

ИНДУКЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ФОТОЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ PsbS И LhcSR В КЛЕТКАХ ЗЕЛЁНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОЙ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

© 2022 В.В. Птушенко^{1,2*}, Г.Н. Бондаренко³, Е.Н. Виноградова^{4,5}, Е.С. Глаголева^{1,4},
О.В. Карпова⁴, О.С. Птушенко^{1,4}, К.А. Шибзухова^{1,4}, А.Е. Соловченко^{4,6}, Е.С. Лобакова⁴

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: ptush@belozersky.msu.ru

² Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия

⁵ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

⁶ Псковский государственный университет, 180000 Псков, Россия

Поступила в редакцию 06.10.2022

После доработки 03.11.2022

Принята к публикации 03.11.2022

Во всех группах организмов, осуществляющих оксигенный фотосинтез, существенную роль в защите фотосинтетического аппарата (ФСА) от повреждающего действия избыточного освещения играет нефотохимическое тушение (НФТ) возбуждённых состояний хлорофилла. У зелёных водорослей, а также у ряда других групп водорослей и мохообразных ключевым компонентом механизма НФТ является белок LhcSR, родственный белкам фотосинтетической антенны. У сосудистых растений этот белок отсутствует, а его функции выполняет белок фотосистемы II (ФСII) PsbS, принадлежащий к тому же суперсемейству антенных белков. PsbS также встречается и выполняет защитную функцию по крайней мере у некоторых мохообразных. Долгое время считалось, что в клетках зелёных водорослей PsbS не активен, хотя и присутствует в их геноме. Лишь шесть лет назад появились свидетельства о накоплении PsbS в клетках модельного организма *Chlamydomonas reinhardtii* в ответ на рост интенсивности света. Однако наблюдаемое возрастание содержания PsbS было кратковременным (часы). Мы обнаружили у зелёной водоросли *Lobosphaera incisa* сохраняющийся в течение четырёх суток значительный (более чем на три порядка) рост уровня экспрессии PsbS в ответ на спровоцированный низкой температурой световой стресс, а менее значительное (порядка десятикратного) повышение уровня экспрессии PsbS сохранялось до девяти суток. Тем самым в настоящей работе мы впервые показываем продолжительное возрастание уровня экспрессии PsbS в клетках зелёных водорослей (Chlorophyta) в ответ на стресс. Это может означать, что функция PsbS в ФСА Chlorophyta не сводится к роли «первого эшелона» защиты в переходных состояниях, как предполагали ранее, а включает полноценное участие в долговременной защите ФСА от стрессовых условий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тепловая диссипация энергии света, PsbS, LhcSR, световой стресс, низкотемпературная акклимация, Chlorophyta.

DOI: 10.31857/S0320972522120235, EDN: NJCOKI

ВВЕДЕНИЕ

Для оксигенных фотосинтезирующих организмов избыточное освещение является стресс-

совым фактором, поскольку может инициировать фотоокислительные реакции, приводящие к повреждению организма [1]. Защита фотосинтетического аппарата (ФСА) от избыточного

Принятые сокращения: Кс – ксантофиллы; НФТ – нефотохимическое тушение; ФСII – фотосистема II; ФСА – фотосинтетический аппарат; Хл – хлорофилл; $\Phi_{\text{ФСII}}$ – квантовый выход фотохимической реакции в ФСII.

* Адресат для корреспонденции.

освещения включает в себя ряд механизмов, среди которых одну из ключевых ролей играет так называемое нефотохимическое тушение флуоресценции (НФТ). В ходе этого процесса происходит преобразование в тепло энергии электронного возбуждения молекул хлорофилла (Хл). В результате снижается вероятность реакции возбуждённого Хл с растворённым в среде кислородом и, следовательно, образования активных форм кислорода [2]. При этом также происходит снижение квантового выхода (тушение) флуоресценции Хл, с чем и связано закрепившееся название этого процесса (эпитет «нефотохимическое» означает, что это тушение не связано с фотохимической реакцией в фотосинтетическом реакционном центре).

В наблюдаемом снижении квантового выхода флуоресценции Хл, как правило, отчетливо наблюдаются несколько фаз. Самая быстрая, протекающая в секундном диапазоне времён, определяется образованием ΔpH на тилакоидной мембране и называется энергозависимым (также энергетическим или pH -зависимым) НФТ (qE). Изменения других характеристик системы защиты ФСА приводят к возникновению более медленных фаз индукции НФТ. НФТ обеспечивается взаимодействием нескольких молекулярных компонентов – пигментов ксантофиллов (Кс) [3, 4] и белков, локализованных в тилакоидной мембране и взаимодействующих с ксантофиллами и/или с фотосинтетическими антенными комплексами. Известно два белка, непосредственно обеспечивающих НФТ: LhcSR (Light-Harvesting Complex Stress-Related proteins) [5, 6] и компонент фотосистемы II (ФСII) PsbS [7]. Оба белка относятся к суперсемейству антенных белков. Белок LhcSR имеет пространственную структуру, схожую со структурой минорной антенны ФСII (CP29) или мономеров комплекса ЛНСII (включающую три трансмембранных альфа-спиральных столба), и, подобно им, также связывает молекулы Хл и Кс (7 молекул Хл *a* и одну дополнительную молекулу Хл *a* или *b* и 3 или 4 молекулы Кс, включая лютеин и виолаксантин) [8]. Существуют различные представления о том, каким образом LhcSR или близкие к нему белки ЛНСХ вызывают тушение электронного возбуждения Хл в антенне: за счёт переноса возбуждения с Хл на Кс с последующей быстрой конверсией K_s^* в Кс, за счёт переноса электрона с Кс на Хл или же за счёт образования экситонного сопряжения между молекулами Хл и Кс [9, 10], однако в любом из этих случаев предполагается, что именно LhcSR является центром тушения.

