

УДК 577.344

## ДИМЕРЫ ХЛОРОФИЛЛА А В СОСТАВЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО БЕЛКА WoWSCP ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮТ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦИТОХРОМА С

© 2023 г. Ю. Н. Обухов<sup>1,\*</sup>, К. В. Неверов<sup>1</sup>, Ю. В. Малеева<sup>2</sup>, М. С. Крицкий<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН А.Б. Рубиным

Поступило 24.10.2022 г.

После доработки 20.11.2022 г.

Принято к публикации 30.11.2022 г.

При связывании с водорастворимыми белками семейства WSCP молекулы хлорофилла формируют димеры, структурно сходные со “специальной парой” хлорофиллов (бактериохлорофиллов) в фотосинтетических реакционных центрах. Под воздействием красного света ( $\lambda \geq 650$  нм) в бескислородной среде димеры хлорофилла *a* в холобелке WoWSCP (из *Brassica oleracea* var. *botrytis*) сенсibilizировали восстановление цитохрома *c*. Согласно данным спектроскопии (абсорбционной и кругового дихроизма), фотохимический процесс не вызывал существенным образом разрушения молекул хлорофилла *a* и не влиял на структуру их димеров в составе белка WoWSCP. Добавление трис(гидроксиметил)аминометана в качестве донора электронов для ревосстановления хлорофилла стимулировало процесс фотовосстановления цитохрома *c*.

**Ключевые слова:** белки WSCP, димер хлорофилла *a*, цитохром *c*, фотохимия, трис(гидроксиметил)аминометан

**DOI:** 10.31857/S2686738922600790, **EDN:** LZAHVX

Хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP (Water-Soluble Chlorophyll Binding Proteins) обнаружены в высших растениях у представителей порядков *Caryophyllales* (гвоздичноцветные), *Polygonales* (гречихоцветные) и *Brassicales* (капустоцветные) [1, 2]. Эти белки водорастворимы, они локализованы вне хлоропластов и не принимают участия в фотосинтетическом процессе, а их физиологические функции, предположительно, связаны с активностью антистрессовых систем клетки [1–5]. Белки семейства WSCP формируют гомотетрамеры с молекулярной массой 69–80 кДа, а каждый из гомотетрамеров нековалентно связывает до четырех молекул хлорофилла (Хл) [6–8].

Для тетрамерных ансамблей белков класса II семейства WSCP показано, что четыре молекулы Хл организованы в них в виде двух димеров с уг-

лом между плоскостями порфириновых колец пигментов в димере около 30 градусов [6, 7]. Эти димеры Хл в WSCP структурно сходны, хотя и не идентичны, димерам Хл (или бактериохлорофилла), образующим “специальную пару” в реакционных центрах фотосинтетических систем [9]. Именно “специальная пара” (бактерио)хлорофиллов при поглощении квантов света (либо в результате миграции энергии от пигментов антенны) участвует в ключевом этапе преобразования энергии – первичном разделении зарядов, выступая в роли донора электрона, транспорт которого по цепи переносчиков приводит к образованию богатых энергией молекул [9].

