

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, № 10, 2022

Специальный выпуск, посвящённый памяти академика В.А. Шувалова

Редакторы выпуска А.А. Красновский (мл.) и А.Ю. Семёнов

- Владимир Анатольевич Шувалов
А.А. Красновский (мл.), А.Ю. Семёнов 1347
- В.А. Шувалов – выдающийся биофизик современности: персональный взгляд
А.Ю. Семёнов 1348
- Математическое моделирование электронного транспорта в первичных процессах фотосинтеза (обзор)
Г.Ю. Ризниченко, Н.Е. Беляева, И.Б. Коваленко, Т.К. Антал, С.Н. Горячев, А.С. Маслаков, Т.Ю. Плюснина, В.А. Федоров, С.С. Хрущев, О.В. Яковлева, А.Б. Рубин 1350
- Окисление пластохинола – лимитирующая стадия в цепи переноса электронов в хлоропластах
Л.Ю. Устынюк, А.Н. Тихонов 1372
- Выделение водорода фотоавтотрофными культурами *Chlamydomonas reinhardtii* при недостатке углекислоты
В.И. Гречаник, М.А. Большаков, А.А. Цыганков 1388
- Изменение симметрии переноса электрона в реакционных центрах фотосистемы I при удалении железо-серных кластеров
А.А. Суханов, М.Д. Мамедов, Г.Е. Милановский, К.М. Салихов, А.Ю. Семенов 1400
- О механизме селективного химического замещения бактериофеофитинов в реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides* R-26
А.А. Забелин, В.Б. Ковалев, А.Я. Шкурпатов 1412
- Селективное возбуждение каротиноидов светособирающих комплексов LH2 *Allochrocatium vinosum* приводит к окислению бактериохлорофилла
И.Б. Клемина, З.К. Махнева, А.А. Москаленко, И.И. Проскураков 1425
- Влияние дипиридамола на энергизацию мембран и процессы миграции энергии в хроматофорах *Rba. sphaeroides*
П.П. Нокс, Е.П. Лукашев, Б.Н. Корватовский, Н.Х. Сейфуллина, С.Н. Горячев, Э.С. Аллахвердиев, В.З. Пащенко 1434
- Свойства мутантных фотосинтетических реакционных центров пурпурной бактерии *Cereibacter sphaeroides* с замещением M206 Pe → Gln
Т.Ю. Фуфина, О.А. Третчикова, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов, Л.Г. Васильева 1447
- Комплекс LH2 из серной бактерии *Allochrocatium vinosum* – природный сенсор синглетного кислорода
З.К. Махнева, Т.Н. Смолова, М.А. Большаков, А.А. Москаленко 1459
- ξ-Каротин: генерация и тушение синглетного кислорода, сравнение с фитофлуином
А.А. Ашихмин, А.С. Бендикис, А.А. Москаленко, А.А. Красновский (мл.) 1471
- Сравнение абсорбционной динамики синглетных возбуждённых состояний хлорофиллов *a* и *d*
Д.А. Черепанов, А.А. Петрова, М.Д. Мамедов, А.И. Вишневская, Ф.Е. Гостев, И.В. Шелаев, А.В. Айбуш, В.А. Надточенко 1483

РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

- Идентификация генов канальных родопсинов в зеленых и криптофитовых водорослях Белого и Черного морей
О.В. Карпова, Е.Н. Виноградова, Е.С. Лобакова 1492
- Значимость экспрессии рецептора NOTCH1 для прогрессии карцином лёгкого и толстой кишки человека
М.В. Васильева, Н.В. Хромова, Б.П. Копнин, В.Б. Дугина, П.Б. Копнин 1505
- Влияние нокдауна *Cc2d1a*/Fgud-1 в гиппокампе у мышей линии ВТBR на аутистически-подобное поведение, серотониновые 5-HT_{1A} и дофаминовые D2-рецепторы, и на внутриклеточные сигнальные пути seб и NF-κB
И.И. Белокопытова, Е.М. Кондаурова, Е.А. Куликова, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко, Н.К. Попова 1514

CONTENTS

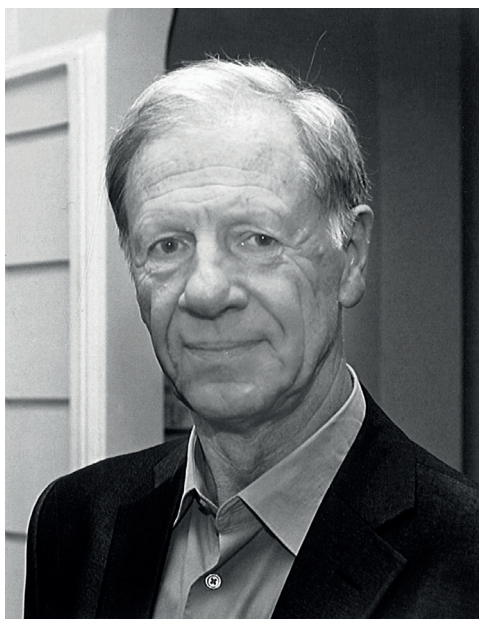
Vol. 87, Issue 10, 2022

Special Issue Dedicated to the Memory of Vladimir A. Shuvalov
Guest Editors Alexander A. Krasnovsky, Jr. and Alexey Yu. Semenov

Vladimir A. Shuvalov <i>A. A. Krasnovsky, Jr. and A. Yu. Semenov</i>	1347
V. A. Shuvalov as an Outstanding Biophysicist of Our Time: Personal View <i>A. Yu. Semenov</i>	1348
Mathematical Simulation of Electron Transport in the Primary Photosynthetic Processes (Review) <i>G. Yu. Riznichenko, N. E. Belyaeva, I. B. Kovalenko, T. K. Antal, S. N. Goryachev, A. S. Maslakov, T. Yu. Plyusnina, V. A. Fedorov, S. S. Khruschev, O. V. Yakovleva, and A. B. Rubin</i>	1350
Plastoquinol Oxidation: the Rate-Limiting Step in the Chain of Electron Transport in Chloroplasts <i>L. Yu. Ustynyuk and A. N. Tikhonov</i>	1372
Hydrogen Production by CO ₂ Deprived Photoautotrophic Cultures <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>V. I. Grechanik, M. A. Bol'shakov, and A. A. Tsygankov</i>	1388
Change in Electron Transfer Symmetry in the Reaction Centers of Photosystem I upon Removal of Iron-Sulfur Clusters <i>A. A. Sukhanov, M. D. Mamedov, G. E. Milanovsky, K. M. Salikhov, and A. Yu. Semenov</i>	1400
On the Mechanism of Selective Chemical Exchange of Bacteriopheophytins in Reaction Centers of <i>Rhodobacter sphaeroides</i> R-26 <i>A. A. Zabelin, V. B. Kovalev, and A. Ya. Shkuropatov</i>	1412
Selective Excitation of Carotenoids of the <i>Allochromatium vinosum</i> Light-Harvesting LH2 Complexes Leads to the Oxidation of Bacteriochlorophyll <i>I. B. Klenina, Z. K. Makhneva, A. A. Moskalenko, and I. I. Proskuryakov</i>	1425
The Effects of Dipyridamole on Membrane Energization and Energy Migration Processes in the <i>Rba. sphaeroides</i> Chromatophores <i>P. P. Knox, E. P. Lukashev, B. N. Korvatovskiy, N. Kh. Seifullina, S. N. Goryachev, E. S. Allakhverdiev, and V. Z. Paschenko</i>	1434
Properties of Mutant Photosynthetic Reaction Centers of Purple Non-Sulfur Bacteria <i>Cereibacter sphaeroides</i> with Substitution M206 Ile → Gln <i>T. Yu. Fufina, O. A. Tretchikova, A. M. Khristin, R. A. Khatypov, and L. G. Vasilieva</i>	1447
LH2 Complex from Sulfur Bacteria <i>Allochromatium vinosum</i> – Natural Singlet Oxygen Sensor <i>Z. K. Makhneva, T. N. Smolova, M. A. Bolshakov, and A. A. Moskalenko</i>	1459
ζ-Carotene: Generation and Quenching of Singlet Oxygen, Comparison with Phytofluene <i>A. A. Ashikhmin, A. S. Benditkis, A. A. Moskalenko, and A. A. Krasnovsky, Jr.</i>	1471
Comparative Absorption Dynamics of Singlet Excited States of Chlorophylls <i>a</i> and <i>d</i> <i>D. A. Cherepanov, A. A. Petrova, M. D. Mamedov, A. I. Vishnevskaya, F. E. Gostev, I. V. Shelaev, A. V. Aybush, and V. A. Nadtochenko</i>	1483

REGULAR PAPERS

Identification of the Channel Rhodopsin Genes in the Green and Cryptophyte Algae from the White and Black Seas <i>O. V. Karpova, E. N. Vinogradova, and E. S. Lobakova</i>	1492
Significance of NOTCH1 Expression in the Progression of Human Lung and Colorectal Cancers <i>M. V. Vasileva, N. V. Khromova, B. P. Kopnin, V. B. Dugina, and P. B. Kopnin</i>	1505
Effect of a <i>Cc2d1a</i> /Freud-1 Knockdown in the Hippocampus in BTBR Mice on Autistic-Like Behavior, Serotonin 5-HT _{1A} and D2 Dopamine Receptors and Intracellular Signaling Pathways CREB and NF-κB <i>I. I. Belokopytova, E. M. Kondaurova, E. A. Kulikova, T. V. Ilchibaeva, V. S. Naumenko, and N. K. Popova</i>	1514



Владимир Анатольевич Шувалов
13.10.1943 – 08.01.2022

DOI: 10.31857/S0320972522100013, EDN: BBITAC

Настоящий сборник посвящён памяти академика Владимира Анатольевича Шувалова и составлен из работ его коллег и учеников. Владимир Анатольевич был учеником академика А.А. Красновского и профессора Ф.Ф. Литвина. Он был выдающимся биофизиком мирового масштаба, безусловным лидером в области биофизики фотосинтеза в России. Шувалов сделал основополагающие открытия в области механизмов первичных реакций фотосинтеза и фактически создал российскую научную школу по изучению сверхбыстрых процессов переноса электрона в фотосинтетических реакционных центрах. В течение многих лет

В.А. Шувалов был директором Института фотосинтеза (теперь Институт фундаментальных проблем биологии РАН в Пущино). Он был организатором и многолетним заведующим отделом фотобиофизики НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, в последние годы активно работал в ФИЦ Химическая физика имени Н.Н. Семенова РАН. Владимир Анатольевич был человеком высокой культуры и широких интересов в науке и в искусстве. Он был принципиальным, обаятельным и доброжелательным человеком, щедро делившимся своими идеями с сотрудниками и учениками.

*Приглашённые редакторы
Проф. А.А. Красновский
Проф. А.Ю. Семёнов*

В.А. ШУВАЛОВ – ВЫДАЮЩИЙСЯ БИОФИЗИК СОВРЕМЕННОСТИ: ПЕРСОНАЛЬНЫЙ ВЗГЛЯД

© 2022 А.Ю. Семёнов^{1,2}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: semenov@belozersky.msu.ru

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.08.2022

После доработки 19.08.2022

Принята к публикации 19.08.2022

Настоящая работа посвящена памяти крупнейшего ученого в области биофизики фотосинтеза – Владимира Анатольевича Шувалова. В статье кратко рассматриваются совместные работы автора с В.А. Шуваловым по исследованию бактериальных фотосинтетических реакционных центров, а также фотосистем 1 и 2 из цианобактерий и высших растений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: В.А. Шувалов, биофизика фотосинтеза, фотосинтетические реакционные центры, перенос электронов, фемтосекундная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972522100025, **EDN:** BBSDKQ

Наше сотрудничество с Владимиром Анатольевичем Шуваловым началось в 1985 г в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Первые работы были посвящены исследованию электрогенных реакций в реакционных центрах (РЦ) серной пурпурной фотосинтезирующей бактерии *Rhodospseudomonas (Blastochloris) viridis*. РЦ из *R. viridis* стал первым мембранным белком, для которого была получена трёхмерная структура с атомным разрешением [1, 2]. За эту работу в 1988 г. Р. Хуберу, И. Дейзенхоферу и Х. Михелю была присуждена Нобелевская премия по химии. Сопоставление относительных вкладов отдельных стадий переноса зарядов в суммарный электрогенез с проекциями расстояний между редокс-кофакторами на нормаль к плоскости мембраны позволило сделать важный вывод о неоднородном характере распределения диэлектрической проницаемости внутри белка РЦ. По этой теме в 1986–1988 гг. нами было опубликовано несколько статей, которые получили большое цитирование, а само направление стало весьма успешно развиваться [3, 4].

В 2005 г. в Институте химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН у нас с В.А. Шуваловым началась совместная работа по фемтосекунд-

ной спектроскопии фотосистем (ФС) 1 и 2. Вместе с В.А. Надточено, О.М. Саркисовым, И.В. Шелаевым, М.Д. Мамедовым, Ф.Е. Гостевым А.Я. Шкуропатовым, А.А. Забелиным и Д.А. Черепановым нам удалось исследовать кинетику первичных реакций переноса электрона в РЦ пигмент-белковых комплексов ФС 1 и 2, определить природу первичных доноров и акцепторов электрона, а также приблизиться к пониманию молекулярного механизма сверхбыстрого первичного разделения зарядов в этих комплексах [5–9]. Эти работы продолжаются и сейчас, и в их успехе нельзя переоценить роль Владимира Шувалова, который являлся мировым экспертом в изучении механизмов первичных реакций в фотосинтетических РЦ.

Владимир Шувалов был не только выдающимся учёным, но и обаятельным человеком, щедро делившимся своими идеями с сотрудниками и учениками. У него был несомненный дар научной интуиции, опережавшей время, и многие его фундаментальные гипотезы, вначале не принимавшиеся научным сообществом, позднее получали экспериментальное подтверждение.

Отвлекаясь от науки, я хочу коротко сказать о человеческих качествах Владимира. Он был очень необычным человеком, спокойным, до-

брожелательным, нестандартно мыслящим, интересующимся искусством, в особенности музыкой. Он мог внимательно выслушать собеседника, убедить в своей правоте, а иногда даже изменить свою точку зрения.

Владимир Шувалов, несомненно, займет достойное и законное место в когор-

те выдающихся отечественных биофизиков вслед за Г.М. Франком, А.А. Красновским, М.В. Волькенштейном, Л.А. Блюменфельдом и другими.

Я благодарен судьбе за то, что мне довелось близко сотрудничать и неформально общаться с этим замечательным человеком.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex: electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.*, **180**, 385-398, doi: 10.1016/s0022-2836(84)80011-x.
2. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution, *Nature*, **318**, 618-624, doi: 10.1038/318618a0.
3. Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Zaberezhnaya, S. M., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., et al. (1986) Spectral, redox and kinetic characteristics of high-potential cytochrome c hemes in *Rhodospseudomonas viridis* reaction centers, *FEBS Lett.*, **205**, 41-46, doi: 10.1016/0014-5793(86)80862-6.
4. Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., Skulachev, V. P., et al. (1988) Electrogenic steps in the redox reactions catalysed by photosynthetic reaction centre complex from *Rhodospseudomonas viridis*, *Eur. J. Biochem.*, **171**, 253-264, doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13784.x.
5. Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Sarkisov, O. M., Nadochenko, V. A., et al. (2010) Femtosecond primary charge separation in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1410-1420, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.026.
6. Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Vishnev, M. I., Shkuropatov, A. Ya., Ptushenko, V. V., et al. (2011) P680 (PD1PD2) and ChlD1 as alternative electron donors in photosystem II core complexes and isolated reaction centers, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **104**, 44-50, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.02.003.
7. Nadochenko, V. A., Semenov, A. Yu., and Shuvalov, V. A. (2014) Formation and decay of P₆₈₀(P_{D1}-P_{D2})⁺Phe_{O_{D1}}⁻ radical ion pair in photosystem II core complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1384-1388, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.01.026.
8. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Petrova, A. A., et al. (2017) Mechanism of adiabatic primary electron transfer in photosystem I: Femtosecond spectroscopy upon excitation of reaction center in the far-red edge of the Q_y band, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 895-905, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.008.
9. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Aybush, A. V., Mamedov, M. D., et al. (2020) Generation of ion-radical chlorophyll states in the light-harvesting antenna and the reaction center of cyanobacterial photosystem I, *Photosynth. Res.*, **146**, 55-73, doi: 10.1007/s11120-020-00731-0.

V. A. SHUVALOV AS AN OUTSTANDING BIOPHYSICIST OF OUR TIME: PERSONAL VIEW

A. Yu. Semenov^{1,2}

¹ *Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; E-mail: semenov@belozersky.msu.ru*

² *Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

This work is dedicated to the memory of the largest scientist in the field of biophysics of photosynthesis – Vladimir Anatolyevich Shuvalov. The article briefly discusses the joint work of the author with V. A. Shuvalov on the study of bacterial photosynthetic reaction centers, as well as photosystems I and II from cyanobacteria and higher plants.

Keywords: V. A. Shuvalov, biophysics of photosynthesis, photosynthetic reaction centers, electron transfer, femtosecond spectroscopy

УДК 577.3

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССАХ ФОТОСИНТЕЗА

Обзор

© 2022 Г.Ю. Ризниченко^{1*}, Н.Е. Беляева¹, И.Б. Коваленко¹, Т.К. Антал²,
С.Н. Горячев¹, А.С. Маслаков¹, Т.Ю. Плюснина¹, В.А. Федоров¹, С.С. Хрущев¹,
О.В. Яковлева¹, А.Б. Рубин¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: riznich46@mail.ru

² Псковский государственный университет, 180000 Псков, Россия

Поступила в редакцию 22.06.2022

После доработки 15.08.2022

Принята к публикации 15.08.2022

Представлен обзор математических моделей электронного транспорта и сопряженных процессов в фотосинтетической мембране, разработанных на кафедре биофизики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Описаны детальные кинетические модели процессов в мембране тилакоида на основе аппарата дифференциальных уравнений. Фитирование модельных кривых по данным спектральных измерений позволило оценить значения параметров, недоступных прямому экспериментальному измерению. Вероятностный метод агентного моделирования Монте-Карло представляет широкие возможности для изучения динамики гетерогенных систем на основе правил поведения индивидуальных элементов системы. Алгоритмы упрощенного представления больших массивов данных позволили в динамике проследить за изменениями фотосинтетического аппарата в ходе роста культуры в фотобиореакторе и в целях экологического мониторинга. С помощью броуновских и молекулярных моделей описано движение и взаимодействие индивидуальных белков – переносчиков электронов, и изучена роль электростатических взаимодействий в регуляции конформационных изменений в реакционных комплексах. Разработанные нами прямые многочастичные модели в явном виде моделируют броуновскую диффузию подвижных белковых переносчиков и их электростатические взаимодействия с мультиферментными комплексами как в растворе, так и в гетерогенном интерьере биомембраны. Совместное использование методов кинетического и броуновского многочастичного и молекулярного моделирования позволяет изучать механизмы регуляции целостной системы электрон-транспортных процессов растений и водорослей на молекулярном и субклеточном уровнях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосинтез, электронный транспорт, флуоресценция, кинетические модели, броуновские многочастичные модели, молекулярное моделирование.

DOI: 10.31857/S0320972522100037, **EDN:** BBSUGZ

ВВЕДЕНИЕ

Живые системы представляют собой далекие от термодинамического равновесия открытые по веществу и энергии системы. В фотосинтетической мембране происходит поглощение энергии света, инициирующей сложную совокупность взаимодействующих процессов, в основе которых лежит электронный транспорт

по так называемой фотосинтетической цепи переносчиков электрона. На первых этапах окисление фотоактивного пигмента приводит к разделению зарядов и первичному запасанию энергии в виде трансмембранного электрического потенциала. Дальнейший перенос электрона по фотосинтетической цепи сопряжен с транспортом протонов и образованием трансмембранного электрохимического потенциала.

Принятые сокращения: МЭА – метод мультиэкспоненциальной аппроксимации; Cyt b_6f – цитохромные комплексы; Fd – ферредоксин; FNR – ферредоксин-NADP⁺-редуктаза; Pс – пластоцианин; PQ – пластохинон; PSI и PSII – мультиферментные комплексы фотосистем I и II.

* Адресат для корреспонденции.

Образованные в результате линейного электронного транспорта восстановленные соединения NADPH являются важнейшими кофакторами цикла фиксации углерода Кальвина–Бенсона, протоны, «закачанные» в люминальное пространство используются молекулярной машиной, АТФ-синтазой, для синтеза АТФ из ADP и неорганического фосфата [1–10].

Математические и компьютерные модели дают возможность оценивать значения параметров фотосинтетического аппарата по данным экспериментов и изучать механизмы регуляции процессов трансформации вещества и энергии при фотосинтезе. Для первичных процессов фотосинтеза экспериментально определены константы скоростей отдельных элементарных стадий как в растворах, так и в нативных системах [10]. Кинетику переноса электронов по фотосинтетической цепи и сопряженных процессов преобразования энергии в фотосинтетической мембране можно непосредственно регистрировать при возбуждении короткими мощными вспышками света с помощью спектральных методов (дифференциальная спектроскопия, флуоресцентные методы, метод электронного парамагнитного резонанса). Эти методы позволяют в реальном времени определять скорости быстрых изменений состояний отдельных компонентов системы в начальных стадиях фотосинтеза. Возможность непосредственной оценки констант скоростей элементарных реакций является существенным преимуществом системы первичных процессов фотосинтеза по сравнению с большинством биологических процессов, для которых определение констант скоростей отдельных стадий реакций представляется сложной задачей. Так, регистрируемая в биохимических экспериментах кинетика обычных ферментативных реакций отражает лишь этапы образования и распада фермент-субстратных комплексов (но не элементарных взаимодействий в них), которые протекают по квантово-химическим механизмам в наносекундном временном диапазоне.

Основные участники процесса фотосинтетического электронного транспорта – мультиферментные комплексы фотосистемы II (PSII), цитохромные комплексы (Cyt b_6f), комплексы фотосистемы I (PSI) – встроены в бислойную липидную мембрану и обеспечивают направленный перенос электрона через фотосинтетическую мембрану (рис. 1). Посредниками между Cyt b_6f и PSI являются молекулы белка пластоцианина (Pc), диффундирующие в люмене. Восстановление молекул NADP, необходимых в цикле фиксации углерода, осуществля-

ют подвижные в строге молекулы небольшого белка ферредоксина (Fd). В последние годы методами электронной томографии и криогенной микроскопии активно изучается сложная форма гранальных и стромальных ламелл, а также гетерогенное распределение комплексов PSII, PSI, Cyt b_6f [11–14].

Первые кинетические модели фотосинтеза [15–16], как и модели других биохимических процессов, были основаны на законе действующих масс, который гласит, что скорость взаимодействия двух веществ пропорциональна произведению концентраций этих веществ. Этот закон справедлив только в случае быстрого полного перемешивания, когда достаточно большое число молекул каждого вещества свободно диффундируют в объеме. В этом случае скорость реакции можно считать пропорциональной вероятности столкновений двух молекул разного типа.

В результате многочисленных экспериментальных исследований формировались представления о структуре фотосинтетической мембраны. В конце 60-х гг. XX века пришло понимание того факта, что компоненты фотосинтетической цепи не плавают свободно в цитоплазме. Фотосинтетические реакционные центры представляют собой мультиферментные комплексы, встроены в мембрану, а взаимодействие фотосистем PSI и PSII осуществляют подвижные переносчики. Эти представления вызвали к жизни появление моделей, где фотосинтетический реакционный центр рассматривается как единое целое. В первых таких моделях [17, 18] перенос электрона в пределах фотосинтетического реакционного центра PSII рассматривался как строго упорядоченный переход между состояниями комплекса, отличающимися зарядами на отдельных компонентах этого комплекса, при этом переход электрона с донорной на акцепторную сторону комплекса инициировался светом. В монографии Рубина и Шинкарева [19] изложены математическое обоснование и методы анализа переноса электрона в мультиферментных комплексах. Применение этого метода для описания процессов в выделенных комплексах реакционных центров бактерий и фотосистем I и II описано в статьях [20–22] и книгах [23–26].

В основу большинства моделей процессов переноса электрона в пределах PSII положена модель обратимой радикальной пары [27–29], в которой предполагается, что при освещении молекула фотосинтетического реакционного центра P680 находится в экситонном равновесии с молекулами хлорофилла антенны. Взаимодействие акцепторной части PSII описывают

согласно концепции двухэлектронного затвора (two electron gate, TEG-model) [30–31].

В качестве переменных рассматриваются концентрации состояний фотосинтетического реакционного центра [32–37]. Сравнение с экспериментом проводится по индукционным кривым флуоресценции, регистрируемым при разных режимах освещения. В ряде работ моделируются линейный и циклический пути переноса электрона через PSI [38–44], а также процессы взаимодействия с циклом фиксации углерода Кальвина–Бенсона [45–49]. Обзор моделей фотосинтетического электронного транспорта и сопряженных процессов подробно представлен в работах Stirbet et al. [10, 50] и др.

В работах нашей группы [39–41, 51–55] при описании процессов переноса электрона в пределах мультиферментных комплексов, встроенных в фотосинтетическую мембрану, используются обыкновенные дифференциальные уравнения для вероятностей состояний этих комплексов. Состояния комплекса отличаются редокс-состояниями отдельных компонентов комплекса, наличием пустых или заполненных сайтов, в которых могут заякориваться подвижные переносчики электрона (как в случае Q_B сайта PSII), наличием протонированных групп.

Константы скоростей переходов между состояниями комплекса могут быть различны для комплексов в различных конформационных состояниях, для комплексов, локализованных в гранальной или стромальной частях тилакоида, а также могут зависеть от других переменных и параметров системы (температуры, трансмембранного электрического потенциала, внешнего электрического поля и т.д.). Константы скоростей перехода между состояниями зависят также от фотоиндуцированного электрического потенциала. Переходы между состояниями системы характеризуют ориентированный граф переходов между состояниями, для вероятностей которых записываются уравнения, линейные относительно вероятностей этих состояний. При этом константы скоростей переходов между состояниями могут зависеть от условий освещения, от электрических зарядов на отдельных переносчиках, входящих в состав фотосинтетического реакционного центра [56, 57], а также от концентраций протонов в люмене и стромахе или от концентраций подвижных переносчиков (концентрации молекул пула пластохинонов (PQ) на акцепторной стороне PSII, Pс – на люминальной стороне PSI и Fd – на стромальной стороне PSI). Поэтому в общем случае уравнения, описывающие переходы между состояниями фотосинтетических мультиферментных комплексов, нелинейные.

Концентрация определенного состояния всего мультиферментного комплекса равна произведению вероятности этого состояния на концентрацию комплекса. Подробное описание метода построения графа состояний представлено в работе Rubin и Riznichenko [22], алгоритм построения графа состояний фермент-субстратного комплекса на примере комплекса Cyt b_6/f , содержащего 256 состояний, приведен в статье Устинина и соавт. [58].

Другой тип взаимодействий компонентов цепи переноса электрона проявляется на тех участках фотосинтетической электрон-транспортной цепи, где в переносе электрона принимают участие подвижные переносчики. Это взаимодействие комплекса PSII с цитохромным комплексом на уровне пластохинона, цитохромного комплекса с комплексом PSI на уровне пластоцианина, участие ферредоксина и ферредоксин-NADP⁺-редуктазы (FNR) в линейном и циклическом транспорте электрона на стромальной стороне PSI. В тилакоидной мембране кинетические параметры взаимодействия комплексов с подвижными переносчиками определяются как временем диффузии подвижного переносчика к соответствующему комплексу, так и вероятностью «правильной» посадки (докинга) подвижного переносчика на соответствующий сайт на донорной или акцепторной стороне комплекса. Важную роль здесь играют параметры диффузии подвижного переносчика в соответствующем компартменте (PQ – внутри мембраны, Pс – в люмене, Fd – в стромальном пространстве), а также геометрия реакционного объема. Эффективность взаимодействия в значительной мере определяется электростатическими взаимодействиями локальных зарядов атомных групп на поверхности донора и акцептора. Именно эти участки, где скорость переноса электрона зависит от пространственной организации мембраны и характера диффузии переносчиков, являются объектом регуляции со стороны целой клетки. Для описания природы взаимодействия подвижных переносчиков с фотосинтетическими мультиферментными комплексами более адекватными представляются не кинетические, а прямые методы компьютерного моделирования, способные описывать движение отдельных макромолекул и их ансамблей.

В целом, система электронного транспорта первичных процессов фотосинтеза представляет собой сложную многоуровневую систему. Происходящие в ней процессы имеют различную природу и сильно отличаются по времени. Моделирование различных процессов в единой системе первичных процессов фотосинтеза

требует разных математических и компьютерных подходов.

В данном обзоре мы не претендуем на полноту описания всех методов математического и компьютерного моделирования, применяемых в настоящее время для описания первичных процессов фотосинтеза. Последний подробный аналитический обзор истории развития наиболее широко развитого кинетического моделирования и современных кинетических моделей первичных процессов дан в работе Stirbet et al. [10]. В данном обзоре на примере результатов работ группы математического моделирования кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова мы пытаемся показать возможности кинетического, стохастического, многочастичного и молекулярного моделирования при воспроизведении *in silico* некоторых характеристик первичных

процессов фотосинтеза, в отношении которых имеющиеся экспериментальные данные позволяют провести верификацию моделей.

МОДЕЛЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА И СОПРЯЖЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЕ ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ И МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Большинство ранних моделей фотосинтетического электронного транспорта описывали процесс переноса электрона в пределах PSII, которая является основным источником флуоресценции [32, 33, 36–38, 59–61].

В работах нашей группы [54, 55, 62] была разработана детальная модель PSII, для идентификации параметров которой были исполь-

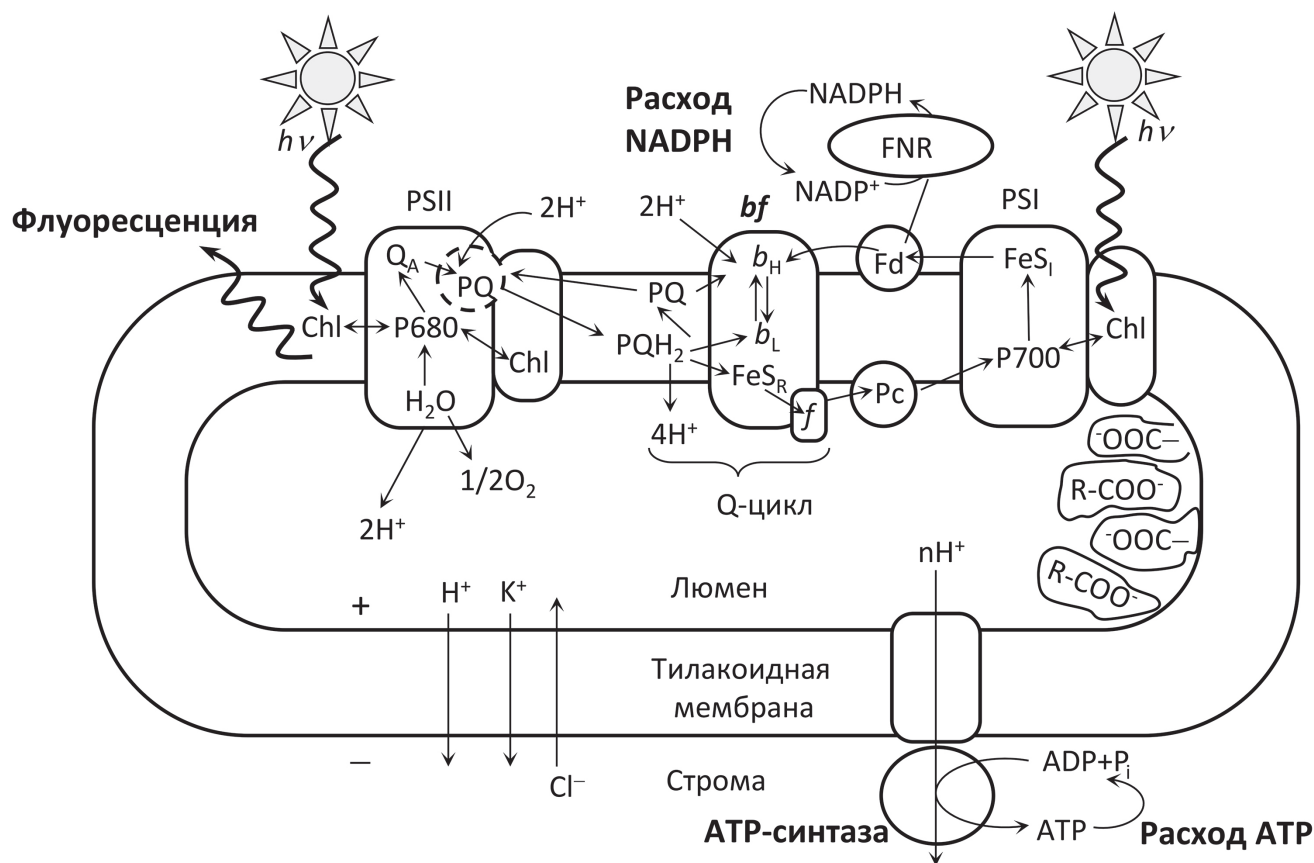


Рис. 1. Схема процессов, рассматриваемых в обобщенной кинетической модели первичных процессов фотосинтеза. PSI, PSII — фотосистемы I и II; b_f — цитохромный b_6/f -комплекс; Chl — хлорофилл антенны; P680 и P700 — пигменты реакционных центров фотосистем II и I; Q_A — первичный хиноновый акцептор электронов PSII; b_L и b_H — низко- и высокопотенциальный гемы цитохрома b ; FeS_R — железосерный центр Риске; f — цитохром f ; FeS_I — акцепторный комплекс PSI; PQ — пластохинон; PQH_2 — пластохинол; Fd — ферредоксин; Pc — пластоцианин; $R-COO^-$ — буферные группы. Знаки «+» и «-» показывают, что в результате светоиндуцированных процессов люмен тилакоида заряжается положительно, а строма хлоропласта — отрицательно. Ломаные стрелки обозначают потоки квантов падающего света и флуоресценцию. Тонкими стрелками показан перенос электронов по цепи электронного транспорта и потоки ионов H^+ , K^+ и Cl^- после включения освещения [40]. Рисунок воспроизведен с изменениями с разрешения Springer Nature: Springer Nature B.V. Photosynthesis Research, 140, 1–19, doi: 10.1007/s11120-019-00627-8, «Analyzing both the fast and the slow phases of chlorophyll a fluorescence and P700 absorbance changes in dark-adapted and preilluminated pea leaves using a Thylakoid Membrane model», авторы: Belyaeva, N. E., Bulychiev, A. A., Riznichenko, G. Yu., Rubin, A. B., © 2019

зованы данные регистрации флуоресценции после освещения объекта короткой (нс) насыщающей лазерной вспышкой. Проведенное фитирование результатов моделирования по экспериментальным данным позволило получить оценки тех параметров системы, которые недоступны для экспериментального подхода, в частности, константы скоростей безызлучательной релаксации в реакционном центре PSII, которые существенно зависят от интенсивности освещения [63]. При больших интенсивностях поток энергии в тепло может составлять до 30% поглощенной фотосинтетическим объектом энергии света [63], обеспечивая защиту системы от ускоренного образования активных форм кислорода. Модель PSII позволяет воспроизвести реальные кинетические изменения, проявляющиеся на нарастающем участке индукционной кривой флуоресценции в диапазоне времен от микросекунд до секунды.

Информационное значение индукционной кривой флуоресценции не исчерпывается ее нарастающим участком. Характер индукционной кривой флуоресценции в ходе роста культуры и в неблагоприятных условиях жизни ав-

тотрофных организмов существенно меняется также на более медленном «спадающем» участке. Для правильной интерпретации изменений выхода флуоресценции на больших временах необходим учет процессов переноса электронов не только в пределах PSII, но и дальнейший линейный путь электрона через цитохромный комплекс и PSI, циклический поток электронов вокруг PSI и другие альтернативные пути переноса электронов, а также сопровождающие электронный транспорт процессы нефотохимического тушения. Эти процессы с разной степенью детализации включены в модели Stirbet et al. [10, 34], Lazár [38], Belyaeva et al. [39–41] и Ebenhoh [42]. Схема процессов в фотосинтетической тилакоидной мембране, учтенных в кинетической модели, разрабатываемой нами, представлена на рис. 1 и подробно описана в работах Belyaeva et al. [39, 40]. Изначальные версии модели представлены в более ранних наших работах [22, 25].

Модель процессов в тилакоидной мембране (Т-М) включает подробную субмодель, описывающую переходы между состояниями PSII, и субмодели переходов между состояниями

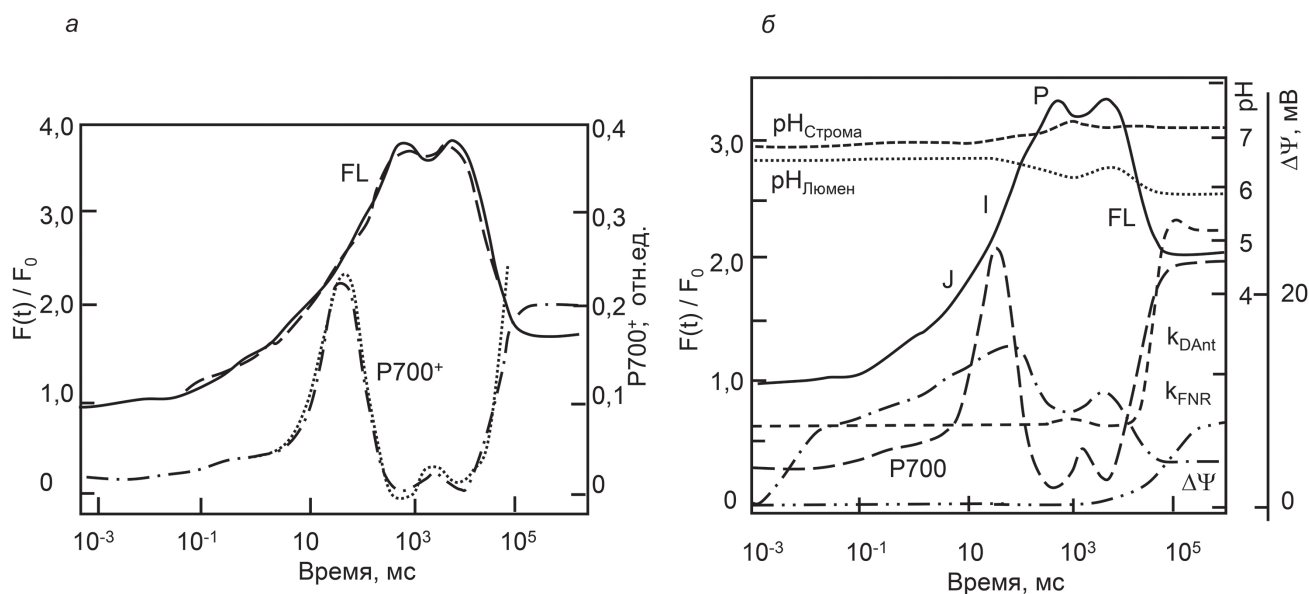


Рис. 2. Результаты фитирования модели процессов в мембране тилакоида (а). Экспериментальные кривые флуоресценции хлорофилла *a* (---) и кривые поглощения ΔA_{810} , (.....) зарегистрированы на целых листьях *Pisum sativum*, адаптированных 15 мин в темноте, при освещении красным светом; освещенность 200 мкМ фотонов $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (максимум излучения 650 нм). Время регистрации 30 с. Модельные кинетические кривые индукции флуоресценции (FL, —) и окислительно-восстановительных превращений фотоативного пигмента PSI (P700⁺, - · - · -) хорошо воспроизводят экспериментальные данные на временном интервале до 30 с. б — Полученные на модели динамические кривые изменения во времени характеристик энергизованного состояния фотосинтетической мембраны после включения света. Кривые индукции флуоресценции (FL, —) и редокс-превращений P700 (— —) фитированы по экспериментальным данным (см. рис. 2, а и подпись к нему). $\Delta\Psi(t)$ — электрический трансмембранный потенциал (— · — · —), pH люмена (.....), pH стромы (-----). Также показаны изменения во времени констант скоростей регуляторных процессов: константы скорости реакции диссипации энергии в антенне k_{DAnt} (-----) и константы скорости взаимодействия Fd с FNR на акцепторной стороне PSI (k_{FNR} , - · · - · ·) [40]. Рисунок воспроизведен с изменениями с разрешения Springer Nature: Springer Nature B.V. Photosynthesis Research, 140, 1–19, doi: 10.1007/s11120-019-00627-8, «Analyzing both the fast and the slow phases of chlorophyll a fluorescence and P700 absorbance changes in dark-adapted and preilluminated pea leaves using a Thylakoid Membrane model», авторы: Belyaeva, N. E., Bulychev, A. A., Riznichenko, G. Yu., Rubin, A. B., © 2019

комплексов *Cyt b₆f* и PSI [39, 40, 56]. Перенос электрона от *Cyt b₆f* на PSI осуществляет подвижный в люмене переносчик Pс, принимающий электроны от *Cyt f* (обращенной в люмен субъединицы *Cyt b₆f*) и донирующий электроны на фотоактивный пигмент P700. Акцептируют электроны с PSI подвижные в строле молекулы Fd, которые принимают участие в линейном и циклическом электронном транспорте. Взаимодействие донорных и акцепторных компонентов комплексов с подвижными переносчиками описывается с помощью закона действующих масс. Уравнения для концентрации протонов на стромальной и люминальной стороне мембраны описывают сопряжение переноса электрона с трансмембранным переносом протонов и работу АТФ-синтазы, учитывается роль буферных групп. В модель Belyaeva et al. [40] включены нефотохимическое тушение и регуляция, связанная с активацией FNR, опосредующей как линейный транспорт электронов на NADH, так и, частично, циклический электронный поток вокруг PSI. Для фитирования модели наряду с кривыми индукции флуоресценции использованы экспериментальные кривые редокс-превращений P700 на временах от миллисекунд до 30 с (рис. 2, а).

На рис. 2, б, наряду с фитированными по экспериментальным данным кривыми индукции флуоресценции и редокс-превращений фотоактивного пигмента P700, представлены изменения во времени величины электрического потенциала на мембране, рН люмена и стромы, константы скорости нефотохимического тушения. Модель позволяет проследить в динамике соотношение этих величин и проверить имеющиеся гипотезы об их регуляторной роли.

В последние годы различными научными группами разработаны модели, учитывающие процесс миграции внешней части светособирающей антенны PSII к PSI и обратно. Эти процессы, называемые «State transition», происходят в основном при высокой интенсивности освещения. Уменьшая эффективный размер антенны и, как следствие, число квантов энергии, попадающих на реакционный центр, они предотвращают разрушительное действие интенсивного облучения. Учет этих процессов позволяет на модели качественно воспроизводить форму спадающей части индукционной кривой флуоресценции [34, 42, 44].

В нашей работе [41] при описании процессов в тилакоидной мембране цианобактерий, содержание комплексов PSI которых значительно выше количества комплексов PSII, также учитывается процесс переноса подвиж-

ной части светособирающей антенны от PSII гранальной части тилакоида к PSI – в стромальной и маргинальной ее части. Специфические светособирающие антенны цианобактерий (фикобилисомы) обладают высокой подвижностью, что позволяет этим микроорганизмам обеспечивать эффективный фотосинтез и предотвращать фотодеструкцию в широком диапазоне интенсивностей освещения. Учет этих процессов в модели позволил описать кинетику флуоресценции и фотопревращений P700 циановых бактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 при высокой (3000 мкМ фотонов · м⁻² · с⁻¹) и средней (1000 мкМ фотонов · м⁻² · с⁻¹) освещенности на временах от миллисекунд до нескольких минут [41, 64].

Таким образом, кинетические модели на основе дифференциальных уравнений для вероятностей состояний фотосинтетических пигмент-белковых комплексов и уравнений химической кинетики для подвижных переносчиков и трансмембранных ионных потоков позволяют наблюдать *in silico* динамику изменения во времени величин, не наблюдаемых экспериментально, в частности, концентрации протонов на внутренней и внешней сторонах мембраны, описывать регуляторные процессы переключения электронных потоков и нефотохимического тушения флуоресценции. Модели оказались полезным инструментом для оценки параметров фотосинтетического аппарата, не поддающихся непосредственному экспериментальному измерению.

Несмотря на большое число параметров модели, лишь немногие из них могут быть свободно варьированы для установления соответствия с экспериментальными кривыми. Большое число параметров детальных моделей переноса электрона в пределах комплексов PSI, PSII и *Cyt b₆f* оценены в ходе независимых экспериментов на выделенных комплексах и цитируются в литературе. Известны диапазоны их изменений для различных видов и разных условий эксперимента [65]. Значения таких параметров могут быть фиксированы при моделировании процессов в целостной фотосинтетической цепи. Этим существенно ограничивается диапазон возможного варьирования параметров в ходе фитирования модельных кривых по экспериментальным данным и делает результаты идентификации параметров по результатам фитирования более достоверными. Так, в работе Belyaeva et al. [40] параметры процессов в пределах комплексов реакционных центров PSII и PSI выбраны из приводимых в литературе диапазонов. На основе фитирования модели вновь оценены параметры зави-

сящей от времени константы, определяющей тепловые потери в процессе тушения флуоресценции в антенне PSII и характерное время активации FNR, а также концентрации буферных групп.

Системы дифференциальных уравнений, положенные в основу кинетических моделей, даны в оригинальных статьях [39–41, 62, 63]. Учет в моделях процессов нефотохимического тушения, циклического электронного транспорта вокруг PSI, реакции Меллера, связи с циклом фиксации углерода и других альтернативных электронных потоков позволяет качественно описывать особенности индукционных кривых флуоресценции для разных фотосинтезирующих видов, в том числе в условиях стресса [43, 49, 66–71].

ВЕРОЯТНОСТНЫЕ МОДЕЛИ ТИПА МОНТЕ-КАРЛО

В эксперименте сигнал регистрируется от совокупности процессов, происходящих в суспензии клеток. При этом каждая клетка содержит миллионы электрон-транспортных цепей. В каждой из этих цепей процесс переноса электрона между соответствующими переносчиками, высвечивание кванта флуоресценции, захват протона происходит с определенной вероятностью. Метод моделирования Монте-Карло позволяет воспроизводить процессы взаимодействия между компонентами системы (агентами), которые имеют стохастический характер. Частоту событий, приводящих к изменению состояния агентов (перенос электрона с одного компонента на другой, испускание кванта флуоресценции, протонирование), можно характеризовать некоторой вероятностью. В «агентном», «корпускулярном», «атомистическом» методе моделирования общие свойства сложной системы выводятся на основе свойств и механизмов взаимодействия составляющих эти системы «агентов» — неких простейших объектов, составных элементов этой системы. Еще в 1958 г. Гарфинкель использовал метод Монте-Карло для моделирования переноса электрона в митохондриальном комплексе. Модель воспроизводила перенос электрона вдоль цепи, каждая из 17 000 цепей была представлена рядом молекул цитохромов, которые могут с некоторой вероятностью реагировать друг с другом и переходить в окисленное, восстановленное и ингибированное состояния.

Моделирование процессов в отдельных фотосинтетических цепях ансамблей, состоящих из сотен тысяч и миллионов электрон-тран-

спортных цепей, стало возможным благодаря использованию мощностей современной вычислительной техники. Суммарный сигнал от моделируемого ансамбля имитирует сигнал, получаемый в эксперименте на суспензии клеток (хлоропластов) методами спектрометрии.

Перенос электрона между компонентами, протонирование, испускание кванта флуоресценции на каждом временном шаге расчета происходит с вероятностью, заданной в соответствии с экспериментальными данными о характерных временах происходящих процессов, с использованием датчика случайных чисел. Количество однородных событий (испусканий кванта флуоресценции или актов окисления фотоактивного пигмента) в определенном интервале времени суммируется. Модельная кинетическая кривая соответствует кривой, наблюдаемой в эксперименте. Таким образом, мы получаем кинетическую кривую для ансамбля фотосинтетических цепей, закладывая в модель данные о взаимодействии компонентов отдельных представителей этого ансамбля (агентов). На рис. 3 представлена схема процессов, происходящих в каждой из нескольких миллионов электрон-транспортных цепей, моделируемых в работах Antal et al. [70] и Маслакова [72]. Пояснения даны в подписи к рисунку.

Основанный на заданных правилах переходов между состояниями элементов, метод построения модели «Rule-based Monte Carlo» позволяет легко модифицировать структуру моделируемых цепочек переноса электрона, учитывать различия отдельных цепей и объединения фотосинтетических реакционных центров фотосистем в группы (энергетический обмен). Впервые этот метод мы применили для оценки соотношения альфа и бета (Q_B -невосстанавливающих) центров PSII в контрольных и подвергшихся тепловой обработке зеленых микроводорослях *Chlamydomonas reinhardtii* [73].

Отметим, что при моделировании изменения структуры связей переносчиков фотосинтетических цепей традиционным способом с помощью систем дифференциальных уравнений для вероятностей (концентраций) возможных состояний системы требуется многократное увеличение числа уравнений системы. Любая модификация моделируемой цепи требует здесь изменения вида многих уравнений системы, что представляет собой трудоемкую задачу. Задавая индивидуальные правила поведения для всех «агентов» системы и правила взаимодействия для любых пар переносчиков, мы можем учесть в агентной модели типа Монте-Карло любые виды гетерогенности системы. Сравнение с экспериментом мы проводили по кривым индук-

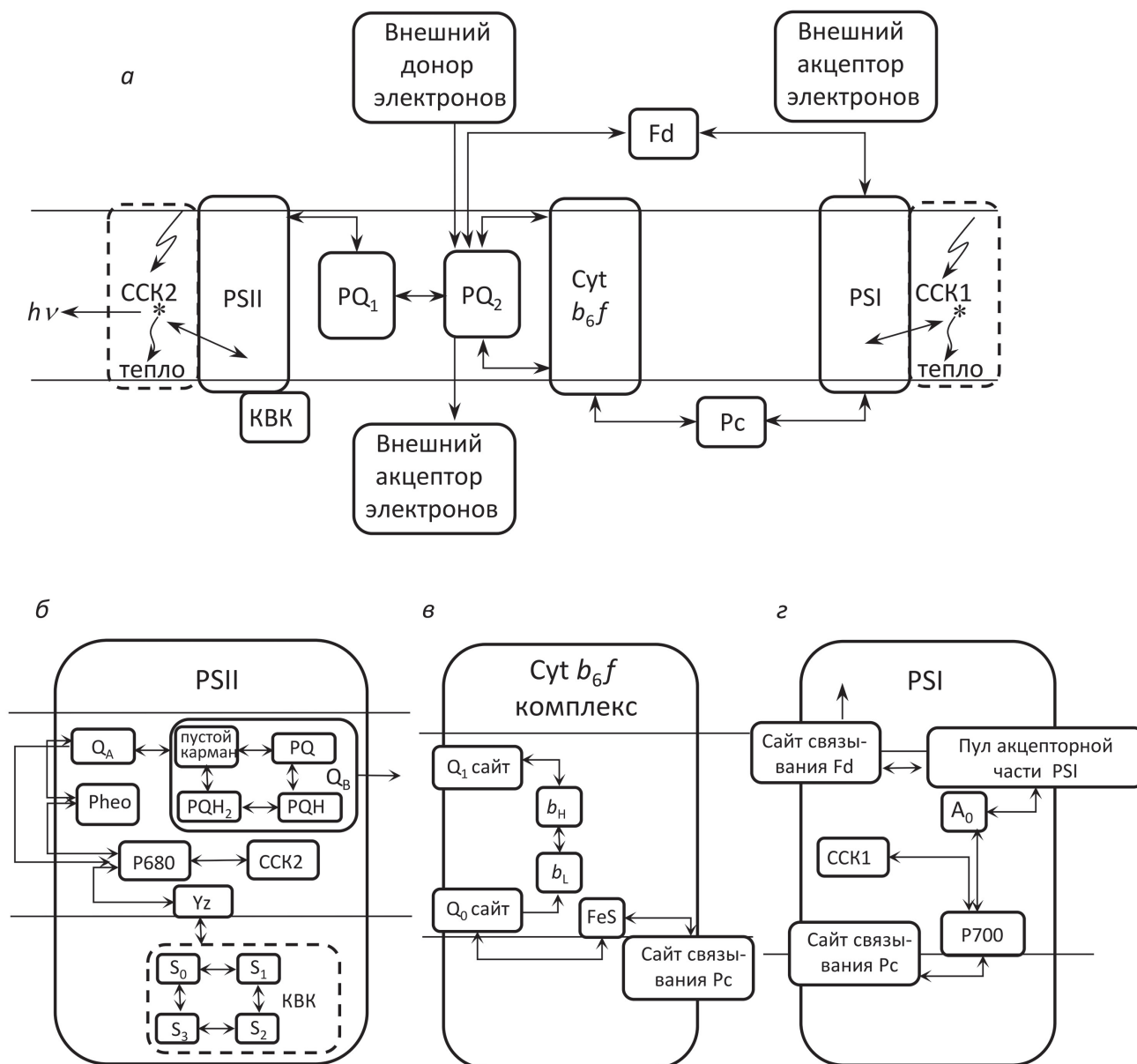


Рис. 3. Общая схема электрон-транспортной цепи, используемая в модели (а); внутреннее устройство PSII (б); внутреннее устройство цитохромного комплекса *Cyt b₆f* (в); внутреннее устройство PSI (г). CCK2 – светособирающий комплекс PSII; КVK – кислород-выделяющий комплекс; Yz – тирозин Z (донор электронов для P680-хлорофилла реакционного центра PSII); P680 – хлорофилл реакционного центра PSII с максимумом поглощения при 680 нм; Pheo – феофитин – акцептор электрона, участвующий в разделении зарядов в PSII; Q_A – первичный акцептор электрона PSII; Q_B – двухэлектронный акцептор PSII; PQ – пластохинон; пул PQ₁ – пластохиноновый пул, взаимодействующий непосредственно с PSII; пул PQ₂ – пластохиноновый пул, взаимодействующий с *Cyt b₆f*-комплексом; Q₀ – сайт связывания PQH₂; Q₁ – сайт связывания PQ; b_L – низкопотенциальный гем b; b_H – высокопотенциальный гем b; FeS – железосерный центр Риске; Pс – пластоцианин; P700 – хлорофилл реакционного центра PSI с максимумом поглощения при 700 нм; CCK1 – светособирающий комплекс PSI; A₀ – первичный акцептор PSI; пул акцепторной части PSI – совокупность переносчиков электрона PSI, следующих за первичным акцептором; Fd – ферредоксин. Рисунок воспроизведен с изменениями из статьи Маслаков (2020) [72], лицензирован под лицензией CC BY, © 2020 Маслаков А.С.

ции флуоресценции после включения света в контрольных и обработанных детергентами образцах, а также кинетике редокс-превращений P700 (A820) [70]. Число электрон-транспортных цепей в модели составляло от нескольких сот тысяч до нескольких миллионов и было сравнимо с количеством фотосинтетических цепей в

клетке микроводоросли. В модели вероятностным образом воспроизводятся процессы в отдельных фотосинтетических цепях.

На рис. 4, наряду с кинетической кривой индукции флуоресценции (а, кривая I и б, кривая I), приведены кинетические кривые для отдельных компонентов фотосинтетических це-

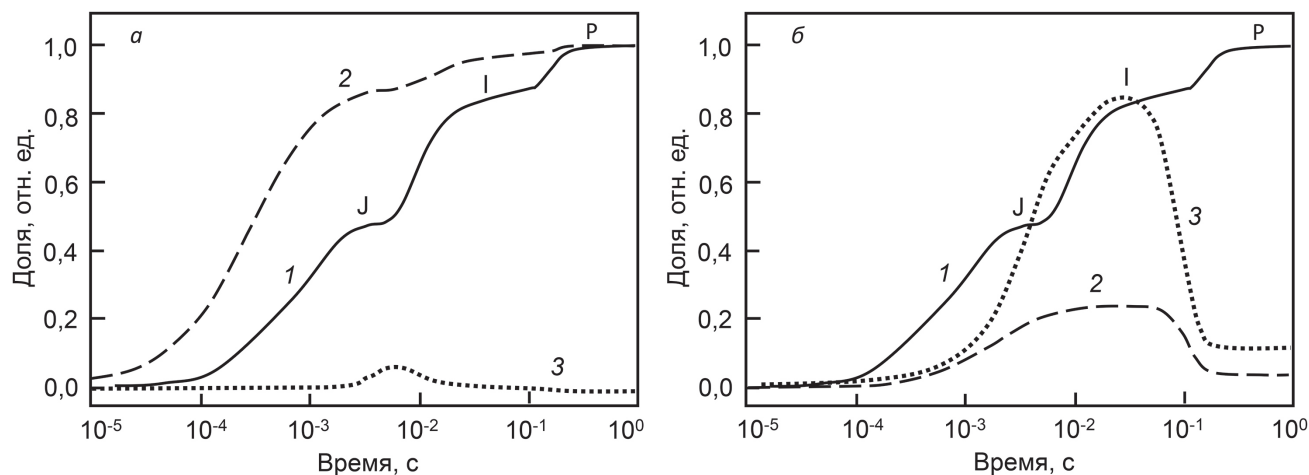


Рис. 4. Модельные индукционные кривые флуоресценции, кривые OJIP (*а*, кривая 1 и *б*, кривая 1), и изменения во времени Q_A^- (*а*, кривая 2), $P680^+$ (*а*, кривая 3), Psc^- (*б*, кривая 2), $P700^+$ (*б*, кривая 3). Адаптировано из статьи Antal et al. (2018) [70]. Рисунок воспроизведен с изменениями с разрешения Springer Nature: Springer Nature B.V. Photosynthesis Research, 138, 191–206, doi: 10.1007/s1120-018-0564-2, «Simulation of chlorophyll fluorescence rise and decay kinetics, and P700-related absorbance changes by using a rule-based kinetic Monte-Carlo method», авторы: Antal, T. K., Maslakov, A. S., Yakovleva, O. V., Krendeleva, T. E., Riznichenko, G. Yu., Rubin, A. B., © 2018

пей, в том числе для суммарной концентрации Q_A^- (*а*, кривая 2), которую принято считать пропорциональной количеству закрытых реакционных центров. Из модели видно, что на стадии J почти 90% фотосинтетических реакционных центров находятся в закрытом состоянии (Q_A^-), что соответствует экспериментальной оценке перехода в закрытое состояние 90% PSII после единичной вспышки [74]. В то же время выход флуоресценции не превосходит половины максимального уровня. Такое различие обусловлено отсутствием прямой пропорциональности между уровнем флуоресценции и редокс-состоянием Q_A^- , в частности, связанным с тушением флуоресценции окисленными формами PQ, учтенным в данной модели.

