

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

Профессор, доктор физико-математических наук

Пашенко Владимир Захарович

Доктор биологических наук

Максимов Евгений Георгиевич

Москва – 2025

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	15
1.1. Структура комплексов светособирающих антенн в цианобактериях.	17
1.2. Структура, функция и фотоактивность ОСР	21
1.3. Функций белка восстановления флуоресценции (FRP)	22
1.4. Расположение и экспрессия генов FRP	25
1.5. Структурная организация FRP	25
1.6. Особенности взаимодействия ОСР-FRP	28
1.7. Структурные модели, описывающие взаимодействие ОСР-FRP	31
Глава 2. Материалы и методы	32
2.1 МАТЕРИАЛЫ	32
2.1.1 Культивирование цианобактерий	32
2.1.2 Экспрессия и очистка белков	34
2.1.3 Конструкции кДНК и клонирование	35
2.1.4 Флуоресцентное мечение ОСР	36
2.2 Методы	37
2.2.1 Условия освещения ОСР, используемые для мониторинга фотоконверсии	37
2.2.2 Измерения спектров поглощения	38
2.2.3 Измерения флуоресценции	40
2.2.4 Пикосекундные измерения флуоресценции и анизотропии с временным разрешением	41
2.2.5 Методы время-коррелированного счета одиночных фотонов (TCSPC) для переходных процессов флуоресценции триптофана	44

2.2.6	Динамическое рассеяние света.....	47
2.2.7	Аналитическая эксклюзионная хроматография	47
Глава 3. Результаты исследования.....		48
3.1	Изменение свойств ОСР вследствие фотоактивации.....	48
3.1.1	Регистрация накопления красной формы ОСР по поглощению каротиноида и флуоресценции триптофана.....	48
3.1.2	Переходные изменения гидрофобных свойств ОСР, обнаруженные с помощью флуоресценции гидрофобного красителя Nile red.....	57
3.1.3	Роли Trp-288 и Trp-201 во взаимодействии белка с каротиноидами и стабилизации оранжевой формы.....	59
3.1.4	Взаимодействия триптофановых остатков ОСР, с каротиноидом ...	61
3.1.5	Удаления триптофановых остатков, не образующих водородную связь на фотоактивность ОСР.....	65
3.1.6	Динамика разрыва водородной связи между кето-группой и Trp-288	72
3.2	Конформационные изменения структуры ОСР при фотоактивации	74
3.2.1	Флуоресценция ОСР выявляет оранжевое промежуточное состояние.	74
3.2.2	Промежуточные продукты фотоцикла ОСР, выявленные с помощью флуориметрии Trp-288 с временным разрешением.	78
3.2.3.	Стадии фотоцикла ОСР	82
3.2.4	Расхождение структурных доменов ОСР	83
3.2.5	Гидродинамические свойства видов ОСР, выявленные с помощью динамического рассеяния света (DLS) и эксклюзионной хроматографии (SEC).....	88
3.2.6	Состояние расплавленной глобулы	91

3.3 Взаимодействие ОСР и FRP на разных этапах фотоцикла.....	93
3.3.1 Влияние FRP на фотоциклические переходы ОСР	93
3.3.2 Влияние FRP на спектры поглощения ОСР и ОСР ^{W288A}	95
3.3.3 Фотоцикл ОСР при добавлении FRP	97
Заключение	110
Выводы	113
Список сокращений	114
Список литературы	117

Введение

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 $ОСР^R$ и её спонтанного перехода в оранжевую, неактивную форму, изучение свойств переходного состояния $ОСР^R$ и его взаимодействия с другими белками является нетривиальной задачей. Описание свойств комплекса $ОСР^R$ -FRP с помощью биохимических и структурных методов потребовало значительных структурных модификаций белков для стабилизации определенных стадий фотоцикла ОСР. 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.

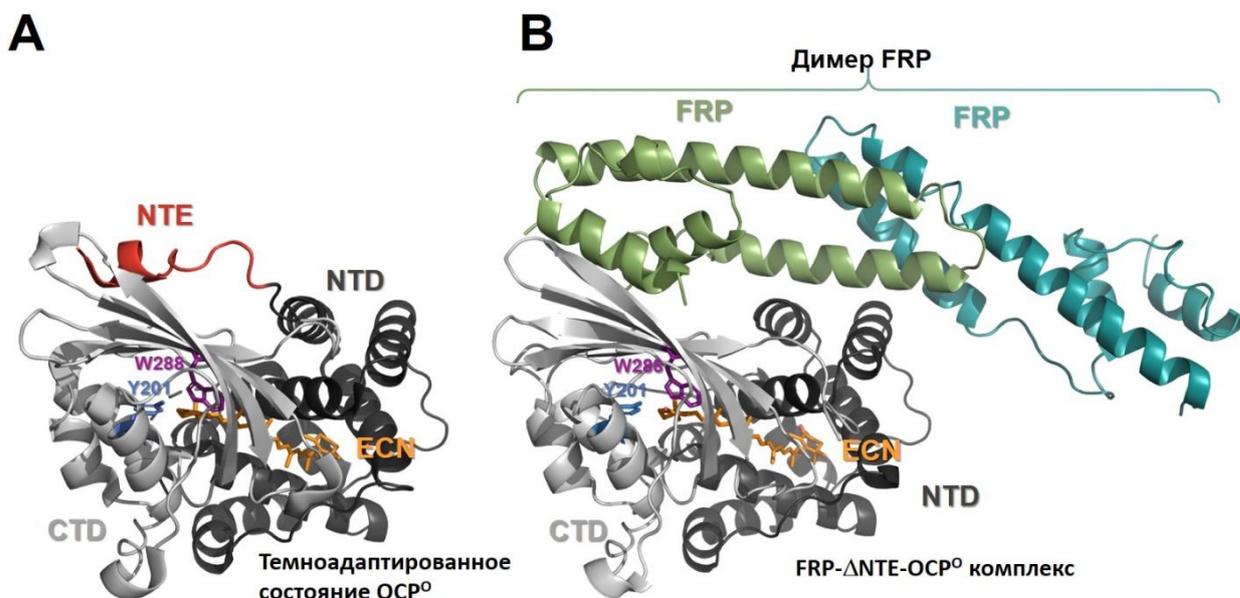


Рисунок 1. Структуры OCP из *Synechocystis* sp. PCC 6803 (A, PDB ID 3MG1) и комплекса Δ NTE OCP - FRP (B, SASDDG9) с удалённой N-концевой α -спиралью. С- и N-концевые домены OCP (CTD и NTD) показаны светло- и темно-серым цветами, соответственно, NTE показана красным. Эхиненон (ECN) показан оранжевым цветом. Ключевые аминокислотные остатки С-домена OCP 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 OCP⁰ занимает сайт связывания FRP.

Фотоцикл OCP включает реакции на временной шкале от единиц пикосекунд до 100 секунд и характеризуется крайне низким квантовым выходом первичных фотопродуктов. Эти свойства затрудняют исследование фотоцикла OCP. 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.

Объект и предмет исследования

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

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

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 A спирали ОСР позволяют сформироваться комплексу ОСР с FRP, что предотвращает переход ОСР в активное состояние.

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

Методология и методы исследования

В исследовании использовались цианобактерии рода *Synechocystis* и их мутантные штаммы. Препараты ОСР 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.

Личный вклад автора

Все эксперименты в режиме накачки-зондирования, обработка массивов данных, интерпретация результатов, формулирование гипотез и оценка их вероятности выполнены автором самостоятельно.

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 охарактеризованы интермедиаты фотоцикла ОСР и установлены состояния, способные взаимодействовать с FRP и антенными комплексами.

Установлена роль короткой α A спирали (NTE) в составе ОСР в регуляции белок-белковых взаимодействий с FRP.

Показано, что в результате фотоактивации NTE отсоединяется от C-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 [48] и Tsoraev *et al.* 2025 [31] 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 129 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 25 рисунков.

Благодарности

Автор выражает благодарность своим научным руководителям – заведующему сектором биофотоники кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессору, д.ф-м.н., Владимиру Захаровичу Пашенко и заведующему лабораторией физико-химии биологических мембран биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова д.б.н. в.н.с. Евгению Георгиевичу Максимову.

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, академику РАН Андрею Борисовичу Рубину за огромную о помощь, оказанную при подготовке диссертации.

Автор благодарит сотрудников сектора фотобиологии и биофотоники и лично к.б.н. н.с. Гвоздева Даниила Александровича, а также сотрудников лаборатории физико-химии биологических мембран и лично к.б.н. н.с. Семёнова Алексея Николаевича и инженера высшей категории Гудкову Викторию Родионовну.

Автор также благодарит коллег – сотрудников кафедры биофизики.

Автор выражает искреннюю благодарность руководителю группы белок-белковых технологий, д.б.н. Николаю Николаевичу Случанко за долгие годы совместной и продолжающейся сейчас работы и за огромное содействие в подготовке диссертационной работы.

Глава 1. Обзор литературы

Фотосинтез выполняет центральную роль в энергообеспечении растений и водорослей и является основным источником энергии, используемой в процессах жизнедеятельности. Фотосинтез представляет собой сложный комплекс фото- и биохимических реакций, протекающих за время от 10^{-15} секунд (поглощение света) до 10^4 секунд (образование продуктов фотосинтеза). Последовательность первичных фотосинтетических процессов включает: поглощение света, миграцию энергии, разделение зарядов и формирование электрохимического потенциала в реакционных центрах фотосистем. Исследования, проведенные в последние десятилетия, показали очень высокую эффективность первичных фотосинтетических процессов, обусловленную особенностями их структурной организации [39].

Фотозащитные механизмы цианобактерий характеризуются рядом особенностей, связанных со структурой их водорастворимых антенных комплексов - фикобилисом. При передаче энергии от ФБС к хлорофиллу реакционных центров фотосистем реализуется принцип "энергетической воронки", регулирующий поток энергии за счет специализированного взаимодействия ядра ФБС с тушащей молекулой, способной эффективно рассеивать энергию электронного возбуждения в тепловую. Роль тушителя выполняет кетокаротиноид в составе фотоактивного оранжевого каротиноидного белка (orange carotenoid protein, OCP), который также является фотосенсором. При высокой интенсивности освещения (инсоляции) OCP обратимо фотоактивируется, что сопровождается значительным изменением его спектральных характеристик и пространственной структуры. Такие конформационные изменения открывают возможность белок-белковых взаимодействий между OCP и ядром ФБС (т.е. активации механизмов фотозащиты) или белком восстановления флуоресценции (fluorescence

recovery protein, FRP). Несмотря на то, что ОСР был открыт в 1981 году, до 2015 года было мало известно о конформации активной формы, а также о свойствах гомологов N- и C-доменов ОСР. Исследования, проведенные в последние годы, совершили прорыв в понимании структурно-функциональной организации ОСР и позволили обнаружить новые аспекты регуляции процессов фотозащиты у цианобактерий.

Нефотохимическому тушению (non-photochemical quenching, NPQ) флуоресценции у цианобактерий, в основе которого лежит работа фотоактивного и водорастворимого ОСР, отводится существенная роль в предотвращении повреждения фотосинтетического аппарата цианобактерий [17, 18, 30, 50, 51, 61, 79]. Хормофором ОСР является молекула кетокаротиноида, которая, как и другие каротиноиды, является эффективным тушителем возбужденных состояний пигментов и синглетного кислорода [90]. Отметим, что контролируемая светом способность ОСР дозировать передачу энергии от специфических светоулавливающих комплексов цианобактерий - фикобилисом [103] к хлорофиллу реакционных центров снижает эффективность фотосинтеза, что необходимо для выживания в экстремальных условиях. Как было отмечено выше, фотоактивные свойства ОСР, использующего кетокаротиноид в качестве сенсора [106] сине-зеленого света и сочетающего в одном белке как рецепторные, так и эффекторные функции, оправдывают значительный интерес исследователей [40], что отражено в более чем 100 статьях, опубликованных за последнее десятилетие. Однако, неоправданно мало внимания уделено другому участнику процесса регуляции NPQ – белку восстановления флуоресценции. FRP не содержит хромофоров, однако способен эффективно контролировать активность ОСР [46]. Важно, что FRP-подобные последовательности встречаются в геномах различных групп бактерий и архей, многие из которых не являются фотосинтетическими организмами. Вероятно, FRP обладает рядом неизвестных физиологических функций.

1.1. Структура комплексов светособирающих антенн в цианобактериях

Светособирающие, или, так называемые антенные, комплексы содержат многочисленные пигменты, расположенные в строго определенных участках белков. Такая ориентация пигментов относительно друг друга необходима для эффективного взаимодействия, направляющего потоки энергии электронного возбуждения к специальным типам пигментов. Кроме того, благодаря взаимодействию молекул пигментов с различными аминокислотными остатками молекул белков, в антенных комплексах выявлено множество спектральных форм хромофоров, а антенны формируют широкий спектр поглощения [41]. После возбуждения светом, благодаря существенному перекрыванию спектров поглощения отдельных пигментов внутри антенны быстро устанавливается термодинамическое равновесие как между пигментами в антенне (в течение долей пикосекунд), так и между антенной и реакционным центром (сотни пикосекунд). Известно, что с благодаря наличию пигментов с различными спектральными характеристиками поглощенная энергия мигрирует направленно к пигментам реакционного центра с максимумом поглощения в длинноволновой области спектра, где преобразуется в энергию разделенных зарядов [108].

Известно, что фотосинтетический аппарат цианобактерий, как и у многих других фотосинтезирующих организмов, состоит из двух взаимодействующих фотосистем - ФС I и ФС II. Свет улавливается "коровыми" (от английского core) антеннами реакционных центров (РЦ), которые содержат хлорофилл [68]. У цианобактерий дополнительными светосборщиками являются - комплексы ФБС, расположенные на поверхности тилакоидной мембраны рядом с ФС I и ФС II [29, 39]. ФБС состоят из хромофорсодержащих фикобилипротеинов и бесцветных

линкерных полипептидов [3, 87]. Молекулы фикобилипротеинов обычно содержат два типа субъединиц - α и β , каждая из которых ковалентно связана с хромофором фикобилина, представляющим собой линейный тетрапиррол [3, 14]. Цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC6803 (далее *Synechocystis* 6803), характеризуется ФБС полудисковидной формы, основными фикобилипротеиновыми компонентами которых являются С-фикоцианин и аллофикоцианин (АФЦ) [3, 29, 95]. Ядро ФБС (core), которое прилегает к стромальной поверхности тилакоидной мембраны, находится в центре полудиска и состоит из трех цилиндров, которые состоят из тримеров АФЦ (Рис. 2). Связь ФБС с фотосинтетической мембраной обеспечивается линкерным полипептидом L_{CM} (linker-core-membrane junction), который состоит из нескольких доменов и участвует в формировании ядра ФБС [22, 59]. От ядра в радиальных направлениях расходятся цилиндры (или стержни - rods), каждый из которых состоит из стопок гексамеров фикоцианина (ФЦ) (Рис. 2а). Энергия света, поглощенная фикобилинами, передается хлорофиллам реакционных центров ФС I и ФС II, повышая эффективность фотосинтеза за счет сбора света в спектральной области, где поглощение хлорофиллами неэффективно [11, 36, 39, 67, 68].

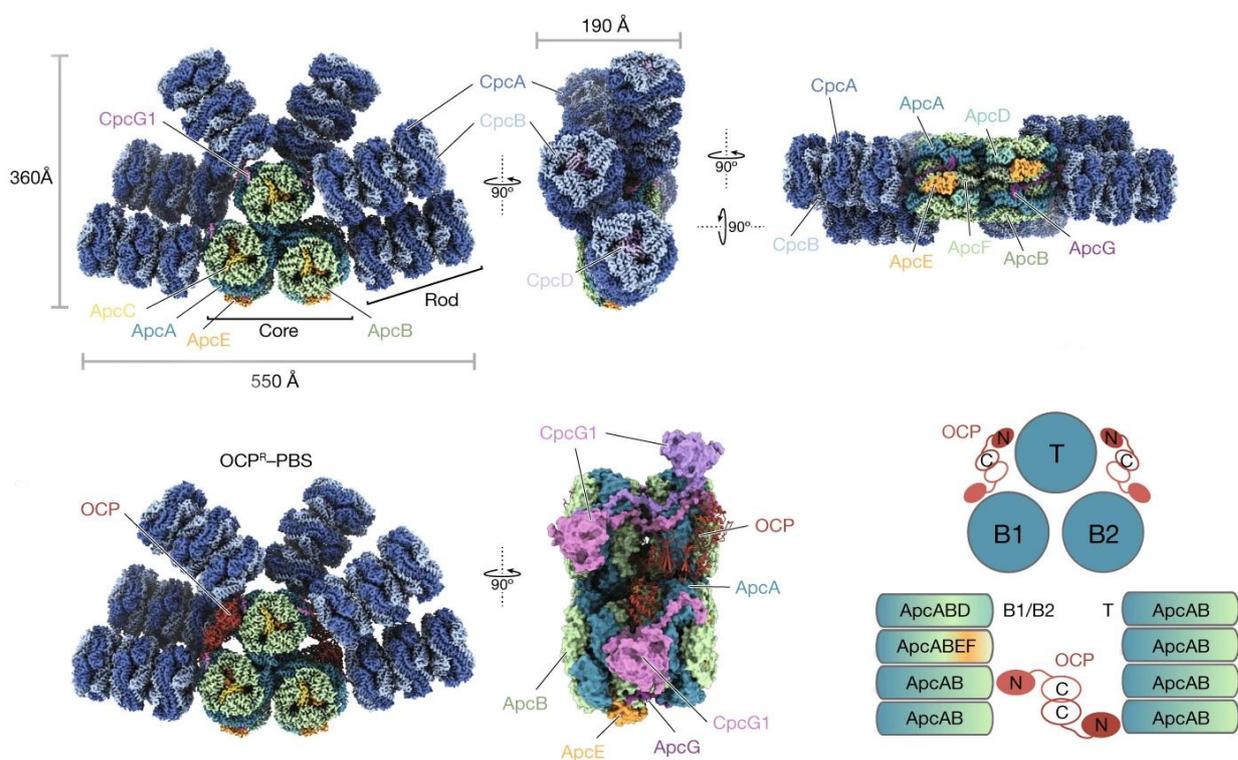


Рисунок. 2. Строение фикобилисомы и комплекса фикобилисомы с OCP из работы Dominguez-Martin et al. [30]. Представлены составные карты плотности, полученные с помощью метода крио-электронной микроскопии, представляющие комплекс OCP^R-PBS, а также схема комплекса OCP^R-PBS с ядром.

Как отмечалось ранее, молекулы фикобилипротеинов состоят из α и β субъединиц в соотношении 1:1 с молекулярной массой приблизительно 16 и 18 кДа, соответственно [27, 107]. Фикобилипротеины являются кислыми белками с изоэлектрической точкой в диапазоне 4,25 - 4,85 единиц pH. Между двумя субъединицами дисульфидные связи отсутствуют, а остатки цистеина в α и β субъединицах участвуют в связывании хромофорных групп фикобилинов посредством ковалентных связей [56, 105]. Остатки Cys-84 необходимы для присоединения хромофора к апопротеину [22]. Дополнительные хромофорные группы могут быть присоединены к α или β субъединице в районе 50-го и 150-го аминокислотных остатков белка.

Количество хромофоров в мономере $(\alpha\beta)_1$ позволяет разделить фикобилипротеины на классы, например, мономер АФЦ $(\alpha\beta)_1$ содержит два хромофора. Фикобилины представляют собой линейные тетрапирролы, химическая структура которых основана на четырех пиррольных кольцах, соединенных тремя одноуглеродными мостиками. Фикобилипротеины обладают выраженной склонностью к самоассоциации [45]. В растворах невозможно получить α и β субъединицы фикобилипротеина, отделенные друг от друга, поскольку даже при очень низких концентрациях ($\sim 10^{-7}$ М) они образуют $\alpha\beta$ -гетеродимеры, которые принято называть $(\alpha\beta)_1$ -мономерами. Поверхность $(\alpha\beta)_1$ -мономеров гидрофобна, что обеспечивает их высокую стабильность только при низкой ионной силе [42]. Олигомеризация зависит от концентрации белка, и $(\alpha\beta)_3$ тримеры и $(\alpha\beta)_6$ гексамеры фикобилипротеинов преобладают уже при концентрации 10^{-6} М в растворах.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, полипептидные субъединицы α и β содержат восемь α -спиральных участков, шесть из которых образуют общую глобиновую структуру этих белков [29, 44, 107]. Хромофорные группы локализованы в «карманах» между α -спиралями. Оставшиеся две α -спирали и две «шпильки» каждой субъединицы образуют взаимодействующие домены, через которые происходит образование $(\alpha\beta)_1$ мономеров. В свою очередь, мономеры, имеющие форму дуги, образуют гидрофобный контакт между α -субъединицей одного мономера и β -полипептидом следующего, формируя кольцеобразный тример. Все тримеры, независимо от типа фикобилипротеина, имеют форму плоских дисков диаметром 11,5 нм и толщиной 3 нм с треугольным отверстием, расположенным в центре диска размером 3 нм [56, 104] (рис. 2).

Известно, что АФЦ занимают особое место среди фикобилипротеинов, поскольку их структура и фотофизические свойства обеспечивают эффективный захват энергии возбуждения от «коротковолновых» форм фикобилипротеинов - фикоцианина и фикоэритрина - и передачу энергии

возбуждения терминальным эмитером (ТЭ) и хлорофиллам реакционных центров [15]. В ряде работ авторы отмечают сложную структуру спектров поглощения тримеров АФЦ [13, 55], а также зависимость формы спектров от температуры [42]. Основной максимум в спектре поглощения (650 нм) обусловлен образованием тримеров и взаимодействием хромофоров, расположенных в соседних $(\alpha\beta)_1$ мономерах. При повышении температуры (до 45°C) взаимодействие между хромофорами нарушается, а в спектре поглощения возрастает вклад компонента с максимумом при 610 нм, что соответствует поглощению мономеров. АФЦ, как и другие фикобилипротеины, являются водорастворимыми белками, и наиболее важным фактором, влияющим на свойства АФЦ, являются сложные взаимодействия в системе хромофор-белок-вода [1, 97].

1.2. Структура, функция и фотоактивность ОСР

ОСР состоит из двух структурно различных доменов: полностью α N-концевого домена (NTD) и смешанного α/β C-концевого домена (CTD) [88], которые стабилизированы междоменным линкером и N-концевым расширением (N-terminal extension NTE), способным прикрепляться к CTD (Рис. 3А). Молекула кетокаротиноида важна для структурной стабилизации и фотоактивности ОСР и располагается между двумя доменами, придавая белку характерную оранжевую окраску (Рис. 3В). При освещении белка структура ОСР меняется: каротиноид транслоцируется в NTD, NTE отсоединяется от CTD и домены разделяются [5, 34, 54, 57, 84] (рис. 3С, шаг 1). Конформационные изменения сопровождаются спектральным сдвигом максимума в спектре поглощения каротиноида [106] (рис. 3В). Во время NPQ, опосредованного ОСР [9, 106], такие структурные изменения приводят к связыванию NTD с ФБС [40]; аналогичный эффект может быть вызван

отдельным фрагментом ОСР, содержащим каротиноид в NTD [84], но не STD [9, 84].

Связываясь с ФБС, ОСР вызывает тушение флуоресценции (рис. 3С.). ОСР перехватывает поток энергии идущей от стержней ФБС к её ядру, рассеивая его в тепло и тем самым предотвращая передачу энергии к реакционным центрам фотосинтеза [40]. Оранжевое состояние ОСР⁰ обычно отождествляется с физиологически неактивной формой белка которой приписывают структурные свойства ОСР в кристалле (PDB-ID: 3MG1, 4XB5). Напротив, красное состояние ОСР^R ассоциируется с фотоактивированной, физиологически активной формой, способной к тушению возбужденных состояний ФБС. Недавно были обнаружены многочисленные "оранжевые" и "красные" [66, 92] интермедиаты фотоцикла ОСР, поэтому ассоциация функционального состояния белка с цветом может быть неправомерной [40].

Из-за динамической и метастабильной природы состояния ОСР^R его молекулярная структура долгое время была неизвестна. В то же время фотоактивированное состояние ОСР можно модифицировать с помощью мутаций консервативных остатков, координирующих кетокаротиноид в STD, которые вызывают разделение доменов, спектральный сдвиг и другие признаки функционального состояния ОСР^R [93].

1.3. Функции белка восстановления флуоресценции (FRP)

Вскоре после выявления роли ОСР в процессе NPQ был обнаружен второй основной регулятор процесса нефотохимического тушения [46]. После удаления гена (slr1964), расположенного вблизи ОСР, восстановление флуоресценции ФБС после NPQ, вызванного синим светом, практически отсутствовало [46]. Эффективность тушения флуоресценции в таком мутанте

была незначительно выше по сравнению с клетками дикого типа, свидетельствуя, что продукт гена *slr1964* не вовлечен в активацию тушения ФБС непосредственно. Благодаря этому эффекту белок был назван белком восстановления флуоресценции (FRP). Исследование восстановления *in vitro* [40] показало, что минимальный набор, состоящий из ФБС, ОСР и FRP, достаточен для моделирования процесса фотозащиты цианобактерии. Добавление FRP к комплексу ФБС-ОСР приводит к восстановлению флуоресценции ФБС (рис. 3С, этап 3-а) даже при интенсивном освещении белков синим светом. Более того, присутствие FRP полностью предотвращало тушение флуоресценции ФБС с помощью ОСР [40, 93]. Переход $ОСР^O$ - $ОСР^R$ под действием синего света обратим, поэтому, вероятно, и взаимодействие $ОСР^R$ с ФБС самопроизвольно прекращается в темноте. Однако этот процесс значительно ускорялся в присутствии FRP [46] (рис. 3С, этап 3-б): предложено, что FRP обеспечивает две различные функции [21], одна из которых заключается в распаде комплекса ОСР и ФБС, а вторая вызывает ускорение инактивации ОСР за счет восстановления контактов между N и C доменами (рис. 3С, шаги 3-а и 3-б). Таким образом, основная роль FRP, вероятно, заключается в регуляции активности ОСР и контроле над эффективностью опосредованной ОСР фотозащиты.

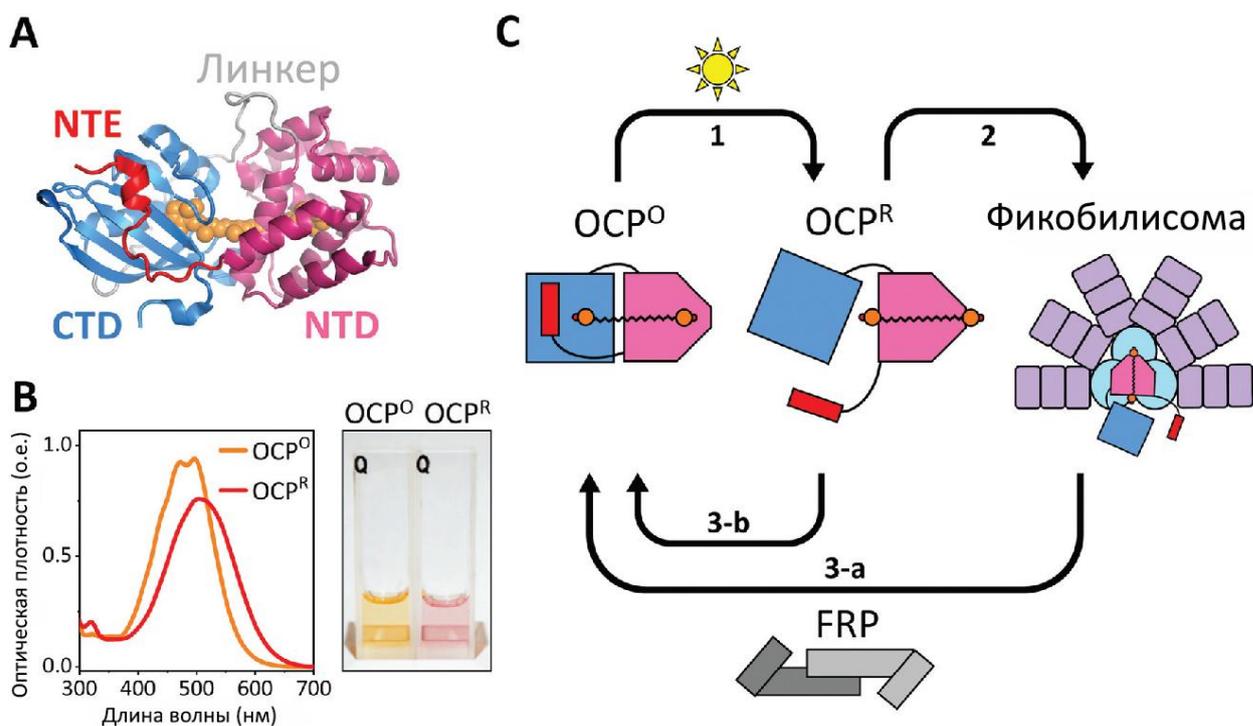


Рисунок 3. Структура и функция OCP из работы Slonimskiy et al., [78] (A) Кристаллическая структура OCP из *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PDB-код 4XB5). Молекула каротиноида (оранжевая) замкнута между N-концевым (NTD, розовый) и C-концевым (CTD, синий) доменами. Домены соединены линкерным полипептидом (серый) и стабилизированы N-концевым расширением (NTE, красный), связывающимся с поверхностью β -листа CTD. (B) Спектральные и цветовые изменения раствора OCP при фотоактивации. (Слева) При освещении сине-зеленым светом спектр поглощения OCP смещается в сторону более длинных волн, расширяется и теряет тонкую структуру. (Справа) Значительный спектральный сдвиг приводит к заметному изменению цвета с оранжевого на красный. (C) Упрощенная модель механизма фотозащиты, зависящего от OCP. OCP (та же цветовая кодировка) фотоактивируется и подвергается резким структурным преобразованиям (шаг 1). После перемещения каротиноида в NTD и разделения доменов OCP приобретает способность связываться с ядром ФБС (голубые круги) и перехватывать электронную энергию возбуждения пигментов ФБС (шаг 2). FRP ускоряет отсоединение OCP от комплекса ФБС-OCP (шаг 3-а) и превращает OCP^R в OCP^O (шаг 3-б).

1.4. Расположение и экспрессия генов FRP

Ген FRP у цианобактерий обычно локализован вблизи гена OCP: либо в непосредственной близости или с вставленным между ними геном кетолазы β -каротина [46]. Механизмы регуляции транскрипции OCP и FRP еще не выяснены. Сверхэкспрессия FRP приводила к значительно более быстрому восстановлению флуоресценции ФБС, что подчеркивает важность баланса уровней экспрессии OCP и FRP для эффективной регуляции механизма фотозащиты [19, 21, 88]. К сожалению, уровень транскрипции FRP до сих пор не исследован, по-видимому, из-за его относительно низкой экспрессии [10]. Согласно исследованиям, проведенным с применением иммуноблотинга, для индукции фотозащиты у *Synechocystis* требуется гораздо более высокая концентрация OCP по сравнению с FRP [21], что согласуется с результатами исследования *in silico*, моделирующего процессы механизма фотозащиты [19].

1.5. Структурная организация FRP

Оптимизация экспрессии гетерологичного белка в *E. coli* позволила получить полностью функциональный водорастворимый FRP, [21, 28]. Пространственная структура FRP с атомарным разрешением была определена методом рентгеновской кристаллографии с использованием белка из *Synechocystis* (PDB ID: 4JDX) [56] и *Tolypothrix sp.* PCC 7601 (PDB код 5TZ0) [10], а структуры FRP низкого разрешения в растворе были исследованы методом малоуглового рентгеновского рассеяния для *Anabaena variabilis* ATCC 29413 и *Arthrospira maxima* CS-328 [35].

FRP представляет собой α -спиральный димерный белок (рис. 4А, слева), состоящий из четырех длинных α -спиралей и одной короткой спирали, образующих две части, которые были названы "головка" (сине-зелёная) и "ножка" (синяя) (рис. 4В). Ножка состоит из $\alpha 1$ и $\alpha 2$ спиралей (рис. 4А, справа), обеспечивающих гидрофобный интерфейс, который стабилизирует сборку димера FRP. Доказано, что нарушение этого гидрофобного ядра (например, мутация L49E) приводит к мономеризации FRP [62].

Димерная структура FRP также стабилизируется за счет взаимодействий между цепями остатков R60 и W50, а также водородными связями между остатками D54 и R60 (рис. 4В). Замена любого из них приводит к нарушениям функциональной активности FRP (табл. 1), хотя мутантная форма R60K, по-видимому, сохраняет димерную форму, характерную для кристаллической структуры FRP дикого типа [28]. Остальные спирали FRP образуют головной домен, присутствующий в каждой субъединице FRP, который также важен для функционирования FRP (рис. 4В).

