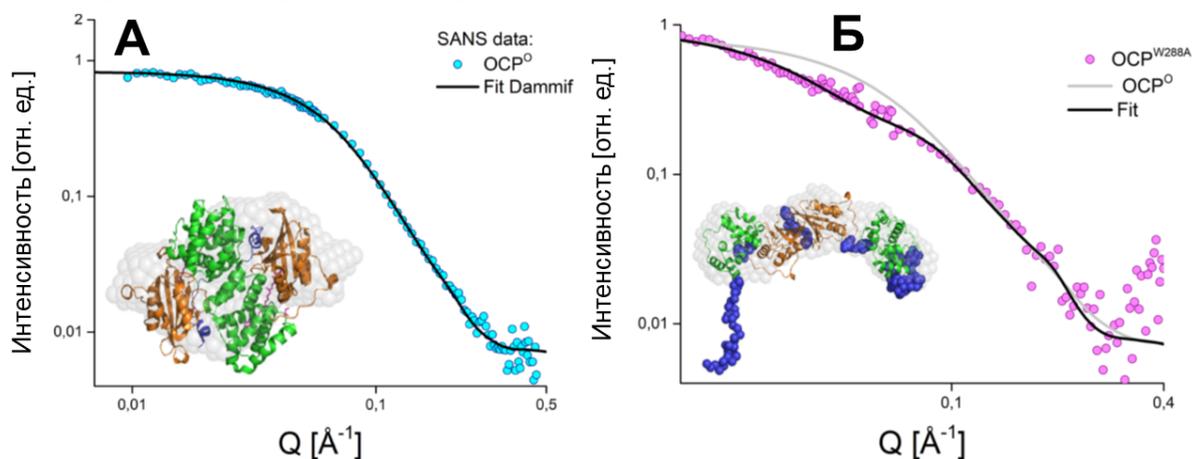


Рис. 14. **А** - анализ данных SANS для препарата ОСР 1 мг/мл, измеренных в темноте при 15 °С (голубые точки). Модель (черная линия) соответствующая реконструированной структуре ОСР в растворе (показана сферами серого цвета на вставке), получена с помощью пакета программ DAMMIF и кристаллической структуры 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 данным рентгеноструктурного анализа холо-формы N-домена ОСР и нашим экспериментам по флуоресцентному мечению белка (см. раздел 3.1), в результате фотоактивации каротиноид может переместиться в N-домен ОСР. Для восстановления контактов с донорами водородных связей необходимо чтобы N- и C-домены были специфически ориентированы друг относительно друга. Поскольку в активной красной форме движения N- и C-доменов ОСР ограничены гибким линкером, подходящая для релаксации конфигурация встречается редко, что определяет большое 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 в которых структурные домены ОСР не расходятся за счет сохранения ряда белок-белковых контактов. Это подтверждается экспериментами, в которых нам удалось ограничить подвижность структурных доменов: за счет введения ковалентных связей между областями белок-белковых контактов (ОСР-I5C/F299C [36]), за счет высоких концентраций космотропов [17] и, наконец, за счет специфических взаимодействий с FRP – белком, регулирующим активность ОСР в клетке [20]. Во всех случаях ограничение подвижности структурных элементов ОСР способствовало значительному увеличению скорости релаксации красных форм (см. *рис. 13*).

Несмотря на большие различия характерных времен релаксации различных красных состояний ОСР, механизм элементарной реакции релаксации одинаков для всех форм. В пользу этого свидетельствует идентичность активационных барьеров для быстрых и медленных стадий (см. *рис. 13C*). 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 форм, что влияет на количество попыток, необходимых для осуществления данной реакции, но не на механизм [17]. Мы показали, что скорость изменения конформации каротиноида при фотоактивации и последующей релаксации ОСР значительно опережают структурные изменения белковой матрицы. Следовательно, спектр поглощения ОСР не является индикатором функционального состояния белка, поскольку возможность взаимодействия ОСР с антенными комплексами и регуляторными белками определяется белок-белковыми контактами. Таким образом, потенциально ОСР может проявлять функциональную активность находясь как в красном, так и в оранжевом состоянии.

Обобщив всю доступную на данный момент информацию, мы предлагаем схему последовательных реакций фотоцикла ОСР, который включает 11 состояний (см. *рис. 15*), 7 из которых впервые охарактеризованы нами.

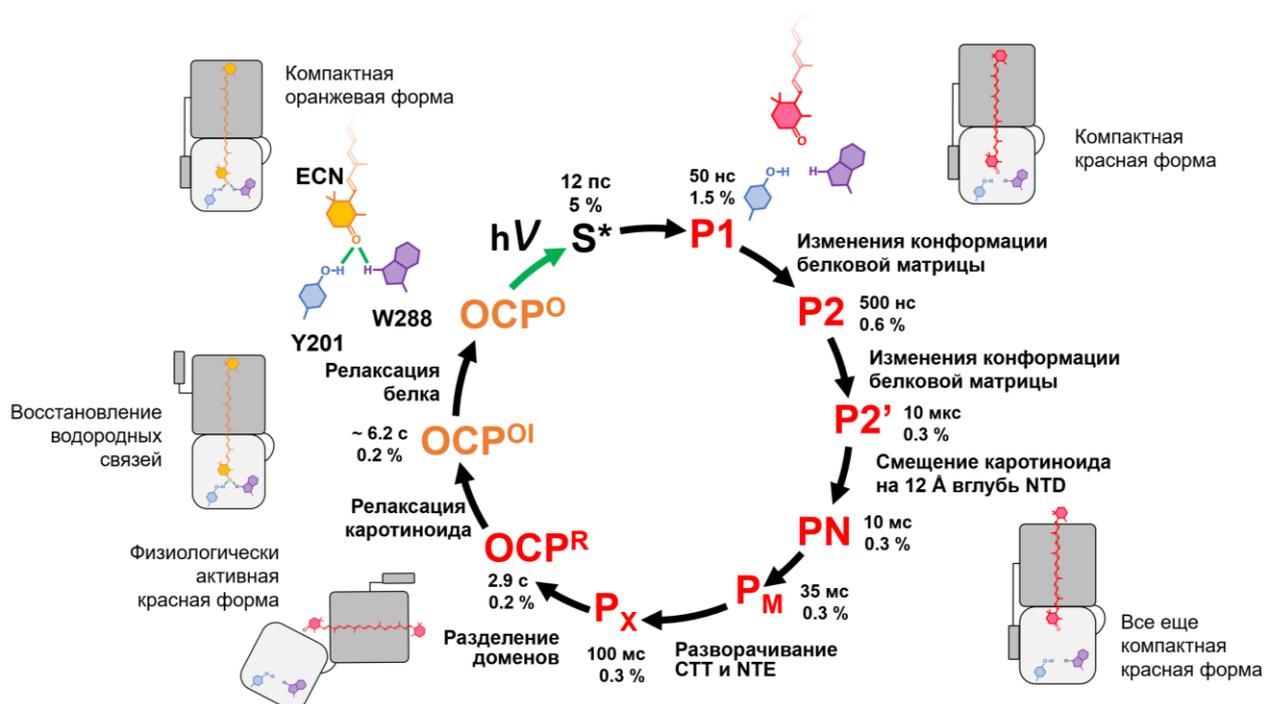


Рис. 15. Фотоцикл Оранжевого Каротиноидного Белка. благодаря неоднородному распределению зарядов в белковом окружении в возбужденной молекуле кето-каротиноида за несколько сотен фс происходит перераспределение электронной плотности таким образом, что отрицательный заряд концентрируется в районе кислорода 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 ~ 1 -10 мкс ($P2'$). При разрыве солевого мостика между остатками R155 и E244 структурные домены OCP 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 OCP расходятся, оставаясь соединенными неструктурированным междоменным линкером, с образованием финальной формы (OCP^R).

