

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Цораев Георгий Витальевич

**Роль белка восстановления флуоресценции (FRP) в регуляции
фотоцикла оранжевого каротиноидного белка (ОСР) и фотозащитных
механизмов цианобактерий**

1.5.2. Биофизика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители — Пазенко Владимир Захарович, доктор физико-математических наук, профессор

Максимов Евгений Георгиевич, доктор биологических наук

Официальные оппоненты — Разживин Андрей Павлович, доктор физико-математических наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», отдел фотосинтеза и флуоресцентных методов исследований, заведующий отделом

Брейгина Мария Александровна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра физиологии растений, старший научный сотрудник

Синетова Мария Андреевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория экофизиологии микроводорослей, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией

Защита диссертации состоится 19 июня 2025 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3373>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Фурсова П.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Одной из важных особенностей фотосинтетических организмов является способность адаптироваться к изменениям условий окружающей среды, что необходимо для поддержания высокой эффективности преобразования энергии света и окислительно-восстановительных реакций. Первичные фотосинтетические реакции осуществляются и регулируются за счет специфической последовательности электронно-конформационных взаимодействий в пигмент-белковых комплексах (ПБК). Поддержание энергетического баланса в фотосинтезирующих организмах осуществляется за счет конкурирующих процессов накопления и диссипации поглощенной энергии. Нефотохимическое тушение (non-photochemical quenching, NPQ) за счет превращения избытков поглощенной энергии в тепло имеет решающее значение для защиты фотосинтезирующих организмов и предотвращения появления активных форм кислорода. Цианобактерии используют водорастворимый фотоактивный оранжевый каротиноидный белок (Orange Carotenoid Protein, OCP) для защиты светособирающих комплексов от фотоповреждения. Под действием света высокой интенсивности OCP переходит в физиологически активную красную форму, взаимодействующую с антенными комплексами. Образующийся комплекс *in vitro* может быть стабилен в течение часов, поэтому для инактивации OCP и возвращения к оптимальной фотосинтетической активности у ряда цианобактерий в ходе эволюции появилась способность синтезировать белок восстановления флуоресценции (Fluorescence Recovery Protein, FRP).

Несмотря на недавние успехи структурной биологии, связанные с установлением пространственных структур OCP, FRP и их комплекса, механизм их взаимодействия остается недостаточно изученным. Понимание этого механизма важно для использования цианобактерий в качестве биотехнологических систем с высокой скоростью продукции биомассы, особенно в биореакторах с возможностью модуляции интенсивности света и температуры.

Из-за большой подвижности элементов третичной структуры физиологически активной формы OCP^R и её спонтанного перехода в оранжевую, неактивную форму, изучение свойств переходного состояния OCP^R и его взаимодействия с другими белками является нетривиальной задачей. Описание свойств комплекса OCP^R-FRP с помощью биохимических и структурных методов потребовало значительных структурных модификаций белков для стабилизации определенных стадий фотоцикла OCP. Например,

мутации, нарушающие контакты каротиноида с С-концевым доменом ОСР, предотвращают релаксацию красной формы. Это позволило смоделировать взаимодействие FRP с активным состоянием $ОСР^R$, а удаление короткой α -спирали в начале N-концевого домена ОСР, называемой N-концевым удлинением (N-terminal extension, NTE), позволило исследовать структуру комплекса с FRP (рис. 1). Эти работы позволили установить основной интерфейс взаимодействия ОСР и FRP, который находится в области β -складки С-домена ОСР. Однако физиологическая значимость таких комплексов и их связь с фотоциклом оставалась неясной.

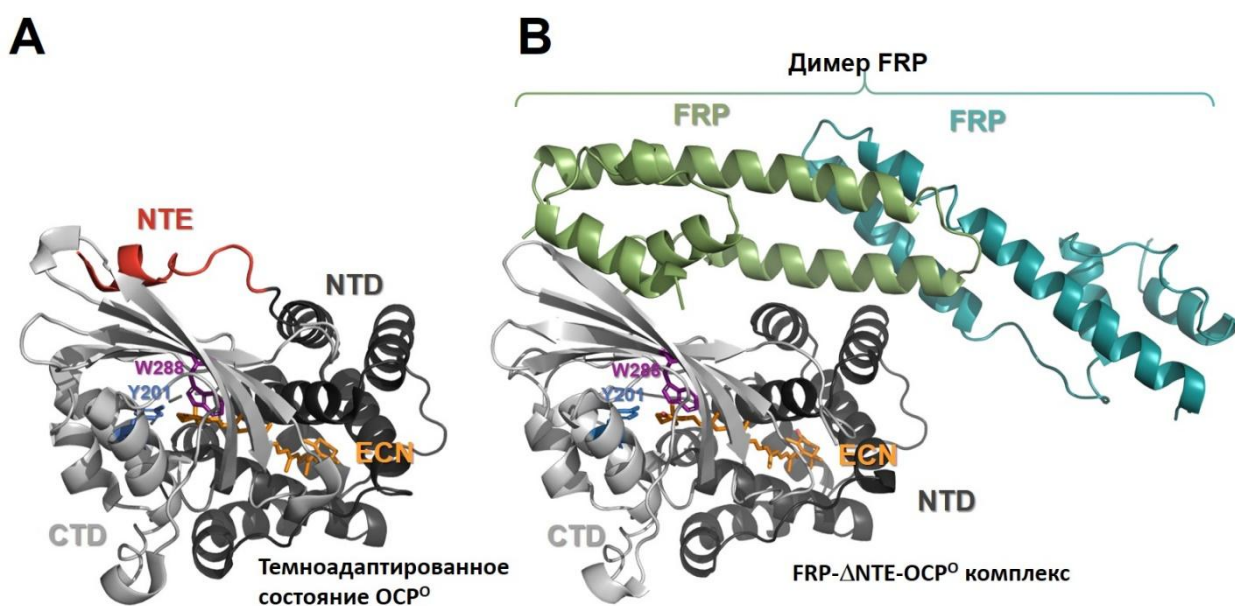


Рисунок 1. Структуры ОСР из *Synechocystis* sp. PCC 6803 (A, PDB ID 3MG1) и комплекса Δ NTE ОСР - FRP (B, SASDDG9) с удалённой N-концевой α -спиралью. С- и N-концевые домены ОСР (CTD и NTD) показаны светло- и темно-серым цветами, соответственно, NTE показана красным. Эхиненон (ECN) показан оранжевым цветом. Ключевые аминокислотные остатки С-домена ОСР тирозин-201 и триптофан-288, которые участвуют в образовании водородных связей с кето-группой каротиноида, показаны синим и фиолетовым цветом, соответственно. Субъединицы димера FRP показаны зеленым и голубым. NTE в темноадаптированном состоянии $ОСР^O$ занимает сайт связывания FRP.

Фотоцикл ОСР включает реакции на временной шкале от единиц пикосекунд до 100 секунд и характеризуется крайне низким квантовым выходом первичных фотопродуктов. Эти свойства затрудняют исследование фотоцикла ОСР. Для наблюдения за начальными стадиями фотоцикла необходимо импульсное возбуждение короткими актиничными вспышками с частотой повторения достаточно низкой для релаксации

долгоживущих красных форм. Тем не менее, поскольку квантовый выход конечной красной формы не превышает 0,2%, наблюдение за фотопродуктами затруднительно. Более того, основным наблюдаемым параметром в подобных экспериментах чаще всего является изменение спектральных свойств каротиноида, которые непосредственно не отражают функциональное состояние белка ОСР. В связи с этим необходимы экспериментальные основания для соотнесения спектральных и функциональных свойств белков ОСР и FRP.

