

УДК 581.132

ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМЫХ БЕЛКОВ, ЗАЩИЩАЮЩИХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ ОТ ФОТОДЕСТРУКЦИИ

© 2019 г. Л. С. Шарапова¹, Д. В. Акуликина¹, Ю. В. Большевцева¹,
И. В. Еланская², **, Н. П. Юрина¹, *

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Москва, 119991, Россия

*e-mail: nyurina@inbi.ras.ru

**e-mail: ivelanskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2018 г.

После доработки 06.07.2018 г.

Подписано в печать 25.07.2018 г.

Изучали ассоциацию низкомолекулярных светоиндуцируемых стрессовых белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. С помощью двумерного электрофореза в ПААГ, масс-спектрометрии и вестерн блоттинга показано, что белки HliA/HliB ассоциированы с мономерами и тримерами фотосистемы I и комплексом фотосистемы II, что предполагает их универсальную роль в защите фотосинтетического аппарата от избыточного света. Для изучения функций белков Hli и их влияния на фотохимическую активность фотосистемы I сравнивали клетки, не содержащие HliA/HliB, с клетками цианобактерий, у которых эти белки были идентифицированы. Показано, что фотохимическая активность пигмент-белковых комплексов фотосистемы I по поглощению кислорода с метилвиологеном в отсутствие стрессовых белков HliA/HliB в 3–4 раза ниже, чем в присутствии Hli белков. Высказано предположение, что белки Hli важны для реакции поглощения кислорода в фотосистеме I с искусственным донором и акцептором, что указывало на их роль в поддержании ее оптимальной активности.

Ключевые слова: фотосистема I, световой стресс, светоиндуцируемые стрессовые белки

DOI: 10.1134/S055510991901015X

В процессе фотосинтеза при оптимальной интенсивности света энергия поглощенных квантов практически полностью преобразуется в энергию химических связей. При избыточном освещении световая энергия может расходоваться на переход молекул хлорофиллов из основного синглетного состояния в триплетное. Триплетно-возбужденные молекулы хлорофилла способны передавать энергию на O₂, в результате чего образуется синглетный кислород и его производные, которые являются сильными окислителями и вызывают деструкцию фотосинтетического аппарата [1–3]. Таким образом, избыточное освещение может вызывать окислительный стресс у фотосинтетических организмов. Чтобы минимизировать образование активных форм кислорода они выработали несколько способов защиты своего фотосинтетического аппарата, из которых наиболее быстрым является нефотохимическое тушение флуоресцен-

ции [1, 3]. Более медленный механизм защиты включает синтез светоиндуцируемых низкомолекулярных тилакоидных белков, содержащих одну трансмембранную спираль (Ope-helix proteins). Эти консервативные белки обнаружены у всех изученных фотосинтезирующих эукариот (окисленных фототрофов) [4, 5]. Показано, что они играют существенную роль в сборке и стабилизации фотосинтетических пигмент-белковых комплексов тилакоидных мембран и, особенно, в реакционных центрах [6].

Цианобактерии относятся к прекрасным модельным организмам для изучения процессов фотосинтеза. У цианобактерий, считающихся эволюционными предшественниками хлоропластов, эти белки называются high light-inducible proteins (Hlips) или small Cab-like proteins (SCP) [5]. У *Synechocystis* sp. PCC 6803 (в дальнейшем *Synechocystis*) идентифицированы пять белков Hli, четыре из

которых представляют собой низкомолекулярные белки HliA/HliB, HliC/HliD, а пятый – С-концевой фрагмент феррохелатазы [7–10]. Hli-белки содержат одну трансмембранную спираль, последовательность которой обладает высокой степенью гомологии с последовательностями первой и третьей трансмембранными областями белка светособирающего комплекса высших растений [7]. HliA-D являются низкомолекулярными белками (6–10 кДа), которые могут связывать хлорофилл и каротиноиды. Предполагают, что Hli-белки цианобактерий участвуют в нефотохимической диссипации избыточно поглощенной световой энергии [11] и в регуляции биосинтеза хлорофилла [15, 16], а также выполняют функции переносчиков молекула хлорофилла при сборке/репарации фотосистемы II (ФСII) [12–14]. Hli-белки, по-видимому, могут быть вспомогательным фактором интеграции хлорофилла с хлорофилл-связывающими белками [4, 17, 18]. Таким образом, низкомолекулярные светоиндуцируемые белки играют важную роль в защите фотосинтетического аппарата от фотодеструкции, и рассматриваются как одна из важных защитных систем клетки. Однако основная функция Hli-белков и их локализация в хлорофилл-белковых комплексах тилакоидных мембран до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Изучение их участия в защите фотосинтетического аппарата от светового стресса при ассоциации с хлорофилл-белковыми комплексами фотосистем представляет большой интерес.