Выводы к разделу 3.2. Фотоцикл оранжевого каротиноидного белка. Фотоактивация OCP требует разрыва водородных связей. Реакция обусловлена перераспределением электронной плотности каротиноида в возбужденном состоянии, сопряженным с обратимым протонированием кето-группы каротиноида. Спектральная гетерогенность поглощения неактивной оранжевой формы OCP обусловлена конкуренцией между остатками Y201 и W288 за водородную связь с кето-каротиноидом, которая снижает квантовый выход первичного фотопродукта. Разрыв водородной связи происходит за времена порядка 23 пс, что

свидетельствует об определяющей роли состояния S* в фотоактивации ОСР. Фотоцикл ОСР характеризуется многочисленными интермедиатами, асинхронностью изменений конфигурации каротиноида и белковой матриц, а также низким квантовым выходом активной формы (0.2 % для дикого типа ОСР). Точечные замены аминокислот в областях ключевых белок-белковых и белок-каротиноидных контактов позволяют контролировать фотоцикл ОСР.

Для наибольшей эффективности синтетических реакций необходим баланс между светосбором и защитой от фотоповреждения. В противном случае клетки могут испытывать стресс из-за образования АФК при избыточном освещении или, напротив, дефицит энергетических ресурсов при недостаточной активности фотосинтетического аппарата. Для восстановления фотосинтетической активности необходимы механизмы позволяющие разобрать комплекс ФБС-ОСР и инактивировать красную форму ОСР^R. Раздел **3.3 Белок-белковые взаимодействия в основе регуляции фотозащитных реакций** посвящен изучению взаимодействия регуляторного белка FRP с ОСР.

Из-за самопроизвольной релаксации изучение взаимодействия активного состояния ОСР с другими белками является нетривиальной задачей. Для решения этой проблемы нами были получены мутанты ОСР-Y201A, ОСР-W288A и ОСР-Y201A/W288A (ОСР^{AA}), являющиеся аналогами активной формы ОСР [14, 17, 20, 40]. При добавлении к раствору ФБС мутант ОСР^{AA} вызывает необратимое тушение флуоресценции. Буферные растворы с высокой концентрацией солей фосфатов используются для работы с выделенными ФБС для повышения их стабильности *in vitro*. Мы обнаружили что в растворах с высоким содержанием космотропов спектр поглощения красной фракции ОСР-W288A постепенно меняется, приобретая форму характерную для оранжевой фотоактивной фракции ОСР (*рис. 16*) [17]. Высокие концентрации фосфата, действуя на белковую структуру ОСР-W288A неспецифически способствуют рефолдингу, схожие эффекты нам удалось обнаружить при взаимодействии красной фракции ОСР-W288A с регуляторным белком FRP.

В результате взаимодействия красной формы дикого типа ОСР с FRP образовавшийся комплекс быстро распадается т.к. FRP ускоряет переход из красной формы в оранжевую, а с оранжевым компактным ОСР FRP практически не взаимодействует [20]. Комплекс ОСР-W288A - FRP оказался стабильным, и мы смогли охарактеризовать его размер и стехиометрию с помощью набора биохимических и биофизических методов [20, 22, 24, 25, 26]. Нами впервые было показано, что FRP, являясь в растворе стабильным димером, мономеризуется при взаимодействии с активированным ОСР, а гидродинамический размер образующегося комплекса значительно меньше, чем суммарный размер двух мономеров ОСР-W288A и FRP,

т.е. происходит компактизация и, вероятно, упорядочивание структуры OCP-W288A, что выражается в характерном для OCP⁰ гипсохромном сдвиге спектра поглощения и восстановлении вибронной структуры. Поскольку переход красной формы OCP-W288A в оранжевую форму требует восстановления водородной связи с остатком Y201, которое невозможно без правильной ориентации N- и C-доменов OCP, мы предположили, что FRP, связываясь активной формой OCP, способствует сближению доменов и восстановлению структуры гидрофобной области внутри OCP.

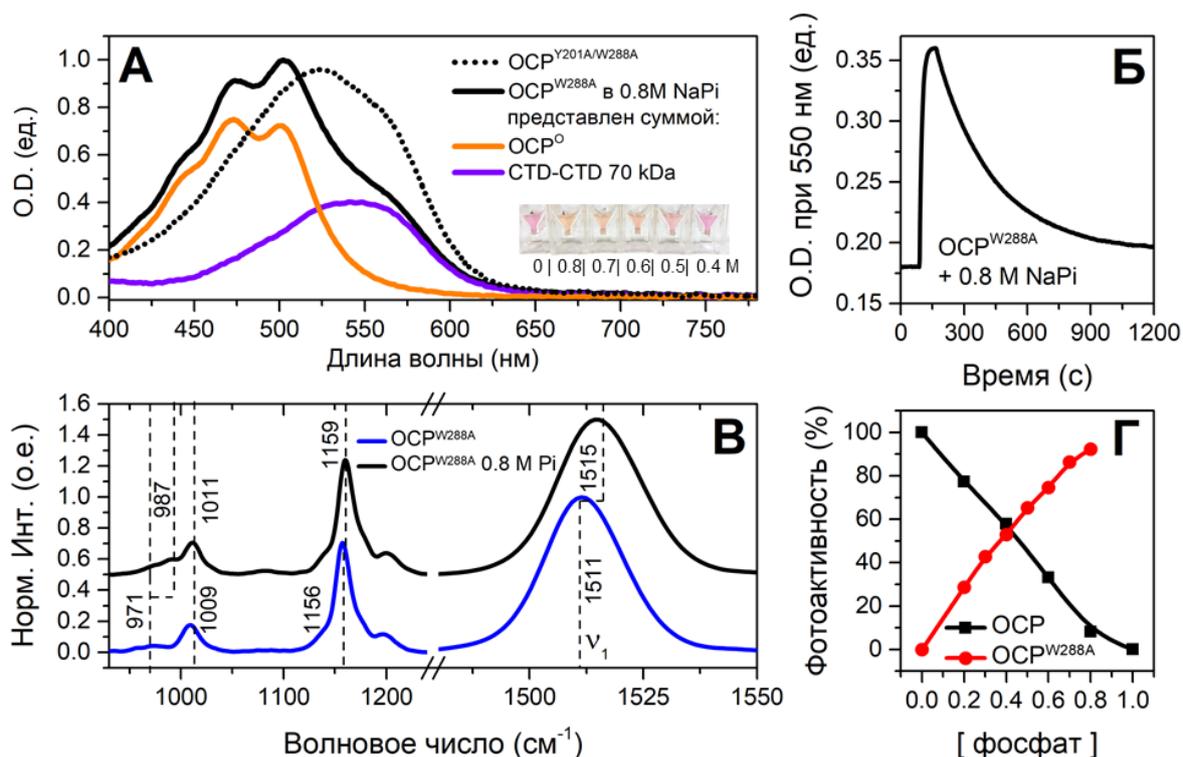


Рис. 16. Влияние фосфата на оптические свойства и фотоактивность OCP-W288A. **А** – спектр поглощения мутантов OCP лишенных одного (W288A) и двух (Y201A/W288A) аминокислот, образующих водородные связи с кето-каротиноидом, в 0.8 М фосфатном буфере. Фото показывает изменение цвета препарата при увеличении 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. Рисунок из статьи [17].