Отметим, что существует альтернативная конформация FRP, при которой полипептидные цепи $\alpha 1$ и $\alpha 2$ образуют одну длинную $\alpha 1'$ -спираль (рис. 4А, справа). Более того, такая конформация приводит к образованию тетрамерной формы белка в кристалле (рис. 4А, в середине). Тетрамерная форма не выявлена в кристаллической структуре FRP из *Tolypothrix sp.* PCC 7601 (PDB ID 5TZ0) [10] и вряд ли образуется в неконцентрированном растворе FRP [28, 60, 93], но различия в конформациях полипептидной цепи, наблюдаемые в структуре 4JDХ, вероятно, свидетельствует о динамике FRP, которая может быть связана с его функцией. Действительно, сравнение двух конформаций показывает возможность изгиба длинной $\alpha 1'$ -спирали с четким шарнирным участком (рис. 4А, справа).

Кроме того, поворот между субъединицами димера FRP, выявленный при сравнении кристаллографических димеров FRP из *Synechocystis* и *Tolypotrix* [10] и обнаруженный с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS), свидетельствует о возможности «скользящих движений» субъединиц FRP вдоль гидрофобного интерфейса димера [35].

Консервативные аминокислотные остатки (рис. 4С) преимущественно расположены только на одной стороне FRP и образуют отдельные участки в области “ножки” и “головки”. Такое распределение консервативных аминокислотных остатков позволило выдвинуть гипотезу об их участии в активности FRP и ее последующей проверке с помощью многочисленных точечных мутаций [8, 28, 62, 89] (рис. 4С). Мутации консервативных аминокислот отрицательно сказывались на функциональной активности FRP, однако полностью не лишали его способности взаимодействовать с OCP, поэтому точный молекулярный механизм взаимодействия OCP-FRP пока не ясен.

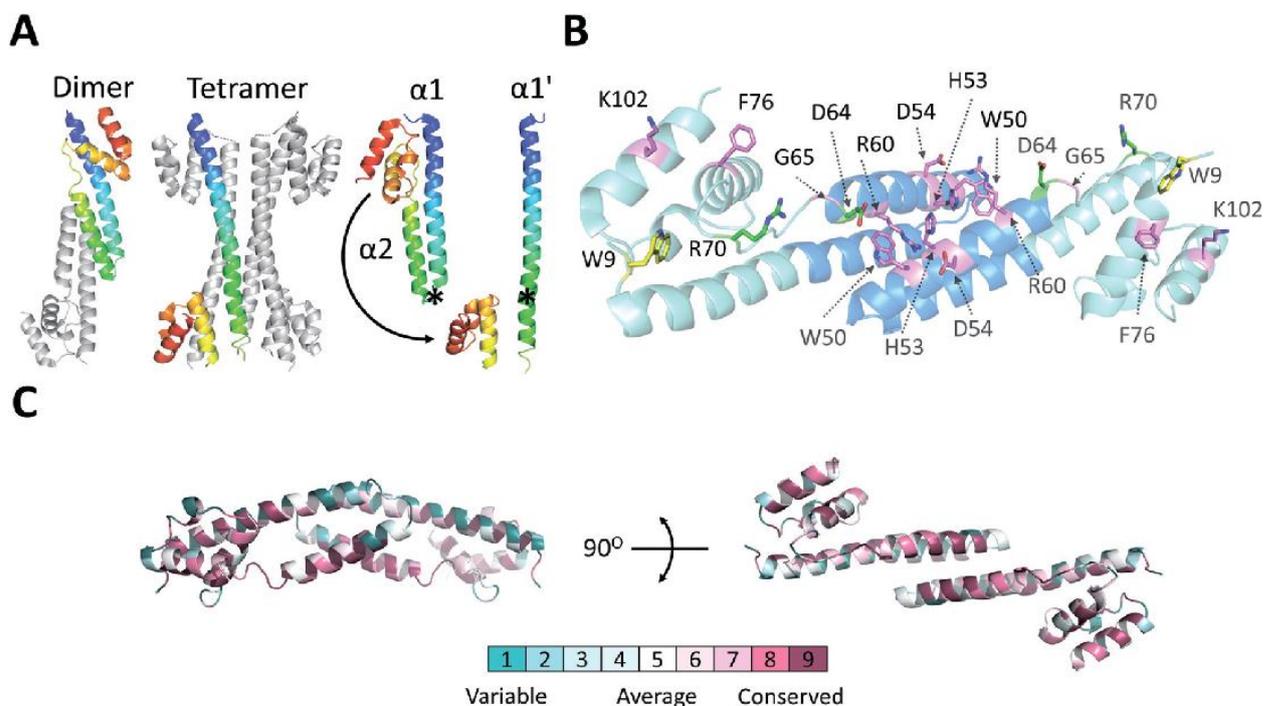


Рисунок 4. Структура и консервативность FRP, построенная на основе работы Slonimskiy *et al.* 2020 [78]. (А) Сравнение конформаций FRP димерной и тетрамерной форм в кристаллической структуре 4JDХ. (Слева)

Одна субъединица в каждой форме окрашена в радужные цвета, указаны N- и C-концы, остальные субъединицы показаны серым цветом. (Справа) Показан воображаемый поворот, трансформирующий полипептид FRP из димерной в тетрамерную конформацию. Звездочкой отмечена область шарнира. (B) Кристаллографический димер FRP с отмеченными аминокислотными остатками. Остатки обозначены на обеих субъединицах черным и серым цветом, соответственно. Различные субдомены FRP, "головка" и "ножка", показаны голубым и синим цветом, соответственно. Боковые цепи изображены палочками, окрашенными в соответствии с влиянием той или иной аминокислотной замены на функциональную активность FRP: фиолетовый - пониженная, зеленый - повышенная, желтый - отсутствие влияния. (C) Сопоставление консервативности с кристаллической структурой FRP (PDB-код 4JDX) с помощью ConSurf, представлена схема цветового кодирования.

1.6. Особенности взаимодействия OCP-FRP

Физиологическая активность FRP направлена на регуляцию взаимодействия OCP с ФБС, поэтому уже в первых работах было предложено прямое взаимодействие между OCP и FRP. Действительно, ко-иммунопреципитация OCP и FRP с использованием антител к FRP подтвердила это взаимодействие и доказала, что оно усиливается при фотоактивации OCP [46]. Позже прямое взаимодействие между FRP и OCP⁰ или имитирующим фотоактивацию OCP мутантом W288A было продемонстрировано количественно с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC) и нативного гель-электрофореза [93]. Установлено, что взаимодействие FRP с OCP^R (или с мутантом W288A) по крайней мере в 10 раз сильнее, чем с OCP⁰ [93]. Взаимодействие FRP с

апоформой ОСР также характеризуется аффинностью, сравнимой с таковой для ОСР^R или его функционального аналога W288A [47]. Все вместе это свидетельствует, что FRP специфически «распознает» формы ОСР с разделенными структурными доменами, однако, связываясь при этом с низким сродством с неактивной темноадаптированной формой ОСР. Предполагается, что взаимодействие FRP с ОСР^R приводит к объединению доменов ОСР, что, в свою очередь приводит к восстановлению неактивной оранжевой формы ОСР^O и последующему высвобождению FRP.

Основной сайт связывания FRP расположен в С-домене ОСР. Взаимодействие FRP с СТД ОСР было показано с помощью ко-иммунопреципитации, [28, 89] хроматографии SEC [16] и нативной масс-спектрометрии [104]. Для исследования корреляции между спектральными свойствами ОСР и изменениями в его структуре были проведены аналогичные эксперименты с ОСР-мутантом ΔNTE. У этого белка отсутствует короткая α-спираль в начале N-домена, которая закрывает основной сайт взаимодействия с FRP в С-домене, что обеспечивает ΔNTE формирование комплекса с димером FRP независимо от условий освещенности. Мы обнаружили ряд особенностей, отличающих релаксацию ΔNTE от ОСР дикого типа: например, кинетика релаксации ΔNTE хорошо совпадала в области 460 и 550 нм, а дифференциальные спектры при различных временных задержках были практически одинаковыми. Вероятно, что последние стадии релаксации каротиноидов в ОСР дикого типа координируются с диссоциацией комплекса ОСР-FRP и присоединением NTE к её первоначальному сайту связывания [82].

Действительно, делеция NTE, который в темноадаптированном неактивном состоянии прикрепляется к поверхности β-листа СТД в ОСР^O, вызывает связывание FRP с таким мутантом ОСР (названным ΔNTE-ОСР) даже без его фотоактивации [97]. Важно отметить, что делеция NTE дестабилизирует ОСР и при экспрессии в клетках *E. coli*, продуцирующих

кетокаротиноиды [91], дает смесь OCP^O- и OCP^R-подобных форм, отличающихся по спектру поглощения и размерам белка [97]. Связывание FRP приводит к так называемому "оранжеванию" (т.е. увеличению доли компактной оранжевой OCP^O) спектра поглощения Δ NTE-OCP [93, 97]. Независящее от фотоактивации взаимодействие FRP с Δ NTE-OCP свидетельствует о том, что сайты связывания FRP и NTE на поверхности STD вероятно, перекрываются [62, 97]. Недавно это было дополнительно подтверждено с помощью мутантной формы OCP у которой NTE и C-домен OCP содержат пару цистеинов, образующую дисульфидный мостик (OCP_{cc}). Такой мутант был не способен взаимодействовать с FRP, если только сконструированный дисульфидный мостик между NTE и STD не был удален путем восстановления [8, 32, 93].

Учитывая возможность реакции FRP с изолированным C-доменом OCP, можно предположить, что именно он служит первоначальным участком взаимодействия для образования комплекса. В тоже время активность FRP по связыванию доменов OCP предполагает существование некоторого вторичного сайта в NTD или в линкерной области. Связывание FRP с изолированным NTD не было показано с помощью хроматографии SEC [16], но было продемонстрировано нативной масс-спектрометрией, подтверждающей существование слабого сайта связывания [8].

Димерный FRP мономеризуется при взаимодействии с OCP [8, 35, 47, 62, 93, 97], что указывает на то, что связывание OCP, вероятно, вызывает значительные структурные перестройки в самом FRP. Действительно, анализы доступности растворителя показали, что разные структурные части FRP могут претерпевать значительные изменения при взаимодействии с OCP [1, 8]. Мономеризация FRP представляет собой отдельную стадию взаимодействия OCP-FRP [8, 35, 93, 97] и, по-видимому, происходит только после того, как димер FRP связывается с OCP, поскольку мутантная мономерная форма FRP была малоэффективна, в отличие от димера FRP,

стабилизированного за счет дополнительных дисульфидных связей, который был полностью аналогичен белку дикого типа с точки зрения возможности связывания OCP и функциональной активности [42].

1.7. Структурные модели, описывающие взаимодействие OCP-FRP

К сожалению, попытки кристаллизовать комплекс OCP-FRP до сих пор не увенчались успехом. Применение других методов структурного анализа и комплементарных подходов, детектирующих белок-белковые взаимодействия, позволило получить несколько моделей взаимодействия OCP-FRP. Все существующие описания модели основаны на связывании “головки” FRP с С-доменом OCP и подчеркивают важность отсоединения NTE как структурного элемента, ограничивающего взаимодействия белков. Химическое сшивание комплекса OCP-FRP и последующий пептидный анализ с помощью масс-спектропии позволили предположить связывание FRP в междоменной полости OCP^R вблизи линкерной области. Анализ доступности растворителя с помощью радиолитического мечения и масс-спектропии показал существенную динамику остатков “головки” FRP при взаимодействии с OCP^R, что свидетельствует, вероятно, о локальном разворачивании FRP. Данный процесс может спровоцировать мономеризацию и перераспределение заряженных аминокислотных остатков, что позволяет мономеру FRP связываться в междоменной полости [42] (комплекс 1:1 OCP-FRP).

Ещё одна модель, основанная на интегративном подходе с использованием SAXS и дополнительных биохимических методов, располагает молекулу FRP на обоих доменах OCP почти параллельно длинной оси OCP, при этом “головка” FRP образует контакты с CTD на месте NTE. Эта модель связывания OCP-FRP, не противоречит гипотезам о

конформационных изменениях структуры FRP, приводящих к мономеризации FRP. Топология комплекса OCP-FRP была исследована с помощью дисульфидной сшивки остатка “головки” FRP (K102C) с остатком CTD (F299C), который обычно экранирован NTE в составе темноадаптированного OCP⁰ [62]. Отметим, что предложенная топология соответствовала комплементарному распределению поверхностного заряда на взаимодействующих белках [62]. Предложенная модель связывания OCP-FRP основана на структуре компактного оранжевого OCP, лишённого NTE, что вызывает ряд вопросов о физиологической релевантности. Такая модель не позволяет судить о конформационных изменениях, происходящих при взаимодействии OCP-FRP, хотя и не исключает их. Кроме того, она представляет собой лишь одно из множества возможных переходных состояний.

Таким образом, для выяснения молекулярного механизма действия FRP необходимы дополнительные эксперименты. Изменения структуры и олигомерного состояния FRP во время фотоцикла OCP могут являться необходимыми конформационными адаптациями, связанными с физиологической активностью, требующей поддержания высокой эффективности фотосинтетических реакций.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1 Культивирование цианобактерий

Клетки цианобактерии *Arthrospira maxima* выращивали в среде Заррука [4] при 30 С под люминесцентными лампами с непрерывным освещением белым светом интенсивностью 100 ммоль фотонов м²с⁻¹. Клетки собирали центрифугированием в течение 15 мин при 7000 g, затем промывали один раз и ресуспендировали в 30 мл 40 mM Трис-НСl буфера, рН 8,8 (буфер А). Полученную суспензию дважды обрабатывали с помощью ультразвукового дезинтегратора VCX130 (Sonics & Materials) при интенсивности 40% и центрифугировали в течение 20 мин при 12000 g и 4 С для удаления остатков клеток. Супернатант подвергали фракционированию сульфатом аммония, фрагменты мембраны удаляли путем ультрацентрифугирования при 105 000 g в течение часа. К синему супернатанту добавляли сульфат аммония до 40% насыщения, и темно-синий осадок собирали центрифугированием в течение 30 мин при 12 000 g и 4 С. В супернатант дополнительно добавляли сульфат аммония до 60% насыщения, и после 30 мин выдерживания на льду центрифугировали для получения синего осадка и супернатанта розового цвета. Синий осадок растворяли в 15 мл 1,2 М раствора сульфата аммония в буфере А. Полученный раствор центрифугировали в течение 30 мин при 12 000 g и 4С, а затем разделяли на фракции с помощью гидрофобной хроматографии на колонке HiTrap Phenyl-Sepharose (GE Healthcare) объемом 5 мл с использованием градиента 1,2-0 М сульфата аммония на буфере А (10 объемов колонки) при скорости потока 2 мл/мин при комнатной температуре. Ярко-оранжевые фракции, свободные от цитохрома С (максимум поглощения при ~ 416 нм) собирали и затем диализовали в течение ночи против 2 л буфера А, после чего диализовали против 1 л 40 mM калий-фосфатного буфера, рН 7,3, для получения раствора ОСР, который характеризовался спектром поглощения, типичным для темно-адаптированной формы белка.

2.1.2 Экспрессия и очистка белков

Для получения рекомбинантных препаратов ОСР была использована следующая стандартная процедура [82, 93]. Две колбы с 500 мл лизогенного бульона, дополненного 34 мг/мл хлорамфеникола и 50 мг/мл ампициллина каждая, инокулировали из стартовой культуры до оптической плотности (ОП) 0,1 ед., и выращивали при 37 °С в орбитальном шейкере при 200 об/мин до достижения ОП 0,8 ед. После индукции экспрессии с помощью 500 мМ изопропил β-D-1-тиогалактопиранозида клетки выращивали в течение 48 ч при 25С. Клетки собирали центрифугированием, получая красноватый осадок, указывающий на биосинтез каротиноидов. Гранулы клеток ресуспендировали в фосфатном буфере со 100 мг лизоцима и ингибитором протеазы Complete (Roche, Базель, Швейцария) и лизировали с помощью трех-четырёх циклов замораживания/оттаивания на сухом льду с абсолютным этанолом. После удаления остатков клеток центрифугированием (12 000 g при 4 С), супернатант очищали методом аффинной хроматографии с помощью системы очистки АКТА FPLC (GE Healthcare, Литтл Чалфонт, Великобритания) с использованием 5 мл NiTrap Talon аффинных колонок (GE Healthcare). После элюирования градиентом имидазола от 20 мМ до 500 мМ был получен раствор белка, интенсивно окрашенный в оранжевый/красный в случае каротиноидных белков. Заключительный этап очистки с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 200 26/60 (GE Healthcare) позволил получить не только электрофоретически однородные, но и монодисперсные белковые препараты, свободные от агрегатов и неспецифических олигомеров. После концентрирования на центробежных фильтрах Amicon (Merck Millipore, Billerica, MA) белковый раствор обессоливали с помощью колонок PD-10 (GE Healthcare) и замораживали при -80 С для хранения. Концентрацию белков определяли на нанофотометре P330 (Implen) с использованием рассчитанных

коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon\lambda_{280\text{ нм}} = 15\,220\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$ для FRP, $\epsilon\lambda_{495\text{ нм}} = 63\,000\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$ для OCP, $\epsilon_{540\text{ нм}} = 38\,000\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$ для OCP^{W288A} и рассчитывали на концентрацию мономера. Кроме того, значения концентраций были подтверждены методом Брэдфорда с использованием BSA в качестве стандарта, что дало практически аналогичные результаты.

Вариант OCP-3FH OCP из *Synechocystis* sp. PCC 6803, несущий множественные аминокислотные замены W41F, W101F, W110F и W277H, был получен методом сайт-направленного мутагенеза с использованием набора для мутагенеза QuikChange II (Agilent, Санта-Клара, США). С целью сохранения способности к фотопереключению были введены замены Trp-41, Trp-101 и Trp-110 на остатки фенилаланина ("3F"), однако замена Trp-277 на фенилаланин приводила к отсутствию фотоактивности, поэтому этот остаток был заменен на гистидин ("3FH").

Все эксперименты проводили в 20 мМ Трис-HCl буфере, pH 7,6, содержащем 150 мМ NaCl.

2.1.3 Конструкции кДНК и клонирование

Для экспрессии апопротеина OCP из *Synechocystis* sp. PCC 6803 была сконструирована плазида, содержащая кДНК OCP в соответствии с опубликованной аминокислотной последовательностью (PubMed/UniProt entry P74102), оптимизированная для использования кодонов в *E. coli* путем искусственного синтеза генов (алгоритм GeneOptimizer® [26], GeneArt, Life Technologies.). КДНК вырезали с помощью BamHI и NotI и лигировали в рамке в модифицированный вектор pQE81L-Amp (Qiagen, Хильден, Германия), содержащий модифицированный сайт рестрикции NotI и ген устойчивости к ампициллину. В результате была получена

последовательность белка с N-концевой меткой 6xHis (N-концевая последовательность MRGSHNNNNHTDPAT), предшествующей первому метионину OCP. Генерацию мутантов OCP проводили с помощью набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange® (Stratagene) в соответствии с инструкциями производителя. Полные открытые рамки считывания всех конструкций были проверены с помощью секвенирования (Eurofins MWG Operon, Германия).

Для того чтобы осуществить вставку каротиноидного кофактора в белок OCP уже после экспрессии в *E. coli*, клетки NEBturbo (New England Biolabs) были трансформированы смесью 1:1 плазмиды pQE81L-Amp, несущей последовательность OCP, и плазмиды pACCAR16ΔcrtX (несущей кластер генов, состоящий из *crtY*, *crtI*, *crtB* и гена *crtE* из *Erwinia uredovora* и кассеты устойчивости к хлорамфениколу) для осуществления биосинтеза β-каротина в *E. coli*, или плазмиды pACCAR25ΔcrtX (несущая кластер генов, состоящий из *crtY*, *crtI*, *crtB*, *crtZ* и гена *crtE* от *Erwinia uredovora* и кассеты устойчивости к хлорамфениколу). Продукт гена CrtE (геранилгеранил-пирофосфат синтаза) образует геранилгеранил-пирофосфат из изопентил-пирофосфата и фарнезил-пирофосфата, два последних предшественника образуются в *E. coli*. Продукт гена *CrtB* (фитоен-синтаза) образует фитоен из двух молекул геранилгеранил-пирофосфата. Продукт гена *CrtI* (десатураза фитоина) образует ликопин из фитоена, а продукт гена *CrtY* (циклаза ликопина) образует β-каротин из ликопина.

2.1.4 Флуоресцентное мечение OCP

Очищенные препараты OCP и его апоформу, лишенную каротиноида (Apo), помещали в буфер, содержащий 30 mM HEPES-NaOH (pH 7.3) и 100 mM NaCl и затем подвергали мечению тетраметил родамином TMR (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO). Сначала добавляли 5-10 молярный избыток свежего дитиотреитола, выдерживали 15 мин при комнатной температуре для обеспечения восстановления Cys, а затем препарат ОСР снова отмывали в буфере L с помощью колонок NAP-10 (GE Healthcare) для удаления избытка дитиотреитола. Сразу после этого образец (1,2 мл) смешивали с 12 мл 20 мМ раствора TMR в диметилсульфоксиде и оставляли сначала на 30 мин при комнатной температуре, а затем на ночь при 4 °С для мечения. Избыток метки тщательно удалялся шестью-семью последовательными отмывками буфером L с последующим концентрированием на блоках Amicon с отсечкой 10 кДа (Merck Millipore) и окончательной заменой буфера на буфер L с помощью колонок NAP-10 для получения 1 мл раствора ОСР, меченного TMR.

2.2 Методы

2.2.1 Условия освещения ОСР, используемые для мониторинга фотоконверсии

В экспериментах фотоконверсия ОСР инициировалась синим светодиодом мощностью 5,4 Вт (SOLIS-445C, Torlabs, США), излучение которого дополнительно фильтровалось полосовым фильтром (450 нм, ширина полосы пропускания 40 нм, Torlabs, США) и фокусировалось на образец, помещенный в кювету из кварца. Синий светодиод управлялся драйвером (DC2200, Torlabs, США), который также подавал сигналы TTL для синхронизации с платой счета фотонов. Превращение ОСР^R/ ОСР^O происходит в темноте и, следовательно, может наблюдаться после окончания освещения образца сине-зеленым светом.

2.2.2 Измерения спектров поглощения

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 на временной шкале от единиц миллисекунд до сотен секунд фотопревращение ОСР активировали синим светодиодом мощностью до $5,4 \text{ Вт/см}^2$ (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 с частотой 80 МГц и генерирующего импульсы света 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). Описание дифференциальных спектров поглощения и флуоресценции с помощью программы Matlab (США) было выполнено методом глобального анализа. 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.

2.2.3 Измерения флуоресценции

Измерения стационарной флуоресценции проводили с помощью спектрофлуорометра FluoroMax-4 (Horiba Jobin Yvon). Образцы разбавляли до ОП ~ 0,1 единицы при 280 нм, чтобы избежать эффекта внутреннего фильтра и реабсорбции. Флуоресценцию Trp в OCP измеряли при возбуждении светом длиной волны 295 нм, а спектры эмиссии регистрировали в области длин волн 305-500 нм. Мы также измерили кинетику затухания флуоресценции Trp после фотоцикла OCP (конверсия OCP^O / OCP^R и OCP^R / OCP^O). Кинетика измерялась на фиксированной длине волны (360 нм) при возбуждении 295 нм с временным разрешением 0,1 с, а ширина щелей для возбуждения и испускания составляла 1 и 15 нм, соответственно.

Эмиссия флуоресценции гидрофобного зонда Nile red (NR) измерялась в растворе OCP во время конверсии OCP^O / OCP^R и OCP^R / OCP^O . Длина волны возбуждения была установлена на 560 нм, а излучение регистрировали в области 590-730 нм. Кинетику флуоресценции NR после конверсии OCP измеряли на фиксированной длине волны (640 нм) при возбуждении светом длиной волны 560 нм с временным разрешением 0,1 с, а ширина щелей для возбуждения и регистрации эмиссии была выбрана на 1 и 15 нм, соответственно.

Эмиссия флуоресценции TMR (Sigma-Aldrich) измерялась при длине волны возбуждения 510 нм, а эмиссия регистрировалась в области 550-680 нм. Температура образца стабилизировалась с помощью кюветодержателя Qpod 2e и контролировалась элементом Пельтье Пельтье (Quantum Northwest, Liberty Lake, WA).

В части работы по изучению тушения флуоресценции ФБС Trp288Ala мутантом *Synechocystis* измерения интенсивности свечения также проводили с помощью спектрофлуориметра FluoroMax4 (Horiba Jobin Yvon, Япония-Франция). Образцы разбавляли 0,8 М фосфатным буфером, pH 7,0, до ОП ~ 0,1 единицы при 280 нм, чтобы избежать эффектов внутреннего фильтра и реабсорбции. Температура образца стабилизировалась с помощью кюветного отделения Qpod 2e (Quantum Northwest, США) с магнитной мешалкой. Все эксперименты по тушению флуоресценции ФБС проводили в присутствии 0,8 М фосфата, что необходимо для поддержания целостности ФБС [40]. В качестве источника актиничного света использовали синий светодиод M455 L3 (Thorlabs, США). Начальный момент ($t = 0$) на временных шкалах представляет собой начало актиничного освещения образцов, содержащих ОСР или добавление ОСР^{W288A} в раствор ФБС.

Измерения стационарных спектров флуоресценции ОСР-3FH проводились с помощью спектрометра Maya 2000PRO (Ocean Optics, США) на основе CCD матрицы.

2.2.4 Измерения флуоресценции и анизотропии с пикосекундным временным разрешением

Чтобы исследовать структурными переходами белка, измеряли кинетику анизотропии флуоресценции TMR для оценки времени корреляции, которое связано с размером и формой белка. В данной серии экспериментов использовали краситель TMR, ковалентно связанный с ОСР. Кинетики затухания флуоресценции с пикосекундным временным разрешением регистрировали с помощью метода однофотонного счета, коррелированного по времени и длине волны (Becker and Nickl, ФРГ). Возбуждение осуществлялось при длине волны 510 нм (InTop, РФ) с частотой генерации

импульсов света ~ 50 МГц. Для отсекающего возбуждающего света использовался длинноволновый фильтр 550 нм (Thorlabs). В экспериментах с NR по мере его связывания с белком возбуждение осуществлялось с помощью лазерного диода ВНЛ-700 (Becker&Hickl, ФРГ) с длиной волны 635 нм и частотой повторения до 50 МГц. Для отсекающего возбуждающего света использовали Notch-фильтр NF633-25 (Thorlabs, США).

При регистрации флуоресценции Trp возбуждение осуществлялось с помощью лазерного диода 280 нм EPLED-280 (Edinburgh Instruments, Шотландия) с длительностью импульса 700 пс на полувысоте (FWHM). Кривые затухания флуоресценции аппроксимировали суммой экспоненциальных функций с помощью программного пакета SPImage (Becker and Hickl). Для сравнения различных кинетик затухания флуоресценции рассчитывали среднее время затухания в соответствии с выражением:

$$\tau_{av} = \sum_i^n a_i \tau_i \quad (1)$$

где τ_i и a_i - время жизни и амплитуда (нормированные на единицу: $\sum_i^n a_i = 1$) каждого компонента затухания флуоресценции, соответственно.

Кинетики анизотропии флуоресценции мы измеряли с помощью системы, собранной на базе фильтров и двух сверхширокополосных поляризаторов WP25M-UB (Thorlabs)[34]. Кинетику затухания флуоресценции $I(t)$ измеряли при различных положениях эмиссионного поляризатора - параллельно (\parallel) и перпендикулярно (\perp) ориентации возбуждающего поляризатора, а кинетика анизотропии $r(t)$ была рассчитана как

$$r(t) = \frac{I(t)_{\parallel} - I(t)_{\perp}}{I(t)_{\parallel} + 2I(t)_{\perp}} \quad (2)$$

Полученную кинетику затухания анизотропии аппроксимировали суммой затухающих экспонент,

$$r(t) = \sum_m r_{0m} \exp\left(-\frac{t}{\theta_m}\right) \quad (3)$$

где r_{0m} амплитуда и анизотропия m -го компонента при $t=0$ и θ_m время корреляции m -го компонента.

В некоторых экспериментах мы наблюдали сложную полифазную кинетику анизотропии, характерную для так называемого ассоциированного затухания [7; 20]. Чтобы количественно оценить время затухания анизотропии, мы предполагали, что каждому типу флуорофора соответствует одно время жизни (τ_m) и одно время корреляции (θ_m) [6]. Тогда затухание анизотропии для данного образца описывается следующим образом:

$$r(t) = \frac{\sum_m \alpha_m \exp(-t/\tau_m) r_{0m} \exp(-t/\theta_m)}{\sum_m \alpha_m \exp(-t/\tau_m)} \quad (4)$$

где α_m и r_{0m} - амплитуда и анизотропия m -й компоненты при $t = 0$.

Такая модель оправдана в случае использования с NR, который имеет короткое время жизни флуоресценции в водных растворах и более длинное время жизни при связывании с гидрофобными участками белков. Если считать, что наша система находится только в двух состояниях, то кинетика анизотропии может быть аппроксимирована следующим уравнением:

$$r(t) = \frac{\alpha_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) r_{01} \exp\left(-\frac{t}{\theta_1}\right) + \alpha_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) r_{02} \exp\left(-\frac{t}{\theta_2}\right)}{\alpha_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \alpha_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)} \quad (5)$$

где индексы соответствуют свободной и связанной молекулам NR, соответственно. В первом состоянии движение (вращение) NR происходит быстро, в то время как во втором состоянии оно ограничено размером сайта связывания и вращением всего белка.

2.2.5 Методы время-коррелированного счета одиночных фотонов (TCSPC) для изучения переходных процессов флуоресценции триптофана

В экспериментах с временными масштабами от миллисекунд до секунд фотоконверсия ОСР запускалась синим светодиодом (SOLIS-445C, Thorlabs, США), излучение которого дополнительно фильтровалось полосовым (bandpass) фильтром (450 нм, ширина 40 нм, Thorlabs, США) и фокусировалось на образец в кварцевой кювете. Температура образца поддерживали в кюветодержателе Qpod 2e (Quantum Northwest, США) с магнитной мешалкой и элементом Пельтье. Триптофановую флуоресценцию белка регистрировали при возбуждении образца импульсным субнаносекундным УФ-светодиодом (EPLD 265, Edinburgh Instruments, Шотландия) с максимумом излучения при 270 нм, скорректированным металлическим полосовым фильтром (270 нм, ширина 15 нм, Chroma, США), генерирующим импульсы света длительностью 700 пс со средней мощностью 0,6 мкВт при частоте повторения 20 МГц. Такая низкая мощность зондирующего света не вызвала изменений в уровне эмиссии Trp во время длительных экспериментов. Флуоресценцию образца (в диапазоне 300-400 нм) регистрировали в перпендикулярном направлении по отношению к направлению возбуждающего света. Свечение образца пропускали через коллимационную линзу, соединенную оптическим волокном с 16-канальным спектрографом с временной корреляцией (PML-SPEC, Becker & Hickl GmbH, ФРГ). Спектрограф оснащен детектором PML-16-C и решеткой 1200 линий/мм (разрешение 6,25 нм для каждого канала). Флуоресценцию образца регистрировали одновременно в 16 спектральных каналах с помощью системы время-коррелированного счета одиночных фотонов (TCSPC) на основе модуля SPC-130EM (Becker & Hickl GmbH, ФРГ). В работе использовали синий светодиод, который управлялся

драйвером (DC2200, Thorlabs, США) и формирующим TTL-сигналы для синхронизации с системой TCSPC. Аппаратура TCSPC работала в режиме first in first out (FIFO), что позволяло регистрировать поток одиночных фотонов вместе с внешними маркерами. С помощью программного обеспечения для измерений (SPCM 9.82, <https://www.becker-hickl.com/products/category/software/> Becker & Hickl GmbH, Германия) мы использовали режим MCS_TA (многоканальное скалярное триггерное накопление), который позволял использовать TTL-сигнал от светодиодного драйвера в качестве опорного триггера. Это позволило последовательно усреднить сигнал и увеличить отношение сигнал-шум.

Для достижения оптимального контраста между темноадаптированным и фотоактивированным состояниями образца мы изучали фотоцикл ОСР при низких температурах (0°C). В данном случае скорость фотоконверсии и последующей релаксации была мала, что позволяло получить серию кинетик затухания флуоресценции образцов в темноадаптированном состоянии и при полной конверсии. Изменения интенсивности, константы времени жизни и спектра флуоресценции обрабатывали с помощью программного пакета SPImage 8.0 (<https://www.becker-hickl.com/products/category/software/> Becker & Hickl, ФРГ). Для получения интегрированных по времени спектров флуоресценции и величины стационарного излучения мы суммировали изменения количества фотонов в каждом канале отдельных гистограмм затухания флуоресценции после коррекции фонового шума (вычитание темнового смещения, измеренного заранее).