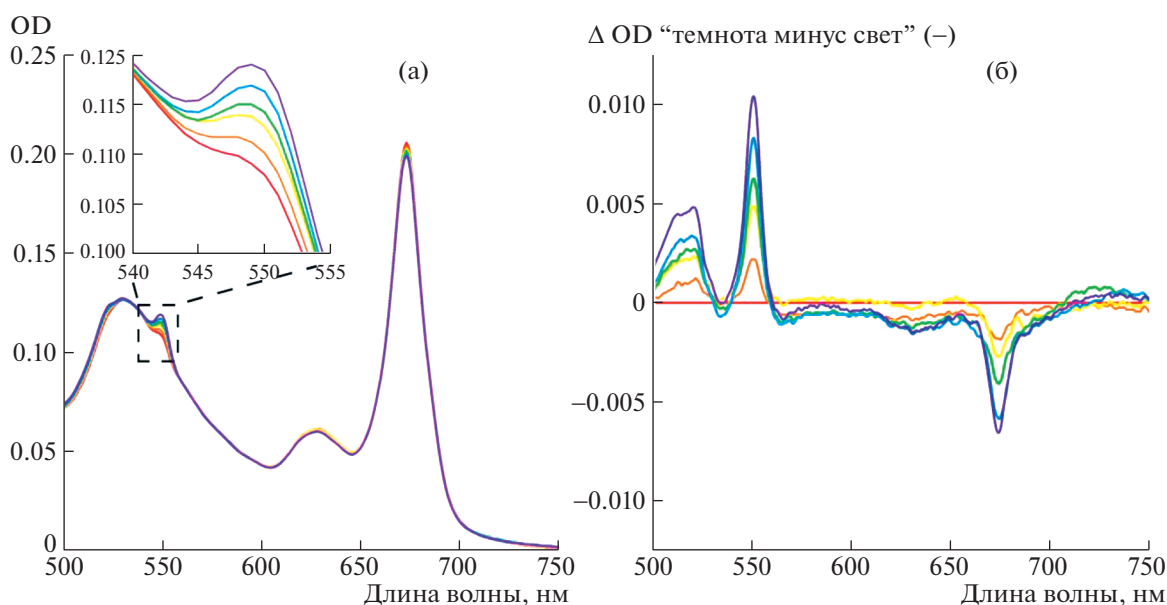
Задача настоящего исследования состояла в выяснении способности димера Хл в составе холобелка WSCP при возбуждении светом сенсibilizировать восстановление акцептора электрона, в качестве которого использовали цитохром *c*. Выявление такой фотохимической активности у Хл в холобелке WSCP важно для углубления физико-химической характеристики белков этой группы и для прояснения их физиологических функций.

В качестве объекта исследования был выбран белок WoWSCP из цветной капусты (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), относящийся к подклассу WSCP ПА, представители которого связывают практи-

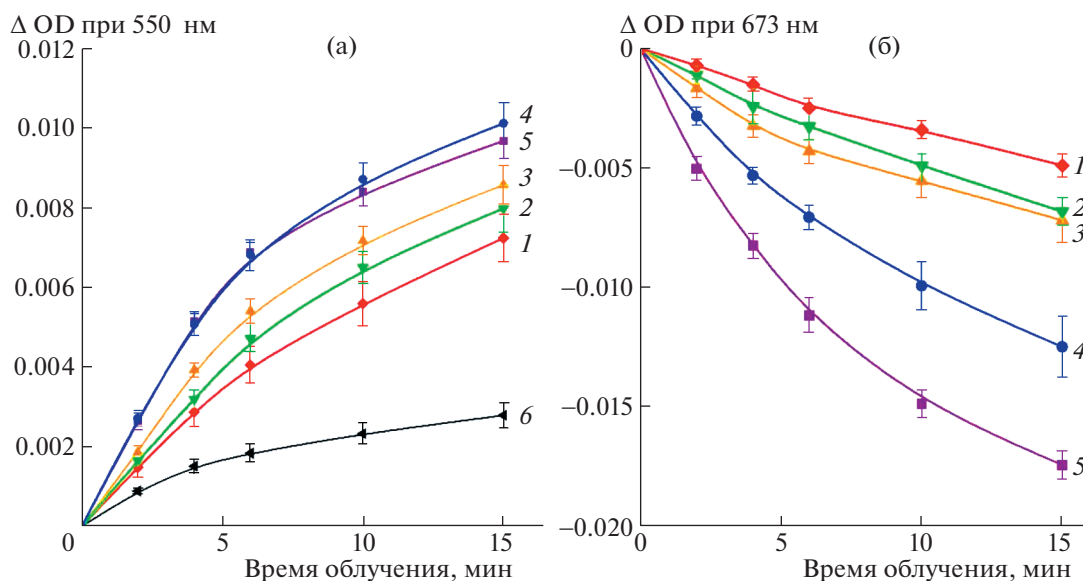
<sup>1</sup> Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: y.u.r.a.o@mail.ru