С момента открытия FRP в 2011 году и до публикации нашей работы [20], 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 (рис. 17). Несмотря на многократное увеличение скорости релаксации красной формы OCP^R в присутствии FRP, изменения энтальпии и энтропии переходов малы. Таким образом, FRP не влияет на механизм релаксации красной формы, а лишь сокращает количество попыток, необходимых для восстановления исходного положения каротиноида в

С-домене ОСР. Мы предположили, что FRP выполняет роль стабилизатора («scaffold»), ограничивая конформационную подвижность доменов ОСР. Для доказательства этой гипотезы нам необходимо было определить участки взаимодействия ОСР и FRP.

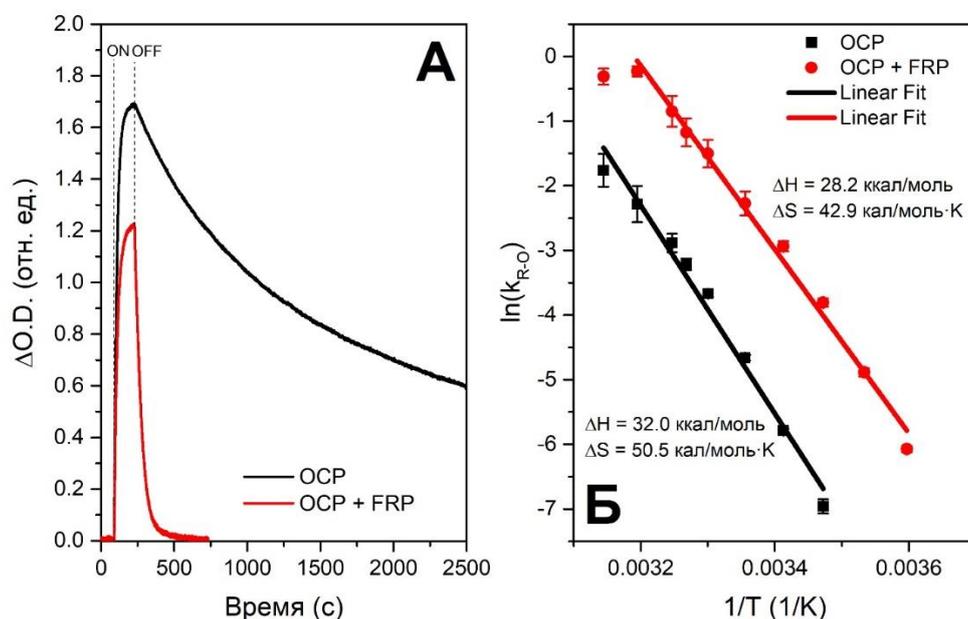


Рис. 17. Влияние FRP на фотоиндуцированное образование и термодинамику релаксации красной формы ОСР. **А** – кинетики фотоиндуцированных изменений оптической плотности при 550 нм препарата ОСР в отсутствии (черная линия) и в присутствии FRP (красная линия) при 15 °С. Моменты включения и выключения синего диода отмечены пунктирными линиями. **Б** – температурные зависимости скорости релаксации красной формы ОСР в отсутствии (черная линия) и в присутствии FRP (красная линия) в координатах Аррениуса.

Установлено, что в красной форме ОСР открывается основной сайт взаимодействия FRP с ОСР, который недоступен в оранжевой компактной форме ОСР, поэтому взаимодействие с ней осуществляется неэффективно ($K_d = 35$ мкМ). Далее, мы показали что FRP образует комплекс с апо-формой ОСР с эффективностью, сравнимой с его взаимодействием с ОСР^R или красной фракцией ОСР-W288A ($K_d = 2.3$ мкМ). Таким образом, взаимодействие FRP с ОСР определяется белок-белковыми взаимодействиями и не связано с состоянием хромофора и его наличием. Далее мы проверили способность FRP взаимодействовать с отдельными фрагментами ОСР и показали, что FRP не взаимодействует с N-доменом ОСР, но эффективно связывается с С-доменом ОСР. Следовательно, основной сайт взаимодействия ОСР с FRP располагается в С-домене. Анализ последовательности FRP и сравнение её с ОСР позволил нам выявить сходства как первичной структуры, так и укладки пептидов ¹²AETQSAHALFR²² в последовательности FRP и пептида ³FTIDSARGIFP¹³ ОСР, расположенного в короткой α-спирали NTE [22]. Это стимулировало наш интерес к исследованию свойств мутанта, лишённого NTE. Основная фракция ΔNTE(O) — это оранжевый белок, полностью соответствующий неактивной форме дикого типа ОСР. Мы обнаружили, что ΔNTE(O)

взаимодействует с FRP с образованием комплекса 1 к 1, с константой диссоциации 0.6 мкМ (рис. 18). Таким образом, отсутствие NTE открывает возможность взаимодействия FRP с ОСР даже в оранжевой форме.

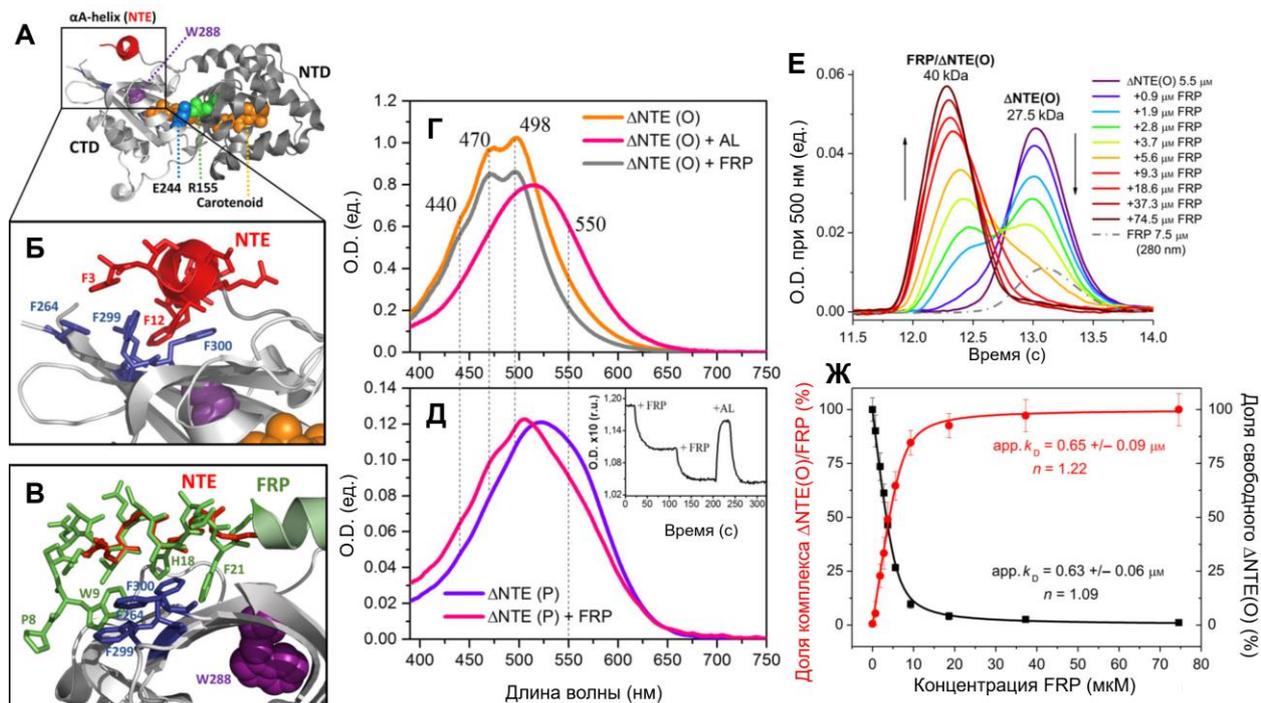


Рис. 18. Роль специфического участка в С-доме ОСР в регуляции взаимодействий с FRP. **А, Б и В** – сравнение элементов структуры ОСР и FRP, отвечающих за взаимодействие с С-доме ОСР. Влияние FRP на спектр поглощения оранжевой (**Г**) и красно-пурпурной (**Д**) фракции ОСР ΔNTE. Вставка показывает, как добавление FRP к красно-пурпурной фракции постепенно снижает оптическую плотность препарата при 550 нм за счёт образования оранжевой формы. **Е** – хроматографические профили элюции ΔNTE(O), FRP и их комплексов при различных концентрациях FRP. **Ж** – кривые связывания, построенные по изменениям интенсивностей пиков ΔNTE(O) и FRP на хроматограммах, позволившие определить кажущуюся константу диссоциации комплекса k_D .