Цель работы – выявить ассоциацию HliA/HliB-белков с хлорофилл-белковыми комплексами клеток *Synechocystis* sp. дикого типа и мутанта, лишённого ФСII и изучить их влияние на фотохимическую активность ФСI.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Объектом исследования служили клетки дикого типа цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 и мутанта ΔФСII (Δ*psbDI*/Δ*psbC*/Δ*psbDII*), лишённого этой фотосистемы [19]. Цианобактерии выращивали в жидкой среде BG-11 при 30°C в условиях постоянного освещения флуоресцентными лампами дневного света и аэрации с помощью магнитной мешалки до середины логарифмической фазы роста. Клетки дикого типа выращивали при умеренной интенсивности света (40 мкмоль фотонов/м² · с), а клетки мутанта без ФСII – при низкой интенсивности света (5 мкмоль фотонов/м² · с) с добавлением 5 мМ глюкозы и антибиотиков хлорамфеникола и спектиномицина 20 мкг/мл. Для создания условий светового стресса клетки дикого типа и

мутантов без ФСII, выращенные в указанных выше условиях, освещали в течение 1 ч светом высокой интенсивности (150 мкмоль фотонов/м² · с). Меньшая интенсивность освещения использовалась для предотвращения фотодеструкции и гибели клеток, особенно в случае мутанта без ФСII. При сравнительном изучении клеток дикого типа и мутанта без ФСII клетки дикого типа были предварительно адаптированы к условиям выращивания мутанта.

Выделение тилакоидных мембран и фракционирование хлорофилл-белковых комплексов. Выделение тилакоидных мембран проводили по методу, описанному в работе [20]. Для экстракции нативных комплексов фотосистем из тилакоидной мембраны использовали мягкий неионный детергент n-додецил-β-D-мальтозид (β-DM), который добавляли в соотношении детергент: хлорофилл 15 : 1. После инкубации в течение 30 мин при 4°C лизат центрифугировали при 18 000 г в течение 10 мин.

Определение содержания хлорофилла и активности комплекса фотосистемы I в тилакоидных мембранах. Содержание хлорофилла в определяли в этаноловом экстракте [21]. Активность комплекса фотосистемы I (ФСI) определяли по способности к фотоокислению P700 (первичного донора электрона реакционного центра ФСI) при освещении действующим светом при 730 нм как фотоиндуцированное изменение поглощения при 810 нм (против 870 нм). Измерения проводили с помощью флуориметра DUAL-PAM-101 с приставкой ED-P700 DW-101 (“Walz, Effelrich”, Германия) [22].

Определение фотохимической активности комплекса ФСI по поглощению O₂ в системе искусственных донора и акцептора с помощью электрода Кларка. Фотохимическую активность ФСI оценивали по поглощению кислорода тилакоидными мембранами в результате транспорта электрона от донорной пары 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ)/аскорбат натрия) через ФСI к метилвиологену (МВ), который после фотовосстановления окислялся кислородом воздуха. Для измерений использовали тилакоидные мембраны, выделенные из клеток дикого типа и мутанта без ФСII, выращенные при низком освещении (5 мкмоль фотонов/м² · с). Клетки мутанта без ФСII подвергали световому стрессу (150 мкмоль фотонов/м² · с) в течение 1 ч. Тилакоидные мембраны суспендировали в 50 мМ трициновом буфере, pH 8.3, содержащем 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ KCN, 40 мкМ ДХФИФ, 2 мМ аскорбиновой кислоты и 0.5 мкМ 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевину (диурон), и измеря-

ли скорость фотохимического восстановления O_2 в присутствии или без МВ (100 мкМ). Ингибитор ФСП — диурон был необходим для того, чтобы подавить ее активность в условиях искусственной донорно-акцепторной системы. В ячейку вносили такое количество тилакоидных мембран, чтобы концентрация хлорофилла составила 20 мкг/мл, а затем освещали белым светом 800 мкмоль фотонов/м² · с. Скорость электронного транспорта выражали в мкмоль O_2 /мг хлорофилла ч.

Фракционирование пигмент-белковых и белковых комплексов тилакоидных мембран. Фракционирование проводили с помощью нативного неокрашенного электрофореза в ПААГ (Clear Native PAGE; CN-PAGE). К лизату тилакоидных мембран *Synechocystis* sp. добавляли в соотношении лизат : буфер 9 : 1 200 мМ бистрис буфера, рН 7.0, содержащего 75%-ную сахарозу и 1 М 6-аминокапроновую кислоту. Использовали градиентный ПААГ от 4 до 12%. Электрофорез в первом направлении проводили в течение 4–5 ч на приборе (“Hoefler”, США) при напряжении 200 В. После окончания электрофореза полосы фотографировали, затем 1 полосу использовали для электрофореза во втором направлении по методу Леммли с Na-ДДС. Электрофорез белков проводили в 12.5%-ном ПААГ в течение 2 ч в трис-глициновом буфере, рН 7.5, содержащем 25 мМ трис, 250 мМ глицина и 0.1%-ный ДДС-Na, при постоянной силе тока 120 мА.