Степень разработанности проблемы

В последние годы были выявлены ключевые механизмы преобразования энергии в системе первичных процессов фотосинтеза, связанные с электронно-конформационными взаимодействиями в пигмент-белковых комплексах. Эти механизмы включают безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения в светособирающих антеннах, генерацию потока по цепочке переносчиков электронов и собственно туннельный перенос электронов.

Регуляция первичных процессов фотосинтеза растений и зелёных водорослей в значительной степени определяется так называемым «нефотохимическим» тушением. Этот процесс у высших растений инициируется изменениями трансмембранного потенциала, которые активируют ферментативные преобразования каротиноидов и способствует тепловой диссипации энергии электронного возбуждения пигмент-белковых комплексов. Схожий механизм реализуется у цианобактерий, где ключевую роль играет молекула каротиноида в составе оранжевого каротиноидного белка (Orange Carotenoid Protein, ОСР). Этот белок обеспечивает направленную доставку каротиноида к светособирающим антенным комплексам — фикобилисомам (ФБС), который и осуществляет тушение энергии возбуждения. Процесс активации ОСР инициируется фотовозбуждением каротиноида в белковой матрице.

Особую ценность в этом контексте представляют исследования, посвящённые белок-белковым взаимодействиям, а также взаимодействиям белковой матрицы с хромофором, которые обеспечивают согласованность этапов преобразования энергии и регуляцию фотозащитных механизмов в клетках цианобактерий.

Цели и задачи

Целью данной работы является изучение конформационных изменений оранжевого каротиноидного белка (ОСР) при фотоактивации, а также механизма взаимодействия белка восстановления флуоресценции FRP и переходных состояний фотоцикла ОСР.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Охарактеризовать спектральные свойства состояний фотоцикла ОСР путём изучения взаимодействия аминокислотных остатков и каротиноида методами флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии на временном диапазоне пс-с.
2. Охарактеризовать спектральные характеристики промежуточных состояний фотоцикла. Изучить роль водородных связей между каротиноидом и остатками тирозина-201 и триптофана-288 в формировании промежуточных состояний фотоцикла ОСР.
3. Описать динамику разрыва водородных связей между кето-группой каротиноида и ключевыми аминокислотными остатками в С-домене ОСР.

Научная новизна

В рамках диссертационной работы было показано, что фотоцикл ОСР характеризуется согласованным характером электронно-конформационных взаимодействий на всех этапах, включая конформационное изменение каротиноида, его белкового окружения и взаимодействия структурных субъединиц.

Были обнаружены новые переходные состояния фотоцикла ОСР, установлены и охарактеризованы их функциональные роли. Описано взаимодействие ОСР с FRP, предотвращающее реализацию последующих конформационных изменений ОСР, таких, как разделение структурных доменов и образование физиологически активного состояния ОСР, способного взаимодействовать с антенными комплексами.

Полученные данные уточняют существующую модель фотоиндуцированных переходов ОСР и взаимодействия его промежуточных состояний с белком FRP. Результаты экспериментов *in vitro* указывают, что наличие FRP в клетке может полностью предотвращать накопление активной формы ОСР даже в условиях повышенной инсоляции.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Научная значимость представленных в диссертационной работе результатов заключается в развитии и дополнении существующих представлений о роли водородных связей между триптофаном-288 и тирозином-201 в молекуле белка и каротиноидом при функционировании ОСР. С помощью разработанных методик охарактеризованы интермедиаты фотоцикла ОСР и их взаимодействие с FRP. Показано, что через 20 мс после фотоактивации ОСР, изменения конформации α А спирали ОСР позволяют

сформироваться комплексу OCP с FRP, что предотвращает переход OCP в активное состояние.

Практическая значимость результатов диссертационной работы, во-первых, заключается в успешном применении биофизического подхода в исследовании конформационных изменений комплекса OCP с FRP. Во-вторых, полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие FRP в клетке может полностью предотвращать накопление активной формы OCP и блокировать нефотохимическое тушение даже при повышенной инсоляции.

Методология и методы исследования

В исследовании использовались цианобактерии рода *Synechocystis* и их мутантные штаммы. Препараты OCP выделяли из клеток цианобактерий, а также получали путем экспрессии рекомбинантных белков в специальном штамме *E.coli*, способном синтезировать кето-каротиноиды благодаря наличию соответствующей ферментной системы.

Для выполнения экспериментальных задач применялся комплекс биофизических методов, основанных на оптической спектроскопии с высоким временным разрешением. Регистрацию мгновенных спектров флуоресценции осуществляли методом время-коррелированного счета единичных фотонов с пикосекундным разрешением. Метод абсорбционной фемтосекундной спектроскопии использовался для определения времени жизни каротиноида в белках. Скорости фотоциклических переходов в фотоактивных белках изучали методом накачки -зондирования в диапазоне времен пикосекунды-секунды. Дополнительно была создана установка для регистрации триптофановой флуоресценции с субпикосекундным временным разрешением в режиме накачка - зондирование.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования являются цианобактериальные оранжевый каротиноидный белок (OCP) и белок восстановления флуоресценции (FRP).

Предметом исследования являются особенности структурной и функциональной организации OCP и FRP, а также их взаимодействия в процессе регуляции фотозащитных реакций у цианобактерий.

Положения, выносимые на защиту:

Фотоцикл ОСР сопровождается согласованным конформационным изменением структуры белка, изменениями спектральных свойств каротиноида и аминокислотных остатков (тирозина-201 и триптофана-288).

Разрыв водородной связи между триптофаном-288 и каротиноидом приводит к увеличению интенсивности флуоресценции соответствующего триптофанового остатка.

С помощью комбинации методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии накачки-зондирования охарактеризован ряд интермедиатов фотоцикла ОСР, в том числе способных взаимодействовать с FRP и антенными комплексами.

Отсоединение короткой α A спирали (NTE) в составе ОСР играет ключевую роль в установлении белок-белковых взаимодействий с FRP и их регуляции.

В результате фотоактивации NTE отсоединяется от С-домена ОСР за времена порядка 20 мс.

Комплекс компактного красного интермедиата ОСР с FRP предотвращает образование физиологически активного состояния $ОСР^R$.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность результатов выполненной работы подтверждена публикацией 5 статей в рецензируемых журналах и сборниках, индексируемых в базах данных Web of Science и RSCI.

Материалы были представлены на семинарах лаборатории физико-химии биомембран биологического факультета МГУ и семинарах сектора фотобиологии и биофотоники кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

В работе были использованы современные биофизические экспериментальные методы исследования и методики подготовки образцов исследования, соответствующие цели и поставленным задачам.

Личный вклад

Основные идеи и результаты, представленные в работе, были сформулированы и получены соискателем лично. В публикациях Tsoraev et al. 2023 [3] и Tsoraev et al. 2025 [4] соискателем были определены основные идеи, а также выполнены измерения спектров поглощения, кинетики изменения оптической плотности, а также кинетики затухания

флуоресценции с использованием метода время-коррелированного счёта фотонов, получены и обработаны результаты.

Структура и объем

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературных источников, состоящий из 108 наименований. Работа содержит 26 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** и первой главе («Обзор литературы») обоснована актуальность исследований, формулируется цель, ставятся задачи работы. **Обзор литературы** систематизирует современные представления о механизмах фотозащитных реакций цианобактерий и механизмах их регуляции.

Обзор литературы приводится в **первой главе** и содержит описание истории открытия нефотохимического тушения флуоресценции фикобилисом цианобактерий, установления структуры, физиологической роли OCP, FRP и развитие современных представлений об их взаимодействии.