Препарат ΔNTE(O) является моделью интермедиата фотоцикла ОСР (P^X), у которого короткая αА-спираль отсоединилась от С-доме или еще не вернулась в исходное положение после релаксации кето-каротиноида и восстановления водородной связи в С-доме (рис. 15). Интермедиат P_X , возникает непосредственно перед образованием функционально активной красной формы ОСР^R, взаимодействующей с ФБС.

Анализ структуры различных FRP и комплекса ΔNTE(O)-ccFRP-L33C/I43C низкого разрешения, полученного с помощью SAXS, и данных о взаимодействии точечных мутантов, показал, что область взаимодействия белков, образующих зону контакта между β-складчатым участком С-доме ОСР и группой α спиралей FRP, может быть ограничена областью расположения остатков F299 в составе ОСР и двух остатков FRP: F76 и K102 [26]. Для проверки этой гипотезы и валидации модели комплекса, полученной с помощью SAXS, были сконструированы мутанты FRP–K102C, FRP–F76C и ОСР-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.

Образование комплекса FRP с интермедиатом P^X играет важную роль в регуляции нефотохимического тушения. Полученные нами экспериментальные данные позволили построить математическую модель, описывающую взаимодействия OCP, FRP и ФБС *in vitro* и *in vivo*. С помощью модели мы оценили внутриклеточные концентрации OCP и FRP. При нормальных условиях в клетках *Synechocystis* количество OCP примерно в 2 раза меньше, чем количество ФБС, а FRP примерно в 10 раз меньше, чем OCP [19, 39]. Эти результаты хорошо согласуются с данными об экспрессии соответствующих генов. Следствием проведенного анализа является гипотеза об отсутствии прямого взаимодействия между FRP и комплекса OCP^R-ФБС.

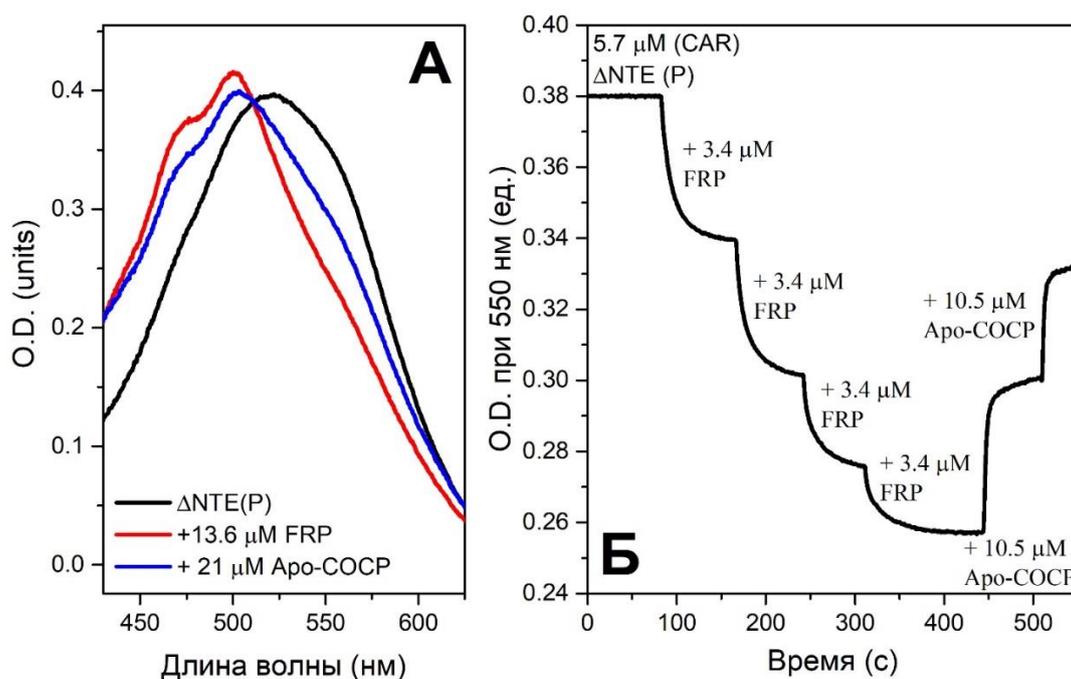


Рис. 20. Обратимое связывание FRP с $\Delta NTE(P)$ -OCP и апо-формой С-домена OCP (Apo-COCP). **А** – взаимодействие FRP с пурпурно-красной формой $\Delta NTE(P)$ приводит к восстановлению компактного оранжевого состояния OCP с выраженной вибронной структуре в спектре поглощения. Данный эффект обратим при добавлении к раствору апо-формы С-домена OCP (**Б**), которое приводит к постепенному исчезновению вибронной структуры.

Используя фрагмент С-домена OCP, обладающий открытым участком для связывания FRP, мы показали, что образование любого комплекса OCP-FRP является обратимым даже в отсутствии NTE способной конкурировать за участок связывания FRP (рис. 20). Для этого мы использовали способность FRP стабилизировать красную фракцию OCP $\Delta NTE(P)$ и

восстанавливать оранжевую форму с выраженной вибронной структурой спектра поглощения. Мы предположили, что связывание FRP является обратимым, поэтому 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. 20). Таким образом, при описании белок-белковых взаимодействий регуляторных белков необходимо учитывать динамическую природу образующихся комплексов.

Выводы к разделу 3.3. Белок-белковые взаимодействия в основе регуляции фотозащитных реакций цианобактерий. FRP 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 Тур-201 и Тгр-288. Удаление короткой N-концевой α -спирали ОСР (как за счет мутаций, так и при фотоактивации) открывает область β -складчатого участка в С-домеене ОСР, являющуюся основным сайтом взаимодействия между ОСР и димером FRP. 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. Способность FRP к эффективному взаимодействию с интермедиатами ОСР, предшествующими образованию активных форм, позволяет ингибировать нефотохимическое тушение ФБС даже при низких концентрациях FRP.

Каротиноиды нерастворимы в воде, поэтому обычно локализованы в клеточных мембранах. Для сборки холо-формы ОСР необходимо, чтобы гидрофобный каротиноид переместился в соответствующую область белковой матрицы водорастворимой апо-формы ОСР. Раздел **3.4 Белок-опосредованный транспорт каротиноидов** посвящен исследованию механизма данной реакции.

Одной из важных промежуточных стадий фотоцикла ОСР является внутримолекулярный перенос каротиноида, в результате которого каротиноид смещается примерно на 12 Å и оказывается в N-домеене. После этого события роль регуляторного С-домена ОСР (СОСР) заключается в восстановлении белок-хромофорных контактов и инактивации красного состояния ОСР. Для изучения функциональной активности С-домена ОСР мы решили синтезировать его отдельно от N-домена.