Полученные к настоящему времени методом Монте-Карло результаты принципиально могут быть получены в кинетических моделях с использованием систем дифференциальных уравнений [61, 72, 73, 75], при этом метод Монте-Карло является более ресурсоемким. Однако быстрое развитие экспериментальных методов изучения структуры и усложнение представлений об организации фотосинтетического аппарата [76, 77] поставит в ближайшее время перед моделированием задачи воспроизведения процессов в сложных гетерогенных системах, для решения которых агентный метод Монте-Карло является, несомненно, более адекватным. Быстрое развитие методов информационных технологий и мощности компьютеров позволит более широко использовать этот метод для адекватного воспроизведения процессов в живой клетке.

АНАЛИЗ БОЛЬШИХ МАССИВОВ ДАННЫХ ФЛУОРОМЕТРИИ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО И ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

Преимуществом описанных выше детальных моделей процессов переноса электрона является то обстоятельство, что их параметры представляют собой константы скоростей элементарных стадий переноса заряда между отдельными компонентами фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Однако для массовой обработки экспериментальных данных такие модели слишком сложны, поскольку идентификация параметров этих многокомпонентных моделей с помощью стандартных процедур часто оказывается неэффективной, а тщательное фитирование экспериментальных кривых требует трудоемкой ручной обработки. Для массовой обработки экспериментальных данных более пригодны упрощенные модели. В моделях, целью которых является описание связи первичных процессов с более длительными процессами метаболизма в растительной клетке, не требуется столь детальное воспроизведение экспериментальных кривых индукции флуоресценции на коротких временах. В этих случаях для описания первичных процессов фотосинтетического электронного транспорта используются упрощенные модели [45, 49, 66].

Развитие методов автоматической регистрации позволяет получать сотни и тысячи индукционных кривых флуоресценции в ходе роста культуры в фотобиореакторе или в процессе автоматического наблюдения за природ-

ными системами [70]. Чтобы понять, какие изменения происходят в фотосинтетическом аппарате фотосинтезирующих объектов с течением времени, необходимо проанализировать форму этих кривых. Для автоматического анализа больших массивов данных удобно использовать упрощенные модели.

Анализ фаз индукционной кривой флуоресценции. Индукционную кривую флуоресценции хлорофилла принято рассматривать состоящей из двух или трех временных фаз (или стадий), которые обычно разделяются соответственно с наблюдаемыми точками перегиба на временной индукционной кривой. Наиболее хорошо изучена первая быстрая стадия (до сотен миллисекунд), обозначаемая в литературе буквами ОЖР (рис. 5, а). Стандартные обозначения на кривой: О (origin, исходная точка), первый минимальный уровень флуоресценции, J и I – промежуточные перегибы, Р (peak) – максимальное значение интенсивности флуоресценции, пик. В отличие от последующих более медленных стадий, нарастающая стадия ОЖР довольно хо-

рошо воспроизводится. Именно поэтому большинство работ по анализу массовых измерений индукционной кривой флуоресценции сосредоточено на воспроизведении в модели стабильно наблюдаемой в опытах формы кривой ОЖР.

Во многих случаях нарастающий участок индукционной кривой флуоресценции ОЖР может быть достаточно хорошо аппроксимирован суммой трех экспонент [78–81]. Strasser и Strasser [82] предложили формализованный метод расчета характеристик энергетических потоков (ЖР-тест) по амплитудам фаз индукционной кривой, используя значения амплитуд в фиксированные моменты времени (2 мс – для ОЖ и 30 мс – для ЖI), а также наклон кривой в начальный момент времени. Вычисляемые на основе этого метода величины широко используются для оценки нарушений фотосинтетического аппарата как для культур в фотобиореакторе [83, 84], так и для сельскохозяйственных культур [85].

В обзоре Stirbet et al. [86] обсуждаются возможности использования ЖР-теста для оценки

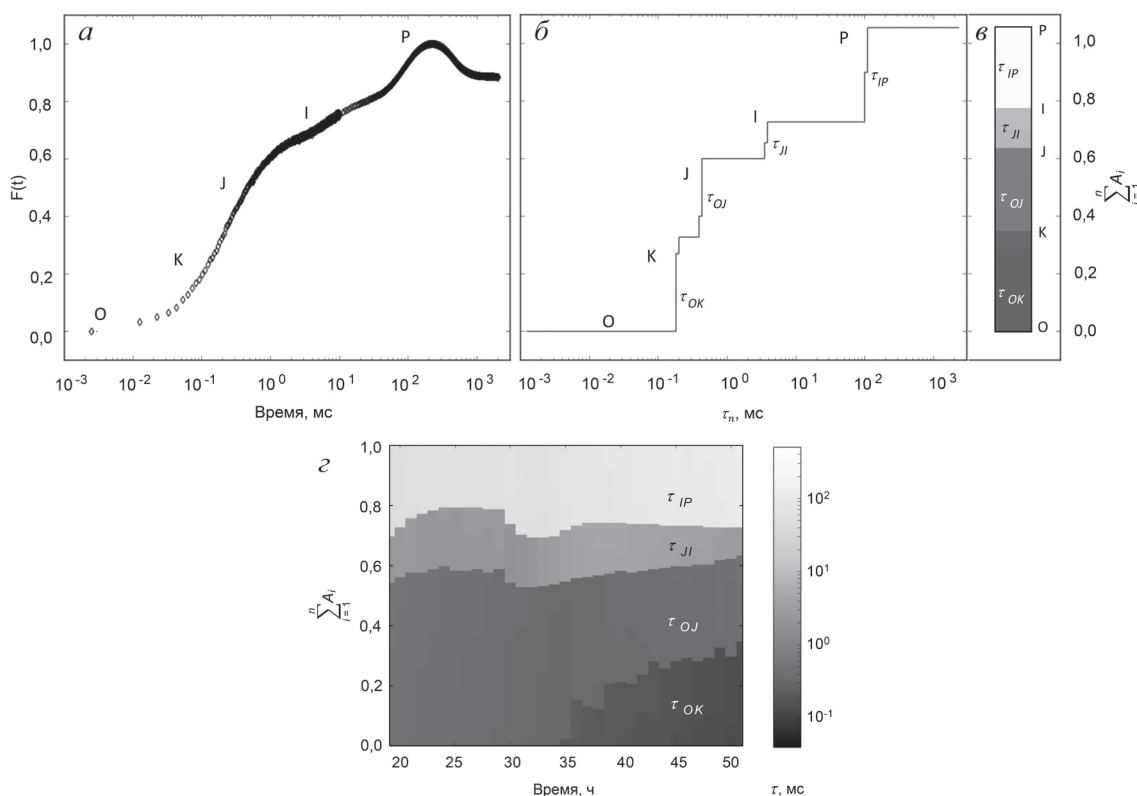


Рис. 5. Пример применения метода мультиэкспоненциальной аппроксимации (МЭА) для анализа кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a* голодающей по азоту культуры *Chlorella vulgaris*. *a* – ОЖР-кривая; *b* – результат ее разложения на экспоненты в начале культивации; *в* – представление амплитуд мультиэкспоненциального разложения в виде столбца теплокарты. Характерные времена идентифицированных фаз: $\tau_{OK} \sim 0,15\text{--}0,25$ мс; $\tau_{OJ} \sim 0,4\text{--}0,5$ мс; $\tau_{JI} \sim 2,6\text{--}4,2$ мс; $\tau_{IP} \sim 55\text{--}130$ мс. *г* – Теплокарта компонентного состава ОЖР-кривых в ходе культивации, по оси абсцисс отложено время в часах. Ширина и цвет полос отражают амплитуду и время жизни экспоненциальных компонентов индукционной кривой. По оси ординат слева – шкала амплитуд. Воспроизведено из статьи [88] под лицензией CC BY-NC-ND, © 2020 Plyusnina, T., Khrushev, S., Degtereva, N., Konyukhov, I., Solovchenko, A., Kouzmanova, M., Goltsev, V., Riznichenko, G., Rubin, A.

устойчивости фотосинтезирующих организмов к различным стрессовым факторам. Одно из ограничений его применения связано с тем, что времена индивидуальных фаз индукционной кривой не являются фиксированными. Поэтому хотя ОЈР-тест достаточно хорошо работает для зеленых растений, он не всегда может быть применен для водорослей и цианобактерий, форма индукционных кривых которых существенно отличается от классической [50].

Плюснина и Хрущев [87] разработали более универсальный метод анализа индукционных больших массивов кривых индукции флуоресценции — метод мультиэкспоненциальной аппроксимации (МЭА) и программное обеспечение ruPhotoSyn. Вместо полуэмпирической оценки стадий, используемой ранее в большинстве исследований, МЭА позволяет ввести более строгие и универсальные критерии оценки фаз. Основой метода является разложение регистрируемого сигнала на экспоненты и его представление в виде ряда экспонент. Кинетическая кривая индукции флуоресценции аппроксимируется мультиэкспоненциальным рядом N экспонент с фиксированными характеристическими временами τ_n :

$$F(t) = F_0 + \sum_{n=1}^N A_n(1 - e^{-t/\tau_n}), \quad (1)$$

где F_0 — минимальное значение на кривой индукции флуоресценции $F(t)$, A_n отражает вклад n -й экспоненты с характерным временем τ_n в общий сигнал, t — время.

Результат аппроксимации представляет собой набор амплитуд, каждая из которых соответствует выбранным фиксированным временам τ_n (спектр). Для случая, когда входной сигнал $F(t)$ представляет собой сумму экспоненциальных функций, спектр имеет вид отдельных полос с группами времен, близкими к характерным временам экспонент, составляющих входной сигнал. Ширина полосы определяется свойствами выбранного численного метода аппроксимации и наличием шума во входном сигнале. Характерные времена отдельных стадий переноса электрона в цепи фотосинтеза значительно различаются, и полосы хорошо разрешимы. Характерные времена отдельных компонентов ряда могут быть сопоставлены с конкретными процессами переноса электрона в фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

Мониторинг фотосинтетической активности культуры микроводорослей методом МЭА. Разработанные на кафедре биофизики автоматические методы регистрации индукционных кривых флуоресценции позволяют изучать происходящие в фотосинтетическом аппара-

те изменения путем измерения кинетических кривых индукции флуоресценции хлорофилла непосредственно в фотобиореакторе без нарушения физиологического состояния клеток [88]. Индукционные кривые флуоресценции регистрируются через относительно короткие интервалы времени и составляют в конечном итоге большой массив данных. Такое наблюдение за ростом культуры становится особенно актуальным при решении биотехнологических задач направленного синтеза, когда подбираются условия роста культур, обогащенных липидами, каротиноидами или выделяющих молекулярный водород.

Метод МЭА был применен для анализа изменений в фотосинтетическом аппарате при культивировании микроводорослей *Chlorella vulgaris* в условиях дефицита азота [89] и *C. reinhardtii* в условиях дефицита серы [84]. Дефицит минеральных компонентов приводит к изменению функционального состояния фотосинтетического аппарата и проявляется в изменении формы индукционных кривых флуоресценции. На рис. 5 изображена индукционная кривая флуоресценции для голодающей по азоту культуры *Chlorella vulgaris*, зарегистрированная сразу после начала инкубации (рис. 5, а), ее разложение на экспоненциальные составляющие, полученное методом МЭА с помощью пакета ruPhotoSyn (рис. 5, б), и представление этого разложения в виде столбца тепловой карты (рис. 5, в). На рис. 5, г представлена тепловая карта, иллюстрирующая динамику изменения вкладов экспоненциальных составляющих во времени.

Возможность анализировать большой массив индукционных кривых открывает хорошую перспективу для дальнейшего изучения динамики переходных процессов при минеральном голодании и действии других факторов стресса. Сопоставление с результатами анализа с помощью ЈР-теста, параллельные дополнительные измерения состава среды и клеточных компонентов: крахмала, липидов, каротиноидов — позволят с большей определенностью соотносить фазы индукционных кривых с физиологическими процессами клетки и использовать эту информацию в дальнейшем для проведения экспресс-анализа изменения состояния клетки под действием стресса.

ПРЯМОЕ МНОГОЧАСТИЧНОЕ КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Кинетические модели, построенные на основе математического аппарата обыкновен-

ных дифференциальных уравнений, исходят из предположения о гомогенном распределении компонентов системы в пространстве. В кинетических моделях процессов в фотосинтетической мембране предполагается, что мультиферментные комплексы PSI, PSII и цитохромные комплексы взаимодействуют с подвижными переносчиками в соответствии с законом действующих масс. Между тем в интерьере фотосинтетической мембраны взаимодействие белков не соответствует представлениям о свободной диффузии и случайных соударениях по типу реакций в растворах. Общее количество подвижных переносчиков, приходящееся на одну грану, как и количество малоподвижных в мембране реакционных центров, составляет десятки–сотни молекул, что значительно меньше необходимого количества для реализации представлений о свободных соударениях и законе действующих масс.

Результаты, полученные методом электронной микроскопии, свидетельствуют о плотном расположении мультиферментных комплексов в мембране, причем комплексы выступают на значительное расстояние внутрь люминального пространства [90–92]. Это делает невозможным свободную диффузию PQ во внутримембранном пространстве и ограничивает движение в люмене молекул подвижного переносчика Pс, передающего электроны с цитохромного комплекса на PSI. То же относится и к диффузии в стромальном пространстве, где молекулы Fd участвуют в переносе электронов по линейному пути и циклическому пути вокруг PSI.

Для описания образования реакционного комплекса двух взаимодействующих белков в растворе с целью предсказания структуры комплекса и оценки константы скорости его образования используются модели броуновской динамики (BD), основанные на математическом аппарате уравнений Ланжевена, которые описывают поступательное и вращательное движение белков под действием случайной броуновской силы и электростатических взаи-

модействий [93–95]. Однако в интерьере фотосинтетической мембраны необходимо рассматривать ансамбли десятков–сотен взаимодействующих молекул.

Для описания в явном виде броуновской диффузии подвижных белковых переносчиков как в растворе, так и в интерьере биологической мембраны нами разрабатываются прямые многочастичные броуновские модели. В этих моделях белки в количествах, составляющих десятки–сотни молекул на реакционный объем, могут быть подвижными, как Fd и FNR в строме тилакоида, или один из белков может быть подвижным, как Pс в люмене тилакоида, а второй – быть частью относительно неподвижного встроенного в мембрану мультиферментного комплекса (белок Cyt *f* – субъединица цитохромного *b₆f*-комплекса). Основы метода и результаты описаны в книгах [25, 26] и оригинальных статьях [58, 96–107].

Разрабатываемый нами метод прямого многочастичного моделирования позволяет использовать преимущества BD-метода, учитывающего роль формы белков и электростатических взаимодействий в процессах электронного транспорта, для изучения взаимодействия не отдельных белков, а их ансамблей в реакционных объемах сложной формы. Модель дает наглядное трехмерное визуальное представление о динамике процессов в системе на разных пространственных и временных масштабах, возможность наблюдать за поведением отдельных компонентов и получать усредненные статистические сведения по всему ансамблю. Пример сцены в модели многочастичной броуновской динамики представлен на рис. 6.

Молекулы белков – переносчиков электронов – осуществляют броуновское движение в среде и одновременно испытывают электростатические взаимодействия друг с другом и с заряженной поверхностью фотосинтетической мембраны. Как подтвердили результаты вычислительных экспериментов, процесс электростатической ориентации значительно

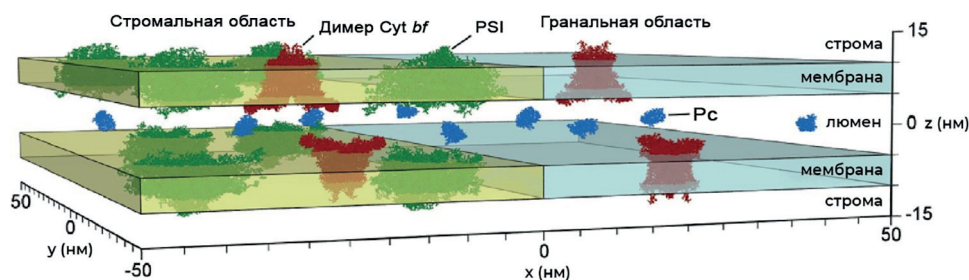


Рис. 6. Сцена в модели многочастичной броуновской динамики, участок фотосинтетической мембраны, на котором подвижный белок Pс осуществляет перенос электрона от Cyt *f* – субъединицы цитохромного комплекса, к донорной части PSI. Рисунок воспроизведен с разрешения издателя [99]

(на 1–2 порядка) увеличивает наблюдаемую кинетическую константу суммарной скорости реакции по сравнению с тем, как если бы белки соударялись случайными местами своих поверхностей в результате чисто броуновского движения без предварительной электростатической взаимной ориентации [104].

При сближении молекулы донора и акцептора способны образовывать белок-белковый комплекс. Подробное описание алгоритма моделирования процесса образования белок-белковых комплексов методом броуновской дина-

мики дано в оригинальных статьях [103, 104]. Модели броуновской динамики, в которых молекулы белков рассматриваются как твердые тела, способны описать образование именно такого диффузионно-столкновительного предварительного (encounter) комплекса. Первоначально образованный комплекс с течением времени может преобразоваться в финальный комплекс или развалиться под действием броуновской силы. К образованию финального реакционного комплекса приводит сложная последовательность процессов, обеспечиваю-

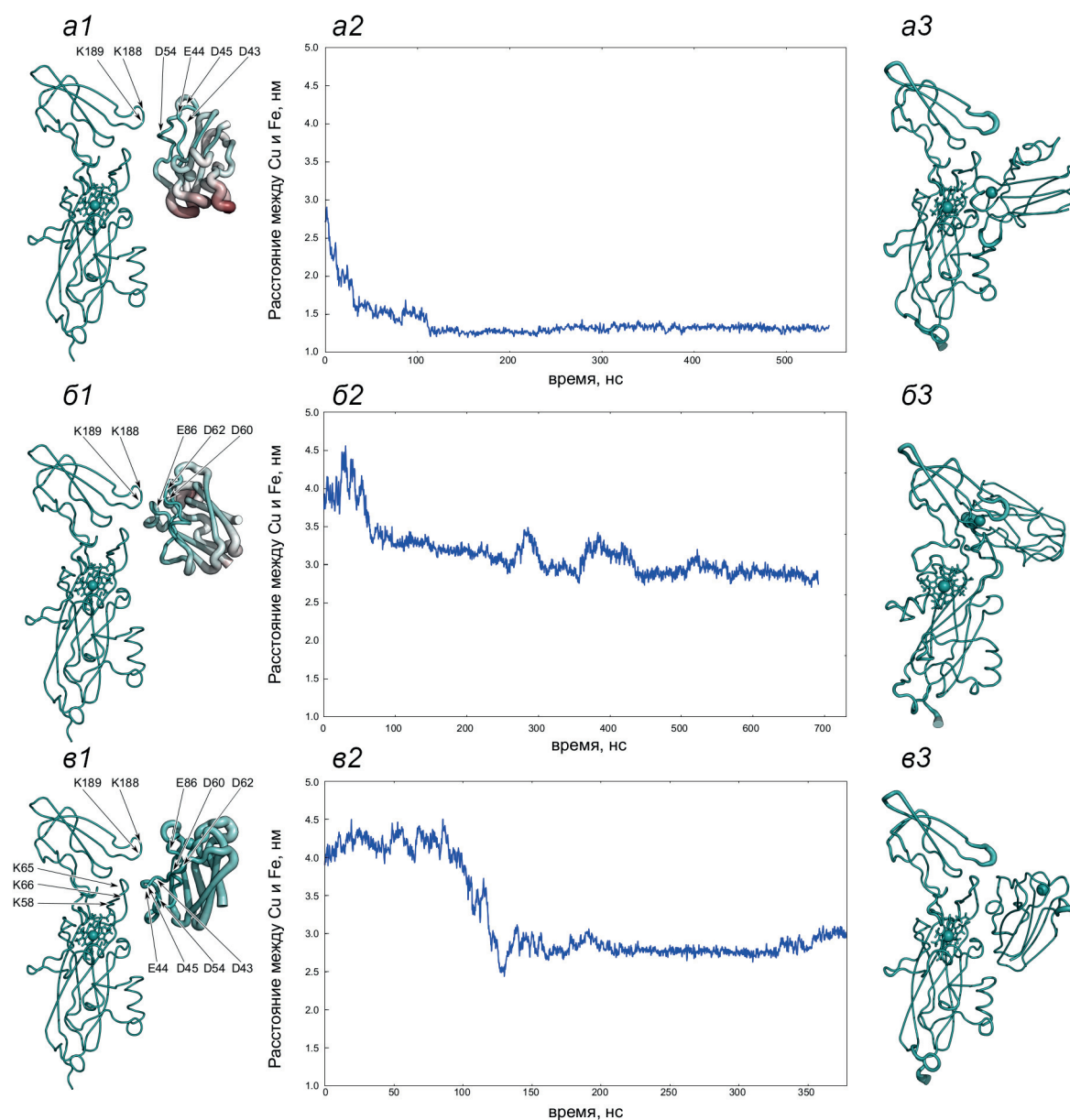


Рис. 7. Центральные структуры первого (*a1*), второго (*b1*) и третьего (*v1*) кластеров диффузионно-столкновительных комплексов пластоцианина и цитохрома *f* из зеленой водоросли *S. reinhardtii* с энергией электростатического притяжения более 8 кТ. *a2*, *b2*, *v2* – Расстояние между атомами меди и железа пластоцианина и цитохрома *f*, полученное из расчетов молекулярной динамики, имеющих в качестве начальных центральную структуру первого (*a1*), второго (*b1*) и третьего (*v1*) кластеров. *a3*, *b3*, *v3* – Структуры первого (*a1*), второго (*b1*) и третьего (*v1*) финальных комплексов, полученных из молекулярно-динамических расчетов. Рисунок воспроизведен с разрешения издателя [108]

ших конформационное соответствие молекул белков донора и акцептора. В финальном комплексе становится возможным туннельный перенос электрона между реакционными центрами белков донора и акцептора. Для описания конформационных движений в таком реакционном комплексе необходимо уже применение методов молекулярной динамики, а для описания переноса электрона с реакционного центра молекулы-донора на реакционный центр молекулы-акцептора внутри комплекса — применение методов квантовой химии.

Роль электростатических взаимодействий в образовании окислительно-восстановительного комплекса двух белков мы подробно изучали для пары фотосинтетических белков (переносчиков электрона) Pс и Cyt *f* [96, 104, 108]. Эти белки являются окислительно-восстановительными партнерами с четко локализованными реакционными центрами — атомами меди и железа соответственно. Конечные конфигурации молекул в группе наиболее часто встречающихся траекторий броуновской динамики, ведущие

к формированию предварительного комплекса, были затем использованы в качестве начальных для расчетов последующей внутримолекулярной динамики. На этом этапе в ходе молекулярно-динамического расчета происходило (либо не происходило) образование финального комплекса, где атом меди Pс и атом железа Cyt *f* сближались до расстояний, на которых осуществляется туннельный перенос электрона. На рис. 7 представлены результаты молекулярно-динамических расчетов взаимодействия Pс и Cyt *f* из зеленой водоросли *C. reinhardtii* [108].

Ансамбль образовавшихся в процессе диффузионного движения структур с внутренней энергией 8 кТ, разбивается на три кластера. Первый кластер (35% структур) значительно отличается от двух других. Его структуры имеют электростатический контакт, образованный противоположно заряженными областями Pс (D43, E44, D45 и D54) и Cyt *f* (K188 и K189). Область Pс, которая образует электростатическую связь с Cyt *f*, имеет низкую подвижность относительно Cyt *f*, в то время как противо-

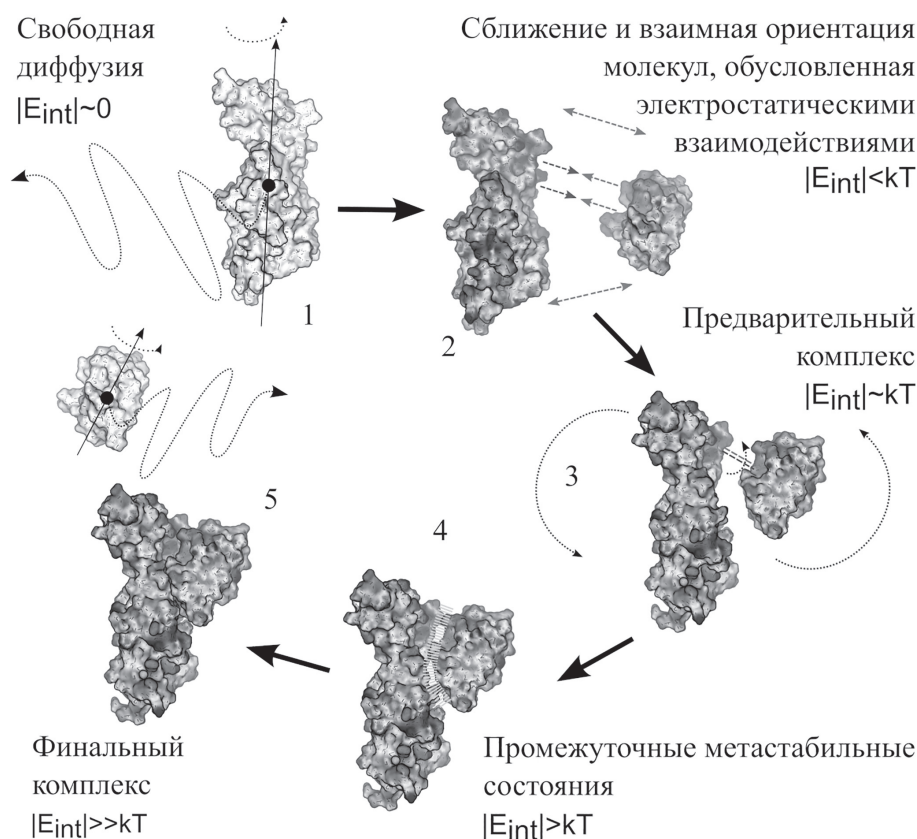


Рис. 8. Схема образования белок-белкового комплекса для электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f* из высших растений и зеленых микроводорослей. (1) — Свободная диффузия молекул; (2) — взаимная ориентация, обусловленная электростатическими взаимодействиями; (3) — формирование энергетически выгодных конформаций; (4) — трансформация диффузионно-столкновительного комплекса в метастабильное энергетически выгодное состояние; (5) — формирование финального комплекса (функционально активная конфигурация) путем конформационных изменений в рамках белок-белкового интерфейса. Поверхности белков окрашены в соответствии с их поверхностным потенциалом в диапазоне от -100 до 100 мВ. Рисунок воспроизведен с разрешения издателя [108]

положительная сторона молекулы Pс претерпевает большие флуктуации, что подтверждается распределением значений В-фактора, показанным на рис. 7, а1.

Второй кластер (25% структур) также имеет одноточечное соединение, но оно образовано другими областями, отличными от первого случая рис. 7, б1. Оно создается положительно заряженной петлей (K188 и K189) Cyt *f* и отрицательно заряженной петлей (D60, D62 и E86) пластоцианина. В этой ориентации вращательное движение молекулы Pс не способно повернуть его в ориентацию с минимальным расстоянием между кофакторами. В третьем ансамбле (9% структур) Pс перевернут относительно ориентации в функционально активном комплексе рис. 7, в1, и его движение значительно ограничено электростатическими взаимодействиями.

Дальнейшая трансформация центральных структур этих трех ансамблей была исследована методом молекулярной динамики. Молекулярно-динамический расчет, в котором белки в начальный момент времени имеют взаимную ориентацию как в центральной структуре первого кластера, завершается образованием стабильного комплекса с расстоянием между кофакторами около 1,2 нм, что происходит в первые 150 нс (рис. 7, а2). Отметим, что этот финальный комплекс похож на финальный комплекс, образованный центральной структурой «продуктивного» кластера высших растений [108]. Молекулярно-динамические расчеты с центральными структурами второго (рис. 7, б3) и третьего (рис. 7, в3) кластеров привели к образованию стабильных комплексов со сравнительно большими расстояниями (около 3 нм) между кофакторами белков. Исходя из расчетов молекулярной динамики видно, что структуры второго и третьего кластеров не могут легко достигнуть ориентации с расстоянием менее 2,5 нм между кофакторами, необходимым для туннелирования электрона. Таким образом потенциально продуктивным является только первый кластер (рис. 7, а).

Общая последовательность этапов образования электрон-транспортного комплекса белков Pс и Cyt *f* из высших растений и зеленых микроводорослей приведена на схеме на рис. 8.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общей целью динамического моделирования сложных систем является раскрытие закономерностей их поведения во времени и изменения во времени количественных характеристик взаимодействующих компонентов.

Ключевым условием адекватности модели реальному объекту является соответствие структуры модели и реальной системы, а также соответствие формы уравнений, механизмов и параметров взаимодействия составляющих ее элементов. Используемый математический аппарат должен соответствовать конкретным механизмам взаимодействий компонентов, таким как свободное соударение по закону действующих масс, диффузионные перемещения в вязкой среде, внутримолекулярные кооперативные переходы в макромолекулярных комплексах. Все это возможно адекватно отразить в модели только на основе независимых данных экспериментов или наблюдений.

По мере углубления наших знаний об устройстве фотосинтетического аппарата менялся и продолжает меняться арсенал применяемых математических методов. Этим обусловлен переход от обыкновенных дифференциальных уравнений кинетики в гомогенной среде к уравнениям, в которых, наряду с химическими членами, учитывается и диффузия веществ в гетерогенном реакционном пространстве.

На современных мощных компьютерах методом Монте-Карло можно адекватно воспроизводить процессы, одновременно происходящие в миллионах цепей активных белков, которые взаимодействуют друг с другом. В отдельных компартментах клетки, где взаимодействуют сравнительно небольшие ансамбли молекул, свою эффективность демонстрирует метод «прямого многочастичного моделирования». По-видимому, для выяснения механизмов клеточных процессов необходимы как модели, построенные на основе дифференциальных уравнений, детальные и упрощенные, допускающие качественное исследование, так и алгоритмические стохастические модели Монте-Карло, а также методы агентного многочастичного моделирования, воспроизводящие перемещения и взаимодействия отдельных подвижных макромолекул в клетке.

Компьютерное воспроизведение броуновского диффузионного сближения белков основано на учете действия случайных толчков, которые испытывают белковые молекулы со стороны ближайшего окружения. Влияние электростатических взаимодействий вносит существенную поправку в «случайность» происходящих встреч белков, вызывая их взаимную нужную ориентацию. Это фактически означает наличие фактора дальнедействующих взаимодействий, который придает «векторный» характер, казалось бы, чисто случайным блужданиям белков. Можно предположить, что этим не исчерпывается «векторизация» броуновского

движения в клетке и что возможно существование других дальнедействующих факторов взаимодействий в клетке. Например, правомерен вопрос о том, какой вклад в отбор случайных толчков может внести форма белковой глобулы по отношению к появлению преимущественного результирующего направления ее броуновского движения. Это может говорить о возможных скрытых пока от нас особенностях элементарных взаимодействий структурных элементов в живой системе, которые были выявлены и «целесообразно» использованы в биологии за миллионы лет эволюции на низших структурных уровнях организации живого.

Настоящий выпуск журнала «Биохимия» посвящен памяти академика Владимира Шувалова – признанного в мире авторитета в области фотобиологии и первичных процессов фотосинтеза. Экспериментальные данные, полученные им методом лазерной спектроскопии, позволили понять характер и природу, происходящих в фемтосекундном временном диапазоне в фотосинтетическом аппарате сверхбыстрых процессов, имеющих направленный характер и биологический смысл. Учет этих данных, несомненно, сыграет большую роль при моделировании совокупности процессов трансформации энергии в широком диапазоне времен, включая первичные фемтосекундные процессы.

Вклад авторов. Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин – концепция и руководство работой; Н.Е. Беляева, И.Б. Коваленко, Т.К. Антал, С.Н. Горячев, А.С. Маслаков, Т.Ю. Плюснина, В.А. Федоров, С.С. Хрущев, О.В. Яковлева – выполнение исследований, Г.Ю. Ризниченко – написание текста.

Финансирование. Работы выполнялись на кафедре биофизики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова в рамках научных проектов государственных заданий МГУ №№ 16-116021660040-7 и 121032500060-0. Частичное финансирование работ осуществлялось Российским фондом фундаментальных

исследований (грант № 20-04-00465) и Российским национальным фондом (гранты №№ 20-64-46018 и 22-11-00009).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам и аспирантам кафедры биофизики, многолетняя совместная работа которых сделала возможным получение результатов, представленных в данной статье. Мы благодарны Российскому фонду фундаментальных исследований за многолетнюю поддержку работ в области изучения фотосинтеза. Мы благодарны Центру коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова за возможность проводить вычисления по нашим моделям.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительная информация. Подробные материалы по кинетическому моделированию первичных процессов фотосинтеза и сопряженных процессов могут быть предоставлены по запросу соавтором данного обзора Натальей Евгеньевной Беляевой (электронная почта: natalmurav@yandex.ru). Подробное описание алгоритма стохастической модели дано в оригинальной статье автора кода Алексея Сергеевича Маслакова [71], соавтора данного обзора, детали могут быть им предоставлены по запросу, электронная почта: alexei.maslakov@gmail.com. Разработанное программное обеспечение для моделирования взаимодействия белков методом броуновской динамики ProKSim может быть предоставлено по запросу автором Сергеем Сергеевичем Хрущевым, электронная почта: styx@biophys.msu.ru. Полученные методами молекулярной динамики белок-белковые комплексы *Cyt f*-Pс зеленых растений, зеленых водорослей и цианобактерий могут быть предоставлены по запросу соавтором данного обзора Владимиром Андреевичем Федоровым, электронная почта: xbgth@yandex.ru.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amesz, J. (1987) *Photosynthesis*, Elsevier.
2. Rabinowitch, E., and Govindjee (1969) *Photosynthesis*, Wiley, NY.
3. Hall, D. O., and Rao, K. (1999) *Photosynthesis*, Cambridge University Press, Cambridge.
4. Ke, B. (2006) *Photosynthesis: Photobiochemistry and Photobiophysics*, Springer Science & Business Media.
5. Nelson, N., and Yocum, C. F. (2006) Structure and function of photosystems I and II, *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **57**, 521-565, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350.
6. Barber, J. (2015) *The photosystems: structure, function and molecular biology*, Elsevier.
7. Barber, J., and Ruban, A. V. (2017) *Photosynthesis and bioenergetics*, World Scientific.

8. Рубин А. Б. (2017) *Биофизика*, часть 3, ИКИ, М.–Ижевск.
9. Shevela, D., Bjorn, L., and Govindjee (2019) *Photosynthesis: Solar Energy for Life*, World Scientific, Singapore, doi: 10.1142/10522.
10. Stirbet, A., Lazar, D., Guo, Y., and Govindjee (2020) Photosynthesis: basics, history and modelling, *Ann. Bot.* **126**, 511-537, doi: 10.1093/aob/mcz171.
11. Ruban, A. V. (2012) *The Photosynthetic Membrane: Molecular Mechanisms and Biophysics of Light Harvesting*, Wiley, doi: 10.1007/s11120-014-0015-7.
12. Kouřil, R., Oostergetel, G. T., and Boekema, E. J. (2011) Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1807**, 368-374, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.11.007.
13. Kooshak, H., Puthiyaveetil, S., Mullendore, D. L., Li, M., and Kirchhoff, H. (2019) The structural and functional domains of plant thylakoid membranes, *Plant J.*, **97**, 412-429, doi: 10.1111/tbj.14127.
14. Rantala, M., Rantala, S., and Aro, E.-M. (2020) Composition, phosphorylation and dynamic organization of photosynthetic protein complexes in plant thylakoid membrane, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **19**, 604-619, doi: 10.1039/D0PP00025F.
15. Holzappel, C., and Bauer, R. (1975) Computer simulation of primary photosynthetic reactions compared with experimental results on O₂-exchange and chlorophyll fluorescence of green plants, *Z. Naturforsch.*, **30**, 489-498, doi: 10.1515/znc-1975-7-812.
16. Кукушкин А. К., Тихонов А. Н., Блюменфельд Л. А., Рууге Э. К. (1975) Теоретические аспекты кинетики первичных процессов фотосинтеза высших растений и водорослей, *Физиол. растений*, **22**, 241-250.
17. Malkin, S. (1971) Fluorescence induction studies in isolated chloroplast. On the electron-transfer equilibrium in the pool of electron acceptors of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **234**, 425-427, doi: 10.1016/0005-2728(71)90208-8.
18. Сорокин Е. М. (1973) Нециклический транспорт электронов и связанные с ним вопросы, *Физиол. растений*, **20**, 733-741.
19. Рубин А. Б., Шинкарев В. П. (1984) *Транспорт электронов в биологических системах*, Наука, Москва.
20. Ризниченко Г. Ю., Воробьева Т. Н., Храброва Е. Н., Рубин А. Б. (1986) Сравнительный анализ кинетических и конформационных характеристик солюбилизованных и встроенных в липосомы пигмент-белковых комплексов фотосистемы I высших растений, *Биофизика*, **31**, 793-799.
21. Riznichenko, G. Yu., Chrabrova, E. N., and Rubin, A. B. (1988) Identification of the parameters of photosynthetic electron transport system, *Studia Biophys.*, **126**, 51-59.
22. Rubin, A. B., and Riznichenko, G. Yu. (2009) Modeling of the primary processes in a photosynthetic membrane, in *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 29 (Laisk, A., Nedbal, L., and Govindjee, eds) Springer, Dordrecht, doi: 10.1007/978-1-4020-9237-4_7.
23. Riznichenko, G. Yu., Vorobjeva, T. N., Khrabrova, E. N., and Rubin, A. B. (1990) Identification of kinetic parameters of plastocyanin and P-700 interactions in chloroplasts and pigment-protein complexes of photosystem I, *Photosynthetica*, **24**, 495-501.
24. Ризниченко Г. Ю. (1991) Математические модели первичных процессов фотосинтеза, *Успехи науки и техники, серия Биофизика, том 31*, ВИНТИ, Москва.
25. Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. (2020) *Динамические модели электронного транспорта в фотосинтезе*, Изд. ИКИ, Ижевск.
26. Rubin, A. B., and Riznichenko, G. Yu. (2014) *Mathematical Biophysics*, Springer, N.Y., doi: 10.1007/978-1-4614-8702-9.
27. Schatz, G. H., Brock, H., and Holzwarth, A. R. (1988) Kinetic and energetic model for the primary processes in photosystem II, *Biophys. J.*, **54**, 397-405, doi: 10.1016/S0006-3495(88)82973-4.
28. Roelofs, T. A., Lee, C.-H., and Holzwarth, A. R. (1992) Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea chloroplasts: a new approach to the characterization of the primary processes in photosystem II α - and β -units, *Biophys. J.*, **61**, 1147-1163, doi: 10.1016/S0006-3495(92)81924-0.
29. Baake, E., and Shloeder, J. P. (1992) Modelling the fast fluorescence rise of photosynthesis, *Bull. Math. Biol.*, **54**, 999-1021, doi: 10.1007/BF02460663.
30. Bouges-Bocquet, B. (1973) Electron transfer between two photosystems in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **31**, 250-256, doi: 10.1016/0005-2728(73)90140-0.
31. Velthuys, B. R., and Amesz, J. (1974) Charge accumulation at the reducing side of Photosystem 2 of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 85-94, doi: 10.1016/0005-2728(74)90165-0.
32. Stirbet, A., Govindjee, Strasser, B. J., and Strasser, R. J. (1998) Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: modelling and numerical simulation, *J. Theor. Biol.*, **193**, 131-151, doi: 10.1006/jtbi.1998.0692.
33. Stirbet, A., and Govindjee (2012) Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise, *Photosynth. Res.*, **113**, 15-61, doi: 10.1007/s11120-012-9754-5.
34. Stirbet A., and Govindjee (2016) The slow phase of chlorophyll a fluorescence induction *in silico*: origin of the S–M fluorescence rise, *Photosynth. Res.*, **130**, 193-213, doi: 10.1007/s11120-016-0243-0.

35. Vredenberg, W. J. (2000) A 3-state model for energy trapping and fluorescence in PS II incorporating radical pair recombination, *Biophys. J.*, **79**, 26-38, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76271-0.
36. Lazár, D. (2003) Chlorophyll *a* fluorescence rise induced by high light illumination of dark adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity, *J. Theor. Biol.*, **220**, 469-503, doi: 10.1006/JTBI.2003.3140.
37. Lazár, D. (2009) Modelling of light-induced chlorophyll *a* fluorescence rise (O–J–I–P transient) and changes in 820 nm-transmittance signal of photosynthesis, *Photosynthetica*, **47**, 483-498, doi: 10.1007/s11099-009-0074-8.
38. Lazár, D. (2013) Simulations show that a small part of variable chlorophyll *a* fluorescence originates in photosystem I and contributes to overall fluorescence rise, *J. Theor. Biol.*, **335**, 249-264, doi: 10.1016/j.jtbi.2013.06.028.
39. Belyaeva, N. E., Bulychev, A. A., Riznichenko, G. Yu., and Rubin, A. B. (2016) Thylakoid membrane model of the Chl *a* fluorescence transient and P700 induction kinetics in plant leaves, *Photosynth. Res.*, **130**, 491-515, doi: 10.1007/s11120-016-0289-z.
40. Belyaeva, N. E., Bulychev, A. A., Riznichenko, G. Yu., and Rubin, A. B. (2019) Analyzing both the fast and the slow phases of chlorophyll *a* fluorescence and P700 absorbance changes in dark-adapted and preilluminated pea leaves using a Thylakoid Membrane model, *Photosynth. Res.*, **140**, 1-19, doi: 10.1007/s11120-019-00627-8.
41. Belyaeva, N. E., Bulychev, A. A., Klementiev, K. E., Paschenko, V. Z., Riznichenko, G. Yu., et al. (2020) Model quantification of the light-induced thylakoid membrane processes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 *in vivo* and after exposure to radioactive irradiation, *Photosynth. Res.*, **146**, 259-278, doi: 10.1007/s11120-020-00774-3.
42. Ebenhoh, O., Fucile, G., Finazzi, G. G., Rochaix, J.-D., and Goldschmidt-Clermont, M. (2014) Short-term acclimation of the photosynthetic electron transfer chain to changing light: a mathematical model, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **369**, 20130223, doi: 10.1098/rstb.2013.0223.
43. Matuszyńska, A., Heidari, S., Jahns, P., and Ebenhoh, O. (2016) A mathematical model of non-photochemical quenching to study short-term light memory in plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1860-1869, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.09.003.
44. Feng, S., Fu, L., Xia, Q., Tan, J., Jiang, Y., and Guo, Y. (2018) Modelling and simulation of photosystem II chlorophyll fluorescence transition from dark-adapted state to light-adapted state, *IET Syst. Biol.*, **12**, 289-293, doi: 10.1049/iet-syb.2018.5003.
45. Laisk, A., Nedbal, L., and Govindjee (2009) Photosynthesis *in silico*: understanding complexity from molecules to ecosystems, in *Advances in photosynthesis and respiration* (Govindjee, and Sharkey, T. D., eds) Springer, Dordrecht, **29**, doi: 10.1093/aob/mcq022.
46. Zhu, X. G., Wang, Y., Ort, D. R., and Long, S. P. (2013) e-Photosynthesis: a comprehensive dynamic mechanistic model of C3 photosynthesis: from light capture to sucrose synthesis, *Plant Cell Environ.*, **36**, 1711-1727, doi: 10.1111/pce.12025.
47. Вершубский А. В., Невьянцев С. М., Тихонов А. Н. (2018) Моделирование электронного и протонного транспорта в мембранах хлоропластов с учетом тиоредоксин-зависимой активации цикла Кальвина–Бенсона и АТФ-синтазы, *Биологические мембраны*, **35**, 87-103, doi: 10.7868/S0233475518020019.
48. Вершубский А. В., Тихонов А. Н. (2019) pH-зависимая регуляция электронного и протонного транспорта в хлоропластах *in situ* и *in silico*, *Биологические мембраны*, **36**, 242-254, doi: 10.1134/S0233475519040121.
49. Saadat, N. P., Nies, T., van Aalst, M., Hank, B., Demirtas, B., et al. (2021) Computational analysis of alternative photosynthetic electron flows linked with oxidative stress, *Front. Plant Sci.*, **12**, doi: 10.3389/fpls.2021.750580.
50. Штирбет А., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б., Говинджи (2014) Моделирование кинетики флуоресценции хлорофилла *a*: связь с фотосинтезом, *Биохимия*, **79**, 379-412, doi: 10.1134/S0006297914040014.
51. Riznichenko, G. Yu., Lebedeva, G. V., Demin, O. V., and Rubin, A. B. (1999) Kinetic mechanisms of biological regulation in photosynthetic organisms, *J. Biol. Phys.*, **25**, 177-192, doi: 10.1023/A:100510170318.
52. Лебедева Г. В., Беляева Н. Е., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б., Демин О. В. (2000) Кинетическая модель фотосистемы II высших растений, *Журнал физ. химии*, **74**, 1874-1883.
53. Лебедева Г. В., Беляева Н. Е., Демин О. В., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. (2002) Кинетическая модель первичных процессов фотосинтеза в хлоропластах. Описание быстрой фазы индукции флуоресценции хлорофилла при различной интенсивности света, *Биофизика*, **47**, 1044-1058.
54. Belyaeva, N. E., Schmitt, F.-J., Steffen, R., Paschenko, V. Z., Riznichenko, G. Yu., et al. (2008) PSII model-based simulations of single turnover flash-induced transients of fluorescence yield monitored within the time domain of 100 ns-10 s on dark-adapted *Chlorella pyrenoidosa* cells, *Photosyn. Res.*, **9**, 105-119, doi: 10.1007/s11120-008-9374-2.
55. Belyaeva, N. E., Schmitt, F.-J., Paschenko, V. Z., Riznichenko, G. Yu., Rubin, A. B., et al. (2011)

- PS II model based analysis of transient fluorescence yield measured on whole leaves of *Arabidopsis thaliana* after excitation with light flashes of different energies, *BioSystems*, **103**, 188-195, doi: 10.1016/j.biosystems.2010.09.014.
56. Schansker, G., Tóth, S. Z., Kovács, L., Holzwarth, A. R., and Garab, G. (2011) Evidence for a fluorescence yield change driven by a light-induced conformational change within photosystem II during the fast chlorophyll a fluorescence rise, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1807**, 1032-1043, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.05.022.
57. Magyar, M., Sipka, G., Kovács, L., Ughy, B., Zhu, Q., et al. (2018) Rate-limiting steps in the dark-to-light transition of Photosystem II – revealed by chlorophyll-*a* fluorescence induction, *Sci. Rep.*, **8**, 2755, doi: 10.1038/s41598-018-21195-2.
58. Устинин Д. М., Коваленко И. Б., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. (2013) Сопряжение различных методов компьютерного моделирования в комплексной модели фотосинтетической мембраны, *Компьютерные исследования и моделирование*, **5**, 65-81, doi: 10.20537/2076-7633-2013-5-1-65-81.
59. Duysens L. N. M., and Sweers, H. E. (1963) Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence, *Photosynth. Bacteria*, **372**, 353-372.
60. Zhu, X.-G., Govindjee, Baker, N. R., deSturler, E., Ort, D. R., et al. (2005) Chlorophyll *a* fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete set of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II, *Planta*, **223**, 114-133, doi: 10.1007/s00425-005-0064-4.
61. Xin, C.-P., Yang, J., and Zhu, X.-G. (2013) A model of chlorophyll *a* fluorescence induction kinetics with explicit description of structural constraints of individual photosystem II units, *Photosynth. Res.*, **117**, 339-354, doi: 10.1007/s11120-013-9894-2.
62. Belyaeva, N. E., Schmitt, F.-J., Paschenko, V. Z., Riznichenko, G. Yu., Rubin, A. B., et al. (2014) Model based analysis of transient fluorescence yield induced by actinic laser flashes in spinach leaves and cells of green algae *Chlorella pyrenoidosa* Chick, *Plant Physiol. Biochem.*, **77**, 49-59, doi: 10.1016/j.plaphy.2014.01.017.
63. Belyaeva, N. E., Schmitt, F.-J., Paschenko, V. Z., Riznichenko, G. Yu., and Rubin, A. B. (2015) Modelling of the redox state dynamics in photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa* Chick cells and leaves of spinach and *Arabidopsis thaliana* from single flash induced fluorescence quantum yield changes on the 100 ns-10 s time scale, *Photosynth. Res.*, **125**, 123-140, doi: 10.1007/s11120-015-0163-4.
64. Беляева Н. Е., Булычев А. А., Пашенко В. З., Клементьев К. Е., Ермаченко П. А., и др. (2022) Динамика процессов в тилакоидных мембранах водорослей *in vivo*, изучаемая в моделях Фотосистемы II и тилакоида по измерениям индукции флуоресценции, *Биофизика*, **67**, doi: 10.31857/S00063029220250.
65. Antal, T. K., Kovalenko, I. B., Rubin, A. B., and Tyystjärvi, E. (2013) Photosynthesis-related quantities for education and modeling, *Photosynth. Res.*, **117**, 1-30, doi: 10.1007/s11120-013-9945-8.
66. Matuszyńska, A., Saadat, N.P., and Ebenhoh, O. (2019) Balancing energy supply during photosynthesis – a theoretical perspective, *Physiol. Plant.*, **166**, 392-402, doi: 10.1111/pp1.12962.
67. Snellenburg, J., Johnson, M. P., Ruban, A. V., van Grondelle, R., and van Stokkum, I. H. M. (2017) A four state parametric model for the kinetics of the non-photochemical quenching in Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 854-864, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.004.
68. Morales, A., Yin, X., Harbinson, J., Driever, S. M., Molenaar, J., et al. (2018) *In silico* analysis of the regulation of the photosynthetic electron transport chain in C3 plants, *Plant Physiol.*, **176**, 1247-1261, doi: 10.1104/pp.17.00779.
69. Mathur, S., Sunoj, V., Elsheery, N., Jajoo, A., and Cao, K.-F. (2021) Regulation of Photosystem II heterogeneity and photochemistry in two cultivars of C4 crop sugarcane under chilling stress, *Front. Plant Sci.*, **12**, doi: 10.3389/fpls.2021.627012.
70. Antal, T. K., Maslakov, A. S., Yakovleva, O. V., Krendeleva, T. E., Riznichenko, G. Yu., et al. (2018) Simulation of chlorophyll fluorescence rise and decay kinetics, and P700-related absorbance changes by using a rule-based kinetic Monte-Carlo method, *Photosyn. Res.*, **138**, 191-206, doi: 10.1007/s11120-018-0564-2.
71. Suslichenko I. S., Trubitsin B. V., Vershubskii A. V., and Tikhonov A. N. (2022) The noninvasive monitoring of the redox status of photosynthetic electron transport chains in *Hibiscus rosa-sinensis* and *Tradescantia* leaves, *Plant Physiol. Biochem.*, **185**, 233-243, doi: 10.1016/j.plaphy.2022.06.002.
72. Маслаков А. С. (2020) Описание процессов в ансамблях фотосинтетических реакционных центров с помощью кинетической модели типа Монте-Карло, *Компьютерные исследования и моделирование*, **12**, 1207-1221, doi: 10.20537/2076-7633-2020-12-5-1207-1221.
73. Antal, T. K., Kolacheva, A., Maslakov, A., Riznichenko, G. Yu., Krendeleva, T. E., et al. (2013) Study of the effect of reducing conditions on the initial chlorophyll fluorescence rise in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photosynth. Res.*, **114**, 143-215, doi: 10.1007/s11120-012-9789-7.
74. Joliot, P., and Joliot, A. (1981) Characterization of photosystem II centers by polarographic, spectroscopic and fluorescence methods. In *Photosynthesis III* (Akoyunoglou, G., ed.) Balaban International Science Services, Philadelphia, pp. 885-899.

75. Guo, Y., and Tan, J. (2014) Kinetic Monte-Carlo simulation of the initial phases of chlorophyll fluorescence from photosystem II, *BioSystems*, **115**, 1-4, doi: 10.1016/j.biosystems.2013.10.004.
76. Ruban, A., Foyer, C., and Murchie, E. (2022) *Photosynthesis in Action: Harvesting Light, Generating Electrons, Fixing Carbon*, Academic Press, doi: 10.1016/C2020-0-00724-3.
77. Staehelin, L. A., and Paolillo, D. J. (2020) A brief history of how microscopic studies led to the elucidation of the 3D architecture and macromolecular organization of higher plant thylakoids, *Photosynth. Res.*, **145**, 237-258, doi: 10.1007/s11120-020-00782-3.
78. Pospíšil, P., and Dau, H. (2002) Valinomycin sensitivity proves that light induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients, *Biochim. Biophys. Acta*, **1554**, 94-100, doi: 10.1016/s0005-2728(02)00216-5.
79. Boisvert, S., Joly, D., and Carpentier, R. (2006) Quantitative analysis of the experimental O-I-J-P kinetic fluorescence induction kinetics. Apparent activation energy and origin of each kinetic step, *FEBS J.*, **273**, 4770-4777, doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05475.x.
80. Vredenberg, W. J. (2008) Algorithm for analysis of OJDIP fluorescence induction curves in terms of photo- and electrochemical events in photosystems of plant cells: derivation and application, *J. Photochem. Photobiol. B*, **91**, 58-65, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.01.005.
81. Vredenberg, W., and Prasil, O. (2009) Modeling of chlorophyll *a* fluorescence kinetics, in *Photosynthesis in silico: Understanding Complexity from Molecules to Ecosystems* (Laisk, A., Nedbal, L., and Govindjee, eds) Dordrecht, Springer, **29**, 125-149, doi: 10.1007/978-1-4020-9237-4_6.
82. Strasser, B. J., and Strasser, R. J. (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test, in *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (Mathis, P., ed.), Kluwer Academic, The Netherlands, **5**, 977-980, doi: 10.1007/978-94-009-0173-5_1142.
83. Solovchenko, A., Aflalo, C., Lukyanov, A., and Boussiba, S. (2013) Nondestructive monitoring of carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* via wholecell optical density spectra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 4533-4541, doi: 10.1007/s00253-012-4677-9.
84. Плюснина Т. Ю., Хрущев С. С., Фролов А. Е., Дегтерева Н. С., Конюхов И. В., и др. (2019) Мониторинг фотосинтетической активности культуры микроводорослей *Chlorella* при истощении азота в среде, *Биофизика*, **64**, 468-477, doi: 10.1134/S0006302919030062.
85. Kalaji, H. M., Oukarroum, A., Alexandrov, V., Kouzmanova, M., Brestic, M., et al. (2014) Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence measurements, *Plant Physiol. Biochem.*, **81**, 16-25, doi: 10.1016/j.plaphy.2014.03.029.
86. Stirbet, A., Lazar, D., Kromdijk, J., and Govindjee (2018) Chlorophyll *a* fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynthetica*, **56**, 86-104, doi: 10.1007/s11099-018-0770-3.
87. Плюснина Т. Ю., Хрущев С. С., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. (2015) Анализ кинетики индукции флуоресценции хлорофилла с помощью спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации, *Биофизика*, **60**, 487-495, doi: 10.1134/S000635091503015X.
88. Antal, T., Konyukhov, I., Volgusheva, A., Plyusnina, T., Khruschev, S., et al. (2019) Chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors, *Physiol. Plant.*, **165**, 476-486, doi: 10.1111/ppl.12693.
89. Plyusnina, T., Khruschev, S., Degtereva, N., Konyukhov, I., Solovchenko, A., et al. (2020) Gradual changes in the photosynthetic apparatus triggered by nitrogen depletion during microalgae cultivation in photobioreactor, *Photosynthetica*, **58**, 443-451, doi: 10.32615/ps.2020.002.
90. Kirchhoff, H., Mukherjee, U., and Galla, H. J. (2002) Molecular architecture of the thylakoid membrane: lipid diffusion space for plastoquinone, *Biochemistry*, **41**, 4872-4882, doi: 10.1021/bi101650y.
91. Albertsson, P.-A. (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane, *Trends Plant. Sci.*, **6**, 349-354, doi: 10.1016/s1360-1385(01)02021-0.
92. McKenzie, S. D., Ibrahim, I. M., Aryal, U. K., and Puthiyaveetil, E. (2020) Stoichiometry of protein complexes in plant photosynthetic membranes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1861**, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.148141.
93. Pearson Jr., D. C., and Gross, E. L. (1998) Brownian dynamics study of the interaction between plastocyanin and cytochrome *f*, *Biophys. J.*, **75**, 2698-2711, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77714-8.
94. Gross, E. L., and Rosenberg, I. (2006) A Brownian dynamics study of the interaction of *Phormidium* cytochrome *f* with various cyanobacterial plastocyanins, *Biophys. J.*, **90**, 366-380, doi: 10.1529/biophysj.105.065185.
95. Хрущев С. С., Абатурова А. М., Дьяконова А. Н., Федоров В. А., Устинин Д. М., и др. (2015) Моделирование взаимодействий белков фотосинтетической электрон-транспортной цепи фотосинтеза методом броуновской динамики, *Биофизика*, **60**, 270-292, doi: 10.1134/S0006350915020086.
96. Kovalenko, I. B., Abaturova, A. M., Gromov, P. A., Ustinin, D. M., Grachev, E. A., et al. (2006) Direct simulation of plastocyanin and cytochrome *f*

- interactions in solution, *Phys. Biol.*, **3**, 121-129, doi: 10.1088/1478-3975/3/2/004.
97. Kovalenko, I. B., Diakonova, A. N., Abaturova, A. M., Riznichenko, G. Yu., and Rubin, A. B. (2010) Direct computer simulation of ferredoxin and FNR complex formation in solution, *Phys. Biol.*, **7**, 026001, doi: 10/1088/1478-3975/7/2/026001.
98. Kovalenko, I. B., Diakonova, A. N., Riznichenko, G. Yu., and Rubin, A. B. (2011) Computer simulation of interaction of photosystem 1 with plastocyanin and ferredoxin, *BioSystems.*, **103**, 180-187, doi: 10.1016/j.biosystems.2010.09.013.
99. Kovalenko, I. B., Knyaseva, O. S., Antal, T. K., Ponomarev, V., Riznichenko, G. Yu., et al. (2017) Multiparticle Brownian dynamics simulation of experimental kinetics of cytochrome *bf* oxidation and photosystem 1 reduction by plastocyanin, *Physiol. Plant.*, **161**, 88-96, doi: 10.1111/ppl.12570.
100. Князева О. С., Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Ризниченко Г. Ю., Грачев Е. А., и др. (2010) Многочастичная модель диффузии и взаимодействия пластоцианина с цитохромом *f* в электростатическом поле фотосинтетической мембраны, *Биофизика*, **55**, 259-268, doi: 10.1134/S0006350910020090.
101. Riznichenko, G. Yu., Kovalenko, I. B., Abaturova, A. M., Diakonova, A. N., Ustinin, D. M., et al. (2010) New direct dynamic models of protein interactions coupled to photosynthetic electron transport reactions, *Biophys. Rev.*, **2**, 101-110, doi: 10.1007/s12551-010-0033-4.
102. Riznichenko, G. Yu., and Kovalenko, I. B. (2019) Multiparticle models of Brownian dynamics for the description of photosynthetic electron transfer involving protein mobile carriers, *Int. J. Appl. Res. Bioinform.*, **9**, 1-19, doi: 10.4018/IJARB.2019010101.
103. Хрущев С. С., Абатурова А. М., Дьяконова А. Н., Устинин Д. М., Зленко Д. В., и др. (2013) Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса много-частичной броуновской динамики ProKSim, *Компьютерные исследования и моделирование*, **5**, 47-64, doi: 10.20537/2076-7633-2013-5-1-47-64.
104. Хрущев С. С., Абатурова А. М., Федоров В. А., Коваленко И. Б., Ризниченко Г. Ю., и др. (2015) Идентификация промежуточных состояний в процессе диффузионного сближения электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f*, *Биофизика*, **60**, 629-638, doi: 10.1134/S0006350915040156.
105. Diakonova, A. N., Khrushchev, S. S., Kovalenko, I. B., Riznichenko, G. Yu., and Rubin A. B. (2016) Influence of pH and ionic strength on electrostatic properties of ferredoxin, FNR, and hydrogenase and the rate constants of their interaction, *Phys. Biol.*, **13**, 056004, doi: 10.1088/1478-3975/13/5/056004.
106. Дьяконова А. Н., Хрущев С. С., Коваленко И. Б., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. (2016) Роль электростатических взаимодействий при образовании комплексов ферредоксин-ferredоксин-НАДФ⁺-редуктаза и ферредоксин-гидрогеназа, *Биофизика*, **61**, 677-685, doi: 10.1134/S0006350916040060.
107. Riznichenko, G. Yu., Plyusnina, T. Yu., Diakonova, A. N., Kovalenko, I. B., Khrushchev, S. S., et al. (2017) pH regulation of hydrogen-generating microalgae photosynthetic chain. Kinetic and multiparticle Brownian models, *Nonlinearity: Problems, Solutions and Applications*, Science Publishers, Inc., United States, pp. 181-202.
108. Fedorov, V. A., Kovalenko, I. B., Khrushchev, S. S., Ustinin, D. M., Antal, T. K., et al. (2019) Comparative analysis of plastocyanin-cytochrome *f* complex formation in higher plants, green algae and cyanobacteria, *Physiol. Plant.*, **166**, 320-335, doi: 10.1111/ppl.12940.