Вторая глава раскрывает способы получения объектов и методы их исследования, а также используемых реактивов, процедуры приготовления препаратов и обработки полученных данных.

Препараты OCP были получены методами микробиологии и биохимии. Также были получены варианты OCP-3FH OCP из *Synechocystis* sp. PCC 6803, несущий аминокислотные замены W41F, W101F, W110F и W277H и мутант OCP характеризующийся удалением NTE (Δ NTE-OCP). Фикобилисомы (ФБС) выделяли из *Synechocystis* sp в соответствии с методом Глейзера.

Для измерения стационарных UV-VIS спектров поглощения и кинетики переходов, индуцированных актиничным светом, была собрана установка, состоящая из стабилизированного широкополосного источника света SLS204 и стабилизированной вольфрам-галогенной лампы SLS201L/M (Thorlabs, США), изменения интенсивности светового потока регистрировали с помощью детекторов на ПЗС матрицах Flame и Maya2000Pro (Ocean Insight, США). Источники UV-VIS света и детекторы соединяли оптоволоконном с термостатическим кюветодержателем Qpod 2e (Quantum Northwest, США)

с элементом Пельтье. В экспериментах с временной шкалой от единиц миллисекунд до сотен секунд фотопревращение ОСР активировали синим светодиодом мощностью до 5,4 Вт/см² (SOLIS-445C, Thorlabs, США), излучение которого дополнительно корректировали полосовым фильтром (450 нм, ширина 40 нм, Thorlabs, США) и фокусировали на образец, помещенный в кварцевую кювету. Питанием светодиода управляли с помощью контроллера (DC2200, Thorlabs, США), который также генерировал сигналы TTL для синхронизации с детекторами и платами счета единичных фотонов. Для регистрации кинетики изменения оптической плотности использовались два режима программы Spectrasuite (Ocean Insight, США). Первый позволяет записывать отдельные спектры с определенным временем накопления сигнала, а второй - кинетики на заданной длине волны, что удобно для получения предварительных данных. Последнее важно, поскольку при использовании коротких актиничных вспышек (до 10 мс) амплитуда изменений оптической плотности крайне мала. По этой причине каждый эксперимент проводился не менее 30 раз, с последующим усреднением данных. Для получения дифференциальных спектров поглощения $\Delta A(t, \lambda)$ переходных форм фотоцикла ОСР каждый эксперимент с фотоактивацией ОСР проводили не менее 150 раз; спектры в диапазоне 250-800 нм записывали с шагом по времени 6 мс с интервалом 10 с между актиничными вспышками, таким образом, для каждого образца было измерено примерно 250 000 спектров.

Флуоресценцию триптофановых остатков в белке возбуждали фемтосекундными импульсами на длине волны 262 нм, - 4-й гармоникой фемтосекундного лазера (ТЕМА-150 и AFsG-A, Avesta Project LTD., Москва, Россия), работающего на частоте повторения 80 МГц и подающего на образец импульсы длительностью 150 фс. Мощность зондирующего луча регулировали с помощью ступенчатого нейтрального светофильтра нейтральной плотности (NDL-25S-4, Thorlabs, США). Флуоресценцию в диапазоне 250-450 нм собирали через асферическую линзу, соединенную с оптическим волокном 16-канального детектора, работающего в режиме время-коррелированного счета единичных фотонов (PML-SPEC, Becker & Hickl GmbH, Германия). Спектрометр был оснащен полихроматором с дифракционной решеткой 600 линий/мм, что давало разрешение 12,5 нм для каждого отдельного спектрального канала. В программном обеспечении (SPCM 9.82, <https://www.becker-hickl.com/products/category/software/> Becker & Hickl GmbH, Германия) использовали режим MCS_TA (многоканальное скалярное триггерное накопление), который использует сигнал TTL от контроллера светодиода. Это позволило последовательно усреднять десятки тысяч кинетик.

Для анализа данных использовали программное обеспечение OriginPro 2018 (OriginLab Corp., США). Для описания дифференциальных спектров поглощения и флуоресценции с помощью программы Matlab (США) было проведен глобальный анализ. Кинетические параметры находили путем численной нелинейной минимизации решения для фитирования экспериментальных данных в спектральном интервале 250-650 нм и временном диапазоне 10 мс - 20 с.

В третьей главе представлены результаты исследования функционального состояния белка ОСР, конформационных изменений структуры ОСР при фотоактивации и природы взаимодействия ОСР с белком восстановления флуоресценции (FRP).

Раздел 3.1 включает результаты исследования накопления красной формы ОСР методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии.

Было показано, что облучение раствора ОСР $3000 \mu\text{M}$ фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ актиничного света (460 нм) вызывает не только увеличение оптической плотности в области 550 нм, но также и увеличение интенсивности флуоресценции триптофановых остатков.

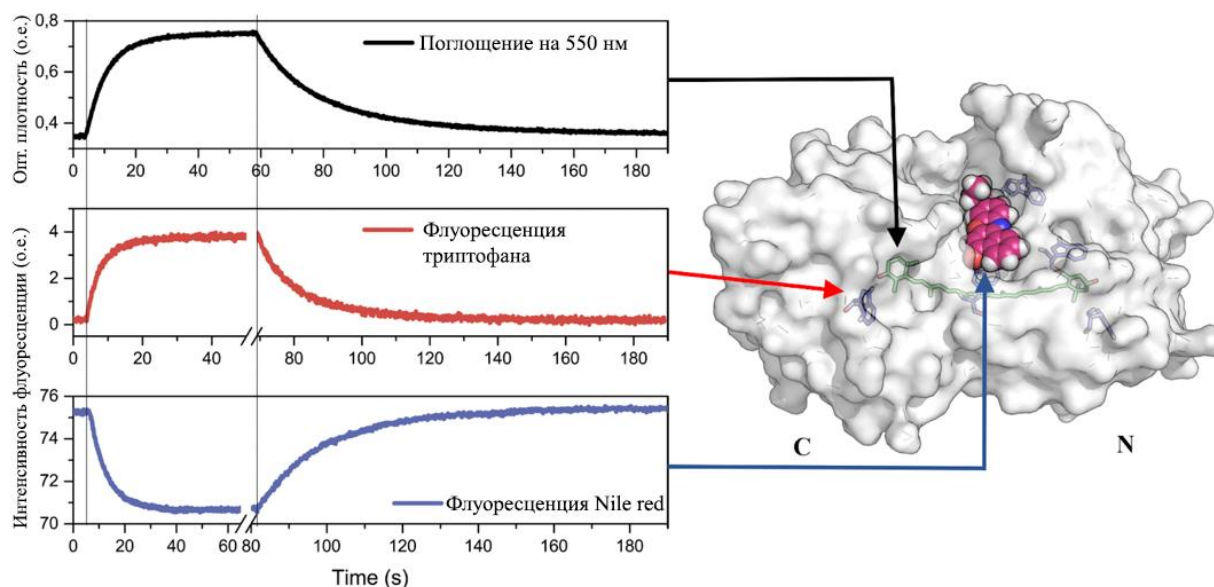


Рисунок 2. Слева: кинетики фотоциклических изменений оптической плотности при 550 нм (черная линия), интенсивности триптофановой флуоресценции при 340 нм (красная линия) и интенсивности флуоресценции гидрофобного красителя - нильского красного (nile red, синяя линия) при фотоактивации ОСР синим светом. Справа: предполагаемая структура комплекса ОСР с молекулой нильского красного. Комплекс получен с помощью молекулярного докинга.