Установлено, что СОСР (в отсутствии N-домена) способен связывать различные

каротиноиды – эхиненон, кантаксантин и зеаксантин [18]. Во всех случаях спектры поглощения СОСР значительно отличались от спектров каротиноидов в органических растворителях. Более того, спектры поглощения СОСР отличались от красной формы ОСР, значительным (более 30 нм) батохромным сдвигом поглощения. Планарная структура кантаксантина в СОСР может поддерживаться за счет образования двух пар водородных связей с каждой кето-группой каротиноида. Это возможно в случае образования белкового димера, что подтверждено с помощью эксклюзионной хроматографии (рис. 21). Удаление одного из доноров водородной связи (W288A, нумерация в соответствии с полноразмерным ОСР) нарушает белок-хромофорные взаимодействия, стабилизирующие димерные формы СОСР. Показано, что спектр поглощения мутанта СОСР-W288A, связывающего кантаксантин с двумя кето-группами, практически не отличался от спектра поглощения СОСР с эхиненоном, обладающим одной кето-группой [32, 33].

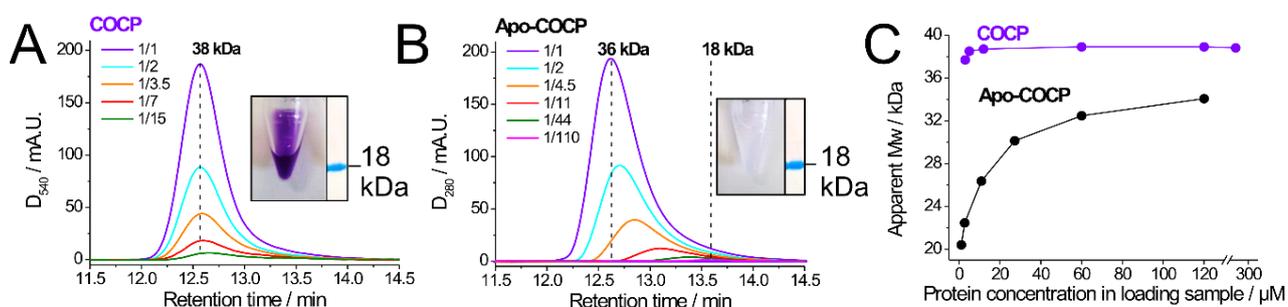


Рис. 21. Определение олигомерного состояния холо-СОСР и апо-СОСР методом эксклюзионной хроматографии. Профили элюции СОСР (А) и апо-СОСР (В), регистрируемые по поглощению каротиноида и белка, соответственно, при разных разведениях белковых препаратов. Фотографии показывают пробирки с растворами белков. С – зависимости кажущихся молекулярных масс белков СОСР и апо-СОСР, рассчитанных по положению пика элюции, от концентрации белка. Рисунок из статьи [18].

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. Вероятно, симметрия распределения зарядов в идентичных белковых субъединицах СОСР не позволяет обеспечить перераспределения электронной плотности в молекуле кето-каротиноида, необходимое для разрыва водородных связей.

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 [22]. Показана способность холо-формы

СОСР взаимодействовать с апо-формой RCP (N-домен ОСР). 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. 22*). 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 [18]. 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. 23*).

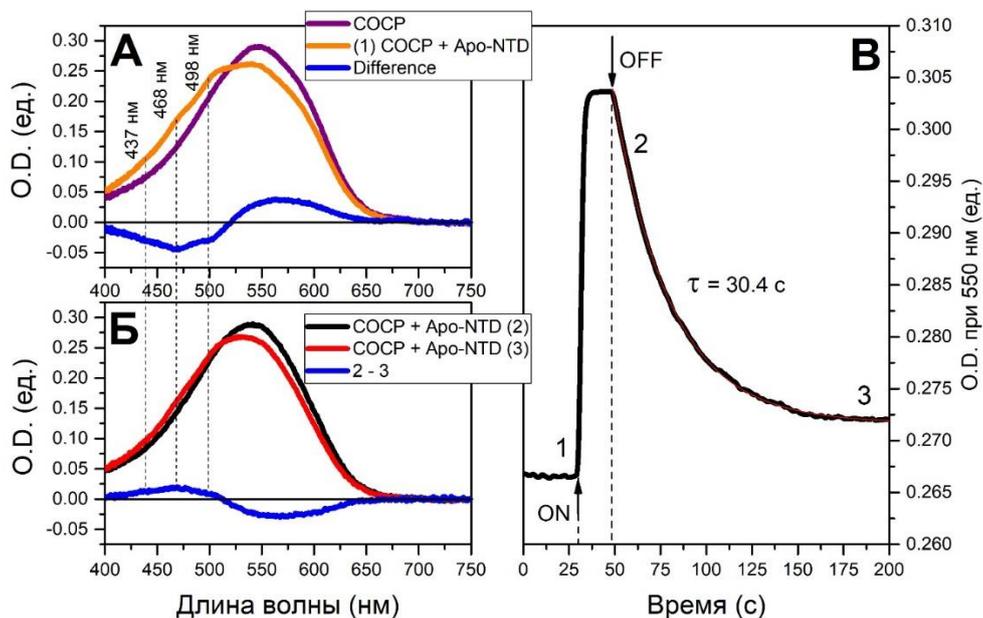


Рис. 22. А - взаимодействия между СОСР и апо-формой N-домена ОСР приводят к образованию нового состояния, характеризующегося схожим с оранжевым ОСР спектром поглощения (1). Б и В – освещение раствора СОСР и апо-формой N-домена ОСР синим светом приводит к обратимым изменениям оптической плотности, характерным для накопления активной красной формы ОСР^R (2). Однако, после выключения актиничного света наблюдается лишь частичная релаксация красной формы (3). Рисунок из статьи [18].

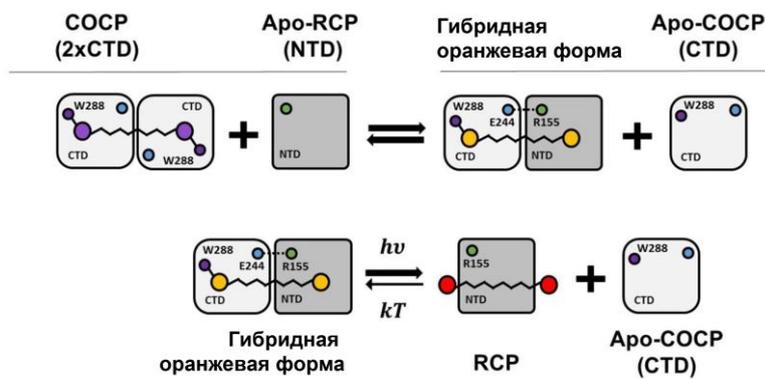


Рис. 23. Схема взаимодействия между СОСР и апо-формой N-домена ОСР: реконструкция фотоактивного оранжевого гетеродимера из отдельных доменов ОСР. Рисунок из статьи [18].

Структура, спектральные характеристики и функциональные свойства природных гомологов N-домена OCP (HCP) мало отличаются от RCP. Многие HCP способны взаимодействовать с ФБС, вызывая тушение её флуоресценции, аналогично RCP или другим аналогам красной формы OCP^R – без предварительной фотоактивации. Апо-форма HCP, как и RCP, способна взаимодействовать с COCP и её природными гомологами (CTDH), однако в результате этих взаимодействий чаще всего образуется не оранжевый гетеродимер, а холо-форма HCP [23, 33]. Вероятно, оранжевый гетеродимер является промежуточной стадией при передаче каротиноида из C-домена в HCP (см. рис. 24).