Вестерн-блоттинг. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в камере для блоттинга в буфере для переноса (25 мМ трис, 250 мМ глицин, 20%-ный этанол и 0.02%-ный Na-ДДС, рН 7.5) в течение 1 ч при 200 мА. Затем мембрану с перенесенными белками помещали на 1 ч при 4°C в (блокирующий) 50 мМ трис/HCl буфер, рН 7.5, содержащий 200 мМ NaCl, 0.1%-ный твин 20 (TBST) и 5%-ное сухое обезжиренное молоко, и затем добавляли первичные поликлональные антитела кролика к HliA/HliB (1 : 4000) (“Abscam”, США). Мембрану инкубировали с антителами при постоянном перемешивании в течение ночи при 4°C. В качестве вторичных антител использовали антикроличий IgG козла, конъюгированный с пероксидазой хрена (1 : 10000) (“AgriSera”, Швеция). Каждый этап сопровождали многократным промыванием мембран буфером TBST. Иммунные комплексы на мембране выявляли с помощью флуоресцентной системы детекции ECL (“GE Healthcare”, Великобритания), сигналы регистрировали на рентгеновскую пленку (“Retina”, Германия). Пленку сканировали, данные обрабатывали с помощью программы Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Идентификация белков с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. Триптический гидролиз белка проводили в полиакриламидном геле, окрашенном Кумасси бриллиантовым голубым. Для удаления красителя кусок геля размером 3–4 мм³ дважды промывали 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 М NH_4HCO_3 в течение 20 мин при 37°C. Затем для дегидратации геля добавляли 100 мкл ацетонитрила, который удаляли и высушивали кусок геля. К высушенному гелю добавляли 3.5 мкл раствора (15 мкг/мл) модифицированного трипсина (“Promega”, США) в 0.05 М NH_4HCO_3 . Гидролиз проводили в течение 3 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 5.25 мкл 0.5%-ной трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 50%-ном водном растворе ацетонитрила и тщательно перемешивали. Гидролизат подвергали MALDI-масс-спектрометрии. Для масс-спектрометрии на мишени смешивали 1.5 мкл гидролизата и 0.5 мкл раствора (10 мг/мл) 2,5-диоксибензойной кислоты (“Aldrich”, США) в 20%-ном водном ацетонитриле, содержащем 0.5%-ную ТФУ. Полученную смесь высушивали на воздухе. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3,3 (“Bruker Daltonics”, Германия). Оборудование и программное обеспечение для масс-спектрометрии использовали на базе Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран. Для изучения локализации Hli белков анализировали хлорофилл-белковые и белковые комплексы в лизатах тилакоидных мембран с помощью двумерного электрофореза (2D). В первом направлении комплексы фракционировали в нативном ПААГ (рис. 1а), а во втором — денатурирующем с ДДС-Na (рис. 1б). После фракционирования во втором направлении и окрашивания белков использовали масс спектрометрию для идентификации окрашенных белковых компонентов.

На основании идентификации белков (на рис. 1 отмечены цифрами) были выявлены хлорофилл-белковые и белковые комплексы, обозначенные на рис. 1. Как показано на рис. 1а, 1б, после фракционирования лизата тилакоидных мембран клеточек дикого типа в нативных условиях удалось обнаружить и идентифицировать тримеры и мономеры комплекса ФС1, димеры и мономеры комплекса ФС2, цитохромный комплекс, АТФ-азный ком-