В экспериментах по флуоресцентной спектроскопии накачки-зондирования использовали II и IV гармоники фемтосекундного Yb лазера. Излучение II гармоники ($\lambda = 525$, $\text{fwhm} = 150\text{фс}$, частота генерации 80 МГц) служило в качестве накачки, поскольку ее излучение хорошо перекрывается с поглощением каротиноида в ОСР. Импульсы света IV гармоники ($\lambda = 262$, $\text{fwhm} = 150\text{фс}$, частота генерации 80 МГц) использовались в качестве

зондирующих и использовались для возбуждения Trp в составе ОСР. Временные задержки между импульсами накачки и зондирования контролировали с помощью оптической линии задержки (GCD-302002 M, ДНС, КНР). Мощность лазера регулировали нейтральными светофильтрами так, чтобы она составляла 10 мВт для импульса зондирования и до 4500 мВт для импульса накачки.

Из-за высокой мощности актиничного света и медленной скорости релаксации фотоактивированных ОСР, измерения требовали циркуляции адаптированного к темноте образца через капилляр из плавленого кварца (диаметр 860 мкм). Перистальтический насос (PD 5101, Heidolph, Германия) обеспечивал скорость потока 0,6 мл/с, что приводило к скорости перемещения образца в капилляре ~ 1 м/с. Оптические импульсы накачки и зондирования были сфокусированы в одном и том же участке (~ 100 мкм) капилляра. Флуоресценцию Trp регистрировали с помощью охлаждаемого детектора однофотонного счета (HPM-100-07C, Becker & Hickl, Германия) с низкой скоростью темнового счета (~ 10 отсчетов в секунду), соединенного с монохроматором (ML-44, Solar, БР). Свечение триптофана регистрировали на длине волны (340 нм), которая соответствует максимуму спектра флуоресценции Trp в адаптированных к темноте ОСР. Разница между интенсивностью флуоресценции Trp с пучком накачки и без него измерялась в каждом положении оптической линии задержки. Из-за низкого квантового выхода фотоконверсии ОСР ($\sim 1,5\%$), измерение в каждой временной точке требовало 120 с для накопления приблизительно 10^6 фотонов. Эта процедура повторялась три раза для достижения надежного соотношения сигнал/шум.

Измерения стационарных спектров флуоресценции ОСР-3FH проводились с помощью спектрометра Maya 2000PRO (Ocean Optics, США) на основе CCD матрицы.

Все расчеты проводились с использованием программы Origin Pro 9 (<https://www.originlab.com/origin>, OriginLab Corporation, США). Все

эксперименты, представленные в данной работе, были повторены не менее трех раз.

2.2.6 Динамическое рассеяние света

Измерения распределения белков по размерам проводились с помощью прибора Nano-ZS (Malvern, Великобритания). Рассеянный свет (632,8 нм гелий-неонового лазера) регистрировался под углом 173° (в геометрии обратного рассеяния).

2.2.7 Аналитическая эксклюзионная хроматография

Метод SEC использовали для оценки гидродинамики белков FRP и OCP, а также для изучения взаимодействия FRP с OCP^{W288A} или OCP^O. Образцы (100 мкл) с различным содержанием белка предварительно инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем помещали на колонку Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare), уравновешенную дегазированным 20 mM TrisHCl буфером, pH 7,6, содержащим 150 mM NaCl, 0,1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 5% глицерина и 3 mM β -меркаптоэтанола. Колонка работала при 25 °C при скорости потока 1,5 мл/мин с использованием хроматографической системы ProStar325 UV/Vis HPLC/FPLC (Varian Inc.). В некоторых случаях мы снижали скорость потока до 1,0 мл/мин, чтобы улучшить разделение пиков. Профили элюирования контролировали по поглощению либо при 280 нм, либо при 540 нм (только для каротиноидных форм белков), а максимумы пиков использовали для расчета соответствующих объемов элюирования и

кажущихся молекулярных масс с помощью калибровки колонок по стандартам молекулярной массы, как описано ранее [6].

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Изменение свойств ОСР вследствие фотоактивации

3.1.1 Регистрация накопления красной формы ОСР по поглощению каротиноида и флуоресценции триптофана

В данной серии экспериментов мы изучили фотопревращение $\text{OCP}^{\text{O}} \rightarrow \text{OCP}^{\text{R}} \rightarrow \text{OCP}^{\text{O}}$ с помощью абсорбционной спектроскопии [94]. Поглощение ОСР в видимой области обусловлено переходом $S_0 \rightarrow S_2$ каротиноида (hECN). В неактивном темноадаптированном состоянии OCP^{O} полоса поглощения hECN характеризуется выраженной вибронной структурой, тогда как при фотоактивации спектр поглощения уширяется и смещается в красную область примерно на 10 нм, теряя вибронную структуру (рис. 5 А). Вероятно, данный сдвиг спектра обусловлен изменением взаимодействия в комплексе каротиноид-белок, и увеличением эффективной длины сопряжения π -электронной системы [81]. В основе таких изменений, очевидно лежат конформационные изменения молекулы каротиноида в результате фотоактивации.

Кинетика фотоактивации и релаксации ОСР обычно изучается путем измерения изменений оптической плотности $\Delta D(t)$ при ~ 550 нм, где поглощение в основном обусловлено OCP^{R} . Типичные кривые конверсии $\text{OCP}^{\text{O}} \rightarrow \text{OCP}^{\text{R}} \rightarrow \text{OCP}^{\text{O}}$, измеренные при 10°C , 17°C и 25°C , представлены на рис. 5 В. В ходе эксперимента выявлено постепенное увеличение оптической

плотности образца при 550 нм, что обусловлено накоплением красной активной формы $ОСР^R$ при освещении сине-зеленым светом. Снижение величины оптической плотности после выключения актиночного света представляет собой спонтанную релаксацию $ОСР^R$ в $ОСР^O$. Последний процесс считается светонезависимым [106]. Отметим, что спектр поглощения $ОСР^R$ также характеризуется незначительным увеличением поглощения в области 300-320 нм, что может соответствовать изомеризации молекулы каротиноида из транс- в 15-цис, согласно Saito *et al.* [77].

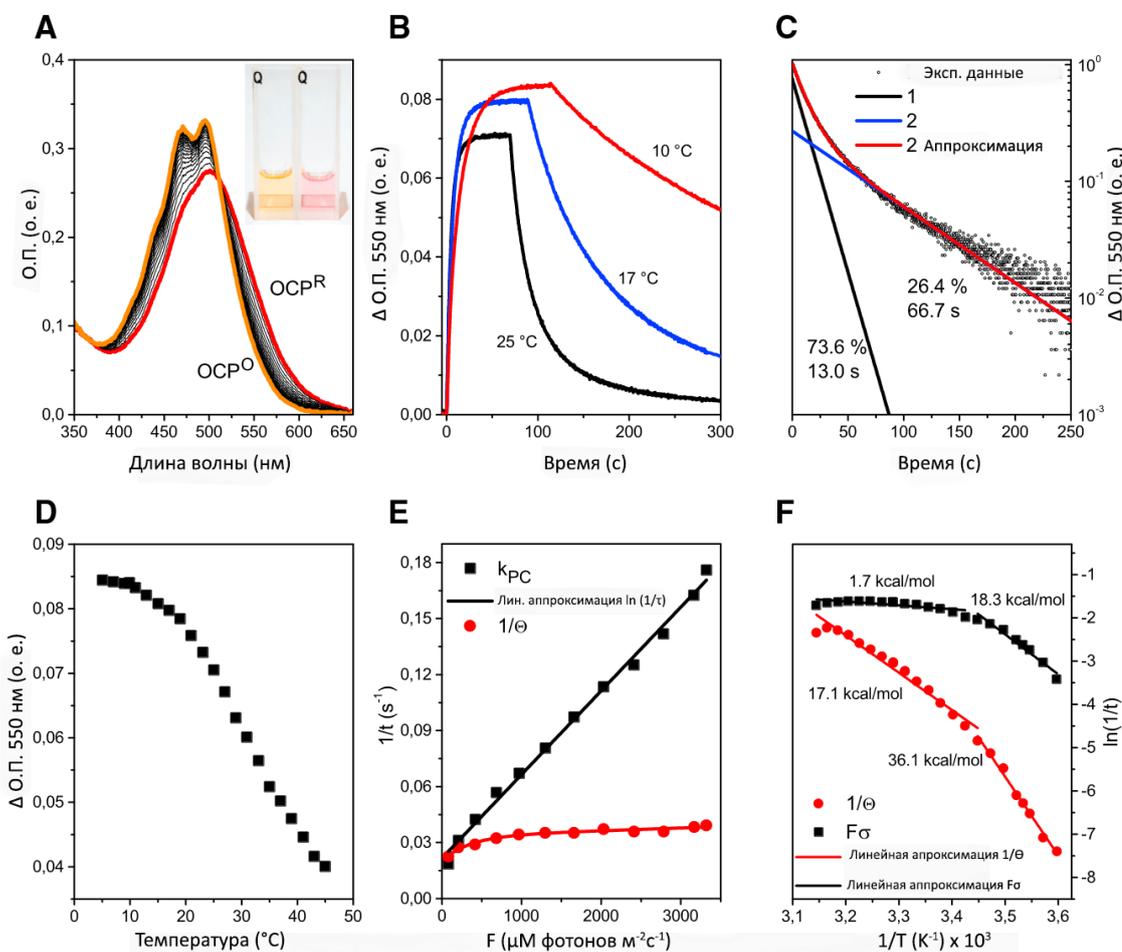


Рисунок 5. (А) Спектры поглощения $ОСР^O$ из *A. taxita*, $ОСР^R$ и набора промежуточных состояний во время релаксации $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$. (кувета с длиной пути 1 см при 20 °C). Фотоконверсия была индуцирована освещением сине-зеленым светом 3000 ммоль фотонов $m^{-2}s^{-1}$. На вставке показано изменение цвета образца в результате фотоконверсии. (В) Типичные кривые

конверсии $ОСР^0 \rightarrow ОСР^R \rightarrow ОСР^0$, измеренные как изменения оптической плотности при 550 нм при 10 °С, 17 °С и 25 °С. (С) Аппроксимация конверсии $ОСР^R \rightarrow ОСР^0$, измеренной при 28 °С с помощью биэкспоненциальной функции, $y = y_0 + A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$. (D) Температурная зависимость амплитуды сигнала фотоконверсии, измеренная как максимальное изменение поглощения при 550 нм. (E) Зависимость скоростей $ОСР^0 \rightarrow ОСР^R$ (kPC) и $ОСР^R \rightarrow ОСР^0$ ($1/\Theta$) от плотности потока фотонов (F). (F) Графики Аррениуса для рассчитанной Fσ скорости активации $ОСР^0 \rightarrow ОСР^R$ под действием 3000 ммоль фотонов $m^{-2}c^{-1}$ синезеленого света (квадраты) и последующей скорости релаксации ($1/\Theta$) в темноте (круги). Низко- и высокотемпературные области были аппроксимированы линейными функциями для оценки энергий активации.

Было показано, что релаксация $ОСР^R \rightarrow ОСР^0$ в темноте описывается биэкспоненциальной зависимостью во всех экспериментах (рис. 5 С). Характерные времена релаксации составили 13 и 66 с при соотношении амплитуд ~ 2:1 при комнатной температуре (18-20 °С). Важно, что ранние работы, посвященные измерению фотоконверсии ОСР с помощью метода абсорбционной спектроскопии, регистрировали моноэкспоненциальные кинетики релаксации $ОСР^R \rightarrow ОСР^0$. Мы предположили, что биэкспоненциальный характер релаксации может быть специфичен не только для ОСР *A. maxima*, но и для ОСР из *Synechocystis*, и отражает гетерогенность белкового препарата [80]. Недавно было установлено, что hECN связывается только с 81% ОСР *A. maxima*, а ECN - с оставшимися 19%. [80]. В связи с этим, можно считать, что наличие двух различных фракций ОСР может обуславливать биэкспоненциальную кинетику конверсии $ОСР^R \rightarrow ОСР^0$.

В следующей серии экспериментов мы провели исследование концентрационной зависимости кинетики изменений оптической плотности,

происходящих во время фотоцикла ОСР. Оказалось, что ни скорость релаксации $ОСР^R$, ни амплитуды компонент не зависели от концентрации в диапазоне 0,05-5 μM . Следовательно, бимолекулярные взаимодействия сохраняются в исследованном диапазоне концентраций не оказывая влияния на кинетику релаксации ОСР.

В исследованиях Gwizdala *et al.* [40] и Willson *et al.* [106] были обнаружены некоторые особенности переходов ОСР в красную форму и обратно, выявленные по изменениям ΔD при 550 нм: 1) Обнаружено, что скорости релаксации $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$ зависят от температуры. Так, эта скорость составляет $(3000 \text{ с})^{-1}$ при 5 °С против $(20 \text{ с})^{-1}$ при 30 °С, (энергия активации процесса релаксации ~ 40 ккал/моль); 2) отсутствие температурной зависимости скорости фотоактивации $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$ (при постоянной интенсивности сине-зеленого света); и 3) скорость фотоактивации $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$ зависит от ионной силы, хотя для скорости релаксации $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$ зависимости от ионной силы не наблюдалось. Эти факты показывают, что переходы $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$ и $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$ протекают с участием различных агентов. С другой стороны, Wilson *et al.* [106] указали на отсутствие температурной зависимости скорости фотопревращения $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$, анализируя аналогичные скорости (наклонов $\Delta D(t)$ на начальной стадии фотопревращения при высоких температурах, хотя в других исследованиях [80], при низких температурах изменения были обнаружены. Для оценки скоростей переходов $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$ и $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$ мы применили другую процедуру.

Известно, что скорость фотоконверсии ОСР при поглощении света равна произведению интенсивности света F (в $\text{см}^{-2}\text{с}^{-1}$) и сечения фотоконверсии σ , которое, в свою очередь, является произведением сечения поглощения σ_{exc} (в см^2) и квантового выхода фотоконверсии β . Если использовать $F = 3000 \mu\text{M}$ фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и сечение поглощения hECN $\sigma_{\text{exc}} \frac{1}{4} 4,6 \times 10^{-16} \text{ см}^2$ (при 470 нм) [7], то скорость фотопреобразования $\sim (10 \text{ с})^{-1}$

приводит к оценке параметра $\beta \approx 10^{-3}$, что хорошо согласуется со значением, опубликованным в работе Gorbunov *et al.* [7]. Далее, в темноте, $OSPR^R$ спонтанно превращается в $OSPR^O$ с характерной скоростью Θ^{-1} .

Кинетика накопления $OSPR^R$ (и, соответственно, изменения ОП при 550 нм) может быть описана следующим уравнением

$$[OSPR^R] = \frac{F\sigma}{F\sigma + \frac{1}{\Theta}} (1 - e^{-(F\sigma + \frac{1}{\Theta})t}) \quad (6)$$

Следовательно, скорость изменения поглощения, происходящего во время конверсии $OSPR^O \rightarrow OSPR^R$, может быть описана величиной τ^{-1} , которая зависит как от $F\sigma$, так и от Θ^{-1} [94]. Уравнение 7 описывает зависимость максимального уровня фотоконверсии ΔD_{max} от скорости релаксации $OSPR^R \rightarrow OSPR^O$ Θ^{-1} , которая зависит от температуры :

$$\Delta D_{max} \sim \frac{F\sigma\Theta}{1 + F\sigma\Theta} \quad (7)$$

Этот факт проиллюстрирован на рис. 5 D, где представлена зависимость максимальной оптической плотности при 550 нм как функция температуры. Установлено, что амплитуда изменения поглощения при низких температурах значительно выше, чем при высоких.

Для определения величины энергии активации фотопревращения $OSPR^O \rightarrow OSPR^R$ (при постоянной плотности потока фотонов 3000 μM фотонов $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) и последующей релаксации $OSPR^R \rightarrow OSPR^O$ мы следовали стандартной процедуре, измеряя изменения поглощения $OSPR$ при 550 нм в диапазоне температур 5-45 °C (рис. 5 F). Кинетики релаксации изменений оптической плотности при 550 нм были аппроксимированы биэкспоненциальной функцией $y = y_0 + A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$, чтобы определить средние времена для фотоактивации (τ^{-1}) и релаксации (Θ^{-1}) соответственно. Затем, чтобы получить значение $F\sigma$, мы вычитали Θ^{-1} из скорости τ^{-1} в соответствии с

формулой 7. (рис. 5 F). Аппроксимация температурной зависимости в координатах Аррениуса, позволила определить энергию активации и предэкспоненциальный коэффициент. Примечательно, что в наших экспериментах изменения скорости переходов $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$ и $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$ от температуры характеризуются насыщением этой величины при высоких температурах. Установленный результат можно объяснить уменьшением энергии активации при высоких температурах [100]. Нельзя забывать, однако, что при значительном повышении температуры может начинаться денатурация белка, что также может приводить к снижению скорости релаксации.

Итак, мы определили, что процесс фотоактивации $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$ $F\sigma$ протекает с низкой энергией активации 1,7 ккал/моль при высоких температурах и высокой энергией активации $\sim 18,3$ ккал/моль при низких температурах. В свою очередь скорость релаксации $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$ Θ^{-1} также зависит от температуры (энергетический барьер-36,1 ккал/моль при низких температурах) (рис. 5 F). Следует отметить, что подобного рода зависимости выявлены для NPQ и последующего восстановления флуоресценции *in vivo* [72].

Отметим, что, хотя предложенная нами модель процесса фотоактивации ОСР позволяет подробно описать многие экспериментальные факты, однако некоторые факты положенные в основу модели требуют дальнейшего изучения. Например, при постоянной температуре (25 °С) скорость фотопреобразования $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$ линейно зависит от плотности потока фотонов F актиничного освещения (рис. 5 E), что согласуется с уравнением 7. Из уравнения 7 следует, что скорость преобразования $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$ равна $k_{pc} = F\sigma + 1/\Theta$, а k_{pc} должна быть равна скорости релаксации $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$ $1/\Theta$ при низкой плотности потока фотонов ($F \rightarrow 0$). Однако линейная аппроксимация данных (см. рис. 5 E) свидетельствует, что значение k_{pc}^0 равно $\sim (50 \text{ с})^{-1}$ и это почти в два раза больше скорости

релаксации $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$, измеренной экспериментально при этой температуре при высоких значениях F.

Результаты исследования флуоресцентных характеристик Trp, локализованного в $ОСР^O$ и $ОСР^R$ (рис. 6 А). Известно, что белки дикого типа ОСР из *Synechocystys* содержат пять остатков Trp. Положение максимума спектра флуоресценции Trp зависит от микроокружения [52, 64, 102]: чем более полярно окружение, тем значительно смещается максимум спектра флуоресценции триптофана в красную область. В нашем случае положение максимума флуоресценции зарегистрировано при 343 нм, наблюдаемое для $ОСР$ (рис. 6 А), что характерно для Trp, контактирующего с молекулами воды [43].

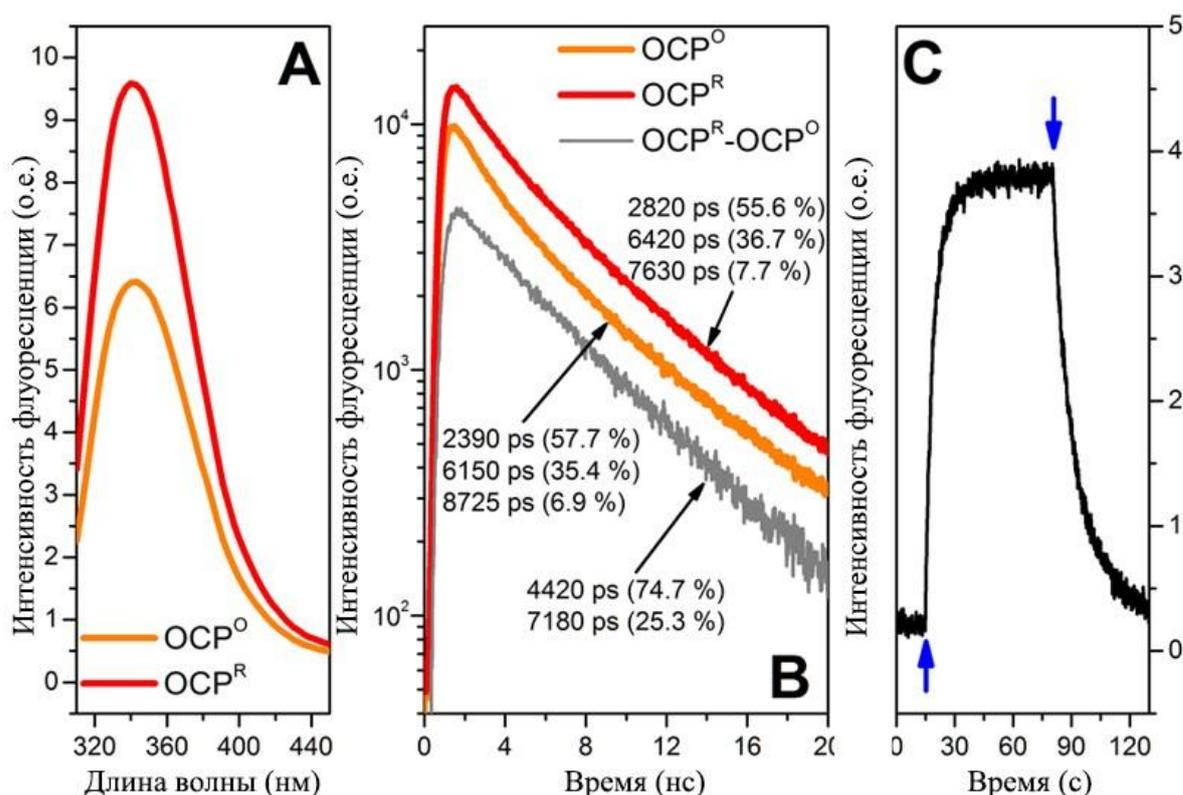


Рисунок 6. Флуоресцентные характеристики Trp, локализованного в $ОСР^O$ и $ОСР^R$. (А) Спектры флуоресценции Trp для *A. maxima* $ОСР^O$ (1) и $ОСР^R$ (2), измеренные в кварцевой кювете с длиной пути 1 см. (В) Кинетики затухания флуоресценции $ОСР^O$ и $ОСР^R$, зарегистрированные при 340 нм. Возбуждение образца при 280 нм осуществляли импульсами ~ 700 пс, генерируемыми

лазерным диодом FWHM при 2 °C; серая линия представляет разницу между кинетикой флуоресценции OCP^R и OCP^O. (C) Фотоконверсия OCP^O → OCP^R → OCP^O, измеренная как изменение интенсивности флуоресценции Trp при 340 нм при интенсивности сине-зеленого света 3000 ммоль фотонов м⁻²с⁻¹ при 25C. Стрелки указывают на начало и конец освещения сине-зеленым светом.

Облучение водного OCP OCP OCP раствора актиничным светом интенсивностью 3000 μМ фотонов м⁻²с⁻¹ на длине волны 460 нм вызвало увеличение интенсивности флуоресценции Trp на 30%, а максимум спектра флуоресценции сместился в синюю область (на ~3 нм) (рис. 6 А). Данный эффект может свидетельствовать об изменениях в локальном окружении Trp, поскольку отрицательно заряженные остатки вблизи пиррольного конца или положительные заряды вблизи бензольного конца кольцевой системы Trp смещают максимум флуоресценции в сторону более коротких длин волн (т.е. вызывают синий сдвиг), а противоположная конфигурация вызывает красный сдвиг [102]. Наблюдаемый рост интенсивности флуоресценции Trp может быть описан моноэкспоненциальной функцией с характерной постоянной времени (6 с)⁻¹, что хорошо согласуется с результатами, полученными с помощью абсорбционной спектроскопии с той же интенсивностью актиничного света (рис. 5). Кинетика спада флуоресценции Trp (рис. 6 С) после выключения актиничного света была биэкспоненциальной, что также согласуется с результатами, полученными при регистрации изменений поглощения при 550 нм. Процесс релаксации OCP при комнатной температуре может быть описан суммой двух затухающих экспонент с постоянными времени τ₁ = 12 с и τ₂ = 60 с.

Итак, по изменениям интенсивности флуоресценции Trp может судить о конформационных изменениях в третичной структуре белка. Поскольку кинетика спада интенсивности флуоресценции Trp (рис. 6 С), была

аналогична кинетике изменения интенсивности поглощения каротиноида в ОСР (рис. 5 В) можно предположить важную роль каротиноид-белковых взаимодействий в формировании фотоцикла ОСР. Увеличение интенсивности флуоресценции Trp после фотоактивации ОСР указывает на то, что снижение эффективности тушения возбужденного состояния Trp, вероятно, вызвано изменениями в конформации белка в процессе фотоактивации.

Действительно, во время фотоактивации происходит снижение общей эффективности переноса энергии электронного возбуждения от остатков Trp к хромофору hECN. Например, остаток Trp-290, необходимый для фотоактивности ОСР, находится в непосредственной близости от каротиноида hECN [33]. Можно предположить, что в результате перехода $ОСР^O \rightarrow ОСР^R$ расстояние (или ориентация) между hECN и Trp-290/Trp-110 значительно изменяется, что и приводит к снижению эффективности ЕЕТ.

Наши предположения основаны на следующем известном факте. Ранее процесс переноса энергии электронного возбуждения от Trp к хромофору был показан для другого фотоактивного желтого белка (PYR) [98]. В этой работе было продемонстрировано постепенное увеличение времени жизни флуоресценции одного остатка Trp в PYR при фотообесцвечивании его кофактора. Было обнаружено, что время жизни флуоресценции Trp в нативной (стабильной) форме PYR составляет 0,18 нс, и достигает 4,8 нс при обесцвечивании хромофора. При фотоактивации диодом на длине волны 470 нм PYR переходит в промежуточное (сигнальное) состояние, для которого время жизни флуоресценции Trp составляло 0,82 нс.

3.1.2 Переходные изменения гидрофобных свойств ОСР, обнаруженные с помощью флуоресценции гидрофобного красителя «Нильский красный» (NR)

Известно, что помимо флуоресценции Trp, для мониторинга конформационных изменений в белках широко используются флуоресцентные метки. Одной из таких флуоресцентных меток является краситель NR, который представляет собой гидрофобный зонд. Этот краситель связывается в гидрофобных полостях белка. Его фотофизические свойства, такие, как спектры поглощения и флуоресценции напрямую зависят от параметров микроокружения [76].

В данной серии экспериментов исследовали возможность связывания NR с ОСР и изменения параметров флуоресценции его в процессе фотоконверсии ОСР. В ДМСО NR демонстрирует высокий квантовый выход флуоресценции, кинетика его флуоресценции моноэкспоненциальна со временем жизни $\tau = 4,2$ нс (рис. 7 В). Флуоресценция NR значительно тушится в буфере PBS. В результате длительность флуоресценции NR в этой среде почти в 10 раз короче, чем в БСА или ДМСО. После добавления ОСР⁰ к раствору NR в буфере PBS мы наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции NR, что указывает на взаимодействие NR с ОСР⁰ и, вероятно, связывания зонда с гидрофобным участком молекулы белка (сайтами) ОСР.

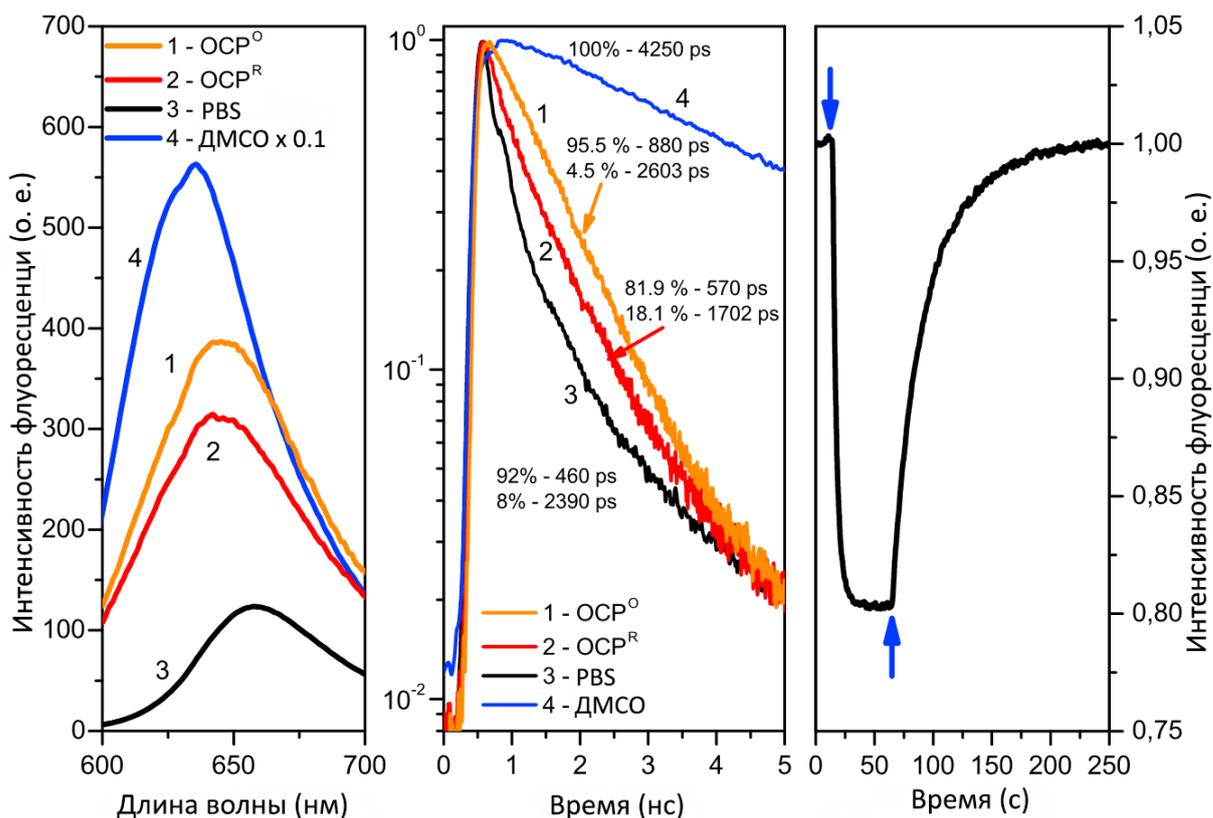


Рисунок 7. Спектры флуоресценции NR (A) и кинетика затухания флуоресценции NR (B) в OCP^O (1) и OCP^R из *A. maxima* (2). Молярное отношение NR к OCP было равно единице. Спектры флуоресценции NR в ДМСО (3) и буфере PBS (4) представлены синим и черным цветом, соответственно. Спектр флуоресценции NR в ДМСО был уменьшен в 10 раз для наглядного представления. (C) Процесс фотоконверсии OCP^O → OCP^R → OCP^O, измеренный как изменение флуоресценции NR при 640 нм при освещении образца NR+OCP сине-зеленым светом интенсивностью 3000 μM фотонов м²с⁻¹ при 25С. Стрелки указывают на включение и выключение сине-зеленого света.

Из рисунка 7C следует, что кинетика флуоресценции комплекса OCP^O-NR биэкспоненциальна с компонентами $\tau_1 = 880$ пс (95,5%) и $\tau_2 = 2600$ пс (4,5%) (рис. 7 B, 1). Наличие двух компонент в кинетике затухания флуоресценции может указывать на существование нескольких сайтов связывания NR в OCP или различной степенью связывания NR с OCP.

3.1.3 Роль Trp-288 и Tyr-201 во взаимодействии белка с каротиноидами и стабилизации оранжевой формы

Локализация молекулы каротиноида в $ОСР^R$ энергетически не выгодна, поэтому наблюдается спонтанная релаксация красной формы ОСР. Релаксация сопровождается перемещением каротиноида между доменами до тех пор, пока не будут восстановлены специфические Н-связи с Trp-288 и Tyr-201. Для установления роли этих контактов нами были проведены точечные замены доноров водородной связи тирозина-201 и триптофана-288 на аланин. Из-за отсутствия донора Н-связей Trp-288 оранжевое состояние $ОСР^{OI}$ мутанта $ОСР^{W288A}$ менее стабильно. Однако динамическое равновесие между $ОСР^{OI}$ и $ОСР^R$ может быть смещено в сторону оранжевой формы с помощью FRP или добавлением высоких концентраций фосфата (см рис. 8). В присутствии таких стабилизирующих агентов одной Н-связи с Tyr-201 достаточно для сохранения ОСР в оранжевом состоянии. Однако ни FRP, ни фосфат не влияют на спектр поглощения двойного мутанта $ОСР^{Y201A/W288A}$ (рис. 8А), который сходен со спектром $ОСР^{W288A}$, что свидетельствует, вероятно, о том, что в обоих мутантах каротиноид не связан прочно с STD [48].