Увеличение интенсивности флуоресценции триптофановых остатков после фотоактивации ОСР указывает на то, что снижение эффективности тушения, вероятно, вызвано изменениями взаимодействий белковой матрицы и каротиноида. Возможным объяснением этого является то, что во время фотоактивации происходит снижение общей эффективности переноса энергии возбуждения от остатков триптофана к каротиноиду. Например, остатки W288 и W110 (нумерация в соответствии с последовательностью ОСР из *Synechocystis*, находятся в непосредственной близости от каротиноида. Мы предположили, что в результате перехода $\text{OCP}^{\text{O}} \rightarrow \text{OCP}^{\text{R}}$ расстояние (и/или ориентация дипольных моментов) между каротиноидом и остатками триптофана значительно изменяется, что приводит к снижению эффективности переноса энергии.

Чтобы исследовать эффективность переноса энергии, мы провели измерения времен жизни флуоресценции триптофановых остатков в составе ОСР с пикосекундным временным разрешением. Полученные результаты продемонстрировали значительные изменения времен жизни собственной флуоресценции ОСР при фотоактивации темноадаптированного образца. Как в случае с OCP^{O} , так и в случае с OCP^{R} мы наблюдали кинетику затухания флуоресценции, характеризующуюся тремя компонентами: 2.4 нс (57,7%), 6.2 нс (35,4%) и 8.7 нс (6,9%) в OCP^{O} и 2.8 нс (55,6%), 6.4 нс (36,7%) и 7.6 (7,7%) в OCP^{R} , соответственно. Средние времена жизни флуоресценции составляют 4,15 и 4,51 нс для OCP^{O} и OCP^{R} , соответственно, поэтому общие изменения времени жизни составляют порядка 10 %. Однако общее увеличение интенсивности флуоресценции при измерении кривых затухания флуоресценции составляло также 30%, как и в стационарных спектрах. Возможной причиной этого является высокая скорость переноса энергии электронного возбуждения, которая может значительно превышать временное разрешение нашей установки (~100 пс).

Остаток триптофана-288 образует водородную связь с кислородом кето-каротиноида в С-домене OCP^{O} , поэтому мы предположили, что он статически потушен в темноадаптированном состоянии, тогда как в OCP^{R} этот остаток может флуоресцировать. Таким образом, триптофановая флуоресценция может являться индикатором структурных изменений в ОСР при фотоактивации.

Раздел 3.2 включает себя материалы о конформационных изменениях структуры ОСР при фотоактивации.

Взаимодействия стабилизирующие контакты между С- и N-доменами ОСР должны быть разрушены, чтобы обеспечить значительные конформационные изменения структуры и переход в физиологически активное красное состояние ОСР^R. Это подразумевает не только разрыв водородных связей между каротиноидом и белком (тирозин-201 и триптофан-288), а также отсоединение NTE от С-домена перед тем, как структурные домены белка полностью разойдутся, оставаясь связанными только за счет гибкого линкера. Поскольку этот каскад конформационных изменений инициируется разрывом водородных связей между кето-группой каротиноида и белком, в частности, с остатком триптофана-288, флуоресценция которого разгорается в результате фотоактивации, нами было принято решение использовать флуоресцентную спектроскопию для изучения интермедиатов фотоцикла ОСР. Однако, сигнал флуоресценции обусловлен не только 288 остатком, но и четырьмя другими остатками триптофана, поэтому нам необходимо было определить их вклад в общий сигнал.

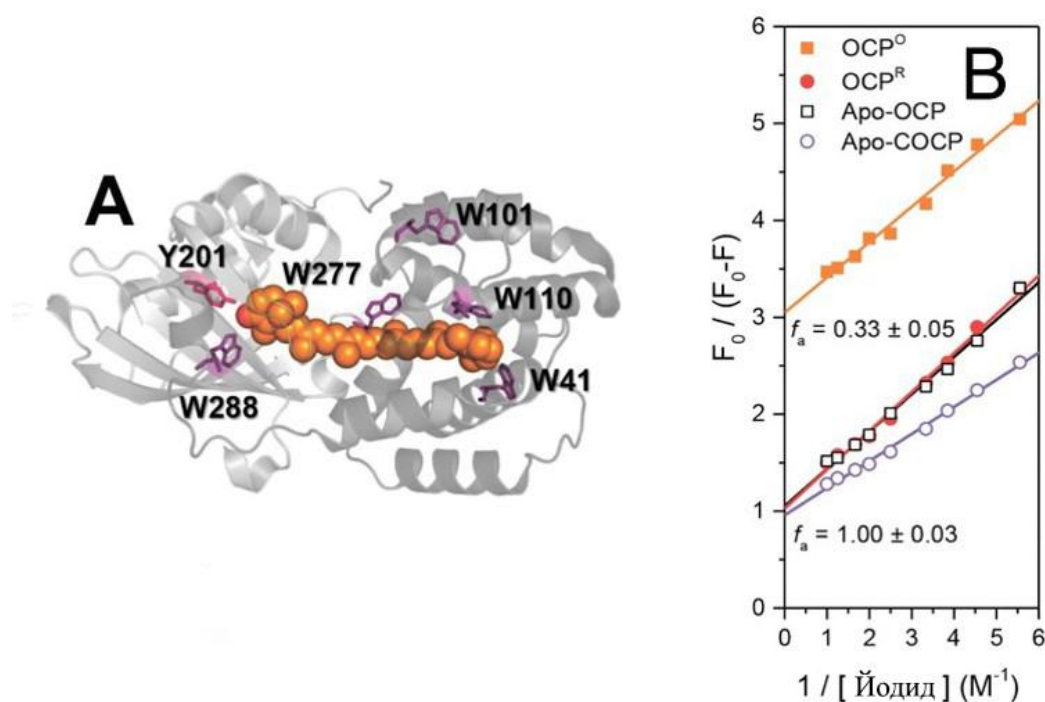


Рисунок 3. Тушение флуоресценции триптофановых остатков в ОСР и фрагменте его С-домена (СОСР) каротиноидом и ионами йода. **(А)** Расположение остатков триптофана, а также тирозина-201 в кристаллической структуре ОСР в оранжевом состоянии (согласно структуре PDB ID : 3MG1). **(В)** модифицированные координаты Штерна-Фольмера зависимости тушения флуоресценции триптофановых остатков от концентрации ионов йода, аппроксимированные линейными зависимостями. Экстраполяция зависимости до пересечения с осью ординат дает оценку доли доступных для тушителя остатков триптофана (f_a).

С помощью флуоресцентной спектроскопии с пикосекундным разрешением, мы установили механизм тушения триптофановых остатков (рис. 3). Для этого использовали ионы йода в качестве тушителя флуоресценции, что позволило показать, что не все остатки являются доступными растворителю в оранжевом состоянии ОСР⁰, что хорошо согласуется с тем, что в темноадаптированном состоянии белок характеризуется компактной структурой, а каротиноид и гидрофобная полость, связывающая каротиноид не контактируют с внешней средой.

В результате анализа взаимодействий триптофановых остатков с йодом в различных формах (Рис. 3) мы подтвердили, что остаток триптофана 288, образующий водородную связь, тушится статически и может являться индикатором наличия водородной связи между каротиноидом и белком. Это стимулировало наши исследования скорости разрыва водородной связи. Однако для выполнения этих экспериментов необходимо было получить мутантный белок с единственным триптофаном-288.