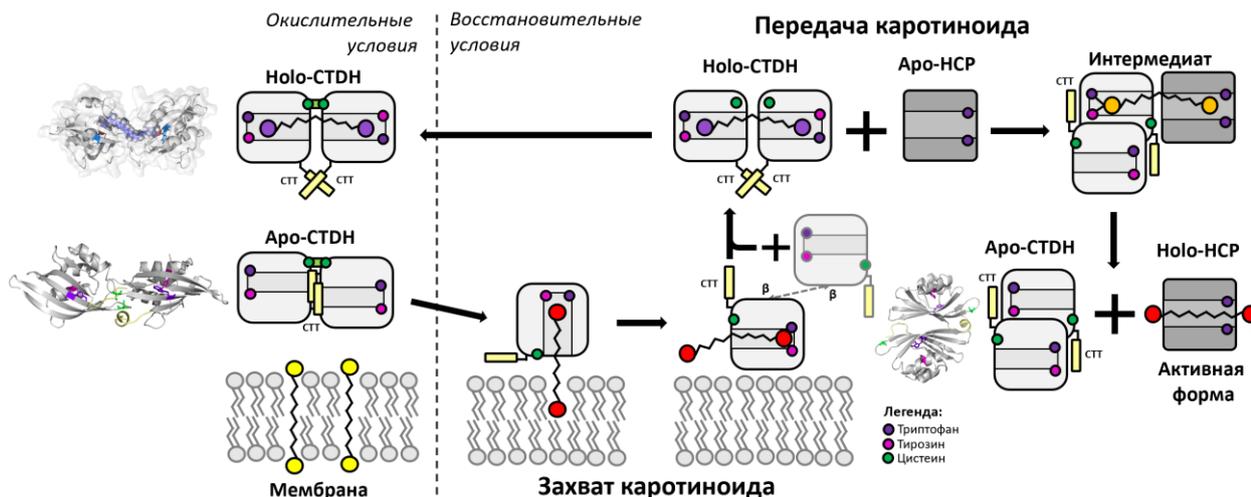


Рис. 24. Перенос каротиноидов между липидной мембраной и белками. В условиях, когда цистеины-104 окислены и STDH находится в мономерном состоянии возможен захват каротиноида из мембраны за счет образования водородных связей между кето-группой и остатками тирозина и триптофана в белке. Димерная форма 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 ФБС. Такой фотозащитный механизм не требует фотоактивации.

Среди природных гомологов C-домена OCP для исследования нами был выбран белок STDH из *Anabaena*, интересный тем, что в его структуре есть цистеин-104, отсутствующий в других STDH. Мы показали, что STDH 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 STDH может зависеть от редокс состояния клетки [33]. При взаимодействии холо-формы STDH с апо-формой HCP1 происходит перенос каротиноида в HCP1, однако эта реакция обратима и при увеличении концентрации апо-формы AnaSTDH происходит перенос каротиноида обратно в STDH. Таким образом положение каротиноида в том или ином гомологе структурных доменов OCP может определяться концентрацией соответствующих белков и редокс состоянием среды, что открывает возможность для

регуляции фотозащитных механизмов без участия фотоактивных белков (см. *рис. 24*).

С помощью рентгеноструктурного анализа мы показали, что структура апо-формы STDH (PDB ID 6FEJ) отличается от структуры С-домена рядом важных особенностей [233]. Во-первых, в апо форме STDH 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. 24*). Возможность реализации такой конфигурации в растворе была подтверждена нами с помощью SAXS [33]. Во-вторых, С-концевая петля (СТТ) STDH обладает значительной подвижностью (что подтверждается исследованиями с помощью ЯМР) и может перемещаться между внешней поверхностью белка и внутренней полостью, блокируя её и тем самым мешая каротиноиду добраться до остатков Y201 и W288. 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 [18].

В экспериментах на липосомах содержащих кантаксантин нами было показано, что STDH способен экстрагировать кантаксантин с 90% эффективностью. Большинство природных гомологов N-доменов OCP не способны забирать каротиноид из мембраны самостоятельно, что повышает значимость STDH как переносчика каротиноида между мембранами и белками (*рис. 24*). Мы установили, что апо-форма STDH 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 [35]. Это говорит о том, что апо-форма ApoSTDH образует контакты с полярными головками соседних мембранных липидов в модельных мембранах вследствие электростатических взаимодействий. Вероятно, что СТТ, содержащий заряженные остатки E133 и R138, может действовать как якорь для образования контактов с мембраной и увеличения вероятности экстракции каротиноидов.

Добавление STDH с эхиненоном к раствору липосом приводило к доставке каротиноида из белка в липосомы. Это подтверждается повышением концентрации апо-формы STDH и изменениями формы спектров поглощения и комбинационного рассеяния эхиненона (*рис. 25*). Показав, что STDH способен доставлять эхиненон в модельные мембраны с эффективностью ~ 70 % мы испытали эту систему на культурах стволовых клеток НЕК293, линиях HeLa, Tet21N (нейробластома) и карциномы яичников. С помощью конфокальной

микроскопии комбинационного рассеяния мы показали, что добавление СТДН с эхиненоном в среды с клетками приводит к встраиванию каротиноидов в плазматическую мембрану и последующему распределению каротиноидов по внутриклеточным мембранам (рис. 25).