MATHEMATICAL SIMULATION OF ELECTRON TRANSPORT IN THE PRIMARY PHOTOSYNTHETIC PROCESSES

Review

G. Yu. Riznichenko^{1*}, N. E. Belyaeva¹, I. B. Kovalenko¹, T. K. Antal², S. N. Goryachev¹,
A. S. Maslakov¹, T. Yu. Plyusnina¹, V. A. Fedorov¹, S. S. Khrushchev¹,
O. V. Yakovleva¹, and A. B. Rubin¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Biophysics,
119234 Moscow, Russia; E-mail: riznich46@mail.ru

² Pskov State University, 180000 Pskov, Russia

A review of the results of work on the study of the regulation of electron transport and associated processes in the photosynthetic membrane by the methods of mathematical and computer modeling, carried out at the Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, is presented. Detailed

kinetic models of processes in the thylakoid membrane were developed using the apparatus of differential equations. Fitting the model curves according to the data of spectral measurements made allowed us to estimate the values of parameters that are inaccessible to direct experimental measurement. The probabilistic method of agent-based Monte Carlo modeling provides ample opportunities for studying the dynamics of heterogeneous systems based on the rules for the behavior of individual elements of the system. Algorithms for simplified representation of Big Data make it possible to monitor changes in the photosynthetic apparatus in the course of culture growth in a photobioreactor and for the purpose of environmental monitoring. Brownian and molecular models describe the movement and interaction of individual electron carrier proteins and make it possible to study electrostatic, hydrophobic and other interactions leading to the regulation of conformational changes in reaction complexes. Direct multiparticle models explicitly simulate the Brownian diffusion of mobile protein carriers and their electrostatic interactions with multienzyme complexes both in solution and in the heterogeneous interior of a biomembrane. The combined use of methods of kinetic and Brownian multiparticle and molecular modeling makes it possible to study the mechanisms of regulation of an integral system of electron transport processes in subcellular and in plants and algae.

Keywords: photosynthesis, electron transport, fluorescence, kinetic models, Brownian multiparticle models, molecular modeling

ОКИСЛЕНИЕ ПЛАСТОХИНОЛА – ЛИМИТИРУЮЩАЯ СТАДИЯ В ЦЕПИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ

© 2022 Л.Ю. Устынюк¹, А.Н. Тихонов^{2*}

¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия*

² *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: an_tikhonov@mail.ru*

Поступила в редакцию 22.06.2022

После доработки 04.08.2022

Принята к публикации 25.08.2022

Работа посвящена анализу функционирования цитохромного b_6f -комплекса (пластохинол:пластоцианин оксидоредуктаза), входящего в цепь переноса электронов фотосинтезирующих систем оксигенного типа. Кратко рассмотрены строение цепи электронного транспорта (ЦЭТ) хлоропластов и механизмы функционирования цитохромного комплекса b_6f , расположенного в ЦЭТ между фотосистемами 2 и 1 (ФС2 и ФС1). Цитохромный b_6f -комплекс окисляет молекулы пластохинола (PQH₂), образующиеся в ФС2, и восстанавливает пластоцианин – донор электрона для ФС1. Окисление PQH₂ – стадия, лимитирующая перенос электронов между ФС2 и ФС1. Проанализированы процессы двухэлектронного (бифуркационного) окисления PQH₂ в каталитическом центре Q_o комплекса b_6f . Методом функционала плотности исследованы две стадии окисления PQH₂ в системе, моделирующей центр Q_o. Результаты квантово-химических расчётов согласуются с тем, что первая стадия окисления PQH₂ – перенос электрона к Fe₂S₂-кластеру белка Риске – это эндергонический (энерго-акцепторный) процесс ($\Delta E \sim 15$ кДж·моль⁻¹), который может лимитировать скорость функционирования цитохромного комплекса. Вторая стадия окисления хинола – перенос электрона от молекулы семихинона (PQH[•]), образующейся после первой стадии окисления PQH₂, к низкопотенциальному гему b_6^L – представляет собой экзоэргический (энерго-донорный) процесс ($\Delta E < 0$). Результаты расчётов показывают, что окисление семихинона стимулируется в результате его смещения в сторону гема b_6^L (акцептор электрона) и приближения к карбоксильной группе Glu78, служащей акцептором протона. Полученные данные обсуждаются в рамках модели Q-цикла Митчелла, описывающей окисление пластохинола в цитохромном b_6f -комплексе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосинтез, цитохромный комплекс, окисление пластохинола, моделирование.

DOI: 10.31857/S0320972522100049, EDN: BBTSHP

ВВЕДЕНИЕ

В фотосинтетических системах оксигенного типа (хлоропласты высших растений, цианобактерии, водоросли) имеются две фотосистемы, которые за счёт энергии света осуществляют перенос электронов от воды, разлагаемой в фотосистеме 2 (ФС2), к NADP⁺ – физиологическому акцептору электронов фотосистемы 1 (ФС1) [1–5]. Фотосинтетический транспорт электронов сопряжён с образованием трансмембранной разности электрохи-

мических потенциалов ионов водорода, $\Delta\mu_{H^+}$, являющейся источником энергии для АТФ-синтазных комплексов, катализирующих образование АТФ из АДФ и P_i [6–9]. Баланс между АТФ и NADPH (АТФ/NADPH = 3/2), необходимый для работы цикла Кальвина–Бенсона (ЦКБ), достигается за счёт регуляторных механизмов, таких как активация или ослабление активностей ФС1 и ФС2, перераспределение электронных потоков (нециклический и циклический пути переноса), рН-зависимая регуляция электронного транспорта [10–14].

Принятые сокращения: ФС1 и ФС2 – фотосистемы 1 и 2; b_6^L и b_6^H – низко- и высокопотенциальный гемы цитохрома b_6 ; Cyt – цитохром; Fd – ферредоксин; FNR – ферредоксин-NADP-редуктаза; ISP – железосерный белок, называемый белком Риске; Pс – пластоцианин; PQ – пластохинон; PQH₂ – пластохинол; Q_o и Q_i – каталитические центры цитохромного комплекса; ТМВQН₂ – 2,3,5-три-метил-бензохинол, аналог пластохинола.

* Адресат для корреспонденции.

Перенос электронов от ФС2 к ФС1 обеспечивается за счёт цитохромного комплекса b_6f и мобильных переносчиков электрона – пластохинона (PQ) и пластоцианина (Pc) [1–5]. Два электрона, «извлекаемых» из молекулы воды за счёт работы водоокисляющего комплекса ФС2, переносятся на молекулу PQ, которая протонируется за счёт ионов водорода, поступающих из стромы ($PQ + 2e^- + 2H_{out}^+ \rightarrow PQH_2$). Молекула пластохинола (PQH_2) окисляется цитохромным комплексом b_6f , от которого электрон переносится к Pc (через гем f) и далее к окисленному реакционному центру ФС1 (P_{700}^+). Два электрона от ФС1 последовательно поступают к ферредоксин-NADP-редуктазе (FNR) через ферредоксин (Fd) и восстанавливают $NADP^+$ до NADPH. Перенос электронов через b_6f -комплекс сопряжён с транслокацией протонов через тилакоидную мембрану. Ионы водорода, поступающие из стромы к пластохинону, при окислении PQH_2 комплексом b_6f выделяются в люмен (внутритилакоидное пространство).

Особенностью тилакоидных мембран хлоропластов является их латеральная гетерогенность [15]. Большая часть комплексов ФС2 находится в тесно примыкающих друг к другу тилакоидах гран. ФС1 и АТФ-синтазные комплексы локализованы в межгранных тилакоидах и на тех участках мембран (торцы гран и внешние тилакоиды), которые ориентированы в строму. Комплексы b_6f распределены равномерно вдоль мембран тилакоидов гран и межгранных тилакоидов. Вследствие латеральной подвижности молекул PQH_2 и Pc гранальные комплексы b_6f могут обеспечивать латеральный транспорт электронов на сравнительно большие расстояния вдоль тилакоидов: $ФС2 \rightarrow PQ \rightarrow b_6f \rightarrow Pc \rightarrow ФС1$. Диффузия Pc внутри люмена (внутритилакоидное пространство) происходит намного быстрее ($\leq 20\text{--}200$ мкс [1, 16]), чем окисление PQH_2 цитохромным комплексом ($\geq 5\text{--}20$ мс [4, 5]). Цитохромные b_6f -комплексы, находящиеся в межгранных тилакоидах, могут участвовать в циклическом переносе электронов вокруг ФС1 [17, 18]. Замедление диффузии PQH_2 в тилакоидной мембране, плотно заполненной белками, может тормозить перенос электронов между ФС2 и ФС1 [19]. Однако, как показали опыты с изолированными хлоропластами класса Б, лишёнными ферментов ЦКБ, в широком диапазоне физиологических условий (рН, температура) скорость переноса электронов между ФС2 и ФС1 контролируется главным образом процессами, происходящими уже после связывания PQH_2 с каталитическим центром b_6f -комплекса [4, 20].

Общая скорость переноса электронов от PQH_2 к b_6f -комплексу определяется: 1) временем диффузии PQH_2 в мембране, 2) временем проникновения PQH_2 внутрь b_6f -комплекса и его связывания с каталитическим центром цитохромного комплекса Q_o , 3) скоростью окисления PQH_2 в каталитическом центре Q_o [4, 20]. Лимитирующей стадией переноса электронов между ФС2 и ФС1 является окисление PQH_2 цитохромным b_6f -комплексом. Несмотря на то что ФС1, ФС2 и b_6f -комплексы могут быть расположены в удалённых областях тилакоидной мембраны, значительная часть этих комплексов находится сравнительно близко друг от друга. Локализация b_6f -комплексов в гранах, обогащённых пигмент-белковыми комплексами ФС2, значительно сокращает путь, который молекулы PQH_2 проходят от ФС2 до ближайших к ним b_6f -комплексов. В этом случае белковые препятствия, ограничивающие диффузии пластохинона в мембране, не являются критическим фактором, лимитирующим скорость окисления PQH_2 . В большинстве случаев характерные времена диффузии PQH_2 от ФС2 к комплексам b_6f не превышают $\Delta\tau \approx 2\text{--}4$ мс [4, 20]. Скорость окисления PQH_2 зависит от внутритилакоидного рН (pH_{in}), поскольку процессы электронного переноса сопряжены с выходом протонов в люмен ($PQH_2 \rightarrow PQ + 2e^- + 2H_{in}^+$). Вероятность депротонирования PQH_2 уменьшается при понижении pH_{in} вследствие усиления «давления» со стороны протонов люмена [20–22].

СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОХРОМНОГО b_6f -КОМПЛЕКСА

Пространственное строение b_6f комплекса. Цитохромный комплекс b_6f представляет собой димер, состоящий, как и родственный ему комплекс bc_1 , из двух белковых мономеров [5, 23–32]). Каждый мономер содержит восемь полипептидных субъединиц. Четыре крупные субъединицы – это железосерный белок (ISP, называемый белком Риске), включающий в себя Fe_2S_2 -кластер; цитохром (Cyt) b_6 , который содержит низкопотенциальный и высокопотенциальный гемы (b_6^L и b_6^H); Cyt f и субъединица IV, с которой связаны два пигмента – хлорофилл (Chl) a и β -каротин. Гем f выступает в люмен. На периферии каждого мономера находятся четыре малые субъединицы, представляющие собой α -спирали.

Каталитические функции b_6f -комплекса связаны с редокс-превращениями PQH_2 и PQ в

двух центрах, Q_o и Q_i . Расположение электронных переносчиков, участвующих в реакциях окисления PQH_2 (центр Q_o) и восстановления PQ (центр Q_i), показано на рис. 1, построенном для нативного b_6f -комплекса шпината по данным криоэлектронной микроскопии (PDB ID: 6RQF [32]). В верхней части этого рисунка показано взаимное расположение кофакторов электронного переноса и двух молекул $Chl a$, находящихся внутри димерного комплекса. Димерная структура b_6f -комплекса обеспечивает формирование крупной внутрибелковой

полости ($\sim 30 \times 25 \times 15 \text{ \AA}$) [26]), через которую молекулы PQH_2 и PQ проникают к хинон-связывающим центрам. В нативном b_6f -комплексе шпината были обнаружены три молекулы пластохинона, обозначенные на рис. 1 как $PQ1$, $PQ2$ и $PQ3$. Эти молекулы значительно удалены от каталитических центров Q_o . Бензольное кольцо молекулы $PQ1$ примыкает к гему и молекуле $Chl a$; $PQ2$ находится вблизи от гемов b_6^H и c_n , молекула $PQ3$ расположена между гемами b_6^H и c_n , связанными с разными мономерами димерного комплекса b_6f .

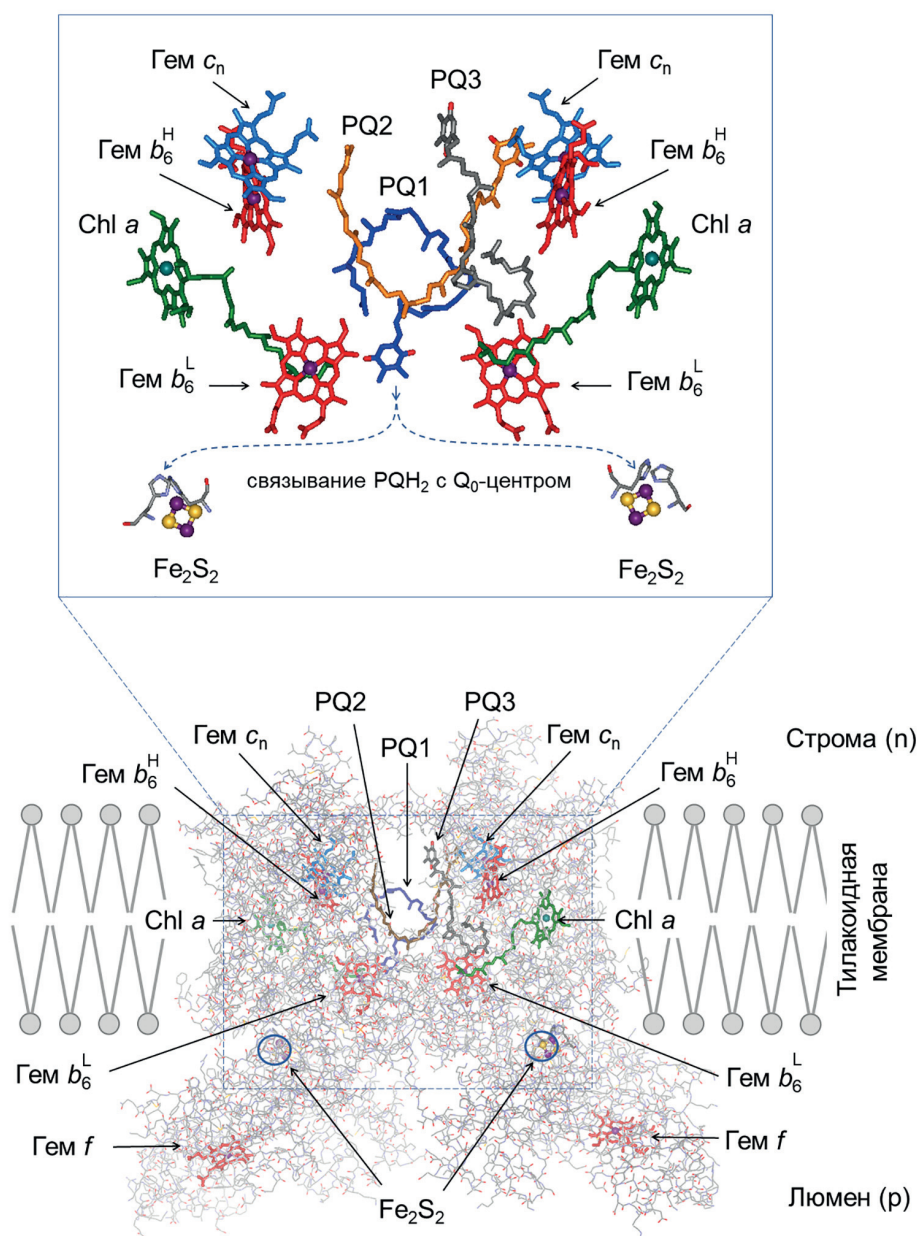


Рис. 1. Кофакторы электронного переноса (верхняя панель) и их расположение в нативном димерном цитохромном b_6f -комплексе шпината (нижняя панель, по данным PDB ID: 6RQF [32]). Стрелками обозначено положение двух Fe_2S_2 -кластеров и гемов цитохрома f , низкопотенциального и высокопотенциального гемов b_6^L и b_6^H , гемов c_n и молекул хлорофилла a ($Chl a$). Символами $PQ1$, $PQ2$ и $PQ3$ обозначены три молекулы пластохинона, которые удалены от Fe_2S_2 -кластеров. Пунктирные стрелки на верхней панели символизируют, что молекула $PQ1$ перемещается внутри белкового комплекса, приближаясь к одному из Fe_2S_2 -кластеров

Сайт Q_o , в котором происходит окисление QH_2 , располагается вблизи от Fe_2S_2 -кластера ISP. Хинон-связывающий портал этого сайта представляет собой полость ($\sim 11 \times 12 \text{ \AA}$), покрытую молекулами липидов [26, 27]. В эту полость проникает липидорастворимая молекула QH_2 , которая связывается с ISP, образуя «субстрат-ферментный» комплекс (QH_2 -ISP).

Второй центр связывания хинона (сайт Q_i) расположен вблизи участка цитохромного комплекса, ориентированного в сторону стромы. Этот сайт находится в полости между геммами b_6^H и c_n [29–32]. Предполагается, что «нетипичный» гем c_n может участвовать в циклическом переносе электронов от акцепторного участка ФС1 (через Fd и FNR) к молекуле PQ, находящейся в сайте Q_i [17, 18].

Пластохинон внутри портала Q_o . В структурах b_6f -комплекса, полученных методом рентгеноструктурного анализа, отсутствуют нативные молекулы QH_2 и PQ. О возможной локализации QH_2 в каталитическом сайте Q_o чаще всего судят по положению ингибитора TDS (три-децил-стигмателлин), расположенного в непосредственной близости от Fe_2S_2 -кластера. TDS образует водородную связь с атомом азота N_ϵ гистидина (His155 – в *Chlamydomonas reinhardtii* [29], His129 – в *Mastigocladus laminosus* [30] или His128 – в b_6f -комплексе шпината [32]), являющегося лигандом одного из ионов Fe кластера Fe_2S_2 . Атом N_ϵ имидазольного фрагмента депротонированной формы His образует водородную связь с группой –OH молекулы QH_2 . Образование водородной связи между N_ϵ и –OH обычно рассматривается как необходимое условие формирования комплекса QH_2 -His. Существование такой связи было показано в цитохромном комплексе bc_1 , родственном b_6f -комплексу [33–39]. Полагают, что атом N_ϵ служит первичным акцептором протона, переносимого от QH_2 к окисленному ISP (ISP_{ox}). Альтернативная модель, предполагающая, что первичным акцептором протона является близлежащая молекула воды, была предложена в работах Postila et al. [39] и Barragan et al. [40].

Проникновению QH_2 в полость хинон-связывающего сайта Q_o предшествует его диффузия из липидной фазы тилакоидной мембраны вдоль сравнительно длинного пути внутри белкового комплекса. Интересное наблюдение заключается в том, что длинный фитильный «хвост» молекулы Chl *a* лежит на пути перемещения пластохинона к portalу Q_o . Предполагается, что Chl *a* выполняет «воротные» функции. Возможны две конформации фитильной цепи: в одной конформации эта

цепь не препятствует, а в другой – ограничивает доступ хинона к portalу Q_o [32].

Экспериментальные данные о расположении пластохинона во внутрибелковой полости портала Q_o отсутствуют. Следует, однако, иметь в виду, что пластохинон (или по крайней мере его редокс-активный фрагмент) обладает высокой подвижностью внутри полости Q_o . Эта полость покрыта липидами (23 потенциальных участка связывания липидов в расчёте на один мономер [27, 28]). Линейные размеры полости достаточно велики (расстояние между Fe_2S_2 и гемом b_6^L составляет $\sim 25 \text{ \AA}$), что позволяет предположить, что молекула пластохинола целиком помещается внутри полости, включая её загнутый фитильный «хвост» (рис. 1). Альтернативой является гипотетический случай, когда «голова» пластохинола проникает в гидрофобную полость и связывается с каталитическим центром Q_o , при этом гибкий фитильный «хвост» оказывается лишь частично погруженным в полость.

Окисление пластохинола в Q_o -центре цитохромного комплекса b_6f . На рис. 2, *a* показана упрощённая схема окислительно-восстановительных процессов, происходящих в комплексе b_6f с участием пластохинола. Центр Q_o выполняет роль хинол-оксидазы: два электрона, донируемых молекулой QH_2 , направляются по разным цепям переноса электрона, высоко- и низкопотенциальной. Один электрон переносится на Fe_2S_2 -кластер ISP (реакция 1); ISP служит донором электрона для Cyt *f*, который, в свою очередь, восстанавливает Pс. Второй электрон поступает от пластосемихинона к низкопотенциальному гему b_6^L (реакция 2). Восстановленный гем b_6^L передаёт электрон высокопотенциальному гему b_6^H , расположенному вблизи от центра Q_i на стромальной стороне комплекса.

На рис. 2, *b* представлена «энергетическая» диаграмма, показывающая стандартные значения редокс-потенциалов кофакторов, участвующих в переносе электронов по высоко- и низкопотенциальной цепям. Согласно этим данным, перенос электрона и протона от QH_2 к ISP – это эндергонический (энерго-акцепторный) процесс, который определяет скорость окисления QH_2 . Дальнейший перенос электрона в сторону P_{700}^+ идет с понижением свободной энергии. В результате первой стадии окисления QH_2 образуется радикальная пара $QH^\bullet - Fe_2S_2(H^+)$. Здесь QH^\bullet обозначает молекулу пластосемихинона в протонированной форме. Такая радикальная пара была зарегистрирована методом ЭПР в цитохромных комплексах bc_1 и b_6f в работах группы

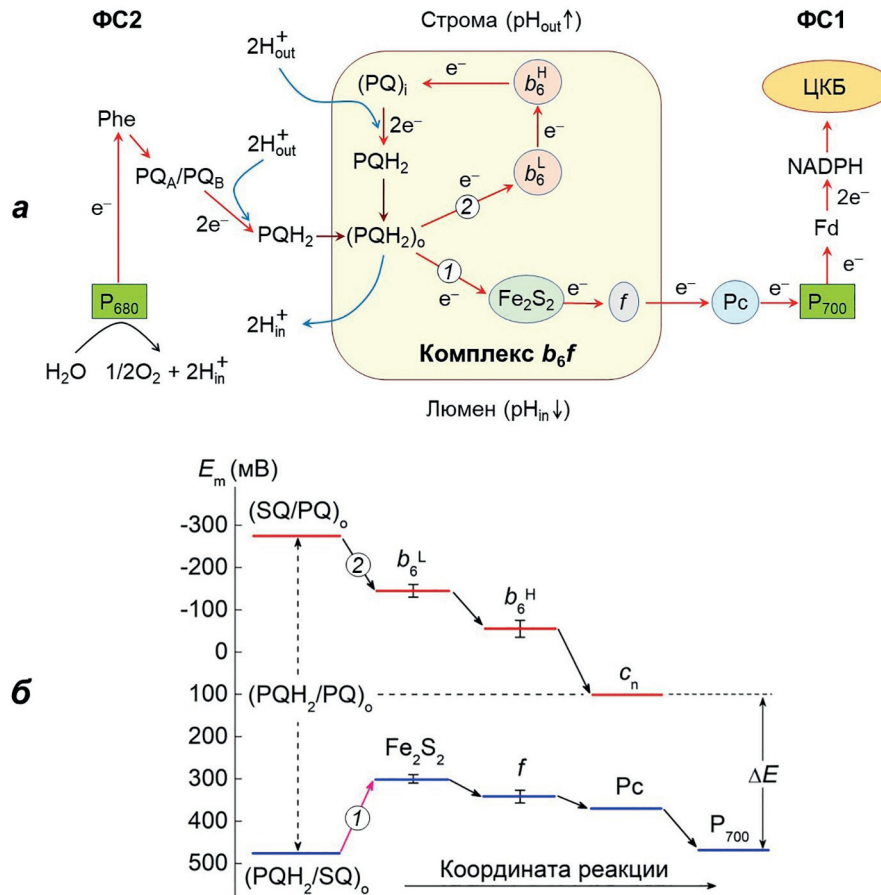


Рис. 2. Схема нециклического электронного транспорта и редокс-превращений пластохинола в цитохромном b_6f -комплексе (а). б – Диаграмма значений стандартных редокс-потенциалов переносчиков высоко- и низкопотенциальной цепи переноса электронов в цитохромном b_6f -комплексе одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Диаграмма построена на основании литературных данных о стандартных значениях редокс-потенциалов, приведённых в работе Piere et al. [77]. Ссылки на значения редокс-потенциалов для комплексов Cyt b_6f для других фотосинтезирующих организмов приведены в подписи к рис. 10 в статье Tikhonov [4]. Символами 1 и 2 обозначены реакции переноса электрона от PQH_2 к Fe_2S_2 -кластеру и от семихинона PQH^\bullet – к низкопотенциальному гему b_6^L соответственно

Osyczka [28, 41–44]. Энергия связи между радикалами невелика (~3,5 ГГц). Метастабильная радикальная пара распадается на PQH^\bullet и $\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{H}^\bullet)$, после чего происходят события, включающие в себя крупномасштабные структурные перестройки белкового комплекса. Перенос электрона от восстановленного кластера $\text{Fe}_2\text{S}_2^\bullet$ к Cyt f связан с движением мобильного фрагмента ISP, содержащего $\text{Fe}_2\text{S}_2^\bullet$, в сторону гема f [45].

Согласно модели Q-цикла [46–48], пласто-семихинон PQH^\bullet восстанавливает гем b_6^L . Дальнейший перенос электрона по низкопотенциальной цепи обеспечивает перенос электрона к окисленной молекуле PQ, связанной с центром Q_i . Эти реакции включают перенос электрона от b_6^L к b_6^H и происходят с понижением свободной энергии. Молекула PQ, находящаяся в центре Q_i , получает один электрон от b_6^H . Согласно модели модифицированного Q-цикла, PQ может получить второй электрон,

поступающий к ней от ФС1 по цепи циклического транспорта электронов через Fd, FNR и гем c_n ($\text{PSI} \rightarrow \text{Fd} \rightarrow \text{FNR} \rightarrow c_n \rightarrow (\text{PQ})_i$) [17, 18]. Двукратно восстановленная молекула PQH_2 уходит из центра Q_i и затем может связаться с вакантным центром Q_o , имеющим высокое сродство к PQH_2 . Можно предположить, что при отсутствии переносчиков циклического транспорта электронов (например, в изолированных хлоропластах класса Б), молекула семихинона $(\text{PQ}^\bullet)_i$, образовавшаяся в центре Q_i , ожидает второго электрона, поступающего к ней от следующей молекулы PQH_2 , окисляемой в центре Q_o . Вся совокупность процессов, показанных на рис. 2, б, свидетельствует, что окисление PQH_2 до PQ – энергетически выгодный процесс: суммарное изменение свободной энергии в результате окисления PQH_2 , оцениваемое по стандартным значениям редокс-потенциалов электронных переносчиков, имеет отрицательное значение.

Процессы двухэлектронного окисления PQH_2 в центре Q_0 сопряжены с переносом протонов от PQH_2 на близлежащие протон-акцепторные группы. Общепризнано, что первичным акцептором протона, донируемого молекулой PQH_2 , служит имидазольная группа His, входящего в ISP [28–38]. Считается, что первичным акцептором протона, донируемого семихиноном PQH^\cdot , служит карбоксильная группа $-\text{COO}^-$ аминокислотного остатка Glu78 ($-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow -\text{COOH}$) (рис. 3, а) [49–51]. В хлоропластах эта группа имеет ограниченную подвижность внутри белкового комплекса b_6f благодаря образованию солевого мостика между Glu78 и Arg87 [49, 52]. От $-\text{COOH}$ протон переносится в люмен,

что происходит посредством обмена с протон-связывающими карбоксильными группами Glu3 и Glu58 [52].

Следует обратить внимание на то, что гем b_6^L и карбоксильная группа Glu78 находятся сравнительно далеко ($\sim 6 \text{ \AA}$) от того участка, где появляется радикал PQH^\cdot . Оценки, сделанные на основании квантово-химических расчётов (см. ниже), показали, что при достаточно большом удалении PQH^\cdot от первичного акцептора протона $-\text{COO}^-$ эффективность переноса электрона к гему b_6^L , сопряжённого с переносом протона, будет невелика. Окисление PQH^\cdot может заметно ускоряться после смещения радикала PQH^\cdot внутри гидрофобной полости в сторону гема b_6^L и карбоксильной

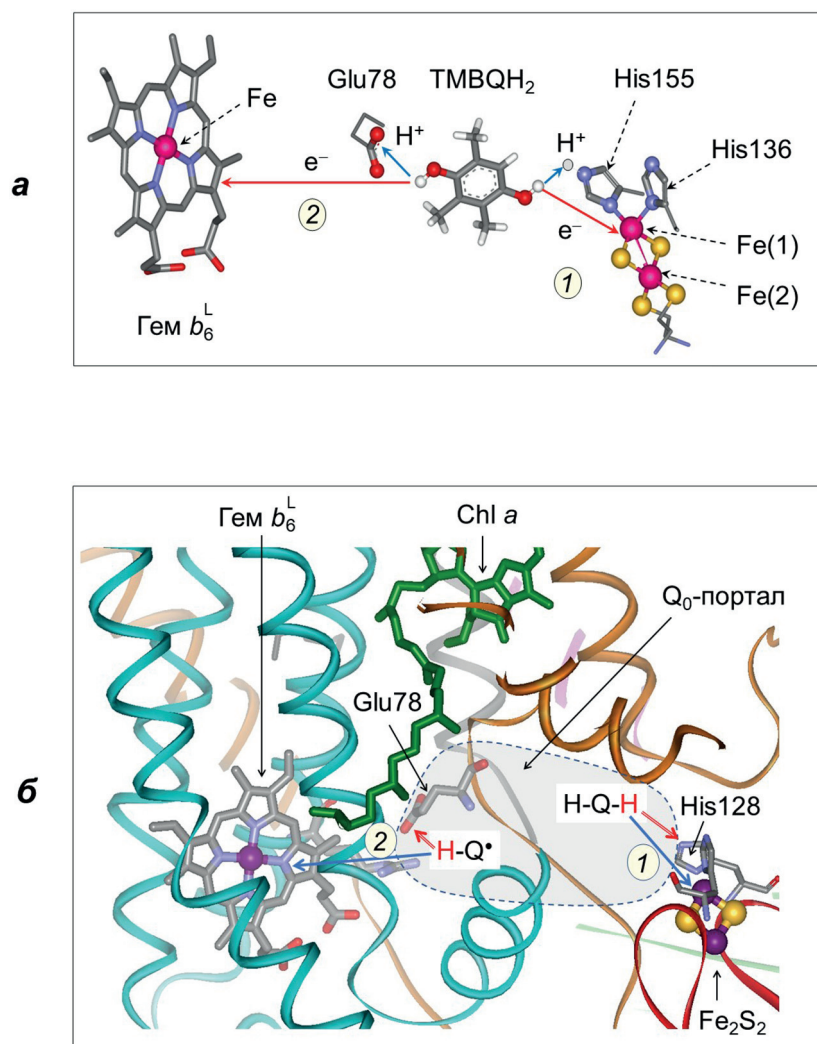


Рис. 3. Реакции бифуркационного (двухэлектронного) окисления ТМВQH₂ (а) и предполагаемые положения молекул пластохинола (H-Q-H) и пластосемихинона (H-Q[•]) внутри белкового портала Q₀ (б). Фрагмент белковой структуры, включающий в себя Fe₂S₂-кластер и гем b_6^L , построен на основании данных криоэлектронной микроскопии для b_6f -комплекса шпината (PDB ID: 6RQF [32]). Серым цветом обозначена полость, в которой находятся молекулы пластохинола и пластосемихинона, непосредственно взаимодействующие с ISP и гемом b_6^L . Короткие красные стрелки показывают направления переноса протонов от пластохинола к атому N_ε гистидина и от пластосемихинона – к группе $-\text{COO}^-$ Glu78 соответственно. Синие стрелки – перенос электронов к Fe₂S₂-кластеру и к гему b_6^L .

группы Glu78 (рис. 3, б). Аналогичное предположение было высказано Crofts [53] на основании анализа процессов окисления убихинола в комплексе b_c1 .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модельная система и методы расчетов. Геометрия модельной системы. Полная модельная система, имитирующая расположение электронных переносчиков в каталитическом центре Q_6 (рис. 4), была построена на основе кристаллической структуры b_6f -комплекса одноклеточной водоросли *C. reinhardtii* (PDB ID: 1Q90 [29]). Можно выделить четыре функциональные группы этой структуры: 1) редокс-центр, содержащий железосерный кластер (Fe_2S_2) и окружающие его аминокислотные остатки; 2) гем b_6^L ; 3) Glu78 субъединицы IV и 4) аналог пластохинола (2,3,5-три-метил-бензохинол, $TMVQH_2$). Молекула $TMVQH_2$ была выбрана в качестве структуры, моделирующей пластохинол. Она имеет такую же структуру хинольного фрагмента, как молекула PQH_2 , но не содержит фитильной цепи. Структуры каждого из четырёх фрагментов были дополнены необходимым числом атомов водорода и полностью оптимизированы как изолированные. Затем эти фрагменты были помещены в исходную систему таким образом, чтобы добиться наилучшего совмещения положений атомов в оптимизированной и в экспериментальной структурах. Предварительно оптимизированная структура $TMVQH_2$ была помещена в то место, где, по данным рентгеноструктурного анализа, находилась молекула ингибитора TDS [31].

На завершающем этапе построения модельной системы проводилось уточнение её струк-

туры путём внесения небольших конформационных изменений. Согласно Ustynyuk et al. [54, 55], образование водородной связи между атомом H группы $-OH$ молекулы $TMVQH_2$ и атомом N_ϵ приводит к уменьшению расстояния $H-N_\epsilon$ за счёт поворота $-OH$ вокруг связи $C-OH$. Такой поворот сокращает путь реакции от 2,42 Å до минимального значения – 2,08 Å. В настоящей работе сканирование зависимости энергии системы от расстояния $H(1)-N_\epsilon$ проведено для структуры, в которой такое расстояние было минимальным.

Вычислительные методы. Расчеты проводили методом функционала плотности с помощью программы «Природа» [56], с использованием функционала PBE [57] и набора базисных функций TZ2P Гауссова типа. Были использованы следующие схемы сжатия орбитальных базисных функций: ($5s1p$)/[$3s1p$] – для атомов H; ($11s6p2d$)/[$6s3p2d$] – для атомов C, N, и O; ($15s11p2d$)/[$10s6p2d$] – для атомов S и ($17s13p8d$)/[$12s9p4d$] – для Fe. При расчёте синглетного состояния фрагмента белка Риске применяли неограниченный метод функционала плотности. Ранее [54, 55] нами было установлено, что для нахождения низшего по энергии синглетного электронного состояния этого комплекса необходимо изменить последовательность граничных орбиталей в одной из электронных подсистем (α или β). Данное обстоятельство представляется важным, поскольку в модельной системе рассматривался биядерный кластер Fe_2S_2 , в котором реализуется антиферромагнитная ориентация спинов парамагнитных ионов железа. Для таких комплексов, как известно [58], энергия системы растёт с увеличением мультиплетности. Данная закономерность (так называемая «лестница» Гейзенберга) была получена нами ранее [54].

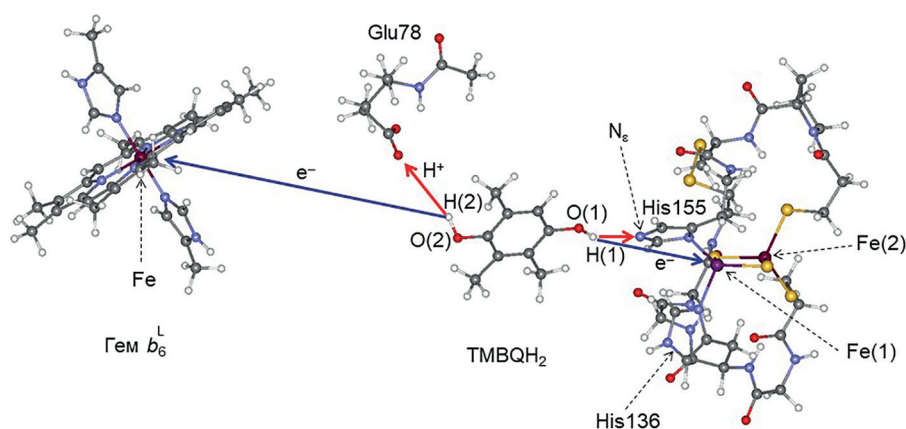


Рис. 4. Модельная система для реакции двухстадийного окисления пластохинола цитохромным комплексом b_6f . Символами O(1) и H(1) показаны атомы кислорода и водорода группы $-OH$ молекулы $TMVQH_2$, взаимодействующей с каталитическим центром ISP (рис. 1, реакция 1). Символами O(2) и H(2) показаны атомы кислорода и водорода группы $-OH$, взаимодействующей с гемом b_6^L и группой $-COO^-$ Glu78. Fe(1) и Fe(2) – два иона железа кластера Fe_2S_2

Для модельной системы, построенной в настоящей работе, эта закономерность также выполнялась. Это доказывает, что синглетное электронное состояние железосерного кластера является низшим по энергии, что соответствует литературным данным [59–63].

Спиновую плотность и заряды на атомах вычисляли по методу Hirshfeld [64]. Согласие расчётных и экспериментальных данных по распределению спиновой плотности на атомах было показано в работе Frolov et al. [65] для радикала ТМВQH \cdot .

Спиновые характеристики. Для окисленного редокс-центра ISP (ISP $_{ox}$) атом N $_{\epsilon}$ имидазолидинового остатка His155 принимали депротонированным, а для His136 – протонированным; общий заряд этого фрагмента равен $Z = -1$. Известно, что окисленный кластер Fe $_2$ S $_2$ является диамагнитным (спин $S = 0$) вследствие антиферромагнитного взаимодействия двух парамагнитных ионов, Fe $^{3+}(1)$ и Fe $^{3+}(2)$, каждый из которых имеет спин $S = 5/2$ [28, 59–61]. Результаты расчётов, проведённых ранее [54], были подтверждены в настоящей работе, они согласуются с экспериментальными данными. После восстановления окисленного ISP (ISP $_{ox}$) кластер Fe $_2$ S $_2$ становится парамагнитным (суммарный спин равен $S = 1/2$ [28, 59–61]). Согласно нашим расчётам, проекции спинов двух ионов железа кластера Fe $_2$ S $_2$ как в окисленном, так и в восстановленном состоянии сохраняют противоположные проекции [54], что также согласуется с экспериментальными данными об антиферромагнитном взаимодействии ионов железа в кластере Fe $_2$ S $_2$ восстановленного белка Риске.

Рассматривая взаимодействие семихинона ТМВQH \cdot с Суt b $_6$, отметим следующее. Молекула семихинона имеет спин $S = 1/2$; окисленный гем b $_6^L$ парамагнитен ($S = 1/2$) [28, 61]. Поэтому при описании второй стадии реакции мы рассматривали две возможности для полного спина модельной системы, описывающей окисление ТМВQH \cdot , $S = 0$ или $S = 1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первая стадия окисления ТМВQH $_2$. На рис. 5 показан энергетический профиль реакции (зависимость энергии системы от расстояния между атомами Н(1) и N $_{\epsilon}$), рассчитанный для первой стадии окисления хинола в модельной системе, включающей ТМВQH $_2$, фрагмент белка Риске, содержащий Fe $_2$ S $_2$ -кластер и окружающие его аминокислотные остатки, а также Glu78. Энергетический профиль имеет два минимума.

Один минимум отвечает исходному положению атома Н(1) в молекуле ТМВQH $_2$. Второй – соответствует положению Н(1) вблизи атома N $_{\epsilon}$ имидазолидинового кольца His155 и характеризует образование связи Н–N $_{\epsilon}$ ($R_{H-N_{\epsilon}} = 1,11 \text{ \AA}$ в структуре, соответствующей второму минимуму). Расстояние между минимумами на кривой, показанной на рис. 5, составляет 0,88 \AA. Перенос атома Н(1) из начального положения (–ОН(1)) в конечное (Н(1)–N $_{\epsilon}$) связан с преодолением энергетического барьера (ΔE^{\ddagger}). Перенос Н(1) к атому N $_{\epsilon}$ – это энерго-акцепторный процесс, который сопровождается преодолением энергетического барьера и повышением полной энергии системы на величину $\Delta E = 25,6 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ (рис. 5).

Энергетический профиль реакции переноса Н(1), приведённый на рис. 5, был получен в предположении о неадиабатическом механизме реакции, когда в ходе быстрого переноса лёгкого атома Н(1) геометрия системы сохраняется. Затем, после переноса протона к атому N $_{\epsilon}$, происходит небольшое изменение («релаксация») геометрии системы, которую определяли путём оптимизации координат атомов, входящих в молекулу хинона, и железосерный кластер. Изменение энергии системы после переноса Н(1) оценивали как разницу энергий «нерелаксированного» продукта ($\Delta E = 25,6 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$) и «релаксированного» продукта реакции. В последнем случае предварительно оптимизированные структуры ТМВQH \cdot и восстановленного Fe $_2$ S $_2$ -кластера с протонированным His155 в качестве лиганда находились на своих

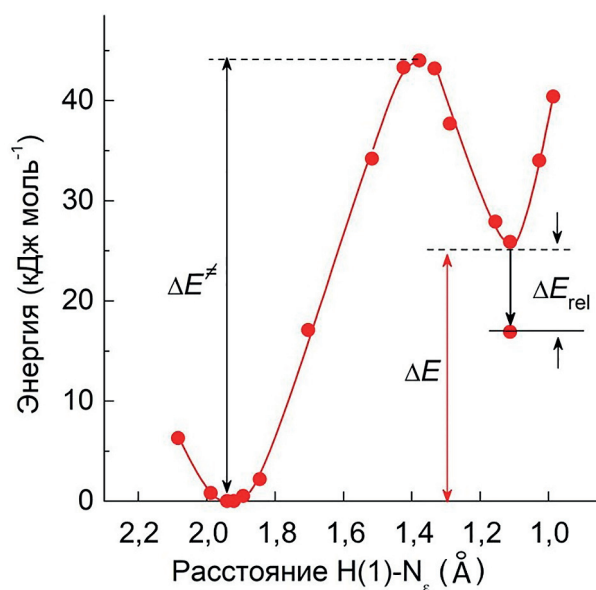


Рис. 5. Энергетический профиль первой стадии реакции окисления ТМВQH $_2$: зависимость энергии от расстояния между атомами Н(1) и N $_{\epsilon}$ (см. обозначения на рис. 4)

местах в общей структуре изучаемой системы. Расчёты показали, что в результате «релаксации» энергия системы уменьшалась на величину $\Delta E_{\text{rel}} = -9,0$ кДж·моль⁻¹. Подчеркнём, что после переноса атома Н(1) и «релаксации» системы её полная энергия была выше, чем в исходном состоянии (до переноса Н(1)), на 16,6 кДж·моль⁻¹. Близкое по порядку значение (10,5 кДж·моль⁻¹) было получено в работе Barragan et al. [40] при моделировании работы каталитического центра Q_o цитохромного комплекса bc₁. Увеличение энергии в результате переноса электрона от PQH₂ к ISP_{ox} (реакция I) хорошо согласуется с представлением о том, что эта реакция является эндергоническим (энерго-акцепторным) процессом [66].

Окисление хинола (отрыв атома Н1) можно рассматривать как два сопряжённых процесса, перенос двух частиц — электрона и протона, которые происходят согласованно. Первичные акцепторы электрона и протона — суть разные фрагменты белкового комплекса: электрон переносится на Fe₂S₂-кластер ISP, протон — на N_e-атом His [54]. Говоря о согласованности процессов переноса электрона и протона, мы имеем в виду, что оба процесса происходят практически одновременно (proton coupled electron transport, PCET [67–69]). Известно, что сродство протона к His может контролироваться состоянием ISP. Редокс-превращения ISP, как известно, влияют на значения рK_a протонируемого атома N_e аминокислотного остатка His, являющегося лигандом для одного из ионов железа кластера Fe₂S₂. Для цитохромного комплекса bc₁ было экспериментально показано, что восстановление ISP в комплексе bc₁ сопровождается увеличением рK_a [34–37]. Это означает, что ISP служит не только переносчиком электрона от хинола к Cyt f, но и выполняет «воротные» функции, обеспечивая перенос протонов в люмен [46, 47]. Восстановление ISP способствует протонированию его His за счёт иона водорода, донируемого молекулой PQH₂, с последующим переносом протона в люмен в результате окисления ISP: $\text{PQH}_2 + \text{ISP}_{\text{ox}} \rightarrow \text{PQH}^{\cdot} + \text{ISP}_{\text{red}}(\text{H}^+) \rightarrow \text{ISP}_{\text{ox}} + \text{H}^+_{\text{in}}$.

Анализ распределения спиновой плотности, сделанный на основании квантово-химических расчётов, показал удовлетворительное согласие расчётных и экспериментальных данных. В начальном состоянии оба участника реакции (ТМВQH₂ и ISP_{ox}) диамагнитны. Суммарное значение спиновой плотности ионов железа в окисленном кластере Fe₂S₂, как показали наши расчёты, близко к нулю. При этом каждый из ионов железа кластера Fe₂S₂ (Fe³⁺(1) и Fe³⁺(2)) является парамагнитным, но значения спинов

плотностей этих ионов имеют противоположные знаки ($\sigma_{\text{Fe}(1)} \approx 3,2$ и $\sigma_{\text{Fe}(2)} \approx -3,2$ а.е.), что согласуется с экспериментальными данными об антиферромагнитном взаимодействии ионов Fe³⁺(1) и Fe³⁺(2) в кластере Fe₂S₂. Спиновая плотность молекулы хинола (ТМВQH₂) равна нулю.

После переноса электрона от ТМВQH₂ к Fe₂S₂ происходит перераспределение спиновой плотности между атомами. Образующийся радикал ТМВQH[·] является парамагнитным; при этом спиновая плотность частично распределена между разными атомами ТМВQH[·], но в основном она локализована на атоме О(1), ориентированном в сторону ISP. Изменение спиновой плотности на всех атомах С и О в ходе реакции переноса атома водорода (протона и электрона) равно $\Delta\sigma(\text{ТМВQH}^{\cdot}) \approx -0,6$ а.е., изменение спиновой плотности на атомах Fe и S кластера Fe₂S₂ составляет близкую величину, $\Delta\sigma(\text{Fe}_2\text{S}_2) \approx 0,5$ а.е. Таким образом, квантово-химические расчёты показывают, что сразу после переноса Н(1) от ТМВQH₂ к ISP_{ox} возникает радикальная пара, образованная двумя парамагнитными частицами, ТМВQH[·] и Fe₂S₂(H⁺)[·], с противоположными ориентациями спинов. Суммарное изменение спиновой плотности радикальной пары, определяемое как $\Delta\sigma_{\Sigma} = [\Delta\sigma(\text{ТМВQH}^{\cdot}) + \Delta\sigma(\text{Fe}_2\text{S}_2)]$, оказывается близким к нулю, что определяется заданием мультиплетности ($S = 0$) исходной модельной системы.

Радикальная пара пластосемихинон—Fe₂S₂(H⁺)[·] является метастабильной. По оценкам, сделанным на основании анализа спектров ЭПР цитохромного комплекса bc₁ [28], энергия взаимодействия радикалов невелика, она составляет ~3,5 ГГц (в температурных единицах это эквивалентно ~1 К). После распада радикальной пары восстановленный кластер Fe₂S₂ смещается на значительное расстояние в сторону гема f. Это происходит за счёт отклонения мобильного домена ISP, содержащего Fe₂S₂[·], по механизму «ограниченной диффузии» (tethered diffusion [45]).

Вторая стадия реакции — окисление семихинона ТМВQH[·]. Согласно модели Q-цикла, молекула семихинона (в нашей модели — это ТМВQH[·]) окисляется низкопотенциальным гемом b₆^L. Возникает вопрос: может ли семихинон, расположенный в месте его образования (радикальная пара ТМВQH[·]—Fe₂S₂(H⁺)[·]), служить эффективным донором электрона для гема b₆^L и протона — для —COO⁻ группы Glu78? Согласно структурным данным, расстояния между семихиноном и его партнёрами — гемом b₆^L и группой —COO⁻ аминокислотного

остатка Glu78 – слишком велики, чтобы обеспечить эффективное окисление ТМВQH \cdot . Возможна ли реализация этих процессов без смещения радикала ТМВQH \cdot в сторону гема b_6^L и Glu78? Мы оценили такую возможность в рамках модели, включающей ТМВQH \cdot , Glu78 и гем b_6^L , для двух случаев: когда полный спин модельной системы равен $S_{\text{total}} = 0$ или $S_{\text{total}} = 1$. Эти значения спина были выбраны, исходя из того, что семихинон ТМВQH \cdot и окисленный гем b_6^L имеют спины $S = \frac{1}{2}$ [28]. В качестве координаты реакции, характеризующей перенос атома Н(2), было выбрано расстояние между Н(2) и ближайшим к нему атомом О карбоксильной группы –COO $^-$.

Расстояние, которое проходит атом Н(2), определяется координатами Н(2) в молекуле семихинона в исходной (ТМВQH \cdot , Glu78 (–COO $^-$), гем b_6^L) и в конечной системе (ТМВQ, Glu78 (–COOH), восстановленный гем b_6^L), оно составляет 2,60 Å. Расчёты, выполненные для такой модельной системы при $S_{\text{total}} = 0$ или $S_{\text{total}} = 1$, показали, что в обоих случаях для радикала ТМВQH \cdot , находящегося в исходном положении, энергетический барьер ΔE^\ddagger второй стадии реакции оказывается очень высоким и составляет 273,4 кДж·моль $^{-1}$ для синглетного состояния и 295,7 кДж·моль $^{-1}$ – для триплетного состояния. Это указывает на то, что окисление радикала ТМВQH \cdot , удалённого относительно гема b_6^L и карбоксильной группы Glu78, должно быть затруднено.

Результаты расчётов, выполненные методом молекулярной динамики в группе Cramer [70], указывают на то, что характерное время диффузии пластохинона внутри портала Q $_o$ на расстояние ~ 10 Å может составлять ~ 10 нс. Быстрая диффузия пластохинона позволяет предположить, что смещение семихинона внутри портала Q $_o$ в сторону гема b_6^L и Glu78 не является фактором, лимитирующим окисление семихинона. Приближение семихинона к группе –COO $^-$ и к гему b_6^L существенно снижает энергетический барьер реакции и ускоряет окисление семихинона. Результаты наших расчётов согласуются с этим предположением.

На рис. 6, а показано, как энергия модельной системы изменяется по мере смещения радикала ТМВQH \cdot в сторону группы –COO $^-$ Glu78. В обоих случаях ($S_{\text{total}} = 0$ и $S_{\text{total}} = 1$) энергия системы уменьшается при приближении ТМВQH \cdot к –COO $^-$. От места, где семихинон образовался, до места, в котором достигается минимальное значение энергии, ТМВQH \cdot должен сместиться на расстояние $\approx 1,90$ Å для синглетного и $\approx 1,80$ Å – для триплетного со-

стояния системы. Энергия системы при этом понижается на 74,5 и 44,5 кДж·моль $^{-1}$ соответственно, в результате чего синглетное состояние становится более устойчивым, чем триплетное, на 15,6 кДж·моль $^{-1}$.

На рис. 6, б показаны энергетические профили реакции, характеризующие изменение полной энергии системы при переносе атома Н(2) к –COO $^-$ в зависимости от положения ТМВQH \cdot относительно Glu78. Профили, рассчитанные для $S_{\text{total}} = 0$ и $S_{\text{total}} = 1$, заметно различаются. В первом случае ($S_{\text{total}} = 0$) энергия системы уменьшается, достигая минимума при расстоянии Н(2)–О, равном 1,06 Å, что соответствует длине связи О–Н в группе –COOH. Энергетические профили, показанные на рис. 6, б, были получены в неадиабатическом приближении, предполагающем, что перенос атома Н(2) происходит быстро, при этом остальные геометрические параметры не меняются. В слу-

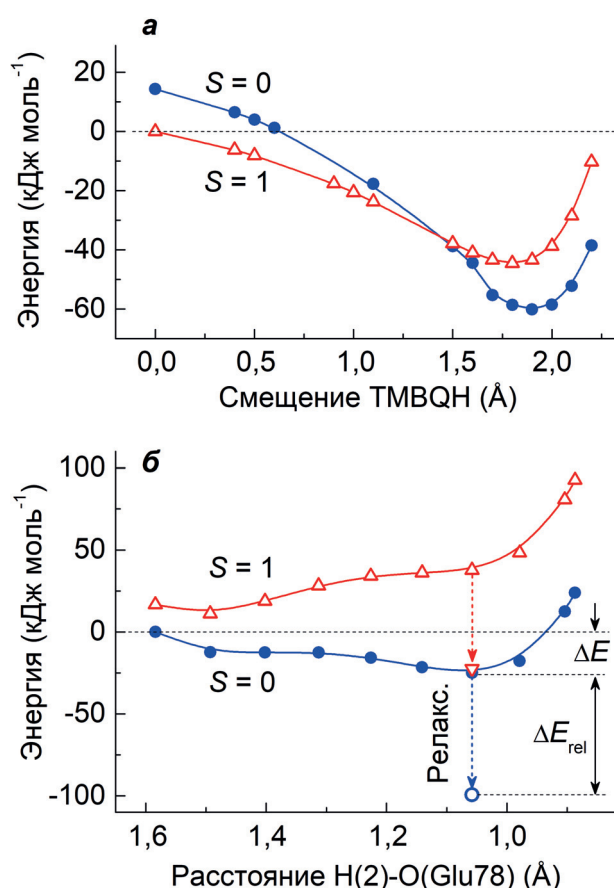


Рис. 6. Зависимости энергии системы от смещения семихинона ТМВQH \cdot (а) от исходного положения в сторону карбоксильной группы Glu78 и гема b_6^L , рассчитанные для двух значений суммарного спина, $S = 0$ и $S = 1$. б – Энергетические профили реакции окисления смещённой молекулы ТМВQH \cdot . Вертикальными стрелками показаны изменения энергии в результате «релаксации» системы, связанной с небольшими изменениями её геометрии после переноса атома Н(2) (пояснения в тексте)

чае $S_{\text{total}} = 0$ следующая за этим «релаксация» системы приводит к уменьшению энергии на величину $\Delta E_{\text{rel}} \approx -74,4$ кДж·моль⁻¹. В случае $S_{\text{total}} = 1$ наблюдается иная картина: по мере приближения Н(2) к $-\text{COO}^-$ энергия системы сначала повышается на 37,7 кДж·моль⁻¹. Однако после сближения Н(2) с атомом кислорода группы $-\text{COO}^-$ на расстояние Н(2)–О $\approx 1,06$ Å последующая «релаксация» (изменение геометрии) системы вызывает уменьшение энергии на величину $\Delta E_{\text{rel}} \approx -60,6$ кДж·моль⁻¹. В обоих случаях ($S_{\text{total}} = 0$ и $S_{\text{total}} = 1$) окисление семихинона оказывается энергетически выгодным процессом. Это означает, что смещение ТМВQH[·] в сторону $-\text{COO}^-$ и к гему b_6^L должно способствовать окислению семихинонового радикала.