В результате последовательного исключения триптофановых остатков был получен вариант ОСР с единственным триптофаном - 288 (ОСР-3FH). При фотоактивации ОСР-3FH интенсивность флуоресценции увеличивалась в 4 раза. При этом мы не наблюдали значительного изменения времени жизни флуоресценции. Соответственно, невозможно объяснить наблюдаемые в эксперименте эффекты изменением эффективности миграции энергии, что подтверждает нашу гипотезу о статическом тушении остатка 288 за счет образования водородной связи. Следует отметить, что в темноадаптированном растворе белка не весь триптофан-288 потушен. Вероятно, это связано с гетерогенностью структуры ОСР в растворе и возможностью образования водородной связи между кетогруппой каротиноида не только с триптофаном-288, но и тирозином-201. Таким образом, при сохранении связи с тирозином-201 белок способен флуоресцировать в УФ. Можно предположить, что наблюдаемые в эксперименте с темноадаптированной формой ОСР-3FH 25% от максимальной флуоресценции относятся к фракции белка, в которой есть связь кето-группы каротиноида с тирозином или нет водородной связи вообще. Таким образом, в растворе между тирозином-201 и триптофаном-288 может быть конкуренция за образование водородной связи с кето-каротиноидом, и, учитывая низкую энергию водородной связи, эти контакты могут спонтанно рваться, как одна, так и обе сразу.

Использование мутанта ОСР-3FH, с единственным триптофаном, флуоресценцию которого можно однозначно связать с наличием или отсутствием взаимодействия триптофана-288 с кето-каротиноидом, позволило нам измерить скорость разрыва этой

водородной связи. Варьируя задержку между фемтосекундными актиничными (525 нм, 4 Вт) и зондирующими вспышками (262 нм, 10 мВт), нам удалось определить, что водородная связь разрывается за примерно за 20 пс.

Используя мутант OCP-3FH в экспериментах с длительными (5-100 мс) актиничными вспышками, мы измерили кинетику восстановления водородной связи после фотоактивации белка. Сложная форма кинетических зависимостей (Рис. 4) говорит о наличии множества переходных состояний фотоцикла OCP, которые отличаются по интенсивности флуоресценции триптофанового остатка 288, вероятно, как за счет изменения взаимного расположения триптофана и каротиноида, так и локального окружения триптофана. Следует отметить, что в непосредственной близости от 288 остатка триптофана в С-доме расположен сайт связывания NTE и FRP (см. Рис. 1), таким образом изменение структуры этого сайта в ходе фотоцикла может сказываться на интенсивности триптофановой флуоресценции.

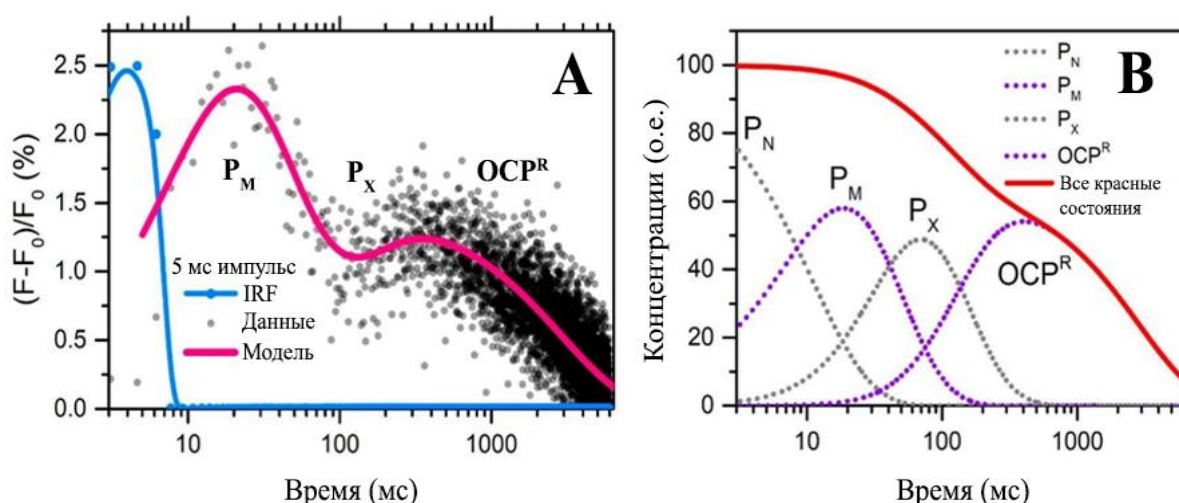


Рисунок 4. (А) - зависимости изменений интенсивности флуоресценции остатка триптофана-288 в OCP-3FH, вызванные актиничной вспышкой (5 мс, 445 нм, 5 Вт), измеренные при 20 °С. Флуоресценцию Trp-288 возбуждали при 262 нм и регистрировали при 340±10 нм в режиме время-коррелированного счета фотонов. Интенсивность флуоресценции, измеренную до вспышки (F_0), вычитали из каждой точки, чтобы оценить относительное увеличение интенсивности флуоресценции как $(F-F_0)/F_0$. Каждая кинетика представляет собой результат усреднения около 2000 циклов возбуждение - релаксация. Сигнал флуоресценции регистрировали с разрешением 1,5 мс. Концентрация белка 2 мкМ. (В) – кинетическая модель изменения концентраций состояний (N, M, X и OCP^R) с различным квантовым выходом флуоресценции триптофана-288, описывающая экспериментальные данные на панели А.

Как отмечалось ранее, для стабилизации взаимодействия между доменами ОСР важную роль играет короткая α -спиральная петля NTE, занимающая основной сайт взаимодействия с регуляторным белком FRP. Соответственно, для инициации взаимодействия FRP с ОСР необходимо чтобы NTE отсоединилась от С- домена ОСР. Для установления механизма взаимодействия FRP с ОСР и определения стадий фотоцикла ОСР способных к образованию комплекса нами были проведены эксперименты по изучению скорости релаксации фотоактивированных состояний ОСР в присутствии FRP.

В результате исследования температурных зависимостей скорости релаксации красных форм ОСР, нам удалось показать, что FRP не снижает активационный барьер для реакции перехода каротиноида из красной формы в оранжевую. Таким образом FRP не является катализатором и, соответственно, не влияет на механизм реакции, а лишь снижает количество попыток необходимых для образования водородных связей.