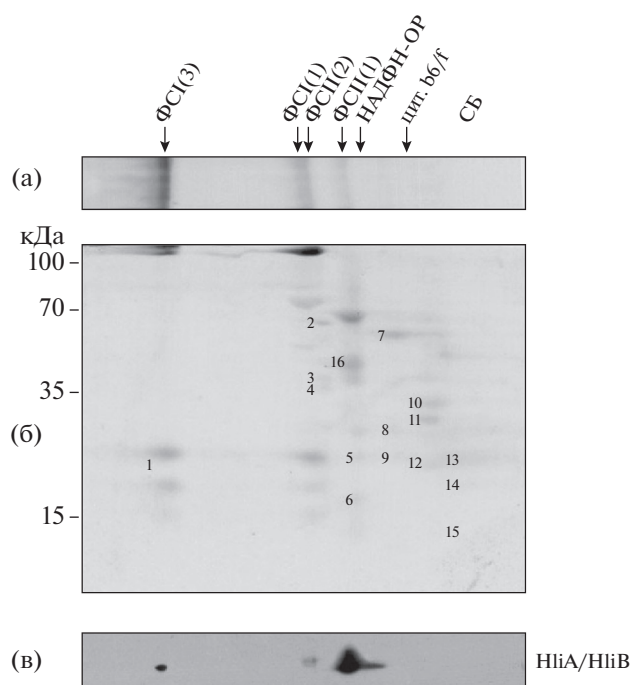


Рис. 1. Двумерная электрофограмма хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран клеток дикого типа *Synechocystis* sp. б – 1–16 – белковые компоненты, идентифицированные масс-спектрометрией MALDI-TOF, а – электрофограмма белковых компонентов в ПААГ в нативных условиях: ФСІ(3) – тример комплекса ФСІ; ФСІ(1) – мономер комплекса ФСІ, ФСІ(2) – димер комплекса ФСІ, ФСІ(1) – мономер комплекса ФСІ, НАДФН-ОР – НАДФН- оксидоредуктаза, цит. b₆/f – цитохром b₆/f и СБ – свободные белки; в – вестерн-блот-анализ белков HliA/HliB после действия светового стресса.

плекс и комплекс НАДФН-оксидоредуктазы, а также зону свободных белков, отделившихся от комплексов в процессе выделения и фракционирования. Сходное распределение хлорофилл-белковых комплексов было установлено для *Synechocystis* [12].

С помощью иммуноблоттинга были идентифицированы белки HliA/HliB в хлорофилл-белковых комплексах (рис. 1в). Установлено, что они ассоциированы с тримерами ФСІ, комплексами ФСІІ и мономерами ФСІ, причем их большая часть связана с комплексом ФСІІ. Иногда белки HliA/HliB обнаруживались также в зоне свободных белков.

Ранее были получены однозначные данные об ассоциации HliA/HliB с комплексом ФСІІ. Так, белок HliA был обнаружен в мономерах и димерах комплекса ФСІІ и ассоциирован непосредственно с субъединицей CP47 [23]. Предполагают, что белки HliA/HliB участвуют в стабилизации хлорофилла для его повторного использования при репа-

рации поврежденного комплекса ФСІІ и биогенезе вновь синтезированных комплексов [23–26].

Относительно локализации HliA/HliB в ФСІ были получены разноречивые данные. Так, было показано, что эти белки не связаны с ФСІ *Synechocystis* [24]. Было обнаружено, что они ассоциированы как с тримерами, так и с мономерами ФСІ клеток дикого типа, выращенных в нормальных условиях и подвергнутых световому стрессу. Полученные в данной работе результаты согласовывались с ранее опубликованными данными о наличии белков Hli в тримерах ФСІ клеток дикого типа в стрессовых условиях [18, 27]. В работе [18] белки Hli не были обнаружены во фракции, содержащей мономеры ФСІ и комплекс ФСІІ, что, возможно, обусловлено их фотодеструкцией при использовании сильного светового стресса (освещение 200–400 мкмоль фотонов/м² · с в течение 12 ч). Предполагают, что Hli белки взаимодействуют с ФСІ в процессе переноса молекул хлорофилла от тримера ФСІ к комплексу ФСІІ. Действительно, показано, что тримеры ФСІ *Synechocystis* акцептируют большую часть вновь синтезированных молекул хлорофилла, которые затем распределяются между другими хлорофилл-связывающими белками [28]. Таким образом, в данной работе обнаружена ассоциация белков HliA/HliB с тримерами и мономером комплекса ФСІ.

Для подтверждения обнаруженной ассоциации HliA/HliB с ФСІ был использован мутант ΔФСІІ, не содержащий ФСІІ, который позволил бы исключить возможность связывания белков Hli с ФСІІ, также связывающей эти белки. У мутанта ΔФСІІ были выявлены все комплексы, содержащиеся в тилакоидных мембранах клеток дикого типа, за исключением комплекса ФСІІ (рис. 2). С помощью иммуноблоттинга удалось установить, что белки HliA/HliB ассоциированы только с мономерами ФСІ. Отмечен также сигнал в области тримеров ФСІ. Таким образом, с помощью мутанта ΔФСІІ *Synechocystis* sp. показана ассоциация белков HliA/HliB с мономерами ФСІ в клетках цианобактерий. Эти результаты согласовывались с полученными в работе, проведенной на клетках высших растений, в которой было показано, что эволюционный гомолог Hlip – односпиральный белок Ohr *Arabidopsis thaliana* также связан с мономером ФСІ [29].

Разноречивость данных литературы может быть обусловлена тем, что время обновления белков ФСІ существенно превышало это время у ФСІІ. Вследствие этого содержание светоиндуцированных стрессовых белков HliA/HliB, участвующих в реутилизации хлорофилла и ассоциированных с ФСІ, оказывалось ниже, чем в ФСІІ.