Итак, результаты моделирования двух стадий окисления ТМВQH₂ показали, что бифуркационное (двухэлектронное) окисление ТМВQH₂ – это энергетически выгодный процесс. Суммарное изменение энергии системы в результате двух стадий окисления молекулы ТМВQH₂ является отрицательным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Окисление пластохинола цитохромным b_6f -комплексом – основное звено в цепи переноса электронов в хлоропластах, которое определяет скорость переноса электронов между ФС2 и ФС1. На рис. 7 показана схема, описывающая совокупность событий, связанных с бифуркационным (двухэлектронным) окислением пластохинола в цитохромном b_6f -комплексе. Цикл превращений RQH₂ включает в себя стадию его проникновения в хинол-связывающий портал Q_o, процессы окисления RQH₂ за счёт взаимодействия с ISP и гемом b_6^L , а также выход RQ из полости портала Q_o. Влияние «механических» стадий (диффузия RQH₂ и RQ в полости портала Q_o) на скорость функционирования комплекса b_6f было экспериментально показано группой Cramer [71, 72]. Путём генетических модификаций α -спирали субъединицы IV (Pro105Ala и Pro112Ala) в цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7002 авторам удалось сузить вход в портал Q_o, тем самым затруднив проникновение RQH₂ к сайту его связывания

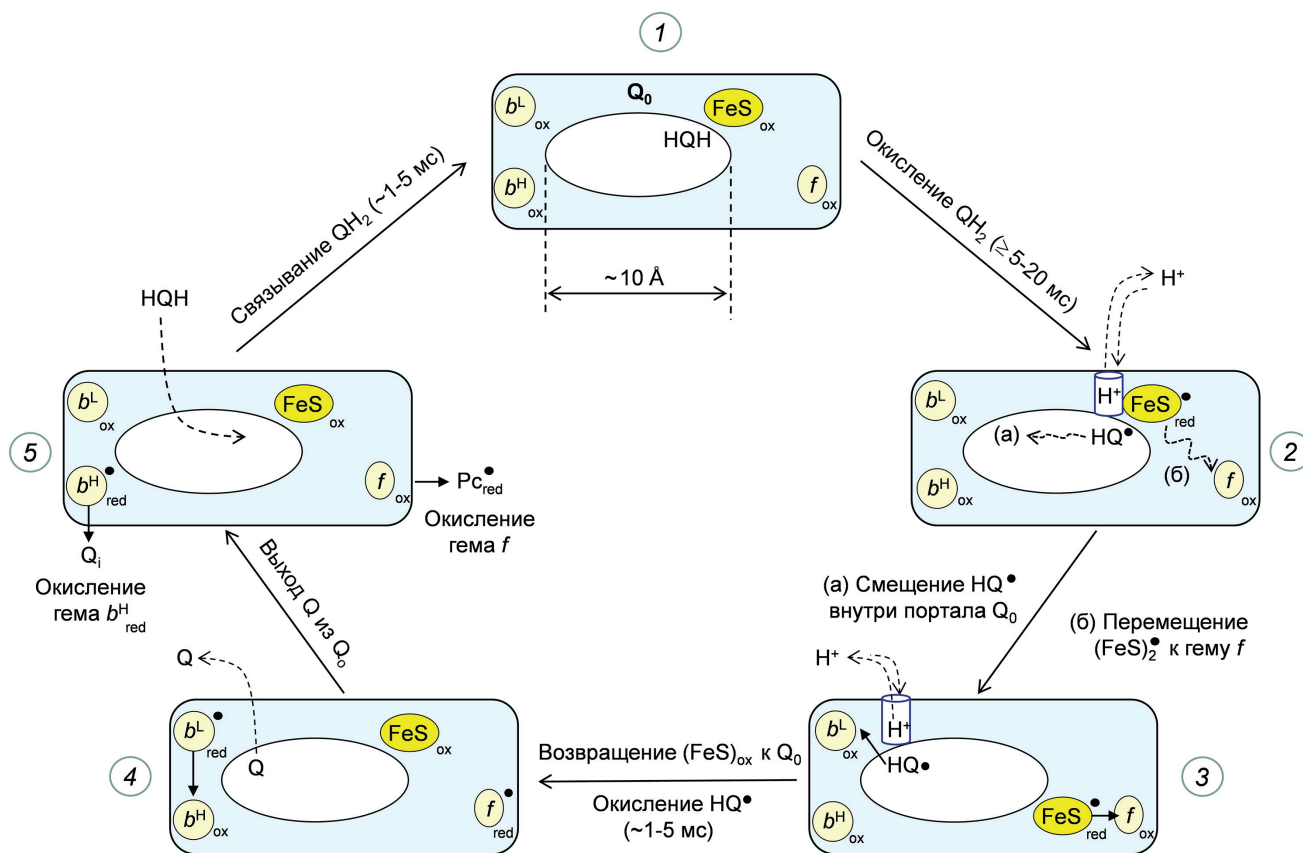


Рис. 7. Схема, иллюстрирующая цикл превращений пластохинола в каталитическом центре Q_o. Символами QH₂, HQ[·] и Q обозначены молекулы пластохинола, пластосемихинона и пластохинона соответственно. Общее время перехода из состояния 3 в состояние 4 определяется временем окисления семихинона HQ[·] гемом b_6^L , оцениваемого по кинетике редокс-превращений b_6^L , а также скоростями стадий, связанных с окислением Fe₂S₂-кластера и возвращением в исходное положение [70–72]

с ISP. В результате таких манипуляций уменьшалась скорость восстановления $Cyt\ f$ и замедлялся рост растений.

Основным процессом, определяющим скорость окисления PQH_2 цитохромным комплексом, является «химическая» стадия реакции, связанная с переносом электрона и протона от PQH_2 к соответствующим акцепторам. В согласии с моделью Q-цикла Митчелла, два электрона, донируемых молекулой хинола, переносятся по разным цепям электронного транспорта – высоко- и низкопотенциальной (рис. 3). Проведённое нами квантово-химическое моделирование бифуркационного окисления пластохинола согласуется с представлениями о том, что первая стадия окисления хинола (перенос электрона к ISP) – это эндергонический (энерго-акцепторный) процесс, который лимитирует общую скорость окисления в хинол-оксидазном центре Q_o [24]. Вторая стадия бифуркационной реакции – окисление семихинона за счёт переноса электрона к гему b_6^L – это экзоергонический (энергодонорный) процесс, идущий с понижением энергии. Результаты наших расчётов позволяют предположить, что одним из ключевых факторов эффективного сопряжения этих двух стадий, является высокая подвижность пластосемихинона внутри белковой полости хинон-связывающего центра Q_o .

Оценки подвижности пластосемихинона, сделанные методом молекулярной динамики [70], показали, что характерное время смещения молекулы хинона в сторону гема b_6^L внутри белковой полости портала Q_o , покрытой большим числом липидов [73], очень короткое, оно составляет $\Delta\tau \sim 10$ нс. Это означает, что движение семихинона в сторону гема b_6^L и Glu78 может происходить очень быстро по сравнению с довольно медленной стадией окисления PQH_2 , в результате которой образуется пластосемихи-

нон ($\tau_{1/2} \geq 4-5$ мс [1, 4, 5]). Поэтому обе стадии бифуркационного окисления хинола – перенос электрона от PQH_2 к белку Риске (ISP_{ox}) и окисление пластосемихинона гемом b_6^L – можно рассматривать как процессы, происходящие синхронно [67–69]. Короткое время жизни семихинона может служить одной из причин того, что в b_6^L -комплексах концентрация радикалов, детектируемых методом ЭПР, очень низкая [28]. Другая причина – сильное уширение спектра ЭПР семихинонов за счёт их взаимодействия с другими парамагнитными центрами. Отметим, что короткое время жизни химически активных семихиноновых радикалов должно уменьшать вероятность побочной реакции переноса электрона от пластосемихинона, находящегося в полости портала Q_o , к молекулярному кислороду O_2 , приводящей к образованию токсичного продукта – супероксидного радикала (O_2^-) [74–76].

Благодарности. Статья посвящена памяти Владимира Анатольевича Шувалова, выдающегося ученого, внесшего фундаментальный вклад в выяснение механизмов электронного переноса в фотосинтетических системах.

Вклад авторов. Л.Ю. Устынюк – проведение квантово-химических расчётов, обработка результатов численных экспериментов, участие в написании статьи. А.Н. Тихонов – общий план работы, анализ литературных данных, подготовка графических материалов, написание статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20047).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Haehnel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants, *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **35**, 659–693, doi: 10.1146/annurev.pp.35.060184.003303.
- Nelson, N., Yocum, C.F. (2006) Structure and function of photosystems I and II, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 521–565, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350.
- Mamedov, M., Govindjee G., Nadtochenko, V., and Semenov, A. Yu. (2015) Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms, *Photosynth. Res.*, **125**, 51–63, doi: 10.1007/s11120-015-0088-y.
- Tikhonov, A. N. (2014) The cytochrome b_6f complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways, *Plant. Physiol. Biochem.*, **81**, 163–183, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.12.011.
- Malone, L. A., Proctor, M. S., Hitchcock, A., Hunter, C. N., and Johnson, M. P. (2021) Cytochrome b_6f – Orchestrator of photosynthetic electron transfer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 148380, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148380.
- Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717–749, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717.

7. Романовский Ю. М., Тихонов А. Н. (2010) Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-синтаза — вращающийся молекулярный мотор, *Успехи физических наук*, **180**, 931-956.
8. Walker, J. E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1-16, doi: 10.1042/BST20110773.
9. Junge, W., and Nelson, N. (2015) ATP synthase, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 631-657, doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034124.
10. Lemeille, S., and Rochaix, J.-D. (2010) State transitions at the crossroad of thylakoid signaling pathways, *Photosynth. Res.*, **106**, 33-46, doi: 10.1007/s11120-010-9538-8.
11. Foyer, C. H., Neukermans, J., Queval, G., Noctor, G., and Harbinson, J. (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression, *J. Exp. Bot.*, **63**, 1637-1661, doi: 10.1093/jxb/ers013.
12. Rochaix, J.-D. (2014) Regulation and dynamics of the light-harvesting system, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **65**, 287-309, doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040226.
13. Tikhonov, A. N. (2015) Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts: An overview, *Photosynth. Res.*, **125**, 65-94, doi: 10.1007/s11120-015-0094-0.
14. Balsera, M., Schürmann, P., and Buchanan, B. B. (2016) Redox regulation in chloroplasts, in *Chloroplasts. Current Research and Future Trends* (Kirchhoff, H., ed.) Caister Academic Press, pp. 187-208, doi: 10.21775/9781910190470.09.
15. Staehelin, L. A. (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supramolecular architecture of thylakoid membranes, *Photosyn. Res.*, **76**, 185-196, doi: 10.1023/A:1024994525586.
16. Höhner, R., Pribil, M., Herbstová, M., Lopez, L. S., Kunz, H.-H., et al. (2020) Plastocyanin is the long-range electron carrier between photosystem II and photosystem I in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 15354-15362, doi: 10.1073/pnas.2005832117.
17. Munekage Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K.-I., Endo, T., et al. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis, *Nature*, **429**, 579-582, doi: 10.1038/nature02598.
18. Strand, D. D., Fisher, N., and Kramer, D. M. (2016) Distinct energetics and regulatory functions of the two major cyclic electron flow pathways in chloroplasts, in *Chloroplasts: Current Research and Future Trends* (Kirchhoff Helmut, ed.) Caister Academic Press, pp. 89-100, doi: 10.21775/9781910190470.04.
19. Kirchhoff, H. (2014) Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 495-502, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.11.003.
20. Tikhonov, A. N. (2018) The cytochrome b_6f complex: biophysical aspects of its functioning in chloroplasts, in *Membrane Protein Complexes: Structure and Function, Subcellular Biochemistry* (Harris, J.R., Boekema, E.J., eds.) **87**, Springer Nature, Singapore Pte Ltd., pp. 287-328, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_10.
21. Kramer, D. M., Sacksteder, C. A., and Cruz, J. A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.*, **60**, 151-163, doi: 10.1023/A:1006212014787.
22. Tikhonov, A. N. (2013) pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **116**, 511-534, doi: 10.1007/s11120-013-9845-y.
23. Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S., and Crofts, A. R. (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 1005-1075, doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.1005.
24. Crofts, A. R. (2004) The cytochrome bc_1 complex: function in the context of structure, *Annu. Rev. Physiol.*, **66**, 689-733, doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251.
25. De Vitry C., Ouyang, Y., Finazzi, G., Wollman, F.-A., and Kallas, T. (2004) The chloroplast Rieske iron-sulfur protein: at the crossroad of electron transport and signal transduction, *J. Biol. Chem.*, **279**, 44621-44627, doi: 10.1074/jbc.M406955200.
26. Cramer, W. A., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G., and Smith, J. L. (2006) Transmembrane traffic in the cytochrome b_6f complex, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 769-790, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142756.
27. Cramer, W. A., and Hasan, S. S. (2016) Structure-function of the cytochrome b_6f lipoprotein complex, in *Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling* (Cramer, W. A., and Kallas, T., eds) Springer, Dordrecht, pp. 177-207, doi: 10.1007/978-94-017-7481-9_9.
28. Sarewicz, M., Pintscher, S., Pietras, R., Borek, A., Bujnowicz, Ł., et al. (2021) Catalytic reactions and energy conservation in the cytochrome bc_1 and b_6f complexes of energy-transducing membranes, *Chem. Rev.*, **121**, 2020-2108, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00712.
29. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.-L., and Picot, D. (2003) An atypical heme in the cytochrome b_6f complex, *Nature*, **426**, 413-418, doi: 10.1038/nature02155.
30. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (2003) Structure of the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity, *Science*, **302**, 1009-1014, doi: 10.1126/science.1090165.
31. Yamashita, E., Zhang, H., and Cramer, W. A. (2007) Structure of the cytochrome b_6f complex: Quinone analogue inhibitors as ligands of heme c_n , *J. Mol. Biol.*, **370**, 39-52, doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.011.
32. Malone, L. A., Qian, P., Mayneord, G. E., Hitchcock, A., Farmer, D. A., et al. (2019) Cryo-EM

- Structure of the spinach cytochrome *b₆f* complex at 3.6 Å resolution, *Nature*, **575**, 535-539, doi: 10.1038/s41586-019-1746-6.
33. Samoilova, R. I., Kolling, D., Uzawa, T., Iwasaki, T., Crofts, A. R., et al. (2002) The interaction of the Rieske iron sulfur protein with occupants of the Q_o-site of the *bc₁* complex, probed by 1D and 2D electron spin echo envelope modulation, *J. Biol. Chem.*, **277**, 4605-4608, doi: 10.1074/jbc.C100664200.
34. Zu, Y., Couture, M. M.-J., Kolling, D. R. J., Crofts, A. R., Eltis, L. D., et al. (2003) The reduction potentials of Rieske clusters: the importance of the coupling between oxidation state and histidine protonation state, *Biochemistry*, **42**, 12400-12408, doi: 10.1021/bi0350957.
35. Hsueh K.-L., Westler W. M., and Markley J. L. (2010) NMR investigations of the Rieske protein from *Thermus thermophilus* support a coupled proton and electron transfer mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 7908-7918, doi: 10.1021/ja1026387.
36. Iwaki, M., Yakovlev, G., Hirst, J., Osyczka, A., Dutton, P. L., et al. (2005) Direct observation of redox-linked histidine *bc₁* complex by ATR-FTIR spectroscopy, *Biochemistry*, **44**, 4230-4237, doi: 10.1021/bi047533v.
37. Lin, I.-J., Chen, Y., Fee, J. A., Song, J., Westler, W. M., et al. (2006) Rieske protein from *Thermus thermophilus*: ¹⁵N NMR titration study demonstrates the role of iron-ligated histidines in the pH dependence of the reduction potential, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10672-10673, doi: 10.1021/ja0627388.
38. Lhee, S., Kolling, D. R. J., Nair, S. K., Dukatov, S. A., and Crofts, A. R. (2010) Modifications of protein environment of the [2Fe-2S] cluster of the *bc₁* complex: effects on the biophysical properties of the Rieske iron-sulfur protein and on the kinetics of the complex, *J. Biol. Chem.*, **285**, 9233-9248, doi: 10.1074/jbc.M109.043505.
39. Postila, P.A., Kaszuba, K., Sarewicz, M., Osyczka, A., Vattulainen, I., et al. (2013) Key role of water in proton transfer at the Q_o-site of the cytochrome *bc₁* complex predicted by atomistic molecular dynamics simulations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 761-768, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.02.005.
40. Barragan, A. M., Schulten, K., and Solov'yov, I. A. (2016) Mechanism of the primary charge transfer reaction in the cytochrome *bc₁* complex, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 11369-11380, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b07394.
41. Sarewicz, M., Dutka, M., Pintscher, S., and Osyczka, A. (2013) Triplet state of the semiquinone-Rieske cluster as an intermediate of electronic bifurcation catalyzed by cytochrome *bc₁*, *Biochemistry*, **52**, 6388-6395, doi: 10.1021/bi400624m.
42. Sarewicz, M., Bujnowicz, Ł., Satarupa, B., Singh S. K., Cramer W. A., et al. (2017) Metastable radical state, nonreactive with oxygen, is inherent to catalysis by respiratory and photosynthetic cytochromes *bc₁/b₆f*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1323-1328, doi: 10.1073/pnas.1618840114.
43. Pietras, R., Sarewicz, M., and Osyczka, A. (2016) Distinct properties of semiquinone species detected at the ubiquinol oxidation Q_o of cytochrome *bc₁* and their mechanistic implications, *J. R. Soc. Interface*, **13**, 20160133, doi: 10.1098/rsif.2016.0133.
44. Sarewicz, M., Bujnowicz, Ł., and Osyczka, A. (2018) Generation of semiquinone-[2Fe-2S]⁺ spin-coupled center at the Q_o site of cytochrome *bc₁* in redox-poised, illuminated photosynthetic membranes from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 145-153, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.11.006.
45. Zhang, Z. L., Huang, L. S., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., et al. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc₁*, *Nature*, **392**, 677-684, doi: 10.1038/33612.
46. Brandt, U. (1996) Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome *bc₁* complex by proton-gated charge transfer, *FEBS Lett.*, **387**, 1-6, doi: 10.1016/0014-5793(96)00436-x.
47. Link, T. A. (1997) The role of the "Rieske" iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q_p) site of the cytochrome *bc₁* complex: the "proton-gated affinity change" mechanism, *FEBS Lett.*, **412**, 257-264, doi: 10.1016/s0014-5793(97)00772-2.
48. Cramer, W. A., Hasan, S. S., and Yamashita, E. (2011) The Q cycle of cytochrome *bc* complexes: a structure perspective, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 788-802, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.02.006.
49. Zito, F., Finazzi, G., Joliot, P., and Wollman, F. A. (1998) Glu78, from the conserved PEWY sequence of subunit IV, has a key function in the cytochrome *b₆f* turnover, *Biochemistry*, **37**, 10395-10403, doi: 10.1021/bi980238o.
50. Osyczka, A., Zhang, H., Mathe, C., Rich, P. R., Moser, C. C., et al. (2006) Role of the PEWY glutamate in hydroquinone-quinone oxidation-reduction catalysis in the Q_o site of cytochrome *bc₁*, *Biochemistry*, **45**, 10492-10503, doi: 10.1021/bi060013a.
51. Victoria, D., Burton, R., and Crofts, A. R. (2013) Role of the -PEWY-glutamate in catalysis at the Q_o-site of the Cyt *bc₁* complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 365-386, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.10.012.
52. Hasan, S. S., Yamashita, E., Baniulis, D., and Cramer, W. A. (2013) Quinone-dependent proton transfer pathways in the photosynthetic cytochrome *b₆f* complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4297-4302, doi: 10.1073/pnas.1222248110.
53. Crofts, A. R. (2004) Proton-coupled electron transfer at the Q_o-site of the *bc₁* complex controls the rate of ubihydroquinone oxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 77-92, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.10.012.
54. Ustynuk, L. Yu., and Tikhonov, A. N. (2018) The cytochrome *b₆f* complex: DFT modeling of

- the first step of plastoquinol oxidation by the iron-sulfur protein, *J. Organomet. Chem.*, **867**, 290-299, doi: 10.1016/j.jorganchem.2018.01.023.
55. Ustyniuk, L. Y., Trubitsin, B. V., and Tikhonov, A. N. (2018) DFT modeling of the first step of plastoquinol oxidation by the iron-sulfur protein of the cytochrome *b₆f* complex, *Mendeleev Commun.*, **28**, 170-172, doi: 10.1016/j.mencom.2018.03.020.
 56. Laikov, D. N. (1997) Fast evaluation of density functional exchange-correlation terms using the expansion of the electron density in auxiliary basis sets, *Chem. Phys. Lett.*, **281**, 151-156, doi: 10.1016/S0009-2614(97)01206-2.
 57. Perdew, J. P., Burke, K., and Ernzerhof, M. (1996) Generalized gradient approximation made simple, *Phys. Rev. Lett.*, **77**, 3865-3868, doi: 10.1103/PhysRevLett.77.3865.
 58. Siegbahn P. E. M., and Blomberg, M. R. A. (1999) Density functional theory of biologically relevant metal centers, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **50**, 221-249, doi: 10.1146/annurev.physchem.50.1.221.
 59. Noodleman, L., Peng, C. Y., Case, D. A., and Mouesca, J.-M. (1995) Orbital interactions, electron delocalization, and spin coupling in iron-sulfur clusters, *Coor. Chem. Rev.*, **144**, 199-244, doi: 10.1016/0010-8545(95)07011-L.
 60. Noodleman, L., Lovell, T., Liu, T., Himo, F., and Torres, R. A. (2002) Insights into properties and energetics of iron-sulfur proteins from simple clusters to nitrogenase, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 259-273, doi: 10.1016/S1367-5931(02)00309-5.
 61. Palmer, G. (1985) The electron paramagnetic resonance of metalloproteins, *Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 548-560, doi: 10.1042/bst0130548.
 62. Hagen, W. R. (1992) Spectroscopy of iron-sulfur proteins, in *Advances in Inorganic Chemistry, Iron-Sulfur Proteins*, Academic Press, Inc., San Diego, pp. 165-222, doi: 10.1016/S0898-8838(08)60064-1.
 63. Link, T. A. (1999) The structures of Rieske and Rieske-type proteins, *Adv. Inorg. Chem.*, **47**, 83-157, doi: 10.1016/S0898-8838(08)60077-X.
 64. Hirshfeld, F. L. (1977) Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities, *Theoret. Chim. Acta (Berl.)*, **44**, 129-138, doi: 10.1007/BF00549096.
 65. Frolov, A. E., Sviryaeva, I. V., Ruuge, E. K., Trubitsin, B. V., and Tikhonov, A. N. (2010) EPR Spectra of the trimethyl-1,4-benzoquinone anion-radical: results of calculations by the density functional method and their comparison with experiment, *Rus. Zhurn. Phys. Chem. A*, **83**, 1543-1547, doi: 10.1134/S0036024410090189.
 66. Crofts, A. R., Hong, S., Wilson, C., Burton, R., Victoria, D., et al. (2013) The mechanism of ubihydroquinone oxidation at the Q_o-site of the cytochrome *bc₁* complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1362-1377, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.01.009.
 67. Zhu, J., Egawa, T., Yeh, S.-R., Yu, L., and Yu, C.-A. (2007) Simultaneous reduction of iron-sulfur protein and cytochrome *b_L* during ubiquinol oxidation in cytochrome *bc₁* complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4864-4869, doi: 10.1073/pnas.0607812104.
 68. Osyczka, A., Moser, C. C., and Dutton P. L. (2005) Fixing the Q cycle, *Trends. Biochem. Sci.*, **30**, 176-182, doi: 10.1016/j.tibs.2005.02.001.
 69. Reece, S. Y., and Nocera, D. G. (2009) Proton-coupled electron transfer in biology: results from synergetic studies in natural and model systems, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 673-699, doi: 10.1146/annurev.biochem.78.080207.092132.
 70. Hasan, S. S., Proctor, E. A., Yamashita, E., Dokholyan, N. V., and Cramer, W. A. (2014) Traffic within the cytochrome *b₆f* lipoprotein complex: gating of the quinone portal, *Biophys. J.*, **107**, 1620-1628, doi: 10.1016/j.bpj.2014.08.003.
 71. Hasan, S. S., and Cramer, W. A. (2012) On rate limitations of electron transfer in the photosynthetic cytochrome *b₆f* complex, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 13853-13860, doi: 10.1039/c2cp41386h.
 72. Ness, J., Naurin, S., Effinger, K., Stadnytskyi, V., Ibrahim, I. M., et al. (2019) Structure-based control of the rate limitation of photosynthetic electron transport, *FEBS Lett.*, **593**, 2103-2111, doi: 10.1002/1873-3468.13484.
 73. Hasan, S.S., Cramer, W.A. (2014) Internal lipid architecture of the hetero-oligomeric cytochrome *b₆f* complex, *Structure*, **22**, 1008-1015, doi: 10.1016/j.str.2014.05.004.
 74. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th Edn., Oxford University, Oxford, doi: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
 75. Mubarakshina, M., Khorobrykh, S., and Ivanov, B. (2006) Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1496-1503, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.09.004.
 76. Ivanov, B. N., Borisova-Mubarakshina, M. M., and Kozuleva, M. A. (2018) Formation mechanisms of superoxide radical and hydrogen peroxide in chloroplasts, and factors determining the signalling by hydrogen peroxide, *Funct. Plant Biol.*, **45**, 102-110, doi: 10.1071/FP16322.
 77. Pierre, Y., Breyton, C., Kramer, D., and Popot, J.-L., (1995) Purification and characterization of the cytochrome *b₆f* complex from *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 29342-29349, doi: 10.1074/jbc.270.49.29342.

PLASTOQUINOL OXIDATION: THE RATE-LIMITING STEP IN THE CHAIN OF ELECTRON TRANSPORT IN CHLOROPLASTS

L. Yu. Ustynyuk¹ and A. N. Tikhonov^{2*}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

² Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: an_tikhonov@mail.ru

This work is devoted to theoretical study of functioning of the cytochrome (Cyt) b_6f complex (plastoquinol:plastocyanin oxidoreductase) of the electron transport chain (ETC) of oxygenic photosynthesis. The composition of the chloroplast ETC and molecular mechanisms of functioning the cytochrome b_6f complex, which is positioned between photosystems 2 and 1 (PS2 and PS1), are briefly overviewed. The Cyt b_6f complex oxidizes plastoquinol (PQH₂) molecules formed in PS2, and reduces plastocyanin, electron donor to PS1. Plastoquinol oxidation is the rate-limiting step in the ETC between PS2 and PS1. Using the density function theory (DFT) method, we have analyzed the two-electron (bifurcated) processes of PQH₂ oxidation in the Q_o center of the Cyt b_6f complex. Results of DFT calculations are consistent with the fact that the first step of PQH₂ oxidation, the electron transfer to the Fe₂S₂ cluster of the iron-sulfur protein (ISP), is the endergonic (energy-accepting) process ($\Delta E \sim 15 \text{ kJ mol}^{-1}$) that would limit the turnover of the Cyt b_6f complex. The second stage of bifurcated oxidation of quinol – the electron transfer from semiquinone (PQH[•], formed after the first stage of electron transfer) to heme b_6^L , is the exergonic (energy-donating) process ($\Delta E < 0$). DFT modeling of this stage revealed that semiquinone oxidation was accelerated after the PQH[•] displacement towards heme b_6^L (an electron acceptor) and the carboxy group of Glu78 (a proton acceptor). The data obtained are discussed within the framework of the Mitchell Q-cycle model describing the plastoquinol oxidation at the Q_o site of the Cyt b_6f complex.

Keywords: photosynthesis, cytochrome complex, plastoquinol oxidation, modelling

ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРОДА ФОТОАВТОТРОФНЫМИ КУЛЬТУРАМИ *Chlamydomonas reinhardtii* ПРИ НЕДОСТАТКЕ УГЛЕКИСЛОТЫ

© 2022 В.И. Гречаник, М.А. Большаков, А.А. Цыганков*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: ttt-00@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2022

После доработки 08.08.2022

Принята к публикации 10.08.2022

Светозависимое выделение водорода микроводорослями привлекает внимание исследователей теоретической возможностью использования этого процесса для конверсии энергии Солнца в альтернативные формы энергии. Считается, что цикл Кальвина–Бенсона–Бассама является конкурентным процессом выделения водорода микроводорослями, и его ограничение субстратом может привести к увеличению выхода водорода, причём при таком стрессе не происходит разрушения фотосинтетического аппарата. Нами изучено состояние фотоавтотрофных культур *Chlamydomonas reinhardtii* при их лимитировании углекислотой. Показано, что при продувании воздухом без углекислоты культуры переходили в стационарную фазу со снижением активности фотосистемы 2 за счёт перевосстановления пула пластохинонов с последующей деградацией всего фотосинтетического аппарата. При продувании аргоном без углекислоты культуры переходили в микроаэробные условия с выделением водорода около 5 мл в сутки на 1 литр культуры. Вероятно, остаточный кислород в культуральной жидкости ингибировал гидрогеназную активность культур. При этом также происходило снижение активности фотосистемы 2 за счёт перевосстановления пула пластохинонов с дальнейшей деградацией фотосинтетического аппарата. Высоких стартовых скоростей выделения водорода удавалось достичь при удалении углекислоты из культуральной жидкости, выключении света и адаптации культур к анаэробным условиям с последующим их освещением светом низкой интенсивности. Таким образом, при недостатке углекислоты в атмосфере аргона фотоавтотрофные культуры способны к выделению водорода, причём низкая скорость процесса обусловлена главным образом ингибированием гидрогеназной активности кислородом, а не конкуренцией цикла Кальвина–Бенсона–Бассама и гидрогеназы за электроны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотовыделение водорода микроводорослями, фотоавтотрофные культуры *Chlamydomonas reinhardtii*, недостаток углекислоты.

DOI: 10.31857/S0320972522100050, EDN: BVTXRV

ВВЕДЕНИЕ

Восемьдесят лет назад Гаффрон и Рубин обнаружили, что одноклеточная микроводоросль *Scenedesmus* после анаэробной инкубации в темноте при последующем освещении была способна к выделению водорода [1]. Позднее было показано, что эта способность распространена среди Chlorophyta, Xanthophyta и Bacillariophyta [2]. Скорость выделения водорода может достигать скоростей фотосинтетического выделения кислорода, а квантовый

выход — достигать теоретического максимума (0,25) [3]. Это обстоятельство и является главной причиной постоянного интереса к фотовыделению водорода микроводорослями. Однако процесс выделения водорода с высокой скоростью очень краткосрочен: выделяющийся при освещении кислород инактивирует гидрогеназу и репрессирует её синтез [4].

Токсическое действие кислорода на выделение водорода микроводорослями известно давно, и разработаны различные методы решения этой проблемы. Для краткосрочных экспе-

Принятые сокращения: РЦ — реакционный центр фотосинтеза; ФСII — фотосистема 2; Хл — хлорофилл; eH — окислительно-восстановительный потенциал среды относительно Ag/AgCl; HSM — стандартная питательная среда для фотоавтотрофных культур; pO₂ — парциальное давление кислорода, выраженное в % от насыщения культуральной среды воздухом; PQ — пластохинон; TAP — трис-ацетат-фосфатная среда.

* Адресат для корреспонденции.

риментов использовали дитионит для удаления кислорода [5, 6]. Для длительных экспериментов использовали активное продувание суспензии микроводорослей инертными газами [7]. В некоторых случаях исследователи полностью ингибировали активность ФСII с помощью дихлорфенилдиметилмочевины (DCMU) [8]. Однако эти методы не приводили к длительному стабильному выделению водорода и не являются пригодными для практического применения.

В начале двадцать первого века Melis et al. [9] разработали новый подход к получению анаэробных культур микроводорослей при освещении: серное голодание. При недостатке серы культуры сначала выделяли кислород и синтезировали крахмал, а затем снижали активность ФСII и переходили в анаэробные условия. В этих условиях на свету происходил синтез гидрогеназ, и начиналось светозависимое выделение водорода, длящееся несколько суток. Было также показано, что при недостатке серы выделение водорода возможно и в фотоавтотрофных условиях, без использования ацетата [10]. В дальнейшем исследователи использовали подходы с недостатком других элементов минерального питания, таких как азот [11, 12] и фосфор [13]. Однако для стабильного и продолжительного выделения водорода культуры микроводорослей значительно снижали активность ФСII [14], что неизбежно ограничивало скорость его выделения.

Одновременно с решением проблемы токсичности кислорода для ключевого фермента в выделении водорода, гидрогеназы, изучались и альтернативные пути транспорта электронов, способные конкурировать с выделением водорода. Среди них поток электронов на восстановление НАДФ с последующей фиксацией углекислоты в цикле Кальвина–Бенсона–Бассама является наиболее активным. Nagy et al. [15] предложили подход инактивации цикла Кальвина–Бенсона–Бассама, основанный на его лимитировании субстратом. Для этого авторы использовали фотоавтотрофные культуры *Chlamydomonas reinhardtii*, из которых после выращивания удаляли углекислоту и инкубировали в темноте в анаэробных условиях. При включении света эти культуры выделяли водород с высокой скоростью. Авторы считают, что такой способ ограничения потока электронов, используемых для фиксации углекислоты, не приводит к разрушению ФСII, при этом выделение водорода идёт за счёт функционирования ФСII с получением электронов от воды. Однако авторам не удалось решить проблему ингибирующего действия кислорода на гидрогеназную активность, и они вводили в сосуды

поглотитель кислорода, основанный на железном порошке.

Целью данной работы было изучение возможности выделения водорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii* при лимитировании культур углекислотой с подробным анализом состояния ФСII.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия и способы культивирования. Исходные культуры *C. reinhardtii* Dang, штамм CC-124, поддерживали на чашках с агаром со стандартной трис-ацетатфосфатной (ТАР) средой (рН 6,9) при 28 °С и освещении (36 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹). Единичные колонии переносили в 10 мл среды ТАР и инкубировали 2 дня в тех же условиях.

Затем культуры выращивали фотоавтотрофно на среде High-Salt (HSM) [16] в колбах Эрленмейера на 500 мл, которые барботировали смесью воздуха с 2% CO₂ через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм (Acro 37 TF, «Gelman Sciences, Inc.», США) до поздней экспоненциальной фазы. Для опытов культуры выращивали в условиях контроля в фотобиореакторе и затем использовали в качестве инокулята в том же реакторе, что снижало стресс, вызванный пересевом культуры.

C. reinhardtii выращивали в фотобиореакторе объёмом 1,5 литра, состоящем из стеклянных коаксиальных цилиндров с внутренней мешалкой [17]. Световой путь (толщина культурального слоя) составлял 22 мм. Температуру (28 °С) и рН (7,4) контролировали автоматически системой на основе микропроцессора и ПК, как описано ранее [18]. В процессе культивирования культуры продували газовой смесью (98% воздуха + 2% CO₂ или 98% аргона + 2% CO₂, 100 мл/мин) через мембранные фильтры Acro 37 TF с размером пор 0,2 мкм («Gelman Sciences, Inc.»). Для освещения культур в фотобиореакторе на оси стеклянных цилиндров располагали люминесцентные лампы холодного белого цвета (Навигатор НКЛ-4У 30 Вт 4000 К). Интенсивность света на поверхности культур составляла 169 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ фотосинтетически активной радиации (ФАР) (измерено с помощью LiCOR LI-250, оснащённого датчиком квантов света). Фотобиореактор физически и программно был соединён с флуориметром JUNIOR-PAM («Walz», Германия), как описано ранее, причём в рециркуляционной петле движение осуществлялось импульсными пневматическими насосами [18]. Импульсы существенно замедляли обрастание кюветы.

Все эксперименты проводились с дважды концентрированной средой HSM (2*HSM).

Удаление углекислоты. В аэробных и анаэробных условиях недостаток углерода создавался удалением углекислого газа из газовой смеси. При этом при продувке культур воздухом он дополнительно очищался от углекислоты пропусканием через ловушку углекислоты, расположенную перед фильтром и содержащую 5 М раствор NaOH с установленным распылителем воздуха. Следует отметить, что при удалении углекислоты из культуральной среды pH в фотобиореакторе возрастал. Чтобы не вносить дополнительного стрессового фактора, pH среды поддерживался на уровне 7,4 путём автоматической добавки 0,2 М серной кислоты.

Измерения аскорбата. Для измерения аскорбата использовали протокол, описанный ранее [20]. Для измерений применяли систему ВЭЖХ Agilent 1100, оснащённую колонкой Supelco INC Waters spherisorb ODS2, 4,6 × 250 мм («Waters», США) с детектированием при 244 нм.

Другие методы. Содержание Хл ($a+b$) определяли спектрофотометрически в 95%-ном спиртовом экстракте [21]. Содержание крахмала, накопленного в клетках, определяли по количеству глюкозы, образующейся в результате ферментативного гидролиза [22]. Процентное содержание H_2 в газовой фазе фотобиореактора анализировали методом газовой хроматографии, как описано ранее [18]. Скорость выделения H_2 рассчитывали с учётом расхода газа (100 мл/мин) и процентного содержания H_2 на выходе, концентрации Хл и объёма культуры в реакторе. Накопление H_2 рассчитывали, предполагая, что между измерениями скорость выделения водорода неизменна.

Статистический анализ. Каждое измерение проводили в трёхкратной повторности. Для статистической обработки данных использовали Excel 2016. Данные представлены как средние значения с 95%-ным доверительным интервалом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование *C. reinhardtii* на воздухе с добавлением углекислоты. В качестве контроля использовали фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* в фотобиореакторе с использованием той же среды (2*HSM), но продуваемые смесью воздух + 2% CO_2 . При культивировании *C. reinhardtii* в этих условиях концентрация Хл ($a+b$) возрастала в течение первых 73 ч с последующим снижением (рис. 1). При этом мак-

симальная концентрация хлорофилла составила 50,4 мг/л. Можно констатировать, что после 73 ч культура переходила в стационарную фазу в связи с исчерпанием какого-то минерального компонента [18]. В начале культивирования pO_2 возрастало в течение первых 40 ч. После 60–70 ч культивирования pO_2 постепенно снижалось, что свидетельствует о замедлении скорости фотосинтетического выделения кислорода культурой, которое происходило раньше перехода в стационарную фазу. Содержание крахмала в клетках и еН (рис. 1) не изменялись в течение всего периода культивирования. Содержание аскорбата в клетках изменялось незначительно и было минимальным в конце экспоненциальной фазы. При этом реальный квантовый выход ФСП $Y(II)$ у культур в начале составлял 0,73–0,77, постепенно снижаясь, причём это снижение ускорялось при наступлении стационарной фазы и достигало 0,4 после 48 ч стационарной фазы. Эти изменения типичны для фотоавтотрофных культур и в общем соответствуют описанным ранее [18, 23].

В целом рост *C. reinhardtii* в аэробных условиях представляет собой типичную картину фотоавтотрофного культивирования микродорослей без стрессов, но с переходом от нелIMITированного роста к светолIMITированию с последующим исчерпанием какого-то компонента питания в стационарной фазе.

Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии воздуха с удалением углекислоты. С начала выращивания в данном режиме *C. reinhardtii* снабжали воздухом с углекислотой, как указано в методах. На 81 ч культивирования из подаваемой газовой смеси удаляли углекислоту (рис. 2). Уже через 15 мин после удаления углекислоты парциальное содержание растворённого кислорода в среде начинало снижаться. Одновременно с этим начинало снижаться $Y(II)$ за счёт некоторого возрастания F_T и значительного снижения F_m' . Через 7 ч после отключения CO_2 содержание кислорода стабилизировалось. Этот момент можно определить как переход культур в стационарную фазу, вызванную недостатком углерода (вследствие удаления углекислоты). Снижение F_m' и возрастание F_T свидетельствует о перевосстановленности пула PQ уже через 7 ч после удаления углекислоты, т.е. с наступлением стационарной фазы. После удаления углекислоты содержание Хл ($a+b$) снижалось всё время культивирования.

Таким образом, даже в аэробных условиях удаление углекислоты из подаваемой газовой фазы приводило к быстрому снижению $Y(II)$ за счёт перевосстановления пула PQ. При этом это снижение было более выражено, чем при

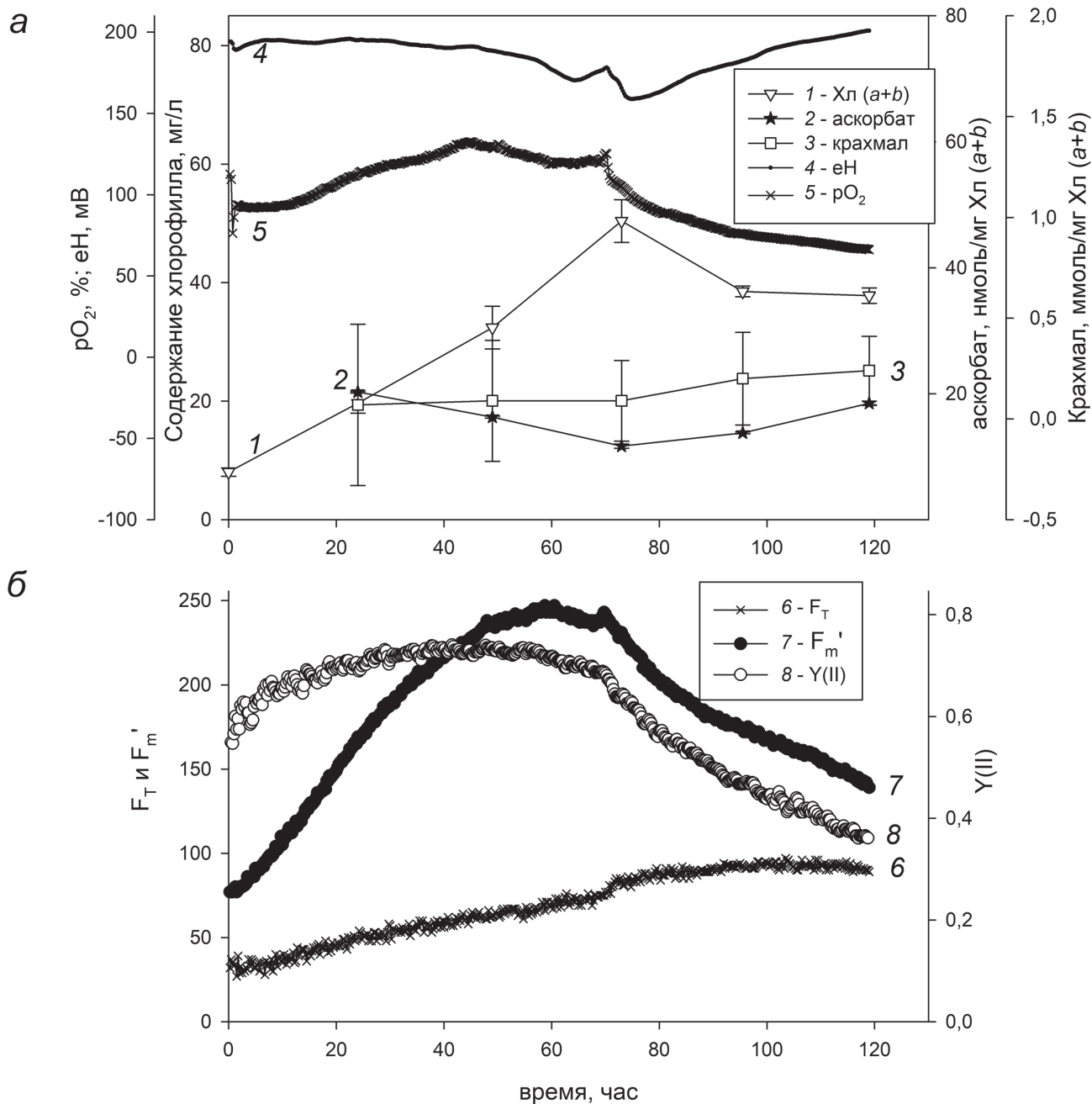


Рис. 1. Изменение (а) содержания Хл (а + b) (1), аскорбата (2), крахмала в клетках (3), eН (4), pO₂ (5) в культуральной жидкости, и (б) F_T (6), F_m' (7) и Y(II) (8) при росте *C. reinhardtii* в фотоавтотрофных условиях на среде 2*HSM. В этом и последующем экспериментах освещённость 168 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, t = 28 °С, рН = 7,4. Газовая фаза 98% воздух + 2% углекислоты

переходе контрольных культур в стационарную фазу (рис. 1). Учитывая значительное падение содержания Хл (а + b), следует отметить и общую деградацию фотосинтетического аппарата.

Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии аргона. С начала выращивания в данном режиме *C. reinhardtii* снабжали аргоном с углекислотой, как указано в методах. На 42,5 ч углекислоту удалили из газовой фазы (рис. 3). После этого момента содержание Хл (а + b) в фотобио-

реакторе снижалось, как и в условиях подачи воздуха (рис. 2). Через 3 ч парциальное давление кислорода, растворённого в культуральной жидкости, начинало снижаться одновременно с началом снижения eН (рис. 3, а). Одновременно снижалось F_m' (рис. 3, б), что свидетельствует о перевосстановленности пула PQ. Параллельно снижалось и Y(II). Через 7 ч после удаления углекислоты из газовой фазы pO₂ стабилизировалось, а в выходящей из фотобио-

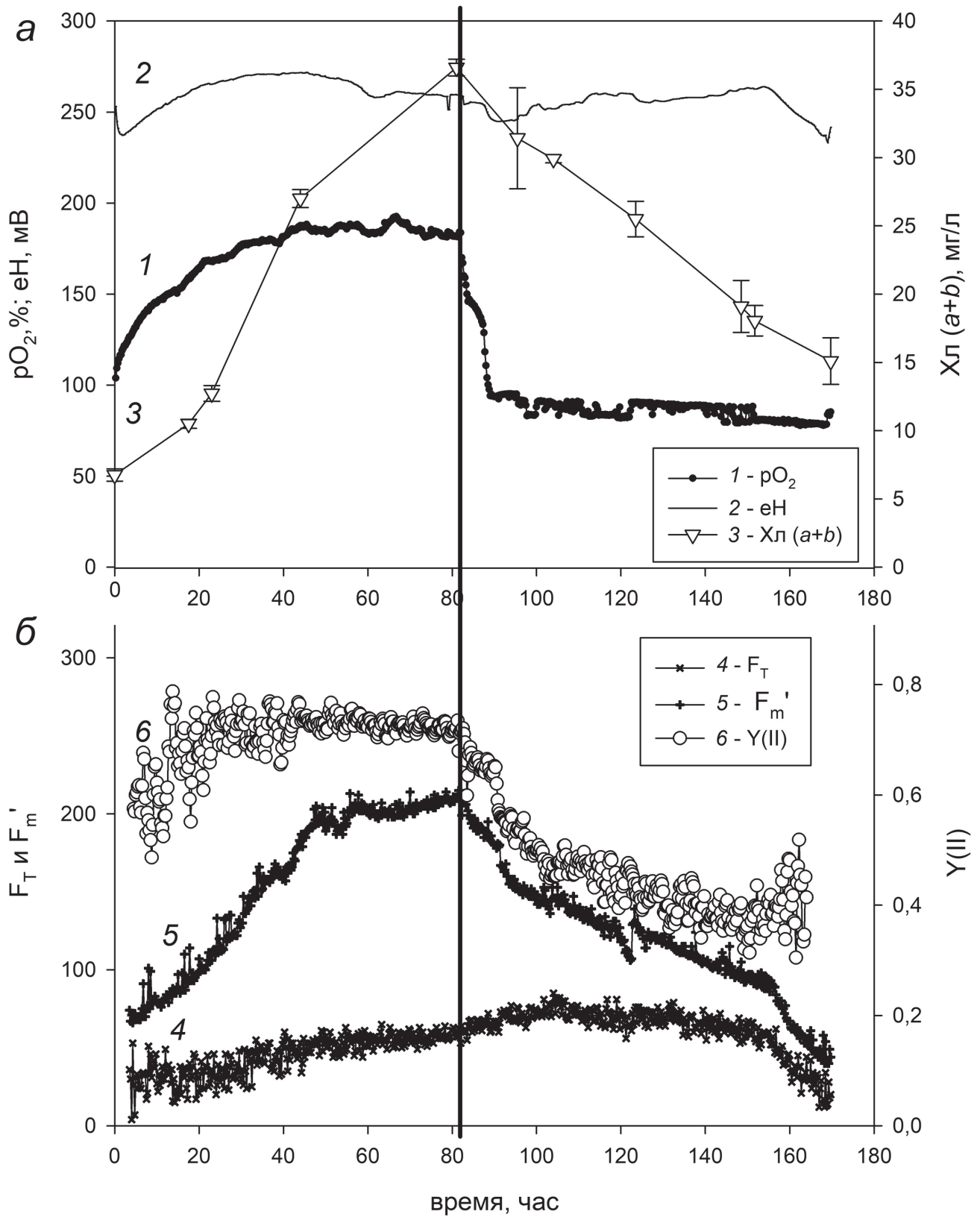


Рис. 2. Изменение (а) содержания pO_2 (1), eH (2) в культуральной жидкости и $Хл (a+b)$ (3) в клетках, и (б) F_T (4), F_m' (5) и $Y(II)$ (6) при росте *C. reinhardtii* в фотоавтотрофных условиях в присутствии воздуха с углекислотой. На 81 ч из подаваемой газовой смеси удалили углекислоту (отмечено вертикальной линией)

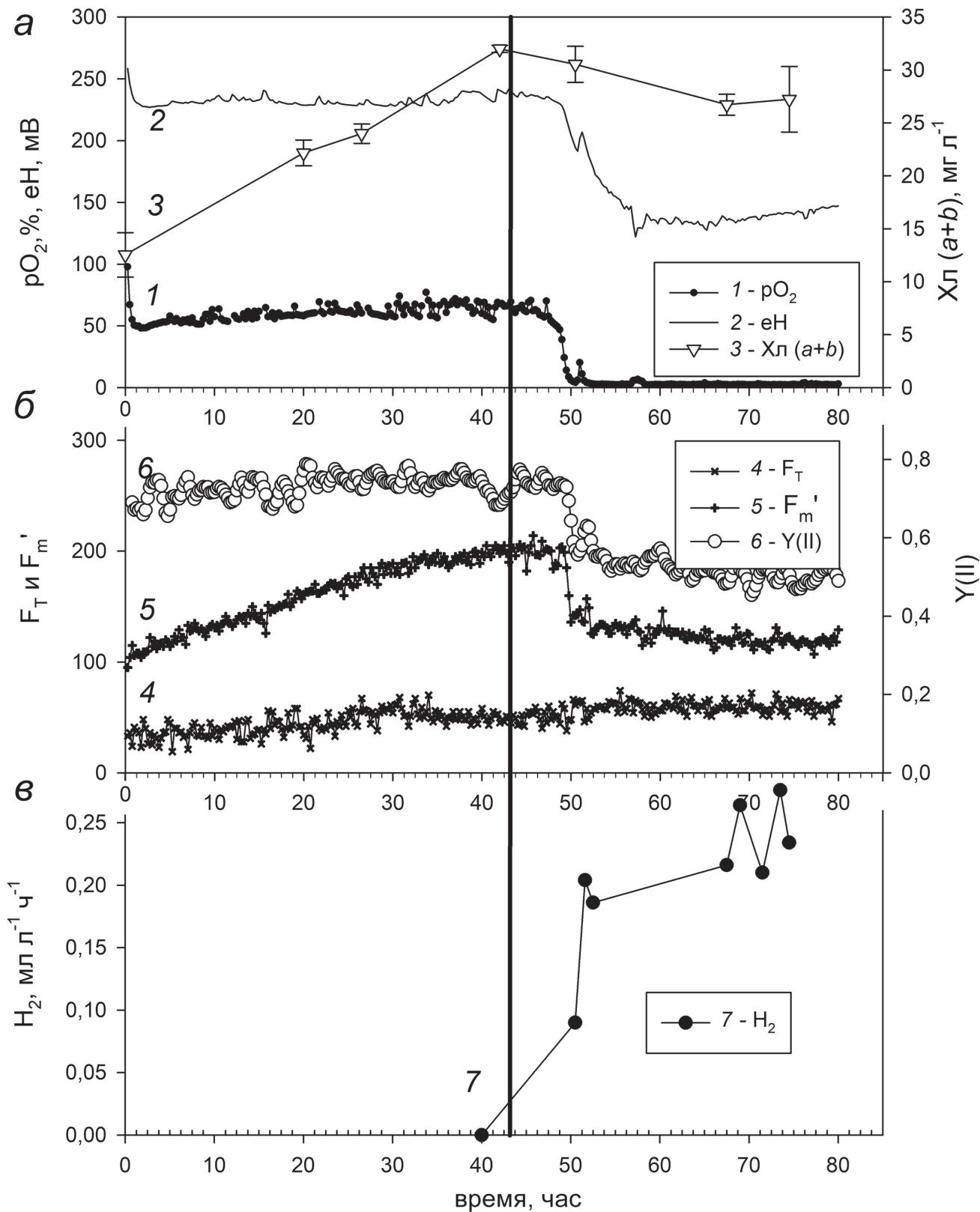


Рис. 3. Изменение (а) содержания pO₂ (1), eN (2) в культуральной жидкости и Хл (а+б) (3) в клетках, и (б) F_T (4), F_m' (5), Y(II), и (в) скорости образования водорода (7) при росте *C. reinhardtii* в фотоавтотрофных условиях в присутствии аргона с углекислотой. Удаление углекислоты на 42,5 ч

реактора газовой фазе обнаруживали водород (рис. 3, в). Важно отметить, что после исчерпания углекислоты pO_2 не падало до нуля, а было около 2,5%, поднимаясь в отдельные моменты до 5,5%, хотя культуры продували аргоном со скоростью 100 мл/мин (см. «Материалы и методы»). Количество выделившегося водорода составило 4,9 мл/литр культуры за 24 ч.

Если предположить, что в наших экспериментах, как и в статье Nagy et al. [15], выделение водорода происходило за счёт прямого биофототоллиза воды (т.е. с участием двух фотосистем и без вклада восстановительных эквивалентов, образующихся при разложении крахмала, в общий поток электронов), то скорость выделения кислорода должна быть вдвое меньше, чем скорость выделения водорода, т.е. 0,05–0,12 мл/ч (рис. 3, в). Если также предположить, что концентрация кислорода в культуральной жидкости находилась в равновесии с концентрацией в газовой фазе, то, учитывая скорость потока аргона (100 мл/мин), парциальное давление кислорода в культуральной жидкости не должно превышать $(0,12 \text{ мл/ч}) / (100 \text{ мл/мин}) = (0,12 \text{ мл/ч}) / (6000 \text{ мл/ч}) = 0,002\%$, что на три порядка ниже наблюдаемого нами в экспериментах. Очевидно, что в условиях образования кислорода в жидкости и при потоке газа 100 мл/мин в фотобиореакторе с объёмом культуры 1 литр даже при интенсивном перемешивании нельзя ожидать равновесной концентрации кислорода в жидкой и газовой фазах, т.е. приведённая расчётная оценка концентрации кислорода в жидкости является заниженной. Тем не менее нельзя исключить, что фотоавтотрофные культуры микроводорослей в микроаэробных условиях способны, как и фотоавтотрофные культуры в анаэробных условиях, к деградации крахмала с образованием ацетата [24] и, соответственно, углекислоты, которая реассимилируется при фотосинтезе с образованием кислорода. Однако для подтверждения такого предположения требуются дополнительные эксперименты.

Известно, что концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) гидрогеназной активности кислородом составляет 0,3–0,4% [4]. Это значение примерно в 6–8 раз ниже содержания кислорода в культуральной жидкости в наших экспериментах. Таким образом, скорость выделения водорода определялась в нашем случае ингибированием гидрогеназной активности остаточным кислородом в среде.

В наших экспериментах количество выделившегося водорода было значительно ниже, чем описано в статье Nagy et al. [15], изучавших выделение водорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii* при удалении углекисло-

ты. Основным отличием наших экспериментов было отсутствие темнового инкубационного периода в анаэробных условиях. В целях выявления важности инкубации культур в темноте в анаэробных условиях, а также учитывая, что фотоавтотрофные культуры микроводорослей при серном голодании выделяли водород с наибольшей скоростью при пониженной интенсивности света в анаэробной и последующей фазах [10], в следующем эксперименте после удаления из культуральной жидкости углекислоты выключали свет на 2 ч и далее освещали культуры светом пониженной интенсивности (40 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$).

Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии аргона с анаэробной адаптацией. В начале культивирования (когда активность ФСII максимальна, и в среде есть CO_2) интенсивность света была 168 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$. Через 47,5 ч культивирования из подаваемой газовой смеси убирали CO_2 (рис. 4; наиболее быстрые изменения параметров культуры, происходящие в диапазоне времени от 47 до 60 ч, подробнее показаны на рис. 5). После начала снижения концентрации кислорода (51,8 ч после начала культивирования) культуры переводили на 2,5 ч в темновые условия. По истечении темновой адаптации включали свет с пониженной интенсивностью (40 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$). В этих условиях содержание суммарного хлорофилла возрастало в течение первых 47 ч, достигая 64 мг Хл ($a+b$)/литр, а в дальнейшем снижалось до 20 мг Хл ($a+b$)/литр к 167 ч (рис. 4, а). Концентрация кислорода вначале росла и к 25 ч стабилизировалась. В момент отключения CO_2 (47,5 ч) происходили изменения всех параметров культуры (рис. 5). Уже через час после исключения углекислоты из газовой фазы концентрация кислорода начинала снижаться. Одновременно с этим редокс-потенциал среды снижался и к моменту выключения света достигал +15 мВ. При снижении pO_2 до ~50% начиналось снижение $Y(II)$ до 0,35 за счёт одновременного падения F_m' и роста F_T . При падении pO_2 до нуля происходило дополнительное падение $Y(II)$ в основном за счёт роста F_T . Через ~30 мин после выключения света $Y(II)$ начинал возрастать до 0,45. Через час после включения света $Y(II)$ продолжал возрастать и достигал 0,65 через 4 ч. Это свидетельствует о том, что снижение $Y(II)$ после удаления углекислоты обусловлено перевосстановленностью пула PQ и не затрагивает структуру ФСII, поскольку является обратимым. Содержание аскорбата с момента удаления углекислоты до момента выключения света не изменялось, а при инкубации в темноте снижалось с последующим

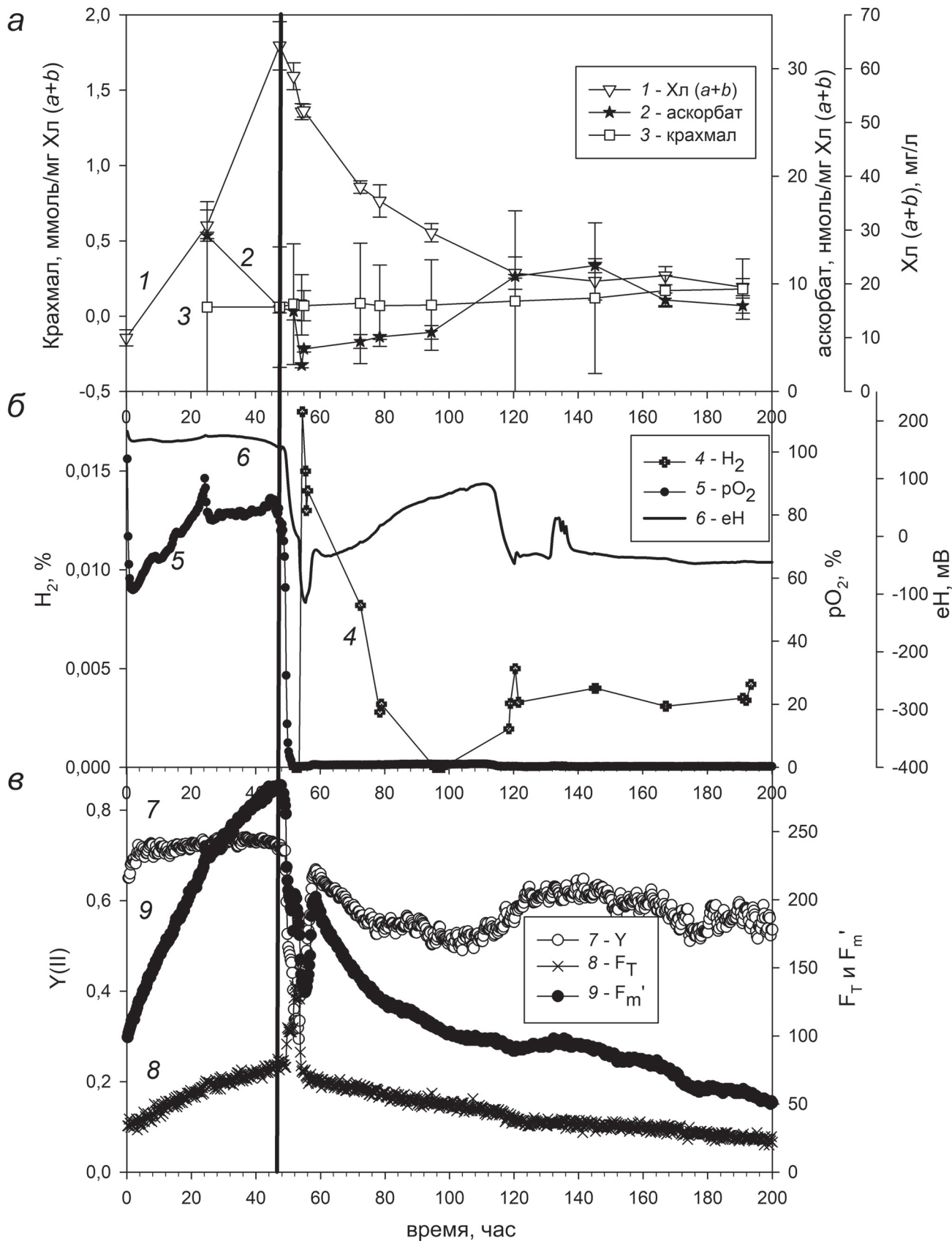


Рис. 4. Рост *S. reinhardtii* в фотобиореакторе в газовой фазе $Ar + 2\% CO_2$. *a* – Содержание Хл (a + b) (1), аскорбата (2) и крахмала (3); *б* – Содержание H_2 в газовой фазе (4), парциальное давление кислорода в жидкости (5) и eN (6); *в* – $Y(II)$ (7), F_T (8), F_m' (9) в фотобиореакторе. Удаление углекислоты в 47,5 ч (отмечено сплошной линией), выключение света ($168 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) в 51,8 ч, включение света ($40 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) в 54,3 ч с момента начала инкубации

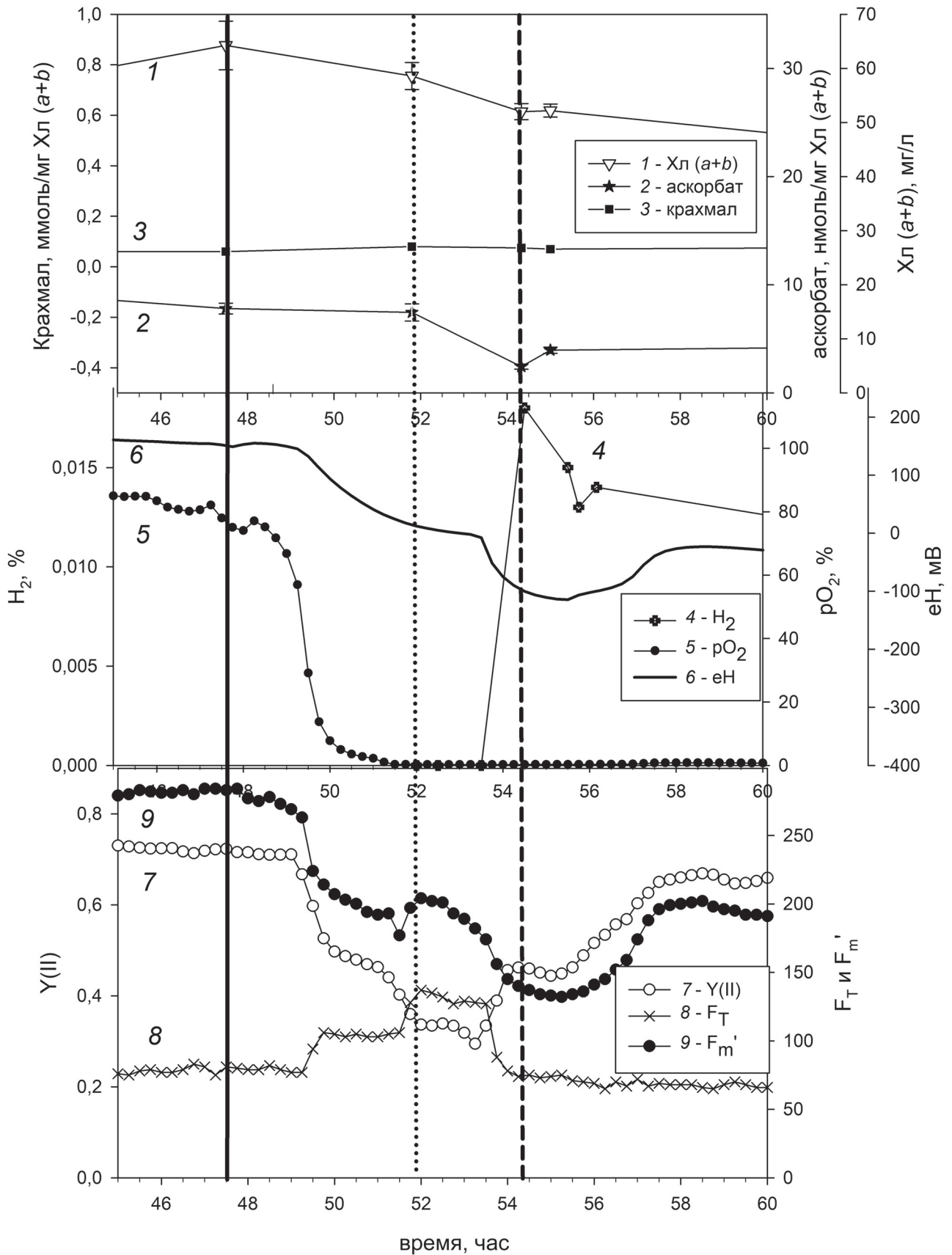


Рис. 5. Подробное представление изменений в культуре при удалении углекислоты (отмечено сплошной вертикальной линией), включая темновую адаптацию (отмечено пунктирной линией) и последующее включение света (штриховая линия). Кривые: 1 – Хл (a+b), 2 – аскорбат, 3 – крахмал, 4 – содержание Н₂ в газовой фазе, 5 – рО₂, 6 – eH, 7 – Y(II), 8 – F_T, 9 – F_m'

небольшим ростом после включения света. Это подтверждает отсутствие его конкуренции с водой за донирование электронов в ФСII, в отличие от микроводорослей при серном голодании в фотоавтотрофных условиях [25]. Содержание крахмала в клетках практически не изменялось.

Через 10 мин после включения света в выходящем из фотобиореактора газе обнаружилось 0,018% H_2 (рис. 4, 5). Это соответствует 1,1 мл H_2 в час на 1 литр культуры. Далее скорость выделения водорода существенно снижалась и даже падала до 0 на 95–98 ч, с возобновлением выделения на 118 ч. Всего за 138 ч (с 54,5 до 193,5 ч) выделилось 56 мл H_2 /литр культуры. Это несколько ниже, чем у фотоавтотрофных культур в условиях недостатка серы [18].

Следует отметить, что изменения данных ЛР-теста культур с анаэробной адаптацией после удаления углекислоты были аналогичны изменениям контрольных культур в стационарной фазе роста, вызванной истощением неизвестного компонента среды, то есть не являются специфическим ответом культур на углеродное голодание (данные не приведены).

Таким образом, культуры *C. reinhardtii* при глубоком лимитировании недостатком углерода способны к выделению водорода, но с низкой скоростью. Следует отметить, что культуры микроводорослей, выделяющие водород при недостатке элементов питания, одновременно реализуют три типа питания: фотосинтез, дыхание и брожение [8]. При этом доли энергетических вкладов этих типов питания взаимозависимы, но фотосинтез, по-видимому, является ключевым. Его активность определяет количество выделяющегося кислорода, который может использоваться в дыхании. Равновесная концентрация растворённого кислорода (отражающая равенство скоростей фотосинтеза и дыхания с учётом выноса кислорода потоком газа), в свою очередь, определяет остаточную активность брожения. Более того, в условиях, когда фиксация углекислоты подавлена (в нашем случае недостатком углекислоты), скорость фотосинтеза в значительной степени определяется скоростью выделения водорода (основной процесс, сбрасывающий избыток восстановленного ферредоксина). Выделение водорода, в свою очередь, определяется равновесной концентрацией кислорода, поскольку он является ингибитором активности гидрогеназы. Все эти процессы проходят со скоростями существенно ниже оптимальных. Для сравнения отметим, что скорость выделения кислорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii*, описанная для аналогичных условий, составляла 220–250 мкмоль $ч^{-1}$ $мг^{-1}$ Хл [24], что соот-

ветствует 150–170 мл $ч^{-1}$ литр $^{-1}$ культуры при концентрации Хл ($a+b$) 30 мг в 1 литре культуры. Гидрогеназная активность *C. reinhardtii* после анаэробной адаптации может достигать 300 мкмоль H_2 $ч^{-1}$ $мг^{-1}$ Хл [26], что соответствует 200 мл $ч^{-1}$ литр $^{-1}$ культуры при той же концентрации хлорофилла. Это на 2 порядка выше, чем полученные нами скорости выделения водорода. Низкое содержание крахмала в активно растущих фотоавтотрофных культурах микроводорослей косвенно свидетельствует, что скорость дыхания у таких культур не может быть высокой. Учитывая, что концентрация кислорода в наших экспериментах не была нулевой, такое низкое значение выделения водорода является результатом именно ингибирующего действия кислорода. Однако для окончательного вывода требуются дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Удаление углекислоты из подаваемой газовой фазы при продувке культур аргоном приводило к выделению водорода, но скорость процесса была невысокой. Это обусловлено парциальным давлением кислорода в культуральной жидкости, значительно превышающим IC_{50} для гидрогеназы. Даже если цикл Кальвина и конкурирует за электроны с гидрогеназой, решающее значение имеет ингибирующее действие кислорода.

Для существенного увеличения количества выделившегося водорода необходимо было проводить предварительную инкубацию культур в темноте в анаэробных условиях и освещать адаптированные культуры светом пониженной интенсивности. Однако через сутки после включения света даже в этих условиях выделение водорода снижалось до уровня, близкого к таковому для неадаптированных к анаэробнобиозу культур. Таким образом, для культур, лимитированных углекислотой (субстратом цикла Кальвина–Бассама–Бенсона), как и для культур с недостатком других элементов питания, скорость выделения водорода не определяется конкуренцией гидрогеназы с другими потребителями потока электронов. Решающим фактором является концентрация растворённого кислорода.

Вклад авторов. В.И. Гречаник – проведение экспериментов, обсуждение результатов, обсуждение и редактирование рукописи; М.А. Большаков – измерение аскорбата, обсуждение результатов, обсуждение и редактиро-

вание рукописи; А.А. Цыганков – концепция, обсуждение результатов, написание рукописи, обсуждение и редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена частично в рамках госзадания 122041200039-0 (рис. 2) и при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00255), остальная часть.

Благодарности. В работе использовали оборудование (ВЭЖХ хроматограф Agilent, газовый

хроматограф Цвет 800 и флуориметры JUNIOR-РАМ и Aquaren PSI) центра коллективного пользования Пущинского научного центра биологических исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gaffron, H., and Rubin, J. (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae, *J. Gen. Physiol.*, **26**, 219-240, doi: 10.1085/jgp.26.2.219.
- Boichenko, V. A., and Hoffmann, P. (1994) Photosynthetic hydrogen-production in prokaryotes and eukaryotes – occurrence, mechanism, and functions, *Photosynthetica*, **30**, 527-552.
- Бойченко В. А., Сатина Л. Ю., Литвин Ф. Ф. (1989) Эффективность фотовыделения водорода у водорослей и цианобактерий, *Физиол. Раст.*, **36**, 239-247.
- Ghirardi, M. L., Togasaki, R. K. and Seibert, M. (1997) Oxygen sensitivity of algal H₂-production, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63-65**, 141-151, doi: 10.1007/BF02920420.
- Pow, T. and Krasna, A. I. (1979) Photoproduction of hydrogen from water in hydrogenase-containing algae, *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 413-421, doi: 10.1016/0003-9861(79)90635-0.
- Urbig, T., Schulz, R., and Senger, H. (1993) Inactivation and reactivation of the hydrogenases of the green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Z. Naturforsch. C, Biosci.*, **48**, 41-45, doi: 10.1515/znc-1993-1-208.
- Greenbaum, E. (1980) Simultaneous photoproduction of hydrogen and oxygen by photosynthesis, *Biotechnol. Bioengin. Symp.*, **10**, 1-13.
- Grechanik, V., and Tsygankov, A. (2022) The relationship between photosystem II regulation and light-dependent hydrogen production by microalgae, *Biophys. Rev.*, **14**, doi: 10.1007/s12551-022-00977-z.
- Melis, A., Zhang, L. P., Forestier, M., Ghirardi, M. L., and Seibert, M. (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **122**, 127-135, doi: 10.1104/pp.122.1.127.
- Tsygankov, A. A., Kosourov, S. N., Tolstygina, I. V., Ghirardi, M. L., and Seibert, M. (2006) Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions, *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 1574-1584, 10.1016/j.ijhydene.2006.06.024.
- Philipps, G., Krawietz, D., Hemschemeier, A., and Happe, T. (2011) A pyruvate formate lyase-deficient *Chlamydomonas reinhardtii* strain provides evidence for a link between fermentation and hydrogen production in green algae, *Plant J.*, **66**, 330-340, doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04494.x.
- He, M. L., Li, L., Zhang, L. T., and Liu, J. G. (2012) The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation, *Int. J. Hydrogen Energy*, **37**, 16903-16915, doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.08.121.
- Batyrova, K. A., Tsygankov, A., and Kosourov, S. (2012) Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures, *Int. J. Hydrogen Energy*, **37**, 8834-8839.
- Antal, T. K., Krendeleva T. E., Laurinavichene T. V., Makarova, V. V., Ghirardi, M. L., et al. (2003) The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1607**, 153-160, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.09.008.
- Nagy, V., Podmaniczki, A., Vidal-Meireles, A., Tengölics, R., Kovács, L., et al. (2018) Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin–Benson–Bassham cycle, *Biotechnol. Biofuels*, **11**, 69, doi: 10.1186/s13068-018-1069-0.
- Winkler, M., Heil, B., and Happe, T. (2002) Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1576**, 330-334, doi: 10.1016/s0167-4781(02)00239-7.
- Tsygankov, A. A., Laurinavichene, T. V., and Gogotov, I. N. (1994) Laboratory-scale photobioreactor, *Biotechnol. Techniques*, **8**, 575-578, doi: 10.1007/BF00152149.
- Grechanik, V., Romanova, A., Naidov, I., and Tsygankov, A. (2020) Photoautotrophic cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*: sulfur deficiency, anoxia,

- and hydrogen production, *Photosynth. Res.*, **143**, 275-286, doi: 10.1007/s11120-019-00701-1.
19. Гольцев В. Н., Каладжи Х. М., Паунов М., Баба В., Хорачек, Т., и др. (2016) Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений, *Физиол. раст.*, **63**, 881-907.
 20. Kovacs, L., Vidal-Meireles, A., Nagy, V., and Toth, S. Z. (2016) Quantitative determination of ascorbate from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by HPLC, *Bio Protocol.*, **16**, doi: 10.21769/BioProtoc.2067.
 21. Harris, E. H. (1989) *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. San Diego: Academic Press, doi: 10.1016/C2009-0-02778-0.
 22. Gfeller, R. P., and Gibbs, M. (1984) Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*, I: analysis of fermentative products from starch in dark and light, *Plant Physiol.*, **75**, 212-218, doi: 10.1104/pp.75.1.212.
 23. Grechanik, V., Naidov, I., Bolshakov, M., and Tsygankov, A. (2021) Photoautotrophic hydrogen production by nitrogen-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures, *Int. J. Hydrogen Energy* **46**, 3565-3575, 10.1016/j.ijhydene.2020.10.215.
 24. Kosourov, S., Patrusheva, E., Ghirardi, M. L., Seibert, M., and Tsygankov, A. (2007) A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions, *J. Biotechnol.*, **128**, 776-787, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.12.025.
 25. Nagy, V., Vidal-Meireles, A., Podmaniczki, A., Szentmihályi, K., Rákhely, G., et al. (2018) The mechanism of photosystem-II inactivation during sulphur deprivation-induced H₂ production in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant J.*, **94**, 548-561, doi: 10.1111/tpj.13878.
 26. Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M., and Ghirardi, M. L. (2002) Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of culture parameters, *Biotechnol. Bioeng.*, **78**, 731-740, doi: 10.1002/bit.10254.

HYDROGEN PRODUCTION BY CO₂ DEPRIVED PHOTOAUTOTROPHIC CULTURES *Chlamydomonas reinhardtii*

V. I. Grechanik¹, M. A. Bol'shakov¹, and A. A. Tsygankov^{1*}

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
"Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences",
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: ttt-00@mail.ru*

Light-dependent microalgal hydrogen production attracts attention of researchers by potential possibility of practical application. It is accepted that Calvin–Benson–Bassham cycle competes with hydrogen production process for electrons and substrate (CO₂) limitation of the cycle can increase hydrogen production rate. Furthermore, photosystem II is not destroyed by CO₂ deficiency. We studied photoautotrophic cultures *Chlamydomonas reinhardtii* under CO₂ deficiency. Under the air atmosphere upon CO₂ exclusion from the gas phase cultures came to stationary phase of growth with down-regulation of photosystem II due to overreduction of plastoquinone pool with following degradation of whole photosynthetic machinery. Under Ar atmosphere CO₂ exclusion caused transfer to stationary phase and the establishment of microaerobic conditions with small (5 ml H₂ day⁻¹ liter⁻¹ culture) hydrogen production. Similar to Air atmosphere prolonged incubation of cultures under these conditions resulted in down-regulation of photosystem II due to overreduction of plastoquinone pool with following degradation of whole photosynthetic machinery. After exclusion of CO₂, transfer cultures into dark anaerobic conditions (2.5 h) with following illumination by low light cultures produced H₂ with high initial rate. Total microalgal hydrogen production under these conditions was 56 ml H₂ liter⁻¹ culture. Thus, CO₂-deprived photoautotrophic cultures produce hydrogen. Hydrogen production was limited by toxic action of oxygen for hydrogenase but not by Calvin–Benson–Bassham cycle competition with hydrogen production process.

Keywords: microalgal hydrogen production, photoautotrophic cultures, *Chlamydomonas reinhardtii*, CO₂ deprivation

ИЗМЕНЕНИЕ СИММЕТРИИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИСТЕМЫ 1 ПРИ УДАЛЕНИИ ЖЕЛЕЗО-СЕРНЫХ КЛАСТЕРОВ

© 2022 А.А. Суханов¹, М.Д. Мамедов², Г.Е. Милановский²,
К.М. Салихов¹, А.Ю. Семенов^{2*}

¹ Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского, ФИЦ Казанский научный центр РАН,
420029 Казань, Россия

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234 Москва, Россия; электронная почта: semenov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 04.07.2022

После доработки 09.08.2022

Принята к публикации 16.08.2022

В фотосинтетических реакционных центрах интактных комплексов фотосистемы 1 (ФС 1) из цианобактерий перенос электронов при комнатной температуре происходит по двум симметричным ветвям редокс-кофакторов *A* и *B* в соотношении ~3 : 1 в пользу ветви *A*. Ранее это было косвенно показано с помощью импульсной абсорбционной спектроскопии и более прямо — с помощью измерения частот модуляции спада сигналов электронного спинового эха (Electron Spin Echo Envelope Modulation, ESEEM), которое позволяет определить расстояние между разделёнными зарядами на первичном доноре электрона P_{700}^+ и филлохионных акцепторах A_{1A} и A_{1B} в ветвях кофакторов *A* и *B*. В настоящей работе эти расстояния с помощью ESEEM были определены на комплексах ФС 1, лишённых трёх 4Fe-4S кластеров — F_X , F_A и F_B , а также белковой субъединицы PsaC (так называемые P_{700} - A_1 -core), в которых терминальными акцепторами служат молекулы филлохинона A_{1A} и A_{1B} . Было показано, что на препаратах P_{700} - A_1 -core среднее расстояние между центрами ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ при температуре 150 К в водно-глицериновом растворе и в высушенной трегалозной матрице, а также в трегалозной матрице при температуре 280 К составляет ~25,5 Å, что соответствует симметричному переносу электрона по ветвям редокс-кофакторов *A* и *B* в соотношении 1 : 1. Обсуждаются возможные причины изменения симметрии переноса электрона в ФС 1 при удалении субъединицы PsaC и 4Fe-4S кластеров F_X , F_A , F_B .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема 1, перенос электрона, модуляция спада сигналов электронного спинового эха (ESEEM), трегалозная матрица, железо-серные кластеры.

DOI: 10.31857/S0320972522100062, EDN: BCCHBW

ВВЕДЕНИЕ

Реакционный центр (РЦ) фотосистемы 1 (ФС 1) цианобактерий и зелёных растений содержит 11 редокс-кофакторов, включая шесть молекул хлорофилла (Хл), две молекулы филлохинона (PhQ) и три железо-серных центра 4Fe-4S типа — F_X , F_A и F_B [1]. Индуцированный лазерной вспышкой, перенос электрона включает окисление первичного донора электро-

на — димера хлорофилла P_{700} , последовательный перенос через первичный хлорофилльный акцептор A_0 на филлохионные акцепторы A_1 и 4Fe-4S кластеры F_X , F_A и F_B [2]. В отсутствие экзогенных акцепторов электрона в РЦ ФС 1 наблюдается рекомбинация зарядов между восстановленными терминальными 4Fe-4S кластерами $[F_A/F_B]^-$ и окисленным донором P_{700}^+ . Ранее было показано, что при последовательном удалении из ФС 1 кластеров F_B , F_A и F_X об-

Принятые сокращения: РЦ — реакционный центр; ФС 1 — фотосистема 1; Хл — хлорофилл; A_1 — филлохион — вторичный акцептор электрона; E_m — среднеточечный редокс-потенциал; ESEEM — метод измерения частот модуляции спада сигналов электронного спинового эха (Electron Spin Echo Envelope Modulation); P_{700} — димер хлорофилла — первичный донор электрона; PhQ — филлохион.

* Адресат для корреспонденции.

ратный перенос электрона на P_{700}^+ происходит с предыдущих акцепторов – F_A , F_X и A_1 соответственно [3–5].

Комплекс ФС 1 из цианобактерий состоит из 12 белковых субъединиц, из которых только три ($PsaA$, $PsaB$ и $PsaC$) связывают все кофакторы переноса электрона. Эти субъединицы связывают также 79 из 90 молекул Хл светособирающей антенны. При этом субъединицы $PsaA$ и $PsaB$ являются центральной частью комплекса, образуют гетеродимер и связывают шесть молекул Хл РЦ, две молекулы PhQ и 4Fe-4S кластер F_X , а субъединица $PsaC$, примыкающая к акцепторному участку гетеродимера $PsaA/PsaB$, связывает терминальные железо-серные кластеры F_A и F_B . Редокс-кофакторы, связанные с $PsaA/PsaB$, расположены вдоль C_2 оси симметрии, проходящей через геометрический центр димера Хл P_{700} и кластер F_X , и образуют две симметричные ветви A и B [1, 3]. Таким образом, ветвь A содержит первичный акцептор A_{0A} (состоящий из молекул Хл $Chl2A$ и $Chl3A$) и молекулу PhQ A_{1A} , а ветвь B – первичный акцептор A_{0B} (состоящий из молекул Хл $Chl2B$ и $Chl3B$) и молекулу PhQ A_{1B} . Перенос электронов происходит по обеим ветвям и начинается с окисления P_{700} , а заканчивается на F_X , где ветви смыкаются, и осуществляется дальнейший перенос на терминальные акцепторы [F_A/F_B] (рис. 1, *a*).

Вопрос о причинах участия обеих ветвей редокс-кофакторов в переносе электрона в РЦ ФС 1 не вполне выяснен [3]. В двух других из-

ученных типах РЦ – комплексах ФС 2 и бактериальных РЦ – у которых также имеются две симметричные ветви кофакторов, аналогичные ветвям A и B , перенос происходит только по одной ветви на первичный хинонный акцептор Q_A , а затем с Q_A^- на вторичный акцептор Q_B с образованием стабильного семихинона Q_B^- . При возбуждении таких РЦ второй вспышкой света наблюдается полное восстановление Q_B^- с образованием протонированного вторичного хинона Q_BH_2 , который, в свою очередь, окисляется цитохромным bc_1 -комплексом (b_6f в случае ФС 2). В то же время в ФС 1 перенос электрона происходит с молекул PhQ A_{1A} и A_{1B} на железо-серный кластер F_X , а переноса между молекулами PhQ A_{1A} и A_{1B} не происходит. Можно предположить, что возможность переноса по обеим ветвям редокс-кофакторов в ФС 1 является эволюционным приспособлением, позволяющим сохранить эффективное восстановление низкопотенциальных акцепторов электрона – ферредоксина и NADP – при случайных мутациях вблизи первичных акцепторов одной из ветвей редокс-кофакторов.

Перенос электронов в РЦ ФС 1 цианобактерий по ветвям A и B происходит асимметрично в соотношении $\sim 3 : 1$ в пользу ветви A [6]. При этом перенос с A_{0A} на A_{1A} и с A_{0B} на A_{1B} происходит с одинаковым характерным временем $\tau \approx 25$ пс, а перенос с A_{1A} на F_X – примерно на порядок медленнее, чем с A_{1B} на F_X ($\tau \approx 200$ нс против $\tau \approx 20$ нс, соответственно) [7–9]. Разница в скоростях реакций $A_{1A} \rightarrow F_X$ и $A_{1B} \rightarrow F_X$

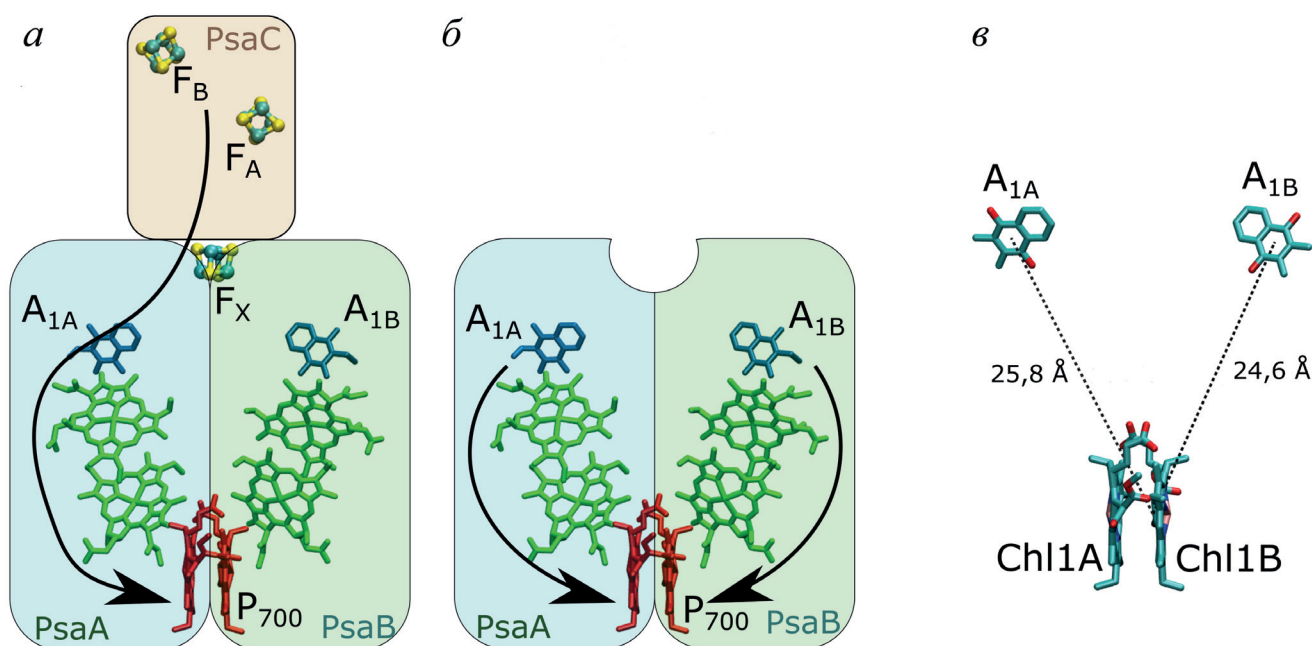


Рис. 1. Структура РЦ комплекса фотосистемы 1. Показаны интактный комплекс P_{700} - F_A/F_B (*a*), комплекс P_{700} - A_1 -core, лишённый 4Fe-4S кластера и субъединицы $PsaC$ (*б*), и расстояния между центрами спиновой плотности P_{700} и A_{1A}/A_{1B} (*в*). Стрелками показаны пути рекомбинации электрона

в основном обусловлена разницей в значениях свободных энергий этих реакций ΔG , поскольку средноточечные редокс-потенциалы (E_m) A_{1A} и A_{1B} различаются примерно на 150 мВ [10, 11]. Возможно, что аналогичным образом на препаратах, лишённых 4Fe-4S кластеров (P_{700} - A_1 -core, рис. 1, б), вследствие разницы между значениями ΔG обратных реакций переноса электрона в реакциях $A_{1A}^- \rightarrow P_{700}^+$ и $A_{1B}^- \rightarrow P_{700}^+$ различаются кинетики рекомбинации зарядов в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_{1B}^-$ и $P_{700}^+A_{1A}^-$ ($\tau \approx 20$ мкс против $\tau \approx 200$ мкс соответственно) [5, 12]. Однако следует отметить, что удаление белковой субъединицы PsaC и железо-серных кластеров может приводить к изменению значений E_m для A_{1A} и A_{1B} . Поскольку отрицательно заряженные кластеры F_A и F_B расположены асимметрично по отношению к филлохинонам A_{1A} и A_{1B} , то удаление этих кластеров должно приводить к уменьшению разницы между редокс-потенциалами A_{1A} и A_{1B} [10, 13].

Вопрос о степени асимметрии переноса электронов по ветвям редокс-кофакторов в ФС 1 продолжает оставаться предметом дискуссий (см. обзор [3]). Как было показано в работах Plato et al., центр спиновой плотности между мономерами *Chl1A* и *Chl1B* в димере P_{700} существенно смещён в сторону *Chl1B* [14, 15]; в результате расстояния между центрами спиновой плотности ион-радикальных пар $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ неодинаковы и составляют ~ 26 Å и ~ 25 Å соответственно (рис. 1, в). Ранее с помощью ЭПР-спектроскопии методом измерения частот модуляции спада сигналов электронного спинового эха (Electron Spin Echo Envelope Modulation, ESEEM) было показано, что при криогенных температурах в интактных комплексах ФС 1 из цианобактерий (P_{700} - F_A/F_B) измеренное расстояние между центрами спиновой плотности в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$ (~ 26 Å) соответствует переносу электрона по ветви *A* [16, 17]. Такое же расстояние было зарегистрировано при исследовании с помощью ESEEM препаратов ФС 1, выделенных из мутантного штамма *menB* и содержащих в сайтах связывания A_{1A} и A_{1B} высокопотенциальное производное хинона – 2,3-дихлорнафтохинон. В этих комплексах перенос электронов на 4Fe-4S кластеры не наблюдался по термодинамическим причинам, и рекомбинация зарядов происходила между A_1^- и P_{700}^+ [16]. При этом измеренное расстояние между P_{700}^+ и A_1^- также составляло ~ 26 Å, что соответствовало преимущественному переносу электрона по ветви *A*.

Другим способом определения степени асимметрии переноса электрона по ветвям редокс-кофакторов *A* и *B* является измерение со-

отношения амплитуд кинетических компонент, соответствующих прямому переносу электрона от A_{1A}^- и от A_{1B}^- на F_x . С помощью измерения электрохромного сдвига полосы поглощения каротиноидов было показано, что это соотношение составляет 2 : 1 в пользу ветви *A* [18]. Однако молекулы каротиноидов в РЦ ФС 1 по-разному ориентированы относительно молекул PhQ в сайтах A_{1A} и A_{1B} . На комплексах P_{700} - A_1 -core были исследованы вклады кинетических компонент, обусловленных рекомбинацией зарядов в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$, с одной стороны, и спадом электрохромного каротиноидного сдвига – с другой. Сопоставление относительных амплитуд этих кинетических компонент показало, что вклад переноса по ветви *A* занижен в 2,33 раза по сравнению со вкладом переноса по ветви *B* [19]. С учётом этого коэффициента соотношение прямого переноса электрона по ветвям редокс-кофакторов должно составлять ~ 4 : 1 в пользу ветви *A*. Поскольку в комплексах P_{700} - F_A/F_B рекомбинация зарядов с молекул PhQ не наблюдается, то о кинетике обратного переноса электрона от A_{1A}^- и A_{1B}^- на P_{700}^+ можно судить только в случае прекращения прямого переноса на железо-серные кластеры. Частичное прекращение прямого переноса электрона от A_1 на 4Fe-4S кластеры наблюдается при понижении температуры и при высушивании в трегалозной стекловидной матрице [20–22]. Однако при комнатной температуре в растворе рекомбинацию зарядов в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ можно регистрировать только на препаратах P_{700} - A_1 -core.

Исследование температурной зависимости кинетики рекомбинации зарядов между A_1^- и P_{700}^+ на препаратах P_{700} - A_1 -core методом импульсной абсорбционной спектроскопии показало, что при температуре 300 К соотношение вкладов кинетических компонент обратного переноса электрона от восстановленных акцепторов A_{1A}^- и A_{1B}^- на P_{700}^+ составляет ~ 60 : 40 в пользу ветви *A*. При понижении температуры до 150 К эти вклады становятся практически равными (50 : 50) [12].

Измерение расстояний между центрами спиновой плотности в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_1^-$ проводилось при криогенных температурах в водно-глицериновых растворах. При температурах выше 200 К импульсная ЭПР-спектроскопия не могла быть надёжно применена из-за быстрой спиновой релаксации. Однако, высушивание препаратов ФС 1 в стекловидной трегалозной матрице замедляет спиновую релаксацию и позволяет регистрировать образование ион-радикальных пар $P_{700}^+A_1^-$ с помо-

шью высокочастотной ЭПР-спектроскопии в полосах W и Q, а также определять расстояние между центрами спиновой плотности в этих парах с помощью ESEEM [17, 23, 24]. Ранее методы высокочастотной ЭПР-спектроскопии и ESEEM были применены для исследования спин-коррелированной радикальной пары $P_{870}^+Q_A^-$ в бактериальных РЦ в высушенной трегалозной матрице при 150 К и при комнатной температуре [25]. Было показано, что высушивание этих препаратов в трегалозной матрице не приводит к изменению молекулярной конфигурации радикальной пары $P_{870}^+Q_A^-$. Можно предполагать, что измерения расстояний между центрами спиновой плотности ион-радикальных пар возможны и для других пигмент-белковых комплексов в высушенной трегалозной матрице при комнатной температуре. Применение дегидратированных трегалозных матриц для длительного сохранения активности различных белковых комплексов при комнатной температуре подробно обсуждено в обзоре Möbius et al. [26].

Недавно расстояние между P_{700}^+ и A_1^- было измерено нами для комплексов $P_{700}-F_A/F_B$ в высушенной трегалозной матрице при криогенной и комнатной температурах [23]. Было показано, что при температурах 150 К и 220 К расстояние составляет ~ 26 Å, а при температуре 280 К оно увеличивается до ~ 27 Å. Однако кажущееся увеличение расстояния в этих условиях, основанное на уменьшении частоты модуляции сигнала ESEEM, было объяснено ускорением спин-решёточной релаксации A_1^- от 3 до 1 мкс вследствие влияния ионов железа 4Fe-4S кластеров. Таким образом, был сделан вывод о том, что расстояние между центрами спиновой плотности пары $P_{700}^+A_1^-$ в трегалозной матрице при комнатной температуре остаётся неизменным и соответствует преимущественному переносу электрона по ветви A.

В другой нашей работе метод ESEEM был применён для определения расстояния между P_{700}^+ и A_1^- в комплексах ФС 1, лишённых субъединицы PsaC и терминальных 4Fe-4S кластеров F_A/F_B (комплексы $P_{700}-F_X$ -core). Полученные данные показали, что это расстояние в высушенной трегалозной матрице (~ 25 Å) соответствует преимущественному переносу электрона по ветви B [24].

В настоящей работе была предпринята попытка измерить расстояние между P_{700}^+ и A_1^- в комплексах ФС 1 $P_{700}-A_1$ -core в водно-глицериновом растворе и в высушенной трегалозной матрице при криогенных температурах, а также в трегалозной матрице при температуре 280 К.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов $P_{700}-A_1$ -core. Тримерные комплексы ФС 1 были выделены из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 [27] путём обработки тилакоидных мембран додецил- β -D-мальтозидом с последующим центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (5–20%) при 210 000 g в течение 3 ч с использованием ротора VTi 50 («Beckman Coulter», США), полученного при поддержке Программы развития Московского университета. Для получения комплексов ФС 1 с удалёнными железо-серными кластерами $F_X/F_A/F_B$ ($P_{700}-A_1$ -core, см. рис. 1, б) интактные комплексы ФС 1 из *Synechocystis* sp. PCC 6803 сначала инкубировали в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 6,8 М мочевины, в течение 90 мин при комнатной температуре в темноте. При этом конечная концентрация детергента не превышала $\sim 0,05\%$ (w/v). Для полного удаления мочевины суспензию ФС 1 промывали буфером 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) до концентрации мочевины $\sim 0,03\%$. После концентрирования суспензии концентрация Хл в ФС 1 составила ~ 2 мг Хл/мл, на данном этапе происходило удаление терминальных кластеров F_A/F_B .

Полученные препараты затем инкубировали в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 3,4 М мочевины и 5 мМ феррицианида калия, в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Для полного удаления мочевины и феррицианида суспензию ФС 1 многократно промывали буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Конечная концентрация мочевины и феррицианида составляла $\sim 0,03\%$ и $\sim 0,005\%$ (m/V) соответственно. После концентрирования суспензии $P_{700}-A_1$ -core концентрация Хл в РЦ составила $\sim 1,5$ мг Хл/мл (см. [28] и ссылки в ней для методики).

Для получения трегалозных матриц полученный раствор комплексов ФС 1 с трегалозой в молярном соотношении 1 : 40 000 высушивался в присутствии насыщенных водных растворов соли LiCl [21]; в этих условиях достигается относительная влажность воздуха 11% над раствором соли. При высушивании раствора комплексов ФС 1 в течение 14 суток в эксикаторе с насыщенным раствором LiCl достигается равновесие между белком в трегалозном матриксе и воздушными парами. Водно-глицериновые растворы комплексов содержали 50% глицерина от общего объёма.

ESEEM комплексов $P_{700}-A_1$ -core. Для нахождения расстояния между разделёнными зарядами в РЦ использовался импульсный метод так называемого первичного электронного спино-

вого эха. Измерения проводились в Q-диапазоне частот (34,03 ГГц) на ЭПР-спектрометре Elexsys E580 («Bruker», США) с использованием резонатора EN 5107D2, который имеет окно для фотовозбуждения, что позволяет подвести лазерный пучок непосредственно к образцу. Использовался азотный криостат ER 4131VT («Bruker»); для фотовозбуждения использовался YAG:Nd³⁺ лазер («Quantel Brilliant В», США, Франция) с длиной волны 532 нм, энергией 1 мДж и частотой повторения 10 Гц. Использовались кварцевые капилляры с внешним диаметром 1,2 мм и внутренним диаметром 1 мм, запаянные с одной стороны. Высушенные трегалозные матрицы помещались в капилляры в атмосфере инертного газа. Протокол эксперимента показан на рис. 2 и более подробно описан в работе [23]. Фурье-преобразование полученных сигналов выполнялось в программном пакете Херг («Bruker») по алгоритму быстрого Фурье-преобразования.

Лазерный импульс индуцирует разделение зарядов в РЦ ФС 1. После некоторой задержки последовательность двух СВЧ-импульсов формирует сигнал первичного электронного спинового эха. Регистрируется зависимость амплитуды сигнала эха в зависимости от интервала времени τ между двумя СВЧ-импульсами. Длительность СВЧ $\pi/2$ -импульса составляла 40 нс. В эксперименте проявляется модуляция огибающей спада сигналов эха (ESEEM). Этот эффект модуляции вызван спин-спиновым диполь-дипольным взаимодействием между разделёнными зарядами $P_{700}^+A_1^-$ в РЦ ФС 1 [29]. Частота наблюдаемой модуляции равна частоте спин-спинового диполь-дипольного взаимо-

действия разделённых зарядов, которая определяется как:

$$\omega_{d-d} = \frac{g_1 g_2 \beta^2 (1 - 3 \cos^2 \theta) r^3}{\hbar}, \quad (1)$$

где r – расстояние между разделёнными зарядами, g_1, g_2 – g-факторы разделённых зарядов, β – магнетон Бора, \hbar – постоянная Планка, θ – угол между радиус-вектором r и направлением вектора индукции постоянного магнитного поля B_0 .

Из уравнения (1) видно, что в зависимости от угла θ дипольная частота принимает разные значения с определённым распределением. Наибольший статистический вес имеют ориентации вектора r с $\theta = \pi/2$, т.е. наибольший вклад в наблюдаемую модуляцию сигнала эха дают РЦ с $\theta = \pi/2$, для которых дипольная частота равна:

$$\Omega = \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3}. \quad (2)$$

Спектр ЭПР спин-коррелированной пары $P_{700}^+A_1^-$, полученный интегрированием сигнала эха с фиксированным значением $\tau = 300$ нс, показан на рис. 3. Измерения сигналов ESEEM проводились для резонансного значения магнитного поля, соответствующего сигналу от P_{700}^+ ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$. Модуляция сигнала наблюдалась только для одной компоненты намагниченности сигнала эха [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рис. 4 приведены ESEEM-сигналы комплексов $P_{700}^+A_1^-$ -core ФС 1 при комнатной и криогенной температурах, а на рис. 5 показаны соответствующие Фурье-спектры.

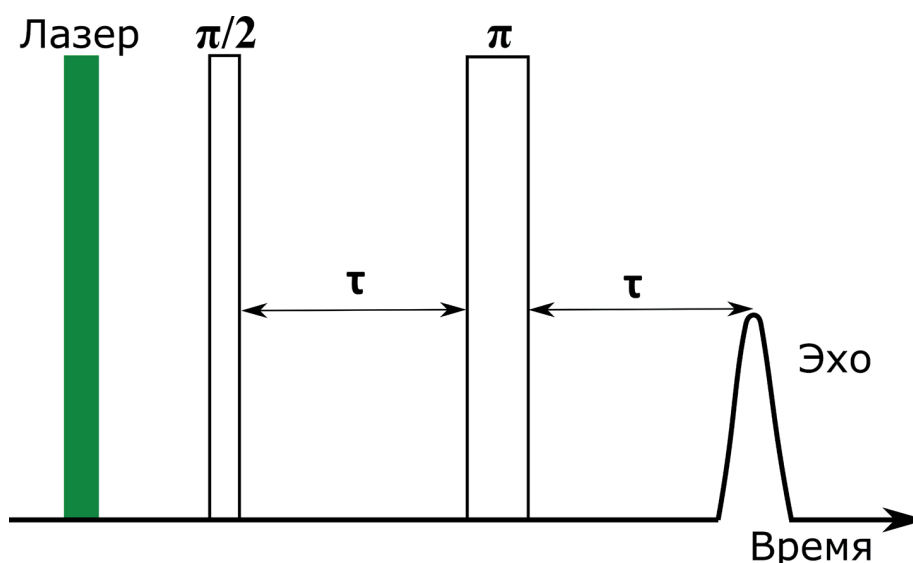


Рис. 2. Протокол эксперимента для измерения частоты модуляции сигнала первичного спинового эха, вызванной диполь-дипольным взаимодействием ион-радикалов состояния разделённых зарядов в РЦ ФС 1

Из рис. 5 видно, что основной вклад в модуляцию сигнала эха вносит частота около 3,2 МГц. На рис. 5, б показано поведение Фурье-спектров в области 3,2 МГц в увеличенном масштабе, что позволяет увидеть сдвиг ча-

стоты модуляции на ~60 кГц при повышении температуры с 150 до 280 К для образца в трегалозной матрице.

Согласно уравнению (2), на основе полученных Фурье-спектров были найдены наи-

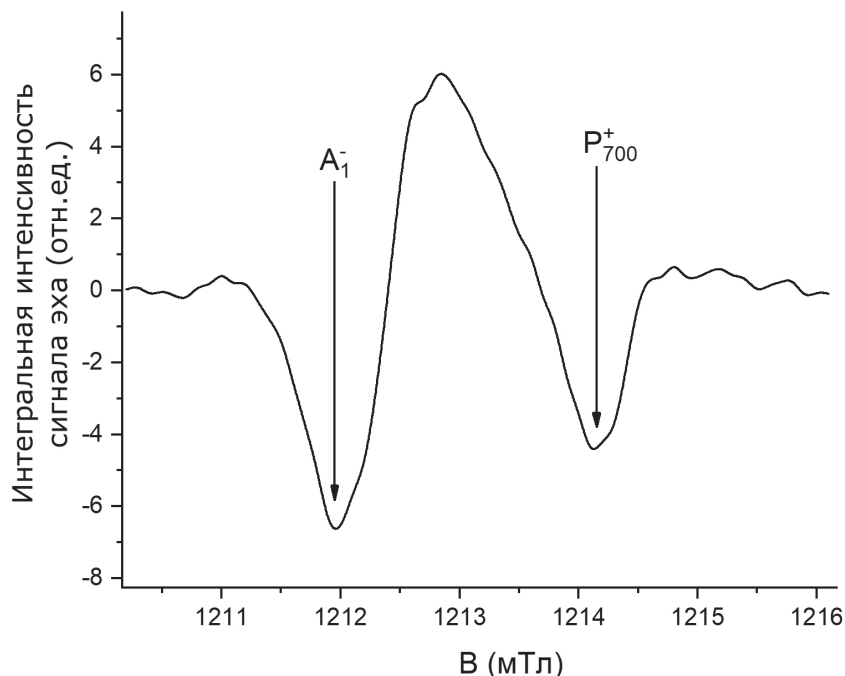


Рис. 3. Спектр ЭПР ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в комплексах $P_{700}-A_1$ -core ФС 1 в трегалозной матрице при 280 К. Спектр получен путём интегрирования сигнала эха для различных значений магнитного поля, интервал времени τ в двухимпульсной последовательности равен 300 нс

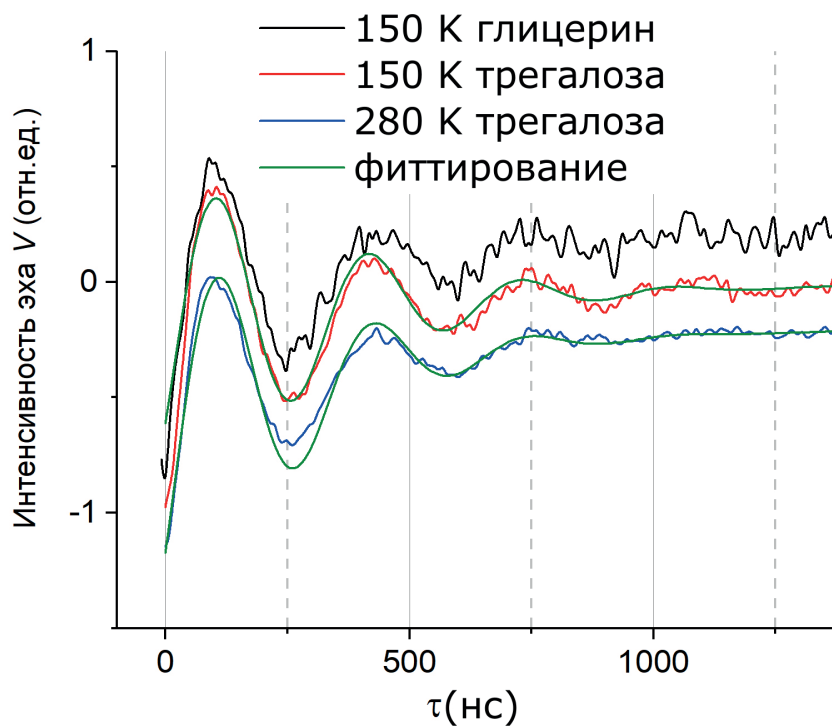


Рис. 4. ESEEM-сигналы P_{700}^+ в $P_{700}-A_1$ -core комплексе ФС 1, полученные в водно-глицериновом растворе при 150 К (чёрная кривая), в трегалозной матрице при 150 К (красная кривая) и в трегалозной матрице при 280 К (синяя кривая). Зелёными кривыми показано фиттирование экспериментальных данных согласно уравнению (3). Кривые произвольно сдвинуты по вертикали

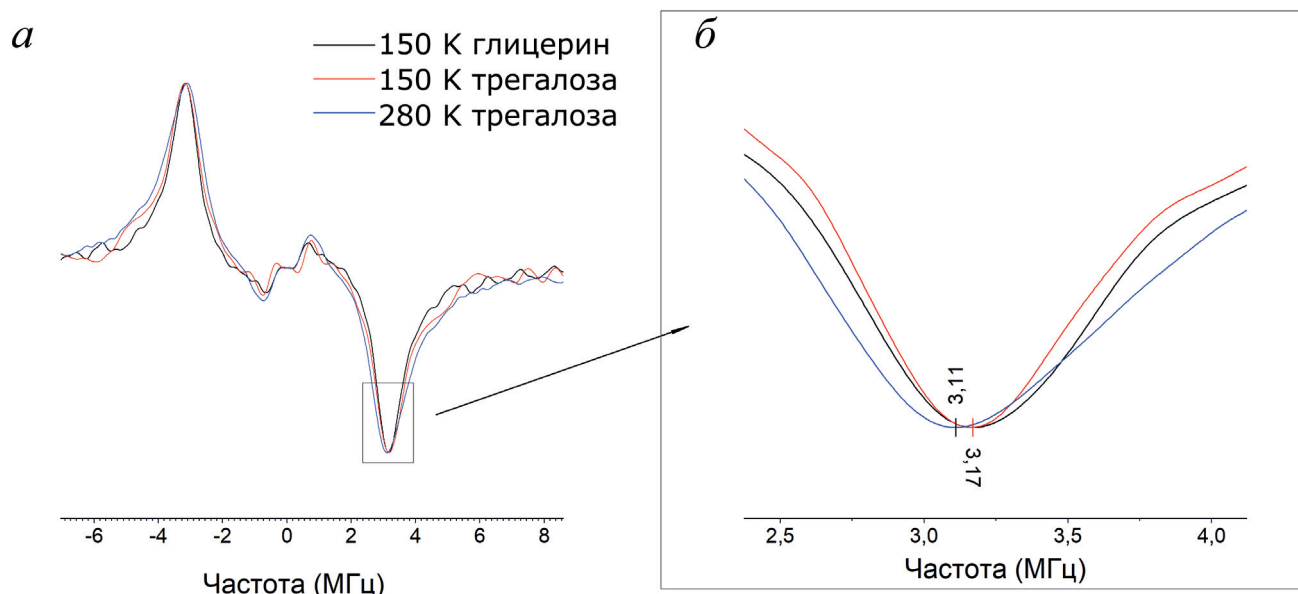


Рис. 5. Фурье-спектр ESEEM-сигналов P_{700}^+ комплекса P_{700} - A_1 -core ФС 1 (а) и его основной пик (б). Показаны спектры для комплексов в водно-глицериновом растворе при 150 К (чёрная кривая), в трегалозной матрице при 150 К (красная кривая) и в трегалозной матрице при 280 К (синяя кривая)

более вероятные значения дипольной частоты изученных систем и расстояния между электронными спинами (разделёнными зарядами). Из рис. 5 видно, что при 150 К максимумы Фурье-спектров в трегалозе и глицерине совпадают.

Для проверки полученных оценок на основе значений расстояния между спинами были рассчитаны кривые модуляции сигнала эха V согласно следующей формуле (см. [23, 31]):

$$V(\tau) = 1 - p + p \langle \cos(\omega_{d-d}\tau) \rangle, \quad (3)$$

где $\langle \cos(\omega_{d-d}\tau) \rangle = \frac{1}{2} \int \cos(\Omega(1-3 \cos^2 \vartheta)) \sin \vartheta d\vartheta$ – средняя ориентация диполь-дипольного взаимодействия, а p – вероятность переворота спинов СВЧ-импульсом в момент времени τ (см. рис. 2).

Полученные значения расстояний между катионом и анионом ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ для разных комплексов ФС 1 и температур приведены в таблице. Там же приведены расстояния для интактной ФС 1 и комплекса P_{700} - F_X -core, лишённого терминальных 4Fe-4S кластеров F_A/F_B , взятые из наших опубликованных ранее работ [23, 24].

Из анализа приведённых в таблице данных для P_{700} - A_1 -core можно сделать два наблюдения. Во-первых, при повышении температуры на 130 К расстояние между кофакторами РЦ увеличивается только на 0,1 Å. Во-вторых, в комплексах P_{700} - A_1 -core расстояние между разделёнными зарядами P_{700}^+ и A_1^- , рассчитанное из частоты модуляции наблюдаемого ESEEM-сигнала, имеет промежуточное значение между расстояниями для пары $P_{700}^+A_{1A}^-$ и пары $P_{700}^+A_{1B}^-$ в интактной ФС 1.

