

## ДИМЕРИЗАЦИЯ СВОБОДНОГО И АССОЦИИРОВАННОГО С МЕМБРАНАМИ ФОТОСИСТЕМЫ II БЕЛКА PsbO ПРИ ОБЛУЧЕНИИ УФ-СВЕТОМ

© 2022 г. М.С. Христин\*, Т.Н. Смолова\*, А.А. Хоробрых\*, #

\*Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: andrewkhor@rambler.ru

Поступила в редакцию 24.08.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

Основной функцией белка PsbO в ФСII является стабилизация  $Mn_4CaO_5$ -кластера водоокисляющего комплекса. В работе впервые показано, что кратковременное воздействие УФ-света как на изолированный, так и на мембранносвязанный белок PsbO приводит к его димеризации. Нековалентный димер белка PsbO обнаруживался с помощью гель-фильтрации. Разделение с помощью электрофореза в полиакриламидном геле белков мембран ФСII, освещенных УФ-светом, свидетельствовало об образовании ковалентного димера PsbO, как и в случае изолированного белка PsbO. Образование ковалентного димера PsbO под действием УФ-излучения подтверждает предположение о существовании *in vivo* нековалентного димера PsbO, который может играть стабилизирующую роль в ФСII.

**Ключевые слова:** УФ-свет, мембраны ФСII, белок PsbO, димеризация, дисульфидная связь, дитиозино-вая связь, электростатическая связь.

DOI: 10.31857/S0006302922060096, EDN: LKETDZ

Фотосистема II (ФСII) представляет собой пигментно-белковый комплекс, локализованный в тилакоидной мембране. Основная функция ФСII — фотоокисление воды и передача электронов от воды в фотосинтетическую электрон-транспортную цепь. ФСII можно условно разделить на реакционный центр (РЦ), состоящий из белков D1 и D2, на которых располагаются кофакторы переноса электронов; водоокисляющий комплекс (ВОК), имеющий каталитический центр —  $Mn_4CaO_5$ -кластер, и внутренние (CP43 и CP47) и внешние светособирающие комплексы, окружающие РЦ. Реакционный центр преобразует энергию возбужденного хлорофилла в энергию разделенных зарядов ( $[P680^{+} \cdot \text{Feo}^{-} \cdot]$ ) с образованием сильного окислителя  $P680^{+} \cdot$  с окислительно-восстановительным потенциалом 1.10–1.27 В [1, 2].  $P680^{+} \cdot$  окисляет  $Mn_4CaO_5$  кластер через редокс-активный тирозиновый остаток белка D1 (TyrZ), который действует как донор

электронов для  $P680^{+} \cdot$ . В результате последовательного разделения зарядов в РЦ ФСII формируются промежуточные S-состояния  $Mn_4CaO_5$ -кластера ( $S_0, S_1, S_2, S_3$  and  $S_4$ ). Переход от  $S_4$  к  $S_0$  сопровождается окислением двух молекул воды и выделением  $O_2$ .

$Mn_4CaO_5$ -кластер окружен внешними белками, которые защищают его от экзогенных восстановителей и служат для оптимизации выделения кислорода. Эти белки включают марганец-стабилизирующий белок (PsbO), который обнаруживается во всех окисленных организмах, белки PsbP и PsbQ, характерные для высших растений и зеленых водорослей, в то время как цианобактерии содержат PsbU и PsbV [3, 4]. В последнее время установлена роль Asp158 белка PsbO в его связывании с ФСII и ее активностью [5], а также необходимость в белке PsbJ для активности ФСII у мутантов *Thermosynechococcus vulcanus*, обедненных люменальными белками PsbO и PsbV [6].

Марганец-стабилизирующий белок PsbO прочно связывается с белками мембран ФСII с люменальной стороны [3] на расстоянии 17 Å от  $Mn_4CaO_5$ -кластера ВОК [7]. Мутанты *Synechocys-*

Сокращения: ФСII – фотосистема II, РЦ – реакционный центр, ВОК – водоокисляющий комплекс, PsbO – марганец-стабилизирующий белок, ПААГ – полиакриламидный гель, ДТТ – дитиотреитол.

*tis sp.* PCC 6803, лишённые белка PsbO, показывают низкую скорость фотосинтетического выделения кислорода в сравнении с диким типом. При высокой интенсивности света эти мутанты быстро утрачивают способность выделять кислород [8], что свидетельствует о защитной роли белка PsbO при функционировании ФСII в условиях фотоокислительного стресса. Отмытые от внешних белков фрагменты мембран ФСII утрачивают фотосинтетическую активность, а при инкубации с белками, прежде всего с препаратами PsbO, восстанавливают ее [9]. Блокирование генов двух изоформ белка PsbO1 и PsbO2 в *Arabidopsis thaliana* приводит к снижению фотосинтетической активности и обнаружению мономера ФСII при электрофорезе в полиакриламидном геле [10]. Рассматривается также участие белка PsbO в поступлении воды к  $Mn_4CaO_5$ -кластеру и отводе протонов, образующихся при разложении воды, из активного центра ВОК в люмен [3, 11–13]. Было установлено, что в отводе протонов принимают участие карбоксилатные группы глутамата и аспартата, расположенные на поверхности  $\beta$ -цилиндра белка PsbO [14]. Механизм передачи протонов включает релеподобную регуляцию, синхронно связанную с конформационными изменениями белка [15].