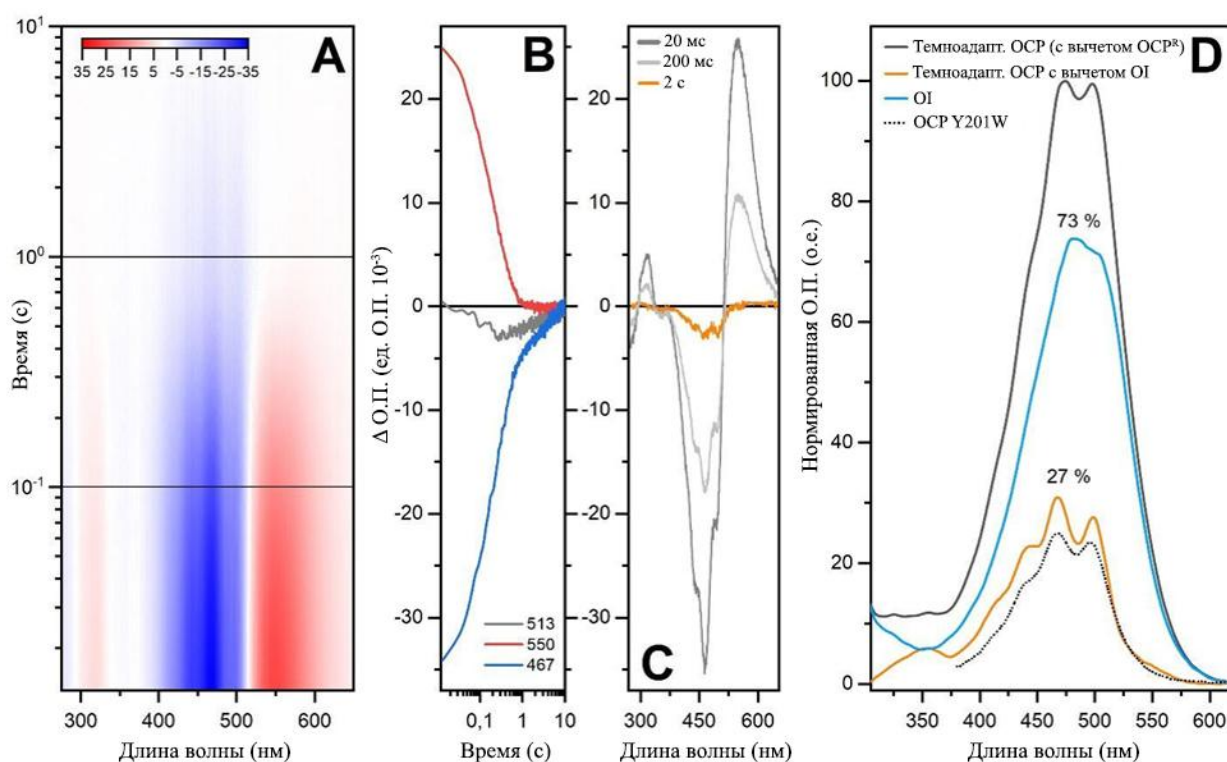


Рисунок 5. (A) – Дифференциальные спектры поглощения 10 мкМ ОСР в присутствии 1 мкМ FRP, записанные с шагом по времени 12 мс после 60 мс актиничной вспышки при 37 °С. Разница в оптической плотности показана цветом от -35 (синий) до +35 (красный) тысячных единицы оптической плотности. Спектры усреднены по 150 фотоциклам. (B) – кинетика изменения оптической плотности на разных длинах волн, полученная как срезы набора данных, представленного на панели A. (C) – дифференциальные спектры при разных временных задержках. Спектры были получены как сечения набора данных, представленного на панели A. (D) – разложение спектра поглощения оранжевого темноадаптированного состояния (DA) на компоненты. Спектр оранжевого промежуточного состояния (OI) был получен путем вычитания из спектра DA спектральных сигнатур, наблюдаемых на заключительных стадиях релаксации ОСР в присутствии FRP, усредненных в области от 2 до 10 с. Пунктирной линией показан спектр поглощения мутанта ОСР с заменой тирозина-201 на триптофан.

Для описания кинетики фотоциклических переходов ОСР в присутствии FRP на временной шкале мс-с требуется минимум 3 переходных состояния (Рис. 6). Красное состояние P^N накапливается за время действия актинической вспышки и, вероятно, представляет собой интермедиат, в котором NTE все еще находится на своем месте в контакте с С-доменом. Это подтверждается тем, что время жизни этого состояния одинаково у дикого типа ОСР и у мутанта, лишённого NTE как в отсутствие, так и в

присутствии FRP. Учитывая временной масштаб, мы уверены, что в этом промежуточном состоянии каротиноид находится в N-домене OCP. Следующее состояние P^M характеризуется отсоединением NTE от C-домена, что подтверждается значительным сокращением длительности этого состояния в присутствии FRP.

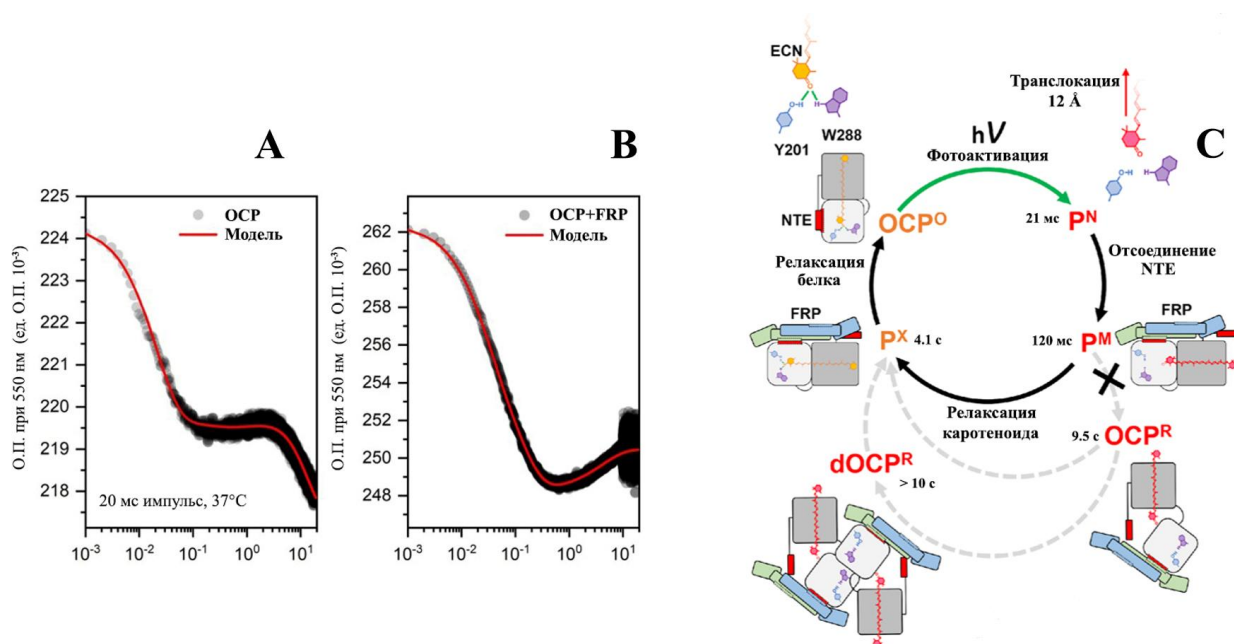


Рисунок 6. Кинетики релаксации интермедиатов фотоцикла OCP в отсутствии (A) и в присутствии FRP (B). Экспериментальные данные показаны черными точками, а результат моделирования красными линиями. (C) - модель фотоциклических переходов OCP на временной шкале мс в присутствии FRP. Числа указывают на время жизни промежуточных состояний.

Таким образом, уже на стадии красного интермедиата P^M возможно образование комплекса с FRP, который значительно сокращает время жизни этого переходного состояния и последующих стадий фотоцикла. Было установлено, что при достаточной концентрации FRP в растворе, это белок полностью блокирует переход P^M в физиологически активное состояние OCP^R. Это наблюдение указывает на то, что регуляторная роль FRP направлена в первую очередь на *предотвращение* взаимодействия между OCP и фикобилисомой. В составе комплекса с FRP состояние P^M эволюционирует

в оранжевое состояние P^X за счет перемещения каротиноида в С-домен и восстановления контакта с донорами водородных связей (тирозин-201 и триптофан-288).

Состояние P^X имеет значительно меньшее поглощение в области 550 нм, чем адаптированное к темноте состояние $ОСР^O$, и не имеет тонкой вибронной структуры. Следует отметить, что состояние P^X наблюдается и в отсутствии FRP, но его выход значительно снижен по сравнению с $ОСР^R$. Мы предполагаем, что на стадии P^X ОСР остается в комплексе с FRP, пока не будет вытеснен NTE. В оранжевом состоянии P^X (и в P^M) общая структура комплекса ОСР-FRP незначительно отличается от известной модели ОСР-FRP (рис. 1), что подтверждает актуальность структурных исследований такого рода комплексов на модельных объектах.