Можно также предположить, что их содержание ниже чувствительности методов, используемых в работах. Отличия могут быть вызваны и различными условиями культивирования клеток. Связь белков Hli с мономерами и тримерами ФСІ не кажется удивительной, поскольку они, по-видимому, могут выполнять функции запасания и сохранения хлорофилла, а также переносить хлорофилл при нарушениях ФСІ и синтезе новообразованных комплексов ФСІ, как это предполагается для ФСII. Можно также предположить, что белки Hli участвуют в системе координированной доставки пигментов и вновь синтезированных апобелков при биогенезе фотосинтетических комплексов ФСІ и ФСII, уменьшая риск накопления фототоксичных свободных молекул хлорофиллов.

Мутанты без ФСII могут расти только в фотогетеротрофных условиях (5 мкмоль фотонов/м² · с в присутствии глюкозы). В связи с этим необходимо было проверить влияние гетеротрофного питания на световую индукцию и ассоциацию белков HliA/HliB с пигмент-белковыми комплексами клеток дикого типа. Для этого клетки дикого типа были выращены в тех же условиях, что и мутант ΔФСII. Однако белки HliA/HliB не удалось в них обнаружить при выращивании в фотогетеротрофных условиях (рис. 3б, 1). Не исключено, что их содержание ниже порога определения. Однако после действия светового стресса белки HliA/HliB удалось идентифицировать в клетках дикого типа [20]. По-видимому, гены этих белков в клетках экспрессируются только под действием светового стресса [5]. Таким образом, фотогетеротрофные условия выращивания не влияли на ассоциацию белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами. Сходные с приведенными результатами данные о присутствии белков HliA/HliB в клетках, выращенных при низкой интенсивности света, были получены в работе [24].

Как показано на рис. 3, у мутанта ΔФСII белки HliA/HliB экспрессировались даже при низком освещении (5 мкмоль фотонов/м² · с), что отличало их от клеток дикого типа, у которых в этих условиях белки HliA/HliB не обнаруживались. Полученные данные свидетельствовали о том, что мутант в большей степени подвержен световому стрессу, и экспрессия стрессовых белков HliA/HliB у него индуцировалась даже в условиях низкой освещенности. Предполагают также, что у мутантов, лишенных фотосистем, эти белки синтезируются конститутивно [7].

Фотохимическая активность ФСІ в клетках дикого типа и мутанта, лишенного ФСII, различающихся по содержанию белков HliA/HliB. Для оценки влияния мембранных белков HliA/HliB на фо-

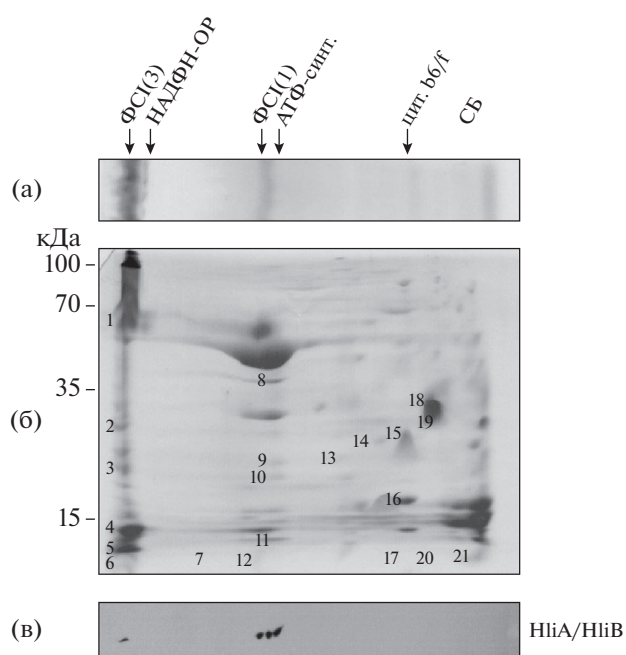


Рис. 2. Двумерная электрофореграмма белковых комплексов тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis* sp. ΔФСII. б – 1–21 – белковые компоненты, идентифицированные масс-спектрометрией MALDI-TOF; а – электрофореграмма компонентов хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран в ПААГ в нативных условиях : ФСІ(3) – тример комплекса ФСІ, ФСІ(1) – мономер ФСІ, АТФсинт – АТФ-синтаза, НАДФН-ОР – НАДФН – оксидоредуктаза, цит. b₆/f – цитохром b₆/f и СБ – свободные белки; в – вестерн-блот-анализ белков HliA/HliB после действия светового стресса.