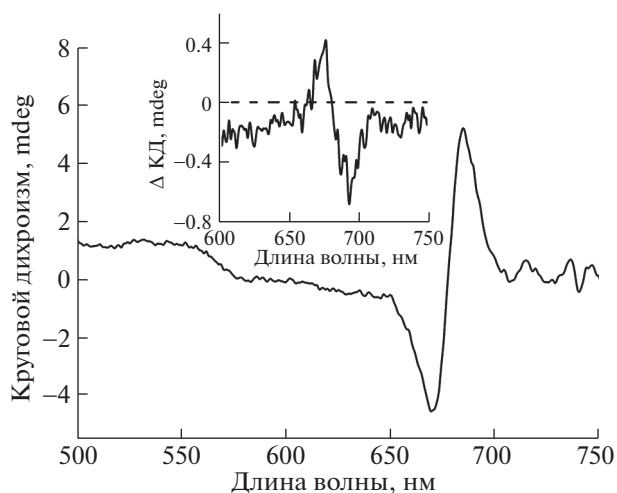
**Рис. 1.** Фотосенсибилизированное холоформой белка VoWSCP восстановление цитохрома *c*. (а) Спектр поглощения смеси VoWSCP ( $OD_{673} = 0.2$ ), 10 мкМ цитохрома *c* и 150 мМ NaCl в 10 мМ Трис-НСl буфере, рН 8.0, до облучения (красная линия) и спустя 2, 4, 6, 10 и 15 мин (фиолетовая линия) инкубации на свету ( $\lambda \geq 650$  нм,  $700 \mu E m^{-2} c^{-1}$ ) в атмосфере аргона. На врезке: Пик поглощения восстановленной формы цитохрома *c* (увеличено). (б) – Разностной спектр “темнота минус свет” (с обратным знаком) из того же опыта. Цветовое обозначение кривых такое же, как на панели А. Значения оптической плотности в пробах, не подвергавшихся облучению, отражены в тексте.



**Рис. 2.** Фотовосстановление цитохрома *c* и фотодеструкция Хл при облучении экспериментальной смеси светом разной интенсивности. Состав смеси и условия эксперимента, как на рис. 1а. (а) – Изменение оптической плотности в пике поглощения цитохрома *c* при 550 нм при облучении светом  $250 \mu E m^{-2} c^{-1}$  (1),  $420 \mu E m^{-2} c^{-1}$  (2),  $700 \mu E m^{-2} c^{-1}$  (3),  $1080 \mu E m^{-2} c^{-1}$  (4),  $1800 \mu E m^{-2} c^{-1}$  (5) и без облучения светом (6). (б) – Изменение поглощения Хл в максимуме 673 нм в пробах при облучении. Интенсивности света – как на панели а.

чески только Хл *a* [1, 5, 10]. Белки родственного подкласса WSCP IIВ способны связывать также и Хл *b*, что делает их более сложными объектами из-за гетерогенного пигментного состава [1, 10,

11]. Белки WSCP филогенетически отдаленного класса I не рассматривались нами в качестве объектов исследования ввиду отсутствия достоверных сведений о димерной упаковке молекул Хл *a*

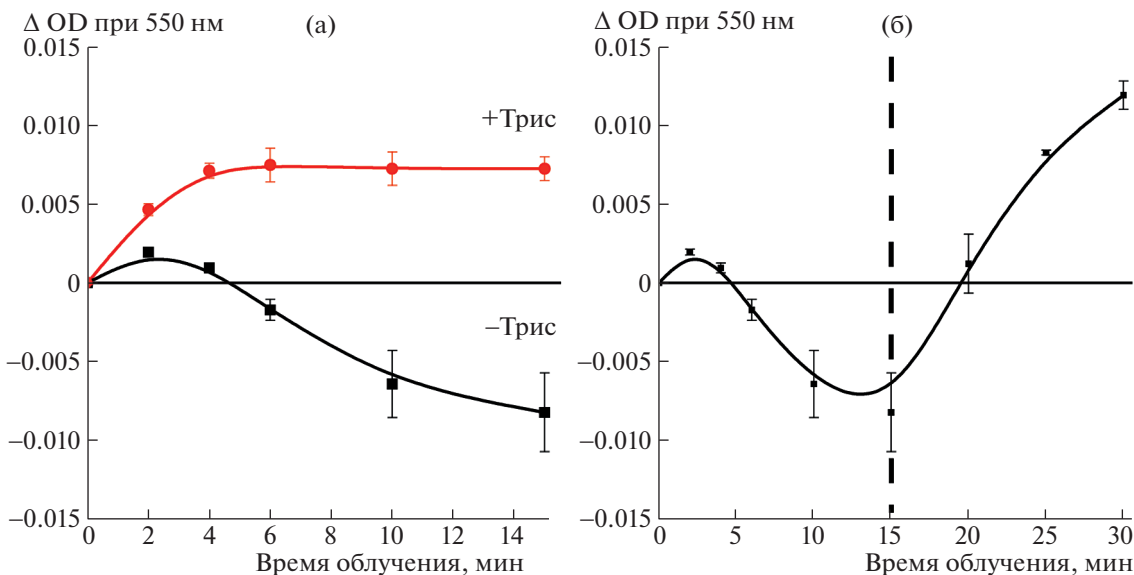


**Рис. 3.** Спектр кругового дихроизма смеси холоформы Хл-ВоWSCP ( $OD_{673} = 0.2$ ), 10 мкМ цитохрома *c* и 150 мМ NaCl в 10 мМ Трис-НСl буфере, рН 8.0, до облучения. На врезке: разностной спектр кругового дихроизма “свет минус темнота” данного образца до и после облучения 15 мин ( $\lambda \geq 650$  нм,  $700 \mu E m^{-2} c^{-1}$ ).