Некоторое время аналогичный механизм тушения предполагался и для PsbS [11, 12]. Однако появившиеся в 2000-х гг. данные о биохимических свойствах PsbS [13], а также по мутагенезу PsbS [14], а затем и данные о трёхмерной структуре этого белка [15] показали, что он не содержит молекул пигментов. В отличие от LhcSR и антенных белков, PsbS имеет дополнительную (четвёртую) трансмембранную спираль и более компактную структуру, которая не оставляет достаточно пространства для связывания Хл и Кс [15]. В связи с этим высказываются различные гипотезы о возможном механизме участия PsbS в тушении возбуждения в антенне, предполагающие его взаимодействие (непосредственное или с участием молекул Кс) с белками внешней и внутренней антенн и переключение самих этих антенн в «тушащее» состояние. Это переключение сопряжено с кластеризацией внешних антенных комплексов ФСII, ЛНСII [16] и, возможно, связано с изменением взаимодействия ЛНСII с их липидным окружением и, как результат, их подвижности в тилакоидной мембране [17].

Однако независимо от молекулярных механизмов, которыми обеспечивается LhcSR- и PsbS-зависимое тушение, полагают, что каждый из этих белков служит детектором pH в тилакоидном люмене и, следовательно, обеспечивает энергозависимый компонент НФТ (qE). А именно: закисление люмена приводит к протонированию экспонированных в люмен аминокислотных остатков и образованию центра тушения в самом белке или же в контактирующих с ним антенных комплексах. Более того, оба белка оказываются аналогами друг друга в эволюционной перспективе. Так, LhcSR (или близкие к нему ЛНСХ-подобные белки) выполняет фотопротекторную функцию у зелёных (включая Chlorophyta и Charophyta), бурых, диатомовых, гаптофитовых и других групп водорослей [18, 19], а также мхов (насколько нам известно, в литературе упоминается лишь главный модельный объект из этой группы – *Physcomitrella patens* [20]). Он исчезает у сосудистых растений, у которых его функции выполняет белок PsbS. У мхов также обнаруживается PsbS, где он работает вместе с LhcSR [20]. Так, для *P. patens* показано, что в стресс-индуцированном НФТ участвуют оба белка, хотя основной вклад в фотозащиту даёт LhcSR [21], особенно при флуктуирующем освещении [22], что связано, скорее всего, не с различием в эффективности LhcSR и PsbS, а с малым содержанием последнего [23]. Для харовых водорослей было показано, что световой стресс вызывает рост экспрессии гена,

кодирующего PsbS. У зелёных водорослей ген, кодирующий PsbS, был обнаружен в геноме, но детектировать белок или обнаружить его дифференциальную экспрессию в каких-либо условиях долгое время не удавалось, из чего делали вывод об отсутствии функциональной активности белка у этой группы фотосинтетических организмов [24, 25]. Позже условия, стимулирующие рост уровня мРНК PsbS в клетке, были найдены для клеток модельной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: азотное голодание [26] и фотопериод (переход от темноты к освещению) [27]. Лишь несколько лет назад сам белок PsbS и стресс-индуцированные изменения его содержания были обнаружены в клетках водоросли *C. reinhardtii* в ответ на значительное повышение освещённости [21, 28] или перенос из темноты на свет [29]. Однако этот ответ был очень кратковременным (порядка нескольких часов, хотя при низкой концентрации CO₂ в среде его удавалось продлить более чем на сутки [28]), в отличие от значительно более пролонгированного влияния стресса на экспрессию LhcSR. На этом основании был сделан вывод о вспомогательной функции PsbS для LhcSR-зависимого тушения [28].

В данной статье мы сообщаем об обнаружении у зелёной водоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047, исследованной нами ранее [30], возрастания уровня экспрессии PsbS в ответ на спровоцированный низкой температурой световой стресс. При этом значительное возрастание (более чем на три порядка) сохранялось в течение четырёх суток после начала стресса, а менее значительное повышение уровня экспрессии PsbS (порядка десятикратного по сравнению с уровнем до начала стресса) сохранялось по крайней мере до 9 суток. Тем самым в настоящей работе мы впервые показываем продолжительное возрастание уровня экспрессии PsbS в клетках зелёных водорослей (Chlorophyta) в ответ на стресс. Это может означать, что функция PsbS в фотосинтетическом аппарате Chlorophyta не сводится к роли «первого эшелона» защиты в переходных состояниях, как предполагали ранее, а включает полноценное участие в защите фотосинтетического аппарата от стрессовых условий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования микроводорослей и отбор проб. Суспензионную культуру зелёной водоросли *L. incisa* IPPAS C-2047 (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) выращивали в фотобио-

реакторе в 0,7-литровой стеклянной колонне (внутренний диаметр 45 мм) при температуре 25–26 °С, постоянном барботировании отфильтрованным атмосферным воздухом (0,4 л/мин) и непрерывном освещении (50 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹) светодиодными панелями, оснащёнными нейтральными белыми светодиодами SMD 2835 («Arlight», Россия). По достижении оптической плотности OD₆₇₈ = 0,4–0,5 производили отбор проб культуры для проведения физиологического и биохимического анализов, затем культуру охлаждали до 0 °С со скоростью 0,4–0,8 °С/мин. Инкубацию при температуре около 0 °С продолжали в течение следующих 9 суток. Для термостатирования культуры использовали охлаждающую циркуляционную баню-термостат, оснащённую контроллером температуры STC-1000 («Elitech», Великобритания) и сопряжённую с культивационной колонной с помощью тонкого (не мешающего освещению культуры) змеевика, погружённого в суспензионную культуру.