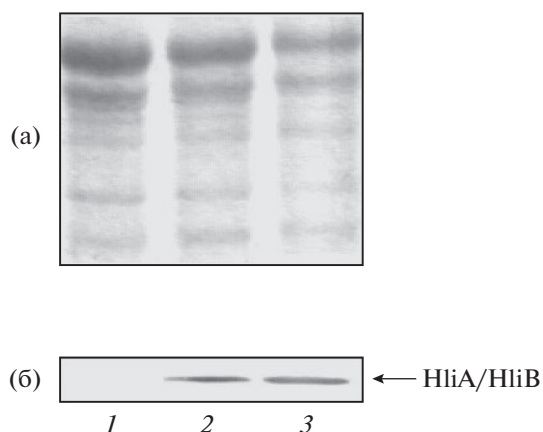


Рис. 3. Электрофореграмма (а) белков тилакоидных мембран клеток дикого типа (1) и мутанта *Synechocystis* sp. до (2) и после светового стресса (3, 150 мкмоль/м² с) в ПААГ с ДДС-На после окрашивания Кумасси R-250; вестерн-блот-анализ (б) белковых комплексов тилакоидных мембран клеток дикого типа (1) и мутанта (2), выращенных в фотогетеротрофных условиях, после действия светового стресса в течение 1 ч (3).

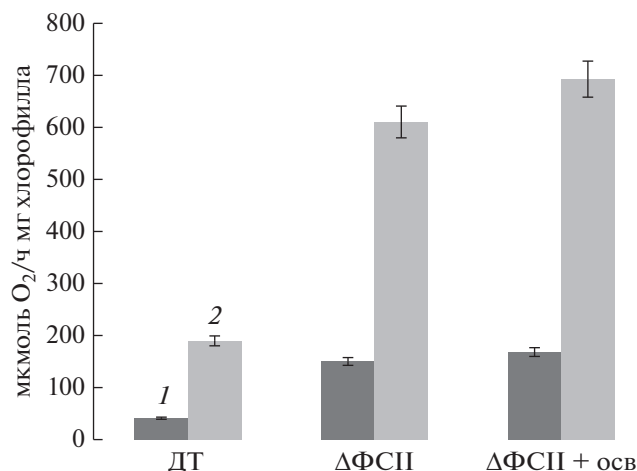


Рис. 4. Фотохимическая активность ФСII (мкмоль O_2 /ч · мг хлорофилла) тилакоидных мембран клеток *Synechocystis* sp. дикого типа (ДТ) и мутанта ΔФСII в отсутствие (1) и в присутствии (2) метилвиологена.

ΔФСII + осв — клетки ΔФСII дополнительно освещенные светом высокой интенсивности ($150 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$ в течение 1 ч.)

тохимическую активность ФСII изучали скорость электронного транспорта через ФСII в мембранах клеток дикого типа и мутанта ΔФСII. Фотохимическую активность ФСII сравнивали в тилакоидных мембранах клеток дикого типа, у которых не идентифицированы белки HliA/HliB, с помощью вестерн-блот анализа, и мутанта, лишённого ФСII, но содержащего их (рис. 3). Клетки дикого типа и мутанта выращивали при низкой освещенности в присутствии глюкозы.

При измерении МВ-зависимого поглощения кислорода скорость электронного транспорта через ФСII в клетках мутанта ΔФСII оказалась значительно выше, чем в клетках дикого типа, выращенных в одинаковых условиях (рис. 4). Фотохимическая активность комплекса ФСII в мембранах мутанта ΔФСII, содержащих белки HliA/HliB, была выше в 3–4 раза, чем в мембранах клеток дикого типа, не содержащих белки HliA/HliB.

Было проведено сравнение активности ФСII в тилакоидных мембранах мутанта ΔФСII, выросшего при низкой освещенности, и в мембранах того же мутанта после действия светового стресса (освещение $150 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$, в течение 1 ч). Оказалось, что в условиях светового стресса содержание белков HliA/HliB у мутанта ΔФСII возрастало на ~20% (рис. 3б, 3). Обнаружено также, что у мутанта ΔФСII, выросшего при низкой освещенности, скорость электронного транспорта увеличивалась на 15–17% после светового стресса (рис. 4), что коррелировало с увеличением содержания белков HliA/HliB в этих условиях

(рис. 3б, 3). Эта корреляция свидетельствовала в пользу предположения о необходимости белков Hli для оптимальной фотохимической активности ФСII. Результаты по низкой скорости фотохимического поглощения кислорода ФСII в мембранах клеток дикого типа, практически их не содержащих (рис. 3б, 1), согласовывались с опубликованными ранее данными по низкой скорости электронного транспорта через ФСII в тилакоидных мембранах мутантов *Synechocystis* sp., лишённых белков Hli [18]. Высокая фотохимическая активность ФСII в мембранах мутанта ΔФСII по сравнению с активностью в клетках дикого типа могла быть связана с присутствием белков HliA/HliB, но могла и отражать различное соотношение тримерных и мономерных комплексов ФСII в мембранах клеток дикого типа и мутанта ΔФСII. В мембранах клеток дикого типа, выращенного при низкой освещенности, оказалось выше содержание тримерных комплексов ФСII, а у мутанта ΔФСII — мономерных [20]. Однако показано, что скорость поглощения кислорода тримерами и мономерами ФСII в искусственной донорно-акцепторной системе одинакова [31]. Обнаруженное различие фотохимической активности ФСII в мембранах клеток дикого типа и мутанта ΔФСII скорее связано с различным содержанием белков HliA/HliB.