Частоты модуляции наблюдаемого сигнала эха и расстояния между разделёнными зарядами P_{700}^+ и A_1^- для изученных комплексов ФС 1 в высушенной трегалозной матрице

Тип комплекса фотосистемы 1	Частота модуляции, МГц		Расстояние, Å
	из сигнала ESEEM согласно уравнению (3)	из Фурье-спектра сигнала ESEEM	
P_{700} - F_A/F_B		2,98	$26 \pm 0,1$ [23]
P_{700} - F_X -core		3,35	$25 \pm 0,1$ [24]
P_{700} - A_1 -core	150 К	3,15	$25,5 \pm 0,1$
	280 К	3,10	$25,6 \pm 0,1$

При интерпретации результатов, полученных для комплексов $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$, мы принимаем во внимание, что для интактной ФС 1 нами ранее было показано [23, 24], что наблюдаемая частота модуляции ESEEM-сигнала может быть меньше частоты диполь-дипольного взаимодействия, согласно формуле (1), из-за низкочастотного сдвига, вызванного спин-решёточной релаксацией спинов кофактора A_1^- . При этом существенный вклад в спин-решёточную релаксацию вносит взаимодействие с парамагнитными железо-серными комплексами. В работах Sukhanov et al. [23, 24] с учётом указанного низкочастотного сдвига частоты ESEEM были получены расстояния между разделёнными зарядами, которые оказались равными около 26 Å для $P_{700}\text{-}F_A/F_B$ и 25 Å для $P_{700}\text{-}F_X\text{-core}$. Сравнивая эти результаты с рентгенографическими данными (см. рис. 1), мы пришли к заключению, что в комплексах $P_{700}\text{-}F_A/F_B$ разделение заряда происходит преимущественно по A -ветви, а в $P_{700}\text{-}F_X\text{-core}$ разделение происходит по B -ветви реакционного центра ФС 1.

В данной работе мы исследовали комплексы $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$, в которых скорость спин-решёточной релаксации разделённых зарядов существенно меньше скорости спин-решёточной релаксации для $P_{700}\text{-}F_A/F_B$ комплекса ФС 1 и комплекса $P_{700}\text{-}F_X\text{-core}$. Поэтому в случае $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$ комплексов низкочастотный сдвиг частоты модуляции за счёт спин-решёточной релаксации пренебрежимо мал, и в этой системе частота ESEEM равна дипольной частоте (1). Наблюдаемая для $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$ частота модуляции сигнала эха может быть представлена как усреднённая частота модуляции сигнала в ESEEM-эксперименте для интактного $P_{700}\text{-}F_A/F_B$ и $P_{700}\text{-}F_X\text{-core}$ комплексов (здесь для интактного РЦ частота модуляции взята при $T = 150$ К, когда низкочастотный сдвиг дипольной частоты частоты модуляции пренебрежимо мал):

$$\Omega_{\text{сред}} = f \cdot (2,98 \text{ МГц}) + (1 - f) \cdot (3,35 \text{ МГц}). \quad (4)$$

Для интерпретации этого факта приходится предположить, что в разделении зарядов в комплексах $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$ принимают участие обе ветви кофакторов РЦ, A и B , с дипольными частотами 2,98 МГц и 3,35 МГц соответственно. Из эмпирического моделирования можно заключить, что для разделённых зарядов в РЦ ФС 1 Фурье-преобразование наблюдаемого сигнала даст одну уширенную колоколообразную кривую вместо кривой с двумя разрешёнными максимумами при выполнении двух условий. Во-первых, времена фазовой релак-

сации спинов должны быть меньше 1 мкс, и, во-вторых, расстояния между спинами в двух подансамблях пар должны отличаться не более чем на 1 Å. Оба этих условия справедливы для предполагаемых сигналов ион-радикальных пар $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$. В этом случае можно ожидать, что наблюдаемый ESEEM-сигнал является суммой вкладов двух подансамблей РЦ с разделёнными зарядами в A - и B -ветвях (см. уравнение (3)):

$$V(\tau) = 1 - p + p \cdot (f \cos(2\pi \cdot 2,98 \text{ МГц} \cdot \tau) + (1 - f) \cos(2\pi \cdot 3,35 \text{ МГц} \cdot \tau)), \quad (5)$$

где p – вероятность переворота спинов СВЧ-импульсом в момент времени τ [мкс].

Можно указать два случая, когда изменение наблюдаемого сигнала во времени, согласно (5), приводит к появлению осцилляций с усреднённой частотой (4). Во-первых, для произвольных значений статистических весов указанных выше подансамблей (произвольного значения f в (5)) проявляется усреднённая частота (4), если электрон может достаточно быстро перескакивать между A_{1A} и A_{1B} , а именно, частота перескоков электрона должна быть равна разности частот модуляции, т.е. $3,35 - 2,98 = 0,37$ МГц. Мы считаем этот сценарий маловероятным.

Во-вторых, уравнение (5) даёт частоту модуляции (4) для равновероятного вклада ветвей A и B в разделение зарядов в РЦ, т.е. в случае $f = 1/2$ (5). В хорошем приближении частота модуляции равна усреднённой частоте (4) и тогда, когда две ветви дают сопоставимые вклады в разделение зарядов. Мы считаем, что в изученной нами системе реализуется именно такая ситуация. Для объяснения уменьшения частоты модуляции с повышением температуры (см. таблицу) приходится считать, что при нагревании должна расти доля f разделённых пар зарядов в A -ветви: $f = 0,49$ при $T = 150$ К, $f = 0,65$ при $T = 280$ К.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Найденное нами из наблюдаемой частоты ESEEM-эффекта расстояние между центрами спиновой плотности ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в комплексах $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$ ФС 1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (25,5 Å) практически совпадает со средним между расстояниями в парах $P_{700}^+A_{1A}^-$ (~26 Å) и $P_{700}^+A_{1B}^-$ (~25 Å), что соответствует симметричному переносу электрона от димера Хл P_{700} по ветвям редокс-кофакторов A и B . Аналогичный вывод был сделан ранее на основании более косвенных

экспериментов [12, 20]. Можно отметить, что аналогичная оценка расстояния в паре $P_{700}^+A_{1A}^-$ (26 Å) была получена ранее для интактных комплексов ФС 1, а также для комплексов ФС 1, содержащих в сайте A_1 высокопотенциальные производные хинонов [16]. Схожие оценки расстояний между центрами спиновой плотности ион-радикальных пар $P_{700}^+A_1^-$ (26 и 25 Å для ветвей A и B соответственно) были также получены в работе [17] при исследовании мутантов ФС 1 с заблокированным переносом по одной из ветвей для комплексов в водно-глицериновой смеси при низкой температуре.

В работе Poluektov et al. [32] с помощью высокочастотной время-разрешённой ЭПР-спектроскопии (частота 130 ГГц) на дейтерированных комплексах ФС 1, выделенных из цианобактерии *Synechococcus leopoliensis*, были выявлены спектры ион-радикальных пар, приписанных авторами состояниям $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$. В этой работе на интактных комплексах $P_{700}-F_A/F_B$, как и в более ранних работах на ФС 1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 [12, 16, 17, 33], при низких температурах было зарегистрировано только образование пары $P_{700}^+A_{1A}^-$. Этот результат, по мнению авторов статьи, объяснялся тем, что в условиях эксперимента перенос электронов на 4Fe-4S кластеры быстро происходил преимущественно по ветви B , не успевая рекомбинировать на P_{700}^+ за время между лазерными вспышками. В результате наблюдалась только пара $P_{700}^+A_{1A}^-$. Однако перенос электрона исключительно по ветви A наблюдался ранее в препаратах ФС 1, содержащих в сайтах связывания A_{1A} и A_{1B} высокопотенциальные производные нафтохинона [16]. Поскольку на этих препаратах ФС 1 перенос электронов на 4Fe-4S кластеры не наблюдался, то был сделан вывод о том, что преимущественный перенос электрона на A_{1A} объясняется не быстрым и практически необратимым переносом по ветви B на 4Fe-4S кластеры, а более высоким редокс-потенциалом A_{1A} по отношению к A_{1B} . В работе Poluektov et al. [32] на препаратах $P_{700}-A_1$ -core было показано, что полученный спектр ЭПР аппроксимируется суммой двух спектров, характерных для состояний $P_{700}^+A_{1B}^-$ и $P_{700}^+A_{1A}^-$ в соотношении 56 : 44.

В работе Kurashov et al. [19] на препаратах $P_{700}-A_1$ -core из *Synechocystis* sp. PCC 6803 при комнатной температуре соотношение вкладов рекомбинации пар $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ в растворе составляло 60 : 40 в пользу ветви A . В высушенной трегалозной матрице это соотношение инвертировалось и составляло 60 : 40 в пользу ветви B . На препаратах $P_{700}-F_X$ -core, лишённых терминальных 4Fe-4S кластеров F_A/F_B и бел-

ковой субъединицы PsaC, соотношение между ветвями A и B составляло 65 : 35 в пользу ветви A , а в трегалозной матрице — 75 : 25 в пользу ветви B . Рекомбинация зарядов с филлохиноновых акцепторов A_{1A}^- и A_{1B}^- на этих препаратах наблюдалась в 40–45% РЦ за счёт того, что в этой фракции функционально активный кластер F_X присутствовал только в 55–60% РЦ [19].

В другой работе Cherepanov et al. [12] на препаратах ФС 1, выделенных из мутантного штамма *RubA*, не содержащих 4Fe-4S кластеров и функционально эквивалентных препаратам $P_{700}-A_1$ -core, была измерена температурная зависимость кинетики рекомбинации между A_1^- и P_{700}^+ . Было показано, что при комнатной температуре соотношение вкладов переноса электрона по ветвям редокс-кофакторов составляет 60 : 40 в пользу ветви A , а при понижении температуры до 150 К вклады ветвей A и B становятся равными (50 : 50). На препаратах $P_{700}-F_X$ -core соотношение обратного переноса электрона по ветвям A и B при комнатной температуре составляло 60 : 40, а при 150 К — возрастало до 77 : 23 в пользу ветви A [20].

Таким образом, полученные нами ранее результаты измерения кинетики рекомбинации зарядов в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ показали, что обратный перенос электрона на комплексах $P_{700}-A_1$ -core как при комнатной температуре, так и в водно-глицериновом растворе при температуре 150 К, а также при комнатной температуре в высушенной трегалозной матрице происходит по обеим ветвям A и B с примерно равным вкладом $50 \pm 10\%$. В то же время на препаратах $P_{700}-F_X$ -core соотношение вкладов ветвей A и B составляет $(62,5 \pm 2,5) : (37,5 \pm 2,5)$ при комнатной температуре в растворе и возрастает до 75:25 в пользу ветви A при температуре 150 К и в высушенной трегалозной матрице. Эти результаты показывают, что наличие кластера F_X способствует асимметричному переносу электрона по ветви A , причём степень асимметрии увеличивается как при понижении температуры, так и при высушивании в стекловидной трегалозной матрице, т.е. при ограничении конформационной подвижности белка.

Возникает вопрос о том, почему расстояние между центрами спиновой плотности в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$, измеренное с помощью ESEEM, в комплексах $P_{700}-A_1$ -core соответствует примерно равному вкладу ветвей A и B , в то время как в комплексах $P_{700}-F_X$ -core это расстояние соответствует преимущественному образованию пары $P_{700}^+A_{1B}^-$? Этому экспериментальному наблюдению можно дать несколько возможных объяснений.

1) В действительности, в препаратах P_{700} - F_X -core перенос электрона идёт по ветви A , но в условиях ограниченной подвижности белка (низкая температура, высушивание в трегалозной матрице) при частоте вспышек 10 Гц происходит накопление восстановленных акцепторов F_X^- и A_{1A}^- , поскольку они не успевают рекомбинировать с P_{700}^+ . В то же время обратный перенос электрона от более низкопотенциального A_{1B}^- на P_{700}^+ происходит быстрее (характерное время 10–20 мкс), в результате чего в эксперименте ESEEM наблюдается расстояние, характерное для $P_{700}^+A_{1B}^-$.

2) На этих препаратах в трегалозной матрице происходит изменение соотношения значений редокс-потенциалов (E_m) A_{1A} и A_{1B} , в результате чего переход электрона на хинон A_{1B} становится термодинамически более предпочтительным, чем на A_{1A} .

3) При высушивании в трегалозной матрице происходит нарушение кластера молекул внутрибелковой воды вблизи сайта A_{1A} (но не вблизи сайта A_{1B}), поскольку этот кластер менее изолирован от внешней поверхности белка [19].

Возникает ещё один вопрос: почему в интактных комплексах P_{700} - F_A/F_B измеряется расстояние, соответствующее ион-радикальной паре $P_{700}^+A_{1A}^-$? Мы предполагаем, что перенос электрона в этих препаратах, так же, как и в P_{700} - F_X -core, идёт преимущественно по ветви A , но накопления восстановленного состояния A_{1A}^- в условиях эксперимента при последовательных лазерных вспышках не происходит вследствие большей ёмкости акцепторов (три 4Fe-4S кластера против одного в препаратах P_{700} - F_X -core).

Дальнейшие эксперименты с различным содержанием 4Fe-4S кластеров при встраивании в сайты A_{1A} и A_{1B} экзогенных хинонов, различающихся по структуре и редокс-потен-

циалам, могут послужить проверкой справедливости этих гипотез.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена памяти выдающегося учёного в области первичных фотосинтетических реакций — Владимира Анатольевича Шувалова. В.А. Шувалов внёс неоценимый вклад в исследование механизмов первичных реакций в ФС I, включая восстановление филлохинонного акцептора A_1 . Трое из соавторов настоящей работы (М.М., Г.М. и А.С.) были соавторами многих работ В.А. Шувалова в течение последних 15 лет и с благодарностью вспоминают период совместной работы с В.А. Шуваловым как исключительно интересный и продуктивный.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ и Кабинета Министров Республики Татарстан в рамках научного проекта № 22-23-20165 (URL: <https://rscf.ru/project/22-23-20165/>).

Вклад авторов. М.Д. Мамедов, Г.Е. Милановский — получение комплексов ФС I; А.А. Суханов, К.М. Салихов — получение спектров ЭПР; А.Ю. Семенов — концепция и руководство работой, написание текста статьи; М.Д. Мамедов, Г.Е. Милановский, А.А. Суханов, К.М. Салихов, А.Ю. Семенов — обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauß, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, **411**, 909–917, doi: 10.1038/35082000.
- Brettel, K., and Leibl, W. (2001) Electron transfer in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 100–114, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00202-X.
- Srinivasan, N., and Golbeck, J. H. (2009) Protein-cofactor interactions in bioenergetic complexes: the role of the A_{1A} and A_{1B} phyloquinones in Photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1787**, 1057–1088, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.04.010.
- Parrett, K. G., Mehari, T., Warren, P. G., and Golbeck, J. H. (1989) Purification and properties of the intact P-700 and F_X -containing Photosystem I core protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 324–332, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80439-6.
- Brettel, K., and Golbeck, J. H. (1995) Spectral and kinetic characterization of electron acceptor A_1 in a Photosystem I core devoid of iron-sulfur centers F_X , F_B and F_A , *Photosynth. Res.*, **45**, 183–193, doi: 10.1007/BF00015559.
- Makita, H., and Hastings, G. (2015) Directionality of electron transfer in cyanobacterial photosystem I

- at 298 and 77 K, *FEBS Lett.*, **589**, 1412-1417, doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.048.
7. Joliot, P., and Joliot, A. (1999) *In vivo* analysis of the electron transfer within photosystem I: Are the two phylloquinones involved? *Biochemistry*, **38**, 11130-11136, doi: 10.1021/bi990857c.
 8. Schlodder, E., Falkenberg, K., Gergeleit, M., and Brettel, K. (1998) Temperature dependence of forward and reverse electron transfer from A_1^- , the reduced secondary electron acceptor in photosystem I, *Biochemistry*, **37**, 9466-9476, doi: 10.1021/bi973182r.
 9. Guergova-Kuras, M., Boudreaux, B., Joliot, A., Joliot, P., and Redding, K. (2001) Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4437-4442, doi: 10.1073/pnas.081078898.
 10. Ptushenko, V. V., Cherepanov, D. A., Krishtalik, L. I., and Semenov, A. Y. (2008) Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I, *Photosynth. Res.*, **97**, 55-74, doi: 10.1007/s11120-008-9309-y.
 11. Ishikita, H., and Knapp, E.-W. (2003) Redox potential of quinones in both electron transfer branches of photosystem I, *J. Biol. Chem.*, **278**, 52002-52011, doi: 10.1074/jbc.M306434200.
 12. Cherepanov, D. A., Milanovsky, G. E., Gupta, O. A., Balasubramanian, R., Bryant, D. A., et al. (2018) Electron-phonon coupling in cyanobacterial photosystem I, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 7943-7955, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b03906.
 13. Ishikita, H., Stehlik, D., Golbeck, J. H., and Knapp, E.-W. (2006) Electrostatic influence of PsaC protein binding to the PsaA/PsaB heterodimer in photosystem I, *Biophys. J.*, **90**, 1081-1089, doi: 10.1529/biophysj.105.069781.
 14. Plato, M., Krauß, N., Fromme, P., and Lubitz, W. (2003) Molecular orbital study of the primary electron donor P_{700} of photosystem I based on a recent X-ray single crystal structure analysis, *Chem. Phys.*, **294**, 483-499, doi: 10.1016/S0301-0104(03)00378-1.
 15. Lubitz, W. (2006) EPR studies of the primary electron donor P_{700} in photosystem, in *Photosystem I*, Dordrecht, Springer Netherlands, pp. 245-269, doi: 10.1007/978-1-4020-4256-0_17.
 16. Mula, S., Savitsky, A., Möbius, K., Lubitz, W., Golbeck, J. H., et al. (2012) Incorporation of a high potential quinone reveals that electron transfer in Photosystem I becomes highly asymmetric at low temperature, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11**, 946, doi: 10.1039/c2pp05340c.
 17. Savitsky, A., Gupta, O., Mamedov, M., Golbeck, J. H., Tikhonov, A., et al. (2010) Alteration of the axial met ligand to electron acceptor A_0 in Photosystem I: effect on the generation of $P_{700}^+ A_1^-$ radical pairs as studied by W-band transient EPR, *Appl. Magnetic Resonance*, **37**, 85-102, doi: 10.1007/s00723-009-0052-0.
 18. Sun, J., Hao, S., Radle, M., Xu, W., Shelaev, I., Nadochenko, V., et al. (2014) Evidence that histidine forms a coordination bond to the A_{0A} and A_{0B} chlorophylls and a second H-bond to the A_{1A} and A_{1B} phylloquinones in M688H_{PsaA} and M668H_{PsaB} variants of *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1837**, 1362-1375, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.04.004.
 19. Kurashov, V., Gorka, M., Milanovsky, G. E., Johnson, T. W., Cherepanov, D. A., et al. (2018) Critical evaluation of electron transfer kinetics in P_{700} -F_A/F_B, P_{700} -F_X, and P_{700} -A₁ Photosystem I core complexes in liquid and in trehalose glass, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 1288-1301, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.09.367.
 20. Milanovsky, G., Gupta, O., Petrova, A., Mamedov, M., Gorka, M., et al. (2019) Multiple pathways of charge recombination revealed by the temperature dependence of electron transfer kinetics in cyanobacterial photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 601-610, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.06.008.
 21. Malferrari, M., Savitsky, A., Mamedov, M. D., Milanovsky, G. E., Lubitz, W., et al. (2016) Trehalose matrix effects on charge-recombination kinetics in Photosystem I of oxygenic photosynthesis at different dehydration levels, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 1440-1454, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.05.001.
 22. Shelaev, I., Gorka, M., Savitsky, A., Kurashov, V., Mamedov, M., et al. (2017) Effect of dehydrated trehalose matrix on the kinetics of forward electron transfer reactions in photosystem I, *Zeitschr. Physikal. Chemie*, **231**, 325-345, doi: 10.1515/zpch-2016-0860.
 23. Sukhanov, A. A., Mamedov, M. D., Möbius, K., Semenov, A. Y., and Salikhov, K. M. (2018) The decrease of the ESEEM frequency of $P_{700}^+ A_1^-$ ion-radical pair in Photosystem I Embedded in trehalose glassy matrix at room temperature can be explained by acceleration of spin-lattice relaxation, *Appl. Magnetic Resonance*, **49**, 1011-1025, doi: 10.1007/s00723-018-1017-y.
 24. Sukhanov, A. A., Mamedov, M. D., Möbius, K., Semenov, A. Y., and Salikhov, K. M. (2020) Impact of iron-sulfur clusters on the spin-lattice relaxation rate and ESEEM frequency of the oxidized primary donor P_{700}^+ and reduced phylloquinone acceptor A_1^- in radical pairs in Photosystem I embedded in trehalose glassy matrix, *Appl. Magnetic Resonance*, **51**, 909-924, doi: 10.1007/s00723-020-01210-4.
 25. Savitsky, A., Malferrari, M., Francia, F., Venturoli, G., and Möbius, K. (2010) Bacterial photosynthetic reaction centers in trehalose glasses: coupling between protein conformational dynamics and electron-transfer kinetics as studied by laser-flash and high-field EPR spectroscopies, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 12729-12743, doi: 10.1021/jp105801q.

26. Möbius, K., Savitsky, A., Malferrari, M., Francia, F., Mamedov, M. D., et al. (2020) Soft dynamic confinement of membrane proteins by dehydrated trehalose matrices: high-field EPR and fast-laser studies, *Appl. Magnetic Resonance*, **51**, 773-850, doi: 10.1007/s00723-020-01240-y.
27. Shen, G., Zhao, J., Reimer, S. K., Antonkine, M. L., Cai, Q., et al. (2002) Assembly of photosystem I. I. Inactivation of the rubA gene encoding a membrane-associated rubredoxin in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 causes a loss of photosystem I activity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20343–20354, doi: 10.1074/jbc.M201103200.
28. Vassiliev, I. R., Jung, Y. S., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., and Golbeck, J. H. (1997) Near-IR absorbance changes and electrogenic reactions in the microsecond-to-second time domain in Photosystem I, *Biophys. J.*, **72**, 301-315, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78669-7.
29. Salikhov, K. M. (1976) *Electron Spin Echo and Its Applications* [in Russian] (Semenov, A. G., and Tsvetkov, Y. D., eds) Nauka, Novosibirsk, Siberian branch.
30. Salikhov, K. M., Kandrashkin, Y. E., and Salikhov, A. K. (1992) Peculiarities of free induction and primary spin echo signals for spin-correlated radical pairs, *Appl. Magnetic Resonance*, **3**, 199-216, doi: 10.1007/BF03166790.
31. Salikhov, K. M., Khairuzhdinov, I. T., and Zaripov, R. B. (2014) Three-pulse ELDOR theory revisited, *Appl. Magnetic Resonance*, **45**, 573-619, doi: 10.1007/s00723-014-0541-7.
32. Poluektov, O. G., Niklas, J., and Utschig, L. M. (2019) Spin-correlated radical pairs as quantum sensors of bidirectional ET mechanisms in Photosystem I, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 7536-7544, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b06636.
33. Dashdorj, N., Xu, W., Cohen, R. O., Golbeck, J. H., and Savikhin, S. (2005) Asymmetric electron transfer in cyanobacterial Photosystem I: charge separation and secondary electron transfer dynamics of mutations near the primary electron acceptor A₀, *Biophys. J.*, **88**, 1238-1249, doi: 10.1529/BIOPHYSJ.104.050963.

CHANGE IN ELECTRON TRANSFER SYMMETRY IN THE REACTION CENTERS OF PHOTOSYSTEM I UPON REMOVAL OF IRON-SULFUR CLUSTERS

A. A. Sukhanov¹, M. D. Mamedov², G. E. Milanovsky²,
K. M. Salikhov¹, and A. Yu. Semenov^{2*}

¹ *Zavoisky Physical-Technical Institute, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, 420029 Kazan, Russia*

² *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: semenov@belozersky.msu.ru*

In photosynthetic reaction centers of intact complexes of photosystem I (PSI) from cyanobacteria, electron transfer at room temperature occurs along two symmetrical branches of redox cofactors A and B at a ratio of ~3:1 in favor of branch A. Previously, this was indirectly demonstrated using pulsed absorption spectroscopy and more directly by measuring the decay modulation frequencies of electron spin echo signals (Electron Spin Echo Envelope Modulation, ESEEM), which allows to determine the distance between the separated charges of the primary electron donor P₇₀₀⁺ and phyloquinone acceptors A_{1A}⁻ and A_{1B}⁻ in the branches of cofactors A and B. In the present work, these distances were determined using ESEEM on PSI complexes lacking three 4Fe-4S clusters, F_X, F_A, and F_B, as well as the PsaC protein subunit (the so-called P₇₀₀-A₁-core), in which phyloquinone molecules A_{1A} and A_{1B} serve as the terminal electron acceptors. It was shown that on P₇₀₀-A₁-core preparations, the average distance between the centers of the P₇₀₀⁺A₁⁻ radical ion pair at a temperature of 150 K in an aqueous glycerol solution and in a dried trehalose matrix, as well as in a trehalose matrix at a temperature of 280 K, is ~25.5 Å, which corresponds to the symmetrical electron transfer along the branches of redox cofactors A and B at a ratio of 1:1. Possible reasons for the change in the electron transfer symmetry in PSI upon removal of the PsaC subunit and 4Fe-4S clusters F_X, F_A, and F_B are discussed.

Keywords: photosystem I, electron transfer, Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM), trehalose matrix, iron-sulfur clusters

О МЕХАНИЗМЕ СЕЛЕКТИВНОГО ХИМИЧЕСКОГО ЗАМЕЩЕНИЯ БАКТЕРИОФЕОФИТИНОВ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ *Rhodobacter sphaeroides* R-26

© 2022 А.А. Забелин*, В.Б. Ковалев, А.Я. Шкуропатов

ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: zabelin.bio@gmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2022

После доработки 11.07.2022

Принята к публикации 10.08.2022

С целью выяснения механизма сайт-селективного химического замещения хромофоров в реакционных центрах (РЦ) фотосинтетических бактерий внешними пигментами исследована эффективность встраивания растительного феофитина *a* (Фео) в сайты связывания молекул бактериофеофитина *a* (БФео) в изолированных РЦ *Rhodobacter sphaeroides* R-26 в зависимости от температуры среды инкубации, агрегационного состояния Фео и присутствия органического растворителя (аcetона). Степень селективного замещения фотохимически неактивных молекул БФео Н_В составляла ~15% при инкубации смеси РЦ/Фео при 5 °С в условиях, когда Фео находился в водно-детергентной среде инкубации в виде мономеров в составе свободных мицелл детергентов. Эффективность замещения увеличивалась до 40% при инкубации при 25 °С и составляла при этой температуре около 100%, если в среду инкубации добавлялся 10%-ный ацетон. Степень пигментного замещения была примерно в 2 раза выше при обеих температурах, когда в качестве инкубационной среды использовалась смесь мономеров и димеров Фео в присутствии 10%-ного аcetона. Удаление аcetона из такой среды с сохранением пигментных форм приводило к значительному снижению эффективности встраивания Фео. Влияние аcetона на пигментное замещение наблюдалось также при повышенной температуре инкубации (43,5 °С), когда частично замещались функционально активные молекулы БФео Н_А. Результаты обсуждаются в рамках механизма, согласно которому (1) температурно-зависимые внутренние движения белка РЦ являются фактором, облегчающим высвобождение молекулы БФео из сайта связывания и одновременное внедрение молекулы Фео в тот же сайт в сопряжённом процессе, (2) роль температурного фактора в значительной степени зависит от стерической доступности связывающих белковых карманов, (3) встраивание Фео происходит из пула мономерных молекул, включённых в мицеллы РЦ-детергент, (4) присутствие аcetона в среде инкубации облегчает обмен мономерными молекулами Фео между мицеллами в растворе и детергентным поясом РЦ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реакционный центр, (бактерио)феофитин, сайт связывания, химическое замещение, мицеллы детергента, *Rhodobacter sphaeroides*.

DOI: 10.31857/S0320972522100074, EDN: BCEFCU

ВВЕДЕНИЕ

Фотохимические реакционные центры (РЦ) фотосинтеза представляют собой трансмембранные пигмент-белковые комплексы, в которых энергия квантов света, поглощённых пигментами, с помощью каскада реакций пере-

носа электрона преобразуется в биохимически доступную энергию разделённых зарядов [1]. Широкий временной интервал реакций переноса электрона (от пикосекунд до сотен микросекунд) и наличие пространственной структуры с атомным разрешением делают РЦ удобной моделью как для исследования механизма фо-

Принятые сокращения: ΔA – изменение поглощения; БФео – бактериофеофитин *a*; БХл – бактериохлорофилл *a*; ЛДАО – *N,N*-диметилдодециламино-*N*-оксид; РЦ – реакционный центр; ТХ100 – Triton X-100; Фео – феофитин *a*; В_А и В_В – мономерные молекулы БХл в А- и В-ветви кофакторов соответственно; Н_А и Н_В – молекулы БФео в А- и В-ветви кофакторов соответственно; Р – первичный донор электрона, димер молекул БХл; Q_А и Q_В – первичный и вторичный убихиноновый акцептор соответственно.

* Адресат для корреспонденции.

тосинтеза, так и для тестирования теорий переноса электрона в молекулярных системах. Высокий (практически 100%-ный) квантовый выход разделения зарядов в РЦ обуславливает также активное применение РЦ при разработке искусственных гибридных преобразователей световой энергии [2, 3].

РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* R-26 состоит из трёх белковых субъединиц (L, M и H), две из которых (L и M) формируют сайты связывания кофакторов: димера молекул бактериохлорофилла *a* (БХл), служащего первичным донором электрона (P), двух мономерных молекул БХл (V_A и V_B), двух молекул бактериофеофитина *a* (БФео; H_A и H_B) и двух молекул убихинона (Q_A и Q_B). Кофакторы организованы в две квазисимметричные ветви (A и B), из которых только одна ветвь (P- V_A - H_A - Q_A - Q_B) участвует в фотоиндуцированном переносе электрона. Исследования реакций электронного переноса в нативных РЦ наталкиваются на ряд существенных трудностей, связанных с сильным перекрыванием полос поглощения индивидуальных пигментов и наличием экситонных взаимодействий между их оптическими переходами. Особенно остро эта проблема проявляется в случае РЦ оксигенного фотосинтеза (см., например, [4]). Кроме того, сверхвысокие скорости переноса электрона на ранних стадиях процесса фотосинтетического разделения зарядов осложняют идентификацию вовлечённых интермедиатов. Эффективным подходом к преодолению этих затруднений является внесение в структуру и пигментный состав РЦ контролируемых точечных изменений с последующим анализом их спектральных и функциональных последствий. В настоящее время известны несколько способов изменения состава пигментных кофакторов в РЦ фотосинтеза, включая сайт-направленный мутагенез [5], генетическую модификацию путей биосинтеза пигментов [5, 6], выращивание цианобактерий на дальнем красном свете [7], обработку борогидридом натрия [8], экстракцию с помощью Си-аффинной хроматографии [9] и химическое замещение хромофоров [10, 11]. Сайт-направленный мутагенез бактериальных РЦ был с успехом использован для встраивания БХл в сайты связывания БФео и, наоборот, за счёт введения/удаления лиганда к центральному атому Mg пигмента [5]. Более многообразные возможности в этом отношении предоставляет метод сайт-направленного химического замещения хромофоров [10, 11]. С помощью этого подхода редокс-потенциал отдельного специфического кофактора может быть селективно изменён без влияния на дру-

гие кофакторы [12, 13], и широкий интервал величин свободной энергии состояний может быть перекрыт за счёт введения в сайты связывания хромофоров РЦ чужеродных пигментов. В частности, такой подход был с успехом применён для решения долгое время существовавшей проблемы механизма участия мономерного БХл V_A в разделении зарядов в РЦ пурпурных бактерий [14-18]. Из-за ультракороткого времени жизни состояния $P^+V_A^-$ и, как следствие, низкой степени его заселённости это состояние не удавалось надёжно зарегистрировать в нативных РЦ даже с использованием фемтосекундной оптической спектроскопии. Замещение БФео на Фео в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 позволило изменить взаимное положение уровней свободной энергии состояний $P^+V_A^-$ и $P^+H_A^-$ и значительно увеличить время жизни $P^+V_A^-$. На этой основе были получены прямые доказательства в пользу общепринятого в настоящее время двухступенчатого механизма первичного разделения зарядов в РЦ пурпурных бактерий с участием молекулы V_A в качестве первичного акцептора электрона. Возможность манипулирования уровнями энергии состояний с помощью замещения хромофоров также представляет интерес в связи с поиском способов увеличения эффективности сопряжения разделения зарядов внутри РЦ с переносом электрона на проводящие подложки [19].

Ранее было показано, что пигментное замещение является сложным процессом, зависящим от ряда факторов, включая структуру, аминокислотный состав и стерическую доступность связывающего белкового кармана РЦ, природу боковых заместителей и гибкость макроцикла модифицированного пигмента, наличие в пигментной молекуле центрального атома Mg [10, 11]. Однако детальный механизм химического замещения пигментов в РЦ остаётся ещё не полностью выясненным. В частности, было предположено, что замещение нативных пигментов в сайтах связывания мономерных молекул БХл и БФео в РЦ пурпурных бактерий происходит при нагревании РЦ-комплексов до температуры, близкой к «точке плавления», когда амплитуда движений белка увеличивается, обеспечивая доступ экзогенным пигментам к внутренним областям РЦ [10, 11]. Позднее, однако, было показано, что замещение БФео на растительный феофитин *a* (Фео) в неактивной В-ветви РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 может происходить с высокой эффективностью уже при комнатной температуре [20]. Недавно была продемонстрирована возможность селективного замещения при комнатной температуре функционально активного БФео H_A

молекулами Фео и [3-ацетил]-Фео в РЦ зелёной нитчатой фототрофной бактерии *Chloroflexus aurantiacus* [21]. Исходя из склонности (бактерии) хлоринов агрегировать в детергентных растворах [22, 23], ранее предполагалось, что свободные пигменты присутствуют в средах замещения не в мономерной форме [10]. Однако экспериментальные данные о состоянии внешних пигментов, вовлечённых в процесс замещения, в литературе отсутствуют.

Данная работа посвящена анализу влияния температуры инкубации и агрегационного состояния внешнего пигмента на процесс химического замещения молекул БФео на Фео в изолированных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26. Показано также, что степень пигментного замещения зависит от присутствия/отсутствия в среде инкубации молекул органического растворителя (ацетона).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 были выделены обработкой мембран детергентом *N,N*-диметилдодециламино-*N*-оксидом (ЛДАО) с последующей очисткой методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [24]. Пигментное замещение проводили в ТЛ-буфере [10 mM Tris-HCl (pH 8)/0,1% (v/v) ЛДАО)]. Для экспериментов по фотонакоплению H_A^- РЦ были переведены в ТТ-буфер [10 mM Tris-HCl (pH 8)/0,1% (m/v) Triton X-100 (TX100)] путём замены детергента ЛДАО на TX100 на мембране 30 кДа («Millipore», США) в ячейке для ультрафильтрации под давлением газообразного аргона. Фео был получен экстракцией из листьев крапивы и очищен методом колоночной хроматографии на сахарной пудре [25].

Реакцию химического замещения проводили по методике, основанной на инкубации изолированных РЦ в присутствии избытка экзогенно добавленного модифицированного пигмента [10, 15, 20, 21, 26, 27]. Были проведены два типа экспериментов, которые отличались способом внесения экзогенного Фео в инкубационную смесь: из плёнки с TX100 в отсутствие ацетона (способ 1) или в виде ацетонового раствора (способ 2). По способу 1, Фео растворяли в ацетоне, содержащем 2%-ный TX100 (m/v). Затем ацетон полностью испаряли, формируя твёрдую пигментную плёнку, которую растворяли в ТЛ-буфере, получая, таким образом, раствор Фео в ТЛ-буфере [10 mM Tris-HCl (pH 8)/0,1% ЛДАО/0,1% TX100] без ацетона. По способу 2, раствор Фео в ацетоне добавляли к ТЛ-буферу до конечной концентрации ацето-

на, не превышающей 10%. В полученные обоими способами растворы Фео с детергентами добавляли концентрированный раствор РЦ в ТЛ-буфере (объём не превышал 10% от общего объёма смеси инкубации) таким образом, чтобы в смеси РЦ + Фео получить конечную концентрацию РЦ, равную 8 мкМ, и 15-кратный молярный избыток пигмента. (В исследованиях, выполненных ранее, обычно использовался способ, при котором раствор Фео в ацетоне добавлялся непосредственно к раствору РЦ в ТЛ-буфере [10, 15, 20, 21, 26, 27].) Смеси РЦ + Фео инкубировали в темноте в термостате Haake DC30-K20 («Thermo Fisher Scientific», США) при 5 °С или 25 °С в течение 6 ч или при 43,5 °С в течение 1 ч. Свободные пигменты удаляли в ходе последующей очистки модифицированных препаратов методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометрах UV-1800 («Shimadzu», Япония) и Agilent 8453 («Agilent», США). Для разложения спектров поглощения нативных и Фео-модифицированных РЦ на гауссовы полосы использовали процедуру минимизации методом наименьших квадратов в программе Origin. При анализе использовали минимальное количество спектральных компонентов, совокупность которых удовлетворительно описывала экспериментальные спектры поглощения.

Разностные (свет-минус-темнота) спектры фотонакопления бактериофеофитинового акцептора электрона H_A^- в восстановленном состоянии (H_A^-) измеряли при освещении РЦ в ТТ-буфере в анаэробных условиях в присутствии красителей индиготетрасульфоната калия (0,1 mM) и нейтрального красного (0,1 mM) в качестве редокс-медиаторов и дитионита натрия (4 mM) в качестве восстановителя, как описано в работе [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 показаны нормированные спектры поглощения Фео в ацетоне и в мицеллярных буферных растворах, которые были использованы в работе в качестве инкубационных сред при получении Фео-модифицированных РЦ.

Спектр поглощения Фео в ацетоне (кривая 1), измеренный при концентрации ~1 mM, использованной в экспериментах, хорошо согласуется со спектрами мономерной формы пигмента [29, 30], показывая интенсивную Q_y (0-0) полосу при 667 нм и более слабую вибронную полосу Q_y (0-1) при 608 нм, а также две полосы с максимумами при 534 и 505 нм,

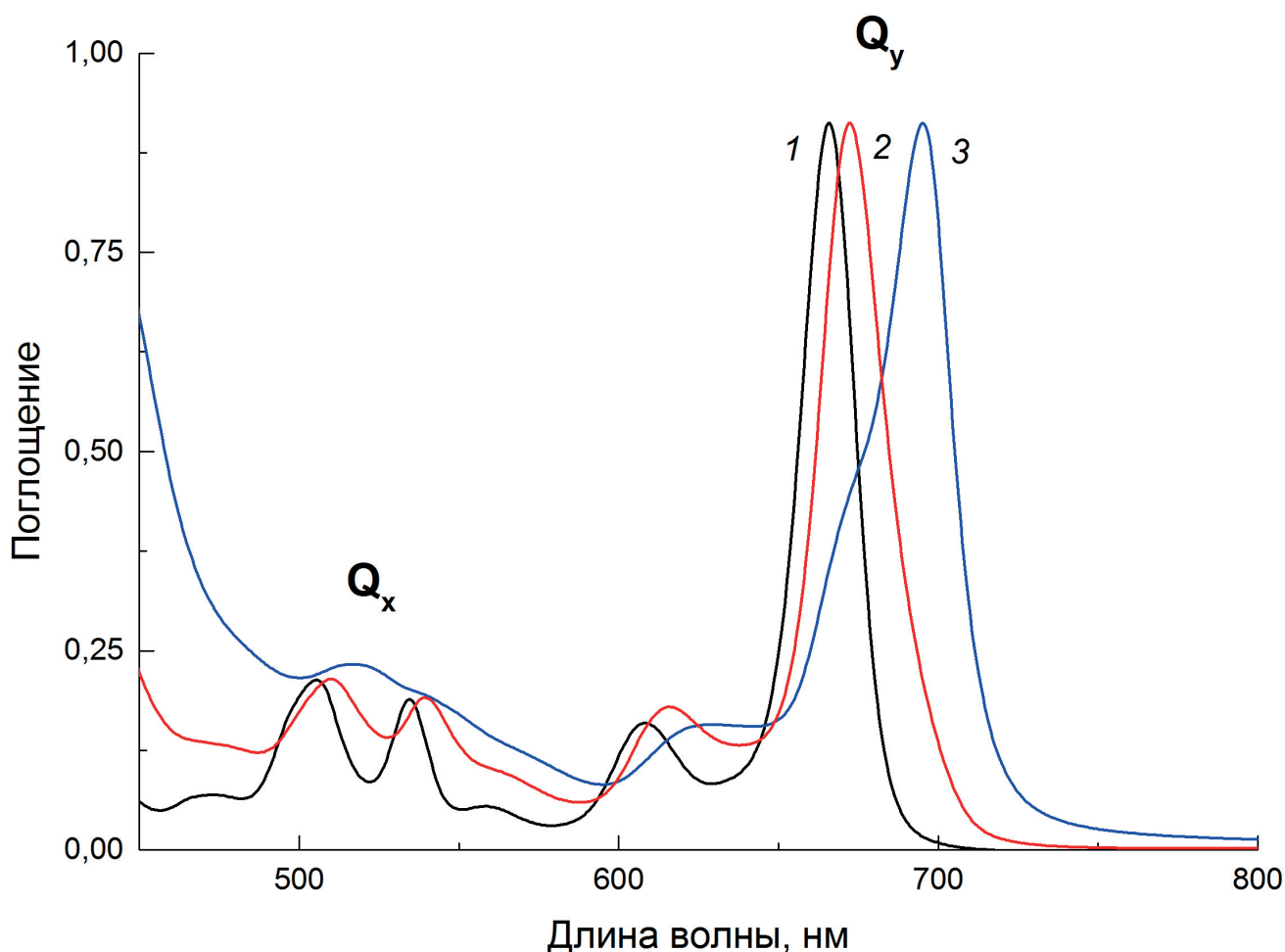


Рис. 1. Спектры поглощения Фео в ацетоне (1), в TLT-буфере без ацетона (2) и в TL-буфере в присутствии 10%-ного ацетона (3). Спектры измерены в области Q_x и Q_y переходов пигментов и нормированы друг к другу в максимуме Q_y полосы поглощения при 667, 672 и 695 нм соответственно

отнесённые к Q_x (0-0) и Q_x (0-1) переходам соответственно. Введение Фео через стадию сухой плёнки в водный TLT-буфер (способ 1) не оказывает значительного влияния на форму спектра поглощения пигмента (кривая 2) за исключением некоторого уширения и небольшого длинноволнового сдвига (на 5 нм до 672 нм) Q_y (0-0) полосы поглощения по сравнению со спектром в ацетоне. Аналогичные спектральные изменения характерны также для других полос поглощения Фео в спектре 2. Эти данные показывают, что Фео в TLT-буфере находится в основном в форме мономеров. Наблюдаемые минорные спектральные различия по отношению к ацетоновому раствору индуцированы, вероятно, изменением окружения мономерных молекул Фео при ассоциации их с мицеллами ЛДАО и TX100. Спектр поглощения Фео, введённого в водный TL-буфер из раствора в ацетоне (способ 2), содержит плечо при ~672 нм (кривая 3), показывая, что часть пигмента в этой среде также находится в мономерной

форме, ассоциированной с мицеллами ЛДАО. Однако в этом случае в спектре присутствует также интенсивная Q_y (0-0) полоса при 695 нм, приписываемая димерам Фео, в которых макроциклы молекул пигмента участвуют в π - π -взаимодействиях [29–34]. Агрегация пигментных молекул сопровождается модификацией также других полос поглощения Фео (кривая 3).

На рис. 2, а показаны нормированные спектры поглощения нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 (кривая 1) и РЦ после инкубации с Фео в TLT-буфере в отсутствие ацетона при 5 °С (кривая 2), 25 °С (кривая 3) и 43,5 °С (кривая 4). Спектр поглощения нативных РЦ соответствует спектрам, известным в литературе. В области Q_y переходов пигментов наиболее характерные изменения в спектрах поглощения РЦ, инкубированных с Фео при повышающихся температурах, включают постепенное уменьшение полосы поглощения молекул БФео H_A и H_B при 758 нм и параллельное появление/

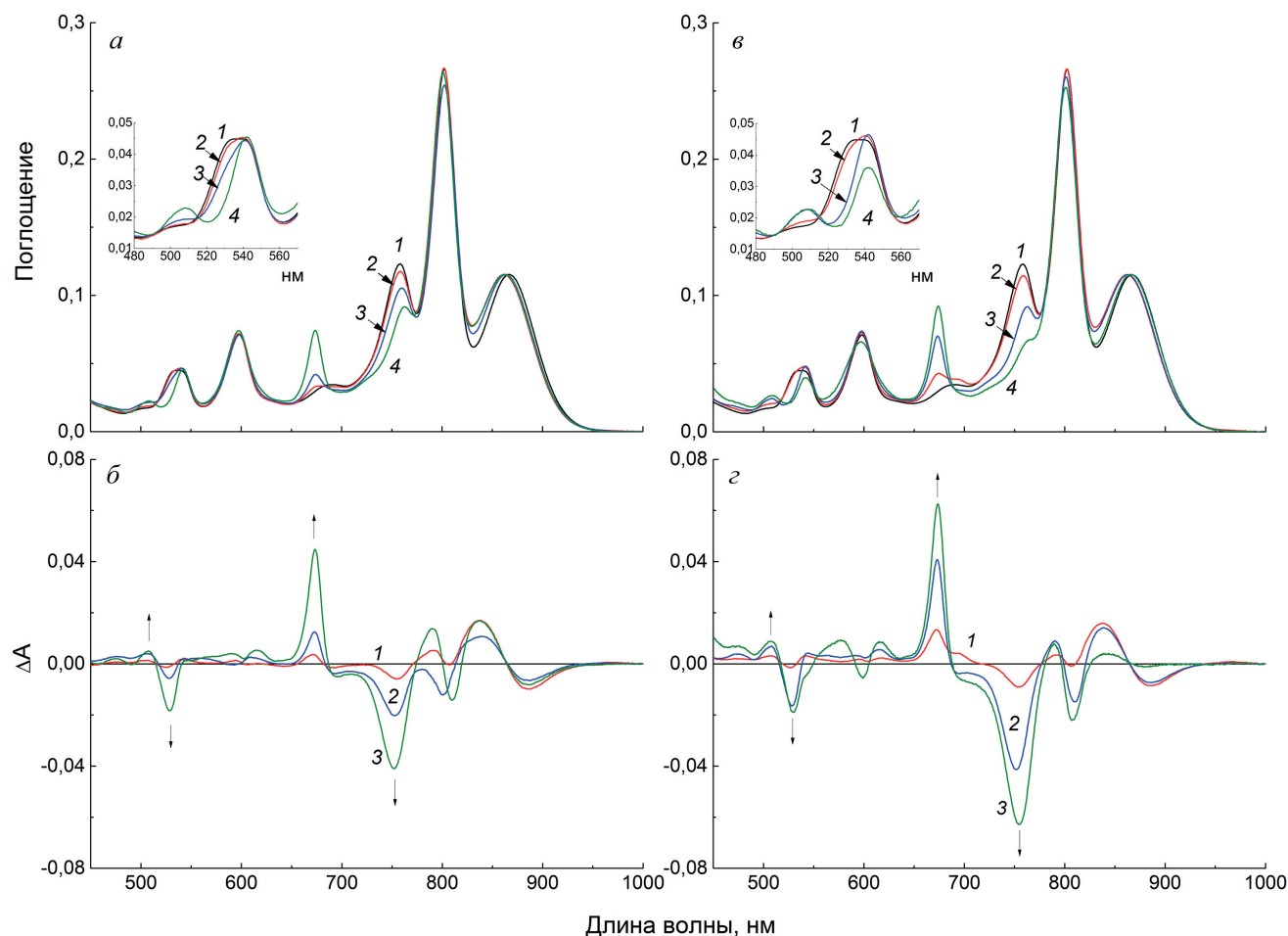


Рис. 2. Спектры поглощения нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 (1) и РЦ, инкубированных с Фео при 5 °С (2), 25 °С (3) и 43,5 °С (4) в TLT-буфере (а) и в TL-буфере (б). Спектры измерены в области Q_x и Q_y переходов пигментов и нормированы в максимуме длинноволновой Q_y полосы первичного донора электрона Р при 864–867 нм. На вставках к панелям а и б в увеличенном масштабе показана область Q_x полос поглощения молекул (Б)Фео; кривые совмещены при 490 нм. б и з – Разностные спектры «РЦ, инкубированные при 5 °С-минус-нативные РЦ» (1), «РЦ, инкубированные при 25 °С-минус-нативные РЦ» (2) и «РЦ, инкубированные при 43,5 °С-минус-нативные РЦ» (3), полученные из спектров поглощения, представленных на панелях а и б соответственно. Стрелки показывают направление абсорбционных изменений

увеличение Q_y (0-0) полосы Фео при 674 нм. Эти данные свидетельствуют об уходе из модифицированных РЦ части нативных молекул БФео и одновременном встраивании в освобождаемые места связывания внешних молекул Фео вследствие процесса пигментного замещения. Наблюдаемые абсорбционные изменения особенно отчётливо видны в разностных спектрах (рис. 2, б), полученных вычитанием спектра поглощения нативных РЦ из спектров поглощения Фео-замещённых РЦ. В частности, в разностном спектре «РЦ, инкубированные при 43,5 °С-минус-нативные РЦ» разрешается вибронная полоса Q_y (0-1) при 613 нм, принадлежащая молекулам Фео, внедрившимся в структуру РЦ. Из сравнения разностных спектров также хорошо видно, что частичная замена БФео на Фео имеет место уже при 5 °С.

Вставка к рис. 2, а показывает, что в области Q_x переходов молекул (Б)Фео инкубация РЦ с Фео в TLT-буфере при 25 °С (кривая 3) приводит к частичному уменьшению поглощения на коротковолновой стороне широкой Q_x (0-0) полосы нативных РЦ при ~535 нм, принадлежащей перекрывающимся вкладкам от молекул БФео H_A и H_B , и к развитию вибронной полосы при 510 нм. Этот факт вместе с присутствием в разностном спектре «РЦ, инкубированные при 25 °С-минус-нативные РЦ» (рис. 2, б, кривая 2) отрицательной полосы при 527 нм и положительной полосы при 510 нм указывает на селективное замещение в этих условиях части молекул БФео H_B в неактивной ветви кофакторов РЦ [20]. Аналогичные спектральные изменения меньшей амплитуды можно также различить на рис. 2, а (вставка, кривая 2) и рис. 2, б (кривая 1) для РЦ, инкубированных с Фео при 5 °С.

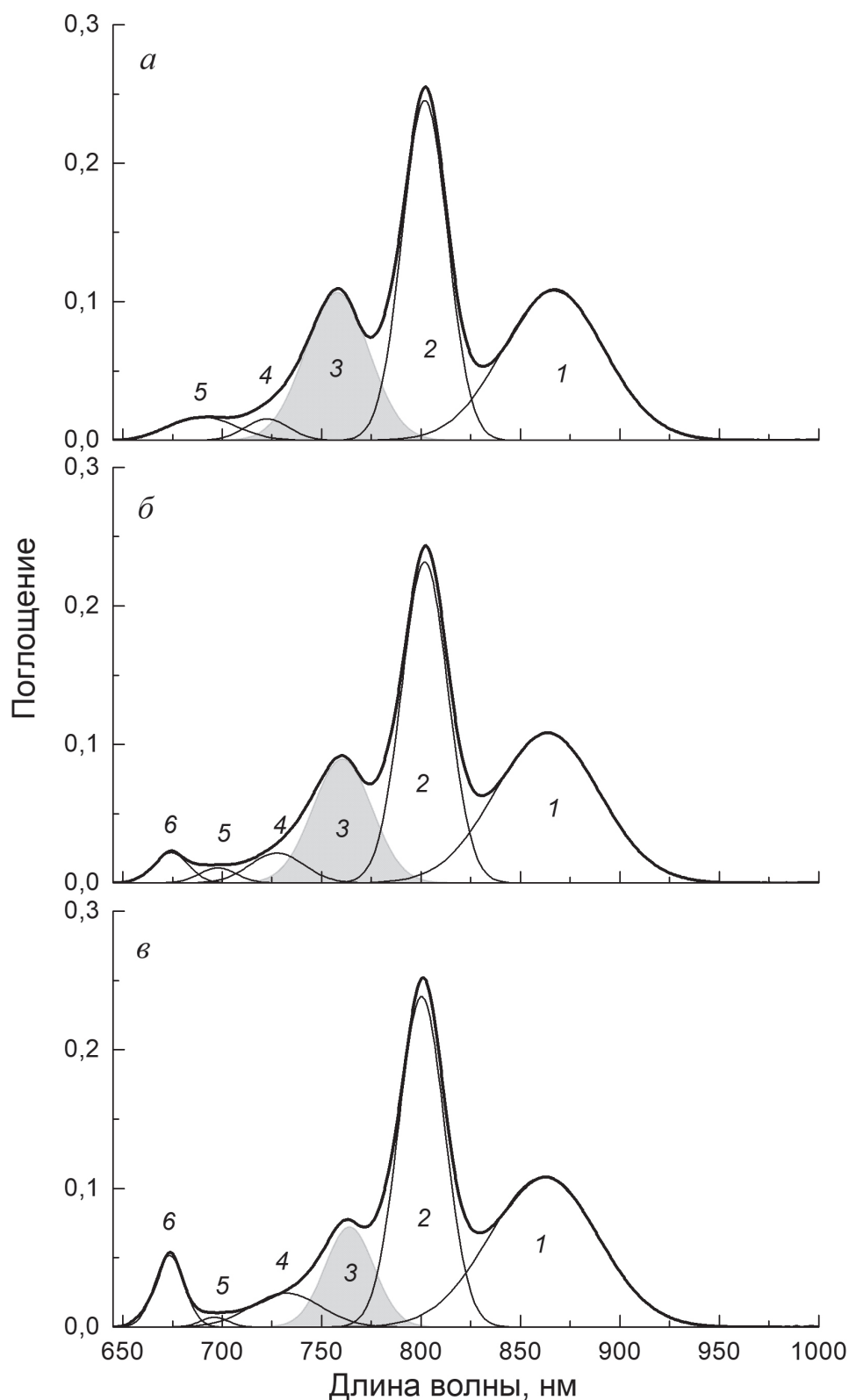


Рис. 3. Результаты разложения на гауссовы компоненты спектров поглощения РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 в области 645–1000 нм: нативные (а), инкубированные с Фео в ТЛТ-буфере при 25 °С (б) и при 43,5 °С (в). Спектры, показанные утолщёнными линиями, представляют собой спектры поглощения из рис. 2, а, из каждого из которых была вычтена соответствующая базовая линия в виде прямой линии, соединяющей точки спектра при 645 и 950 нм. Тонкими линиями показаны гауссовы компоненты. Полуширины гауссовых компонентов (полуширина на полувывоте) для полос БХл Р (кривые 1) и БХл В_{А/В} (кривые 2) были примерно одинаковыми для всех образцов (60–63 нм для Р и 27–28 нм для В_{А/В}). Полуширина компонента для БФео Н_{А/В} (кривые 3, закрашенные серым цветом) уменьшалась с увеличением степени пигментного замещения с 38 до 30 нм в связи с необходимостью учёта асимметрии полосы [20]. Компоненты 4 и 5 обусловлены фоновым поглощением РЦ. Компонент б представляет полосу поглощения инкорпорированных молекул Фео

Степень замещения БФео на Фео в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 в зависимости от температуры среды инкубации и способа введения молекул Фео в среду

Температура, °С	Фео в ТЛТ-буфере без ацетона (способ 1)	Фео в смеси ТЛ-буфер + 10%-ный ацетон (способ 2)
5	7%	12%
25	20% (52%*)	51% (26%**)
43,5	48%	70%

Примечание. Степень замещения оценивалась по уменьшению площади полосы БФео при 760 нм в спектрах поглощения Фео-замещённых РЦ относительно площади аналогичной полосы в спектре нативных РЦ (см. рис. 3). Точность оценки составляла $\pm 5\%$.

* После добавки 10%-ного ацетона.

** После удаления 10%-ного ацетона.

Амплитуда таких изменений значительно возрастает после инкубации при 43,5 °С, когда пигментному замещению подвергается основная часть молекул БФео в сайте H_B . В этом случае в спектре поглощения (рис. 2, а, вставка, кривая 4) наблюдаются $Q_x(0-1)$ полоса Фео_В

при 510 нм и $Q_x(0-0)$ полоса при 545 нм, включающая в основном вклады от молекул Фео_В и БФео_А, а также, возможно, в небольшой степени от молекулы Фео_А.

Для того чтобы количественно оценить степень замещения молекул БФео на Фео в ТЛТ-буфере, спектры поглощения нативных и Фео-модифицированных РЦ из рис. 2, а разлагали на гауссовы полосы в области Q_y переходов пигментов (645–1000 нм) (рис. 3).