в их составе. Кроме того, наличие у WSCP класса I фотоконверсии (фотоиндуцированного превращения Хл *a* в бактериохлорин-подобные продукты) делает невозможным контроль их пигментного состава [1, 12].

Препараты апобелка WoWSCP получали методом гетерологической экспрессии его структурного гена в штамме *Escherichia coli BL 21 DE3*. Хранение и выращивание клеток *E. coli* с плазмидами, несущими гены целевого белка, а также экспрессию этих генов и выделение препаратов апобелка проводили согласно методикам, представленным в [5, 11] с незначительными модификациями. Самосборку тетрамерных Хл-белковых комплексов (холоформ) проводили в растворе при комнатной температуре, инкубируя апобелки WSCP с препаратами свежeweделенных тилакоидов из листьев шпината. Полученные тетрамерные комплексы, благодаря наличию на С-концах апобелков шести гистидиновых остатков, очищали аффинной хроматографией на Ni-агарозе [5, 11, 13].

Раствор холобелка WoWSCP (концентрация по  $OD_{673 \text{ нм}} = 0.2$ ), содержащий 10 или 30 мкМ цитохрома *c* из сердца лошади (Sigma-Aldrich, США) в 10 мМ Трис-НСl буфере (Serva, Germany), рН 8.0, облучали красным светом (светофильтр КС-15,  $\lambda \geq 650$  нм) при непрерывной продувке аргоном. В качестве источника света использовали галогеновую лампу ( $W = 150$  Вт), имеющую сплошной спектр излучения в видимой и ИК-области. Дальнюю инфракрасную часть спектра отсекали водным фильтром (3 см); свет фокусировали на кювету с реакционной смесью линзой ( $F = 97$  мм). Квантовую интенсивность излучения измеряли радиометром LI-250A (LiCOR, USA) с диапазо-



**Рис. 4.** (а) – Участие трис(гидроксиметил)аминометана (основания Трис-НСl буфера) в фотовосстановлении цитохрома *c* при облучении светом ( $\lambda \geq 650$  нм,  $1800 \mu E m^{-2} c^{-1}$ ) в атмосфере аргона. Состав проб: холобелок WoWSCP ( $OD_{673} = 0.2$ ), 30 мкМ цитохром *c* и 150 мМ NaCl в Na-фосфатном буфере 10 мМ, рН 8.0. Черная линия – без добавления Трис-НСl, красная линия – при добавлении перед началом инкубации Трис-НСl до 10 мМ, рН 8.0. (б) – Облучение пробы в фосфатном буфере (условия как на панели а). После 15-й минуты облучения к пробе добавлен Трис-НСl до 10 мМ, рН 8.0 (момент добавления обозначен пунктирной линией).

ном чувствительности 400–710 нм. С помощью нейтральных светофильтров получали плотность потока квантов на уровне объекта от 250 до 1800  $\mu\text{E м}^{-2} \text{с}^{-1}$ . В пробу добавляли 150 мМ NaCl для предотвращения коагуляции WSCP и цитохрома.

Повышение пика поглощения при 550 нм в процессе облучения указывало на восстановление цитохрома *c* (рис. 1). Без облучения восстановление происходило в несколько раз медленнее: за 15 мин инкубации  $\text{OD}_{550}$  монотонно возрастала до величины, не превышающей 0.003 ед. При отсутствии в пробе BoWSCP фотовосстановления цитохрома *c* не наблюдали. Можно заключить, что возбуждение светом Хл *a* в составе BoWSCP сенсibilizировало восстановление цитохрома *c*. Таким образом, молекулы Хл *a*, организованные в димерные структуры в составе белка из семейства WSCP, подобно Хл “специальной пары” фотосинтетических реакционных центров, сенсibilizировали фотовосстановление акцепторов электрона.