Установлено, что на одну ФСII приходится две молекулы белка PsbO [16]. Связывание двух молекул белка с одним реакционным центром ФСII увеличивает скорость выделения кислорода [11]. Доказательство участия нековалентного димера белка PsbO в стабилизации ФСII *in vivo* основано на анализе энергетических и электростатических взаимодействий между двумя молекулами белка [14], а также электронно-микроскопических изображений ФСII в мембранах тилакоидов [17].

Экспериментально обнаружить димер белка PsbO в мембранных фрагментах, обогащенных комплексами ФСII (мембраны ФСII) возможно с помощью химических сшивок, например, карбодимидом, который ранее был успешно использован для сшивки PsbO с CP47 [18]. Однако химический метод сшивок не подтверждает наличие димера белка PsbO в ФСII. Вероятно, условия для обратимой димеризации белка PsbO в растворе и в мембранах ФСII значительно отличаются. Таким образом, вопрос о наличии димера белка PsbO в мембранах ФСII нельзя считать окончательно решенным. Представляется, что использование УФ-света для сшивки димера белка PsbO позволит получить новые данные о его возможном участии в стабилизации ФСII.

УФ-свет, являясь составным компонентом спектра солнечного света, оказывает на растения как положительное, так и повреждающее действие. Известно, что свет диапазона УФ-В поглощается белком psb33, ассоциированным с ВОК

[19], а также белком-рецептором УФ-света UVR 8 [20]. УФ-свет вызывает образование синглетного кислорода, гидроксильных радикалов в мембранах тилакоидов [21]. Нами показано, что в препаратах РЦ ФСII УФ-свет индуцирует выцветание хлорофилла *a*, феофитина, каротиноида, а также изменяет структуру белков, ковалентно сшивает гетеродимер D1-D2 [22]. В результате этих и, возможно, других, еще неизученных механизмов, запускаемых УФ-светом, ингибируется ФСII. Нельзя исключить поглощение света диапазона УФ-В белком PsbO и, как следствие, образование фотомодифицированных форм белка. Это может влиять на структурно-функциональные свойства белка и регулировать фотосинтетическую активность растений.

Настоящая работа посвящена исследованию индуцированной УФ-светом димеризации как свободного, так и связанного с мембранами ФСII белка PsbO.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

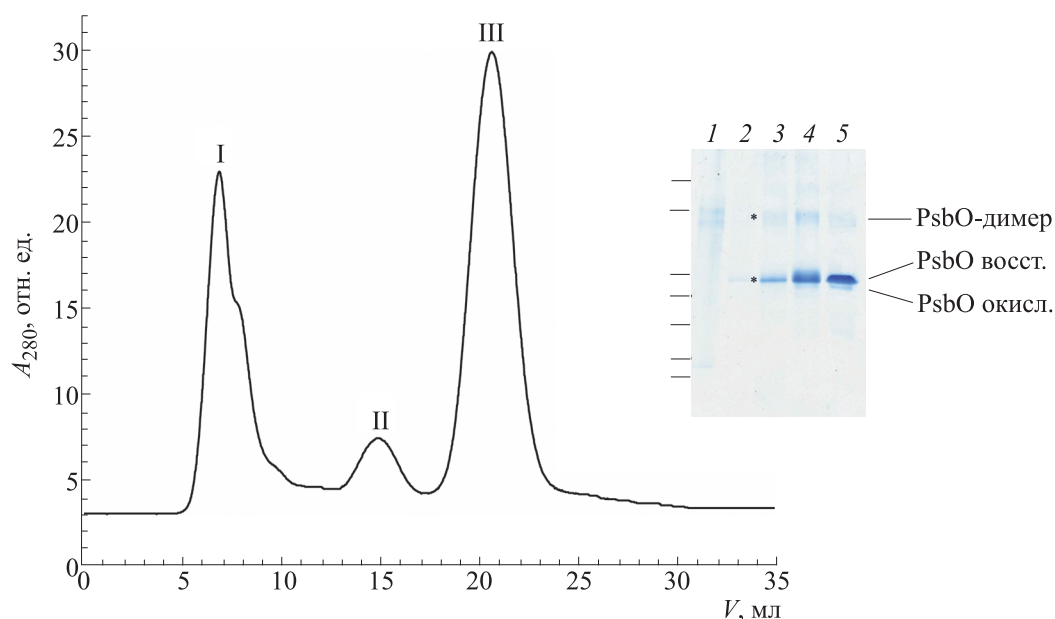
Кислород-выделяющие мембраны ФСII получали из хлоропластов гороха и шпината по методу, описанному в работе [23]. Белок PsbO был выделен по методу, описанному в работе [24].

Выделенный белок PsbO и мембраны ФСII освещали ртутно-кварцевой лампой ОКН-11, 950 Вт, (максимумы основных полос излучения паров ртути 253.65 и 435.8 нм), расположенной на расстоянии 150 мм от чашки Петри, в которую наливали раствор образца слоем толщиной в 2–3 мм. Чашку помещали на лед и дополнительно охлаждали поверхность растворов с помощью вентилятора. Такие условия исключали нагрев образца во время УФ-облучения. В отдельных опытах использовали интерференционные фильтры на 260 и 296 нм с полушириной полос в спектре пропускания 10 нм.

Флуоресценцию белка до и после облучения регистрировали с помощью спектрофлуориметра Hitachi-850 (Япония).