Используя отношения площадей (интегрированного поглощения) под кривыми 3 для модифицированных препаратов к площади под кривой 3 для нативных РЦ в качестве меры замещаемости пигментов в сайтах H_A и H_B , из рис. 3 было определено, что 20% и 48% молекул БФео были заменены на Фео после инкубации при 25 °С и 43,5 °С соответственно (таблица). Степень пигментного замещения после инкубации при 5 °С (данные не представлены на рис. 3) составляла 7% (таблица). Учитывая, что отношение площадей на рис. 3 даёт суммарную оценку степени замещения молекул БФео в сайтах связывания H_A и H_B , а в ТЛТ-буфере замещению подвергаются главным образом молекулы в сайте H_B (рис. 2, а и б), степень селективного замещения БФео H_B на Фео при 5 °С,

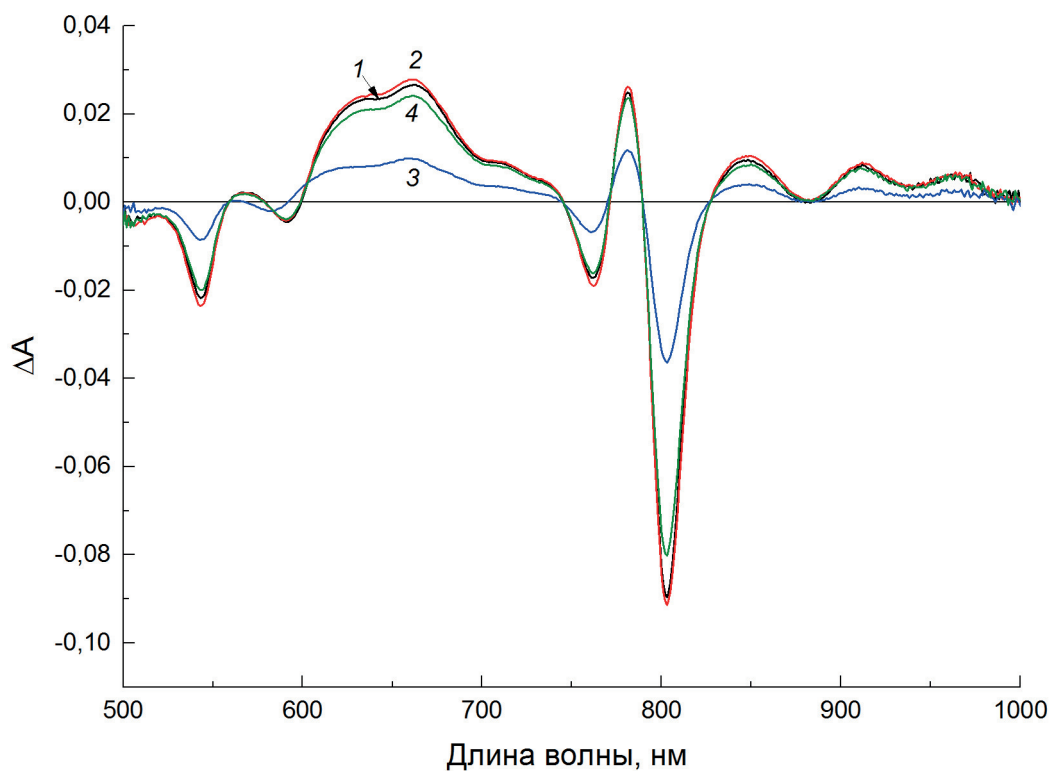


Рис. 4. Разностные (свет-минус-темнота) спектры H_A^-/H_A для нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 (1) и РЦ после инкубации с Фео в ТЛТ-буфере при 25 °С (2) и 43,5 °С (3). Кривая 4 представляет аналогичный разностный спектр для РЦ после инкубации с Фео в ТЛТ-буфере при 43,5 °С. Все разностные спектры получены для препаратов, имеющих одинаковое поглощение в максимуме Q_y полосы Р при 864–867 нм в исходных спектрах поглощения

25 °С и 43,5 °С может быть оценена как 14%, 40% и 96% соответственно. Однако в случае инкубации при 43,5 °С оценочное значение является, по-видимому, несколько завышенным, поскольку, как будет показано ниже (рис. 4), при этой температуре замещению подвергается также небольшая часть (~10%) молекул БФео в сайте H_A .

Нормированные спектры поглощения и разностные спектры, представленные на рис. 2, *в* и *г* соответственно, показывают, что инкубация РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 с Фео в ТЛ-буфере в присутствии 10%-ного ацетона при 5 °С, 25 °С и 43,5 °С приводит к спектральным изменениям, качественно сходным с теми, что наблюдаются при инкубации в ТЛТ-буфере в отсутствие ацетона (рис. 2, *а* и *б*). Однако замещение БФео на Фео в ТЛ-буфере было значительно более эффективным, чем в ТЛТ-буфере. Используя разложение спектров поглощения в области 645–1000 нм на гауссовы компоненты (рис. S1 Приложения), было определено, что суммарная степень пигментного замещения в ТЛ-буфере составляла 12%, 51% и 70% после инкубации при 5 °С, 25 °С и 43,5 °С соответственно (таблица). Исходя из этих данных, эффективность селективного замещения БФео H_B на Фео при 5 °С и 25 °С может быть оценена величинами 24% и около 100% соответственно, в то время как при 43,5 °С, наряду с преимущественным замещением в H_B -сайт, в значительной части модифицированных РЦ внешний Фео встраивается в сайт H_A .

Для более точной оценки степени замещения БФео на Фео в сайте H_A в обеих использованных буферных системах были проведены сравнительные исследования разностных (свет-минус-темнота) спектров H_A^-/H_A (рис. 4), отражающих селективное фотонакопление восстановленного БФео H_A^- при низких окислительно-восстановительных потенциалах среды [24, 35, 36].

Приведённый на рис. 4 (кривая 1) разностный спектр H_A^-/H_A для нативных РЦ хорошо соответствует спектрам фотонакопления H_A^- , ранее опубликованным для РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 [24, 35, 36], демонстрируя селективное выцветание Q_y и Q_x полос БФео H_A при 762 и 543 нм соответственно, появление характерных полос поглощения анион-радикала H_A^- при 660, 912 и 965 нм, а также электрохромный коротковолновый сдвиг и уменьшение дипольной силы полосы поглощения мономерных молекул БХл в области 800 нм. Из рис. 4 видно, что разностный спектр для Фео-модифицированных РЦ, полученных инкубацией в ТЛ-буфере

при 25 °С (кривая 2), практически идентичен по форме спектру для нативных РЦ и совпадает с ним по амплитуде. (Минорное различие по амплитуде между кривыми 1 и 2 находится в пределах ошибки измерений, которая составляла $\pm 5\%$.) Аналогичный результат был получен также для Фео-модифицированных РЦ после инкубации в ТЛТ-буфере при 25 °С (рис. S2 Приложения). Эти наблюдения подтверждают, что при инкубации при комнатной температуре внешний Фео замещает преимущественно неактивные молекулы БФео H_B при сохранении фотохимически активных молекул БФео H_A . После инкубации в ТЛ-буфере при 43,5 °С разностный спектр остаётся неизменным по форме, но значительно уменьшается по амплитуде (рис. 4, кривая 3), показывая, что в этих условиях молекулы Фео частично встраиваются также в сайт H_A , но, в отличие от нативного БФео, они не способны к фотонакоплению восстановленной формы ($Фео_{A^-}$). Наиболее вероятной причиной этого эффекта является более отрицательный потенциал восстановления Фео по сравнению с БФео, что приводит к повышению уровня свободной энергии состояния $Р^+Фео_{A^-}$ и к изменению энергетики процесса разделения зарядов в модифицированных РЦ (для более детального обсуждения и ссылок см. работу [21]). Из соотношения амплитуд абсорбционных изменений в разностных спектрах 3 и 1 в полосе анион-радикала H_A^- при 660 нм степень замещения БФео H_A после инкубации в ТЛ-буфере при 43,5 °С была оценена равной 60%. Аналогичное сравнение амплитуд абсорбционных изменений при 660 нм в разностных спектрах фотонакопления анион-радикала H_A^- в нативных РЦ и Фео-модифицированных РЦ, инкубированных в ТЛТ-буфере при 43,5 °С (рис. 4, кривые 1 и 4), показало ~10%-ное замещение БФео H_A на Фео.

В дополнительных экспериментах с инкубацией при 25 °С (спектры не показаны) было найдено, что добавка в ТЛТ-буфер 10%-ного ацетона увеличивала суммарную степень замещения БФео на Фео с 20% до 52% (таблица). Напротив, удаление из ТЛ-буфера 10%-ного ацетона путём выдерживания раствора (до внесения РЦ) на воздухе при комнатной температуре в течение суток со спектрофотометрическим контролем содержания ацетона приводило к уменьшению степени замещения с 51% до 26% (таблица). Этот результат показывает, что в описанных выше экспериментах роль ацетона как органического растворителя не ограничивалась введением гидрофобных молекул Фео в буферную водно-детергентную среду.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в работе данные показывают, что температура среды инкубации и агрегационная форма внешнего пигмента относятся к факторам, контролирующим возможность, селективность и эффективность химического замещения нативных хромофоров в БФео-содержащих белковых карманах РЦ *Rba. sphaeroides* R-26.

Роль температуры среды инкубации. Ранее Scheer и Struck [10] предположили, что для успешного протекания процесса химического замещения инкубационную смесь, содержащую РЦ с избытком модифицированного пигмента, необходимо нагреть до температуры, близкой к «точке плавления» РЦ (~42-43 °С). При этом происходит усиление внутренних движений белка, что обеспечивает условия для достижения равновесия между добавленным модифицированным пигментом и молекулами нативного пигмента, связанного с белком [11]. Результаты наших исследований подтверждают влияние температуры на эффективность пигментного замещения (рис. 2; таблица). Однако предполагаемый ранее «высокотемпературный» режим не является, очевидно, критически важным во всех случаях, поскольку эффективное замещение БФео Н_В на Фео наблюдается уже при комнатной температуре [20] и, частично, уже при 5 °С (эта работа), то есть в условиях, когда белковая структура РЦ-комплекса сохраняется невозмущённой. В последнее время в многочисленных исследованиях было показано, что белки в их нормальном состоянии (например, при физиологических условиях) не обладают фиксированной структурой, флуктуируя между множеством конформационных состояний (для обзора см. [37, 38]). В работе [39] были теоретически проанализированы нормированные амплитуды и направления доминирующих мод, связанных с согласованными флуктуациями белкового матрикса в РЦ *Rba. sphaeroides*. Полученные нами данные указывают на то, что белковые движения, вовлечённые в процесс пигментного замещения в РЦ-комплексе, активированы уже при 5 °С, и их влияние на эффективность замещения возрастает при повышении температуры среды. Хотя детали процесса обмена пигментными молекулами остаются неясными, термоактивированные белковые движения в РЦ, по-видимому, способствуют (ассистируют) выходу нативного БФео из сайта связывания и одновременно встраиванию в тот же сайт внешнего Фео. Дальнейшие исследования с помощью комбинации экспериментальных и теоретических ме-

тодов, включая молекулярную динамику, нейтронное рассеяние и ЯМР [38, 40], потребуются для выяснения природы и характеристик таких движений. Вероятно, влияние температурного фактора на процесс замещения в значительной степени определяется степенью стерической доступности связывающего белкового кармана для внешнего пигмента. Вследствие этого молекула БФео, локализованная в относительно доступном сайте Н_В в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 [21], эффективно замещается молекулой Фео уже при комнатной температуре ([20], эта работа). В то же время для встраивания молекулы Фео в стерически более заблокированный сайт Н_А [21] требуются движения белка большей амплитуды, активируемые только при повышенных температурах [10, 15, 20, 27].

Роль агрегационного состояния Фео. Для эффективного осуществления предполагаемого выше сопряжённого процесса пигментного замещения экзогенный пигмент должен оказаться, очевидно, вблизи сайтов связывания Н_А и Н_В. Однако, поскольку эти сайты находятся в гидрофобной области РЦ-комплекса, окружённой «детергентным поясом» из молекул ЛДАО [41], возникают вопросы, каким образом такая ситуация реализуется при внесении молекул Фео в водно-детергентную среду инкубации и в какой форме агрегации находятся молекулы Фео, непосредственно участвующие в реакции замещения.

Полученные нами данные показывают, что в системе Фео + ТЛТ-буфер, приготовленной по способу 1 в отсутствие ацетона, пигмент находится, судя по его спектру поглощения (рис. 1, 2), преимущественно в мономерной форме в составе свободных мицелл детергентов среды. Тот факт, что внесение в эту систему нативных РЦ приводит к их модификации (рис. 2, а и б), указывает на то, что в процессе инкубации происходит обмен мономерным Фео между мицеллами ТЛТ-буфера и детергентным поясом ЛДАО. Возможность обмена солибилизованным веществом между мицеллами хорошо известна в литературе (для обзора см. [42]). Переход пигмента из свободных мицелл буферной среды в мицеллярный детергентный пояс РЦ происходит, по-видимому, при слиянии мицелл с образованием короткоживущих супермицелл с последующей фрагментацией на мицеллы обычного размера [42]. Исходя из предположения о том, что распределение молекул пигмента между мицеллами подчиняется распределению Пуассона [43], расчёт на основе используемых в данной работе концентраций пигмента (~10⁻⁴ М) и детергентов [ТХ100 (1,6·10⁻⁴ М) и ЛДАО (4·10⁻⁴ М)] позволяет оце-

нить, что более 99% мицелл содержали две и более молекулы Фео после достижения равновесия в инкубационной смеси.

При внесении ацетонового раствора Фео в ТЛ-буфер (способ 2), по-видимому, образуется микрогетерогенная система, в которой гидрофобные молекулы пигмента распределяются по меньшей мере между двумя фазами: водно-ацетоновой фазой (ацетон не образует отдельной фазы и полностью растворяется в воде) и мицеллами ЛДАО. Исходя из спектра поглощения пигмента (рис. 1, кривая 3), наиболее вероятно, что гидрофобные молекулы Фео в водно-ацетоновой фазе образуют π - π -сопряжённые димеры, поглощающие при 695 нм, в то время как в мицеллярной фазе Фео находится в виде мономеров, ассоциированных с мицеллами ЛДАО (поглощение при ~672 нм). Рис. 2, в и г и таблица показывают, что степень пигментного замещения в такой микрогетерогенной системе была существенно выше, чем в системе Фео + ТЛ-буфер. Результаты данного исследования не позволяют сделать однозначный вывод относительно возможности эффективного вовлечения в пигментное замещение димеров Фео в ТЛ-буфере. Однако такая возможность представляется маловероятной, поскольку наблюдаемое различие в выходе реакции может быть объяснено тем (несколько неожиданным) фактом, что степень замещения БФео на Фео в присутствии ацетона оказалась выше, чем в случаях, когда ацетон не добавлялся или был удалён (таблица). Ранее было показано, что добавка ацетона вызывает ограничение мицеллообразования и повышение температуры точки помутнения в системе вода–ТХ100 вследствие изменения структуры водной фазы и адсорбции ацетона на поверхности мицелла–вода [44]. Предположительно, в присутствии ацетона мицеллы ТХ100 и, возможно, ЛДАО становятся менее стабильными, что могло бы облегчить пигментный обмен между ними и детергентным поясом РЦ, повышая тем самым концентрацию мономерного Фео в области БФео-связывающего белкового кармана и увеличивая вероятность реакции замещения. В то же время, хотя в описанных здесь экспериментах использовалась относительно низкая концентрация ацетона (10%), нельзя исключить, что присутствие этого органического растворителя могло сделать локальную структуру связывающих белковых карманов в РЦ несколько более лабильной, обеспечивая большую доступность молекул БФео для пигментного обмена. Однако, если такая ситуация имеет место, она, очевидно, не оказывает значительного влияния на

функциональные реакции переноса электрона в РЦ. В пользу этого свидетельствует тот факт, что инкубация РЦ с Фео в ТЛ-буфере в присутствии 10%-ного ацетона при 25 °С, приводящая к ~100%-ному замещению БФео Н_В, не влияла на форму и амплитуду разностного спектра фотонакопления анион-радикала Н_Д (рис. 4, кривая 2). Кроме того, выполненные ранее фемтосекундные измерения на модифицированных РЦ *Rba. sphaeroides*, в которых молекулы БФео Н_А и БФео Н_В были замещены в присутствии 10%-ного ацетона молекулами [3-ацетил]-Фео, имеющими потенциал восстановления *in vitro*, сравнимый с потенциалом БФео, выявили динамические характеристики процесса первичного разделения зарядов очень близкие к таковым, наблюдаемым в РЦ дикого типа [45].

В заключение отметим, что в сочетании с другими факторами [10, 11] температурный фактор, состояние агрегации внешнего пигмента и присутствие небольшого количества органического растворителя, исследованные в данной работе на примере встраивания молекул Фео в структуру РЦ пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* R-26, могут, очевидно, играть важную роль в процессах сайт-селективного замещения пигментов также в РЦ других фотосинтезирующих организмов. Учёт таких факторов необходим для достижения максимальной степени пигментного замещения и получения спектрально и функционально гомогенных препаратов модифицированных РЦ, что является важным при исследовании начальных, ультрабыстрых стадий фотоиндуцированного разделения зарядов при фотосинтезе методом кинетической абсорбционной спектроскопии.

Благодарности. В работе использовали оборудование (спектрофотометр UV-1800 («Shimadzu»)) центра коллективного пользования Пушкинского научного центра. Авторы выражают благодарность И.А. Шагиной за помощь на начальной стадии работы.

Вклад авторов. А.А. Забелин, А.Я. Шкурпатов – концепция и руководство работой; А.А. Забелин, В.Б. Ковалев – проведение экспериментов; А.А. Забелин, А.Я. Шкурпатов, В.Б. Ковалев – обсуждение результатов исследования; А.А. Забелин, А.Я. Шкурпатов – написание текста.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена за счёт средств госзадания «Структура и функции пигмент-белковых комплексов фотосинтези-

рующих организмов как наноразмерных природных преобразователей солнечной энергии» (№ 122041100204-3).

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследо-

ваний с участием людей или животных в качестве объектов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шувалов В. А. (1990) *Первичное преобразование световой энергии при фотосинтезе*, Наука, Москва.
2. Yehezkeili, O., Tel-Vered, R., Michaeli, D., Willner, I., and Nechushtai, R. (2014) Photosynthetic reaction center-functionalized electrodes for photobioelectrochemical cells, *Photosynth. Res.*, **120**, 71-85, doi: 10.1007/s11120-013-9796-3.
3. Friebe, V. M., Barszcz, A. J., Jones, M. R., and Frese, R. N. (2022) Sustaining electron transfer pathways extends biohybrid photoelectrode stability to years, *Angew. Chem. Int. Ed.*, e202201148, doi: 10.1002/anie.202201148.
4. Zabelin, A. A., Shkuropatova, V. A., Makhneva, Z. K., Moskalenko, A. A., Shuvalov, V. A., et al. (2014) Chemically modified reaction centers of photosystem II: exchange of pheophytin a with 7-deformyl-7-hydroxymethyl-pheophytin b, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1870-1881, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.08.004.
5. Jones, M. (2009) in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., Beatty, J. T., eds) Springer, Dordrecht, pp. 295-321, doi: 10.1007/978-1-4020-8815-5_16.
6. Xu, H., Vavilin, D., and Vermaas, W. (2001) Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14168-14173, doi: 10.1073/pnas.251530298.
7. Gan, F., Zhang, S., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. C., et al. (2014) Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light, *Science*, **345**, 1312-1316, doi: 10.1126/science.1256963.
8. Shkuropatov, A. Ya., Khatypov, R. A., Volshchukova, T. S., Shkuropatova, V. A., Owens, T. G., et al. (1997) Spectral and photochemical properties of borohydride-treated D1-D2-cytochrome b-559 complex of photosystem II, *FEBS Lett.*, **420**, 171-174, doi: 10.1016/S0014-5793(97)01512-3.
9. Vacha, F., Joseph, D. M., Durrant, J. R., Telfer, A., Klug, D. R., et al. (1995) Photochemistry and spectroscopy of a five-chlorophyll reaction center of photosystem II isolated by using a Cu affinity column, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2929-2933, doi: 10.1073/pnas.92.7.2929.
10. Scheer, H., and Struck, A. (1993) in *The Photosynthetic Reaction Center* (Deisenhofer, J., and Norris, J.R., eds) Academic Press, San Diego, pp. 157-192.
11. Scheer, H., and Hartwich, G. (1995) in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 649-663.
12. Meyer, M., Scheer, H., and Breton, J. (1996) Probing native-like orientation of pigments in modified reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R26 by linear dichroism, *FEBS Lett.*, **393**, 131-134, doi: 10.1016/0014-5793(96)00869-1.
13. Meyer, M. (1997) *Pigment-Modified Reaction Centers of Rb. sphaeroides R26.1*. Dissertation, University of Munich, Munich.
14. Zinth, W., and Wachtveitl, J. (2005) The first picoseconds in bacterial photosynthesis – ultrafast electron transfer for the efficient conversion of light energy, *Chem. Phys. Chem.*, **6**, 871-880, doi: 10.1002/cphc.200400458.
15. Shkuropatov, A. Ya., and Shuvalov, V. A. (1993) Electron transfer in pheophytin a-modified reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* (R-26), *FEBS Lett.*, **322**, 168-172, doi: 10.1016/0014-5793(93)81561-D.
16. Schmidt, S., Arlt, T., Hamm, P., Huber, H., Nägele, T., et al. (1994) Energetics of the primary electron transfer reaction revealed by ultrafast spectroscopy on modified bacterial reaction centers, *Chem. Phys. Lett.*, **223**, 116-120, doi: 10.1016/0009-2614(94)00429-3.
17. Schmidt, S., Arlt, T., Hamm, P., Huber, H., Nägele, T., et al. (1995) Primary electron-transfer dynamics in modified bacterial reaction centers containing pheophytin-a instead of bacteriopheophytin-a, *Spectrochim. Acta A*, **51**, 1565-1578, doi: 10.1016/0584-8539(95)01440-6.
18. Kennis, J. T. M., Shkuropatov, A. Ya., van Stokkum, I. H. M., Gast, P., Hoff, A. J., et al. (1997) Formation of a long-lived P⁺B_A⁻ state in plant pheophytin-exchanged reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26 at low temperature, *Biochemistry*, **36**, 16231-16238, doi: 10.1021/bi9712605.
19. Lu, Y., Xu, J., Liu, Y., Liu, B., Xu, C., et al. (2006) Manipulated photocurrent generation from pigment-exchanged photosynthetic proteins adsorbed to nanostructured WO₃-TiO₂ electrodes, *Chem. Commun.*, **7**, 785-787, doi: 10.1039/b514606b.
20. Franken, E. M., Shkuropatov, A. Ya., Francke, C., Neerken, S., Gast, P., et al. (1997) Reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26 with selective replacement of bacteriopheophytin by pheophytin a I. Characterisation of steady state absorbance and

- circular dichroism, and of the P⁺Q_A⁻ state, *Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 242-250, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00165-X.
21. Zabelin, A. A., and Shkuropatov, A. Ya. (2021) Pigment-modified reaction centers of *Chloroflexus aurantiacus*: chemical exchange of bacteriopheophytins with plant-type pheophytins, *Photosynth. Res.*, **149**, 313-328, doi: 10.1007/s11120-021-00855-x.
 22. Katz, J. J., Bowman, M. K., Michalski, T. J., and Worcester, D. L. (1991) in *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 211-236.
 23. Scherz, A., Rosenbach-Belkin, V., and Fisher, J. R. E. (1991) in *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 237-268.
 24. Zabelin, A. A., Shkuropatova, V. A., Shuvalov, V. A., and Shkuropatov, A. Ya. (2011) FTIR spectroscopy of the reaction center of *Chloroflexus aurantiacus*: photoreduction of the bacteriopheophytin electron acceptor, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1013-1021, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.05.018.
 25. Strain, H. H., and Svec, W. A. (1966) in: *The chlorophylls* (Vernon, L. P., Seele, G. R., eds) Academic Press, N.Y., pp. 21-66.
 26. Scheer, H., Meyer, M., and Katheder, I. (1992) in *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II: Structure, Spectroscopy, and Dynamics* (Breton, J., and Vermeglio, A., eds) NATO ASI Series, Springer, N.Y., pp. 49-57.
 27. Meyer, M., and Scheer, H. (1995) Reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26 containing C-3 acetyl and vinyl (bacterio)pheophytins at sites H_{A,B}, *Photosynth. Res.*, **44**, 55-65, doi: 10.1007/BF00018296.
 28. Забелин А. А., Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г., Шкуropатова В. А., Зверева М. Г., и др. (2009) Мутантные реакционные центры *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)H с прочно связанным бактериохлорофиллом *a*: структурные свойства и пигмент-белковые взаимодействия, *Биохимия*, **74**, 86-94.
 29. Гуринович Г. П., Стрелкова Т. И. (1963) Изучение ассоциации молекул некоторых порфиринов, *Биофизика*, **2**, 172-180.
 30. Luisetti, J., Möhwal, H., and Galla, H. J. (1979) Spectroscopic and thermodynamic studies of chlorophyll containing monolayers and vesicles. Part II: chlorophyll a and pheophytin a aggregation on DMPC vesicles, *Z. Naturforsch.*, **34**, 406-413, doi: 10.1515/znc-1979-5-615.
 31. Ballschmitter, K., and Katz, J. J. (1972) Chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-water interactions in the solid state, *Biochim. Biophys. Acta*, **256**, 307-327, doi: 10.1016/0005-2728(72)90062-X.
 32. Cotton, T. M., Loach, P. A., Katz, J. J., and Ballschmitter, K. (1978) Studies of chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-ligand interactions by visible absorption and infrared spectroscopy at low temperatures, *Photochem. Photobiol.*, **27**, 735-749, doi: 10.1111/j.1751-1097.1978.tb07672.x.
 33. Луганская А. Н., Лебедев Н. Н., Красновский А. А. (1984) Молекулярная организация феофитина а в водных растворах детергентов, *Мол. биол.*, **18**, 963-971.
 34. Hynninen, P.H., and Lötjönen, S. (1993) Effects of π-π interactions on the ¹H-NMR spectra and solution structures of pheophytin a and a' dimers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**, 374-380, doi: 10.1016/0005-2728(93)90242-8.
 35. Okamura, M. Y., Isaacson, R. A., and Feher, G. (1979) Spectroscopic and kinetic properties of the transient intermediate acceptor in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **546**, 394-417, doi: 10.1016/0005-2728(79)90076-8.
 36. Shuvalov, V. A., Shkuropatov, A. Ya., Kulakova, S. M., Ismailov, M. A., and Shkuropatova, V. A. (1986) Photoreactions of bacteriopheophytins and bacteriochlorophylls in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and *Chloroflexus aurantiacus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **849**, 337-346, doi: 10.1016/0005-2728(86)90145-3.
 37. Khodadadi, S., and Sokolov, A. P. (2015) Protein dynamics: from rattling in a cage to structural relaxation, *Soft. Matter.*, **11**, 4984-4998, doi: 10.1039/c5sm00636h.
 38. Grimaldo, M., Roosen-Runge, F., Zhang, F., Schreiber, F., and Seydel, T. (2019) Dynamics of proteins in solution, *Quart. Rev. Biophys.*, **52**, e7, doi: 10.1017/S0033583519000027.
 39. Stoica, I. (2006) Characterization of protein matrix motions in the *Rb. sphaeroides* photosynthetic reaction center, *J. Mol. Model.*, **12**, 468-480, doi: 10.1007/s00894-005-0074-y.
 40. Puthenveetil, R., Christenson, E. T., and Vinogradova, O. (2022) New horizons in structural biology of membrane proteins: experimental evaluation of the role of conformational dynamics and intrinsic flexibility, *Membranes*, **12**, 227, doi: 10.3390/membranes12020227.
 41. Roth, M., Arnoux, B., Ducruix, A., and Reiss-Husson, F. (1991) Structure of the detergent phase and protein-detergent interactions in crystals of the wild-type (strain y) *Rhodobacter sphaeroides* photochemical reaction center, *Biochemistry*, **30**, 9403-9413, doi: 10.1021/bi00103a003.
 42. Rharbi, Y., and Winnik, M. A. (2001) Solute exchange between surfactant micelles by micelle fragmentation and fusion, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **89-90**, 25-46, doi: 10.1016/S0001-8686(00)00054-3.
 43. Infelta, P.P., and Gratzel, M. (1979) Statistics of solubilize distribution and its application to pyrene fluorescence in micellar systems. A concise kinetic model, *J. Chem. Phys.*, **70**, 179-186, doi: 10.1063/1.437218.

44. Gu, T., and Galera-Gómez, P. A. (1999) The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water, *Colloids Surf A Physicochem. Eng. Aspects*, **147**, 365-370, doi: 10.1016/S0927-7757(98)00710-9.
45. Huber, H., Meyer, M., Nägele, T., Hartl, I., Scheer, H., et al. (1995) Primary photosynthesis in reaction centers containing four different types of electron acceptors at site H_A, *Chem. Phys.*, **197**, 297-305, doi: 10.1016/0301-0104(95)00132-8.

ON THE MECHANISM OF SELECTIVE CHEMICAL EXCHANGE OF BACTERIOPHEOPHYTINS IN REACTION CENTERS OF *Rhodobacter sphaeroides* R-26

A. A. Zabelin*, V. B. Kovalev, and A. Ya. Shkuropatov

*Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research,
Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: zabelin.bio@gmail.com*

In order to elucidate the mechanism of site-selective chemical exchange of chromophores in reaction centers (RCs) of photosynthetic bacteria by external pigments, the efficiency of incorporation of plant pheophytin *a* (Pheo) into the binding sites of bacteriopheophytin *a* molecules (BPheo) in isolated *Rhodobacter sphaeroides* R-26 RCs was studied depending on the temperature of the incubation medium, the aggregation state of Pheo, and the presence of an organic solvent (acetone). The degree of selective replacement of photochemically inactive BPheo H_B molecules was ~15% upon incubation of the RC/Pheo mixture at 5 °C under conditions when Pheo was in a water–detergent incubation medium in the form of monomers in free detergent micelles. The exchange efficiency increased to 40% upon incubation at 25 °C and was about 100% at this temperature if 10% acetone was added to the incubation medium. The degree of pigment exchange was approximately twice as high at both temperatures when a mixture of Pheo monomers and dimers in the presence of 10% acetone was used as an incubation medium. The removal of acetone from such a medium with the preservation of pigment forms led to a significant decrease in the efficiency of Pheo incorporation. The effect of acetone on pigment exchange was also observed at an elevated incubation temperature (43.5 °C), when functionally active BPheo H_A molecules were partially replaced. The results are discussed in terms of the mechanism according to which (1) the temperature-dependent internal movements of the RC protein are a factor facilitating the release of the BPheo molecule from the binding site and the simultaneous insertion of the Pheo molecule into the same site in a coupled process, (2) the role of the temperature factor largely depends on the steric accessibility of binding protein pockets, (3) the incorporation of Pheo occurs from a pool of monomeric molecules included in the micelles RC–detergent, (4) the presence of acetone in the incubation medium facilitates the exchange of Pheo monomer molecules between micelles in solution and the detergent belt of the complex.

Keywords: reaction center, (bacterio)pheophytin, binding site, chemical exchange, detergent micelles, *Rhodobacter sphaeroides*

СЕЛЕКТИВНОЕ ВОЗБУЖДЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ СВЕТСОБИРАЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ LH2 *Allochrochromatium vinosum* ПРИВОДИТ К ОКИСЛЕНИЮ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА

© 2022 И.Б. Клена, З.К. Махнева, А.А. Москаленко, И.И. Проскуряков*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: pros@issp.serpukhov.su

Поступила в редакцию 15.06.2022

После доработки 13.07.2022

Принята к публикации 14.07.2022

Механизм процесса фотоокисления бактериохлорофилла светособирающих комплексов ряда пурпурных фототрофных бактерий при освещении в полосу поглощения каротиноидов в течение многих лет остается невыясненным. С использованием узкополосного лазерного излучения нами проведено измерение спектра действия этого процесса в спектральных диапазонах поглощения каротиноидов и бактериохлорофиллов. Показано, что фотоокисление бактериохлорофилла практически не происходит при возбуждении этих молекул, а при возбуждении каротиноидов – протекает с квантовым выходом около 0,0003. Столь низкое значение квантового выхода позволило предположить, что изучаемый процесс инициируется триплетными состояниями основных каротиноидов с длиной цепи сопряженных двойных связей $N = 11$. При взаимодействии с кислородом воздуха эти триплетные состояния вызывают, хотя и с низкой эффективностью, образование синглетно-возбужденного состояния кислорода, при взаимодействии с которым происходит окисление бактериохлорофилла. Триплетные состояния каротиноидов образуются в результате изученного ранее синглет-триплетного деления возбуждения. Полученные результаты указывают на необходимость пересмотра взглядов на функции каротиноидов светособирающих антенн пурпурных бактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериохлорофилл, каротиноиды, фотоокисление, спектр действия, квантовый выход, триплетные состояния, синглетный кислород, светособирающие комплексы, пурпурные серные бактерии.

DOI: 10.31857/S0320972522100086, EDN: BCGGDQ

ВВЕДЕНИЕ

По современным представлениям, две основные функции, выполняемые каротиноидами (Кар) в составе фотосинтезирующих организмов, – расширение спектрального диапазона поглощения солнечного света, используемого затем реакционными центрами, и защита от генерации химически активной формы кислорода – синглетно-возбужденного $^1\text{O}_2^*$, а также нейтрализация этого состояния, если синглетный кислород все же образовался. Защитная функция каротиноидов впервые экспериментально продемонстрирована в работе Griffiths et al. [1] по прекращению деления клеток и разрушению основного пигмента – бактериохлоро-

филла *a* (БХл) – в бескаротиноидных мутантах несерной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* в присутствии воздуха. Эти эффекты отсутствовали у клеток дикого типа, содержащих каротиноиды. В сопутствующем комментарии [2] было сделано предположение, что наблюдаемые явления вызваны генерацией синглетного кислорода за счет взаимодействия кислорода воздуха с триплетными состояниями БХл ($^3\text{БХл}$) и подавлением этого процесса по механизму тушения $^3\text{БХл}$ каротиноидами. За прошедшие почти 70 лет такой взгляд на защитную функцию каротиноидов стал общепринятым [3–5].

В противоречие с этими взглядами вступают результаты многолетних исследований реакции пурпурных фототрофных бактерий на освеще-

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл *a*; $^3\text{БХл}$ – триплетное состояние БХл; БХл850 – форма бактериохлорофилла *a* с максимумом поглощения при 850 нм; Кар – каротиноид; $^3\text{Кар}$ – триплетное состояние каротиноида; ССК – светособирающий комплекс; LH2 – периферийные светособирающие комплексы.

* Адресат для корреспонденции.

ние в полосу поглощения входящих в их состав каротиноидов. Наиболее ярко эти эффекты проявляются в случае серных бактерий. Так, было показано, что освещение клеток *Allochrochromatium vinosum* светом, возбуждающим Кар, приводит к более интенсивному выцветанию БХл, чем при возбуждении самого бактериохлорофилла [6]. Аналогичный эффект наблюдался при освещении изолированных светособирающих комплексов (ССК) ряда пурпурных бактерий [7]. В обоих случаях выцветает форма бактериохлорофилла с максимумом поглощения в районе 850 нм (БХл850), и фотовыцветание прекращается после удаления кислорода. В работе Махневой и соавт. [8] показано, что похожие спектральные изменения происходят в мембранах хромофоров и в изолированных периферийных светособирающих комплексах (LH2) при их окислении феррицианидом калия. При этом продукт окисления с максимумом поглощения в районе 700 нм был идентифицирован как 3-ацетил хлорофилл. В работах Махневой и соавт. [9, 10] было показано, что возбуждение внесенного в среду бенгальского розового, известного генератора $^1\text{O}_2^*$, вызывает в спектрах поглощения хромофоров и изолированных ССК ряда бактерий изменения, аналогичные наблюдаемым при возбуждении каротиноидов. Фотовыцветание БХл прекращалось при добавке тушителей синглетного кислорода. На основе всех перечисленных наблюдений был сделан парадоксальный вывод, что возбуждение каротиноидов ССК приводит к генерации синглетного кислорода. Затем в результате взаимодействия $^1\text{O}_2^*$ с БХл происходит окисление БХл850 с выцветанием полосы поглощения при 850 нм и образованием 3-ацетил хлорофилла. Таким образом, каротиноиды способны нести не защитную, а деструктивную функцию.

Механизм генерации $^1\text{O}_2^*$ при возбуждении каротиноидов остается неизвестным. Использованное в перечисленных выше работах широкополосное возбуждение Кар усложняет интерпретацию результатов и не позволяет провести корректную оценку квантового выхода фотоокисления БХл850. В данной работе с использованием узкополосного лазерного возбуждения мы провели оценку квантового выхода этого процесса и измерили спектр действия фотоокисления бактериохлорофилла LH2-комплексов *Alc. vinosum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение LH2-комплексов. Клетки *Allochrochromatium vinosum* strain MSU (ранее

Allochrochromatium minutissimum) из коллекции кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ выращивали в анаэробных условиях (фототрофно). Для получения хромофоров клетки разрушали ультразвуком (УЗДН-1, СССР) и проводили дифференциальное центрифугирование. Хромофору солибилизировали 2,0–2,5%-ным додецилмальтозидом, и светособирающие комплексы выделяли хроматографией на колонке Toyopearl DEAE-650S («Toyo Soda», Япония) в градиенте концентрации NaCl. Подробное описание процедуры приведено ранее [11]. Препарат LH2-комплексов приготавливали в количестве, достаточном для проведения всех экспериментов.

Фотоокисление LH2-комплексов в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5) проводили в 1 см спектрофотометрической кювете при оптической плотности около 1 в полосе поглощения 850 нм при интенсивном перемешивании. Использовали свет импульсной лазерной системы («Solar Laser Systems», Белоруссия), состоящей из лазера накачки LQ 529В и параметрического преобразователя LP 603. Система позволяет получать импульсы длительностью 6–8 нс в диапазоне длин волн $\lambda \geq 430$ нм с шириной полосы не более 1 нм; частота следования импульсов составляла 15 Гц. Энергия вспышки не превышала 0,15 мДж·см⁻² и была выбрана так, чтобы не вызывать насыщения процесса фотовыцветания БХл850 (рис. 1 в Приложении); ее регулировали с помощью нейтральных светофильтров. Среднюю мощность падающего на образец света измеряли термоэлектрической головкой 3А-Р-1-SH с устройством индикации NOVA II («Ophir», Израиль). Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 («Shimadzu», Япония). Для измерения каждой точки спектра действия фотовыцветания использовали свежую порцию ССК-комплексов. На результаты измерений при импульсном возбуждении может влиять эффект просветления образца во время вспышки. При этом образец поглощает меньше света, чем следует из его стационарного спектра поглощения. При использованных энергиях вспышки и концентрации ССК в образце возбуждалось не более 4% молекул БХл, поэтому данным эффектом мы пренебрегали. Квантовый выход фотоокисления определяли по формуле: $\phi_{\text{ок}} = N_{\text{БХл}}/N_{\text{фот}}$, где $N_{\text{БХл}}$ – число молекул БХл850, окисленных в результате 10-минутного освещения образца, а $N_{\text{фот}}$ – число поглощенных за то же время фотонов. Были также проведены измерения фотоокисления БХл850 при возбуждении добавленного красителя бенгальского розового. Краситель добавляли в количестве, дающем поглощение 1 опт. ед. в максимуме 560 нм. Процедура освеще-

ния образца была та же, что описана выше, при длительности освещения 10 мин.

Коэффициент экстинкции БХл850. Для определения числа молекул БХл850 в образце необходимо знать их коэффициент экстинкции ϵ_{850} в ССК. Поскольку литературные значения этого параметра значительно варьируют, мы провели его определение. Пигменты ЛН2-комплексов с известной оптической плотностью экстрагировали смесью ацетон/метанол = 7/2 (v/v) и определяли количество БХл в экстракте, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{770} = 76 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [12]. При подсчете коэффициента экстинкции БХл850 в ЛН2-комплексах было учтено то обстоятельство, что ССК содержит также бактериохлорофиллы, поглощающие при 800 нм, в соотношении 1 : 2 с БХл850 [13]. Полученное значение $\epsilon_{850} = 197 \pm 30 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ (среднее из 4 измерений) хорошо совпадает с величиной $184 \pm 13 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, приведенной в статье Clayton и Clayton [14] для БХл850 *Rhodospseudomonas sphaeroides*.

Количественный анализ каротиноидного состава ЛН2-комплексов проводили методом ВЭЖХ [15] на колонке Spherisorb ODS2, 5 мкм («Waters», США). Концентрацию каротиноидов рассчитывали, согласно полученным ранее коэффициентам экстинкции [16], а площадей полос поглощения в области 360–550 нм – с помощью программы LC-solution («Shimadzu»).

Измерения ЭПР высокого временного разрешения (ВР-ЭПР) проводили на модифицированном спектрометре РЭ1306 (СССР), как описано ранее [17] при $T = 120 \text{ К}$ и $\lambda_{\text{возб}} = 470$ и 850 нм. Для приготовления использовали ЛН2-комплексы с оптической плотностью около 50 в полосе 850 нм. Температуру понижали до $T = 120 \text{ К}$ с помощью криостата ESR900 («Oxford Instruments», Англия) для предотвращения деградации образца. Образцы в качестве криопротектора содержали 66% глицерина. Для возбуждения использовали ту же лазерную систему, которая описана выше; энергия вспышки была $\sim 1,5 \text{ мДж}$. В спектрометре ВР-ЭПР для регистрации сигнала используется стробоскопический (бокскар) интегратор SR250 («Stanford Research Systems», США). Бокскар-интегратор регистрирует сигнал ЭПР в коротком интервале времени, синхронно с возбуждающей вспышкой света. В работе применяли интервал регистрации 0,15–1 мкс после вспышки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке 1, линия 1 представлен спектр поглощения ЛН2-комплексов *Alc. vinosum* до

освещения. Данные о структуре ЛН2-комплексов этой бактерии пока что не получены, однако совпадение многих характеристик с изученными ССК [18, 19] позволяет с хорошей достоверностью предположить общие мотивы структурной организации пигментов. Поглощение в районе 800 нм и 850 нм – ИК-полосы по-разному пространственно организованных молекул БХл *a*. При 850 нм поглощают достаточно сильно экситонно взаимодействующие между собой бактериохлорофиллы, что вызывает значительное длинноволновое смещение полосы поглощения по сравнению с БХл *a* в растворе. Поглощение в районе 800 нм определяется слабо взаимодействующими БХл, сохраняющими в значительной степени свойства мономерных молекул [13]. Полоса при 590 нм принадлежит всем бактериохлорофиллам ССК. В районе 400–550 нм основное поглощение осуществляется каротиноидами, далее, в коротковолновой области поглощают снова БХл. На рис. 1, линия 2 приведен спектр того же образца после 10-минутного освещения лазерной вспышкой при $\lambda = 480 \text{ нм}$. Основные изменения сводятся к уменьшению поглощения в полосе БХл850. На врезке показан разностный спектр (2) – (1) в диапазоне 540–750 нм, на котором заметно также выцветание общей полосы БХл при 590 нм и появление полосы 3-ацетил хлорофилла – в районе 700 нм.

В данной работе мы сравнили квантовые выходы фотовыцветания БХл850 при возбуждении в полосы поглощения каротиноидов и бактериохлорофиллов. Результаты измерений представлены на рис. 2, из которого видно, что возбуждение Кар значительно более эффективно. Возбуждение БХл в полосы поглощения при 590 нм и в диапазоне 800–870 нм вызывает фотоокисление бактериохлорофилла лишь на уровне погрешности измерения. Квантовый выход процесса чрезвычайно низок даже при возбуждении Кар ($\phi_{\text{ок}}$ составляет $\sim 0,25 \times 10^{-3}$). Для сравнения мы определили квантовый выход фотоокисления БХл при возбуждении добавленного к ЛН2-комплексам красителя бенгальского розового, известного сенсбилизатора $^1\text{O}_2^*$ (квантовый выход синглетного кислорода в воде – 0,76 [20]). В этом случае также получено низкое значение квантового выхода фотоокисления – $\phi_{\text{ок}} = 0,27 \times 10^{-3}$ (рис. 2 в Приложении).

На рис. 3 приведены результаты измерения спектров ВР-ЭПР комплексов ЛН2 *Alc. vinosum* при возбуждении каротиноидов ($\lambda_{\text{возб}} = 470 \text{ нм}$) (рис. 3, линия 1) и бактериохлорофиллов (рис. 3, линия 3). Возбуждение в полосу поглощения Кар приводит к заселению

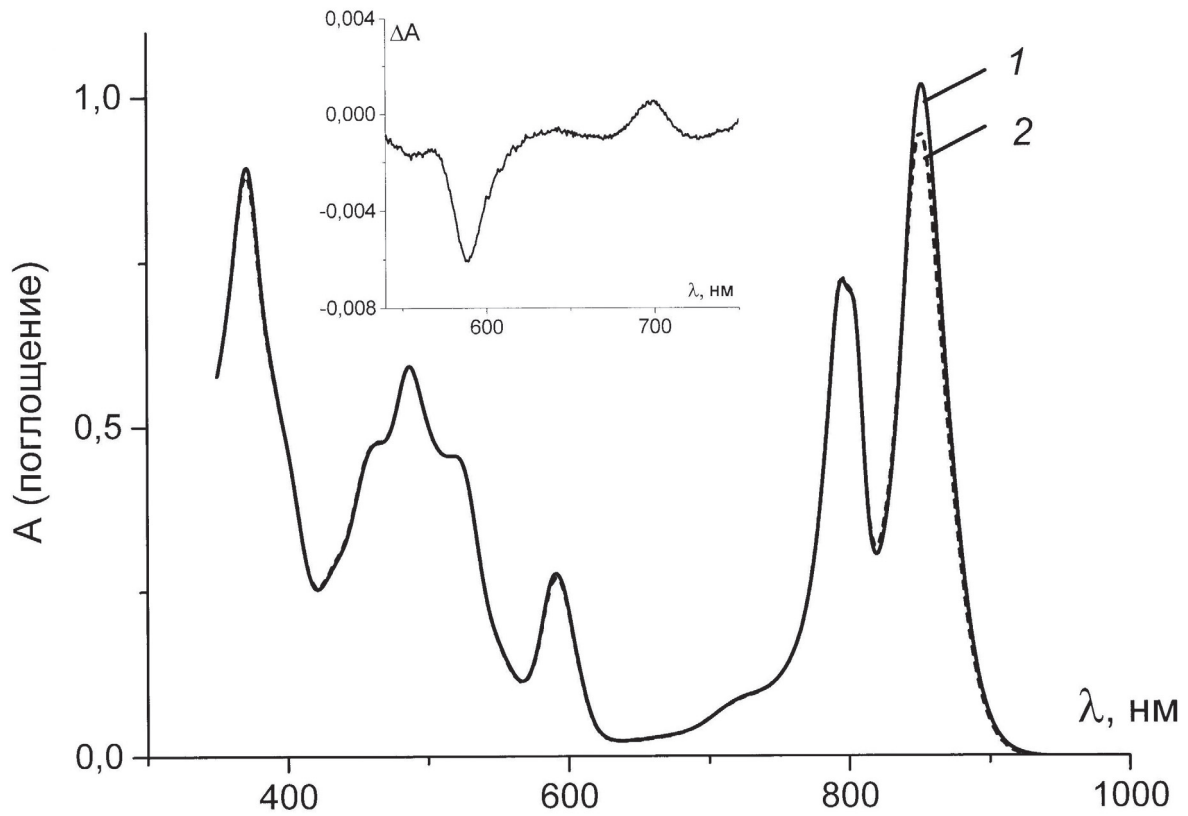


Рис. 1. Спектр поглощения светособирающих LH2-комплексов *Alc. vinosum* до освещения (1) и после 10-минутного освещения вспышками лазера при $\lambda = 480$ нм (2). На врезке – дифференциальный спектр (2) – (1)

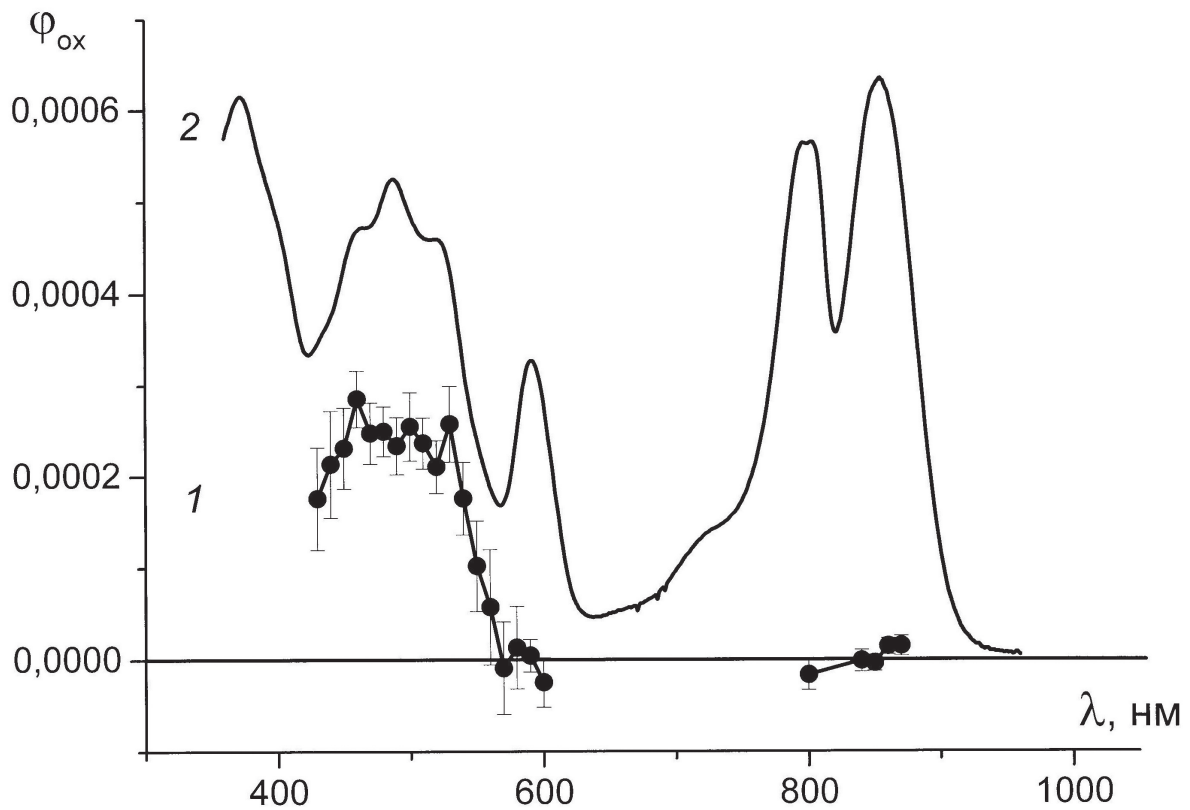


Рис. 2. Спектр действия (спектральная зависимость квантового выхода) фотоокисления БХл850 (1). Спектр (1 – Т) LH2-комплексов *Alc. vinosum* до освещения (2), Т – пропускание света. Погрешности измерений спектра действия (1) рассчитаны исходя из погрешностей измерения оптической плотности образца и энергии лазерной вспышки

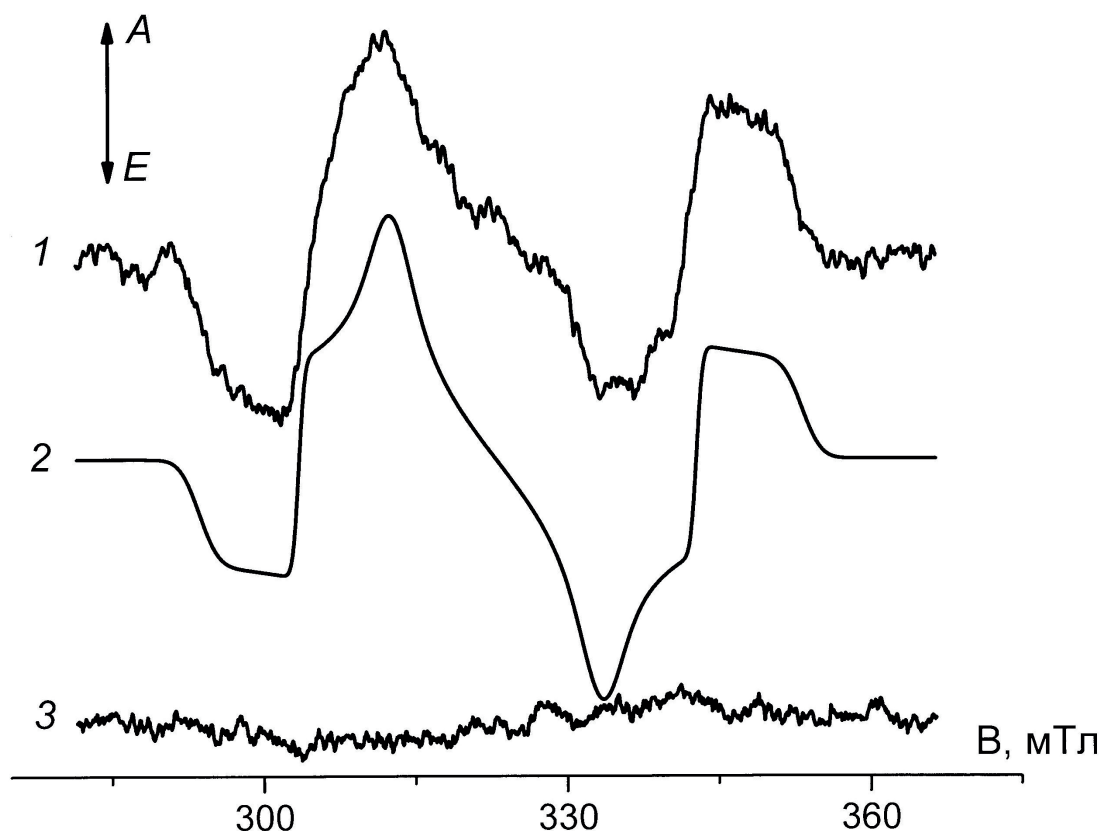


Рис. 3. Спектр ВР-ЭПР LH2-комплексов *Alc. vinosum*, измеренный в период 0,15–1 мкс при $\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм (1). Спектр ЭПР триплетного состояния, рассчитанный для параметров расщепления в нулевом поле каротиноида родопина ($N = 11$), $|D| = 0,0279 \text{ см}^{-1}$, $|E| = 0,0029 \text{ см}^{-1}$ и T_0 спиновой поляризации (2). Спектр ВР-ЭПР LH2-комплексов *Alc. vinosum*, измеренный в период 0,15–1 мкс при $\lambda_{\text{возб}} = 850$ нм (3). Все измерения проведены при $T = 120$ К. Стрелки в левом верхнем углу указывают направление поглощения (А) и излучения (Е) мощности СВЧ

триплетного состояния каротиноида с характерной картиной спиновой поляризации и параметрами расщепления в нулевом поле, соответствующими родопину ($|D| = 0,0279 \text{ см}^{-1}$, $|E| = 0,0029 \text{ см}^{-1}$, [21]) (рис. 3, линия 2). Расчет спектра ЭПР проведен в предположении селективной заселенности T_0 спинового подуровня триплета [22, 23]. Несоответствие экспериментального (1) и расчетного спектра (2) сводится в основном к различию амплитуд центральных пиков. Это различие вызвано быстрой анизотропной спин-решеточной релаксацией и подробно рассмотрено ранее [17]. Спектр при возбуждении бактериохлорофиллов (рис. 3, линия 3) слишком слабый для проведения подробного анализа, однако можно сделать предположение, что он принадлежит $^3\text{БХл}$, которые заселены за счет спин-орбитальной связи [22, 23].

Каротиноидный состав (таблица) того же препарата LH2-комплексов согласуется с результатами ЭПР. Преобладающим каротиноидом является родопин. Важно отметить, что каротиноиды с короткой системой сопряженных двойных связей не обнаружены.

Каротиноидный состав LH2-комплексов *Alc. vinosum*

Каротиноид	Мол %	N
Родопин	89,8	11
Ликопин	3,5	11
Ангидрородовибрин	3,2	12
Дидегидрородопин	2,4	12
Спириллоксантин	1,1	13

Примечание. Мол % – молярный процент каротиноида; N – число сопряженных двойных связей каротиноида.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В задачи настоящей работы входило изучение спектральной зависимости процесса фотоокисления БХл850 при возбуждении каротиноидов ССК, оценка квантового выхода этого процесса и использование полученной информации для выработки представлений о возможном механизме данного необычно-

го явления. Результаты работ Махневой и соавт. [9, 10] указывают на механизм с участием синглетно-возбужденного кислорода. В подтверждение этого вывода можно также привести наблюдение, что фотоокисление БХл850 сопровождается поглощением кислорода [10]. Фотофизическая генерация $^1\text{O}_2^*$ происходит по схеме $^3\text{O}_2 + ^3\text{D} \rightarrow ^1\text{O}_2^* + ^1\text{D}$ и требует участия триплетного состояния сенсibilизатора D, имеющего достаточную энергию. В растворе такими эффективными сенсibilизаторами являются хлорофиллы и бактериохлорофиллы [24]. Из рис. 2 видно, однако, что эффект фотоокисления БХл850 характеризуется высокой спектральной селективностью и происходит практически только при возбуждении каротиноидов. Отсюда представляется неизбежным парадоксальный вывод, что триплетным сенсibilизатором являются сами молекулы каротиноидов.

Известно, что фотофизические свойства Кар существенно зависят от числа сопряженных двойных связей (N) этих молекул [4, 25–27]. Энергия их синглетных возбужденных уровней и триплетных уровней повышается при уменьшении N . При определенных значениях N энергии триплетного состояния Кар становятся достаточно для заселения состояния $^1\text{O}_2^*$. В работах Foote et al. [28, 29] оценка относительных энергий $^3\text{Кар}$ и синглетного кислорода проведена путем изучения зависимости константы скорости тушения каротиноидами синглетно-возбужденного состояния O_2 от значения N . Оказалось, что при $N \leq 10$ происходит экспоненциальное падение константы скорости тушения синглетного кислорода каротиноидами. Это означает, что уровень триплетного состояния таких каротиноидов оказывается выше уровня $^1\text{O}_2^*$, и обратный процесс возбуждения кислорода в синглетное состояние при взаимодействии с $^3\text{Кар}$ становится энергетически возможным. При $N \geq 11$ тушение синглетного кислорода идет практически с диффузионной константой скорости.

Анализ каротиноидного состава LH2-комплексов показывает (таблица), что каротиноиды с короткой системой сопряженных двойных связей ($N \leq 10$) в этих комплексах не детектируются. Этот факт привел к выработке представления, что в ССК образование $^1\text{O}_2^*$ при взаимодействии с $^3\text{Кар}$ невозможно. Полученное в данной работе низкое значение квантового выхода фотоокисления БХл позволяет предположить, что такой процесс генерации $^1\text{O}_2^*$ идет при возбуждении каротиноидов, хотя и с низкой эффективностью.