Скорость фотовосстановления цитохрома *c* снижалась при интенсивности света, превышающей 1000  $\mu\text{E м}^{-2} \text{с}^{-1}$  (рис. 2а). Возможно, это свидетельствует о наличии диффузионного ограничения, понижающего эффективность прямого взаимодействия макромолекул цитохрома *c* и WSCP в условиях низкого времени жизни возбужденного состояния Хл, инициирующего фотохимическую реакцию.

Облучение растворов BoWSCP приводило к незначительной деструкции Хл *a* и нарушению димерной организации его молекул. О состоянии этих параметров судили по снижению поглощения в пике при 673 нм, а также уменьшению амплитуды характерного для димерной формы Хл специфического сигнала в спектре кругового дихроизма в области 650–700 нм (рис. 2б и 3).

Облучение в атмосфере аргона данных проб светом с интенсивностью 700  $\mu\text{E м}^{-2} \text{с}^{-1}$  в течение 15 мин вызывало деструкцию Хл и нарушение его димерной структуры не более, чем на 10%, что свидетельствует о сравнительно высокой фотостойчивости тетрамерного холобелка BoWSCP (рис. 2, 3).

Возникает вопрос, за счет какого источника происходило ревосстановление Хл, подвергнутого окислению при фотохимической редокс-реакции с цитохромом *c*? Согласно нашим результатам, таким донором служил трис(гидроксиметил)аминометан, присутствовавший в пробах в качестве основания Трис-НСl буферного раствора. Ранее сообщалось об использовании данного соединения в качестве донора электрона в фотохимических экспериментах [14–16].

В пользу участия трис(гидроксиметил)аминометана в качестве донора электрона свидетель-

ствуют результаты опытов, в которых буферную систему (10 мМ Трис-НСl, рН 8.0) заменяли в пробах на 10 мМ Na-фосфатный буфер, рН 8.0. В первые минуты облучения красным светом ( $\lambda \geq 650$  нм, 1800  $\mu\text{E м}^{-2} \text{с}^{-1}$ ) проб, содержавших холоформы BoWSCP ( $\text{OD}_{673} = 0.2$ ), 30 мкМ цитохром *c* и 150 мМ NaCl в 10 мМ Na-фосфатном буфере, рН 8.0, оптическая плотность при 550 нм сначала незначительно повышалась. Далее происходило ее монотонное снижение, свидетельствовавшее об окислении цитохрома *c*. Причиной могло служить присутствие в коммерческих препаратах цитохрома *c* около 2.5% (по массе) примеси восстановленной формы, которая окислялась следовыми количествами кислорода, сохранившимися в пробах после продувки аргоном. При добавлении в пробы Трис-НСl буфера, рН 8.0, до концентрации 10 мМ перед началом световой инкубации или в ходе облучения, наблюдали прирост пика поглощения при 550 нм, что указывало на фотовосстановление цитохрома *c* (рис. 4).

Из рис. 4а видно, что кривая фотовосстановления цитохрома в присутствии Трис-НСl-буфера после 4 мин облучения выходит на плато. Возможно, это является следствием более эффективного окисления цитохрома *c* в фосфатном буфере, где была использована более высокая концентрация цитохрома *c* – 30 мкМ вместо 10 мкМ (рис. 2).

Можно заключить, что трис(гидроксиметил)аминометан выполнял при фотосенсibilizированном Хл *a* восстановлении цитохрома *c* роль донора электрона, восстанавливающего молекулы Хл, подвергнувшиеся окислению во время редокс-реакции.

Выявление фотохимической редокс активности у димеров Хл в составе холобелка BoWSCP ориентирует на конструирование на этой основе водорастворимых моделей реакционных центров фотосинтетических систем с целью исследования эволюции фотосинтетического аппарата, а также конструирование искусственных конверторов солнечной энергии. Очевидно, что реализация таких моделей и обоснование их плодотворности потребуют серьезного экспериментального исследования молекулярных механизмов пигмент-пигментных и пигмент-белковых взаимодействий в WSCP с использованием спектральных методик с высоким временным разрешением.