В ходе инкубации проводили отбор проб через 16 ч, 2, 4 и 9 суток после охлаждения культуры. Сразу после отбора каждой пробы её подвергали центрифугированию при 0 °С для осаждения клеток; в полученный осадок добавляли нетоксичный водный фиксатор, предназначенный для быстрой стабилизации клеточной РНК – IntactRNA («Евроген», Россия), в количестве 8 : 1 по отношению к объёму осадка. Полученную суспензию перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем 24 ч в холодильнике, после чего повторно центрифугировали и замораживали полученный осадок при –80 °С.

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Выделение суммарной РНК из клеток, синтез одноцепочечной кДНК, подбор праймеров и ПЦР-РВ выполнены в соответствии с протоколом, детально описанным нами ранее [30] (с использованием того же оборудования и реактивов), а также в Приложении к настоящей работе. Последовательности праймеров приведены в таблице. Предсказанные размеры продуктов ПЦР составляли: для кДНК белка PsbS – 146 п.н., LhcSR – 121 п.н., Act – 77 п.н., Ubi – 147 п.н., размеры участка геномной ДНК между праймерами – 400 п.н., 372 п.н., 301 п.н. и 441 п.н. соответственно. Эффективность всех используемых праймеров составляла не менее 80%.

Постановка ПЦР включала 35 циклов с температурным профилем 95 °С (10 с, плавление), 58 °С (15 с, отжиг праймеров), 72 °С (15 с, элонгация) и 81 °С (15 с, измерение репортёрной флуоресценции). Графики амплификации

Последовательности праймеров для целевых (*PsbS*, *LhcSR*) и референсных (*Act*, *Ubi*) генов

Ген	Праймеры	
	прямой	обратный
<i>PsbS</i>	CACCTTCAGCGAGTCCAAC	ACAGCTCGTTCCTTCTGGTG
<i>LhcSR</i>	CTGGTGTTCGCCATCGG	GGTCAAAGCCCAGGTTACC
<i>Act</i>	CCATCTATGAGGGCTATGCG	CATGTAGTCGGTCAGGTCG
<i>Ubi</i>	CTACCTGAACATCAAGTCCCTG	TTTTCCCTTCGCACCTCC

приведены на рис. П.1 Приложения. Специфичность ПЦР была подтверждена с использованием электрофореза продуктов ПЦР, который показал наличие в продуктах лишь предсказанных транскриптов (рис. П2 и П3 Приложения). В качестве референсных генов (эндогенного контроля) были выбраны гены актина (*Act*) и убиквитинлигазы (*Ubi*). Содержание специфических транскриптов рассчитывали относительно полусуммы уровней транскриптов *Act* и *Ubi* в той же культуре до начала низкотемпературной акклимации.

Измерения фотохимической активности фотосинтетического аппарата выполняли непосредственно сразу после отбора проб с помощью импульсно-модулированного хлорофилл-флуориметра Fluor Pen FP 100 («Photon Systems Instruments», Чехия). Суспензию помещали в кварцевую кювету и адаптировали к темноте в течение 10 мин при 0 или 25 °С (для опытных и контрольных образцов соответственно), после чего производили запись световой кривой квантового выхода фотохимической активности ФСII (Φ_{FSII}).

Измерения фотосинтетического выделения кислорода были выполнены с помощью системы измерения уровня респирации и фотосинтеза образцов в жидкой фазе Chlorolab 3 («Hansatech Instruments», Великобритания), использующей электрод Кларка, и термостатируемую 20-мл камеру для суспензии с магнитной мешалкой. Освещение суспензии осуществлялось красным светом (максимум длины волны 660 нм, ширина спектра на полувысоте около 15 нм) с помощью светодиодного светильника.

Статистическая обработка данных. Измерения содержания транскриптов целевых и референсных генов выполнены с трёхкратной биологической повторностью и с трёхкратной аналитической повторностью, измерения фотосинтетического выделения кислорода и фотохимической активности ФСII – с четы-

рёхкратной биологической и трёхкратной аналитической повторностью. Результаты представляют среднее значение (M) \pm стандартное отклонение (SD). Для результатов количественной ПЦР усреднение проводили сначала по аналитическим, затем по биологическим повторностям. SD оценивали по разбросу биологических повторностей, т.к. он существенно превосходил разброс между аналитическими повторностями. Для остальных данных SD оценивали по разбросу всех повторностей. Достоверность отличия изменений уровня экспрессии от единицы оценивали на основе доверительных интервалов для математического ожидания нормальной выборки с уровнем доверия $p = 99\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После охлаждения суспензии до 0 °С мы наблюдали рост экспрессии генов обоих защитных белков ФСА, *PsbS* и *LhcSR*. К моменту первого измерения, через 16 ч после охлаждения, экспрессия достигала наибольшего уровня, наблюдавшегося за всё время низкотемпературной инкубации клеток. В случае белка *PsbS* этот уровень поднимался по сравнению с уровнем до воздействия низкой температуры более чем на три порядка (рис. 1, а). В течение первых двух суток изменение уровня экспрессии было незначительным, а к концу четвёртых суток падало в 3–5 раз. К концу девятых суток инкубации уровень экспрессии снижался уже значительно (в 200–300 раз по сравнению с максимальным уровнем), однако всё ещё оставался примерно в 7–10 раз выше, чем до начала стресса.