Для того чтобы понять, какой участок переноса электрона может отвечать за увеличение фотохимической активности ФСII в присутствии белков Hli, были изучены фотоиндуцированные изменения поглощения реакционного центра P700 в мембранах клеток дикого типа и мутанта ΔФСII, выращенных при низкой интенсивности света ($5 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$). При измерении на флуориметре DUAL-РАМ-101 фотоиндуцированных изменений поглощения P700 было обнаружено, что скорость восстановления P700 аскорбатом натрия после выключения света у мутанта заметно выше, чем у дикого типа. Время 50%-ного темнового восстановления P700 составляло 17.5 ± 3.5 с для клеток дикого типа и 10.5 ± 0.5 с для мутанта. Эти данные косвенно подтверждали предположение о большей доступности P700 для доноров и (или) акцепторов в комплексах ФСII мутанта ΔФСII по сравнению с P700 комплексов ФСII клеток дикого типа. Не исключено, что наличие мембранных (светоиндуцированных) белков HliA/HliB, ассоциированных с комплексами ФСII мутанта ΔФСII, могут вызывать изменения организации этих пигмент-белковых комплексов, приводящие к увеличению доступности P700 для доноров и (или) акцепторов электронов, в результате чего может возрастать фотохимическая активность ФСII.

Таким образом, сравнение фотосинтетической активности ФСИ в клетках, содержащих и не содержащих белки HliA/HliB, показало важную роль этих белков в поддержании оптимальной фотохимической активности ФСИ. Полученные в работе данные об ассоциации стрессовых светоиндуцируемых белков с мономерами и тримерами ФСИ и комплексом ФСII свидетельствуют об универсальной роли этих белков в защите фотосинтетического аппарата от избыточного света. Изучение локализации стрессовых светоиндуцируемых белков имеет не только самостоятельный научный интерес, но и позволяет расширить представления о защитных функциях светоиндуцируемых Hli-белков. Эти данные могут быть использованы для изучения регуляции процессов фотосинтеза, определяющих продуктивность сельскохозяйственных растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01626А), программы Президиума РАН № I.18 “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии” и госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН № 01201351375.