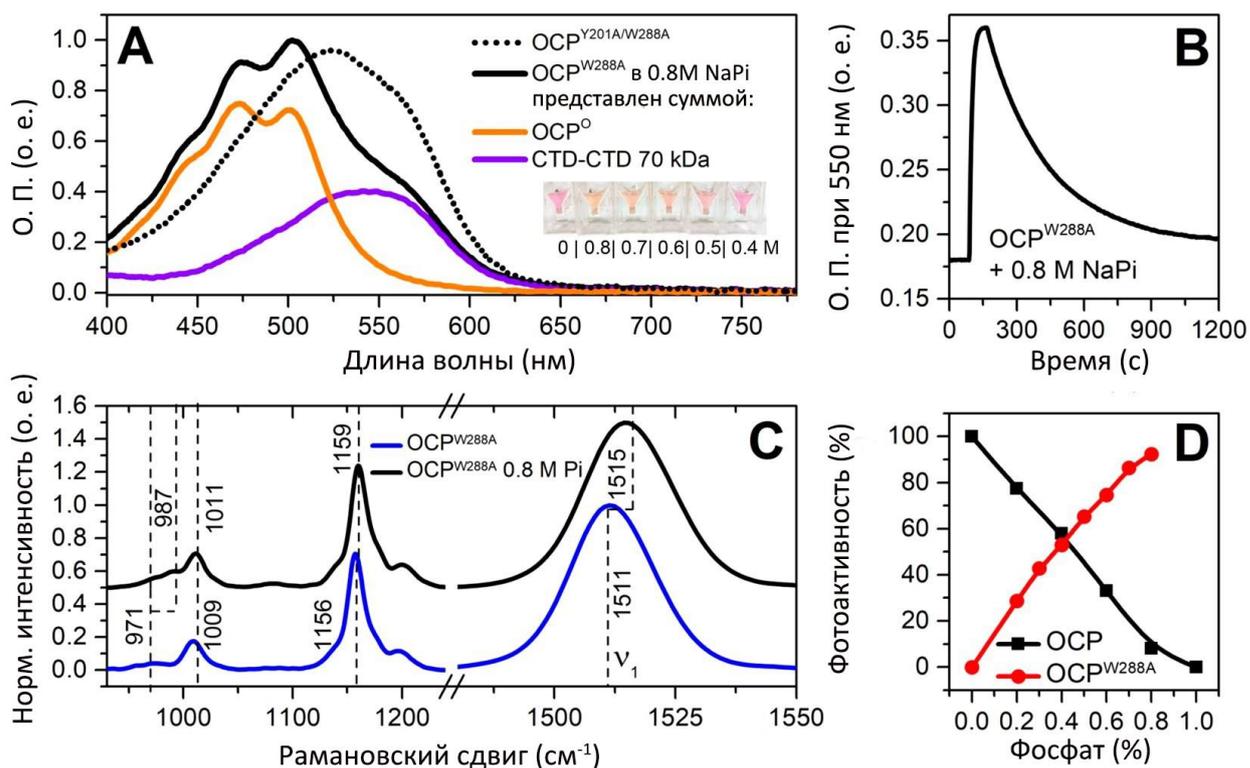


Рисунок 8. Влияние фосфата на спектральные и функциональные свойства OCP^{W288A} . (A) спектр поглощения OCP^{W288A} в 0,8 М фосфатном буфере. Спектр представляет собой смесь оранжевой OCP^{OI} и фиолетовой форм. Пунктирная линия показывает спектр поглощения мутанта $OCP^{Y201A/W288A}$, который идентичен изначально фиолетовой форме OCP^{W288A} , но не чувствителен к фосфату. На вставке показаны изображения кювет, содержащих растворы OCP^{W288A} в буферах с различной концентрацией фосфата. (B) Фотоцикл OCP^{W288A} , измеренный как изменение оптической плотности при 550 нм при освещении актиничным светом. (C) Спектры комбинационного рассеяния (КР) OCP^{W288A} без фосфата и с фосфатом. (D) Фотоактивность OCP дикого типа и мутанта OCP^{W288A} при различных концентрациях фосфата. Фотоактивность определяли, как изменение оптической плотности при 550 нм, нормированное на концентрацию каротиноидов в образце. Максимальные изменения оптической плотности при 550 нм для OCP дикого типа в отсутствие фосфата были нормированы на 100%.

Очевидно, что структура такого индуцированного фосфатом оранжевого ОСР^{W288A} не идентична ОСР^O, однако, в присутствии фосфата ОСР^{W288A} не только восстанавливает некоторые из его спектральных характеристик, но и способен к фотоконверсии под воздействием актиничного света (рис. 7B). Этот факт также был подтвержден с помощью спектроскопии КР (рис. 8C), показавшей что длина эффективного сопряжения π -системы каротиноида в составе ОСР^{W288A} увеличивается при повышении концентрации фосфата. Амплитуда сигнала фотоконверсии в случае ОСР^{W288A} не уменьшается из-за высокой концентрации фосфата (рис. 8D). Более того, скорость обратного перехода красной формы ОСР^{W288A} в оранжевую форму была обратно пропорциональна концентрации фосфата.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что аминокислота Trp-288 белка не является уникальным остатком, необходимым для фотопереключения ОСР, а скорее является дополнением к связи каротиноид тирозин-201 и необходима для стабилизации промежуточного соединения ОСР^{O1} во время обратной конверсии или для формирования окончательного компактного состояния ОСР^O, как это недавно показано Vandara *et al.* [65].

3.1.4 Взаимодействия триптофановых остатков ОСР, с молекулой каротиноида

Очевидно, наличие нескольких остатков Trp в структуре ОСР (см. рис. 9A) затрудняет интерпретацию флуоресцентных свойств каждой из этих молекул. Известно, что перенос электронов в возбужденном состоянии на карбонильные группы белковой основы является одним из основных механизмов тушения флуоресценции остатков Trp [63]. Учитывая этот факт и тесные взаимодействия между Trp-288 и кетокислородом β -кольца ЕСN, мы

предполагаем, что флуоресценция Trp-288 может также тушиться по статическому механизму. Ранее мы показали, что два концевых домена STD OCP могут связывать CAN (с кетооксигенами на каждом β -кольце) и что Trp-288 выполняет важную роль в стабилизации гомодимера C-домена OCP который мы назвали COCP [16, 96]. Сравнение кинетики затухания флуоресценции Trp в COCP и его апопротеиновой форме (Apo-COCP), имеющей только два Trp (Trp-277 и Trp-288 в STD *Synechocystis* OCP), показывает, что флуоресценция обоих остатков Trp снижается на 85% в присутствии каротиноида (рис. 9В).

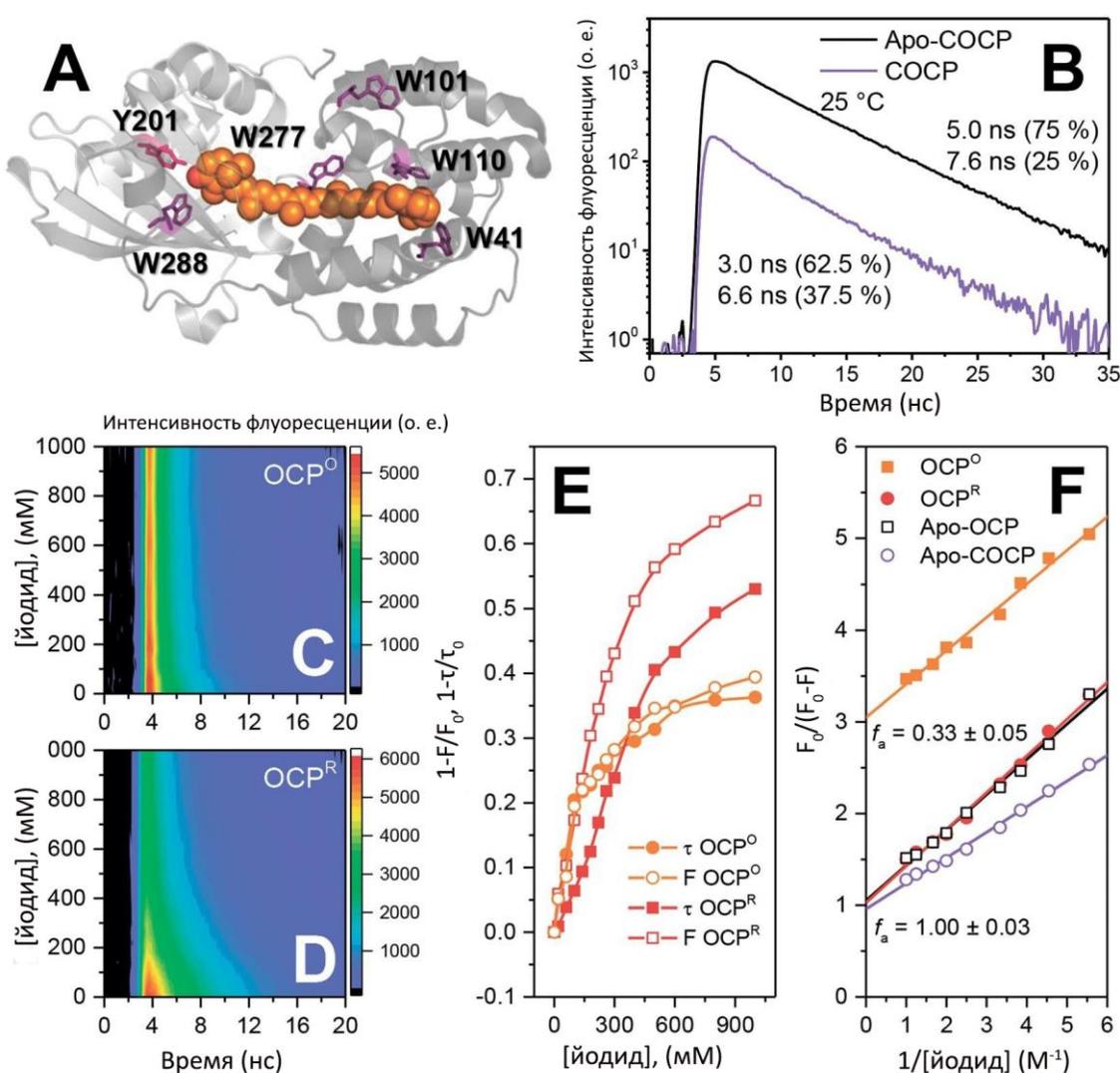


Рисунок 9. Тушение флуоресценции Trp в OCP и COCP каротиноидом и ионами йода. (А) Расположение всех остатков Trp и Tyr-201 в кристаллической структуре OCP в оранжевом состоянии (PDB:3MG1).

Каротиноид показан оранжевыми сферами, остатки Trp и Tyr-201 - фиолетовым и розовым цветами, соответственно. (B) Кинетики затухания флуоресценции СОСР (фиолетовый) и Аро-СОСР (черный), измеренные при 25 °С. Концентрация белка в обоих образцах была одинаковой. (C, D) Тушение флуоресценции Trp ОСР⁰ и ОСР^R возрастающими концентрациями йодида калия. Все эксперименты с йодидом проводились при 2 °С, чтобы уменьшить скорость обратной конверсии ОСР^R в ОСР⁰. (E) зависимости эффективности тушения от концентрации йодида, рассчитанные как изменения интенсивности флуоресценции и среднего времени жизни из данных, представленных в панелях C и D. (F) модифицированные графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции Trp йодидом, аппроксимированные линейными функциями. Пересечения ординат определяют обратные значения доли доступных остатков Trp (fa). Концентрация белка во всех образцах была одинаковой.

Тушение флуоресценции Trp в СОСР происходит по смешанному типу: около 25% определяется динамическим механизмом (связанное с изменением среднего времени жизни), а остальные около 75% обусловлены статическим механизмом. Можно предположить, что означает, что в гомодимере STD, координирующем каротиноиды, две молекулы Trp тушатся статически, а две других за счет переноса энергии электронного возбуждения к каротиноиду. Мы предполагаем, что статический механизм тушения Trp-288 реализуется за счет наличия Н-связи с каротиноидом, а флуоресценция Trp-277 тушится за счет безызлучательного переноса энергии. Отметим, что ситуация для Trp-277 в белке СОСР вполне может отличаться от механизмов тушения флуоресценции триптофана в состоянии ОСР⁰, поскольку в последнем флуоресценция Trp-277 частично тушится по статическому механизму, за счет формирования Н-связи с Asn-104 [85]. Однако, пока нет достаточных доказательств наличия подобной Н-связи в димере STD СОСР.

Для дальнейшего выяснения механизма тушения флуоресценции Trp в ОСР мы исследовали флуоресценцию Trp в присутствии различных концентраций йодида калия, хорошо известного динамического тушителя флуоресценции. Задача заключалась в сравнении механизмов тушения, вызванного йодидом в различных формах белка, и получении информации о доступности различных остатков Trp. Было установлено, что йодид по-разному влияет на процесс затухания флуоресценции ОСР в оранжевой и красной формах (рис. 9С, D и E). Тушение флуоресценции Trp ОСР⁰ сопровождается практически одинаковыми изменениями квантового выхода, однако в случае ОСР^R наблюдается несоответствие между изменениями длительности и интенсивности флуоресценции в присутствии йодида, что, вероятно, свидетельствует об участии в процессе различных типов остатков Trp. В целом, графики Штерна-Фольмера (отношение амплитуды флуоресценции F_0/F к концентрации йодида [52]) для Aro-СОСР, Aro-ОСР и ОСР^R представляли собой линейные зависимости (в области концентраций до 500 мМ йодида), с максимальным наклоном для Aro-СОСР (константа тушения около $4,5 \text{ M}^{-1}$). Для Aro-ОСР и ОСР^R были зарегистрированы совпадающие зависимости с меньшими наклонами (константы Штерна-Фольмера около $3,5 \text{ M}^{-1}$) (рис. 9). Представление результатов исследования с помощью графика Штерна-Фольмера для ОСР⁰ свидетельствует о тушении, возникающим при низких концентрациях йодида (рис. 9). Эти данные, указывают на ограниченность доступности остатков Trp в ОСР⁰. Оценим полученные результаты в соответствии с модифицированным графиком Штерна-Фольмера ($F_0/(F_0 - F)$ против $1/[I]$, [52]), (рис. 9F), что позволяет определить долю доступных остатков Trp (f_a) в ОСР⁰. Анализ модифицированных графиков Штерна-Фольмера ОСР⁰ позволил оценить значение $f_a = \sim 0,33$ (рис. 9F). Отметим, что в компактном состоянии ОСР⁰ до четырех из пяти остатков Trp уже вовлечены в статическое тушение из-за взаимодействия с каротиноидом, так что только один остаток Trp вносит вклад в наблюдаемую флуоресценцию. Вероятно, Trp-101 белка локализован

близко к его поверхности и, доступен для коллизионного тушения йодидом. Учитывая структуру ОСР^О (PDB: 3MG1), остаток Trp-101 может участвовать в ЕЕТ, находясь дальше всего от молекулы каротиноида (рис. 9А), в то время как остатки Trp в координирующей полости каротиноида, Trp-288, Trp-41 и Trp-110 (участвующие во взаимодействии с каротиноидом) и Trp-277 (образование Н-связи с Asn-104) подвержены статическому тушению.

Эти соображения согласуются нашими результатами о характере тушения Trp-277, наблюдаемого в СОСР. Более высокая эффективность тушения Trp в ОСР^Р по сравнению с ОСР^О, а также тушение флуоресценции Аро-ОСР, который имеет аналогичную структуру [47], и Аро-СОСР, вероятно, обусловлена различиями в конформации белка. В то время как ОСР^О очень компактен, ОСР^Р характеризуется разделением доменов и доступностью междоменной полости для растворителя [6, 94], в частности, для йодида.

3.1.5 Влияние удаления триптофановых остатков, не образующих водородную связь на фотоактивность ОСР

В литературе отмечается, что все остатки Trp в ОСР кроме W101 высоко консервативны и являются частью так называемого "каротиноидного туннеля", который формирует его специфическое гидрофобное окружение (рис. 10А). Таким образом, можно ожидать, что мутации существенно повлияют на эффективность связывания каротиноидов, спектральные свойства и фотоактивацию ОСР. Сочетание мутаций W41F, W101F, W110F и W277H (в результате которых нами была получена конструкция, названная ОСР-3FH) позволило получить холопротеин со спектром поглощения аналогичным спектру поглощения ОСР дикого типа (рис. 10В). Отсутствие четырех из пяти триптофанов приводит к значительному снижению

молярной экстинкции OCP-3FH в УФ-области. Так, отношение Vis/UV увеличилось с 1,85 (WT OCP) до 3,45 для адаптированного к темноте состояния OCP-3FH (рис. 10). Поскольку поглощение WT OCP и варианта 3FH аналогично в видимой области спектра, мы предположили, что молярный коэффициент экстинкции встроенного каротиноида одинаков в этих двух образцах и оценили его вклад в УФ-области равным $12,340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, (чтобы соответствовать экспериментальным значениям коэффициентов поглощения Vis/UV обоих образцов). Молярная экстинкция ECN в OCP равна $87,270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (при 495 нм), хотя предположение о равной молярной экстинкции ECN в WT OCP и OCP-3FH может быть чрезмерно упрощенным из-за возможного различного каротиноидного окружения и/или локальных эффектов электрического поля. Отметим, что важно учитывать вклад каротиноида в поглощение OCP и OCP-подобных белков в УФ области, поскольку это существенно влияет на определение концентрации холопротеина OCP. При исследовании OCP-3FH методом аналитической эксклюзионной спектрохроматографии удалось определить его размер 34-35 кДа, что полностью соответствует теоретическому значению (34,5 кДа) для мономера белка (рис. 10D и E). Поскольку гидродинамические свойства OCP-3FH и OCP дикого типа идентичны, мы предполагаем, что адаптированный к темноте белок 3FH остается в компактном оранжевом состоянии, которое не нарушается мутациями.

Освещение образца OCP-3FH актиничным светом вызывает обратимый переход в красное состояние, который можно наблюдать как увеличение поглощения при 550 нм. Важно отметить, что обратный переход OCP-3FH в отсутствие освещения происходит примерно в 50 раз быстрее по сравнению с WT OCP при тех же экспериментальных условиях. Совсем недавно мы показали, что длительность обратной конверсии OCP может быть резко уменьшена с помощью ковалентной стабилизации белок-белковых взаимодействий [32]. Однако, в случае OCP-3FH механизм, обеспечивающий

обратный переход, безусловно, иной. Увеличение скорости обратной конверсии, вероятно, связано с мутациями в NTD и особенно с заменами W41F и W110F в N-концевой части «каротиноидного туннеля». Эти замены, предположительно, снижают аффинность связывания каротиноида в этой области по сравнению с аффинностью CTD, на которую мутации практически не влияют.

Очевидно, что аминокислотные замены могут быть использованы также для контроля направленности переноса каротиноидов.

Тот факт, что при фотоконверсии поглощение образца обратимо уменьшается при 270 нм и увеличивается при 320 нм (рис. 10С) при переходе из оранжевой формы (ОСР⁰) в красную (ОСР^R), доказывает, что в области 250-300 нм поглощение аминокислот перекрывается с УФ-полосой поглощения встроенного каротиноида, что также следует учитывать при расчете концентрации белка.

При низких температурах, благодаря снижению скорости обратной конверсии, ОСР-3FH может быть полностью переведен в красное состояние, со спектром поглощения, аналогичным спектру поглощения фотоактивированного WT ОСР. Как и у WT ОСР, поглощение ОСР-3FH в адаптированном к темноте состоянии представляет собой суперпозицию оранжевого (77%) и красного (23%) состояний (рис. 10В) [53]. Согласно данным SEC, поглощающее в красной области состояние темноадаптированного образца, которое, как мы предполагаем, спектрально неотлично от ОСР^R, должно быть отнесено к компактному белковому состоянию с весом 35-кДа. Этот белок структурными особенностями темноадаптированного ОСР⁰, в котором могут происходить спонтанные конформационные изменения каротиноида.

Объединив эти наблюдения с предыдущими данными исследования варианта ОСР-W288A, который также может образовывать компактное

оранжевое состояние [92], мы пришли к выводу, что ни один из триптофанов ОСР не является необходимым для фотоактивности ОСР, хотя эти остатки могут быть важны для регуляции фотозащиты т.к. увеличивают время жизни красного активного состояния [33].

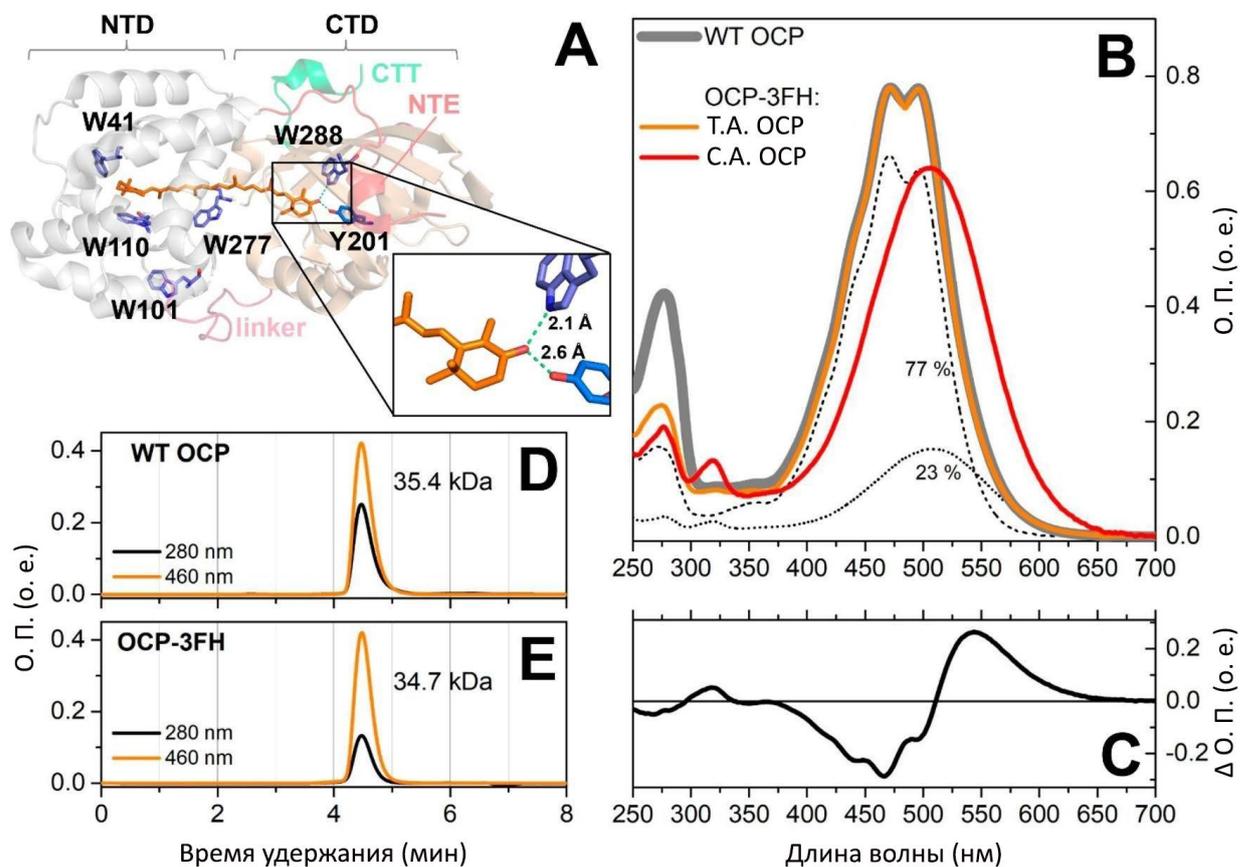


Рисунок 10. (А) Положение остатков Тгр в структуре ОСР из *Synechocystis* sp. PCC 6803. Остатки Тгр помечены и показаны фиолетовым, Тур-201 показан синим, NTE показан красным цветом, дополнительная С-концевая короткая α -спираль (СТТ) показана зеленым, NTD и CTD показаны серым и бежевым цветом, соответственно, междоменный линкер показан розовым. (В) UV-Vis спектры поглощения WT ОСР (серый) и ОСР-3FH (оранжевый), записанные с помощью детектора на диодной матрице в ходе хроматографии. Чтобы оценить выход отдельных спектральных состояний (пунктирные и штриховые линии), спектр поглощения фотоактивированного белка вычитали из темноадаптированного образца с соответствующим масштабным коэффициентом. (С) Спектр разности поглощения -

фотоактивированного (красный) и вычтенного из него адаптированного к темноте образца (оранжевый). (D), (E) Аналитические профили SEC вариантов WT OCP и OCP-3FH с поглощением при 280 нм и 460 нм, с оценками молекулярных весов, полученными в результате калибровки колонок. В экспериментах SEC концентрация белка составляла около 50 мкМ.

OCP-3FH представляет собой модель для исследования фотоцикла OCP, в которой сохранен только один, наиболее функционально важный, остаток Trp. Флуоресценция одиночного Trp в OCP-3FH чувствительна к наличию Н-связи между Trp-288 и каротиноидом. Мы обнаружили, что интенсивность флуоресценции Trp в темноадаптированном состоянии холопротеина OCP-3FH низкая, а фотоактивация при низкой температуре приводит к её четырехкратному увеличению связанному с накоплением красного состояния (рис. 11). Увеличение интенсивности флуоресценции сопровождается смещением максимума спектра флуоресценции Trp на 3 нм в красную область (рис. 11D) и увеличением амплитудно-взвешенного среднего времени жизни флуоресценции одиночного Trp-288 (с 2,65 до 3,35 нс, компоненты затухания показаны на рис. 11B). В нашей предыдущей работе на диком типе OCP мы исследовали типы тушения флуоресценции Trp в темноадаптированном состоянии OCP различных остатков Trp и определили, что флуоресценция Trp-288 в OCP⁰ тушится статически [92], что согласуется с настоящими наблюдениями. Поскольку увеличение среднего времени жизни на 21% не может быть связано с увеличением интенсивности флуоресценции на 300%, мы предполагаем, что при фотоактивации увеличивается количество непотушенных остатков Trp-288. Другими словами, фотоконверсия OCP устраняет статическое тушение флуоресценции Trp-288. В связи с этим возникает вопрос, почему флуоресценция Trp-288

тушится в адаптированном к темноте состоянии существенно, но не полностью.

Выше мы отмечали, что кинетика флуоресценции Trp мультиэкспоненциальна и чувствительна к микроокружению [58]. Для флуоресценции Trp в полярной среде обычно характерно наличие как минимум двух компонентов кинетики затухания [12]. Изменения интенсивности и длительности флуоресценции Trp обычно связывают с тушением возбужденного состояния [38], энергия и время жизни короткого, как известно, зависят от локального окружения и числа водородных связей в частности. Образование водородной связи с молекулой Trp приводит к красному сдвигу спектра флуоресценции [52]. Тушение флуоресценции Trp в адаптированного к свету состояния ОСР может происходить за счёт переноса электрона с возбужденной молекулы Trp на амидную карбонильную группу [20, 37] или в результате других механизмов молекулярных взаимодействий [24, 58]. Кроме того, некоторые исследования связывают различия во флуоресценции Trp с его ротамерными состояниями в белковой матрице [101], однако эта концепция все еще остается спорной [12, 12, 86]. Мы предполагаем, что тушение флуоресценции Trp-288 в ОСР-3FH обусловлено двумя различными путями распределения энергии: образованием состояния переноса заряда (charge transfer, CT) и переносом энергии электронного возбуждения (excitation energy transfer, EET) в состояние S_2 каротиноида. Состояние CT - это возбужденное состояние, в котором электронная плотность мигрирует от индольного кольца к карбонильной группе амида. Такое перераспределение заряда приводит к появлению большого дипольного момента состояния CT; таким образом, энергия состояния CT сильно зависит от локального электрического поля. Водородная ($\sim 2,1 \text{ \AA}$) связь между Trp-288 и кетокислородом каротиноида, очевидно, ориентирует отрицательный заряд в сторону индольного кольца. Этот эффект может дополнительно усиливаться молекулой Tyr-201, находящейся Trp-288 в

локальном окружении (рис. 10А). В этой ситуации состояние СТ будет энергетически стабилизировано, что, по сути, вызовет быстрый переход в состояние СТ. Разрыв водородной связи, как ожидается, вызовет противоположный эффект: дестабилизацию СТ относительно адаптированного к свету состояния. Результирующее снижение эффективности образования СТ приведет к увеличению сигнала флуоресценции Trp.

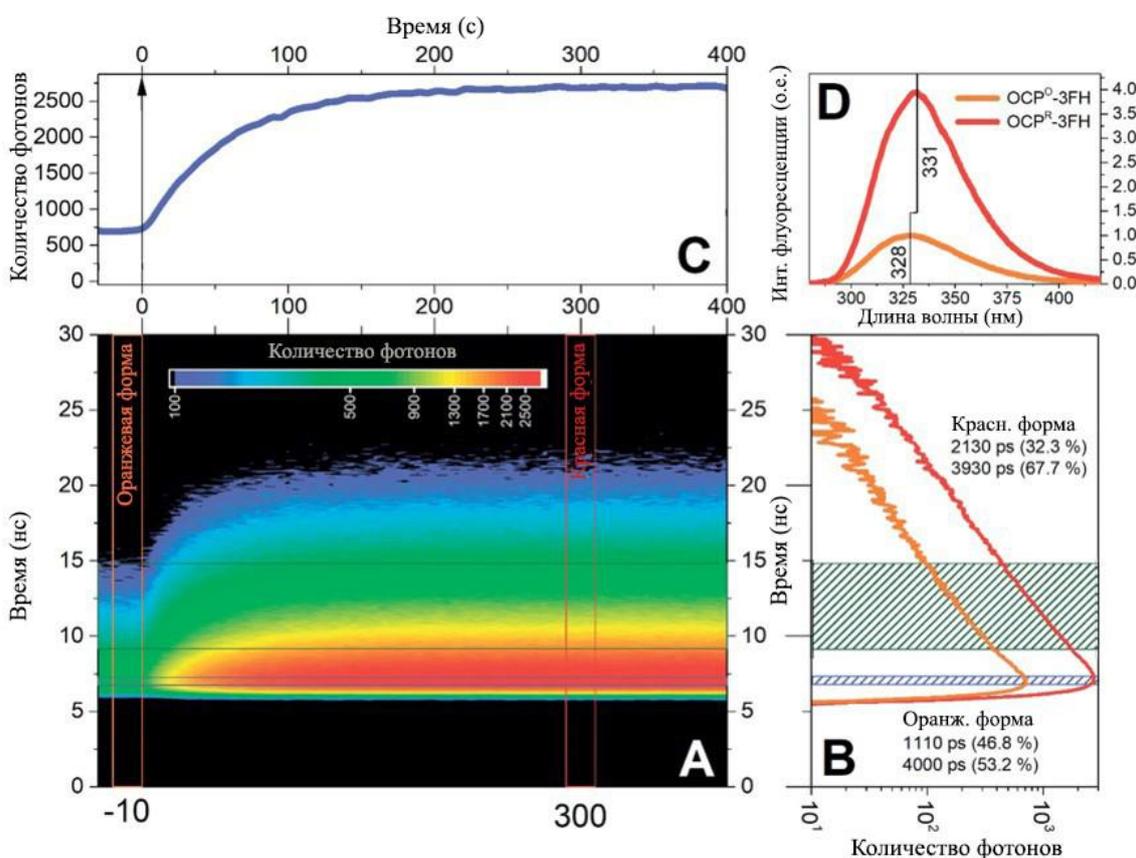


Рисунок 11. Накопление во времени красного состояния OCP-3FH, выявленное с помощью флуоресцентной спектроскопии Trp. Цветное 3D изображение (А) представляет собой последовательность кинетик затухания флуоресценции одной молекулы Trp в OCP-3FH, записанную с временем интеграции 5 с. Ноль на горизонтальной шкале времени представляет собой начало фотоактивации светодиодом мощностью 5 мВт, излучающим при 445 нм. Вертикальные оранжевые и красные сечения показывают интервалы

(пять соседних кривых затухания), в которых фотоны были объединены для демонстрации характерной кинетики затухания флуоресценции Trp-288 OCP-3FH в темном и светоадаптированном состояниях. (B) Кинетики затухания флуоресценции в полулогарифмическом масштабе (логарифм числа фотонов против линейного масштаба времени. Горизонтальные сечения показывают, как изменяется количество фотонов при фотоактивации образца на разных участках затухания флуоресценции и соответствующие временные каналы интенсивности. (C) синяя линия показывает изменения на пике интенсивности кинетики [синяя область на панели (B), среднее значение 10 временных каналов, общая ширина ~ 488 пс], зеленая линия показывает изменения во временных каналах, которые соответствуют медленной составляющей затухания [зеленая область на панели (B), среднее значение 100 временных каналов, общая ширина ~ 4,8 нс]. Эксперименты проводили при 0 °С. Концентрация образца была равна 2 мкМ. Каждая точка представляет собой среднее значение четырех независимых экспериментов. (D) Стационарные спектры флуоресценции OCP-3FH в темном (оранжевая линия) и светоадаптированном (красная линия) состояниях.