В случае белка *LhcSR* изменения были менее значительными. Через 16 ч воздействия низкой температуры уровень экспрессии его гена возрастал приблизительно в 10 раз, после чего медленно снижался: примерно в два раза

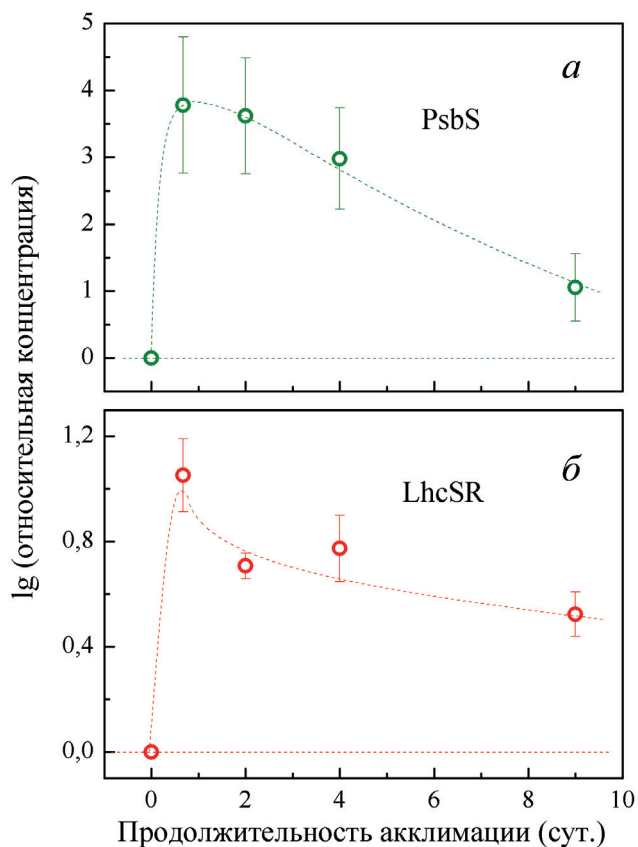


Рис. 1. Кинетика изменений уровня экспрессии генов белков PsbS (а) и LhcSR (б) в клетках *L. incisa* IPPAS С-2047 в результате акклимации к температуре 0 °С (приведён десятичный логарифм относительного изменения уровня транскрипта, RQ). Приведены средние значения \pm SD ($n = 3$). Уровень экспрессии обоих генов в ходе всего времени акклимации клеток к низкой температуре достоверно отличается от их начального уровня экспрессии ($t = 0$ на графике) с уровнем доверия $p = 99\%$

к концу вторых суток и ещё в 1,5–1,8 раза через 9 дней после начала низкотемпературной инкубации (рис. 1, б).

Приведённые данные выявляют совершенно иной характер участия PsbS в ответе на стресс у зелёных водорослей (Chlorophyta), чем это предполагалось ранее. Так, ранее ответ, связанный с дифференциальной экспрессией и накоплением PsbS в клетках другой зелёной водоросли, *C. reinhardtii*, наблюдался лишь в течение короткого времени (порядка нескольких часов) после начала воздействия на клетку стрессовых условий. Так, при переносе культуры *C. reinhardtii* с 45 на 400, 800 или 1200 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$ концентрация мРНК PsbS возрастала в течение менее чем 30 мин, далее спадая практически до нуля в течение 14 ч. При этом динамика изменений концентрации самого белка несколько отставала от мРНК: содержание PsbS возрастало до максимума за 4–8 ч, а через 32 ч белок прак-

тически не детектировался [21]. При периодической смене периодов темноты и освещения (интенсивностью 200 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$), моделирующей суточные колебания освещённости, уровень экспрессии гена PsbS возрастал на время около 1 ч после начала освещения и сохранялся сколь-либо заметным в течение 2–3 ч [29]. Изменения уровня экспрессии гена PsbS в течение суток в естественных условиях были также недавно обнаружены у многоклеточной зелёной водоросли *Ulva prolifera*; наблюдаемые колебания содержания мРНК (приблизительно 10-кратные) были сходными для PsbS и LhcSR как по динамике, так и по величине; вероятно, они отражали суточные колебания освещённости и температуры [31]. Интересно, что у *C. reinhardtii* более плавное (в течение 2 ч) нарастание интенсивности света или снижение её максимальной величины (до 60 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$) приводило к снижению концентрации мРНК, но не к изменению характерного времени её исчезновения после достижения максимума. Содержание самого белка (PsbS) также достигало максимума в течение первого часа и ещё сохранялось сколь-либо заметным через 3 ч после начала освещения. Световой стресс (резкое повышение интенсивности света с 30 до 480 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$) на фоне низкой (ниже атмосферной) концентрации CO_2 позволял продлить присутствие PsbS в клетке до 48 ч, хотя и при концентрациях много меньших, чем в максимуме (6–10 ч), в то время как при атмосферной концентрации CO_2 через 24 ч его уже не удавалось детектировать [28]. У двойного мутанта *prq4lhcsr1*, лишённого обеих форм защитного белка LhcSR, LhcSR1 и LhcSR3, падение концентрации PsbS было ещё более замедленным. Однако о сопутствующих изменениях содержания мРНК в этой работе не сообщается [28].