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили в денатурирующих условиях в градиенте акриламида (12–18%) при комнатной температуре. Образцы белковых фракций после гель-хроматографии осаждали трихлоруксусной кислотой (10%), отмывали ацетоном, центрифугировали и высушивали. Осадок белка растворяли в трис-НСI-буфере (рН 6.8), содержащем 10% сахарозы, 8 М мочевины, 3% додецилсульфата натрия, 0.005% бромфенолового синего, 1% 2-меркаптоэтанола или 5 мМ дитиотреитола (ДТТ).

Гель-фильтрацию белка PsbO проводили на колонке Superdex-75 10/300 (GE Healthcare, Швеция) с использованием жидкостного хроматографа АКТА FPLC (Amersham Biociences, Швеция).



**Рис. 1.** Профиль гель-фильтрации белка PsbO из шпината на колонке Superdex-75. На врезке – электрофореграммы фракции I без (дорожка 1) и с 5 мМ ДТТ (дорожка 2), фракции II (дорожка 3), фракции III без (дорожка 4) и с 5 мМ ДТТ (дорожка 5). Штрихами слева обозначены белковые маркеры с молекулярными массами 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 кДа; звездочками отмечены димер и мономер фракции I + 5 мМ ДТТ.

Белок PsbO, растворенный в среде А (50 мМ HEPES-NaOH, pH 7.0, 35 мМ NaCl) наносили на колонку Superdex-75 10/300, уравновешенную средой А и элюировали средой А при скорости потока 0.5 мл/мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

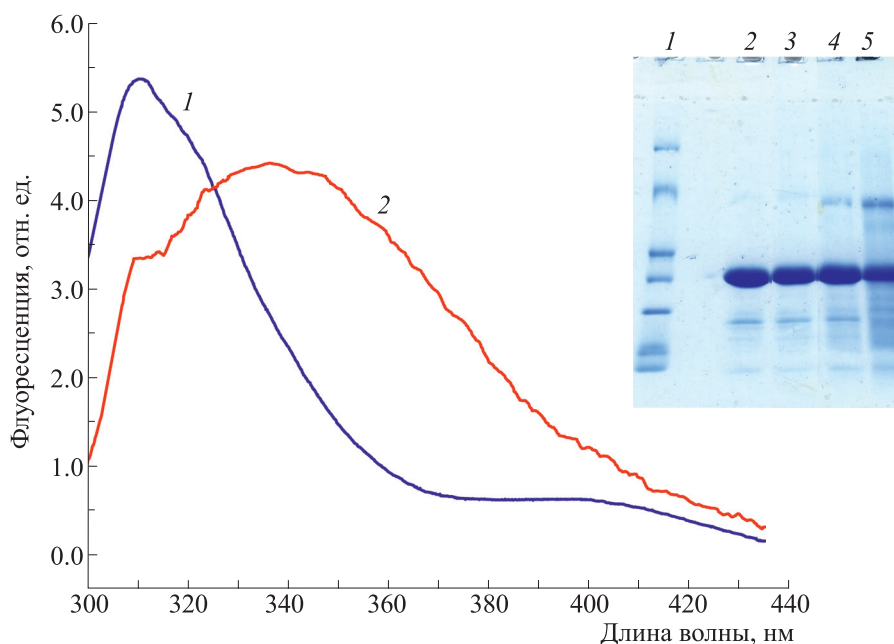
На рис. 1 представлены результаты разделения белка PsbO из шпината на колонке Superdex 10/300 и электрофореза в ПААГ трех (I–III) его фракций. В первой фракции содержится белок с молекулярной массой около 70 кДа, согласно калибровке колонки по стандартам молекулярных масс, приложенным фирмой-производителем. Результаты разделения фракций I–III с помощью электрофореза в ПААГ (рис. 1, врезка) показали, что фракция I содержит две близкие белковые зоны, незначительно отличающиеся по подвижности. Относительная молекулярная масса этих зон соответствует димеру белка PsbO (рис. 1, дорожки 1 и 2). Во фракциях II и III содержатся мономер и димер белка PsbO (рис. 1, дорожки 3–5). Также следует отметить, что мономер белка PsbO разделяется на две фракции, одна из которых содержит дисульфидную связь и представляет окисленный мономер PsbO, другая – мономер с восстановленной дисульфидной внутрибелковой связью, т.е. вместо дисульфида содержит две сульфгидрильные группы [25].

Инкубация белка фракции I с 5 мМ ДТТ перед электрофорезом приводила к увеличению интен-

сивности полосы (т.е. концентрации белка) в зоне 33 кДа, соответствующей относительной молекулярной массе белка PsbO, и уменьшению интенсивности в зоне, соответствующей его димеру (рис. 1, дорожка 2). Этот факт может свидетельствовать о том, что в геле часть димера белка PsbO содержит дисульфидную связь, а часть димера, не прореагировавшая с ДТТ, вероятно, имеет другой тип ковалентной связи, предположительно дитиозиноновый мостик между двумя молекулами мономера. Он может образоваться при окислительных реакциях, катализируемых ионами металлов и УФ-светом [26].

Как показано на рис. 2, освещение раствора белка PsbO УФ-светом в течении 5 мин приводит к снижению интенсивности флуоресценции при 310 нм при возбуждении светом 280 нм, а также смещению спектра флуоресценции в длинноволновую область, что характерно для денатурированного белка PsbO, когда единственный остаток триптофана (Трп) становится доступным для света. Для белка PsbO известна особенность флуоресценции единственного остатка Трп [27]. Максимальная эмиссия флуоресценции приходится примерно на 317 нм, что указывает на сильно гидрофобное окружение этого остатка в молекуле белка PsbO. Освещение светом 295 нм возбуждает только остаток Трп, а светом 280 нм – и этот остаток, и остатки восьми остатков тирозина (Тир).