## БЛАГОДАРНОСТИ

При проведении измерений использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Авторы признательны Prof. Dr. Harald Paulsen (Institute of Molecular Physiology, The Johannes Gutenberg University Mainz, Germany) за предоставление экспрессионных векторов для трансформации бактериальных штаммов, а также к.б.н. В.В. Никандрову и к.б.н. В.В. Шубину (ФИЦ биотехнологии РАН) за консультации в ходе выполнения и оформления работы.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа с экспрессионными штаммами, выделение и очистка препаратов белков, а также самосборка пигмент-белковых комплексов выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20155).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов нет потенциальных и явных конфликтов интересов, связанных с рукописью.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Satoh H., Uchida A., Nakayama K., Okada M. // *Plant and Cell Physiology*. 2001. V. 42. № 9. P. 906–911.
2. Малеева Ю.В., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Круцкий М.С. // *Молекулярная биология*. 2019. Т. 53. № 6. С. 998–1011.
3. Schmidt K., Fufezan C., Krieger-Liszka A., Satoh H., et al. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. № 24. P. 7427–7433.
4. Damaraju S., Schlude S., Eckhardt U., Lokstein H., et al. // *Journal of Plant Physiology*. 2011. V. 168. № 12. P. 1444–1451.
5. Takahashi S., Yanai H., Nakamaru Y., Uchida A., et al. // *Plant and Cell Physiology*. 2012. V. 53. № 5. P. 879–891.
6. Horigome D., Satoh H., Itoh N., Mitsunaga K., et al. // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. V. 282. № 9. P. 6525–6531.
7. Bednarczyk D., Dym O., Prabakar V., Peleg Y., et al. // *Angewandte Chemie International Edition*. 2016. V. 55. № 24. P. 6901–6905.
8. Takahashi S., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. // *The Protein Journal*. 2014. V. 33. № 4. P. 337–343.
9. Blankenship R.E. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. 2nd ed. In: Ch.7. Reaction centers and electron transfer pathways in oxygenic photosynthetic organisms, pp. 89–109. John Wiley & Sons, Ltd. Oxford, UK, etc. 2014. ISBN 978-1-4051-8976-7
10. Palm D.M., Agostini A., Aversch V., Girr P., et al. // *Nature Plants*. 2018. V. 4. № 11. P. 920–929.
11. Takahashi S., Yanai H., Oka-Takayama Y., Zantama-Sohtome A., et al. // *Planta*. 2013. V. 238. № 6. P. 1065–1080.
12. Hirabayashi H., Amakawa M., Kamimura Y., Shino Y., et al. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2006. V. 183. № 1-2. P. 121–125.
13. Charlton A., Zachariou M. // *Affinity Chromatography*. Humana Press. 2008. P. 137–150. ISBN: 978-1-58829-659-7
14. Diesen V., Jonsson M. // *Journal of Advanced Oxidation Technologies*. 2012. V. 15. № 2. P. 392–398.
15. Nikandrov V.V., Shlyk M.A., Zorin N.A., Gogotov I.N., et al. // *FEBS Letters*. 1988. V. 234. № 1. P. 111–114.
16. Никандров В.В., Надточенко В.А., Семенов А.Ю. и соавторы. Фотобиокатализатор для получения восстановленных форм никотинамидных кофакторов NADH или NADPH и фотокаталитический способ получения NADH или NADPH. // Патент RU(11) 2416644. Срок действия с 17.11.2009.

## CHLOROPHYLL A DIMERS HARBORED BY WATER-SOLUBLE PROTEIN BoWSCP PHOTOSENSITIZE REDUCTION OF CYTOCHROME C

Yu. N. Obukhov<sup>a,#</sup>, K. V. Neverov<sup>a</sup>, Yu. V. Maleeva<sup>b</sup>, and M. S. Kritsky<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: y.u.r.a.o@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS A.B. Rubin

When bound to water-soluble proteins of the WSCP family, chlorophyll molecules form dimers structurally similar to “special pair” of chlorophylls (bacteriochlorophylls) in photosynthetic reaction centers. Being exposed to red light ( $\lambda \geq 650$  nm) in oxygen-free solutions, chlorophyll *a* dimers harbored by BoWSCP holoproteins (from *Brassica oleracea* var. *botrytis*) have sensitized the reduction of cytochrome *c*. According to absorption and circular dichroism spectroscopy data, the photochemical process did not significantly impair the structure of chlorophyll *a* molecules as well as their dimers harbored by BoWSCP protein. Adding tris(hydroxymethyl)aminomethane as an electron donor for chlorophyll recovery stimulated the photoreduction of cytochrome *c*.

**Keywords:** WSCP proteins, chlorophyll *a* dimer, cytochrome *c*, photochemistry, tris(hydroxymethyl)aminomethane