В связи с этим у PsbS в клетках зелёных водорослей предполагалась лишь вспомогательная [28] фотопротекторная функция в переходные периоды (в начале стресса) [6]. Такой характер индукции синтеза PsbS существенно отличал этот белок от его функционального аналога, белка LhcSR. Для последнего наблюдался значительно более длительный период стресс-индуцированного возрастания экспрессии и практически постоянное [29] или, по крайней мере, значительно более длительное присутствие в повышенных концентрациях в течение действия стрессовых условий [21, 28, 29]. В наших экспериментах мы также отмечали повышенную экспрессию LhcSR в течение всего времени воздействия стрессовых условий. Но при этом

одновременно наблюдали значительно более длительное повышение концентрации мРНК PsbS в ходе индукции стресса, продолжающееся (хотя и со значительным снижением по сравнению с пиковыми значениями) до 9 суток. Однако даже период пиковых значений был растянут в исследованном нами случае на 2–4 суток. По-видимому, это говорит о том, что роль PsbS у зелёных водорослей в ответе их ФСА на стрессовые условия может быть значительно более существенной, чем это ожидалось ранее, и не ограничиваться лишь ролью «первого эшелона» защиты.

При этом стоит заметить, что сама индукция синтеза и накопления PsbS в клетках зелёных водорослей ранее была показана лишь для единственного модельного объекта из этой группы (отдел Chlorophyta), *C. reinhardtii*, поэтому вопрос о распространённости PsbS-зависимого механизма защиты ФСА среди зелёных водорослей до сих пор остаётся неясным. Приводимые здесь данные позволяют думать, что этот механизм не является уникальным для *C. reinhardtii* и может быть достаточно широко распространён среди представителей отдела Chlorophyta.

Полученные нами данные говорят о возрастании уровня экспрессии гена белка PsbS. В то же время для многих белков увеличение экспрессии гена слабо коррелирует с накоплением кодируемого им белка [32]. Однако в случае PsbS *C. reinhardtii* было показано, что содержание белка следует за изменением экспрессии гена [29]. Поэтому можно ожидать, что и у *L. incisa* наблюдаемая нами динамика изменений уровня экспрессии гена белка PsbS отражает характер изменений концентрации белка.

Обнаруженное нами длительное возрастание содержания мРНК, кодирующей белок PsbS, и, как мы предполагаем, также самого белка может быть связано с особенностями физиологии и экологии фотосинтеза исследуемого штамма *L. incisa* IPPAS C-2047. Однако нельзя исключить, что оно обусловлено в первую очередь иным характером стресса, который испытывали клетки водоросли в нашем исследовании по сравнению с обсуждавшимися выше исследованиями на *C. reinhardtii* [21, 28, 29]. PsbS-зависимое нефотохимическое тушение является защитной реакцией ФСА на избыток световой энергии, то есть компонентом светового стресса. В настоящей работе для индукции светового стресса у клеток *L. incisa* мы не использовали непосредственное увеличение интенсивности освещения, как это делается в большинстве работ, исследующих световой стресс у фотосинтезирующих организмов. Вместо этого индуцировали световой стресс понижением температуры на фоне достаточно низкой освещённости (50 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$), которая существенно ниже значений освещённости, насыщающих фотосинтез или вызывающих фотоповреждение у большинства изученных групп зелёных водорослей [33]. Разумеется, мы не можем отождествлять это воздействие на водоросли и их реакцию на него с реакцией на возрастание интенсивности света. Тем не менее мы можем утверждать, что понижение температуры в наших условиях вызывает световой стресс, о чём свидетельствуют наши данные о существенном снижении насыщающей интенсивности света (рис. 2, а). В то время как при нормальной температуре инкубации (25 °C)

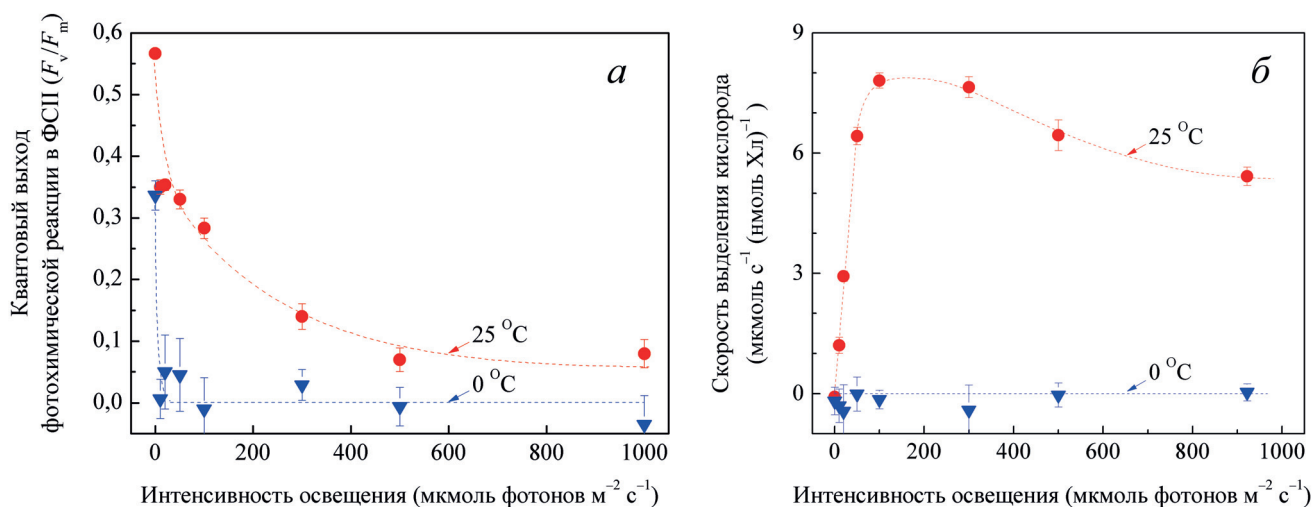


Рис. 2. Зависимость Φ_{PSII} (а) и скорости фотосинтетического выделения кислорода (б) суспензией клеток *L. incisa* IPPAS C-2047, инкубируемой при температуре 25 °C (круги) и 0 °C (треугольники) в течение 4 суток, от интенсивности освещения. Приведены средние значения \pm SD ($n = 4$)