Освещение УФ-светом и разделение электрофорезом в ПААГ показывают также образование

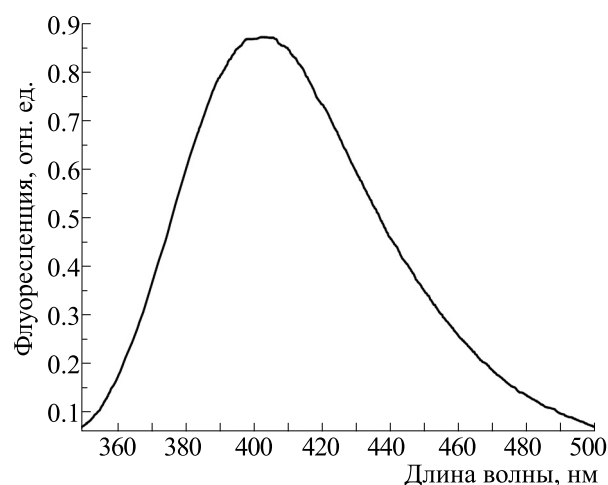


**Рис. 2.** Спектры флуоресценции ( $E_x = 280$  нм) белка PsbO из гороха до (спектр 1) и после (спектр 2) пятиминутного облучения УФ-светом. На врезке – электрофореграммы исходного белка (дорожка 2), после облучения УФ-светом в течение 1 мин (дорожка 3), 2 мин (дорожка 4) и 5 мин (дорожка 5); дорожка 1 – белковые маркеры с молекулярными массами 116,0, 66,2, 45,0, 35,0, 25,0, 18,4, 14,4 кДа. Освещение образца проводили светом интенсивностью  $54,3$  мкмоль фотонов·м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup> с помощью ртутно-кварцевой лампы (ОКН-11).

димера PsbO (рис. 2, дорожки 3–5). Связь между двумя молекулами белка формируется в результате фотохимического образования радикала Тир, локализованного на поверхности молекулы белка. Столкновение двух молекул, каждая из которых содержит на поверхности радикалы Тир, создает условия для формирования связи Тир–Тир. На рис. 3 представлен спектр флуоресценции белка PsbO, освещенного УФ-светом в течение 5 мин. Видно, что возбуждение белка светом с длиной волны 325 нм выявляет максимум флуоресценции при 410 нм, что соответствует дитиозину (согласно флуоресцентному методу определения дитиозина [28]).

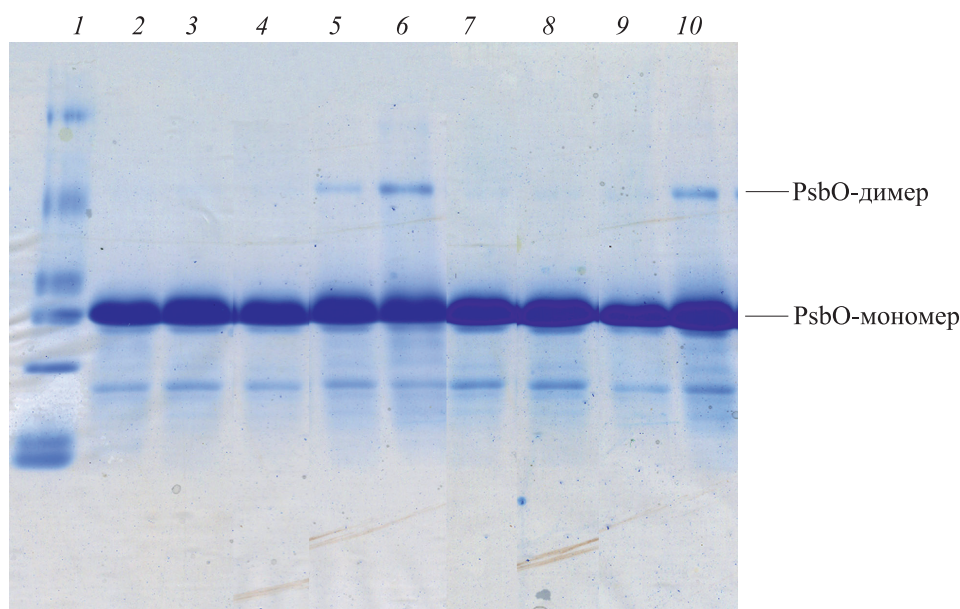
Исследование влияния УФ-света на белки предусматривает, как правило, использование УФ фильтров, пропускающих свет определенного диапазона, что позволяет учитывать природу аминокислот в структуре белка. На рис. 4 представлены результаты электрофореза белка PsbO после освещения с использованием фильтров, пропускающих свет 276 нм (рис. 4, дорожки 3–6) и 290 нм (рис. 4, дорожки 7–10) по отношению к контрольному варианту (рис. 4, дорожка 2). Заметное увеличение содержания белка PsbO в полосе димера наблюдается после 5 и 10 мин освещения белка с использованием фильтра 276 нм (рис. 4, дорожки 5 и 6) и после 10 мин освещения с использованием фильтра 290 нм (рис. 4, дорожка 10). Так как диаметр и толщина обоих

фильтров, а также расстояние от УФ-лампы до поверхности освещаемых препаратов были одинаковыми, выявленное различие (заметное увеличение интенсивности полосы димера) обусловлено длиной волны и интенсивности УФ-света (для фильтра на 260 нм –  $39,5$  мкмоль фотонов·м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup> и на



**Рис. 3.** Спектр флуоресценции ( $E_x = 325$  нм) освещенного УФ-светом белка PsbO из гороха. Освещение образца проводили светом интенсивностью  $54,3$  мкмоль фотонов·м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup> с помощью ртутно-кварцевой лампы (ОКН-11) в течение 3 мин.