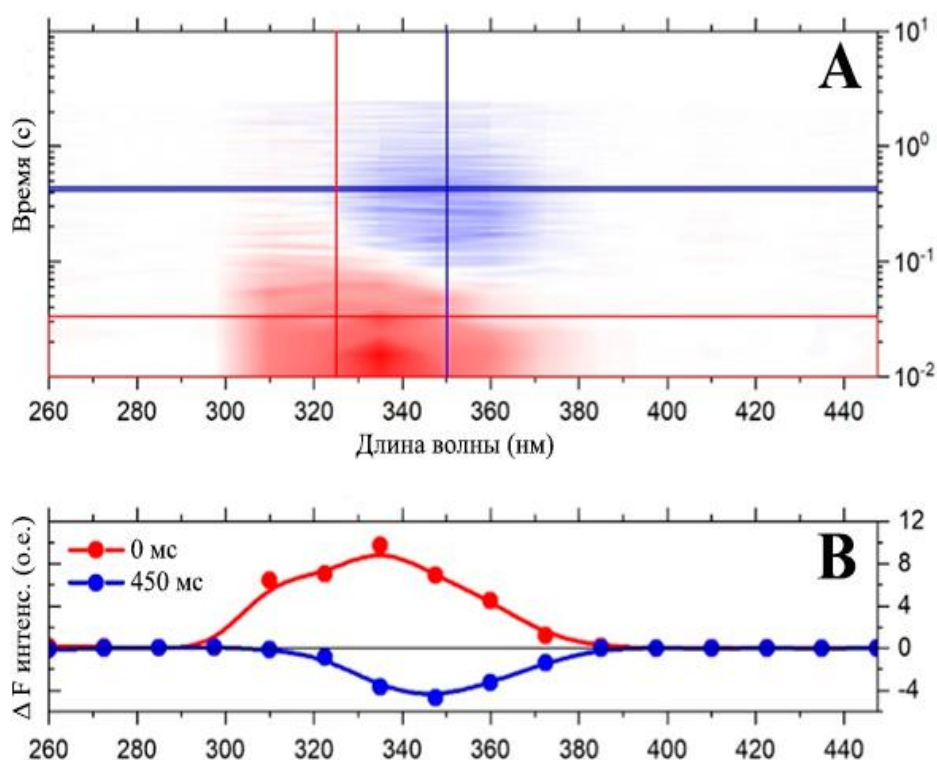


Рисунок 7. Дифференциальные спектры флуоресценции 5 мкМ ОСР, полученные в результате возбуждения триптофанов в УФ (262 нм) в присутствии 0,5 мкМ FRP (А). Изменения интенсивности флуоресценции записаны с шагом по времени 2 мс после 60 мс актиничной вспышки (445 нм, 5 Вт) при 37 °С. Разница в интенсивности флуоресценции показана цветом в диапазоне от -13,5 (синий) до +13,5 (красный) условных. Набор данных представляет усреднение 500 циклов фотовозбуждения и релаксации, равных 2,4 с для ОСР в присутствии FRP. (В) спектры флуоресценции индуцированные актиничной вспышкой на разных временных задержках

Использование методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии в режиме накачки - зондирования позволило нам лучше понять природу гетерогенности спектральных характеристик оранжевого каротиноидного белка. Мы показали, что при релаксации красной формы ОСР, образующейся после разрыва водородных связей между кето-каротиноидом и белком и перемещения каротиноида в N-домен, сначала образуется оранжевое переходное состояние, которое отличается от темноадаптированного ОСР отсутствием вибронной структуры в спектре поглощения каротиноида (см. рис. 5). Образование этого интермедиата совпадает со значительным снижением интенсивности флуоресценции триптофана-288 (см. рис. 7). Обобщив доступные данные, мы можем предположить, что в результате релаксации каротиноида в N-домене ОСР он приобретает энергетически выгодную конформацию, значительно отличающуюся от таковой в темноадаптированном белке. Последующее перемещение релаксированного каротиноида обратно в С-домен приводит к тому, что водородные связи восстанавливаются сразу с двумя донорами, что обеспечивает дополнительную конформационную подвижность β -иононового кольца и по этой причине спектры поглощения интермедиата лишены тонкой структуры. Действительно, отсутствие одного из доноров водородной связи (не имеет значения это может быть тирозин-201 или триптофан-288) приводит к значительному увеличению интенсивности вибронной структуры. Дальнейшая компактизация белковой структуры приводит к ограничению подвижности каротиноида и увеличению взаимодействия кето-группы каротиноида с остатком тирозина-201, что сказывается на форме спектра темноадаптированного состояния и интенсивности флуоресценции триптофана-288. Таким образом, мы предполагаем, что при физиологических температурах возможен спонтанный переход между тремя состояниями хромофора в составе ОСР: с 2 водородными связями (тирозин-201 и триптофан-288) – оранжевая форма без признаков вибронной структуры; с 1 водородной связью (тирозин-201 или триптофан-288) – оранжевая форма с хорошо выраженной тонкой структурой спектра поглощения; без водородных связей – красная форма (Рис. 8). Вероятно, состояния с 1 водородной связью обеспечивают активацию белка при поглощении кванта молекулой каротиноида, а общий низкий квантовый выход фотоактивации ОСР обусловлен тем что такие состояния с 1 водородной связью являются минорной популяцией (менее 30 %).