суспензии *L. incisa* снижение Φ_{PSII} в два раза происходит при интенсивности света около $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, у культуры, инкубируемой при 0°C в течение 4 суток, уже свет интенсивности $10 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ вызывает снижение Φ_{PSII} как минимум в 6–8 раз. В результате скорость фотосинтетического выделения кислорода падает практически до нуля во всём диапазоне исследованных значений освещённости (рис. 2, б). К сожалению, точность наших измерений не позволила надёжно установить степень отличия от нуля скорости выделения кислорода в этих условиях и определить точное значение полунасыщающей интенсивности света; можно лишь утверждать, что она ниже $10 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Световой стресс развивается в клетках *L. incisa* достаточно быстро: так, уже в течение нескольких часов после начала охлаждения Φ_{PSII} при той освещённости, при которой инкубируется суспензионная культура ($50 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), падает приблизительно в 3 раза, хотя некоторое падение продолжается и в последующие несколько дней (рис. 3). Таким образом, на фоне холодового стресса мы ранее наблюдали развитие признаков светового стресса, таких как снижение активности ФСII и рост тепловой диссипации энергии поглощённого света в фотосинтетической антенне [30]. Однако при этом не наблюдали изменения общего содержания хлорофилла в клетках, изменения количества антенных комплексов в расчёте на реакционный центр, а также изменения содержания и состава каротиноидов. Отсутствие изменений этих характеристик, которые также являются маркерами светового стресса, мы ранее объяснили относительной «мягкостью» условий, при которых наиболее «экономной» стратегией адаптации, по-видимому, оказывается индукция LhcSR-зависимого НФТ [30]. Теперь мы видим, что, наряду с LhcSR, в индукции НФТ может участвовать и его эволюционно более поздний аналог – белок PsbS. Поскольку на протяжении как минимум 4–5 суток этот ответ остаётся основным [30], то можно предположить, что одновременно возрастает необходимость продления периода повышенной экспрессии белка. Подчеркнём, однако, что наблюдаемый нами долговременный рост содержания транскриптов гена PsbS хотя и является важным указанием на роль этого белка в обеспечении защиты ФСА от избыточного освещения при пониженной температуре, но ещё не служит доказательством этой роли. Чтобы доказать её и оценить вклад PsbS в суммарную фотопротекторную реакцию ФСА, необходимы до-

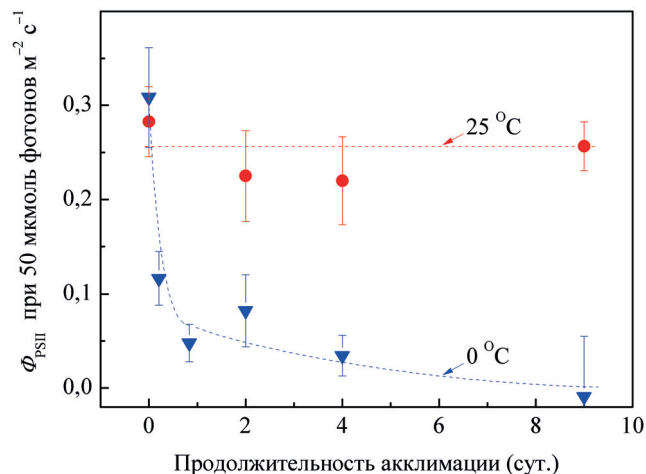


Рис. 3. Кинетика изменений Φ_{PSII} *L. incisa* IPPAS C-2047 при интенсивности освещения $50 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Показаны изменения для суспензии клеток, инкубируемой при температуре 25°C (красные круги) и 0°C (синие треугольники) в течение 9 суток. Приведены средние значения $\pm \text{SD}$ ($n = 4$)

полнительные исследования с привлечением мутантов, лишённых одного или нескольких других фотопротекторных механизмов.

Это предположение позволяет сформулировать следующую гипотезу: экспрессия гена PsbS в клетках зелёных водорослей (или, во всяком случае, в *L. incisa*) будет снижаться в условиях, когда будут активно включаться другие механизмы защиты ФСА от избыточного освещения (в том числе связанные с накоплением и изменением состава каротиноидов, снижением содержания Хл и изменением стехиометрии компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи). Иными словами, мы можем ожидать отрицательную корреляцию между экспрессией PsbS и активностью других защитных механизмов при одном и том же количестве полезной поглощённой световой энергии (потраченной на активацию фотосинтетического транспорта электронов) в расчёте на единицу биомассы водоросли. Проверка данной гипотезы должна стать целью последующих работ в этой области.

Вклад авторов. Проведение экспериментов по ПЦР-РВ – О.К., Е.В., Е.Г., В.П.; получение, ведение культуры микроводорослей и контроль её состояния – К.Ш., Г.Б., А.С., Е.Л.; обработка результатов – О.П., В.П.; концепция и руководство работой, написание текста – В.П.; обсуждение результатов исследования – все авторы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00323).