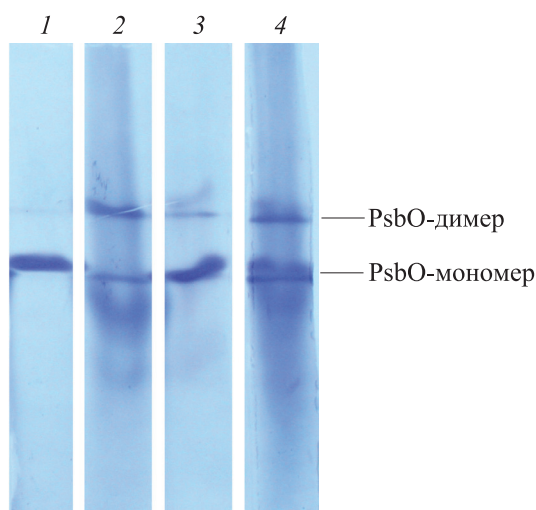




**Рис. 4.** Электрофореграммы белка PsbO из гороха до (дорожка 2) и после облучения УФ-светом через фильтры 260 нм в течение 1 мин (дорожки 3 и 7 соответственно), 5 мин (дорожки 5 и 9 соответственно) и 10 мин (дорожки 6 и 10 соответственно).

290 нм –  $27.2 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ). Частично разница может быть за счет разного коэффициента поглощения при 260 и 290 нм.

Индукцированная УФ-светом димеризация белка PsbO была также исследована в мембранных препаратах ФСII, обработанных 1 М NaCl



**Рис. 5.** Электрофореграммы белка PsbO (дорожка 1); белка PsbO, экстрагированного из мембранных препаратов ФСII, предварительно освещенных УФ-светом (дорожка 2); белка PsbO, освещенного УФ-светом в течение 5 мин (дорожка 3); белка PsbO, экстрагированного из освещенных УФ-светом мембранных препаратов ФСII + белок PsbO (дорожка 4).

для удаления белков PsbP и PsbQ ВОК. Предполагалось, что удаление внешних белков PsbP и PsbQ, находящихся на достаточно близком расстоянии от PsbO, может способствовать большей доступности УФ-света к белку PsbO. Кроме того, отмывка внешних белков PsbP и PsbQ от мембран с помощью 1 М NaCl частично удаляет белок PsbO, вероятно, ту его часть, которая находится в люмене в не связанном с мембранами состоянии. Такой белок можно добавить к отмывкам 1 М NaCl препаратам ФСII перед освещением УФ-светом с тем, чтобы наблюдать эффект димеризации белка в условиях, когда часть белка связана с мембранами ФСII, а другая часть находится в растворимой форме. Кроме того, нельзя исключить редокс-взаимодействие между связанными с мембранами и растворимыми мономерами PsbO.

На рис. 5 представлены результаты электрофореза растворимого (рис. 5, дорожки 1 и 3) и связанного с мембранами ФСII (рис. 5, дорожки 2 и 4) белка PsbO до (рис. 5, дорожка 1) и после (рис. 5, дорожки 2 и 4) облучения УФ-светом. К мембранам ФСII, содержащим связанный белок PsbO, после освещения добавляли растворимый белок PsbO. Как видно из рис. 5, полосы мономера и димера белка PsbO во всех вариантах опыта (свободный необлученный УФ-светом белок PsbO; облученные УФ-светом мембраны ФСII, содержащие связанный белок; облученный УФ-светом белок PsbO; свободный необлученный белок PsbO, добавленный к облученным мембранам ФСII, содержащим связанный белок PsbO) совпадают по подвижности, что исключает ошиб-

ку в идентификации образовавшегося димера белка после освещения препаратов ФСII (рис. 5, дорожка 2).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