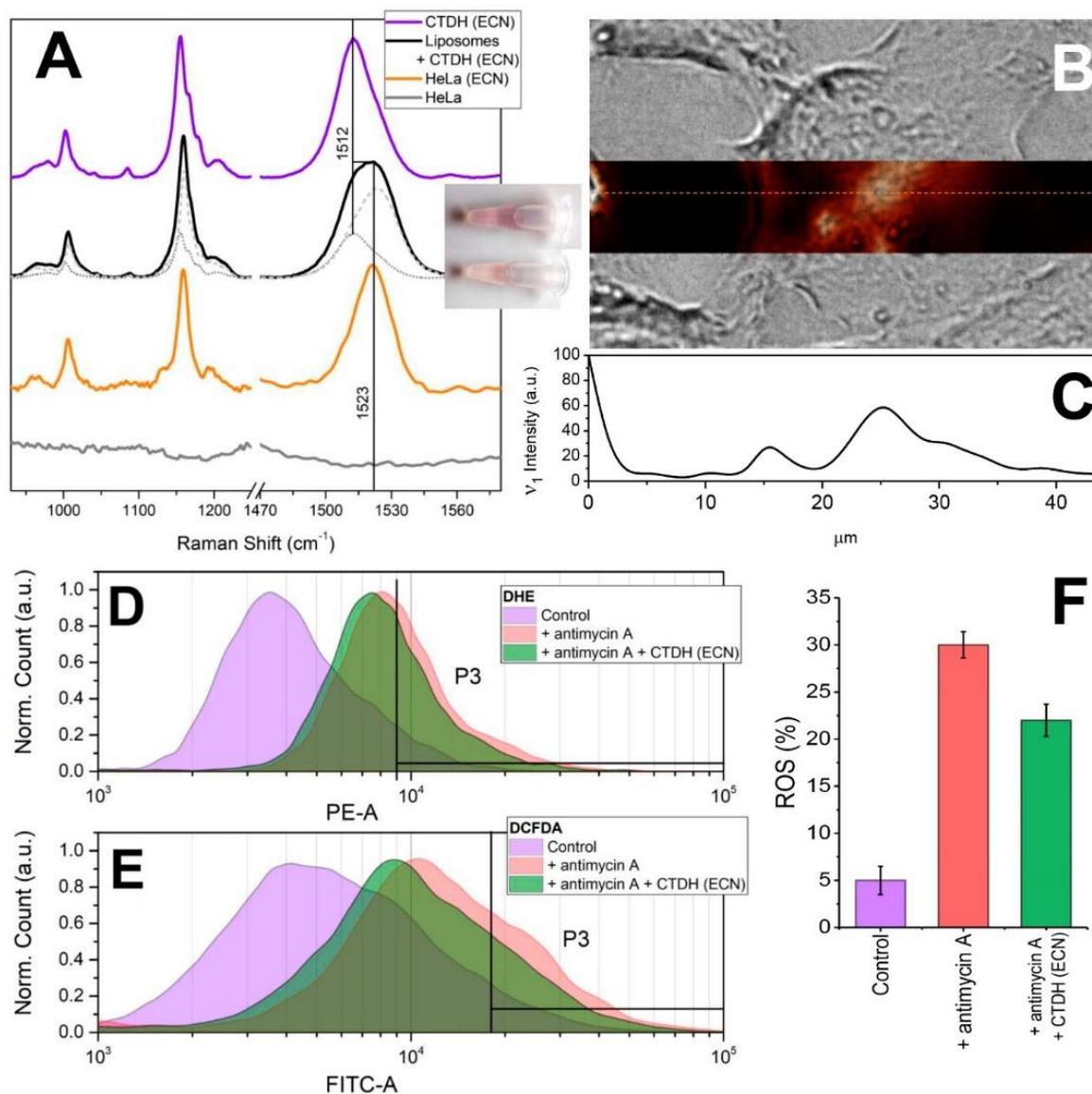


Рис. 25. Доставка эхиненона в клеточные мембраны при добавлении AnaSTDH в культуральную среду. **A** – спектры комбинационного рассеяния эхиненона в составе белкового препарата AnaSTDH (фиолетовая линия), после инкубации AnaSTDH в растворе липосом (черная линия) и после инкубации в среде с клетками HeLa (оранжевая линия). **B** – совмещение изображений клетки HeLa в проходящем свете и полученного с помощью микроскопии в режиме регистрации спектров комбинационного рассеяния. **C** – сечение вдоль пунктирной линии на **B**, показывающее интенсивность полосы 1520 см⁻¹ в спектрах комбинационного рассеяния. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации каротиноидов. **D** и **E** - интенсивность флуоресценции клеток Tet21N, окрашенных диэтилимидом (DHE) и диацетатом дихлордигидрофлуоресцином (DCFDA), чувствительных к содержанию активных форм кислорода по данным проточной цитофлуориметрии. Окислительный стресс вызывали добавлением антимицина А в среду культивации. **F** – изменение выхода активных форм кислорода при добавлении в среду AnaSTDH с эхиненоном. Рисунок из статьи [35].

Поскольку каротиноиды являются природными антиоксидантами, их доставка в клетки

с помощью STDH 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. Добавление в культуральную среду 1 мкМ AnaSTDH 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 белок может быть специфически модифицирован для взаимодействия с рецепторами на поверхности определенных клеток и, соответственно, оптимизирован для адресной доставки антиоксиданта. Также разработанный нами подход открывает возможность для сборки 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. 5*).

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 STDH) с апо-формой полноразмерного ОСР из *Synechocystis* (или *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 последующей мономеризации С-доменного переносчика каротиноида. Нам удалось детектировать появление интермедиатов, используя химерные конструкции на основе ОСР и флуоресцентного белка GFP. Сближение СОСР и GFP в комплексе с ОСР сопровождается сокращением времени жизни флуоресценции хромофора GFP, которое происходит из-за переноса энергии электронного возбуждения на каротиноид в составе СОСР [16]. 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 AnaSTDH и ОСР из *Anabaena*), NTE может участвовать в стабилизации контактов в промежуточном комплексе. 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.

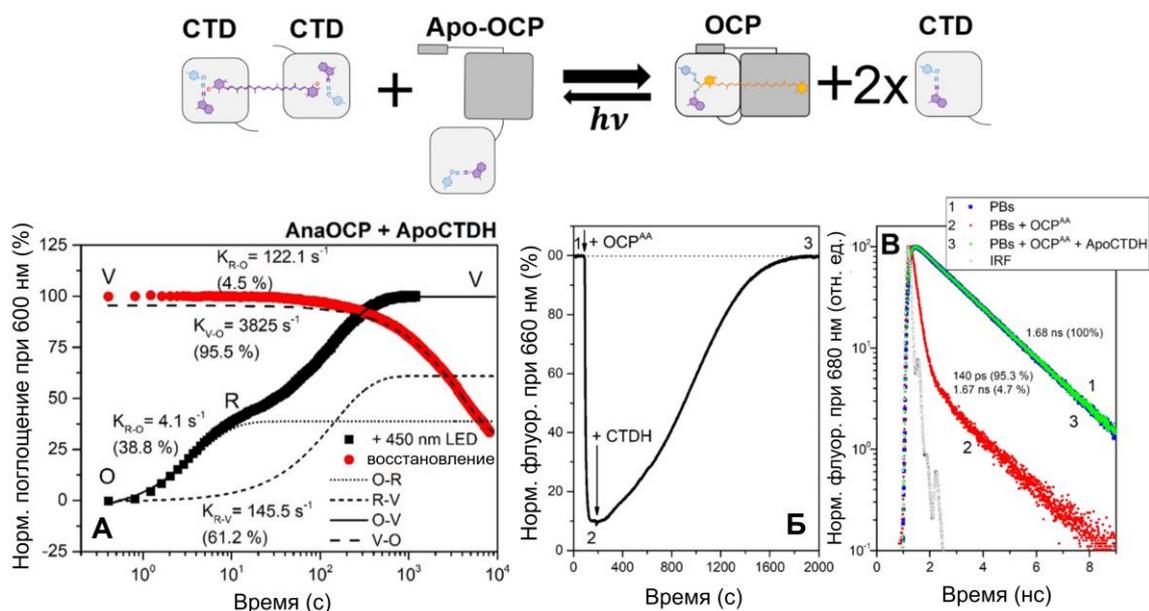


Рис. 26. Сверху: схема обратимого фотоиндуцируемого переноса каротиноида из OCP в АнаSTDH. **А** – черные квадраты показывают изменения поглощения при 600 нм (область наименьших значений коэффициента молярной экстинкции оранжевой формы OCP) при освещении раствора апо-формы гомолога С-домена OCP (STDH) и оранжевого OCP из *Anabaena*. 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 STDH и образование фиоетового гомодимера. После выключения света происходит постепенное восстановление оранжевой формы в результате переноса каротиноида из STDH в OCP. **Б** и **В** – изменения интенсивности и времени жизни флуоресценции ФБС в результате добавления активной формы OCP^{AA} обратимы при добавления в среду апо-формы STDH.

Оранжевая форма OCP не взаимодействует с апо-формами COCP и STDH *in vitro*. Мы показали, что эта реакция может быть инициирована фотоактивацией OCP (см. *рис. 26*). При фотоактивации происходит образование красной активной формы OCP^R, которая, взаимодействуя с апо-формой STDH, передает ей эхиненон. В результате образуется димерная холо-форма STDH. При выключении света реакция полностью обратима [33]. Поскольку мы установили, что STDH может передавать эхиненон в мембраны, мы повторили эксперимент с фотоактивацией OCP в присутствии апо-формы STDH и липосом и показали что STDH значительно ускоряет перенос кето-каротиноида в мембрану липосом при фотоактивации OCP.

Установлено, что при активации нефотохимического тушения флуоресценции ФБС за счет красной формы OCP добавление апо-формы STDH приводит к восстановлению флуоресценции ФБС (см. *рис. 26Б* и *В*). Эффект сопоставим с влиянием FRP на взаимодействие красной формы OCP и ФБС. В данном случае механизм восстановления флуоресценции не связан с релаксацией красной формы и предотвращением её взаимодействия с антенной. STDH «отнимает» каротиноид у красной формы OCP, снижая

эффективную концентрацию активной формы, вызывающей тушение флуоресценции ФБС. 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.