Благодарности. Спектрофотометрические измерения были выполнены с использованием оборудования ЦКП «Фенотипирование фототрофных организмов» МГУ имени М.В. Ломоносова научной школы МГУ «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Авторы благодарны Р.А. Зиновкину и М.Д. Логачевой за советы и помощь с обеспечением реактивами и оборудованием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Muller, O., and Adams III, W. W. (2012) Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons, *Photosynth. Res.*, **113**, 75-88, doi: 10.1007/s11120-012-9761-6.
- Müller, P., Li, X.-P., and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy, *Plant Physiol.*, **125**, 1558-1566, doi: 10.1104/pp.125.4.1558.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 1-24, doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90088-L](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90088-L).
- García-Plazaola, J. I., Esteban, R., Fernández-Marín, B., Kranner, I., and Porcar-Castell, A. (2012) Thermal energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the Arabidopsis model, *Photosynth. Res.*, **113**, 89-103, doi: 10.1007/s11120-012-9760-7.
- Peers, G., Truong, T. B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., Grossman, A. R., Hippler, M., and Niyogi, K. K. (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis, *Nature*, **462**, 518-521, doi: 10.1038/nature08587.
- Pinnola, A. (2019) The rise and fall of Light-Harvesting Complex Stress-Related proteins as photoprotection agents during evolution, *J. Exp. Bot.*, **70**, 5527-5535, doi: 10.1093/jxb/erz317.
- Li, X.-P., Müller-Moulé, P., Gilmore, A. M., and Niyogi, K. K. (2002) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15222-15227, doi: 10.1073/pnas.232447699.
- Guarnetti Prandi, I., Sláma, V., Pecorilla, C., Cupellini, L., and Mennucci, B. (2022) Structure of the stress-related LHCSR1 complex determined by an integrated computational strategy, *Commun. Biol.*, **5**, 1-10, doi: 10.1038/s42003-022-03083-8.
- Pinnola, A., Staleva-Musto, H., Capaldi, S., Ballottari, M., Bassi, R., and Polívka, T. (2016) Electron transfer between carotenoid and chlorophyll contributes to quenching in the LHCSR1 protein from *Physcomitrella patens*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1870-1878, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.09.001.
- Park, S., Steen, C. J., Lyska, D., Fischer, A. L., Endelman, B., Iwai, M., Niyogi, K. K., and Fleming, G. R. (2019) Chlorophyll-carotenoid excitation energy transfer and charge transfer in *Nannochloropsis oceanica* for the regulation of photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 3385-3390, doi: 10.1073/pnas.1819011116.
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., and Niyogi, K. K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting, *Nature*, **403**, 391-395, doi: 10.1038/35000131.
- Aspinall-O'Dea, M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A. V., and Horton, P. (2002) The PsbS subunit of photosystem II binds zeaxanthin and activates it for non-photochemical fluorescence quenching, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16331-16335, doi: 10.1073/pnas.252500999.
- Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M., and Bassi, R. (2002) Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant, *J. Biol. Chem.*, **277**, 22750-22758, doi: 10.1074/jbc.M200604200.
- Bonente, G., Howes, B. D., Caffarri, S., Smulevich, G., and Bassi, R. (2008) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro, *J. Biol. Chem.*, **283**, 8434-8445, doi: 10.1074/jbc.M708291200.
- Fan, M., Li, M., Liu, Z., Cao, P., Pan, X., Zhang, H., Zhao, X., Zhang, J., and Chang, W. (2015) Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 729-735, doi: 10.1038/nsmb.3068.
- Ruban, A. V., and Wilson, S. (2021) The mechanism of non-photochemical quenching in plants: localization and driving forces, *Plant Cell Physiol.*, **62**, 1063-1072, doi: 10.1093/pcp/pcaa155.
- Daskalakis, V., Papadatos, S., and Kleinekathoefer, U. (2019) Fine tuning of the photosystem II major antenna mobility within the thylakoid membrane of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 183059, doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183059.