3.1.6 Динамика разрыва водородной связи между кето-группой и Trp-288

Важно отметить, что белковый препарат OCP-3FH не содержит апопротеина, который в противном случае вносил бы существенный вклад во флуоресценцию Trp. Однако, увеличение гидродинамического размера апоформы позволяет полностью отделить ее хроматографически от компактной холоформы белка [47], что исключает вклад апоформы в наблюдаемую эмиссию Trp. Далее, как было предложено ранее [92], статическое тушение Trp-288 в оранжевом состоянии может быть обусловлено взаимодействием с кетокислородом ECN (образованием

водородной связи), как это следует из анализа кристаллических структур [88]. При разрыве водородной связи этот тип тушения должен исчезнуть после фотоактивации и перехода образца в конечное красное состояние, в котором каротиноид транслоцируется в NTD и отделяется от Trp-288 вследствие разделения доменов. Учитывая, что все молекулы OCP-3FH переходят в состояние OCP^R и что время жизни флуоресценции Trp-288 изменяется от 2,65 до 3,35 нс, можно оценить долю остатков Trp-288, излучающих в компактном темноадаптированном состоянии, как 28,1%. Это число вполне соответствует спектральной неоднородности каротинопротеина в темно-адаптированном состоянии, поскольку в спектре поглощения UV-Vis наблюдается красная форма с вкладом 23% (рис. 10B). Мы предполагаем, что эта форма характеризуется отсутствием водородной связи между Trp-288/Tyr-201 и кето-кислородом ECN. Таким образом, спонтанное нарушение водородной связи, возможно, влекущее за собой изомеризацию каротиноида может происходить уже в компактном состоянии белка (рис. 10D и E) с OCP^O-подобной структурой. Учитывая, что OCP может быть оранжевым и фотоактивным даже в отсутствие Trp-288 [92], мы предполагаем, что в компактном красном состоянии водородная связь между кето-каротиноидом и Tyr-201 также нарушена, тогда как в оранжевом состоянии она должна быть сохранена. Это также позволяет предположить, что в ~ 5% образца у каротиноида отсутствует водородная связь с Trp-288, в то время как в оранжевом состоянии он удерживается благодаря водородной связи с Tyr-201.

В связи с тем, что ~ 71,9 % адаптированных к темноте форм OCP-3FH являются оранжевыми и "невидимыми" с точки зрения флуоресценции Trp, мы решили, что можно проследить за разрывом водородной связи ECN-Trp с помощью измерения флуоресценции Trp-288 в OCP-3FH.

3.2 Конформационные изменения структуры ОСР при фотоактивации

3.2.1 Флуоресценция ОСР выявляет оранжевое промежуточное состояние.

С помощью флеш-фотолиза нами было установлено, что время жизни промежуточного красного состояния и OCP^{R} составляет 300 мкс и 3,3 с, соответственно, а непрерывное (или высокочастотное) возбуждение образца актиничным светом приводит к накоплению физиологически активного состояния OCP^{R} . Кинетика обратной релаксации этого состояния до OCP^{O} была ранее подробно изучена, при регистрации спектров поглощения хромофора. Ранее мы показали, что стадии фотоцикла ОСР могут быть изучены с помощью различных флуоресцентных методов [6, 34, 47], включая флуоресценцию Trp. В связи с этим, в данной серии экспериментов мы исследовали флуоресценцию ОСР и анализировали кинетику переходных процессов, связанных с каротиноидами и белковой матрицей. В этом эксперименте мы использовали те же образцы и экспериментальные установки, что описаны выше, для измерения кинетики релаксации OCP^{R} . Были изучены изменения поглощения при 550 нм и эмиссия флуоресценции Trp при 350 нм. Флуоресценцию образца контролировали с помощью время-коррелированного счета фотонов, что позволило выявить не только изменения интенсивности флуоресценции, но и времени жизни флуоресценции Trp. После фотоконверсии образца в состояние OCP^{R} (1 мин освещения актиничным светом) свет выключали и регистрировали кинетику затухания флуоресценции с пикосекундным временным разрешением (рис. 11А).

Мы обнаружили, что интенсивность флуоресценции Trp значительно (до 85%) тушилась в темноадаптированном состоянии ОСР⁰ по сравнению с ОСР^R, а различия во временах жизни флуоресценции составляли менее 40% (рис. 11С). Если предположить, что в красном состоянии все пять остатков Trp обеспечивают флуоресценцию с одинаковым квантовым выходом, а общее тушение представляет собой комбинацию статического тушения и переноса энергии электронного возбуждения (ЕЕТ), пропорциональную числу остатков, участвующих в каждом типе тушения, то оказывается, что в оранжевом состоянии, только один остаток Trp (из пяти) может участвовать в миграции энергии возбуждения к каротиноиду за счет механизма ферстеровского резонансного переноса энергии Фёрстера (в результате $1/5 \times 60\% = 12\%$ от общей возможной интенсивности), в то время как остальные четыре остатка полностью тушатся статически из-за взаимодействий в темноадаптированном состоянии с каротиноидом или другими аминокислотами (и вносят нулевой вклад в общую интенсивность). Очевидно, остатки триптофана, участвующие в статическом тушении, скорее всего, непосредственно вовлечены во взаимодействие белка с хромофором, такие как Trp-288 (Н-связь с каротиноидом), Trp-110 (π -стекинг с каротиноидом) и Trp-41, или остатки, вовлеченные в междоменные взаимодействия, такие как Trp-277, поскольку он образует Н-связь с Asn-104, как следует из кристаллических структур (рис. 9А). Анализ кинетики изменения поглощения и флуоресценции при обратной конверсии ОСР^R в ОСР⁰ показал, что изменения длительности флуоресценции Trp происходят значительно медленнее, чем изменения интенсивности флуоресценции, хотя константы скорости последних были аналогичны константам скорости восстановления оранжевого состояния (рис. 12D). Этот факт свидетельствует о том, что восстановление первоначальной эффективности ЕЕТ между остатками Trp и каротиноидом, характерного для темноадаптированного состояния ОСР⁰, происходит только после того, как система белок-каротиноид уже перешла в оранжевую форму. Важно, что сравнение

изменений времени жизни и интенсивности флуоресценции позволило различить динамическое (связанное с ЕЕТ) и статическое тушение (рис. 12Е).

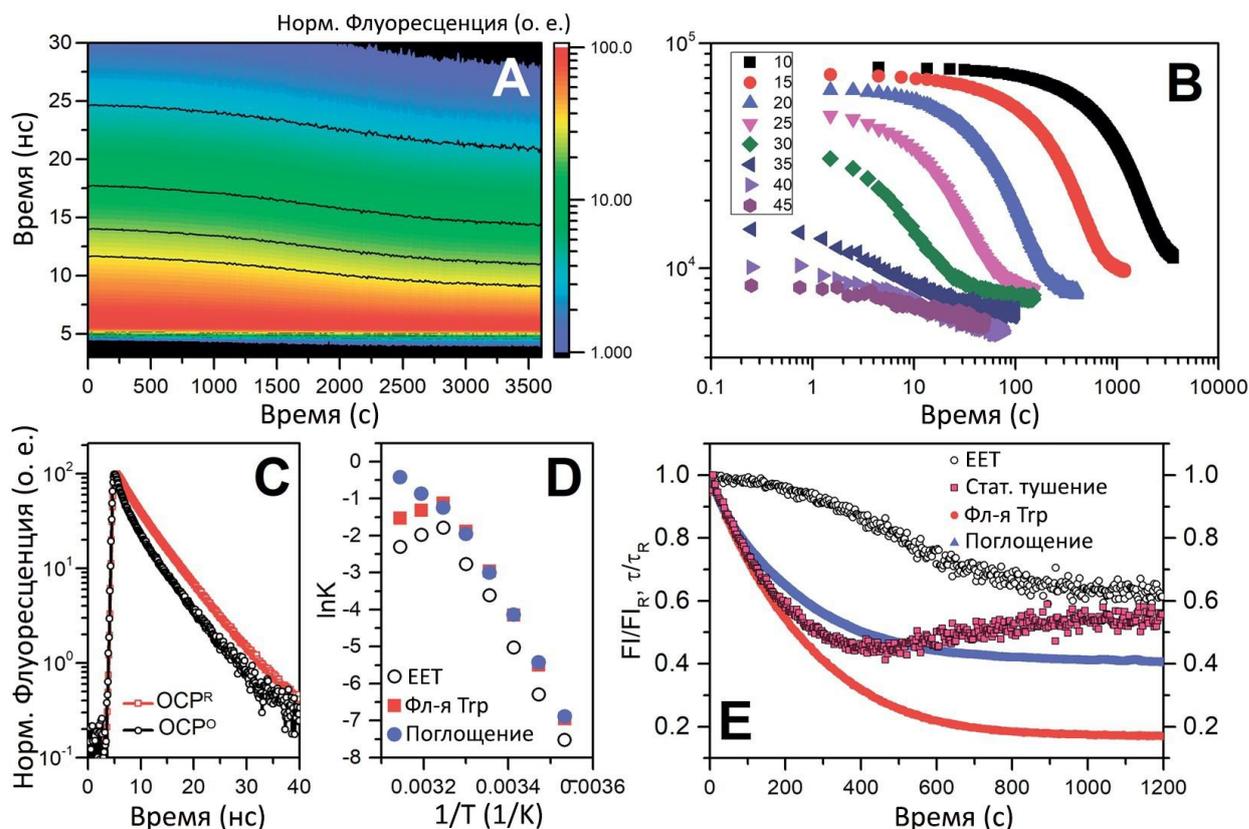


Рисунок 12. Изменения флуоресценции Trp в ОСР, связанные с переходом OCP^R-OCP^O . (А) типичный набор из 400 кинетик затухания флуоресценции, нормированных на максимальную интенсивность, измеренных при 10 °С последовательно после выключения актиничного света, вызывающего преобразование ОСР из красной формы в оранжевую. Черные линии обозначают одинаковые уровни интенсивности флуоресценции. (В) изменения интенсивности флуоресценции во времени при 350 нм при переходе OCP^R-OCP^O при температурах, обозначенных разными цветами на вставке, значения температуры даны в °С. Каждая экспериментальная точка была получена путем интегрирования соответствующей кинетики затухания флуоресценции Trp. Обе оси на этом рисунке показаны в логарифмическом масштабе. (С) нормализованная кинетика затухания флуоресценции Trp фотоактивированного (OCP^R) и ОСР преобразованного в темноадаптированное состояние белка после 60 минут в темноте.

Эксперимент проводили при 15 °С. (D) Графики Аррениуса для релаксации $ОСР^R-ОСР^O$, измеренные как изменения поглощения при 550 нм (Abs, синие круги), изменения интенсивности флуоресценции Trp (Trp fl, красные квадраты) и изменения среднего времени жизни флуоресценции Trp (EET, открытые круги), рассчитанные по данным, представленным в (B). (E) характерные кинетики переходов $ОСР^R-ОСР^O$, измеренные как изменения поглощения (синий) при 550 нм, и интенсивности флуоресценции Trp (красные круги) и времени жизни (или EET, открытые круги) при 350 нм. Переходы измеряли при 15 °С, концентрация образца была одинаковой для измерений флуоресценции и поглощения. Значения оптической плотности, интенсивности флуоресценции и времени жизни были нормированы на единицу. Кинетика изменения статического тушения (красные квадраты) рассчитывалось по изменению общей интенсивности флуоресценции $\frac{Fl(t)}{Fl_R}$ и средних времен жизни $\frac{\tau(t)}{\tau_R}$ как $\frac{Q(t)}{Q_R} = 1 - \frac{\tau(t)}{\tau_R} + \frac{Fl(t)}{Fl_R}$

Полученные данные свидетельствуют, что восстановлению статического тушения (например, за счет образования Н-связей или других взаимодействий остатков Trp) предшествуют изменения во взаимодействии каротиноида и белка. Мы предполагаем, что образование этого оранжевого промежуточного состояния (далее $ОСР^{OI}$) предшествует окончательным структурным перестройкам и восстановлению взаимодействий белок-хромофор, которые необходимы для стабилизации взаимодействий СТД-NTD и образования исходного темноадаптированного состояния $ОСР^O$. Учитывая, что восстановление спектра поглощения каротиноида до оранжевой формы требует правильного расположения молекулы каротиноида между ОСР-СТД и -NTD, включая образование Н-связей и, в конечном итоге, «изогнутой» структуры полиеновой цепи. Мы предполагаем, что перемещение каротиноида от NTD к СТД является первичным шагом на

пути к темноадаптированному, стабильному $OSCP^O$. Как обсуждалось ранее, скорость обратного превращения $OSCP^R-OSCP^O$ зависит от множества факторов, однако восстановление Н-связей между кетокислородом на β -кольце ECN и Trp-288 и Tyr-201 имеет решающее значение для стабилизации промежуточного состояния $OSCP^{OI}$ и последующего образования $OSCP^O$.

3.2.2 Промежуточные продукты фотоцикла OCP, выявленные с помощью флуориметрии Trp-288 с временным разрешением.

Традиционный способ исследования фотоцикла OCP заключается в освещении образца мощным актиничным светом в течение десятков секунд или даже минут и регистрации изменений поглощения при 550 нм. Такой подход позволяет накопить высокие концентрации долгоживущей красной формы $OSCP^R$ с разделенными белковыми доменами. Это важно для исследования физиологически значимых состояний белка. С другой стороны, непрерывное освещение делает невозможным изучение, в частности, ранних промежуточных продуктов фотоцикла OCP, которые появляются уже на миллисекундной или даже более короткой временных шкалах. Недостатком уменьшения длительности актиничной вспышки, очевидно, является потеря контраста между исследуемыми состояниями цикла. Эта проблема связана с низким квантовым выходом красного состояния $OSCP^R$ [66]. Для устранения этой проблемы мы использовали периодическое возбуждение OCP-3FH относительно короткими вспышками света (рис. 13). Такой подход позволил нам выявить многостадийное переключение состояний Trp-288 в ходе фотоцикла OCP.

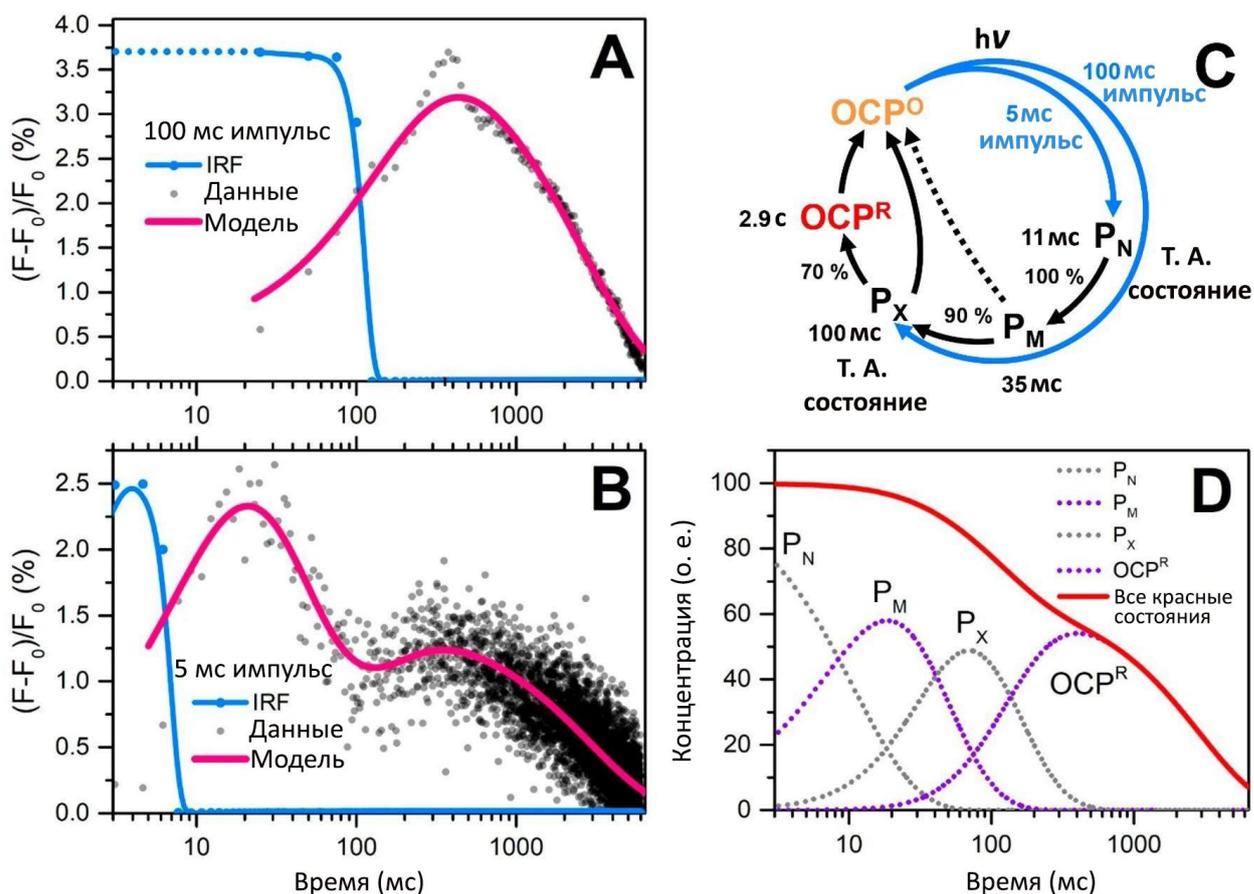


Рисунок 13. Характерные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции Trp-288 в OCP-3FH, индуцированные 100 мс (A) и 5 мс (B) актиничными вспышками (синий светодиод), измеренные при 20 °С. Флуоресценция Trp возбуждалась при 262 нм и измерялась при 340 ± 10 нм в режиме коррелированного по времени счета фотонов. Интенсивность флуоресценции, измеренная до вспышки (F_0), вычиталась из каждой точки, чтобы оценить относительное изменение интенсивности флуоресценции как $(F-F_0)/F_0$. Каждая кинетика представляет собой усреднение ~ 2000 фотоциклов. Сигнал регистрировали с временным разрешением 25 мс в (A) и 1,5 мс в (B). Концентрация образца была равна 2 мкМ. (C) Модель фотоцикла OCP, построенная на основе экспериментальных данных о флуоресценции Trp. Числами обозначены кинетические параметры, которые использовались для аппроксимации экспериментальных данных в панелях (A) и (B) (розовые линии) с помощью модели последовательных переходов. (D) Относительные

концентрации промежуточных состояний, образующихся после 5 мс вспышки (эксперимент на панели В).

Установлено, что интенсивность флуоресценции Trp достигает максимального значения уже после окончания актиничной вспышки (рис. 13). Чтобы объяснить полученный эффект, мы должны предположить, что после воздействия света, в течение нескольких мс остаток Trp-288 в белке участвует в формировании нескольких промежуточных состояний (последовательность, обозначенная как P_N - P_M - P_X - $OSCP^R$, см. рис. 13С), интенсивность флуоресценции которых пропорциональна концентрации, умноженной на квантовый выход флуоресценции, который может быть различным для каждого из таких состояний. Мы предположили, что квантовый выход флуоресценции для промежуточного состояния P_N равен 0, а для состояния P_X в 4 раза ниже по сравнению с $OSCP^R$. Без такого допущения оказалось невозможным качественно описать эффект увеличения интенсивности флуоресценции Trp через 30 мс и 300 мс после выключения актиничной вспышки. Отметим, что в настоящее время технически невозможно определить длительность флуоресценции Trp, чтобы объяснить причины изменения интенсивности флуоресценции при переходе от одного промежуточного состояния к другому.

Природа и количество обнаруженных промежуточных состояний (P_N - P_M - P_X), выявленных при регистрации флуоресценции Trp-288 при переходе от $OSCP^O$ к $OSCP^R$, вызывают научный интерес в связи с тем, что не установлена их физиологическая роль. Только конечное состояние (с временем жизни 2,9 с) однозначно соответствует $OSCP^R$ с разделенными доменами белка, в то время как другие состояния возникают и исчезают значительно быстрее (рис. 13). Вероятно, они представляют собой состояние белка $OSCP$, в которых структурные домены все еще расположены в компактном, адаптированном к темноте состоянии, что, в частности,

обеспечивает интактный каротиноидный туннель и более эффективное перемещение молекулы каротиноид обратно в STD. Таким образом, конформационные изменения (в течение 100 пс) могут быть отнесены к медленным, заключительным этапам фотоконверсии ОСР. В работе Konold *et al* [66] параллельно контролировали времяразрешенную переходную абсорбционную и ИК-спектроскопию в ходе фотоцикла ОСР (в диапазоне времени от ~ 100 фс до 750 пс) и обнаружили четыре промежуточных состояния, включая промежуточное состояние P3, появляющееся в течение 10 пс после освещения со спектром поглощения аналогичным конечному состоянию ОСР^R. Это состояние не менялось далее до последней временной задержки (750 пс). По мнению авторов, P3 представляет собой состояние, в котором каротиноид уже локализован в NTD, в то время как конформация NTE и СТТ ещё не поменялась и, по мнению авторов работы, должны были развернуться и/или диссоциировать от С-концевого β -листа за время более 0,5 пс, чтобы произошло разделение доменов [66]. В связи с этим, мы предполагаем, что P3 может структурно соответствовать P_N-состоянию Trp288 (см. рис. 13), а две последующие стадии (P_M-P_X) связаны с конформационными изменениями NTE и СТТ.

Хотя природа снижения интенсивности флуоресценции Trp в конкретных промежуточных состояниях (P_N и P_X) не установлена, отметим, что Trp-288 расположен в β -листе STD, который образует контакты как с NTE, так и с СТТ (см. рис. 10А). Учитывая, что конформация белка в этой области значительно изменяется при фотоактивации и, как предполагается, отвечает за димеризацию ОСР^R при высокой концентрации белка, мы предполагаем, что и флуоресценция Trp-288 может быть чувствительна к таким изменениям локального окружения в молекуле белка. Важно, что водородные связи с Trp-288 нарушаются на значительно более коротком временном интервале, поэтому невозможно связать наблюдаемые медленные изменения флуоресценции Trp-288 с взаимодействием с ЕСН (например,

индукцией СТ-состояний); однако снижение эффективности ЕЕТ от Trp к ECN, по мере увеличения расстояния по мере разделения доменов, может вносить свой вклад в наблюдаемые эффекты (рис. 13А, В).

3.2.3. Стадии фотоцикла ОСР

Спектральная гетерогенность поглощения каротиноидов, которая наблюдается даже при компактном, темноадаптированном состоянии белка, возникает из-за спонтанного разрыва водородных связей между ECN и Trp-288/Tyr-201. Это означает, что примерно 25% темноадаптированного ОСР находится в компактном, "красном" состоянии, в котором молекула каротиноида приобретает конформационную подвижность из-за потери H-связи с Trp-288/Tyr-201.

Однако вероятность того, что эти состояния переходят в физиологически активное состояние ОСР^R с разделенными белковыми доменами, мала, поскольку водородные связи в конечном итоге быстро реорганизуются.

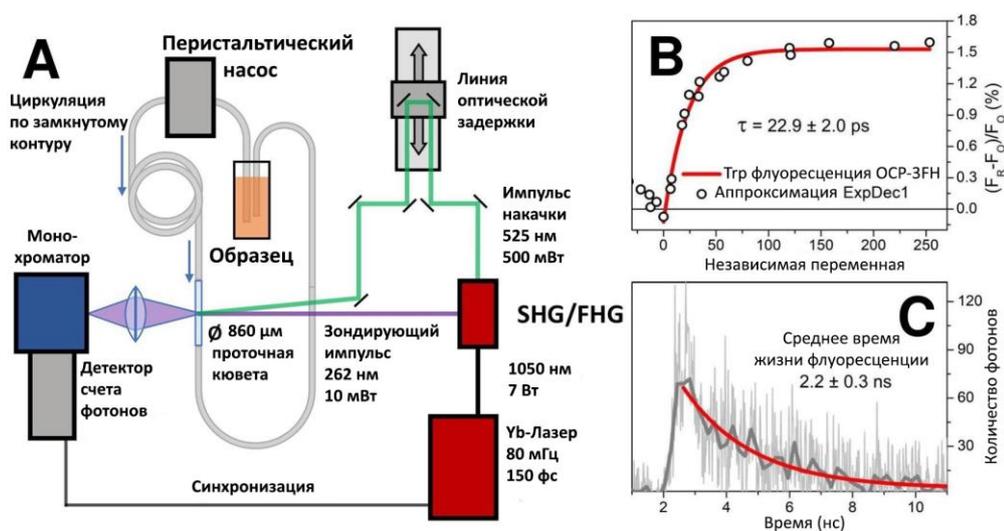


Рисунок 14. (А) Экспериментальная установка для фемтосекундной время-разрешенной спектроскопии в режиме накачка - зондирование. (В)

Увеличение интенсивности флуоресценции Trp-288, вызванное фотовозбуждением OCP-3FH одной 150-фс актиничной вспышкой (525 нм). Каждая точка - среднее значение по трем измерениям. (С) Кинетика затухания флуоресценции различных форм Trp, появляющихся после возбуждения OCP-3FH импульсом накачки (pump pulse), усредненная для времен задержки от 100 до 250 пс.

Таким образом с помощью метода накачки-зондирования было установлено, что процесс разрыва водородных связей ECN-Trp-288 происходит с постоянной времени $22,9 \pm 2,0$ пс. Это согласуется с тем, что данная реакция инициируется переходом кофактора ECN в так называемое состояние S^* (с характерным временем жизни 14-25 пс) [25, 66] что существенно больше, чем время жизни состояния S_1 ($\sim 3,2$ пс). В целом, эти результаты свидетельствуют, что первый этап фотоцикла OCP, когда структура каротиноида существенно отличается от таковой в темноадаптированном состоянии, происходит в течение нескольких пикосекунд.

3.2.4 Расхождение структурных доменов OCP

Вторичная структура OCP при фотоактивации практически не изменяется, хотя и обнаружено увеличение объема молекулы белка [54, 84], что свидетельствует о разделении N- и C-доменов при поглощении фотонов OCP⁰ [94]. В частности, в состоянии OCP^R разделение N- и C-концевых доменов было установлено в экспериментах по малоугловому рентгеновскому рассеянию (SAXS) [54]. Этот результат, в сочетании со смещением хромофора на 12 Å в N-домен в RCP [5], дает основание предположить, что хромофор отделяется от C-домена в нативном OCP при

фотоконверсии. В то же время принято считать, что именно хромофор стабилизирует структуру OCP^{O} за счет водородных связей, образующихся между его кольцом и соседними аминокислотными группами, поэтому изменения в ходе точечных мутаций могут привести к дестабилизации OCP^{O} и образованию OCP^{R} -эквивалентной формы.

Нашей целью было отслеживание с помощью резонансного переноса энергии транслокацию ECN при фотоконверсии OCP. Это потребовало разработки сайт-специфического флуоресцентного мечения OCP с помощью красителя, который оказался энергетически связанным с ECN посредством переноса энергии возбуждения и, таким образом, чувствительным к изменениям поглощения ECN и/или конформации OCP в оранжевом и красном состояниях. Здесь мы воспользовались всеми тремя эндогенными цистеинами OCP для создания фотоактивного флуоресцентного белка и охарактеризовали его фотофизические свойства в зависимости от структуры белка. Мы обнаружили, что тетраметилродамин (TMR) наиболее удачно подходит для наших целей. Ковалентное связывание OCP с TMR привело к образованию двух различных донорных участков для переноса энергии к кофактору ECN. Таким образом, в структуре одной молекулы OCP образовывались две различные донорно-акцепторные пары [34].

Согласно данным SAXS [54] и известной кристаллической структуры OCP, обе формы OCP представляют собой вытянутые вращающиеся эллипсоиды размерами $63 \times 36 \text{ \AA}$ для OCP^{O} и $90 \times 27 \text{ \AA}$ для OCP^{R} . По нашим оценкам, расстояние между введенной в структуру белка меткой TMR и ECN, по крайней мере, не превышают длины белка.

Мечение красителем TMR вызывает значительные изменения в спектре поглощения OCP. Хотя вибронные полосы с максимумами при ~ 440 и 470 нм по-прежнему присутствуют в спектре поглощения OCP^{O} -TMR, наиболее интенсивная полоса смещается от 496 нм, в красную область и в спектре поглощения OCP^{O} -TMR появляются новые полосы при 520 и 552 нм (рис. 15

А). Полоса 552 нм, несомненно, отвечает максимуму поглощения TMR, так как интенсивная полоса при 520 нм является новой спектральной особенностью. Интенсивность этой полосы оказывается значительно выше в OCP⁰-TMR по сравнению с поглощением TMR в этаноле. Поскольку Aро-OCP не содержит хромофора ECN, его поглощение в видимой области должно быть обусловлено исключительно поглощением TMR. Примечательно, что комплекс Aро-TMR также демонстрировал повышенное поглощение в полосе 520 нм, хотя и несколько меньшее, чем для OCP⁰-TMR (рис. 15 Б).

Спектр возбуждения флуоресценции комплекса OCP-TMR, который очень похож на поглощение TMR в этаноле.

Спектр эмиссии флуоресценции адаптированного к темноте образца OCP-TMR и спектр после освещения актиничным светом имеют схожую форму полос, но общая интенсивность флуоресценции OCP^R-TMR значительно ниже по сравнению с таковой у комплекса OCP⁰-TMR (рис. 15 С).

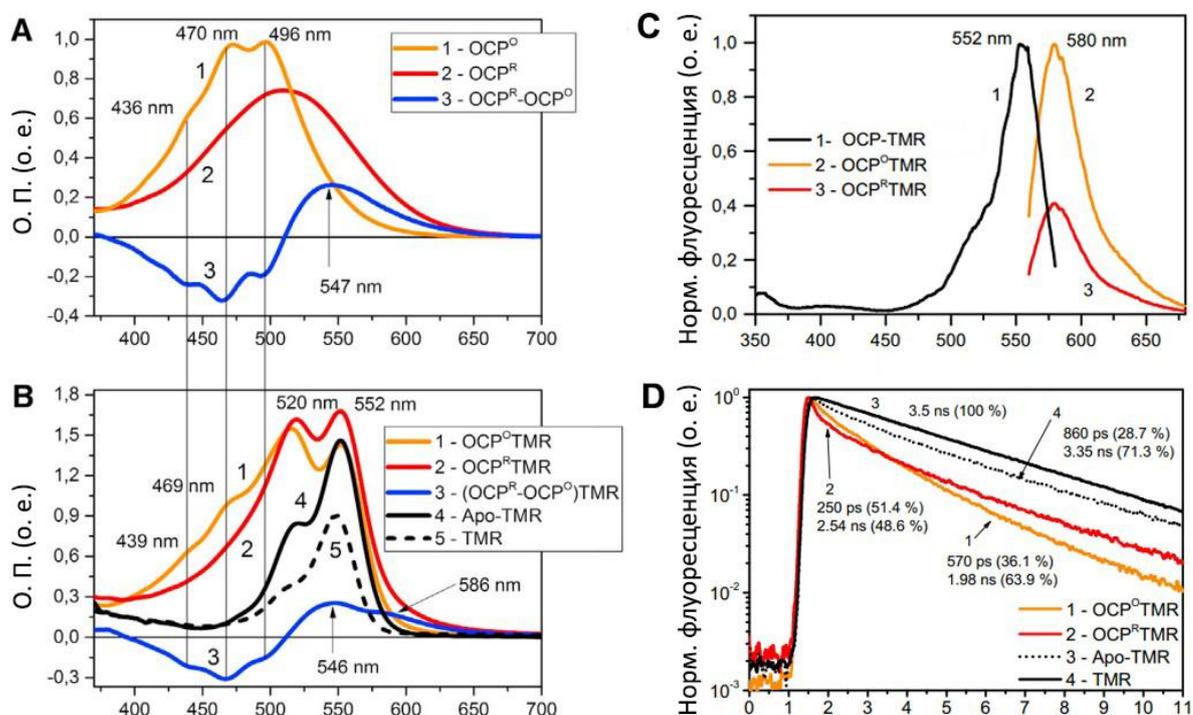


Рисунок 15. Спектры поглощения OCP (А) и комплексов OCP-TMR (В)

в темноте (1) и после 2 минут актиничного освещения (2) синим светодиодом мощностью 150 мВт. Спектр (3) представляет разность между поглощением образцов в фотоактивированном и темно-адаптированном состояниях. Черной линией (4) показаны спектры поглощения апо-ОСР, меченного TMR, пунктирной линией (5) - поглощение свободного TMR в этаноле. Поглощение измеряли при 2°C, чтобы уменьшить скорость перехода ОСР^R-ОСРО. (С) Спектры возбуждения (1) и эмиссии ОСР-TMR до (2) и после (3) фотоактивации актиничным сине-зеленым светом. (D) Кинетики затухания флуоресценции TMR в этаноле (3), в образце Apo-ОСР (4), в ОСР-TMR, адаптированном к темноте (1) и после 2 минут актиничного освещения (2), измеренные при 2°C для снижения скорости конверсии ОСР^R/ОСРО. Флуоресценция TMR возбуждалась 30 пс лазерными импульсами с частотой повторения 25 МГц на длине волны 510нм.