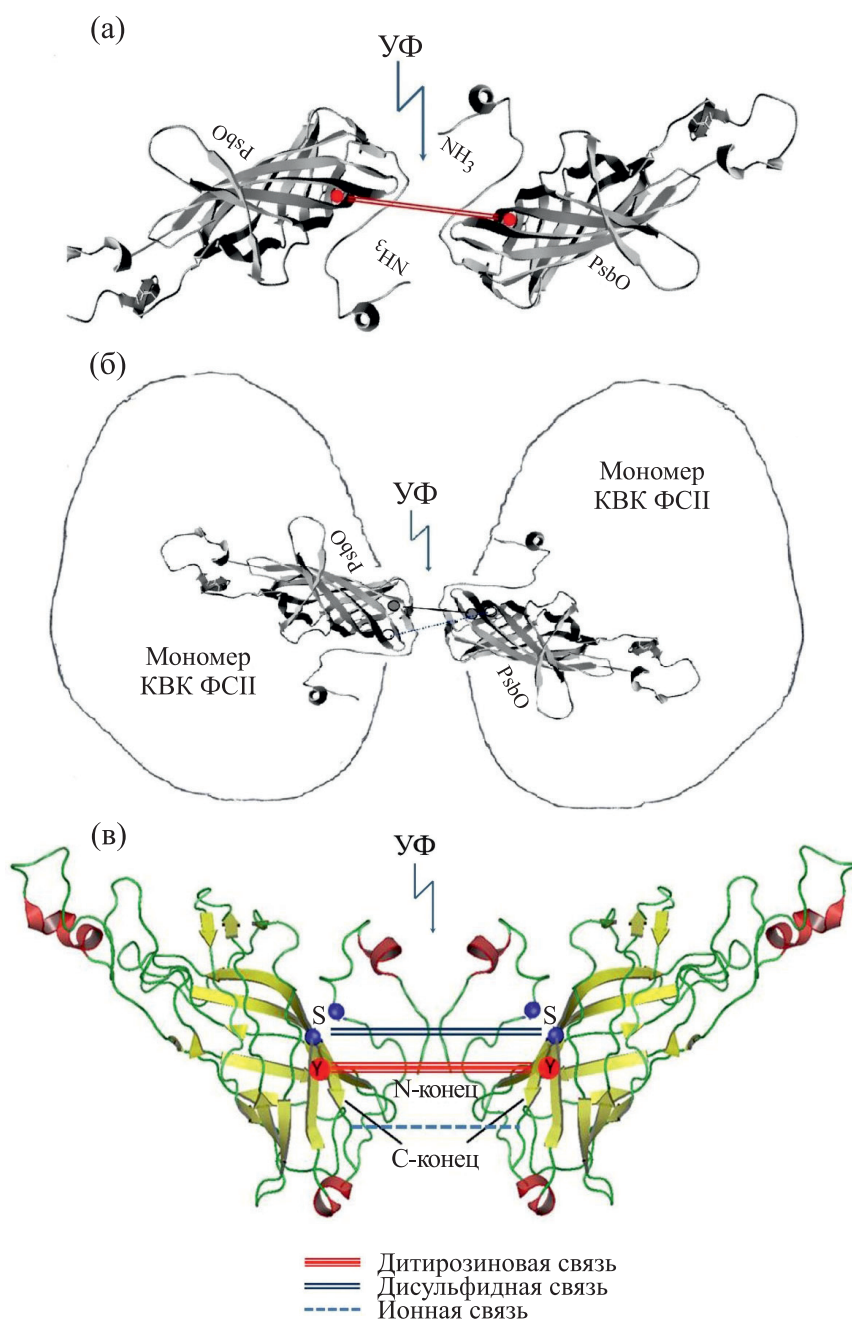
Новые знания о влиянии УФ-света на структурно-функциональную организацию ФСII важны для более глубокого понимания механизмов повреждения и адаптации растений к возрастающей на Земле интенсивности УФ-света связанного с истощением озонового слоя [29] и потеплением климата. УФ-свет поглощается ароматическими кислотными остатками белков (прежде всего, Тир и Трп), липидами, нуклеиновыми кислотами, что усиливает окислительный стресс в ФСII и, таким образом, ингибирует фотосинтез [21, 30]. В настоящей работе получены данные, свидетельствующие о способности полихроматического (рис. 2) и монохроматического (рис. 4) УФ-света активировать димеризацию изолированного белка PsbO. Неожиданным явилось образование димеров без воздействия на белок УФ-света. Так, при хроматографии неосвещенного УФ-светом изолированного белка PsbO на гель-фильтрационной колонке (рис. 1) были обнаружены мономеры и димеры белка. Было предположено, что в процессе разделения происходит обратимая димеризация и мономеризация белка. Образование димеров также наблюдается при электрофорезе в ПААГ фракций белка, полученных при его хроматографии на колонке Superdex-75 (рис. 1). Димеризация при электрофорезе, вероятно, связана с тем, что на границе концентрирующего и разделяющего гелей мономерный белок концентрируется в узкую зону при pH 6.8 и димеризуется, а затем движется в разделяющем геле с pH 8.5. Электрофорез белков в гелях, приготовленных с использованием персульфата аммония, происходит в условиях, благоприятных для окисления цистеина [31], что способствует димеризации белка с участием цистеинов и в связи с этим приводит к возникновению артефактов. Учитывая это, мы проводили предэлектрофорез без белков для удаления персульфата, заменяли электродные буферы на свежие и затем наносили белковые растворы в ячейки гелевого блока. После окрашивания белков в гелях красителем Ку-масси и при наличии димерной полосы белка наблюдается шлейф, направленный от димера к мономеру (рис. 2, врезка, дорожка 5), что можно объяснить мономеризацией димера в процессе электрофореза. Такой эффект наблюдается при электрофорезе рекомбинантного хемокина, содержащего четыре цистеина [32].

Таким образом, сравнивая собственные результаты электрофореза PsbO с литературными данными, можно заключить, что димер с межмолекулярной дисульфидной связью формируется в

результате взаимодействия цистеинов белка с окислителями, например, персульфатом аммония, который используется в качестве окислителя при полимеризации гелей для электрофореза. В ФСII такими окислителями являются радикальные формы кислорода [33], образующиеся во время освещения препаратов ФСII видимым светом.