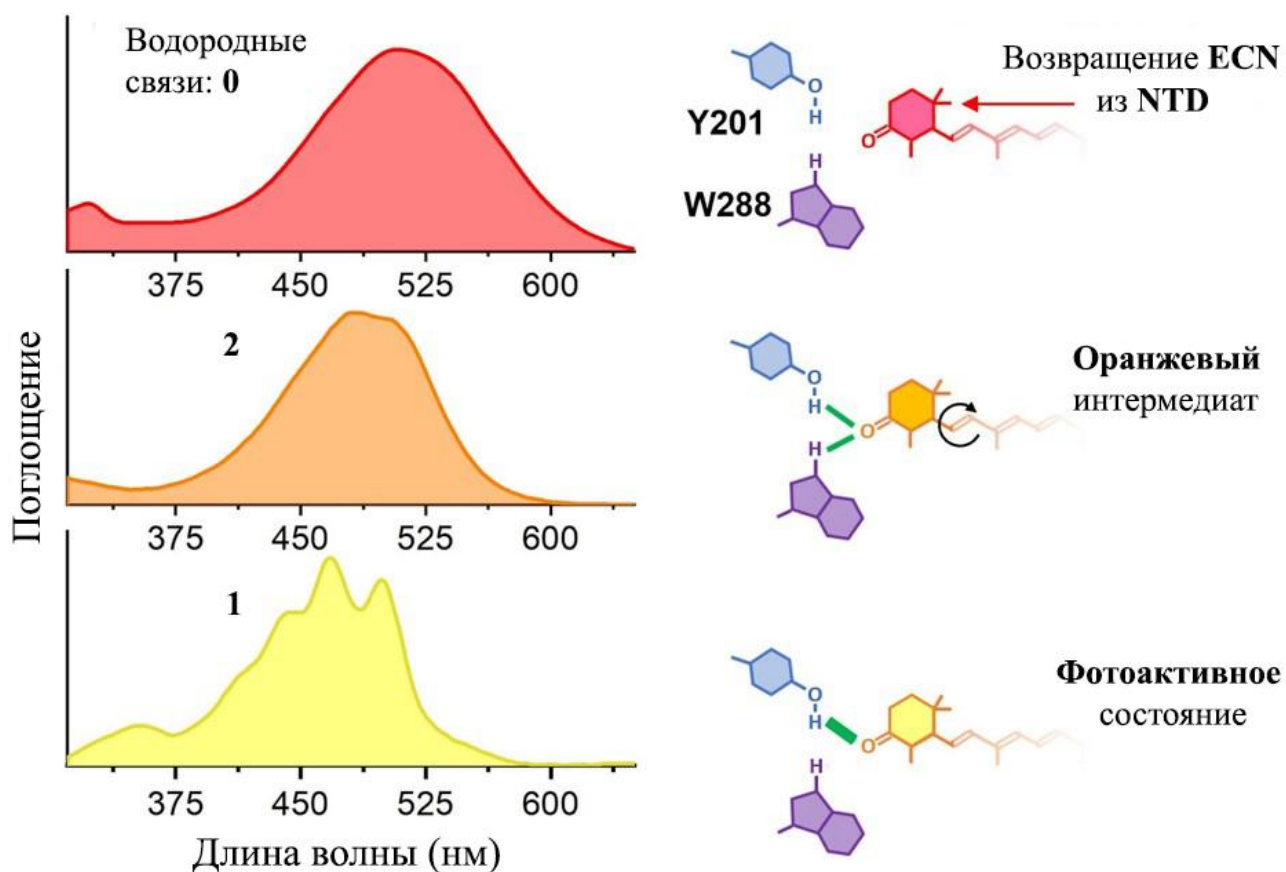


Рисунок 8. Спектры поглощения каротиноида и схематичное представление соответствующих им конфигураций водородных связей между кето-группой эхиненона и остатками тирозина-201 и триптофана-288.

Мы оценили вклады различных спектральных состояний в поглощении темноадаптированного ОСР, однако открытым остается вопрос о физиологической роли этих состояний. Вероятно, низкая квантовая эффективность конверсии ОСР предотвращает переход клеткок цианобактерий в режим фотозащиты при низких интенсивностях солнечного света.

Однако для применения ОСР в качестве фотопереклювателя в оптогенетических приложениях это кажется непрактичным. Первая работа в данном направлении, демонстрирующая, что с помощью ОСР возможно управлять активностью фермента в живом растении, была опубликована в 2022 году (doi.org/10.1093/plphys/kiac122). Поэтому, с точки зрения создания на основе ОСР молекулярных фотоуправляемых конструкций, понимание белок-хромофорных и белок-белковых взаимодействий, влияющих на фотоцикл, является важной прикладной задачей.

Таким образом, проанализировав фотоциклы ОСР в присутствии FRP, мы видим, что увеличение скорости релаксации красных форм на ранних стадиях фотоцикла эффективно предотвращает последующие конформационные изменения и образование физиологически активной красной формы, способной взаимодействовать с антенными комплексами. Данное наблюдение важно для понимания роли FRP в цианобактериальной клетке и способов регуляции фотозащитных реакций. Вероятно, увеличение экспрессии FRP в некоторых условиях может предотвращать связанное с активацией ОСР тушение флуоресценции фикобилисом, что позволяет сохранить высокую эффективность первичных фотосинтетических процессов.

Выводы:

1. Использование эндогенных и экзогенных флуоресцентных зондов позволило выявить фотоциклические изменения структуры оранжевого каротиноидного белка, связанные с разрывом водородных связей и разделением структурных доменов белка.
2. Установлено, что статическое тушение флуоресценции триптофана-288 является индикатором образования водородной связи между молекулой кето-каротиноида и белковой матрицей оранжевого каротиноидного белка. Измерение изменений интенсивности флуоресценции триптофана-288 показало, что разрыв водородной связи происходит примерно через 23 пс после возбуждения каротиноида 150 фс лазерным импульсом.
3. С помощью комбинации методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии в режиме накачки-зондирования установлен ряд интермедиатов фотоцикла оранжевого каротиноидного белка.
4. Было обнаружено физиологически неактивное красное состояние, образующееся через 21 мс после фотоактивации и характеризующееся транслокацией каротиноида в N-домен
5. Показано, что восстановлению темноадаптированного состояния белка предшествует промежуточное компактное оранжевое состояние, характеризующееся двумя водородными связями с тирозином-201 и триптофаном-288.

6. Установлено, что белок восстановления флуоресценции способен взаимодействовать не только с финальным активным состоянием ОСР, но и с промежуточным компактным состоянием, образующимся примерно через 100 мс после фотоактивации и характеризующимся отсоединением короткой α -спирали от С-домена каротиноидного белка. Взаимодействие FRP с этим состоянием предотвращает появление активного красного состояния.
7. Предложена схема фотоиндуцированных циклических переходов ОСР в присутствии белка FRP, демонстрирующая регуляторную роль FRP, предотвращающего взаимодействие между ОСР и ФБС.

Основные публикации Цораева Георгия Витальевича по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1. **Tsoraev Georgy V.**, Protasova Elena A., Klimanova Elizaveta A., Ryzhykau Yury L., Kuklin Alexander I., Semenov Yury S., Ge Baosheng, Li Wenjun, Qin Song, Friedrich Thomas, Sluchanko Nikolai N., Maksimov Eugene G. Anti-Stokes fluorescence excitation reveals conformational mobility of the C-phyococyanin chromophores // Structural Dynamics. – 2022. – Vol. 9, No. 5 – P. 054701. **(JIF 2.3, 1.08/0,41 п. л.)**.
2. **Tsoraev Georgy V.**, Bukhanko Antonina, Budylin Gleb S., Shirshin Evgeny A., Slonimskiy Yury B., Sluchanko Nikolai N., Kloz Miroslav, Cherepanov Dmitry A., Shakina Yaroslava V., Ge Baosheng, Moldenhauer Marcus, Friedrich Thomas, Golub Maksym, Pieper Jörg, Maksimov Eugene G., Rubin Andrew B. Stages of OCP-FRP Interactions in the Regulation of Photoprotection in Cyanobacteria, Part 1: Time-Resolved Spectroscopy // The Journal of Physical Chemistry B. – 2023. – Vol. 127, No. 9. – P. 1890-1900. **(JIF 2.8, 1.18/0,48 п. л.)**.
3. **Tsoraev Georgy V.**, Bukhanko Antonina Y., Mamchur Alexandra A., Yaroshevich Igor A., Sluchanko Nikolai N., Tseng Hsueh-Wei, Moldenhauer Marcus, Budisa Nediljko,

- Friedrich Thomas, Maksimov Eugene G. Intrinsic tryptophan fluorescence quenching by iodine in non-canonical amino acid reveals alteration of the hydrogen bond network in the photoactive orange carotenoid protein // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2023. – Vol. 683, – P. 149119. **(JIF 2.5, 0.68/0,37 п. л.)**.
4. Zlenko Dmitry V., Protasova Elena A., **Tsoraev Georgy V.**, Sluchanko Nikolai N., Cherepanov Dmitry A., Friedrich Thomas, Ge Baosheng, Qin Song, Maksimov Eugene G., Rubin Andrew B. Anti-stokes fluorescence of phycobilisome and its complex with the orange carotenoid protein // *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. – 2024. – Vol. 1865, No. 1. – P. 149014. **(JIF 3.4, 1.74/0,58 п. л.)**.
 5. **Tsoraev Georgy V.**, Bukhanko Antonina Y., Mamchur Aleksandra A., Surkov Makar M., Sidorenko Svetlana V., Moldenhauer Marcus, Tseng Hsueh-Wei, Petrovskaya Lada E., Cherepanov Dmitry A., Shelaev Ivan V., Gostev Fedor E., Blinova Anastasia R., Grigorenko Bella L., Yaroshevich Igor A., Nadtochenko Victor A., Budisa Nediljko, Kamenski Piotr, Friedrich Thomas, Maksimov Eugene G. Engineering hydrogen bonding at tyrosine-201 in the orange carotenoid protein using halogenated analogues // *Photosynthesis Research*. – 2025. – Vol. 163, No. 1. – P. 10. **(JIF 2.9, 1.18/0,49 п. л.)**.