Чтобы получить высокую и стабильную концентрацию красной формы и снизить скорость конверсии ОСР^R/ОСРО, мы проводили измерения ОСР-TMR при 2°C, когда скорость обратной конверсии практически ничтожна (рис. 15 D). Аппроксимация кинетик затухания флуоресценции выявила мультиэкспоненциальный характер кинетик ОСР-TMR в O- и R-состояниях и показала, что флуоресценция TMR в исследуемых белках была значительно потушена по сравнению со свечением свободного TMR в этаноле. Кроме того, в комплексах ОСР-TMR наблюдалась быстрая компонента флуоресценции длительностью порядка нескольких сотен пикосекунд, отсутствующая в этанольном растворе TMR. Наличие этого быстрого компонента можно объяснить двумя факторами 1) высокоэффективным переносом энергии от TMR к кофактору ESN, которая возможна благодаря пространственной близости и значительному спектральному перекрытию, и 2) димеризацией молекул TMR в NTD ОСР. Этот быстрый (~860 пс) компонент присутствует и в затухании флуоресценции образца апо-ОСР,

меченного TMR (рис. 15 D), что, наряду с характерным спектром поглощения апо-TMR (выраженное плечо при 520 нм; см. рис. 15 B), позволяет предположить, что, по всей видимости, димеризация TMR ответственна за быстрый компонент затухания.

Предполагая, что перенос энергии между меткой и каротиноидом происходит по индуктивно-резонансному механизму, мы обнаружили, что расстояние между димером TMR в NTD и ECN увеличивается с 45,6 Å в оранжевой форме до 63,7 Å в красной форме, что является свидетельством значительных перестроек в структуре белка.

Полученные данные позволяют предположить, что в контексте полноразмерной OCP фотоиндуцированная изомеризация ECN, запускаемая поглощением квантов света, приводит к транслокации ECN из CTD и разделению доменов CTD и NTD (рис. 16).

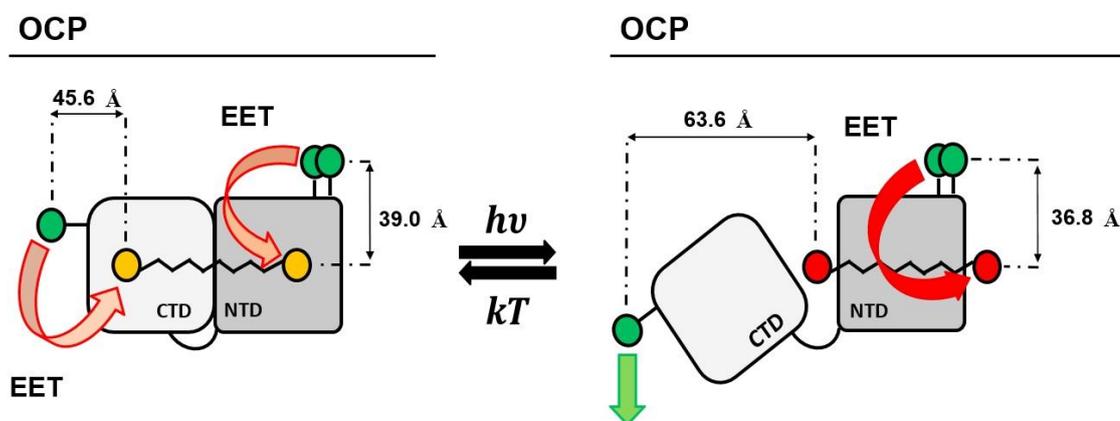


Рисунок 16. Схематическое изображение процессов переноса энергии от TMR к хромофору OCP (ECN) в различных состояниях белка. Фотоактивация вызывает изменение конформации ECN, что приводит к реорганизации третичной структуры белка, сопровождающуюся транслокацией ECN внутри белка и разделением структурных доменов.

Установленные нами изменения эффективности переноса энергии от TMR к ECN при фотоконверсии выявили увеличение на 18 Å расстояния между мономером TMR в STD и ECN, что хорошо согласуется с идеей разделения доменов OCP в результате фотоактивации ([54]). Одновременно наблюдалось уменьшение на 2,2 Å расстояния между димером TMR в NTD и ECN (рис. 16), что согласуется с данными о том, что ECN в красной форме остается в NTD и даже проникает глубже в ядро белка ([5, 84]).

3.2.5 Гидродинамические свойства различных форм OCP, выявленные с помощью динамического рассеяния света (DLS) и эксклюзионной хроматографии (SEC)

Поскольку введение аланина вместо Trp-288 нарушает связывание ECN у белка-мутанта, то полученный препарат содержит смесь апо-формы и ECN-содержащего белка. Однако, благодаря характерному поглощению в видимой области спектра, нам удалось исследовать гидродинамические свойства холо-формы с помощью SEC. Форма и положение максимума на профиле элюции OCP⁰ были практически одинаковыми независимо от того, наблюдали ли за профилем 280 нм (весь белок) или 540 нм (только каротиноид-связанный белок). Положение максимума элюции OCP⁰ оставалось неизменным при более чем 10-кратном изменении концентрации белка (рис. 17) и соответствовало гидродинамическому радиусу - 26,4 Å. Этот результат согласуется с данными кристаллографического исследования субъединицы OCP (PDB ID 3MG1). Следует отметить, что более высокие концентрации белка OCP⁰ привели к появлению небольшого пика, соответствующего более крупным частицам. Можно предположить, что это связано с наличием небольшой доли неспецифических олигомеров (возможно, димеров), присутствующих в образце. В отличие от OCP⁰, хроматографический

профиль W2882A в большей степени зависел от концентрации белка, демонстрируя значительное уменьшение объема элюирования (с 15,5 до 14,9 мл, что свидетельствует об увеличении гидродинамического радиуса с 30,5 до 34,7 Å) при увеличении концентрации белка (рис. 17, нижняя панель). Отметим, что положение пика W2882A при самой высокой концентрации было сравнимо с положением предполагаемых неспецифических олигомеров OCP^O (рис 17, нижняя и средняя панели); а у эквивалентной смеси OCP^O и RCP были выявлены два пика, соответствующих невзаимодействующим отдельным белкам, хотя профиль элюирования соответствовал их алгебраической сумме (рис. 17, верхняя панель, синяя пунктирная линия). Вероятно, что эти данные обусловлены существованием концентрационно-зависимой самоассоциацией мутанта OCP W2882A. Однако, даже при меньшей концентрации белка расчетный радиус W2882A был выше, чем у OCP^O (30,5 вместо 26,4 Å). Освещение образца OCP^O во время преинкубации и проведения SEC при действии синим светом привело к смещению пика и, соответственно, увеличению его гидродинамического радиуса с 26,4 до 29,8 Å (рис. 17, верхняя панель и вставка), что согласуется с результатами работы [54, 84]. Вероятно, при низкой концентрации белка мутант W2882A хорошо имитирует фотоактивированную форму OCP^R, а увеличение радиуса свидетельствует о структурных изменениях.

Эти выводы были дополнительно качественно подтверждены результатами, полученными с помощью динамического светорассеяния (DLS). Установлено, что гидродинамический радиус Apo-W288A был равен 48,7 Å, тогда как соответствующий параметр для OCP в оранжевой форме был равен 30,4 Å, а у красной формы OCP, полученной при обработке 1,5M NaSCN, гидродинамический радиус составлял - 37,7 Å.

Полученные данные согласуется как с результатами SEC, так и с временами корреляции красителя NR, наблюдаемыми при измерениях анизотропии с временным разрешением. Сравнение данных SEC и DLS

свидетельствует, что относительное увеличение гидродинамического радиуса ОСР после химической активации сопоставимо с изменениями, вызванными фотоактивацией.

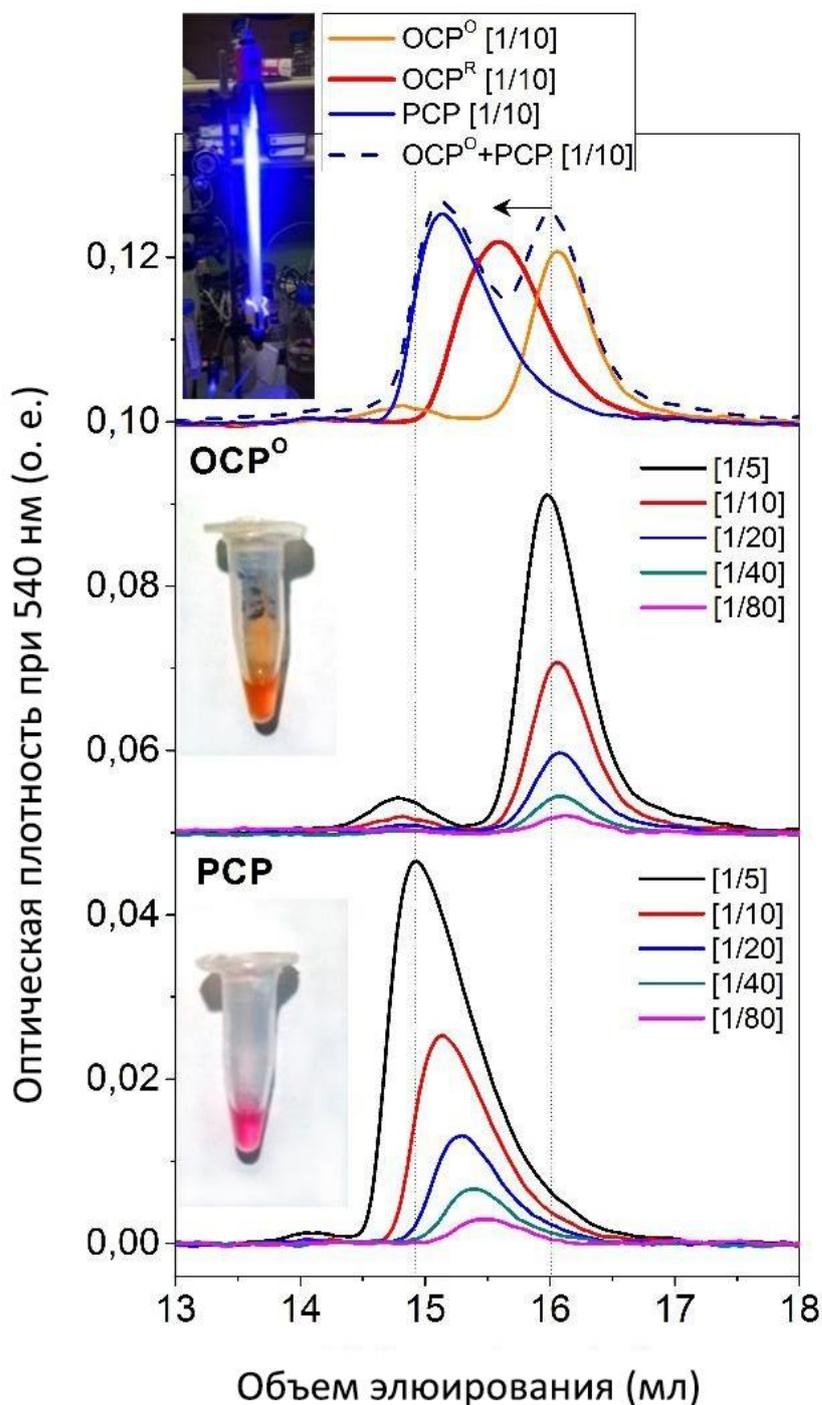


Рисунок 17. Аналитическая хроматография (SEC) ОСР и мутанта W2882A, выполненная при различных концентрациях белка, загруженного на колонку Superdex 200 Increase 10/300. Исходные препараты (см. вставки) были

выравнены по оптической плотности при 540 нм, их разбавляли буфером для хроматографии (соответствующие разбавления выделены цветом на средней и нижней панелях) и загружали на колонку (профили смещены по вертикали для наглядности). Образец ОСР⁰ подвергали постоянному освещению синим светом (вставка на верхней панели), что приводило к уменьшению объема элюирования (отмечено стрелкой). Таким же образом анализировалась смесь ОСР⁰ и W2882A (темно-синяя пунктирная линия). Тонкие вертикальные пунктирные линии обозначают положение пиков для самой высокой концентрации белка ОСР⁰ ($V_e \sim 16,0$ мл) или W2882A ($V_e \sim 14,9$ мл).

3.2.6 Состояние расплавленной глобулы

Понятие "расплавленная глобула" относится к промежуточным состояниям фолдинга белка, которые имеют вторичную структуру, подобную той, что наблюдается в нативном состоянии, в то время как третичная структура еще не сформирована [73]. Состояние расплавленной глобулы обычно характеризуется увеличением эффективного объема белка и открытием гидрофобных областей для раствора вследствие неполного сворачивания [69].

Используя гель-фильтрацию, в работе Leverenz et al. [84] показано, что, хотя ОСР^R имеет больший объем, чем ОСР⁰, оба характеризуются почти одинаковыми спектрами кругового дихроизма (КД) в дальнем ультрафиолете, что свидетельствует о схожей вторичной структуре. Более того, было показано, что в видимой области спектры КД оранжевой и красной форм отличаются, что свидетельствует о менее упорядоченной структуре хромофора в красной форме [23]. Учитывая эти факты и наши результаты по исследованию изменений гидродинамического радиуса и

гидрофобности ОСР в результате фотоактивации, химической активации или мутаций (W288A), можно предположить, что красная форма белка ОСР представляет собой структуру расплавленной глобулы. Это согласуется с тем, что сигнальное состояние РУР также считается расплавленной глобулой [99].

Изменения спектров флуоресценции Trp, происходящие после фотоконверсии и релаксации ОСР, свидетельствуют об изменениях в третичной структуре белка, а изменения во флуоресценции NR доказывают изменения доступности гидрофобных областей ОСР для растворителя.

В связи с тем, что 1) спектры КД в УФ-диапазоне и спектры КР ОСР не выявили изменений вторичной структуры белка как в стабильной темноадаптированной, так и в активной формах, и 2) эксперименты по гелефильтрации демонстрируют увеличение объема ОСР в активной форме [84], мы предполагаем, что активная форма ОСР^R находится в состоянии расплавленной глобулы. Структура, подобная расплавленной глобуле, была ранее предложена для другого фотоактивного белка, РУР, в исследовании, в котором NR использовался в качестве флуоресцентного зонда [99]. Таким образом, мы установили, что фотоцикл ОСР имеет некоторые общие черты с фотоциклом РУР. Кроме того, в недавней работе [74] было показано, что добавление хаотропных ионов к раствору ОСР может привести к его фотоактивации вследствие конформационных изменений и увеличения энтропии. Эти результаты также хорошо согласуются с расплавленно-глобулоподобным состоянием ОСР^R. Примечательно, что аналогичный эффект наблюдался и для РУР, когда добавление хаотропов способствовало прохождению фотоцикла [49]. Кроме того, было показано, что фотоиндуцированные изменения нарушают взаимодействие α -спирали из N-домена с β -листом из C-домена, что приводит к дестабилизации работы белка [57]. Мы предполагаем, что результаты наших экспериментов с NR связаны с

подобными перестройками полости между N- и C-доменами и являются прямым доказательством дезорганизации третичной структуры.

3.3 Взаимодействие OCP и FRP на разных этапах фотоцикла

3.3.1 Влияние FRP на фотоциклические переходы OCP

В связи с тем, что FRP ускоряет релаксацию $OCP^R \rightarrow OCP^O$ *in vitro*, а восстановление флуоресценции ФБС осуществляется за счет распада комплекса OCP и ФБС *in vivo* [46], можно предположить, что изменения скорости восстановления флуоресценции фикобилисомы осуществляется за счет уменьшения энергии активации реакции, а FRP в данном случае действует как катализатор реакции. В данной серии экспериментов, мы проверили эту гипотезу измерив релаксацию $OCP^R \rightarrow OCP^O$ в отсутствие и в присутствии FRP при различных температурах и оценив термодинамические эффекты (рис. 18).

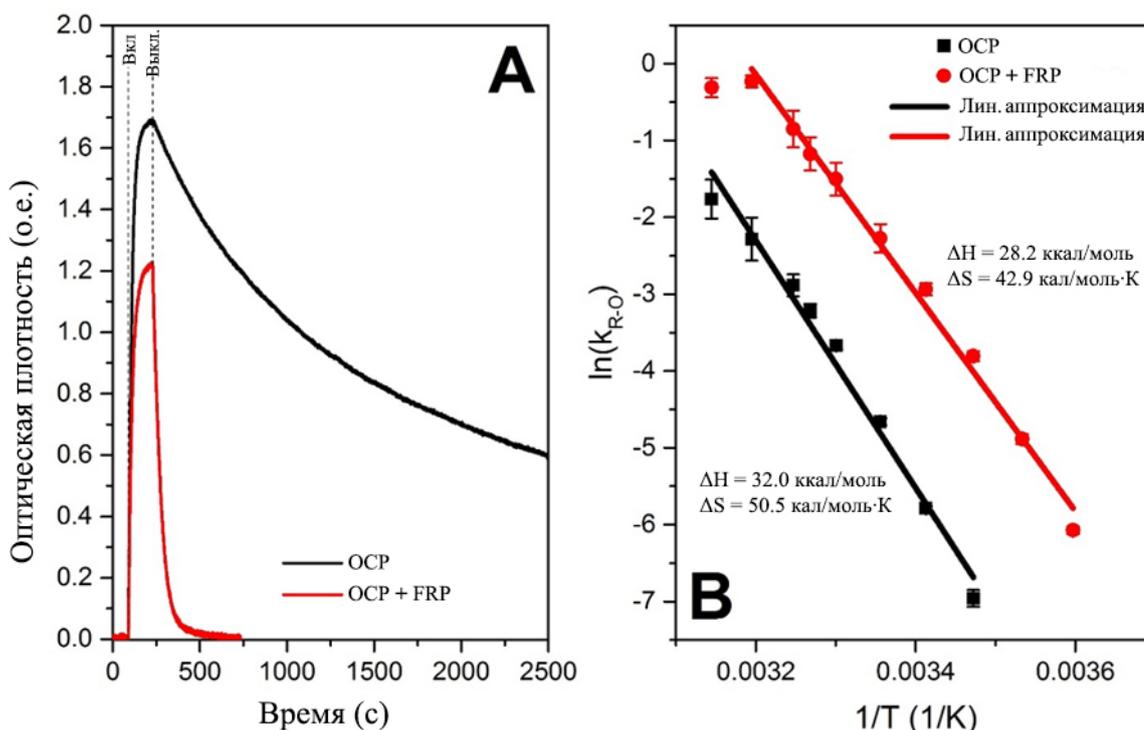


Рисунок. 18. Влияние FRP на термодинамические характеристики релаксации фотоактивированного ОСР. (А) - характерные кинетики фотоактивации ОСР, измеренные как изменения оптической плотности при 550 нм при 15 °С. Вертикальные пунктирные линии обозначают начало и конец освещения образца актиничным синим светом. (В) - графики Аррениуса для скоростей релаксации $ОСР^R-ОСР^O$ в отсутствие и в присутствии FRP (0,7 FRP на 1 ОСР), аппроксимированные линейными функциями. Эксперимент проводился в диапазоне температур от 5 до 45 °С. Данные представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов.

Следует отметить, что в данной конфигурации эксперимента при соотношении концентраций $FRP/ОСР \geq 1$ фотоиндуцированные изменения поглощения ОСР (образование $ОСР^R$ из $ОСР^O$) не выявлены, что вероятно можно объяснить высокими скоростями релаксации $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$ в присутствии FRP [94]. Таким образом избыток FRP полностью предотвратил переход ОСР в красную форму.

При том, что скорость релаксации красной формы ОСР в присутствии FRP многократно возрастала, мы не обнаружили значительных изменений величины энергии активации (рис. 18В), что можно объяснить увеличением предэкспоненциального коэффициента в формуле Аррениуса (k_0), который соответствует скорости релаксации $ОСР^R \rightarrow ОСР^O$ в условиях бесконечно высоких температур. Этот параметр соответствует вероятности образования правильной конфигурации молекул (в нашем случае - хромофора ЕСН и белка), приводящей к образованию оранжевой формы $ОСР^O$.

Таким образом, FRP образует комплекс с ОСР, в котором ЕСН находится в специфическом окружении, обеспечивающем оптимальную

конформацию для восстановления водородных связей с остатками Trp и Tyr (в CTD) и перехода белка в оранжевую форму.

С другой стороны, температурная зависимость скорости релаксации комплекса $ОСР^R-ОСР^O$ может быть описана уравнением Эйринга-Полани, позволяющим рассчитать величину энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) активационного перехода. Согласно нашим данным, релаксация $ОСР^R-ОСР^O$ в отсутствие и в присутствии FRP характеризуется тенденцией к снижению ΔH , а энтропия ΔS значительно уменьшается, что согласуется с образованием более упорядоченного комплекса, обеспечивающего превращение $ОСР^R$ в $ОСР^O$.

3.3.2 Влияние FRP на спектры поглощения ОСР и $ОСР^{W288A}$

В связи с тем, что мутант $ОСР^{W288A}$ тушит флуоресценцию ФБС аналогично $ОСР^R$, мы предположили наличие сходного механизма формирования комплекса $ОСР^{W288A}$ с FRP. Нами было показано, что, подобно влиянию FRP на ОСР-индуцированное тушение флуоресценции ФБС [93], присутствие FRP в растворе ФБС, содержащем $ОСР^{W288A}$ (при молярном соотношении $FRP/ОСР^{W288A}$ 1:1), почти полностью нивелировало тушение флуоресценции ФБС. Таким образом, $ОСР^{W288A}$ также может образовывать комплексы с FRP.

В присутствии FRP у фотоактивированной формы $ОСР^R$ *in vitro* было выявлено изменение цвета образца и его поглощения в видимой области (рис. 19А), что свидетельствует о прямом взаимодействии между FRP и активной формой ОСР. Установлено, что при увеличении количества FRP у фотоконвертированного $ОСР^R$ наблюдается спектральный сдвиг, который при молярном соотношении белков 1:1 выходит на стационарный уровень

(рис. 19В), что свидетельствует о специфическом взаимодействии компонентов комплекса.

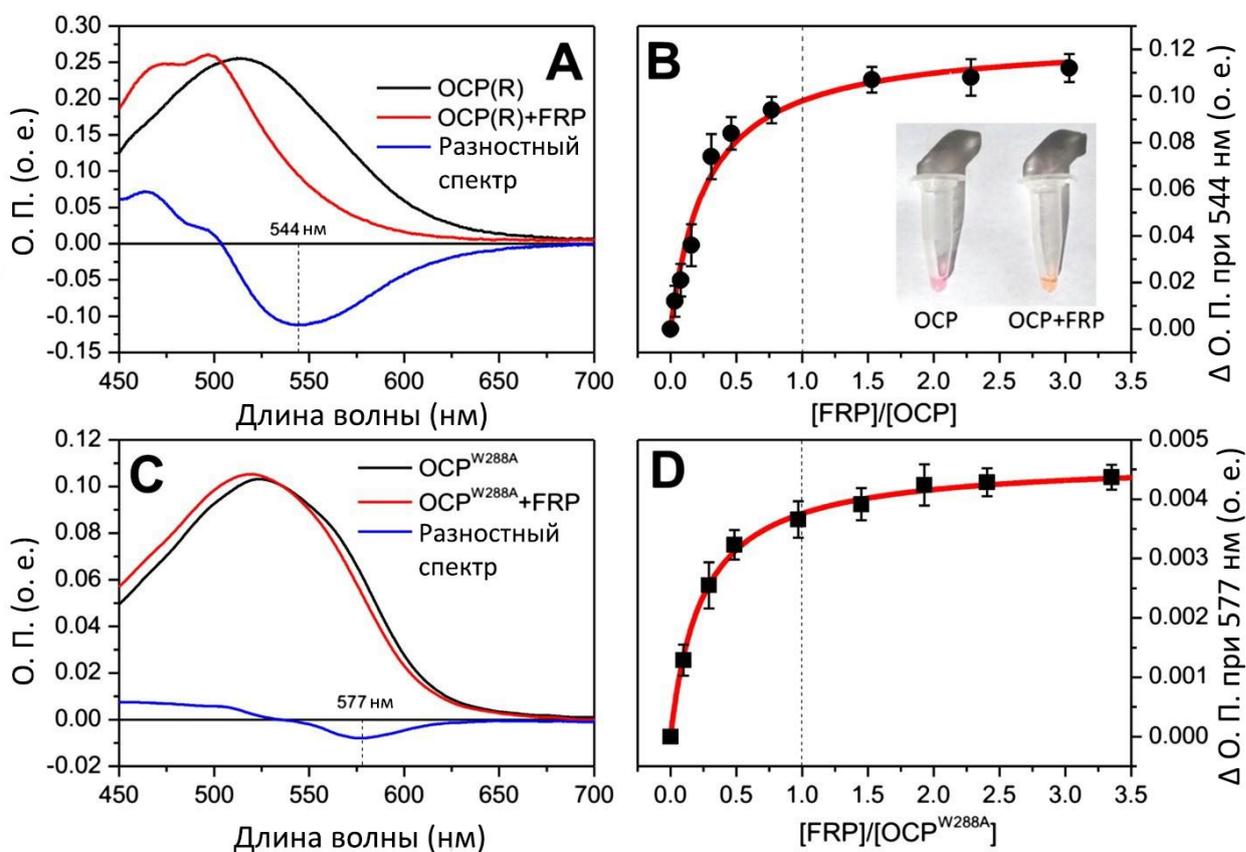


Рисунок 19. Влияние FRP на спектры поглощения OCP и OCP^{W288A}. Стационарные спектры поглощения фотоактивированных OCP (А) и OCP^{W288A} (С) в отсутствие (черный) и в присутствии FRP (красный). Синяя линия показывает разницу между поглощением в отсутствие и в присутствии избытка FRP. OCP был преобразован в красную форму под действием актиничного света (5800 мкмоль м⁻² с⁻¹). (В) и (Г) - относительные (интегральные) изменения поглощения OCP (3 мкМ) и OCP^{W288A} (4 мкМ) при 544 и 577 нм, соответственно, при добавлении возрастающих концентраций FRP. Температура во всех экспериментах составляла 33 °С. Данные представляют собой среднее значение из 5 независимых экспериментов. Реакция OCP в отсутствие и в присутствии избытка FRP на актинический белый свет показана в качестве вставки на панели В.

В следующей серии экспериментов, мы исследовали формирование комплексов $ОСР^{W288A}/FRP$ и обнаружили, что в присутствии FRP спектр поглощения $ОСР^{W288A}$ меняется (рис. 19C), при увеличении концентрации FRP наблюдается сдвиг максимума поглощения в синюю область спектра $ОСР^{W288A}$ и исчезновение характерного плеча при ~ 570 нм [6]. Полученные результаты свидетельствуют об изменениях в белок-хромофорных взаимодействиях, вызванных белок-белок взаимодействиями внутри комплекса ОСР-FRP. Снижение поглощения в красной области (при 577 нм) спектра $ОСР^{W288A}$ зависело от соотношения FRP и $ОСР^{W288A}$, насыщаясь при молярном соотношении примерно 1:1 (рис. 19D). Таким образом, максимум спектра поглощения $ОСР^{W288A}$ смещается (становится более "оранжевым") по мере образования комплекса с FRP, что характерно для формирования комплекса $ОСР^R/FRP$. Все эти данные свидетельствуют о том, что активность $ОСР^{W288A}$ повторяет способность красной формы ОСР связывать FRP.

3.3.3 Фотоцикл ОСР при добавлении FRP

Для фотоактивации ОСР обычно используются светодиоды и лазеры с максимумом излучения в синей области (~ 450 нм). Это оправдано тем, что, во-первых, свет эффективно поглощается каротиноидом в белке (рис. 20A), а во-вторых, он не мешает исследованию изменений спектра поглощения самого белка, наибольшая амплитуда которого наблюдается в районе 550 нм. Отметим, что для максимума, расположенного в области обесцвечивания основной полосы поглощения (467 нм), характерны в 1,2 раза большие изменения амплитуды, чем при 550 нм. Это, вероятно, связано с более высоким коэффициентом молярной экстинкции оранжевой формы по сравнению с красной при фотоактивации ОСР. Следует отметить, что даже в адаптированных к темноте образцах ОСР присутствуют красные состояния, которые, вероятно, возникают из-за спонтанного разрыва водородной связи

между каротиноидом и белком, что в конечном итоге приводит к уширению спектра поглощения каротиноида в темноадаптированном состоянии ОСР. Доля таких красных состояний составляет около 10-15%, (в зависимости от чистоты белкового препарата), но они не фотоактивны и не проявляют функциональной активности, так как, вероятно, их белковая структура не отличается от компактного оранжевого ОСР⁰. При оценке квантового выхода фотопродукта такие неактивные состояния обычно не учитываются, хотя, это очевидно снижает квантовый выход флуоресценции. Но все же, учитывая, что 90 % белка находится в состоянии ОСР⁰, даже при насыщающей интенсивности вспышки квантовый выход не превышает 0,2 %. С другой стороны, длительные экспозиции позволяют количественно исследовать красную форму ОСР^R, которая, как мы показывали ранее, достаточно стабильна при низких температурах из-за чрезвычайно низкой скорости релаксации.

Таким образом, низкий квантовый выход и низкая скорость релаксации являются проблемами при изучении фотоцикла ОСР, в частности, его начальных стадий. Поскольку FRP не влияет на оптические свойства ОСР дикого типа в видимой области спектра, но значительно ускоряет релаксацию фотоактивированных состояний, мы предположили, что можно использовать этот регуляторный белок, чтобы предотвратить образование ОСР^R и сосредоточиться на исследовании начальных стадий фотоцикла ОСР. Однако, как показали эксперименты это не упростило форму кинетических кривых (Рисунок 20В).