Авторы выражают благодарность проф. В.Ф.Д. Вермаасу (Университет Аризоны, США) за предоставление мутанта цианобактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Karapetyan H.V.* // Биохимия. 2007. Т. 72. № 10. С. 1385–1395. (*Karapetyan N.V.* // Biochemistry (Mosc). 2007. V. 72. № 10. P. 1127–1135).
2. *Niyogi K.K.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1999. V. 50. P. 333–359.
3. *Kirilovsky D., Kerfeld C.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. № 1. P. 158–166.
4. *Tibiletti T., Hernández-Prieto M.A., Matthijs H.C.P., Niyogi K.K., Funk C.* // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1857. № 4. P. 396–407.
5. *Tibiletti T., Rehman A.U., Vass I.* // Photosynth. Res. 2018. V. 135. № 1–3. P. 103–114.
6. *Beck J., Lohscheider J.N., Albert S., Andersson U., Mendgen K.W., Rojas-Stütz M.C., Adamska I., Funck D.* // Frontiers Plant Sci. 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00007>.
7. *Funk C., Vermaas W.F.J.* // Biochemistry. 1999. V. 38. № 29. P. 9397–9404.
8. *Sobotka R., McLean S., Zuberova M., Hunter C.N., Tichy M.* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 6. P. 2086–2095.
9. *Sobotka R., Tichy M., Wilde A., Hunter C.N.* // Plant Physiol. 2011. V. 155. № 4. P. 1735–1747.
10. *Storm P., Tibiletti T., Hall M., Funk C.* // PLoS One. 2013. V. 8. e55569.
11. *Havaux M., Guedeney G., He Q., Grossman A.R.* // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1557. № 1–3. P. 21–33.
12. *Knoppová J., Sobotka R., Tichy M., Yu J., Konik P., Halada P., Nixon P.J., Komenda* // Plant Cell. 2014. V. 26. № 3. P. 1200–1212.
13. *Hernández-Prieto M.A., Tibiletti T., Abasova L., Kirilovsky D., Vass I., Funk C.* // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1807. № 9. P. 1043–1151.
14. *Yao D.C., Brune D.C., Vavilin D., Vermaas W.F.* // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 1. P. 682–692.
15. *Xu H., Vavilin D., Funk C., Vermaas W.F.J.* // Plant Mol. Biol. 2002. V. 49. № 2. P. 149–160.
16. *Xu H., Vavilin D., Funk C., Vermaas W.F.J.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 27. P. 27971–27979.
17. *Юрина Н.П., Мокерова Д.В., Одинцова М.С.* // Физиол. растений. 2013. Т. 60. № 5. С. 611–624. (*Yurina N.P., Mokerova D.V., Odintsova M.S.* // Russian Journal of Plant Physiology. 2013. V. 60. № 5. P. 577–588).
18. *Wang Q., Jantaro S., Lu B., Majeed W., Bailey M., He Q.* // Plant Physiol. 2008. V. 147. № 3. P. 1239–1250.
19. *Shen G., Boussiba S., Vermaas W.F.J.* // Plant Cell. 1993. V. 5. № 12. P. 1853–1863.
20. *Акулинкина Д.В., Бولчевцева Ю.В., Еланская И.В., Карапетян Н.В., Юрина Н.П.* // Биохимия. 2015. Т. 80. № 10. С. 1522–1531. (*Akulinkina D.V., Bolchevtseva Y.V., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V., Yurina N.P.* // Biochemistry (Mosc). 2015. V. 80. № 10. P. 1254–1261).
21. *Lichtenthaler H.K.* // Methods Enzymol. 1987. V. 148. P. 350–382.
22. *Schreiber U., Klughammer C., Neubauer C.* // Z. Naturforsch. 1988. V. 43. P. 686–698.
23. *Promnares K., Komenda J., Bumba L., Nebesarova J., Vacha F., Tichy M.* // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 43. P. 32705–32713.
24. *Yao D.C., Kieselbach T., Komenda J., Promnares K., Hernandez-Prieto M.A., Tichy M., Vermaas W.F.J., Funk C.* // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 1. P. 267–276.
25. *Kufryk G., Hernandez-Prieto M.A., Kieselbach T., Miranda H., Vermaas W.F.J., Funk C.* // Photosynth Res. 2008. V. 95. № 2–3. P. 135–145.
26. *Shi L.X., Hall M., Funk C., Schöder W.P.* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. № 1. P. 13–25.
27. *Daddy S., Zhang J., Jantara S., He C., He Q., Wang Q.* // Sci. Rep. 2015. V. 5. 9480. doi 10.1038/srep09480
28. *Kopceva J., Komenda J., L. Bucinska L., Sobotka R.* // Plant Physiol. 2012. V. 160. № 4. P. 2239–2250.
29. *Andersson U., Heddad M., Adamska I.* // Plant Physiol. 2003. V. 132. № 2. P. 811–820.
30. *Rakhimberdieva M.G., Boichenko V.A., Karapetyan N.V., Stadnichuk I.N.* // Biochemistry. 2001. V. 40. № 51. P. 15780–15788.
31. *El-Mohsnawy E., Kopezak M.J., Schlodder E., Nowaczuk M., Meyer H.E., Warscheid B., Karapetyan N.V., Rögnér M.* // Biochemistry. 2010. V. 49. № 23. P. 4740–4751.

Investigation of Localization of Low Stress-Inducible Proteins That Protect the Photosynthetic Apparatus against Photodestruction

L. S. Sharapova^a, D. V. Akulinkina^a, Yu. V. Bolychevseva^a, I. V. Elanskaya^{b, **}, and N. P. Yurina^{a, *}

^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: nyurina@inbi.ras.ru*

***e-mail: ivelanskaya@mail.ru*

Received April 16, 2018

Revised July 06, 2018

Accepted July 25, 2018

Association of low high-light-inducing stressful HliA/HliB proteins with thylakoids chlorophyll-protein complexes of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 was studied. Using two-dimensional electrophoresis in PAAG, mass spectrometry and Western blotting, it is shown that these stressful high light-inducing HliA/HliB proteins are associated with monomers and trimeric photosystem I complexes (PSI) and photosystem II complex (PSII), which suggests a universal role of these proteins in the protection of the photosynthetic apparatus from excess light. To evaluate the functions of Hli proteins and their effect on the photochemical activity of photosystem I, non-HliA/HliB cells were compared with cyanobacterial cells containing these proteins. It is shown that the photochemical activity of the photosystem I was 3–4 times lower in the absence of HliA/HliB proteins than in the presence of Hli proteins. This suggests that Hli proteins are important for the oxygen consumption reaction in photosystem I with an artificial donor and acceptor, which indicates their role in maintaining of optimal photosystem I activity.

Keywords: photosystem I, light stress, high light-inducible stress proteins