18. Niyogi, K. K., and Truong, T. B. (2013) Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **16**, 307-314, doi: 10.1016/j.pbi.2013.03.011.
19. Giovagnetti, V., and Ruban, A. V. (2018) The evolution of the photoprotective antenna proteins in oxygenic photosynthetic eukaryotes, *Biochem. Soc. Trans.*, **46**, 1263-1277, doi: 10.1042/BST20170304.
20. Alboresi, A., Gerotto, C., Giacometti, G. M., Bassi, R., and Morosinotto, T. (2010) Physcomitrella patens mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization, *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA*, **107**, 11128-11133, doi: 10.1073/pnas.1002873107.
21. Tibiletti, T., Auroy, P., Peltier, G., and Caffarri, S. (2016) Chlamydomonas reinhardtii PsbS protein is functional and accumulates rapidly and transiently under high light, *Plant Physiol.*, **171**, 2717-2730, doi: 10.1104/pp.16.00572.
22. Gao, S., Pinnola, A., Zhou, L., Zheng, Z., Li, Z., Bassi, R., and Wang, G. (2022) Light-harvesting complex stress-related proteins play crucial roles in the acclimation of physcomitrella patens under fluctuating light conditions, *Photosynth. Res.*, **151**, 1-10, doi: 10.1007/s11120-021-00874-8.
23. Gerotto, C., Alboresi, A., Giacometti, G. M., Bassi, R., and Morosinotto, T. (2012) Coexistence of plant and algal energy dissipation mechanisms in the moss Physcomitrella patens, *New Phytologist*, **196**, 763-773, doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04345.x.
24. Anwaruzzaman, M., Chin, B. L., Li, X.-P., Lohr, M., Martinez, D. A., and Niyogi, K. K. (2004) Genomic analysis of mutants affecting xanthophyll biosynthesis and regulation of photosynthetic light harvesting in Chlamydomonas reinhardtii, *Photosynth. Res.*, **82**, 265-276, doi: 10.1007/s11120-004-2439-y.
25. Bonente, G., Passarini, F., Cazzaniga, S., Mancone, C., Buia, M. C., Tripodi, M., Bassi, R., and Caffarri, S. (2008) The occurrence of the psbS gene product in Chlamydomonas reinhardtii and in other photosynthetic organisms and its correlation with energy quenching, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1359-1370, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00456.x.
26. Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gärtner, K., Li, X., Moellering, E. R., Zäuner, S., Cornish, A. J., Liu, B., Bullard, B., Sears, B. B., Kuo, M.-H., Hegg, E. L., Shachar-Hill, Y., Shiu, S.-H., and Benning, C. (2010) Changes in transcript abundance in Chlamydomonas reinhardtii following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism, *Plant Physiol.*, **154**, 1737-1752, doi: 10.1104/pp.110.165159.
27. Zones, J. M., Blaby, I. K., Merchant, S. S., and Umen, J. G. (2015) High-resolution profiling of a synchronized diurnal transcriptome from Chlamydomonas reinhardtii reveals continuous cell and metabolic differentiation, *Plant Cell*, **27**, 2743-2769, doi: 10.1105/tpc.15.00498.
28. Correa-Galvis, V., Redekop, P., Guan, K., Griess, A., Truong, T. B., Wakao, S., Niyogi, K. K., and Jahns, P. (2016) Photosystem II subunit PsbS is involved in the induction of LHCSR protein-dependent energy dissipation in Chlamydomonas reinhardtii, *J. Biol. Chem.*, **291**, 17478-17487, doi: 10.1074/jbc.M116.737312.
29. Strenkert, D., Schmollinger, S., Gallaher, S. D., Salomé, P. A., Purvine, S. O., Nicora, C. D., Mettler-Altmann, T., Soubeyrand, E., Weber, A. P. M., Lipton, M. S., Basset, G. J., and Merchant, S. S. (2019) Multiomics resolution of molecular events during a day in the life of Chlamydomonas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2374-2383, doi: 10.1073/pnas.1815238116.
30. Птушенко В. В., Бондаренко Г. Н., Виноградова Е. Н., Глаголева Е. С., Карпова О. В., Птушенко О. С., Соловченко А. Е., Трубицин Б. В., Чивкунова О. Б., Шибзухова К. А., Щербаков П. Н. (2021) Действие низких положительных температур на фотосинтетический аппарат микроводоросли Lobosphaera incisa IPPAS C-2047, *Биохимия*, **86**, 1853-1864, doi: 10.31857/S0320972521120095.
31. Zhao, X., Tang, X., Hu, S., Zhong, Y., Qu, T., and Wang, Y. (2019) Photosynthetic response of floating Ulva prolifera to diurnal changes of in-situ environments on the sea surface, *J. Oceanol. Limnol.*, **37**, 589-599, doi: 10.1007/s00343-019-8081-5.
32. Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples, *FEBS Lett.*, **583**, 3966-3973, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036.
33. Richardson, K., Beardall, J., and Raven, J. A. (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies, *New Phytologist*, **93**, 157-191, doi: 10.1111/j.1469-8137.1983.tb03422.x.

**CHILLING UPREGULATES EXPRESSION OF THE PsbS AND LhcSR GENES
IN THE CHLOROPLASTS OF THE GREEN MICROALGA
Lobosphaera incisa IPPAS C-2047**

V. V. Ptushenko^{1,2*}, G. N. Bondarenko³, E. N. Vinogradova^{4,5}, E. S. Glagoleva^{1,4}, O. V. Karpova⁴,
O. S. Ptushenko^{1,4}, K. A. Shibzukhova^{1,4}, A. E. Solovchenko^{4,6}, and E. S. Lobakova⁴

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

² *Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

³ *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

⁴ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

⁵ *National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow Russia*

⁶ *Pskov State University, 128000 Pskov, Russia*

Non-photochemical quenching (NPQ) of excited chlorophyll states is essential for protecting the photosynthetic apparatus (PSA) from the excessive light-induced damage in all groups of oxygenic photosynthetic organisms. The key component of the NPQ mechanism in green algae and some other groups of algae and mosses is the LhcSR protein of the light harvesting complex (LHC) protein superfamily. In vascular plants, LhcSR is replaced by PsbS, another member of the LHC superfamily and a subunit of photosystem II (PSII). PsbS also performs the photoprotective function in mosses. For a long time, PsbS had been believed to be nonfunctional in green algae, although the corresponding gene was discovered in the genome of these organisms. The first evidence of the PsbS accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in response to the increase in irradiance was obtained only six years ago. However, the observed increase in the PsbS content was short-termed (on an hour-timescale). Here, we report a significant (more than three orders of magnitude) and prolonged (four days) upregulation of PsbS expression in response to the chilling-induced high-light stress followed by a less significant (~ tenfold) increase in the PsbS expression for nine days. This is the first evidence for the long-term upregulation of the PsbS expression in green alga (Chlorophyta) in response to stress. Our data indicate that the role of PsbS in the PSA of Chlorophyta is not limited to the first-line defense against stress, as it was previously assumed, but includes full-scale participation in the photoprotection of PSA from the environmental stress factors.

Keywords: thermal dissipation of light energy, PsbS, LhcSR, high-light stress, chilling acclimation, Chlorophyta