Межбелковые сшивки в изолированных тилакоидах хлоропластов при освещении видимым светом наблюдаются только при температуре 40°C [34]. В цитируемой работе иммуноблотинг белков в ПААГ специфическими антителами против белка PsbO показал образование нескольких дополнительных полос после освещения при температуре 40°C, одна из которых соответствует мономеру белка. Снижение компактности и формы зоны мономера белка в полосах после обработки мембран белым светом интерпретируются авторами работы [35] как повреждение структуры белка PsbO гидроксильными радикалами ( $\text{OH}^\bullet$ ), образующимися в реакции перекиси водорода с ионами переходных металлов. Мы наблюдали расширение и раздвоение зоны мономера белка PsbO в присутствии окислителей ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , феррицианида), восстановителей (ДТТ, 2-меркаптоэтанол), а также при электрофорезе. Так как эти изменения обратимы, можно говорить о структурных изменениях белка, связанных с редокс-состоянием Цис, Трп и Тир. Возможно, димеры, способные к мономеризации, образуются в гелях при электрофорезе в результате окислительно-восстановительных изменений дисульфидной связи. Димер белка PsbO, в котором молекулы связаны между собой в результате индуцированного УФ-светом образования дитиозина, не подвергается мономеризации. Такие димеры, вероятно, подвергаются протеолитической деградации *in vivo*. Важным подтверждением образования дитиозинового мостика является обнаружение специфической флуоресценции (рис. 3). В литературе описаны результаты восстановления дисульфидной связи инсулина и вазопрессина с помощью УФ-света [36]. В их восстановлении, вероятно, принимает участие возбужденный Трп [37]. По аналогии с этими работами мы также не исключаем возможность восстановления дисульфидной связи при облучении УФ-светом и последующего их окисления с образованием межбелковой дисульфидной связи.

Индукцированное УФ-светом образование дитиозина эффективно используется для межмолекулярных сшивок белков в научных исследованиях и решении практических задач. По предположению исследователей [38] определение ковалентных сшивок белков в растениях методом электрофореза в ПААГ является информативным и ценным тестом для определения чувствительности растений к УФ-свету. Сшитые белки могут



**Рис. 6.** Схема предполагаемого образования дитиразиновой и дисульфидной связи в димере белка PsbO при облучении УФ-светом в растворе (а), ассоциированного с ВОК (б) и с димерами ФСII в мегакомплексах тилакоидов (в). Модель белка PsbO взята из Data Bank entry 3ARC<sup>30</sup>, модель димера PsbO в мегакомплексе – согласно работе [14].

функционировать в растениях и обладать повышенной устойчивостью к стрессам. Эта идея подтверждается многочисленными примерами сшивания белков с помощью химических и физических методов при моделировании и создании искусственного фотосинтеза, био-фототранзисторов на основе фотосинтетических белков.

На рис. 6 представлена гипотетическая схема индуцированной УФ-светом димеризации сво-

бодного белка PsbO (рис. 6а) и в составе димера ВОК ФСII (рис. 6б), а также его участия в образовании мегакомплексов ФСII (рис. 6в). Такая димеризация белка PsbO, вероятно, происходит не только в препаратах изолированного белка, но и в фотосинтезирующих организмах растений, бактерий, водорослей. Пока в литературе недостаточно экспериментальных данных, позволяющих глубже понять физиологическую роль этой, без-

условно важной, структурно-функциональной перестройки белков. Накопленные литературные данные и результаты, представленные нами в этой работе, позволяют предположить, что УФ-свет активирует перестройку белка PsbO, изменяя его структурную организацию. Предполагается, что нековалентные связи между мономерами белка PsbO участвуют в организации димеров ФСП. В этом случае образование дитиозиновых димеров белка PsbO, индуцированное УФ-светом, может быть вовлечено в этот процесс. Пока неясно, связано ли образование дитиозиновых связей со стабилизацией ВОК при действии УФ-света или их образование свидетельствует о повреждении, и таким образом является маркером стресса ФСП. В настоящее время отсутствуют сведения о возможности деполимеризации индуцированных УФ-светом димеров белка. Изучение механизмов деполимеризации белков, кроме научного, может также иметь практическое значение при конструировании искусственного фотосинтеза и в медицине. Например, проблема лечения болезни Паркинсона, молекулярным механизмом которой является активируемая окислительным стрессом ковалентная полимеризация си-нуклеина с образованием его дитиозиновых димеров, до последнего времени не решена, так как невозможно подобрать лекарственное средство, которое могло бы активировать деполимеризацию димеров и агрегатов (телец Леви) в клетках нейронов.

Таким образом, исследуя димеризацию УФ-светом, мы предполагаем возможность образования трех типов димера белка PsbO *in vitro*, различающихся по типу связи между двумя мономерами: электростатической, дитиозиновой и дисульфидной. Возможность образования ковалентного димера белка в виде двух популяций, в одной из которых связь мономеров дитиозиновая, а в другой дисульфидная подтверждается масс-хроматографическим анализом пептидов препарата  $\alpha$ -лактальбумина, облученного УФ-светом [39].