Выводы к разделу 3.4. Белок-опосредованный транспорт каротиноидов. С-домен ОСР и его природные гомологи способны связывать молекулу каротиноида с образованием димеров, характеризующихся уникальными оптическими свойствами. 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*. 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. Образование оранжевой компактной фотоактивной формы ОСР возможно в результате взаимодействия отдельных доменов или их гомологов и не требует соединения их междоменным линкером. Установленные реакции позволяют создавать фотоуправляемые генетически кодируемые (оптогенетические) системы.

В **заключении** приведено обсуждение результатов работы, рекомендации по их использованию и выводы.

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. *рис. 15*). 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. На рис. 27 представлена общая схема процессов, объединяющая фотохимические превращения ОСР (см. рис. 15) и взаимодействия участников нефотохимического тушения. Согласно схеме (рис. 27), фотовозбуждение каротиноида в составе ОСРО 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 рис. 15) и его перемещение между доменами ОСР (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 ОСР с FRP (стадия P_x). Таким образом, комплекс ОСР-FRP может образоваться еще до нарушения белок-белковых контактов между структурными доменами ОСР (NTD и CTD) и появления активного состояния ОСР^R, взаимодействующего с ФБС. Тем самым образование комплекса ОСР-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 (ОСР⁰¹) и релаксацию каротиноида в исходные положение и конфигурацию в С-домене (ОСР⁰). 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. 27).

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. рис. 13 и 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. рис. 21, раздел 3.4), механизмы регуляции фотозащитных реакций за счет белок-опосредованного транспорта каротиноидов (см. рис. 24) и разработать метод высокоэффективной доставки природных антиоксидантов в клетки (см. рис. 25). 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.

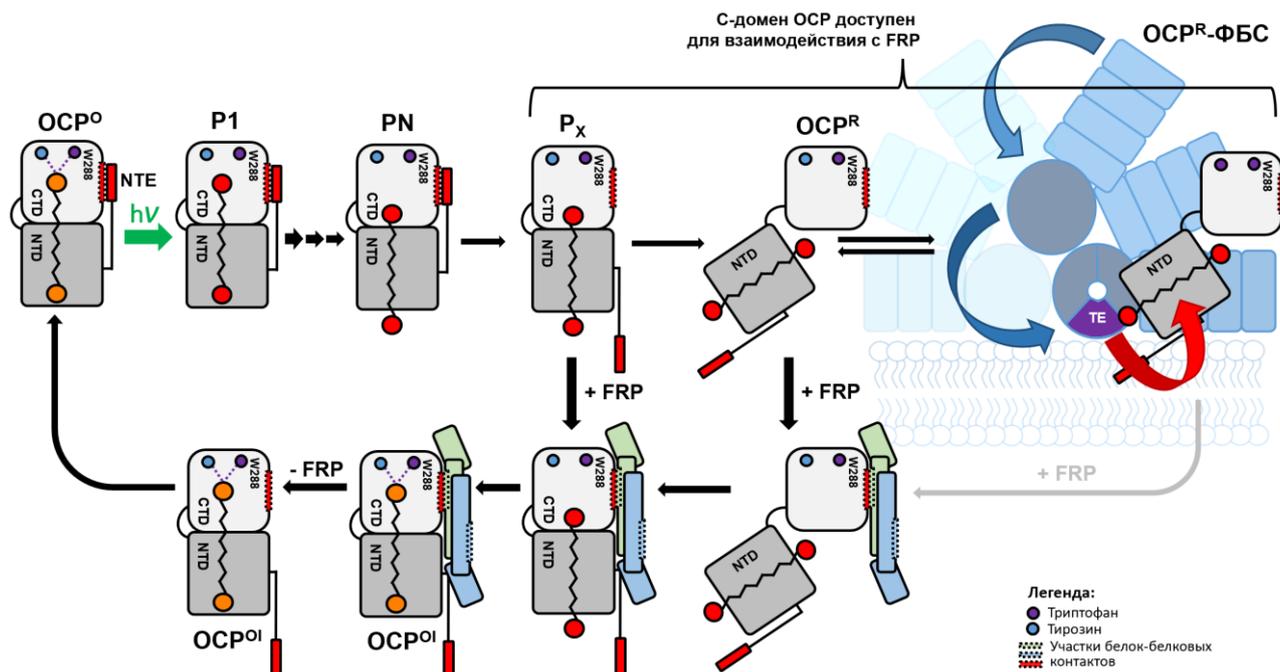


Рис. 27. Регуляция ОСР-зависимого нефотохимического тушения ФБС цианобактерий за счет взаимодействия ОСР с FRP.

На основе понимания механизмов электронно-конформационных взаимодействий в нативных системах становится возможна разработка искусственных фотосенсоров и оптогенетических конструкций. Так, например, под руководством профессора Оксфордского университета Франческо Ликаузи в 2021 году были созданы трансгенные растения, в которых активность люцифераз регулируется за счет разделения доменов ОСР. Мы уверены, что подобные принципы контроля олигомерного состояния белков могут быть использованы для изучения и управления различными метаболическими реакциями *in vivo*. Невозможная ранее в клетках реконструкция протонных и натриевых насосов (XR, GR, NaR и т.д.) с дополнительным хромофором теперь может стать доступной благодаря белкопосредованной доставке кето-каротиноида. Использование таких систем может иметь ряд преимуществ за счет антиоксидантных свойств каротиноида, расширения спектра действия и принципиально новых способов управления активностью оптогенетической конструкции.

Выводы диссертационной работы

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 Максимова Е.Г. по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ 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. **IF WoS 0.639**
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. **IF WoS 6.252**
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. **IF WoS 3.008**
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. **IF WoS 0.781**
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. **IF WoS 0.781**
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. – Т. 1817, № 8. – С. 1461-1470. **IF WoS 3.911**
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. – Т. 1817, № 8. – С. 1436-1445. **IF WoS 3.911**
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. – Т. 10, № 5. – С. 055602. **IF WoS 2.016**
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. – Т. 125. – С. 137-145. **IF WoS 6.252**
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. – Т. 1837, № 9. – С. 1540-1547. **IF WoS 3.911**
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. – Т. 125, № 1. – С. 167-178. **IF WoS 3.573**
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. **IF WoS 4.033**
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. **IF WoS 6.252**
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. **IF WoS 3.573**
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. **IF WoS 4.033**
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. **IF WoS 4.033**
17. **Maksimov E. G.**, Sluchanko N. N., Slonimskiy Y. B., Slutskaia 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. **IF WoS 4.379**
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. **IF WoS 3.573**
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. **IF WoS 3.573**
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. **IF WoS 3.911**
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. **IF WoS 1.978**
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. **IF WoS 4.124**
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. **IF WoS 6.268**
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. **IF WoS 3.573**
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. **IF WoS 3.911**
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. **IF WoS 14.919**
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. **IF WoS 2.991**
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. **IF WoS 2.991**
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. **IF WoS 3.911**
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. **IF WoS 3.575**
31. **Maksimov E. G.**, Yaroshevich I. A., Tsoraev G. V., Sluchanko N. N., Slutsкая 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. **IF WoS 4.379**
32. Pishchalnikov R. Y., Yaroshevich I. A., Slastnikova T. A., Ashikhmin A. A., Stepanov A. V., Slutsкая 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. **IF WoS 3.567**
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. **IF WoS 5.542**
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. **IF WoS 4.379**
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., 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.

IF WoS 6.312

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. **IF WoS 3.911**

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. **IF WoS 3.982**

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. **IF WoS 0.746**

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. **IF WoS 3.911**

40. Yaroshevich I. A., **Maksimov E. G.**, Sluchanko N. N., Zlenko D. V., Stepanov A. V., Slutsкая 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. **IF WoS 6.268**