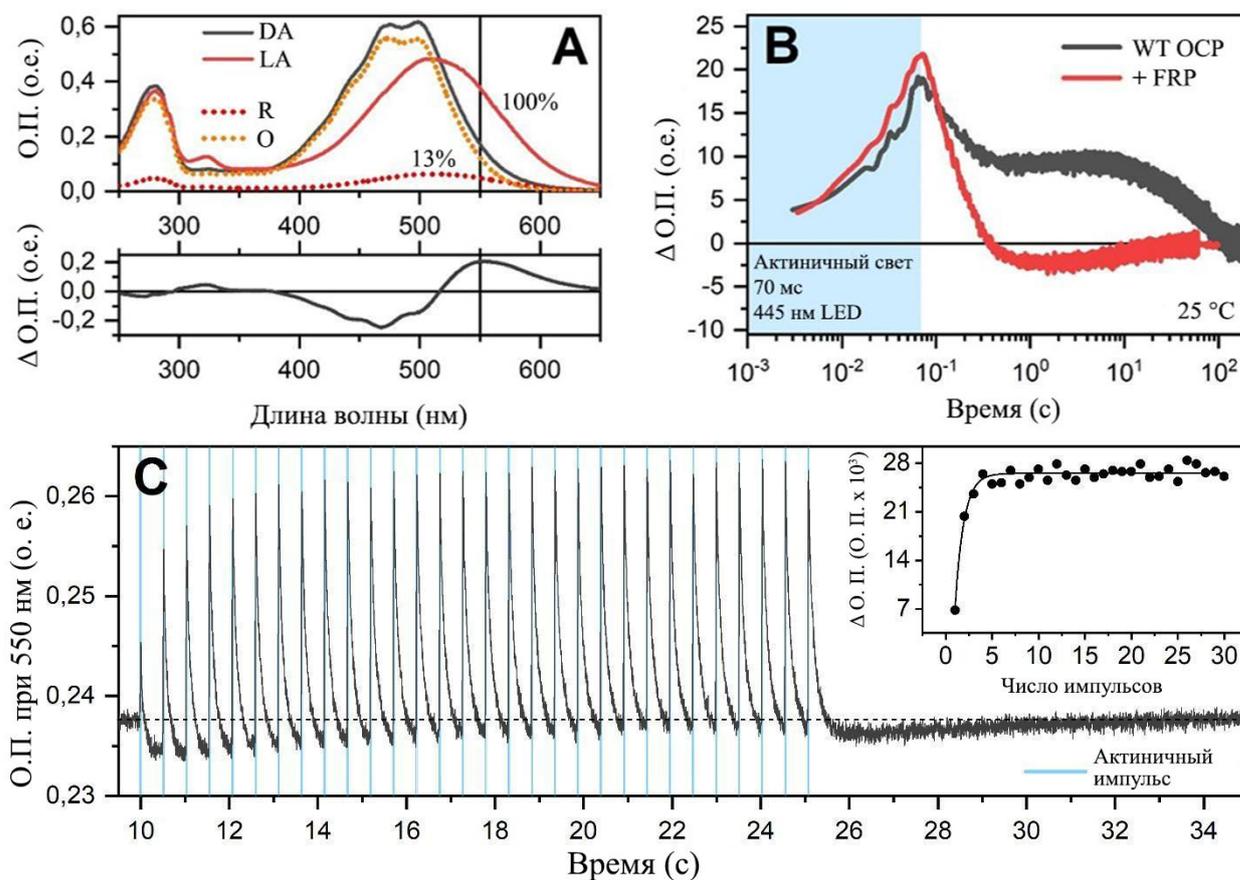


Рисунок 20. А – спектры поглощения ОСР адаптированного к темноте и к свету. Пунктирные линии показывают долю оранжевых фотоактивных (О) и красных (R) состояний в адаптированном к темноте образце. Разностный спектр адаптированного к свету и темноадаптированного состояний показан ниже стационарного поглощения. Для полной фотоконверсии эксперимент проводился при 1°C . Полоса 550 нм отмечена вертикальной линией. В - кинетика образования и распада фотопродукта при 550 нм в процессе фотоактивации ОСР в отсутствие (черная кривая) и в присутствии FRP при 25°C . Область, выделенная синим цветом, показывает период действия актиничной вспышки. Данные усреднены по 10 экспериментам. Обратите внимание на логарифмическую шкалу времени. С - кинетика изменения оптической плотности при 550 нм в процессе фотоактивации 8 μM ОСР в присутствии 2 μM FRP актиничными вспышками длительностью 20 мс с последующими темными интервалами 500 мс при 37°C . Пунктирная линия

показывает базовую линию поглощения при 550 нм. На вставке показано изменение выхода фотопродукта в зависимости от числа вспышек.

Для изучения взаимодействия OCP и FRP было необходимо найти наиболее подходящие условия проведения исследований: длительность и мощность вспышки, при которой уже заметно формирование промежуточной красной формы, а также температуру, при которой белок все еще остается стабильным, а релаксация OCP^R происходит достаточно быстро. Мы экспериментально установили, что при температуре от 25 до 37 °C и длительности актиничной вспышки до 100 мс в релаксации изменений оптической плотности WT OCP (при 550 нм) четко наблюдаются по крайней мере 2 фазы (рис. 20B). Хотя при длительности вспышки 20 мс выход фотопродукта составляет всего 1,85% от максимального, многократное повторение эксперимента и усреднение данных позволило нам получить кинетические кривые с хорошим соотношением сигнал/шум. Оказалось, что при повторном фотовозбуждении (в течение не менее 30 с), квантовый выход фотопродукта значительно увеличивается (Рисунок 20C вставка). Такой эффект был обнаружен как для OCP в присутствии FRP, так и для OCP без FRP. Поскольку мощности актиничного света, использованные в эксперименте, исключают двухфотонные процессы, это явление, вероятно, указывает на наличие в белке нескольких взаимосвязанных состояний хромофора, одно из которых имеет большую склонность к фотоактивации. Большая амплитуда изменений оптической плотности в присутствии FRP объясняется более частым возбуждением образца (рис. 20B).

Уже при низких концентрациях присутствие FRP в растворе сказывается на кинетике (рис 21A) релаксации красных состояний OCP, увеличивая скорость медленной фазы на 2 порядка, причем 50% эффект наблюдается даже при 200-кратном избытке OCP, учитывая, что FRP является димером (рис. 21B). Однако такой избыток OCP является

кажущимся, поскольку в ответ на короткую вспышку активируется лишь небольшая часть исследуемого образца ОСР. Отметим, что форма кинетики релаксации характеризуется четко выраженной фазой роста оптической плотности за время от нескольких сотен мс до нескольких секунд (Рис. 20В, 21В и С). Более того, эта фаза наблюдается в области величин оптической плотности, которые значительно ниже исходного уровня, или в области отрицательных значений в дифференциальных спектрах поглощения.

Хотя импульсное возбуждение и ранее использовалось для изучения фотоцикла ОСР в присутствии FRP, подобные эффекты были выявлены нами впервые. Мы предполагаем, что это связано с низкой амплитудой сигнала, получаемого с помощью метода флеш-фотолиза, что было воспринято, как завершение релаксации через несколько сотен мс, в связи с чем высокая частота повторения лазерных импульсов была оправдана. Мы исследовали, как частота фотовозбуждения ОСР влияет на кинетику релаксации фотопродукта в присутствии FRP и обнаружили, что скорость процесса уменьшается с увеличением частоты вспышек (рис. 21С). Одновременно с этим уменьшается и интенсивность фазы с отрицательной амплитудой. Как отмечалось выше, более высокая частота фотовозбуждения увеличивает выход фотопродуктов (Рис. 20С и 21D), формируя состояния, с которыми может взаимодействовать FRP, что также влияет на быструю фазу релаксации.

Итак, мы показали, что FRP способен взаимодействовать не только с конечным красным состоянием ОСР^R, но и с более ранними состояниями фотоцикла. Для расчета констант скорости мы использовали сумму двух затухающих экспонент для аппроксимации релаксации красных состояний в области до 700 мс после вспышки (рис. 21Е). Предварительный анализ показал, что быстрая компонента (~ 25 мс) не зависит от концентрации FRP и красных состояний, в отличие от компоненты со временем жизни около 200

мс. Вероятно, это указывает на то, что взаимодействие с FRP начинается в течение 100 мс после актиничной вспышки.

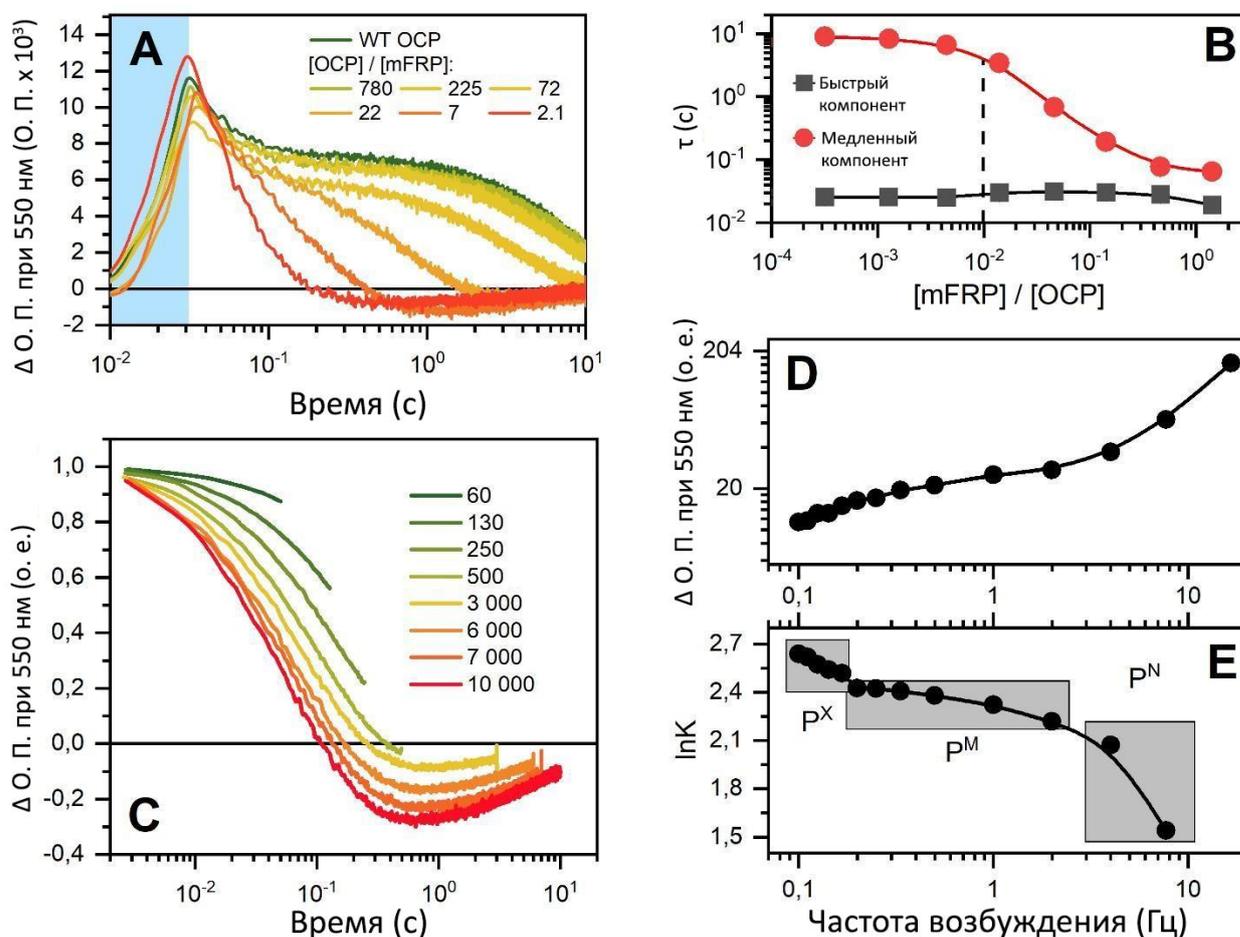


Рисунок 21. А - влияние концентрации FRP на кинетику накопления и релаксации красных состояний после фотоактивации ОСР актиничной вспышкой длительностью 30 мс при 37 °С (данные усреднены по 10 экспериментам). В - зависимость времени жизни компонентов кинетики релаксации красных форм ОСР от соотношения концентраций FRP и ОСР. Пунктирная линия показывает соотношение концентраций, при котором длительность медленной компоненты (красные точки) кинетики уменьшается на 50%. Обе оси представлены в логарифмическом масштабе. С - влияние временного интервала между 20 мс актиничными вспышками на кинетику релаксации красных состояний ОСР в присутствии FRP, измеренную при 37 °С. Момент окончания актиничной вспышки принят за 0 времени. Значение оптической плотности при 550 нм до включения актиничной вспышки

устанавливается равным нулю, максимальное значение ОП устанавливается равным единице. D - зависимость относительного выхода красных форм от частоты возбуждения образца ОСР при концентрации 8 мкМ актиничными вспышками длительностью 20 мс в присутствии 2 мкМ FRP. E - зависимость логарифма средней скорости релаксации красных состояний ОСР от частоты возбуждения 20 мс актиничными вспышками в присутствии FRP. Серыми прямоугольниками выделены области с разным наклоном зависимости $\ln K$. Данные усреднены по 30 экспериментам.

Однако, учитывая неэкспоненциальное поведение кинетики релаксации, необходимо было определить минимальное количество спектральных состояний и учесть возможность их последовательных переходов. В связи с этим, мы исследовали поглощение ОСР в широком спектральном диапазоне (рис. 22).

Для улучшения качества измеренных дифференциальных спектров мы использовали более длительное время интегрирования, а также увеличив длительность актиничной вспышки до 60 мс. Полученные таким образом дифференциальные спектры свидетельствуют, что после фотоактивации ОСР релаксация сигнала в красной области (550 нм) происходит гораздо быстрее, чем восстановление поглощения в области основной полосы (467 нм). Это явление и приводит к неэкспоненциальной форме кинетики изменения оптической плотности при 550 нм (рис. 22B), а также постепенному батохромному сдвигу положения изобестической точки. В течение последних нескольких секунд дифференциальный спектр практически не содержит следов красных фотопродуктов (рис. 22C), а форма дифференциального спектра характеризуется ярко выраженной вибронной структурой.

Таким образом, на последних стадиях релаксации кето-каротиноида его спектр приобретает тонкую структуру. Предположив, что предшествующее промежуточное состояние молекулы каротиноида полностью лишено вибронной структуры, мы разложили спектр оранжевого состояния ОСР на два состояния (рис. 22D. Благодаря многочисленным результатам по замещению Trp-201 и Trp-288, в том числе с использованием неканонических аминокислот, мы знаем, что вибронная структура спектра поглощения ESN в ОСР характерна для белков с одним донором водородной связи, как например в случае мутанта Y201W. Таким образом, спектры поглощения указывают на ряд конформационных изменений в каротиноиде во время конечных стадий релаксации ОСР, которые могут включать изгиб полиеновой цепи и увеличение роли одного из доноров водородных связей. Другим следствием является факт существенной гетерогенности темноадаптированного состояния ОСР, которое, вероятно, может включать не только красную и оранжевую формы.

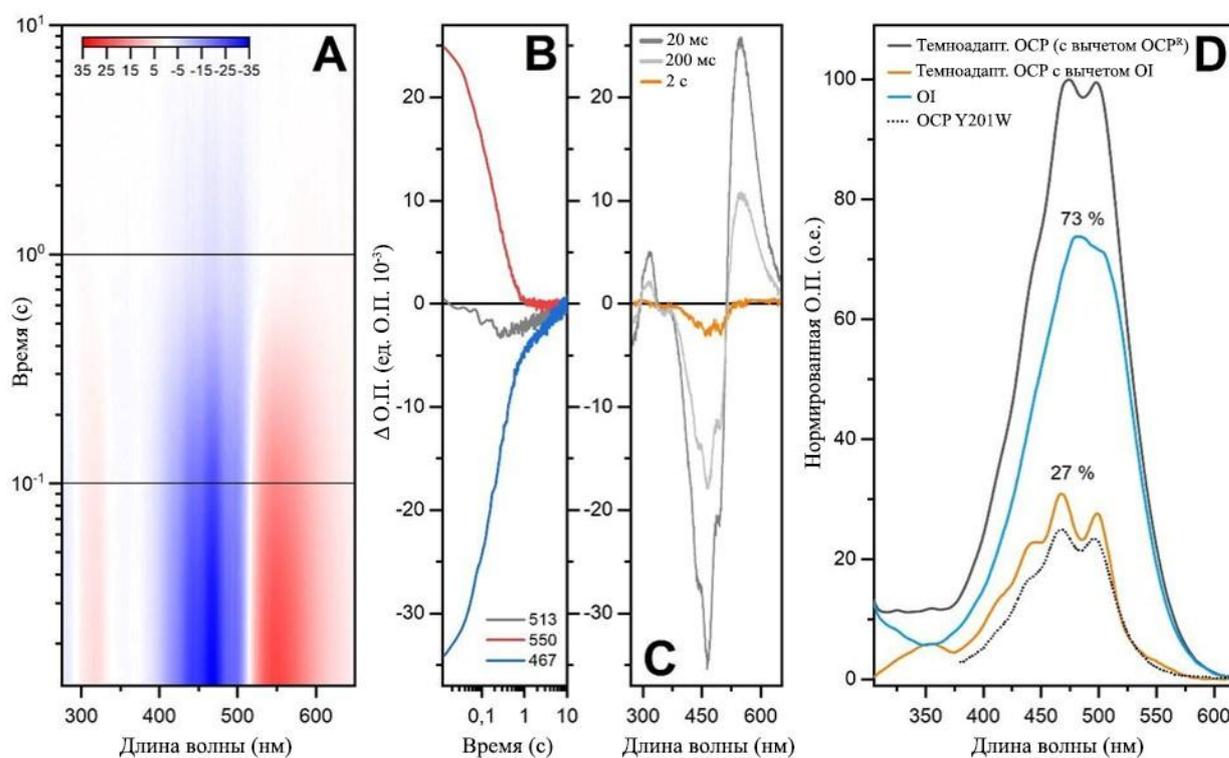


Рисунок 22. А – Дифференциальные спектры поглощения 10 мкМ ОСР в присутствии 1 мкМ FRP, записанные с шагом по времени 12 мс после 60 мс

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 отдельно измеренным фотоциклам. В - кинетики изменения оптической плотности на разных длинах волн, полученные как срезы набора данных, представленных на панели А. С - дифференциальные спектры при разных временных задержках. Спектры были получены как сечения набора данных, представленных на панели А. 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.

Сравнение спектров поглощения адаптированных к темноте WT ОСР и ОСР-Y201_3IodY показывает, что введение йода приводит к увеличению вклада состояния с ярко выраженной вибронной структурой в спектр поглощения (рис. 23А и В). Ранее мы показали, что такие состояния характерны для вариантов ОСР, в которых может быть образована или эффективно присутствует только одна водородная связь с кетокаротиноидом [2, 71, 75]. Мутация уменьшает роль остатка Y201 и увеличивает важность Н-связи с W288. Это согласуется с нашими кристаллографическими и спектроскопическими данными по варианту ОСР-Y201W, в котором мутация привела к специфической конформации W201, не подходящей для Н-связывания. В результате это привело к усилению вибронной структуры спектра поглощения [75]. Таким образом, 3-йодирование только Y201 смещает конфигурацию каротиноида в темноадаптированном состоянии ОСР от взаимодействия с двумя донорами водородных связей одновременно (и в

меньшей степени с Y201, см. рис. 23) к состоянию с решающей ролью одиночной Н-связи W288 [31, 48].

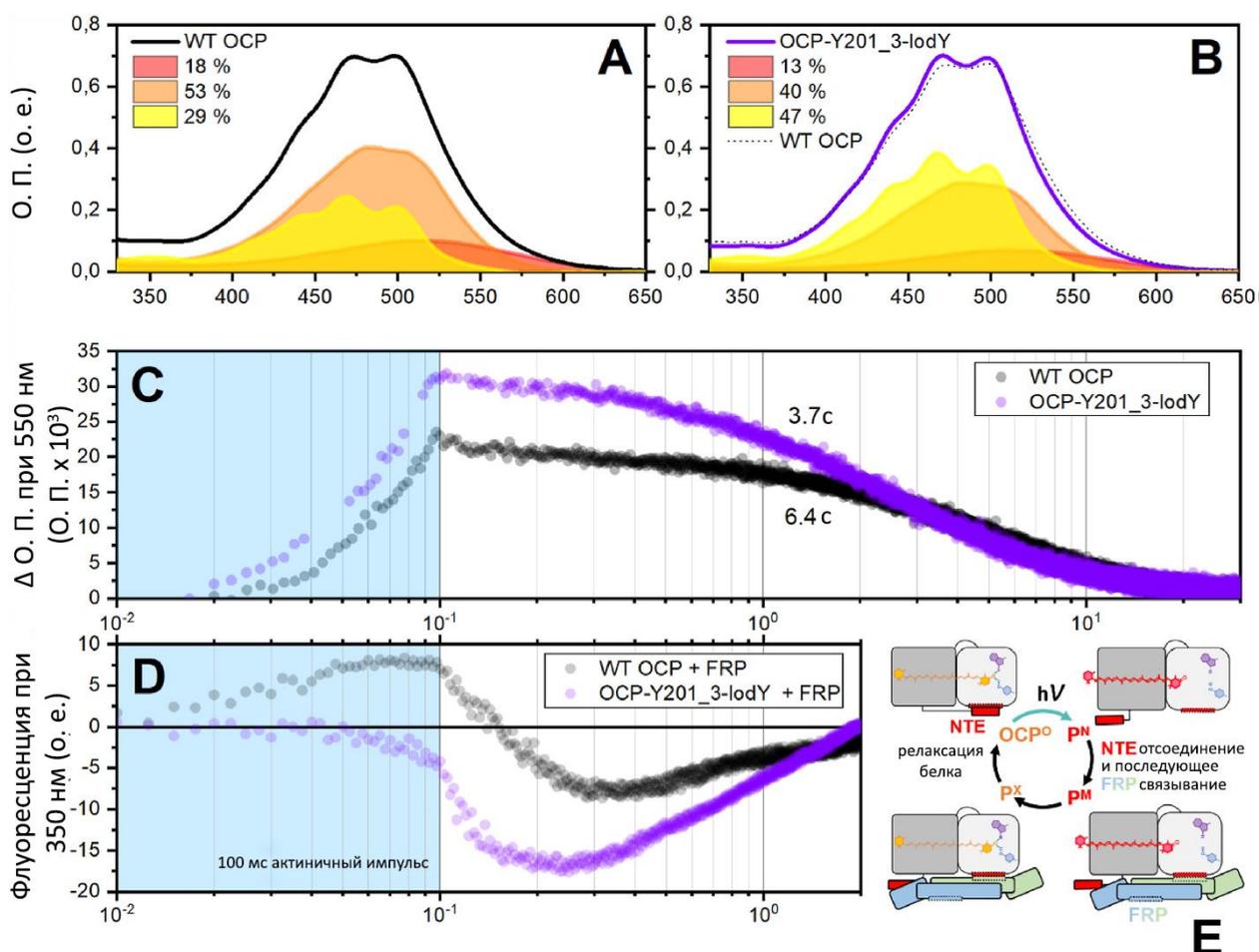


Рисунок 23. Поглощение адаптированного к темноте WT OCP (A) и OCP-Y201_3IodY (B) при 5 °C. Спектры поглощения представлены как сумма красной формы (отсутствие Н-связей между каротиноидом и белком), оранжевого промежуточного состояния (две Н-связи) и желтой формы (одна Н-связь) с их соответствующими вкладами в общий спектр. (C) - кинетика образования и релаксации красных форм OCP, измеренная как изменение оптической плотности при 550 нм в ответ на 100 мс актиничную вспышку (445 нм). Концентрация белка в обоих препаратах была одинаковой. Эксперименты проводили при 37 °C. (D) - относительные изменения интенсивности триптофановой флуоресценции WT OCP и OCP-Y201_3IodY в присутствии FRP (молярное соотношение 1 FRP на 2 OCP) в ответ на 100

мс актиническую вспышку. (E) - фотоциклические переходы OCP в присутствии FRP.

Увеличение доли состояний с одной водородной связью в OCP Y201_3IodY коррелирует с увеличением выхода фотопродукта на 30 % в ответ на вспышку длительностью 100 мс (рис. 23C). Это подчеркивает роль состояний с одиночными Н-связями как оптимальной стартовой точки для фотоактивации. Мы также обнаружили, что релаксация красных форм OCP-Y201_3IodY происходит быстрее, чем у WT OCP (рис. 23C). Это наблюдение согласуется с нашими предыдущими результатами, которые показали, что во время релаксации красных состояний WT OCP каротиноид сначала восстанавливает водородную связь с W288, а затем увеличивается доля состояний с одной водородной связью с Y201 [82]. Если в OCP-Y201_3IodY конечным состоянием является конфигурация с одной Н-связью с W288 и переход на Y201 менее вероятен, то его релаксация занимает меньше шагов.

Добавление FRP увеличивает скорость релаксации красных форм, в которых NTE отщеплен от С-домена OCP, что позволяет избавиться от расширенных физиологически активных форм OCP и наблюдать преимущественно релаксацию компактных промежуточных продуктов фотоцикла (рис. 23E). Ранее мы показали, что кинетика изменений поглощения и флуоресценции WT OCP в присутствии FRP сходна между собой и имеет характерную сигнатуру, что позволило нам идентифицировать оранжевое переходное состояние на стадии релаксации фотоцикла [82]. Как было показано ранее, изменения интенсивности флуоресценции триптофана в компактных формах OCP обусловлены взаимодействием между W288 и каротиноидом и сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции при разрыве Н-связи и снижением при ее восстановлении [70]. В случае OCP-Y201_3IodY мы наблюдали значительное отклонение от обычного поведения триптофановой флуоресценции OCP WT (рис. 23D) [48].

Примечательно, что интенсивность флуоресценции Trp в ОСР Y201_3IodY начала снижаться уже во время актиничной вспышки. Поскольку каротиноид, очевидно, не может вызывать тушение флуоресценции Trp288 до тех пор, пока не окажется в отсоединенном домене NTD в фотоактивированном состоянии ОСР, такие изменения, вероятно, могут быть объяснены взаимодействием атома йода в 3IodY с W288 [48]. Увеличение интенсивности флуоресценции триптофана-288 в экспериментах в режиме накачка – зондирование (на шкале от мс до с) указывает на фотоиндуцированный разрыв водородной связи во время актиничной вспышки. После вспышки интенсивность флуоресценции постепенно снижается, временно опускаясь ниже исходного уровня. Поскольку флуоресценция Trp-288 тушится при образовании водородных связей, мы объяснили этот эффект увеличением числа контактов молекулы каротиноида с W288 в переходном состоянии [83].

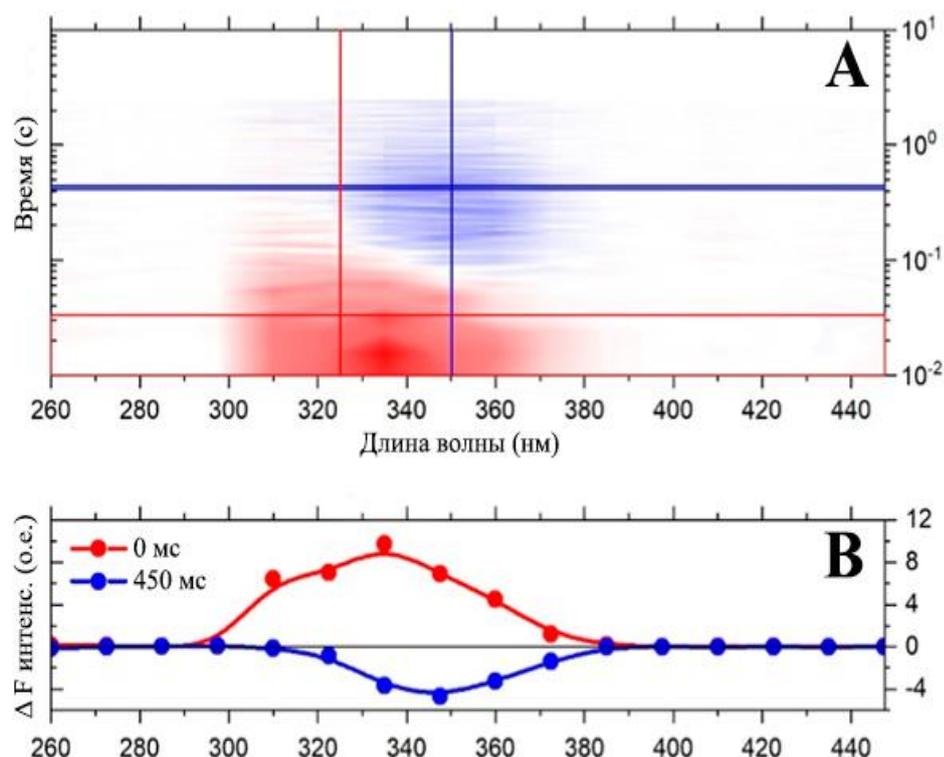


Рисунок 24. Дифференциальные спектры флуоресценции 5 мкМ ОСР, полученные в результате возбуждения триптофанов в УФ области спектра (262 нм) в присутствии 0,5 мкМ FRP (А). Изменения интенсивности флуоресценции записаны с шагом по времени 2 мс после 60 мс актиничной вспышки (445 нм, 5 Вт) при 37 °С. Разница в интенсивности флуоресценции показана цветом в диапазоне от -13,5 (синий) до +13,5 (красный) условных единиц. 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

Мы также получили дифференциальные спектры флуоресценции ОСР WT в присутствии FRP (рис. 24). Очевидно, что прирост красного физиологически активного состояния исчезает быстрее, чем восстанавливается сигнал от исходного темноадаптированного состояния. Это напрямую указывает на существование промежуточного состояния, образующегося между исчезнувшей красной формой и невосстановленным

оранжевым состоянием. Возвращаясь к результатам измерения спектров поглощения ОСР в присутствии FRP (рис. 22), следует отметить, что после фотоактивации ОСР с FRP релаксация красного сигнала происходит быстрее, чем восстанавливается сигнал от оранжевого состояния, при этом образуется промежуточное состояние с двумя водородными связями без вибронной структуры (рис. 22 С и D). Эти данные согласуются с изменениями флуоресценции триптофана (рис. 23, рис 24)

Заключение

На основании полученной в работе новой информации о последовательности процессов релаксации промежуточных состояний фотоцикла ОСР, построим кинетическую модель взаимодействия ОСР и FRP (рис. 25). Ранее мы установили, что для описания кинетики фотоциклических переходов ОСР в присутствии FRP в миллисекундном-секундном интервале требуется, по крайней мере, 3 переходных состояния [82]. Красное состояние P_N накапливается после актинической вспышки и, вероятно, представляет собой промежуточное состояние, в котором NTE все еще формирует контакт с С-доменом. Это подтверждается тем, что время жизни этого состояния одинаково в присутствии и в отсутствие FRP, а также у мутанта Δ NTE. Учитывая временной масштаб, мы уверены, что в этом промежуточном состоянии каротиноид уже транслоцирован в N-домен. Следующее состояние P_M формируется из P_N во время его жизни, после чего домен NTE отсоединяется от С-домена и освобождает его для взаимодействия с FRP.

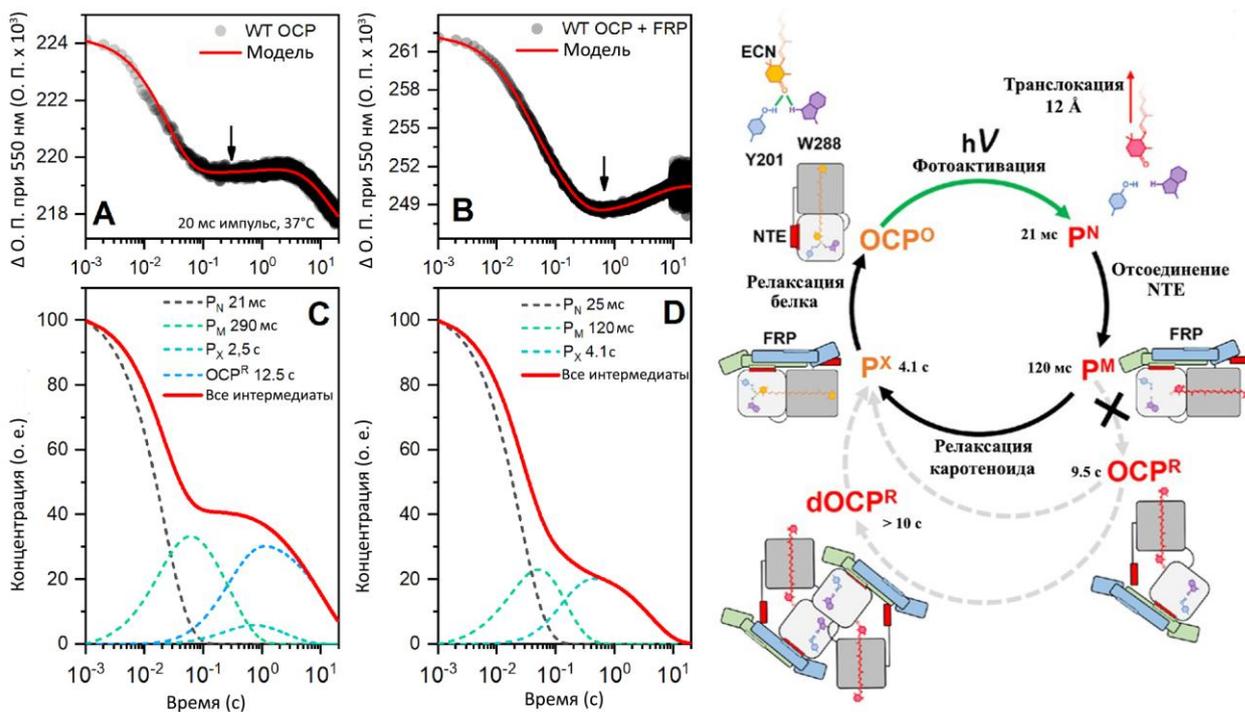


Рисунок 25. Моделирование кинетики изменения поглощения OCP при 550 нм. Экспериментальные данные (черные точки) и результат моделирования (красные линии) кинетики релаксации OCP в отсутствии (A) и в присутствии FRP (B). Относительная концентрация переходных состояний в отсутствии (C) и в присутствии FRP (D) показана пунктирными линиями. E - модель фотоциклических переходов OCP на миллисекундной-секундной временной шкале в присутствии FRP. Числа указывают на время жизни промежуточных состояний.