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН (122041100274-6).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Климов, С. И. Аллахвердиев, Ш. Деметер и др., Докл. АН СССР, **49**, 227 (1979).
2. H. Ishikita, B. Loll, J. Biesiadka, et al., *Biochemistry*, **44**, 4118 (2005).
3. T. M. Bricker, J. L. Roose, R. D. Fagerlund, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 121 (2012).
4. K. Ifuku and T. Noguchi, *Front. Plant Sci.*, **7**, 84 (2016). DOI: 10.3389/fpls.2016.00084
5. Q. Zhu, Y. Yang, Y. Xiao, et al., *Photosynth. Res.*, **146** (1–3), 29 (2020).
6. P. Chao, J. A. Forsman, L. Hui, et al., *Photosynth. Res.*, **151** (1), 103 (2022).
7. A. R. Offenbacher, B. C. Polander, and B. A. Barry, *J. Biol. Chem.*, **288**, 29056 (2013).
8. S. R. Mayes, K. M. Cook, S. J. Self, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1060** (1), 1 (1991).
9. Н. И. Шутилова, И. Г. Кадошникова, Т. Н. Смолова и др., *Биохимия*, **52** (12), 1958 (1987).
10. B. Lundin, M. Nurmi, M. Rojas-Stuetz, et al., *Photosynth. Res.*, **98**, 405 (2008).
11. H. Popelkova and C. F. Yocum, *J. Photochem. Photobiol.*, **104**, 179 (2011).
12. А. В. Пиголев и В. В. Климов, *Биохимия*, **80** (6), 785 (2015).
13. R. Hussein, M. Ibrahim, A. Bhowmick, et al., *Nature Commun.*, **12** (1), 6531 (2021)
14. L. M. Gerland, D. Friedrich, L. Hopf, et al., *ChemBioChem.*, **21**, 1597 (2020).
15. C. del Val and A.-N. Bondar, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858** (6), 432 (2017).
16. J. L. Roose, C. F. Yocum, and H. Popelkova, *Biochemistry*, **50**, 5988 (2011).
17. M. Li, J. Ma, X. Li, et al., *eLife*, **10**, e69635 (2021). DOI: 10.7554/eLife.69635
18. A. Seidler, *Eur. J. Biochem.*, **242**, 485 (1996).
19. R. Fristedt, A. Herdean, C. E. Blaby-Haas, et al., *Plant Physiol.*, **167** (2), 481 (2010).
20. D. J. Kliebenstein, J. E. Lim, L. G. Landry, et al., *Plant Physiol.*, **130**, 234 (2002).
21. É. Hideg and I. Vass, *Plant Sci.*, **115** (2), 251 (1996).
22. О. В. Никитишена, М. С. Христин, Т. Н. Смолова и др., *Биохимия*, **62**, 1280 (1997).
23. D. A. Berthold, G. T. Babcock, and C. F. Yocum, *FEBS Lett.*, **134**, 231 (1981).
24. О. В. Pobeguts, Т. Н. Smolova, D. S. Timoshevsky, et al., *J. Photochem. Photobiol.*, **100** (1), 30 (2010).
25. M. Karamoko, S. Cline, K. Redding, et al., *Plant Cell*, **23**, 4462 (2011).
26. M. B. Maina, G. Burra, Y. K. Al-Hilaly, et al., *iScience*, **23** (10), 101537 (2020)
27. K. Ruan, J. Li, R. Liang, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 593 (2002)
28. D. A. Malencik and S. R. Anderson, *Amino Acids*, **25**, 233 (2003).
29. J. B. Kerr and C. T. McElroy, *Science*, **262** (5136), 1032 (1993).
30. G. Renger, M. Volker, H. J. Eckert, et al., *J. Photochem. Photobiol.* **49** (1), 97 (1989).



31. C. Achilli, A. Ciana, and G. Minetti, *J. Biol. Methods*, **5** (4), e104 (2018)
32. M. K. Crow, N. Karasavvas, and A. H. Sarris, *Biotechniques*, **30** (2), 311 (2001).
33. P. Pospíšil, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787** (10), 1151 (2009).
34. A. K. Singh, G.S. Singhal, *Photosynthetica*, **36**, 213 (1999).
35. T. Henmi, M. Miyao and Y. Yamamoto, *Plant Cell Physiol.*, **45**(2), 243 (2004).
36. S. K. Gammelgaard, S. B. Petersen, K. F. Haselmann, et al., *ACS Omega*, **5**, 7962 (2020).
37. E. A. Permyakov, S. E. Permyakov, G. Y. Deikus, et al., *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **51**, 498 (2003).
38. N. Shanthi, K. Lingakumar, and G. Kulandaivelu, *J. Global Biosci.*, **4** (4), 1996 (2015).
39. Z. Zhao, K. Engholm-Keller, M. M. Poojary, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **68** (24), 6701 (2020).

## **Dimerization of the Free and Photosystem II-Associated PsbO Protein upon Irradiation of UV Light**

**M.S. Khristin\*, T.N. Smolova\*, and A.A. Khorobrykh\***

*Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The main function of the PsbO protein in photosystem II is to stabilize the water-oxidizing Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> cluster. The present study shows for the first time that short-term exposure of both isolated and membrane-bound protein PsbO to UV light led to protein dimerization. A non-covalent dimer of the PsbO protein was detected by gel filtration. The electrophoretic separation of proteins of PSII membrane fragments illuminated with UV light using a polyacrylamide gel was indicative of the formation of the covalent dimer of the PsbO protein, as with the isolated PsbO protein. The formation of the covalent dimer of the PsbO protein exposed to UV light confirms the assumption about the existence in vivo of a non-covalent dimer of the PsbO protein that may play a regulatory role in PSII.

*Keywords: UV light, PSII membranes, PsbO protein, dimerization, disulfide bond, tyrosine bond, electrostatic bond*