Согласно предполагаемой схеместадии P_M образуется комплекс с FRP, который значительно сокращает время жизни этого переходного состояния и последующих стадий фотоцикла. При определенной концентрации FRP, которая может быть на порядки ниже концентрации OCP, FRP полностью блокирует переход P_M в физиологически активное состояние OCP^R . На наш взгляд, это наблюдение важно, поскольку доказывает, что регуляторная роль FRP направлена, в первую очередь, на предотвращение взаимодействия

между ОСР и ФБС, а не только на ускорение процесса диссоциации комплекса ОСР^R-ФБС.

В составе комплекса с FRP состояние P_M переходит в оранжевое состояние P_X путем перемещения каротиноида в С-домен и восстановления контакта с донорами водородных связей. Состояние P_X имеет значительно меньшее поглощение в области 550 нм, чем адаптированное к темноте состояние ОСР^O, и не имеет тонкой вибронной структуры.

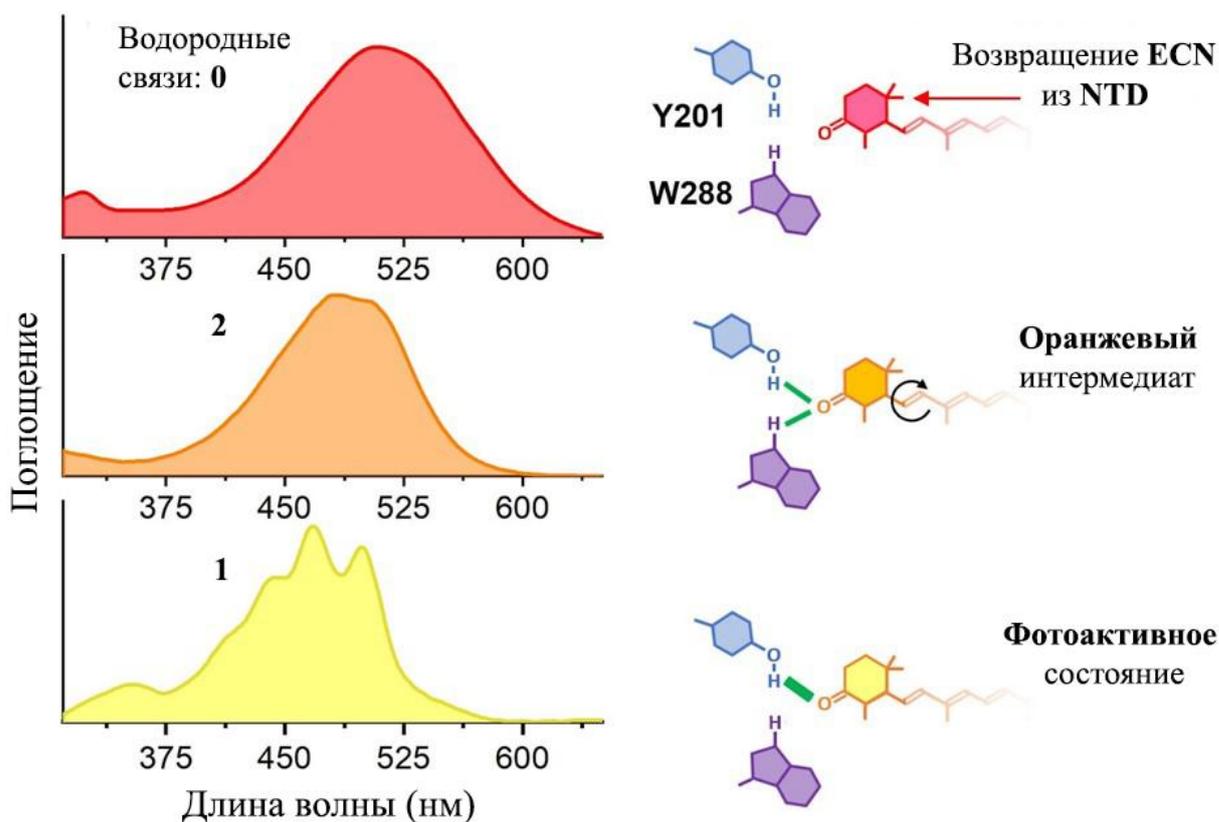


Рисунок 26. Спектры поглощения каротиноида и схематичное представление соответствующих им конфигураций водородных связей между кето-группой эхиненона и остатками тирозина-201 и триптофана-288.

Отметим, что состояние P_X наблюдается и в отсутствие FRP, но его концентрация значительно снижена по сравнению с ОСР^R. Мы предполагаем, что на стадии P_X ОСР может оставаться в комплексе с FRP, пока не будет вытеснен NTE. В оранжевом состоянии P_X (и в P_M) общая структура

комплекса OCP-FRP, вероятно, незначительно отличается от известной модели NTE-FRP (рис. 1). Пока остается не выяснено как именно NTE вытесняет FRP, можно лишь предположить, что в результате образования связей между каротиноидом и белком в С-домене энергия взаимодействия между FRP и С-доменом ослабевает. Следуя этой логике, константа связывания между FRP и P_M должна быть меньше, чем у P_X или NTE. Ранее было показано, что комплекс NTE-FRP диссоциирует при появлении свободных С-доменов [62]. Поэтому вполне вероятно, что FRP будет связываться в первую очередь с красными состояниями OCP, включая физиологически активный OCP^R, если он по каким-то причинам успел образоваться до появления FRP в среде.

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 -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.

Список сокращений

АФЦ - аллофикоцианин

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДМСО - диметилсульфоксид

КД – круговой дихроизм

КР – комбинационное рассеяние

ОП – оптическая плотность

ПБК – пигмент-белковый комплекс

РЦ – реакционный центр

ТЭ – терминальный эмитер

ФБС - фикобилисома

ФС I – фотосистема I

ФС II – фотосистема II

ФЦ – фикоцианин

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

aaRS - аминоксил-тРНК-синтетаза

Аро – форма белка, лишенная каротиноида

Аро-СОСР – СОСР в апопротеиновой форме

Аро-ОСР – ОСР в апопротеиновой форме

CAN – каротиноид кантаксантин

СОСР - белок-переносчик каротиноида, который состоит из димеризованного

С-домена ОСР

СТD – С-концевой домен (C-terminal domain)

СТ – перенос заряда (charge transfer)

СТТ - дополнительная С-концевая короткая α -спираль (C-terminal tail)

DFT – теория функционала плотности (Density functional theory)

DLS – динамическое рассеяние света (Dynamic light scattering)

ECN – каротиноид эхиненон

EET – перенос энергии возбуждения (Electronic energy transfer)

FRP – белок восстановления флуоресценции (Fluorescence recovery protein)

LCM – линкерный полипептид, обеспечивающий связь ФБС с фотосинтетической мембраной (linker-core-membrane junction)

ncAAs – неканонические аминокислоты

NPQ – нефотохимическое тушение (Non-photochemical quenching)

NR – гидрофобный краситель Нильский красный (Nile red)

NTD - N-концевой домен (N-terminal domain)

NTE - α -спираль в начале N-концевого домена OCP (N-terminal extension)

OCP – оранжевый каротиноидный белок (Orange carotenoid protein)

OCP^O – оранжевая форма OCP

OCP^R – красная форма OCP

OCP^{OI} – промежуточная оранжевая форма OCP

OCP^{W288A} – пурпурный мутант OCP

OCP^{Y201A/W288A} - пурпурный мутант, сходный с OCP^{W288A}, устойчивый к фосфату

OCP-Y201_3-BrY - мутантная форма OCP с аминокислотной заменой Y201 на неканонический вариант 3-BrY

OCP-Y201_3-ClY - мутантная форма OCP с аминокислотной заменой Y201 на неканонический вариант 3-ClY

ОСР-Y201_3-IodY - мутантная форма ОСР с аминокислотной заменой Y201 на неканонический вариант 3-IodY

ОСР-Y201_3-XY - общее название мутантных форм ОСР с аминокислотной заменой Y201 на неканонический вариант

PM – состояние ОСР с транслоцированным в NTD каротиноидом

PN – состояние ОСР с каротиноидом, вышедшим из конформационно-напряженного состояния

PX - состояние ОСР с NTE, отсоединенной от CTD

PYP – фотоактивный желтый белок (Photoactive yellow protein)

SEC – эксклюзионная хроматография (Size exclusion chromatography)

Trp - триптофан

Tyr – тирозин

WT – дикий тип (Wild type)

Список литературы

1. Anomalous temperature dependence of the fluorescence lifetime of phycobiliproteins / E. G. Maksimov, F.-J. Schmitt, P. Hätti [et al.] // Laser Physics Letters. – 2013. – Т. 10. – № 5. – С. 055602.
2. Parameterization of a single H-bond in Orange Carotenoid Protein by atomic mutation reveals principles of evolutionary design of complex chemical photosystems / M. Moldenhauer, H.-W. Tseng, A. Kraskov [et. al.] // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2023. – Т. 10. – С. 1072606.

3. Samsonoff, W. Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat / W. Samsonoff, R. MacColl // *Archives of Microbiology*. – 2001. – T. 176. – № 6. – C. 400-405.
4. Zarrouk, C. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée, influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de «*Spirulina maxima*» / C. Zarrouk // *Contribution à l'étude d'une Cyanophycée, influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de «Spirulina maxima»*. – 1966. – T. 1. – C. II-85.
5. A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection / R. L. Leverenz, M. Sutter, A. Wilson [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 348. – № 6242. – P. 1463-1466.
6. A comparative study of three signaling forms of the orange carotenoid protein / E. G. Maksimov, M. Moldenhauer, E. A. Shirshin [et al.] // *Photosynthesis Research*. – 2016. – Vol. 130. – № 1-3. – P. 389-401.
7. A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria / M. Y. Gorbunov, F. I. Kuzminov, V. V. Fadeev [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2011. – Vol. 1807. – № 12. – P. 1591-1599.
8. A Molecular Mechanism for Nonphotochemical Quenching in Cyanobacteria / Y. Lu, H. Liu, R. Saer [et al.] // *Biochemistry*. – 2017. – Vol. 56. – № 22. – P. 2812-2823.
9. A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related Energy Dissipation in Cyanobacteria / A. Wilson, G. Ajlani, J.-M. Verbavatz [et al.] // *The Plant Cell*. – 2006. – Vol. 18. – № 4. – P. 992-1007.
10. Additional families of orange carotenoid proteins in the photoprotective system of cyanobacteria / H. Bao, M. R. Melnicki, E. G. Pawlowski [et al.] // *Nature Plants*. – 2017. – Vol. 3. – № 8. – P. 17089.

11. Adir, N. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant / N. Adir // *Photosynthesis Research*. – 2005. – Vol. 85. – Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome. – № 1. – P. 15-32.
12. Albani, J. R. Origin of Tryptophan Fluorescence Lifetimes. Part 2: Fluorescence Lifetimes Origin of Tryptophan in Proteins / J. R. Albani // *Journal of Fluorescence*. – 2014. – Vol. 24. – Origin of Tryptophan Fluorescence Lifetimes. Part 2. – № 1. – P. 105-117.
13. Allophycocyanin Trimer Stability and Functionality Are Primarily Due to Polar Enhanced Hydrophobicity of the Phycocyanobilin Binding Pocket / A. McGregor, M. Klartag, L. David, N. Adir // *Journal of Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 384. – № 2. – P. 406-421.
14. Anti-Stokes fluorescence excitation reveals conformational mobility of the C-phycocyanin chromophores / G. V. Tsoraev, E. A. Protasova, E. A. Klimanova [et al.] // *Structural Dynamics*. – 2022. – Vol. 9. – № 5. – P. 054701.
15. Anti-stokes fluorescence of phycobilisome and its complex with the orange carotenoid protein / D. V. Zlenko, E. A. Protasova, G. V. Tsoraev [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2024. – Vol. 1865. – № 1. – P. 149014.
16. Assembly of photoactive orange carotenoid protein from its domains unravels a carotenoid shuttle mechanism / M. Moldenhauer, N. N. Sluchanko, D. Buhrke [et al.] // *Photosynthesis Research*. – 2017. – Vol. 133. – № 1-3. – P. 327-341.
17. Bailey, S. Photoprotection in Cyanobacteria: Regulation of Light Harvesting † / S. Bailey, A. Grossman // *Photochemistry and Photobiology*. – 2008. – Vol. 84. – Photoprotection in Cyanobacteria. – № 6. – P. 1410-1420.

18. Bao, H. Structure and functions of Orange Carotenoid Protein homologs in cyanobacteria / H. Bao, M. R. Melnicki, C. A. Kerfeld // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2017. – Vol. 37. – P. 1-9.
19. Biophysical modeling of in vitro and in vivo processes underlying regulated photoprotective mechanism in cyanobacteria / E. A. Shirshin, E. E. Nikonova, F. I. Kuzminov [et al.] // *Photosynthesis Research*. – 2017. – Vol. 133. – № 1-3. – P. 261-271.
20. Callis, P. R. Quantitative Prediction of Fluorescence Quantum Yields for Tryptophan in Proteins / P. R. Callis, T. Liu // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2004. – Vol. 108. – № 14. – P. 4248-4259.
21. Characterization of the Synechocystis PCC 6803 Fluorescence Recovery Protein involved in photoprotection / M. Gwizdala, A. Wilson, A. Omairi-Nasser, D. Kirilovsky // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2013. – Vol. 1827. – № 3. – P. 348-354.
22. Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: An overview / L.-N. Liu, X.-L. Chen, Y.-Z. Zhang, B.-C. Zhou // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2005. – Vol. 1708. – Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae. – № 2. – P. 133-142.
23. Chemical activation of the cyanobacterial orange carotenoid protein / J. D. King, H. Liu, G. He [et al.] // *FEBS Letters*. – 2014. – Vol. 588. – № 24. – P. 4561-4565.
24. Chen, Y. Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins / Y. Chen, M. D. Barkley // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – № 28. – P. 9976-9982.

25. Comparative ultrafast spectroscopy and structural analysis of OCP1 and OCP2 from *Tolypothrix* / V. Kuznetsova, M. A. Dominguez-Martin, H. Bao [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2020. – Vol. 1861. – № 2. – P. 148120.
26. Concerted Action of Multiple *cis* -Acting Sequences Is Required for Rev Dependence of Late Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression / M. Graf, A. Bojak, L. Deml [et al.] // *Journal of Virology*. – 2000. – Vol. 74. – № 22. – P. 10822-10826.
27. Crystal Structure of Allophycocyanin from Marine Cyanobacterium *Phormidium* sp. A09DM / R. R. Sonani, G. D. Gupta, D. Madamwar, V. Kumar // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – № 4. – P. e0124580.
28. Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria / M. Sutter, A. Wilson, R. L. Leverenz [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – № 24. – P. 10022-10027.
29. De Marsac, N. T. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. / N. T. De Marsac, G. Cohen-bazire // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1977. – Vol. 74. – № 4. – P. 1635-1639.
30. Dominguez-Martin, M. A. Engineering the orange carotenoid protein for applications in synthetic biology / M. A. Dominguez-Martin, C. A. Kerfeld // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2019. – Vol. 57. – P. 110-117.
31. Engineering hydrogen bonding at tyrosine-201 in the orange carotenoid protein using halogenated analogues / G. V. Tsoraev, A. Y. Bukhanko, A. A. Mamchur [et al.] // *Photosynthesis Research*. – 2025. – Vol. 163. – № 1. – P. 10.
32. Engineering the photoactive orange carotenoid protein with redox-controllable structural dynamics and photoprotective function / Y. B. Slonimskiy,

E. G. Maksimov, E. P. Lukashev [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2020. – Vol. 1861. – № 5-6. – P. 148174.

33. Essential role of two tyrosines and two tryptophans on the photoprotection activity of the Orange Carotenoid Protein / A. Wilson, C. Punginelli, M. Couturier [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2011. – Vol. 1807. – № 3. – P. 293-301.

34. Fluorescent Labeling Preserving OCP Photoactivity Reveals Its Reorganization during the Photocycle / E. G. Maksimov, N. N. Sluchanko, K. S. Mironov [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2017. – Vol. 112. – № 1. – P. 46-56.

35. Functional interaction of low-homology FRPs from different cyanobacteria with *Synechocystis* OCP / Y. B. Slonimskiy, E. G. Maksimov, E. P. Lukashev [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2018. – Vol. 1859. – № 5. – P. 382-393.

36. Gantt, E. Phycobilisomes / E. Gantt // *Annual Review of Plant Physiology*. – 1981. – Vol. 32. – № 1. – P. 327-347.

37. Gasymov, O. K. pH-Dependent Conformational Changes in Tear Lipocalin by Site-Directed Tryptophan Fluorescence / O. K. Gasymov, A. R. Abduragimov, B. J. Glasgow // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49. – № 3. – P. 582-590.

38. Ghisaidoobe, A. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques / A. Ghisaidoobe, S. Chung // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2014. – Vol. 15. – Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins. – № 12. – P. 22518-22538.

39. Glazer, A. N. Light Harvesting by Phycobilisomes / A. N. Glazer // *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. – 1985. – Vol. 14. – № 1. – P. 47-77.

40. Gwizdala, M. In Vitro Reconstitution of the Cyanobacterial Photoprotective Mechanism Mediated by the Orange Carotenoid Protein in *Synechocystis* PCC 6803 / M. Gwizdala, A. Wilson, D. Kirilovsky // *The Plant Cell*. – 2011. – Vol. 23. – № 7. – P. 2631-2643.
41. He, J.-A. Photodynamic action of phycobiliproteins: in situ generation of reactive oxygen species / J.-A. He, Y.-Z. Hu, L.-J. Jiang // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 1997. – Vol. 1320. – Photodynamic action of phycobiliproteins. – № 2. – P. 165-174.
42. Highly efficient energy transfer from quantum dot to allophycocyanin in hybrid structures / A. A. Karpulevich, E. G. Maksimov, N. N. Sluchanko [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2016. – Vol. 160. – P. 96-101.
43. Hixon, J. Algorithm for the Analysis of Tryptophan Fluorescence Spectra and Their Correlation with Protein Structural Parameters / J. Hixon, Y. Reshetnyak // *Algorithms*. – 2009. – Vol. 2. – № 3. – P. 1155-1176.
44. Holzwarth, A. R. Structure-function relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae / A. R. Holzwarth // *Physiologia Plantarum*. – 1991. – Vol. 83. – № 3. – P. 518-528.
45. Hybrid systems of quantum dots mixed with the photosensitive protein phycoerythrin / E. G. Maksimov, T. S. Gostev, F. I. Kuz'minov [et al.] // *Nanotechnologies in Russia*. – 2010. – Vol. 5. – № 7-8. – P. 531-537.
46. Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria / C. Boulay, A. Wilson, S. D'Haene, D. Kirilovsky // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 25. – P. 11620-11625.

47. Interaction of the signaling state analog and the apoprotein form of the orange carotenoid protein with the fluorescence recovery protein / M. Moldenhauer, N. N. Sluchanko, N. N. Tavraz [et al.] // *Photosynthesis Research*. – 2018. – Vol. 135. – № 1-3. – P. 125-139.
48. Intrinsic tryptophan fluorescence quenching by iodine in non-canonical amino acid reveals alteration of the hydrogen bond network in the photoactive orange carotenoid protein / G. V. Tsoraev, A. Y. Bukhanko, A. A. Mamchur [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2023. – Vol. 683. – P. 149119.
49. Khoroshyy, P. Effect of Hofmeister cosolutes on the photocycle of photoactive yellow protein at moderately alkaline pH / P. Khoroshyy, A. Dér, L. Zimányi // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2013. – Vol. 120. – P. 111-119.
50. Kirilovsky, D. The Orange Carotenoid Protein: a blue-green light photoactive protein / D. Kirilovsky, C. A. Kerfeld // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2013. – Vol. 12. – The Orange Carotenoid Protein. – № 7. – P. 1135-1143.
51. Kirilovsky, D. The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria / D. Kirilovsky, C. A. Kerfeld // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2012. – Vol. 1817. – № 1. – P. 158-166.
52. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* / J. R. Lakowicz. – Boston, MA : Springer US, 1999.
53. Light-controlled carotenoid transfer between water-soluble proteins related to cyanobacterial photoprotection / Y. B. Slonimskiy, F. Muzzopappa, E. G. Maksimov [et al.] // *The FEBS Journal*. – 2019. – Vol. 286. – № 10. – P. 1908-1924.

54. Local and global structural drivers for the photoactivation of the orange carotenoid protein / S. Gupta, M. Guttman, R. L. Leverenz [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – Vol. 112. – № 41. –
55. MacColl, R. Allophycocyanin and energy transfer / R. MacColl // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2004. – Vol. 1657. – № 2-3. – P. 73-81.
56. MacColl, R. Cyanobacterial Phycobilisomes / R. MacColl // Journal of Structural Biology. – 1998. – Vol. 124. – № 2-3. – P. 311-334.
57. Mass spectrometry footprinting reveals the structural rearrangements of cyanobacterial orange carotenoid protein upon light activation / H. Liu, H. Zhang, J. D. King [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2014. – Vol. 1837. – № 12. – P. 1955-1963.
58. Mechanism of the Efficient Tryptophan Fluorescence Quenching in Human γ D-Crystallin Studied by Time-Resolved Fluorescence / J. Chen, D. Toptygin, L. Brand, J. King // Biochemistry. – 2008. – Vol. 47. – № 40. – P. 10705-10721.
59. Mimuro, M. A high molecular weight terminal pigment ("anchor polypeptide") and a minor blue polypeptide from phycobilisomes of the cyanobacterium *Nostoc* sp. (MAC): Isolation and characterization / M. Mimuro, E. Gantt // Photosynthesis Research. – 1986. – Vol. 10. – № 3. – P. 201-208.
60. Native Mass Spectrometry Analysis of Oligomerization States of Fluorescence Recovery Protein and Orange Carotenoid Protein: Two Proteins Involved in the Cyanobacterial Photoprotection Cycle / Y. Lu, H. Liu, R. G. Saer [et al.] // Biochemistry. – 2017. – Vol. 56. – № 1. – P. 160-166.
61. Niyogi, K. K. Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis / K. K.

Niyogi, T. B. Truong // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2013. – Vol. 16. – № 3. – P. 307-314.

62. OCP–FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria / N. N. Sluchanko, Y. B. Slonimskiy, E. A. Shirshin [et al.] // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 3869.

63. Peptide Sequence and Conformation Strongly Influence Tryptophan Fluorescence / R. W. Alston, M. Lasagna, G. R. Grimsley [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2008. – Vol. 94. – № 6. – P. 2280-2287.

64. Permyakov, E. A. Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence / E. A. Permyakov, E. A. Burstein // *Biophysical Chemistry*. – 1984. – Vol. 19. – № 3. – P. 265-271.

65. Photoactivation mechanism of a carotenoid-based photoreceptor / S. Bandara, Z. Ren, L. Lu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – № 24. – P. 6286-6291.

66. Photoactivation Mechanism, Timing of Protein Secondary Structure Dynamics and Carotenoid Translocation in the Orange Carotenoid Protein / P. E. Konold, I. H. M. Van Stokkum, F. Muzzopappa [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2019. – Vol. 141. – № 1. – P. 520-530.

67. Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants / E. G. Maksimov, F. I. Kuzminov, I. V. Konyuhov [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2011. – Vol. 104. – № 1-2. – P. 285-291.

68. Phycobilisomes Supply Excitations to Both Photosystems in a Megacomplex in Cyanobacteria / H. Liu, H. Zhang, D. M. Niedzwiedzki [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 342. – № 6162. – P. 1104-1107.

69. Privalov, P. L. Stability of Proteins Small Globular Proteins / P. L. Privalov. // *Advances in Protein Chemistry*. – Elsevier, 1979. – Vol. 33. – P. 167-241.
70. Probing of carotenoid-tryptophan hydrogen bonding dynamics in the single-tryptophan photoactive Orange Carotenoid Protein / E. G. Maksimov, E. A. Protasova, G. V. Tsoraev [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 11729.
71. Probing the spectral signatures of orange carotenoid protein by orthogonal translation with aromatic non-canonical amino acids / H.-W. Tseng, M. Moldenhauer, T. Friedrich [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2022. – Vol. 607. – P. 96-102.
72. Protein-protein interactions in carotenoid triggered quenching of phycobilisome fluorescence in *Synechocystis* sp. PCC 6803 / M. G. Rakhimberdieva, Y. V. Bolychevtseva, I. V. Elanskaya, N. V. Karapetyan // *FEBS Letters*. – 2007. – Vol. 581. – № 13. – P. 2429-2433.
73. Ptitsyn, O. B. Molten Globule and Protein Folding / O. B. Ptitsyn // *Advances in Protein Chemistry*. – Elsevier, 1995. – Vol. 47. – P. 83-229.
74. Ritchie, D. W. Accelerating and focusing protein–protein docking correlations using multi-dimensional rotational FFT generating functions / D. W. Ritchie, D. Kozakov, S. Vajda // *Bioinformatics*. – 2008. – Vol. 24. – № 17. – P. 1865-1873.
75. Role of hydrogen bond alternation and charge transfer states in photoactivation of the Orange Carotenoid Protein / I. A. Yaroshevich, E. G. Maksimov, N. N. Sluchanko [et al.] // *Communications Biology*. – 2021. – Vol. 4. – № 1. – P. 539.

76. Sackett, D. L. Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces / D. L. Sackett, J. Wolff // *Analytical Biochemistry*. – 1987. – Vol. 167. – № 2. – P. 228-234.
77. Saito, S. Resonance Raman spectra (5800-40 cm⁻¹) of All-trans and 15-cis isomers of β -carotene in the solid state and in solution. Measurements with various laser lines from ultraviolet to red / S. Saito, M. Tasumi, C. H. Eugster // *Journal of Raman Spectroscopy*. – 1983. – Vol. 14. – № 5. – P. 299-309.
78. Slonimskiy, Y. B. Fluorescence recovery protein: a powerful yet underexplored regulator of photoprotection in cyanobacteria† / Y. B. Slonimskiy, E. G. Maksimov, N. N. Sluchanko // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2020. – Vol. 19. – № 6. – P. 763-775.
79. Sluchanko, N. N. Features of protein–protein interactions in the cyanobacterial photoprotection mechanism / N. N. Sluchanko, Y. B. Slonimskiy, E. G. Maksimov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – Vol. 82. – № 13. – P. 1592-1614.
80. Specificity of the Cyanobacterial Orange Carotenoid Protein: Influences of Orange Carotenoid Protein and Phycobilisome Structures / D. Jallet, A. Thurotte, R. L. Leverenz [et al.] // *Plant Physiology*. – 2014. – Vol. 164. – № 2. – P. 790-804.
81. Spectroscopic Properties of the Carotenoid 3'-Hydroxyechinenone in the Orange Carotenoid Protein from the Cyanobacterium *Arthrospira maxima* / T. Polívka, C. A. Kerfeld, T. Pascher, V. Sundström // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – № 10. – P. 3994-4003.
82. Stages of OCP-FRP Interactions in the Regulation of Photoprotection in Cyanobacteria, Part 1: Time-Resolved Spectroscopy / G. V. Tsoraev, A. Bukhanko, G. S. Budylin [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2023. – Vol. 127. – № 9. – P. 1890-1900.

83. Stages of OCP–FRP Interactions in the Regulation of Photoprotection in Cyanobacteria, Part 2: Small-Angle Neutron Scattering with Partial Deuteration / M. Golub, M. Moldenhauer, O. Matsarskaia [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2023. – Vol. 127. – № 9. – P. 1901-1913.
84. Structural and Functional Modularity of the Orange Carotenoid Protein: Distinct Roles for the N- and C-Terminal Domains in Cyanobacterial Photoprotection / R. L. Leverenz, D. Jallet, M.-D. Li [et al.] // *The Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – № 1. – P. 426-437.
85. Structural Determinants Underlying Photoprotection in the Photoactive Orange Carotenoid Protein of Cyanobacteria / A. Wilson, J. N. Kinney, P. H. Zwart [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 24. – P. 18364-18375.
86. Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies. Structure and Dynamics of Macromolecules. – Elsevier, 2004.
87. Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica* / J. Zhang, J. Ma, D. Liu [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 551. – № 7678. – P. 57-63.
88. The Crystal Structure of a Cyanobacterial Water-Soluble Carotenoid Binding Protein / C. A. Kerfeld, M. R. Sawaya, V. Brahmandam [et al.] // *Structure*. – 2003. – Vol. 11. – № 1. – P. 55-65.
89. The cyanobacterial Fluorescence Recovery Protein has two distinct activities: Orange Carotenoid Protein amino acids involved in FRP interaction / A. Thurotte, C. Bourcier De Carbon, A. Wilson [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2017. – Vol. 1858. – № 4. – P. 308-317.
90. The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher / A. Sedoud, R. López-Igual, A. Ur Rehman [et al.] // *The Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – № 4. – P. 1781-1791.

91. The nature of anomalous temperature dependence of the fluorescence lifetime of allophycocyanin / E. G. Maksimov, G. V. Tsoraev, V. Z. Paschenko, A. B. Rubin // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2012. – Vol. 443. – № 1. – P. 86-90.
92. The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components / E. G. Maksimov, N. N. Sluchanko, Y. B. Slonimskiy [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 15548.
93. The purple Trp288Ala mutant of *Synechocystis* OCP persistently quenches phycobilisome fluorescence and tightly interacts with FRP / N. N. Sluchanko, K. E. Klementiev, E. A. Shirshin [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2017. – Vol. 1858. – № 1. – P. 1-11.
94. The Signaling State of Orange Carotenoid Protein / E. G. Maksimov, E. A. Shirshin, N. N. Sluchanko [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2015. – Vol. 109. – № 3. – P. 595-607.
95. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model / D. A. Bryant, G. Guglielmi, N. T. De Marsac [et al.] // *Archives of Microbiology*. – 1979. – Vol. 123. – № 2. – P. 113-127.
96. The Unique Protein-to-Protein Carotenoid Transfer Mechanism / E. G. Maksimov, N. N. Sluchanko, Y. B. Slonimskiy [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2017. – Vol. 113. – № 2. – P. 402-414.
97. Time resolved temperature switchable excitation energy transfer processes between CdSe/ZnS nanocrystals and phycobiliprotein antenna from *Acaryochloris marina* / F.-J. Schmitt, E. G. Maksimov, H. Suedmeyer [et al.] // *Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications*. – 2011. – Vol. 9. – № 2. – P. 190-195.

98. Time-Resolved Single Tryptophan Fluorescence in Photoactive Yellow Protein Monitors Changes in the Chromophore Structure during the Photocycle via Energy Transfer / H. Otto, D. Hoersch, T. E. Meyer [et al.] // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – № 51. – P. 16804-16816.
99. Transient Exposure of Hydrophobic Surface in the Photoactive Yellow Protein Monitored with Nile Red / J. Hendriks, T. Gensch, L. Hviid [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2002. – Vol. 82. – № 3. – P. 1632-1643.
100. Truhlar, D. G. Convex Arrhenius plots and their interpretation / D. G. Truhlar, A. Kohen // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 98. – № 3. – P. 848-851.
101. Tryptophan Rotamers as Evidenced by X-Ray, Fluorescence Lifetimes, and Molecular Dynamics Modeling / S. L. C. Moors, M. Hellings, M. De Maeyer [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2006. – Vol. 91. – № 3. – P. 816-823.
102. Vivian, J. T. Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins / J. T. Vivian, P. R. Callis // *Biophysical Journal*. – 2001. – Vol. 80. – № 5. – P. 2093-2109.
103. Watanabe, M. Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex / M. Watanabe, M. Ikeuchi // *Photosynthesis Research*. – 2013. – Vol. 116. – Phycobilisome. – № 2-3. – P. 265-276.
104. Zlenko, D. V. Structural modeling of the phycobilisome core and its association with the photosystems / D. V. Zlenko, P. M. Krasilnikov, I. N. Stadnichuk // *Photosynthesis Research*. – 2016. – Vol. 130. – № 1-3. – P. 347-356.
105. Zuber, H. Structure of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae / H. Zuber // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1986. – Vol. 11. – № 10. – P. 414-419.

106. A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor / A. Wilson, C. Punginelli, A. Gall [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – T. 105. – № 33. – C. 12075-12080.
107. Betz, M. One century of protein crystallography: the phycobiliproteins / M. Betz // Biological Chemistry. – 1997. – T. 378. – One century of protein crystallography. – № 3-4. – C. 167-176.
108. Bioenergetic processes of cyanobacteria: from evolutionary singularity to ecological diversity. Bioenergetic processes of cyanobacteria / ред. G. A. Peschek. – Dordrecht Heidelberg : Springer, 2011. – 720 с.