Триплетные состояния Кар при этом образуются в процессе синглет-триплетного деления возбуждения: $^1\text{Кар}^* + \text{Кар} \rightarrow ^3\text{Кар} + ^3\text{Кар}$. Этот процесс разрешен по спину и достаточно хорошо известен в области исследования фотофизики органических соединений [30, 31]. Ранее он был описан в случае ССК *Alc. vinosum* в работах Клевиной и соавт. [17, 32]. Форма спектра ЭПР, приведенная на рис. 3, линия 1, подтверждает функционирование этого механизма при заселении наблюдаемых триплетных состояний. Заселение $^3\text{Кар}$ в результате деления возбуждения происходит чрезвычайно быстро, в пико- и субпикосекундном временном диапазоне [33]. Квантовый выход триплетов каротиноидов ССК *Alc. vinosum* не определялся. Для другой пурпурной бактерии (*Rhodospirillum rubrum*) для квантового выхода была получена достаточно высокая оценка (0,32) [34].

Учитывая низкий квантовый выход фотоокисления Бхл850 (рис. 2), нельзя полностью исключить возможность участия в этом процессе небольшой примеси Кар с $N \leq 10$, присутствующих в количестве ниже порога детектирования. Необходимо, однако, отметить, что в этом случае следует ожидать влияния таких каротиноидов на измеренный спектр действия (рис. 2, линия 1). В работе Niedzwiedzki et al. [27] приведены данные о спектрах поглощения каротиноидов с различным числом двойных связей (N) в ацетоне. При изменении N от 9 до 13 положение пика поглощения Кар смещается на 60 нм – от 470 до 530 нм. Похожее изменение можно ожидать и для каротиноидов в составе ССК. Это привело бы к заметному отклонению спектра действия от спектра 1 – Т, определяемому основными каротиноидами LH2-комплексов. Поскольку такое отклонение не наблюдается, участие Кар с короткой системой сопряженных двойных связей в генерации $^1\text{O}_2^*$ представляется маловероятным.

Возбуждение в длинноволновые полосы поглощения бактериохлорофиллов при 800 и 850 нм не вызывает практически никакого фотоокисления БХл850 (рис. 2). Это связано, с одной стороны, с эффективным тушением триплетов бактериохлорофилла каротиноидами. С другой стороны, квантовый выход $^3\text{БХл}$ в светособирающих комплексах вообще невысокий. Так, в работе Monger et al. [35] этот квантовый выход определен как 0,02, причем появление одной триплетной молекулы БХл вызывает резкое тушение возбуждения ССК. Низкая амплитуда сигнала ЭПР при возбуждении БХл (рис. 3, линия 3) согласуется с этими данными.

При возбуждении добавленного к ССК бенгальского розового, известного эффективного генератора синглетного кислорода, квантовый выход окисления БХл850 также оказался низким (рис. 2 в Приложении). Частично это связано с тем обстоятельством, что, в отличие от возбуждения каротиноидов, входящих в состав ССК, возбуждение бенгальского розового приводит к генерации $^1\text{O}_2^*$ во всем объеме растворителя. При этом, учитывая короткое время жизни синглетного кислорода (2 мкс в воде [36]), вероятность контакта и реакции с бактериохлорофиллом ССК будет заметно понижена. Снижение квантового выхода фотоокисления бактериохлорофиллов может быть также связано с тушением $^1\text{O}_2^*$ самими бактериохлорофиллами, как отмечено в статье Krasnovsky [24].

Необходимо отметить, что полученные значения квантовых выходов фотоокисления БХл850 являются приблизительными. Зависимость уменьшения поглощения экситонно-связанных пигментов БХл850 от числа окисленных молекул БХл может иметь достаточно сложный характер и в данной работе не исследовалась. Такой расчет проведен в работе Leiger et al. [37] в случае серной пурпурной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*. Основываясь на результатах этой работы, можно оценить, что в условиях наших экспериментов фотоокисление претерпевает приблизительно одна молекула БХл в LH2-комплексе. Учет экситонного взаимодействия БХл в любом случае не вызовет принципиальных изменений в оценке квантового выхода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные еще раз заставляют задуматься о роли каротиноидов ССК пурпурных бактерий. Рассмотрим эту проблему на примере каротиноидов *Alc. vinosum*. Принято считать, что к основным функциям Кар относятся: 1) поглощение света и передача энергии на молекулы БХл; 2) защита биологических структур от активных форм кислорода, в частности, предотвращение генерации $^1\text{O}_2^*$ путем тушения триплетов БХл; 3) возможная роль в стабилизации структуры ССК, в состав которых они входят. В случае ССК *Alc. vinosum* эффективность передачи поглощенной Кар энергии на БХл невысокая: около 0,36 [18]. Низкое значение этого параметра не в последнюю очередь связа-

но с быстрым и достаточно эффективным синглет-триплетным делением возбуждения [34]. Вторая функция – тушение $^3\text{БХл}$ – также не представляется жизненно важной вследствие низкого квантового выхода триплетов бактериохлорофилла в экситонно-связанных кольцевых структурах [35]. С этим выводом согласуются результаты работ Торопыгиной и соавт. [7] и Махневой и соавт. [9, 10], в которых показано, что фотовыцветание БХл850 слабо зависит от присутствия каротиноидов в ССК. К тому же *Alc. vinosum* обитают в анаэробных условиях, хотя нельзя исключить их периодическое попадание в аэробные условия. Таким образом, на первый план выходит третья, структурная функция молекул каротиноидов в светособирающих комплексах. Подтверждение этого вывода требует дальнейших исследований.

Биологический смысл синглет-триплетного деления возбуждения каротиноидов ССК остается непонятным. Этот процесс существенно понижает эффективность переноса энергии на бактериохлорофиллы. В настоящее время единственным объяснением этой функции Кар может быть рассеяние избытка энергии в условиях высокой интенсивности света. В анаэробных условиях заселение $^3\text{Кар}$ не будет приводить к деструктивным последствиям.

Вклад авторов. И.И. Проскуряков, А.А. Москаленко – концепция и руководство работой; З.К. Махнева, И.Б. Кленина, И.И. Проскуряков – проведение экспериментов; А.А. Москаленко – обсуждение результатов исследования; И.И. Проскуряков, И.Б. Кленина – написание текста; З.К. Махнева, А.А. Москаленко – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта № 121040200027-1 Минобрнауки.

Благодарности. Авторы благодарят М.А. Большакова за приготовление LH2-комплексов *Allochrochromatium vinosum* и В.В. Терентьева за предоставленную возможность измерений на спектрофотометре Shimadzu.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Griffiths, M., Sistrom, W. R., Cohen-Bazire, G., and Stanier, R. Y. (1955) Function of carotenoids in photosynthesis, *Nature*, **176**, 1211-1214, doi: 10.1038/1761211a0.
- Calvin, M. (1955) *Nature*, **176**, 1215, doi: 10.1038/1761215a0.
- Krinsky, N. I. (1979) Carotenoid protection against oxidation, *Pure Appl. Chem.*, **51**, 649-660, doi: 10.1351/pac197951030649.
- Frank, H. A., and Cogdell, R. J. (1993) The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis, Chapt. 8, in *Carotenoids in Photosynthesis* (Young, A. J. and Britton, G., eds) Springer, Dordrecht, pp. 252-326, doi: 10.1007/978-94-011-2124-8_8.
- Telfer A., Pascal, A., and Gall, A. (2008) Carotenoids in Photosynthesis, Chapt. 10, in *Carotenoids, Vol. 4: Natural Functions* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., eds) Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 265-308, doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0_14.
- Махнева З. К., Ерохин Ю. Е., Москаленко А. А. (2007) Фотосенсибилизированное каротиноидами окисление димеров бактериохлорофилла светособирающих комплексов В800-850 в клетках *Allochro-matium minutissimum*, *Докл. Акад. Наук*, **416**, 408-411.
- Торопыгина О. А., Махнева З. К., Москаленко А. А. (2003) Кластерам бактериохлорофилла не требуются каротиноиды для защиты от фотоокисления в светособирающих комплексах фотосинтезирующих бактериях, *Докл. Акад. Наук*, **391**, 828-831.
- Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2016) Образование 3-ацетил-хлорофилла в светособирающих комплексах пурпурных бактерий при химическом окислении, *Биохимия*, **81**, 282-294.
- Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2019) Защита БХл850 от действия синглетного кислорода в мембранах серной фотосинтезирующей бактерии *Allochro-matium vinosum* с помощью тушителей, *Микробиология*, **88**, 91-99, doi: 10.1134/S0026365619010129.
- Makhneva, Z. K., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2021) Carotenoids do not protect bacteriochlorophylls in isolated light-harvesting LH2 complexes of photosynthetic bacteria from destructive interactions with singlet oxygen, *Molecules*, **26**, 5120, doi: 10.3390/molecules26175120.
- Большаков М. А., Ашихмин А. А., Махнева З. К., Москаленко А. А. (2016) Влияние интенсивности освещения и ингибирования биосинтеза каротиноидов на сборку периферийных светособирающих комплексов пурпурной серной бактерии *Allochro-matium vinosum* ATCC 17899, *Микробиология*, **85**, 403-414, doi: 10.7868/S0026365616040029.
- Clayton, R. K. (1966) Spectroscopic analysis of bacteriochlorophylls *in vitro* and *in vivo*, *Photochem. Photobiol.*, **5**, 669-677, doi: 10.1111/j.1751-1097.1966.tb05813.x.
- Cogdell, R. J., Gall, A., and Köhler, J. (2006) The architecture and function of the light harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to *in vivo* membranes, *Quart. Rev. Biophys.*, **39**, 227-324, doi: 10.1017/S0033583506004434.
- Clayton, R. K., and Clayton, B. J. (1981) B850 pigment-protein complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: extinction coefficients, circular dichroism, and the reversible binding of bacteriochlorophyll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5583-5587, doi: 10.1073/pnas.78.9.5583.
- Ashikhmin, A., Makhneva, Z., and Moskalenko, A. (2014) The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis, *Photosynth. Res.*, **119**, 291-303, doi: 10.1007/s11120-013-9947-6.
- Gall, A., Henry, S., Takaichi, S., Robert, B., and Cogdell, R. J. (2005) Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions, *Photosynth. Res.*, **86**, 25-35, doi: 10.1007/s11120-005-3481-0.
- Кленина И. Б., Махнева З. К., Москаленко А. А., Кузьмин А. Н., Проскураков И. И. (2013) Синглет-триплетное деление возбуждения в светособирающих комплексах пурпурных фотосинтезирующих бактерий и в изолированных каротиноидах, *Биофизика*, **58**, 54-63.
- Niedzwiedzki, D. M., Bina, D., Picken, N., Honkanen, S., Blankenship, R. E., et al. (2012) Spectroscopic studies of two spectral variants of light-harvesting complex 2 (LH2) from the photosynthetic purple sulfur bacterium *Allochro-matium vinosum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1576-1587, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.05.009.
- Löhner, A., Carey, A. M., Hacking, K., Picken, N., Kelly, S., et al. (2015) The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochro-matium vinosum*, *Photosynth. Res.*, **123**, 23-31, doi: 10.1007/s11120-014-0036-2.
- Kochevar, I. E., and Redmond, R. W. (2000) Photosensitized production of singlet oxygen, *Methods Enzymol.*, **319**, 20-28, doi: 10.1016/s0076-6879(00)19004-4.
- Frank, H. A., Chadwick, B. W., Oh, J. J., Gust, D., Moore, T. A., et al. (1987) Triplet-triplet energy transfer in B800-850 light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria and synthetic carotenoporphyrin molecules investigated by electron spin resonance, *Biochim. Biophys. Acta*, **892**, 253-263, doi: 10.1016/0005-2728(87)90229-5.
- Budil, D. E., and Thurnauer, M. C. (1991) The chlorophyll triplet state as a probe of structure and function in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1057**, 1-41, doi: 10.1016/S0005-2728(05)80081-7.

23. Angerhofer, A. (1991) Chlorophyll triplets and radical pairs, Chapt. 4.8, in *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 945-991.
24. Krasnovsky, A. A., Jr. (1994) Singlet molecular oxygen and primary mechanisms of photo-oxidative damage of chloroplasts. Studies based on detection of oxygen and pigment phosphorescence, *Proc. R. Soc. Edinburgh*, **102B**, 219-235, doi: 10.1017/S0269727000014147.
25. Christensen, R. L. (1999) The electronic states of carotenoids, Chapt. 8, in *The Photochemistry of Carotenoids, Advances in Photosynthesis, vol. 10* (Frank, H. A., Young, A. J., Britton, G., and Cogdell, R. J., eds) Kluwer Acad. Publ., N.Y., pp. 137-159.
26. Angerhofer, F., Bornhäuser, F., Gall, A., and Cogdell, R. J. (1995) Optical and optically detected magnetic resonance investigation on purple photosynthetic bacterial antenna complexes, *Chem. Phys.*, **194**, 259-274, doi: 10.1016/0301-0104(95)00022-G.
27. Niedzwiedzki, D., Kosciulecki, J. F., Cong, H., Sullivan, J. O., Gibson, G. N., et al. (2007) Ultrafast dynamics and excited state spectra of open-chain carotenoids at room and low temperatures, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 5984-5998, doi: 10.1021/jp070500f.
28. Foote, C. S., Chang, Y. C., and Denny, R. W. (1970) Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5216-5218, doi: 10.1021/ja00720a036.
29. Foote, C. S. (1979) Quenching of singlet oxygen, Chapt. 5, in *Singlet Oxygen. Organic Chemistry, vol. 40* (Wasserman, H. H., and Murray, R. W., eds) Academic Press, N.Y., pp. 139-171.
30. Smith, M. B., and Michl, J. (2010) Singlet fission, *Chem. Rev.*, **110**, 6891-6936, doi: 10.1021/cr1002613.
31. Smith, M. B., and Michl, J. (2013) Recent advances in singlet fission, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **64**, 361-386, doi: 10.1146/annurev-physchem-040412-110130.
32. Кленина И. Б., Махнева З. К., Москаленко А. А., Гудков Н. Д., Большаков М. А., и др. (2014), Синглет-триплетное деление возбуждения каротиноидов светособирающих комплексов LH2 пурпурных фототрофных бактерий, *Биохимия*, **79**, 310-317.
33. Gradinaru, C. C., Kennis, J. T. M., Papagiannakis, E., van Stokkum, I. H. M., Cogdell, R. J., et al. (2001) An unusual pathway of excitation energy deactivation in carotenoids: Singlet-to-triplet conversion on an ultrafast timescale in a photosynthetic antenna, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2364-2369, doi: 10.1073/pnas.051501298.
34. Rademaker, H., Hoff, A. J., van Grondelle, R., and Duysens, L. N. M. (1980) Carotenoid triplet yields in normal and deuterated *Rhodospirillum rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **592**, 240-257, doi: 10.1016/0005-2728(80)90185-1.
35. Monger, T. G., Cogdell, R. J., and Parson, W. W. (1976) Triplet states of bacteriochlorophyll and carotenoids in chromatophores of photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 136-153, doi: 10.1016/0005-2728(76)90013-X.
36. Kearns, D. R. (1979) Solvent and solvent isotope effects on the lifetime of singlet oxygen, Chapt. 4, in *Singlet Oxygen. Organic Chemistry, vol. 40* (Wasserman, H. H., Murray, R. W., eds) Academic Press, N.Y., pp. 115-137.
37. Leiger, K., Linnanto, J. M., Rätsep, M., Timpmann, K., Ashikhmin, A. A., et al. (2019) Controlling photosynthetic excitons by selective pigment photooxidation, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 29-38, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b08083.

SELECTIVE EXCITATION OF CAROTENOIDS OF THE *Allochromatium vinosum* LIGHT-HARVESTING LH2 COMPLEXES LEADS TO THE OXIDATION OF BACTERIOCHLOROPHYLL

I. B. Klenina, Z. K. Makhneva, A. A. Moskalenko, and I. I. Proskuryakov*

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: pros@issp.serpukhov.su*

The mechanism of bacteriochlorophyll photooxidation in light-harvesting complexes of a number of purple photosynthetic bacteria when the complexes are excited into the carotenoid absorption bands remains unclear for many years. Here, using narrow-band laser illumination we measured the action spectrum of this process for the spectral ranges of carotenoid and bacteriochlorophyll. It is shown that bacteriochlorophyll excitation results in almost no photooxidation of these molecules, while at carotenoid excitation it proceeds with a quantum yield of about 0.0003. The low value of the yield enabled an assumption that the studied process is initiated by the triplet states of the main carotenoids of the complexes with the number of conjugated double-bond chain length of $N = 11$. Interacting with oxygen, these states promote formation, though with low efficiency, of the singlet-excited oxygen, which oxidizes bacteriochlorophylls. The carotenoid triplet states are populated in the process of the earlier studied singlet-triplet fission. The obtained results point at the necessity of reconsidering the functions of carotenoids in the light-harvesting complexes of purple bacteria.

Keywords: bacteriochlorophyll *a*, carotenoids, photooxidation, action spectrum, quantum yield, triplet states, singlet oxygen, light-harvesting complexes, purple sulfur bacteria

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ ДИПИРИДАМОЛА НА ЭНЕРГИЗАЦИЮ МЕМБРАН И ПРОЦЕССЫ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ В ХРОМАТОФОРАХ *Rba. sphaeroides*

© 2022 П.П. Нокс^{1*}, Е.П. Лукашев¹, Б.Н. Корватовский¹, Н.Х. Сейфуллина¹, С.Н. Горячев¹, Э.С. Аллахвердиев², В.З. Пашенко¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия, электронная почта: knox@biophys.msu.ru

² Российский национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, 121552 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.06.2022

После доработки 24.08.2022

Принята к публикации 24.08.2022

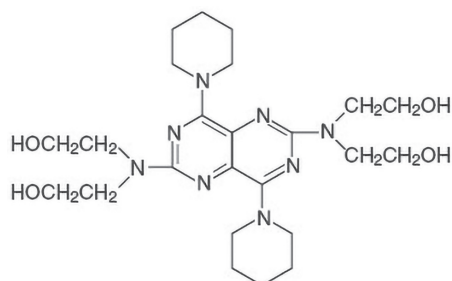
Исследовано влияние дипиридамола (ДИП) в концентрациях до 1 мМ на флуоресцентные характеристики светособирающих (LH2 и LH1) комплексов и на состояние фотосинтетической электрон-транспортной цепи в хроматофорах бактерий *Rhodobacter sphaeroides*. ДИП оказывает воздействие на эффективность переноса энергии от светособирающего комплекса LH2 к core-комплексу LH1 – реакционный центр и приводит к появлению длинноволнового («красного») сдвига полосы поглощения молекул светособирающего бактериохлорофилла в ИК-области спектра при 840–900 нм. Данный сдвиг связан с образованием энергизованного состояния мембраны. Показано, что ДИП способен восстанавливать фотоокисленный бактериохлорофилл реакционного центра. Это приводит к увеличению потока электронов по электрон-транспортной цепи и генерации трансмембранного потенциала на мембране хроматофора. Полученные результаты важны при анализе возможных механизмов влияния ДИП на активность мембранных функциональных белков. В частности, они могут иметь значение для интерпретации многочисленных терапевтических эффектов ДИП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроматофоры, энергизация мембран, миграция энергии, дипиридамола.

DOI: 10.31857/S0320972522100098, EDN: BCGSCN

ВВЕДЕНИЕ

Дипиридамола (ДИП) представляет собой модифицированный пурин-(2,6-бис(диэтиламино)-4,8-дипиридинопиридино(5,4-d)пиридин). Структурная формула молекулы показана ниже.



Этот препарат широко используется в медицине в качестве коронарного вазодилатора и антитромботического средства, тормозя агрегацию тромбоцитов. Предполагаемым механизмом его антитромботической активности является ингибирование активации тромбоцитов, ведущей к изменению их формы, что является начальным этапом их агрегации. Этот процесс осуществляется в результате воздействия ДИП на фосфодиэстеразу, регулирующую активационный путь передачи сигналов циклическими нуклеотидами (сGMP и сAMP) [1]. ДИП также служит эффективным ингибитором трансмембранного белка P-gp – АТФ-зависимой «помпы» липофильных соединений, выкачивающей из раковой клетки противоопухолевые лекарственные соедине-

Принятые сокращения: Бхл – бактериохлорофилл; ДИП – дипиридамола; ТМФД-Н₂ – восстановленный аскорбатом натрия N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин; LH2, LH1 – светособирающие комплексы; P – фотоактивный бактериохлорофилл; Q_A – первичный хинонный акцептор; Q_B – вторичный хинонный акцептор; RC – реакционный центр.

* Адресат для корреспонденции.

ния [2, 3]. Высказывались предположения, что ингибирование функции этого мембранного транспортёра может быть обусловлено прямым ингибированием мест связывания переносимых субстратов или нарушением сопряжённого процесса связывания и гидролиза АТФ [4]. ДИП способствует и множеству других биологических активностей, включая противовоспалительную, антиоксидантную и противовирусную. В связи с широким спектром фармакологической активности ДИП (сосудорасширяющей, антитромботической, противовоспалительной, антиоксидантной) существуют теоретические предпосылки к его применению в лечении пациентов с COVID-19 в качестве терапевтического средства. COVID-19 начинается как респираторная инфекция, но может сопровождаться состоянием гиперкоагуляции, тяжёлым воспалением из-за чрезмерного производства цитокинов и потенциально значительным окислительным стрессом [5, 6]. Однако, несмотря на длительное использование дипиридамола в медицине, детальные механизмы его многочисленных терапевтических эффектов до сих пор остаются неясными.

В наших предыдущих работах для изучения возможных механизмов взаимодействия ДИП с биологическими структурами мы исследовали влияние дипиридамола и его различных производных на процессы фотоиндуцированного переноса электронов и протонов в бактериальных фотосинтетических реакционных центрах (RC) пурпурных бактерий и в пурпурных мембранах галобактерий, содержащих бактериородопсин [7–9]. В этих исследованиях трансмембранные фоточувствительные белковые комплексы были использованы в качестве удобных информативных тест-систем для изучения молекулярных механизмов влияния ДИП на мембранные белки. Было показано, что в препаратах RC, изолированных из мембран *Rhodobacter sphaeroides*, ДИП вызывает ускорение темновой рекомбинации между фотоокисленным димером бактериохлорофилла (Бхл) P^+ и восстановленным первичным хинонным акцептором Q_A^- . В мембранах хроматофоров этих бактерий дипиридамола замедляет скорость образования полностью восстановленного вторичного хинонного акцептора — гидрохинона Q_BH_2 , переносящего восстановительные эквиваленты из белка RC в фотосинтетическую мембрану. Его влияние на фотоцикл бактериородопсина проявлялось в замедлении скорости распада M-интермедиа, сопряжённого с репротонированием основания Шиффа.

Как уже отмечено выше, ДИП также обладает антиоксидантными свойствами, ингибируя, в частности, перекисное окисление липидов за счёт способности к одно- и двух-электронному окислению [10–12]. Предположения о том, что терапевтические эффекты данного химического соединения могли бы быть связаны с его антиоксидантной способностью, высказаны, в частности, в работах Iuliano et al. [10] и Barzegar [13]. Влияние антиоксидантных агентов на белок P-gp было показано на примере ряда флавоноидов [14]. В работах Knox et al. [15, 16] мы показали возможность генерации катион-радикала ДИП как при его взаимодействии с изолированными белково-пигментными комплексами RC *Rba. sphaeroides*, так и с мембранами хроматофоров этих бактерий. Также в работе Knox et al. [16] мы высказали предположение о том, что вероятные электрон-донорные свойства ДИП являются предпосылкой для возможности генерации энергизованного состояния сопрягающих мембран.

Очевидно, что представляется актуальным дальнейшее детальное изучение влияния ДИП на состояние функциональных биологических мембран, на взаимодействия их интегральных компонентов. Целью данной работы явилось исследование эффектов ДИП на миграцию энергии от светособирающих белково-пигментных комплексов к фотосинтетическому RC бактерий *Rba. sphaeroides* и его электрон-донорных характеристик с использованием, в том числе, флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии высокого временного разрешения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фотосинтетические мембраны хроматофоров из пурпурных несерных бактерий *Rba. sphaeroides* дикого типа выделяли из предварительно отмытых натрий-фосфатным буфером (100 мМ, pH 7,5) свежих клеток 5–6-дневной культуры. После ультразвуковой дезинтеграции клеток неразрушенные клетки и крупные частицы отделяли центрифугированием при 40 000 g в течение 15 мин, хроматофоры получали центрифугированием надосадочной жидкости при 144 000 g в течение 120 мин. Хроматофоры суспендировали в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,5. Перед измерениями их разводили буфером до концентрации, соответствующей ~10 мкМ фотоактивного пигмента. Препараты обладают хорошей фотоиндуцированной электрон-транспортной активностью, хотя исходная циклическая скорость переноса электрона

в них невысокая. Последнее, очевидно, связано со значительной потерей водорастворимых подвижных переносчиков электрона – молекул цитохрома c_2 .

Ввиду слабой растворимости ДИП в воде, которая существенно увеличивается в кислой области, рН «сток-раствора» ДИП в концентрации 20 мМ мы понижали до 4,5. Однако, поскольку буферная ёмкость раствора была достаточно высокой, то даже при максимальной концентрации ДИП 1 мМ, полученной при добавлении 50 мкл ДИП к 950 мкл хроматофоров, значение рН в образце практически не менялось.

В качестве экзогенного донора электронов использовали водный раствор ТМФД (N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин, «Sigma», США) в концентрации от 1 мкМ до 1 мМ с аскорбатом натрия («Sigma»), который добавляли в концентрации на порядок выше концентрации ТМФД.

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра Hitachi-557 («Hitachi Ltd.», Япония), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Fluorolog 3 («Horiba Jobin Yvon», Япония) с высокочувствительным в ИК-диапазоне охлаждаемым фотоумножителем Hamamatsu-5509 («Hamamatsu Photonics», Япония). Возбуждение флуоресценции осуществляли в полосе Соре поглощения порфириновых пигментов при 400 нм. Кинетики затухания флуоресценции измеряли методом счёта фотонов на длине волны 880 нм в режиме коррелированного счёта одиночных фотонов (TCSPC). Гибридный фотодетектор НРМ-100-07 («Becker&Nickl», Германия) обеспечивал аппаратную функцию системы регистрации около 16 пс. В качестве источника возбуждающего света использовали фемтосекундную лазерную систему «Тема-150» («Авеста-Проект», Россия), которая генерировала импульсы света с длиной волны излучения 400 нм, длительностью 300 фс и частотой повторения 80 МГц (средняя мощность излучения составляла 2,8 Вт, энергия отдельного лазерного импульса была равна 34 нДж). В экспериментах энергию возбуждающих импульсов света уменьшали с помощью нейтральных светофильтров до уровня, определяемого чувствительностью системы регистрации, при этом средняя плотность мощности излучения составляла $3 \cdot 10^{-4}$ Вт/см². Кинетики флуоресценции аппроксимировали в двухэкспоненциальном приближении.

Фотоиндуцированные изменения поглощения в области 740–920 нм при стационарном освещении регистрировали с шагом 10 нм на однолучевом дифференциальном спектрофо-

тометре с механической модуляцией света. Образец освещался в течение 5 с красным светом ($\lambda > 620$ нм). Для построения по точкам разностного спектра поглощения типа «свет-минус-темнота» была использована программа Origin 8.1 («OriginLab», США) с функцией сглаживания «spline».

Изменения поглощения на одиночную вспышку (532 нм, длительность 7 нс, энергия импульса 10 мДж, YAG-Nd лазер LS-2131M («LOTIS ТП», Беларусь)) регистрировали на установке флеш-фотолиза с двойной монохроматизацией измеряющего света. С целью улучшения отношения сигнал/шум с помощью аналого-цифрового преобразователя OctopusCompuScope 8327 («GaGe», Канада) обычно проводили накопление от 50 до 100 одиночных сигналов. Для мультиэкспоненциальной аппроксимации кинетических кривых использовали программу Origin 8.1.

Все измерения повторяли минимум три раза, а результаты усредняли. Приводятся средние значения и стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фотосинтетический аппарат пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* содержит светособирающие комплексы двух типов – LH1 и LH2, комплексы реакционного центра цитохрома bc_1 и АТФ-синтетазы [17]. В мембране RC и LH1 образуют комплекс LH1–RC, в котором каждый RC окружён кольцевой белковой структурой LH1, содержащей 32 связанных молекулы Бхл. Q_y полоса поглощения LH1 имеет максимум при 875 нм, максимум спектра флуоресценции этого комплекса находится при 885 нм. В отличие от LH1, в состав комплекса LH2 входят два спектрально различных типа молекул Бхл. Коротковолновую форму антенны образуют 9 молекул Бхл, поглощающих при 800 нм, остальные 18 молекул Бхл формируют более тесно связанную структуру, поглощающую при 850 нм. При возбуждении энергия от кольцевого комплекса Бхл 800 очень быстро переносится к кольцу комплекса Бхл 850, который способен флуоресцировать. Максимум спектра флуоресценции Бхл 850 находится при 860 нм [18].

Кинетика затухания флуоресценции хроматофоров, выделенных из клеток *Rba. sphaeroides*, выращенных в стандартных условиях, содержит, как правило, 3 компонента длительностью примерно 100 пс, 200–300 пс и 700–1000 пс [19, 20]. Авторы полагают, что быстрый компонент длительностью ~100 пс связан с захватом возбуждения от LH1, второй – либо

с миграцией энергии от LH2 к LH1, либо с рекомбинацией зарядов P^+H^- (P – фотоактивный димер Бхл, H – бактериофеофитин). Третий долгоживущий компонент относится к длительности флуоресценции не связанных с LH1 комплексов LH2. Отметим, что энергетическая связанность комплексов LH2 с LH1 определяет как длительность флуоресценции LH2, так и заселённость LH1-комплексов [21]. Подробный анализ кинетик затухания флуоресценции данных хромофоров приведён нами в работе Strakhovskaya et al. [22].

В спектрах поглощения контрольных образцов хромофоров *Rba. sphaeroides* и в при-

сутствии ДИП (0,25, 0,5 и 1 мМ) заметных различий обнаружено не было. Вместе с тем влияние ДИП проявляется в флуоресцентных характеристиках хромофоров. В контрольных образцах (рис. 1) основной максимум (~890 нм) обусловлен флуоресценцией комплекса LH1, который является акцептором энергии, поглощённой светособирающими пигментами LH2-комплекса хромофоров. Хорошо различимое плечо при ~855 нм является вкладом последнего в спектр испускаемой флуоресценции. На рис. 1 представлены спектры флуоресценции хромофоров и результаты их разложения на две гауссовы составляющие с максимумами

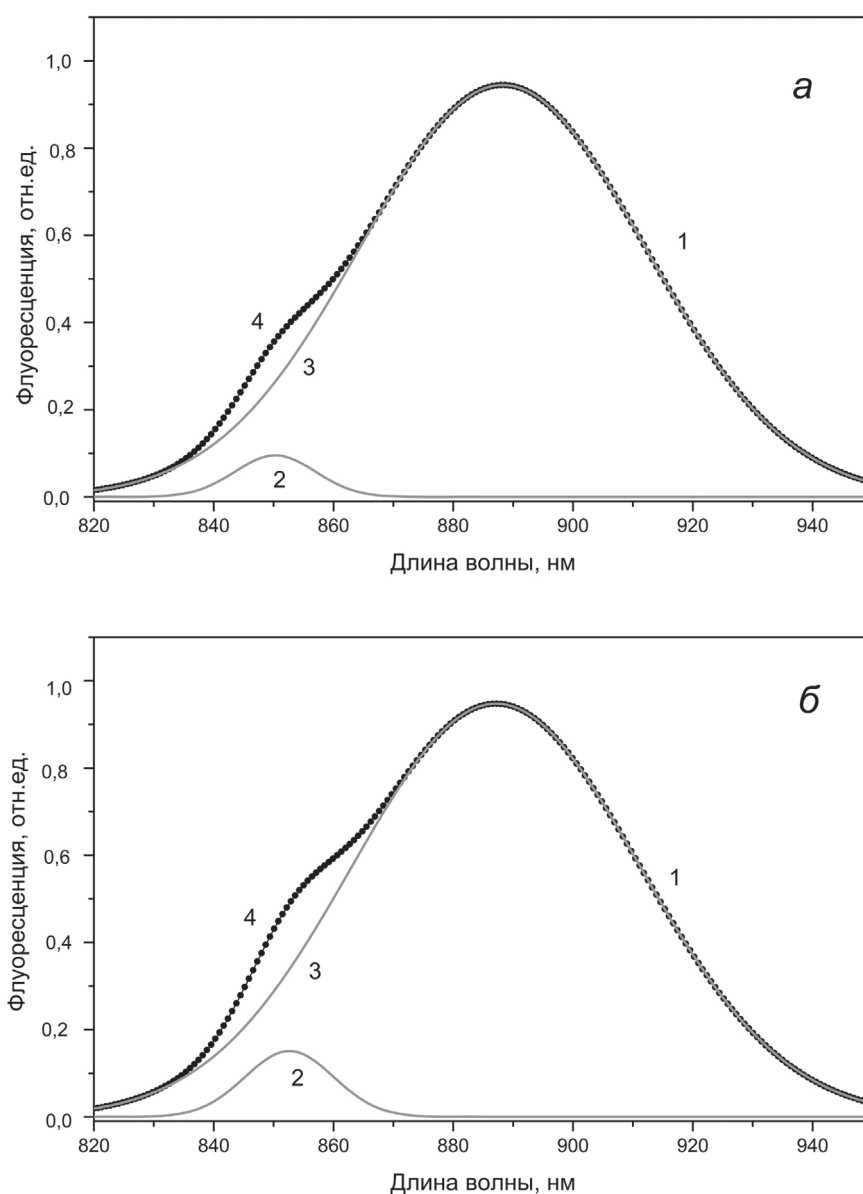


Рис. 1. Спектры флуоресценции суспензии хромофоров *Rba. sphaeroides* в контроле (а) и в присутствии 1 мМ ДИП (б). Оригинальные спектры (1, точки) были аппроксимированы суммой двух гауссовых компонент (4, сплошная чёрная кривая). Компонент с максимумом около 855 нм (2, серая сплошная кривая) принадлежит флуоресценции LH2-комплекса, а с максимумом около 890 нм (3, серая сплошная линия) – флуоресценции LH1-комплекса

при ~ 890 и ~ 855 нм, принадлежащие соответственно излучению LH1- и LH2-комплексов. Из сравнения спектров видно, что после добавления 1 мМ ДИП флуоресценция от LH2 увеличивается. Если в контрольном образце отношение площадей под гауссовыми компонентами спектров флуоресценции LH1 и LH2 составляло около 35, то в присутствии ДИП это значение уменьшалось до 20. Добавление ТМФД-Н₂ не приводило к изменениям спектров флуоресценции (данные не приводятся). Ещё более существенный рост интенсивности флуоресценции LH2 (и, соответственно, относительное уменьшение флуоресценции LH1) был обнаружен нами в недавней работе [22], в которой исследовалось влияние ряда катионных антисептиков на перенос энергии в таких же препаратах. Было показано, что это обусловлено нарушением функциональной связи между периферическими пигмент-белковыми комплексами LH2 и core-комплексами LH1–RC, что выражается в падении эффективности переноса энергии между ними. Очевидно, что сходный эффект, хотя и заметно менее выраженный, проявляется и при добавлении ДИП к хроматофорам *Rba. sphaeroides*.

Сохранение замкнутой везикулярной структуры мембран и системы энергетического сопряжения в хроматофорах *Rba. sphaeroides* позволяет исследовать не только электрон-транспортные процессы, но и преобразова-

ние поглощённой световой энергии в энергию трансмембранно разделённых зарядов. Так, сдвиги полос поглощения каротиноидов в спектральной области 400–500 нм возникают в ответ как на локальное разделение зарядов в RC, так и на появление трансмембранного поля, индуцирующего поляризацию белковой матрицы [23]. В то же время наблюдающийся в ИК-области спектра при 840–900 нм длинноволновый (так называемый «красный») сдвиг полосы поглощения молекул светособирающего Бхл отражает в основном образование энергизованного состояния мембраны хроматофора и не чувствителен к отдельным стадиям локального транспорта электрона по цепочке $P \rightarrow Q_A \rightarrow Q_B$. Эти изменения абсорбции наблюдались и в целых клетках различных видов пурпурных бактерий, и в хроматофорах, которые имели замкнутую везикулярную структуру, как у бактерий *Rhodospirillum rubrum*, *Rba. sphaeroides*, *Chromatium minutissimum* [24, 25]. Этот энергозависимый «красный» сдвиг поглощения Бхл наблюдался в условиях, когда трансмембранный перенос электронов сопровождался антибатным транспортом протонов в виде восстановленного вторичного гидрохинона в результате работы так называемого Q-цикла с участием цитохром *bc₁*-оксидоредуктазного комплекса. При добавлении в среду экзогенного донора электронов (2,6-дихлорфенолиндофенола с избытком аскорбата) происходило

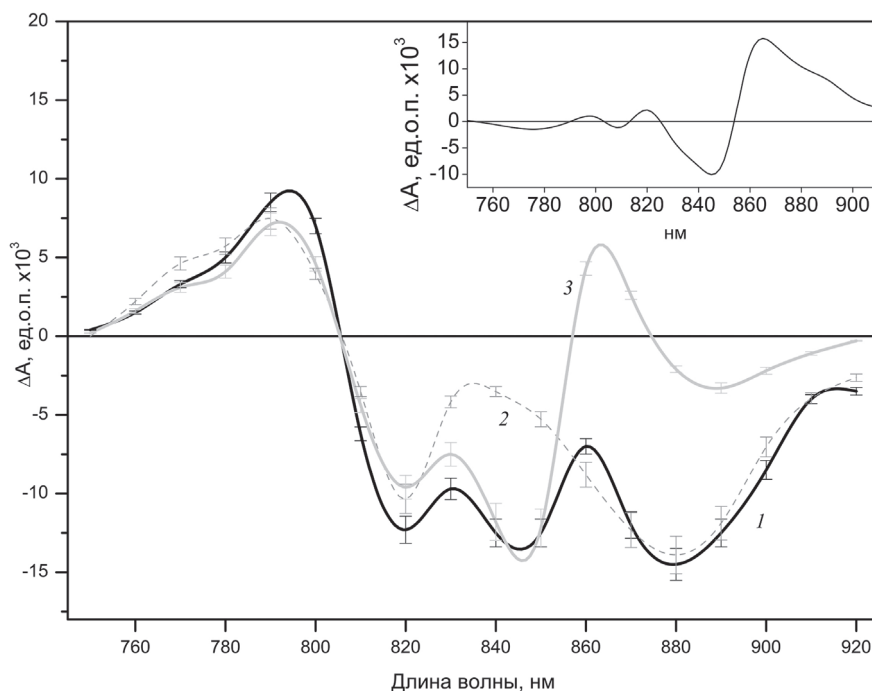


Рис. 2. Дифференциальные спектры «свет-минус-темнота» хроматофоров *Rba. sphaeroides* в контроле (1), в присутствии 10 мМ ингибитора переноса электронов о-фенантролина (2) и в присутствии 1 мМ ДИП (3). На вставке показана разность «спектр 3-минус-спектр 2» после их нормирования при 790 нм

усиление этого красного сдвига за счёт активации циклического транспорта электронов на стационарном свете в тех RC, где отсутствует экзогенный донор электронов – цитохром c_2 .

В то же время блокирование электронного транспорта на участке между первичным и вторичным хинонными акцепторами с помощью специфического ингибитора о-фенантролина привело к их полному подавлению [26].

Разностные спектры поглощения «свет-минус-темнота» хроматофоров бактерий *Rba. sphaeroides* в контроле (1), а также в присутствии ингибитора переноса электронов о-фенантролина (2) и ДИП (3) приведены на рис. 2. Спектр контрольного образца в ближней ИК-области имеет положительный максимум при 790 нм и три отрицательных максимума при 820, 840 и 880 нм. Такой вид спектра свидетельствует, что нативность мембран хроматофоров не нарушена, и что под влиянием появляющейся на мембране разности потенциалов возникает «красный» сдвиг полосы светособирающего Бхл. Поскольку экзогенный донор электронов не добавлялся, циклическая активность фотосинтетического аппарата оказалась, очевидно, невысокой, и положительных изменений в области 850–900 нм не наблюдалось. При блокировании транспорта электрона о-фенантролином сохраняются лишь те изменения поглощения, которые отражают фотоокисление Р, характеризующиеся выцветанием полосы при 870 нм и сопутствующим коротковолновым сдвигом полосы поглощения мономерного Бхл при 800 нм, с дифференциальными максимумами при 790 нм и минимумом при 820 нм (рис. 2, кривая 2).

Добавление ДИПw вызывало стимуляцию энергозависимых абсорбционных изменений. В дифференциальном спектре поглощения в области 850–900 нм наблюдалось появление положительных изменений в спектре поглощения с максимумом около 860 нм за счёт суперпозиции изменений, связанных с окислительно-восстановительными переходами редокс-компонентов RC (фотоактивный Бхл → хинонные акцепторы) и изменений, отражающих действие внешнего трансмембранного поля на молекулы светособирающего Бхл. Это подтверждается сложной кинетикой разнонаправленных фотоиндуцированных изменений поглощения в этой области после выключения активирующего света, указывающей на существование более медленно релаксирующих «положительных» и более быстрых «отрицательных» абсорбционных изменений. Первые, очевидно, связаны с «красным» сдвигом антенны, а вторые – с окислительно- восстано-

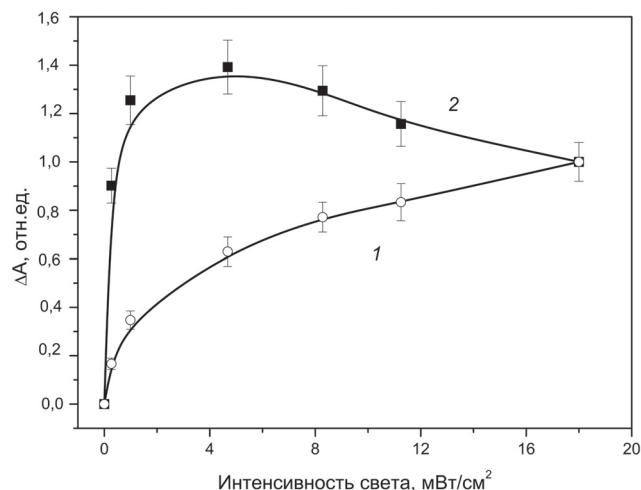


Рис. 3. Зависимость от интенсивности света амплитуды фотоиндуцированных изменений поглощения в хроматофорах *Rba. sphaeroides* в присутствии 1 мМ ДИП при 790 нм (1), отражающих окислительно-восстановительные превращения фотоактивного Бхл Р, и изменений поглощения при 860 нм (2), в области их суперпозиции с энергозависимым красным сдвигом полосы 850 нм

вительными превращениями Бхл Р. Световые кривые, измеренные в спектральной области, характерной для абсорбционных изменений только второго типа (например, при 790 нм) и в области, где наблюдается суперпозиция изменений обоих типов (около 860 нм), также подтверждают данный вывод (рис. 3). Из рис. 3 следует, что положительные фотоиндуцированные изменения поглощения, связанные с длинноволновым сдвигом полосы Бхл под действием разделённых зарядов, имеют более низкую область светового насыщения, чем отрицательные изменения поглощения, обусловленные выцветанием фотоактивного Бхл Р. Напомним, что напряжённость поля на мембране может достигать величины порядка 10^8 В/м [27].

Вычитая из спектра 3 на рис. 2 спектр 2, получим разностный спектр для потенциал-зависимых изменений поглощения. Это показано на вставке к рис. 2. Структура разностного спектра свидетельствует о том, что в условиях энергизации мембран хроматофоров происходит длинноволновый сдвиг полосы поглощения светособирающей антенны молекул Бхл при 850 нм.

Как уже отмечено выше, у бактерий *Rba. sphaeroides* существует два антенных комплекса: LH2 – молекулы с максимумами поглощения при 800 и 850 нм (Бхл 800 и Бхл 850) и LH1 с максимумом поглощения при 870 нм (Бхл 870). Согласно данным рентгеноструктурного анализа [28, 29], молекулы Бхл 850 находятся в существенно гидрофобном окружении, тесно упакованы и ориентированы плоскостями своих порфириновых колец перпендикулярно к

плоскости мембраны хромофора. В то же время мономерные молекулы Бхл 800 располагаются между внешними спиралями белкового носителя, ориентированы параллельно плоскости мембраны и взаимодействуют с полярной средой. Очевидно, перпендикулярная ориентация молекул Бхл 850 к плоскости мембраны и низкая диэлектрическая постоянная их мембранного окружения и являются главными причинами того, что именно эти молекулы в поле высокой напряжённости испытывают длинноволновый электрохромный сдвиг полосы поглощения (Штарк-эффект) при образовании разности потенциалов на мембране.

Влияние ДИП на энергизацию мембран хромофоров можно объяснить, полагая, что этот агент способен отдавать электроны фотоокисленному Р, как это делают, например, редокс-медиаторы 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ) или ТМФД в присутствии аскорбата натрия. Их стимулирующее действие на процесс энергизации мембран хромофоров известно давно [25] и заключается в усилении циклического транспорта электронов за счёт их притока от восстановленной формы ТМФД на фотоокисленный пигмент Р. Регистрируемая при этом скорость темнового восстановления Р⁺ увеличивается.

На рис. 4 показаны кинетические кривые фотоиндуцированных изменений поглощения в хромофорах при 790 нм (в полосе-индикаторе окислительно-восстановительных превращений) в контроле и при добавлении ТМФД-Н₂ или ДИП.

Видно, что темновое восстановление пигмента существенно ускоряется в обоих случаях, что подтверждает предположение об электрон-донорных свойствах ДИП. Однако эти свойства у ДИП выражены существенно слабее. Максимальный эффект ускорения кинетики в присутствии ДИП достигается при концентрации 1 мМ. При дальнейшем росте концентрации ДИП скорость темнового восстановления Р⁺ уже не увеличивается. Следует отметить, что «красный» сдвиг полосы БХл 850, регистрируемый при освещении постоянным светом как положительные изменения абсорбции при 860 нм, также достигает максимума при концентрации ДИП 1 мМ. ТМФД-Н₂ является гораздо более эффективным донором электронов. Близкий к действию ДИП эффект ускорения кинетики достигается уже при концентрации ТМФД-Н₂ около 1 мкМ, а при дальнейшем увеличении его концентрации до 1 мМ константа скорости восстановления Р⁺ увеличивается существенным образом (рис. 5).

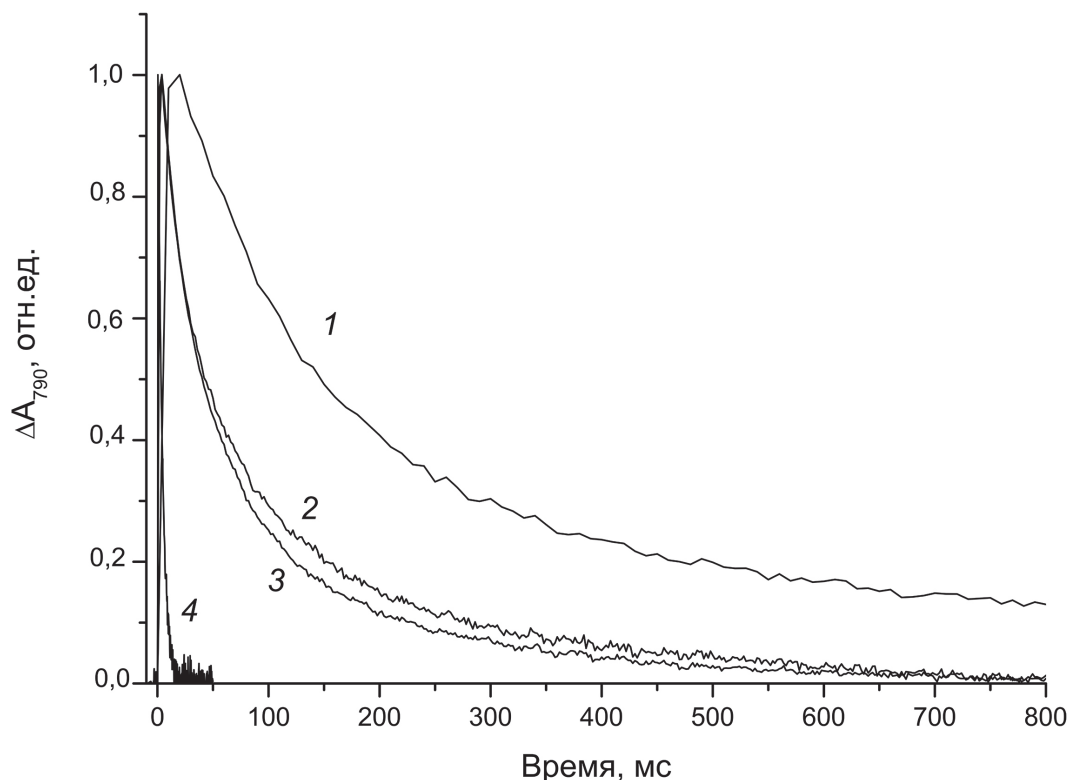


Рис. 4. Кинетика темнового восстановления Р⁺ в хромофорах *Rba. sphaeroides* после активации одиночной лазерной вспышкой (532 нм, 7 нс) в контроле (1), а также в присутствии 1 мМ ДИП (2) и ТМФД-Н₂ в концентрации 1 мкМ (3) и 1 мМ (4)

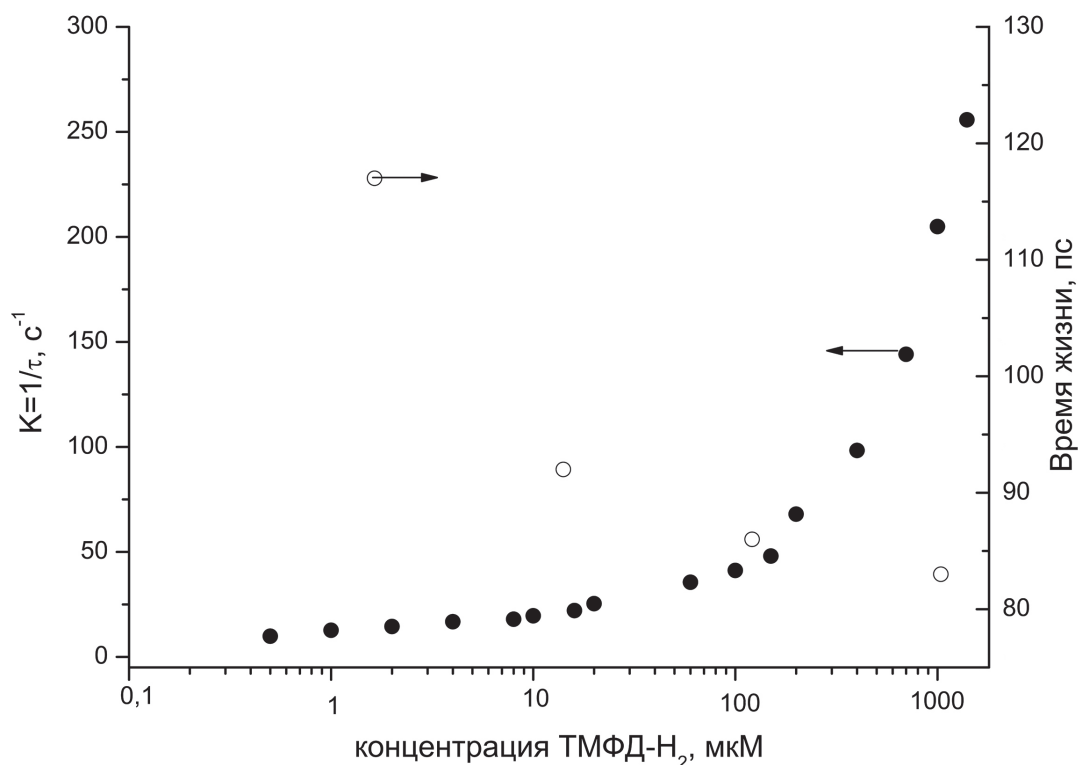


Рис. 5. Зависимость константы скорости темнового восстановления P^+ в хромофорах *Rba. sphaeroides* (чёрные кружки) от концентрации ТМФД-Н₂ после световой активации лазерной вспышкой (532 нм, 7 нс). Для расчётов использовали время, за которое светоиндуцированное изменение абсорбции уменьшалось в 2,7 раз. На рисунке также показана зависимость от концентрации ТМФД-Н₂ τ короткого компонента флуоресценции БХл (открытые кружки), имеющего амплитуду порядка 95%

Мы также исследовали изменение времени жизни флуоресценции в хромофорах *Rba. sphaeroides* при добавлении ДИП и ТМФД-Н₂: рис. 6, таблица (времена жизни и амплитуды кинетики затухания флуоресценции в таблице приводятся в двухэкспоненциальном приближении).

Как видно из рис. 6, наблюдается ускорение этой кинетики как при добавлении ДИП,

так и при добавлении ТМФД-Н₂. Объясняется это следующим. Хотя мы использовали очень низкую интенсивность возбуждающего света, при использованной нами частоте фотовозбуждения препаратов 80 МГц, когда световые импульсы следуют через 12,5 нс, часть фотоактивного пигмента в хромофорах постоянно оказывается в окисленном состоянии (поскольку, как отмечалось выше, исходная цикличе-

Времена жизни (τ , пс) и амплитуды (a , %) кинетических компонентов флуоресценции* хромофоров *Rba. sphaeroides* в контроле и в присутствии ДИП и ТМФД-Н₂ в различных концентрациях

Хромофоры *Rba. sphaeroides*

Время жизни	Контроль	+ДИП, 0,1 мМ	+ДИП, 0,5 мМ	+ДИП, 1 мМ	+ТМФД, 1 мкМ	+ТМФД, 10 мкМ	+ТМФД, 100 мкМ	+ТМФД, 1 мМ
τ_1	131 ± 6	125 ± 5	123 ± 5	112 ± 4	117 ± 6	92 ± 6	86 ± 5	83 ± 4
τ_2	581 ± 17	602 ± 15	597 ± 15	616 ± 14	767 ± 15	873 ± 16	878 ± 14	889 ± 14
a_1	96,0 ± 4,3	95,2 ± 4,7	94,2 ± 3,5	93,9 ± 4,4	95,2 ± 5,1	95,1 ± 4,6	95,2 ± 3,9	94,9 ± 5,3
a_2	4,0 ± 0,8	4,8 ± 1,1	5,8 ± 0,9	6,1 ± 0,4	4,8 ± 0,9	4,9 ± 0,7	4,8 ± 0,6	5,1 ± 1,0

* Приведены средние значения по трём измерениям и стандартная ошибка.

$\lambda_{\text{возб.}} = 400 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег.}} = 880 \text{ нм}$

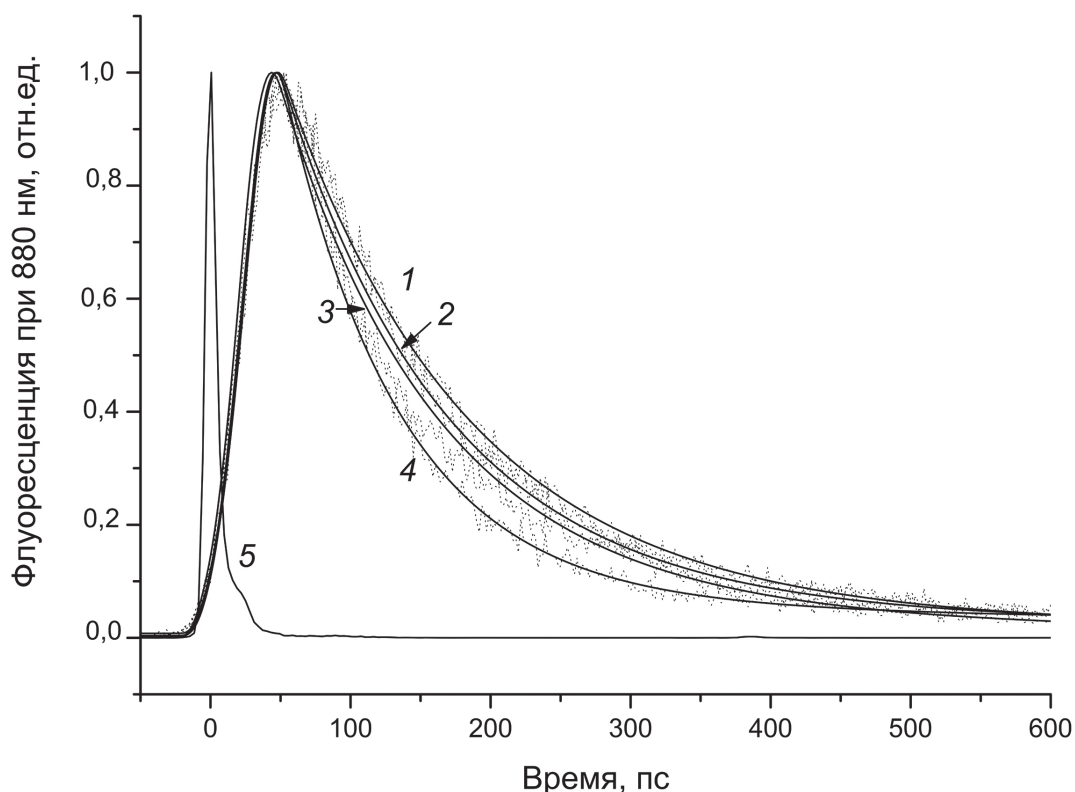


Рис. 6. Кинетика затухания флуоресценции в хромофорах *Rba. sphaeroides* в контроле (1), в присутствии 1 мМ ДИП (2), а также ТМФД-Н₂ в концентрации 1 мкМ (3) и 1 мМ (4). Кривая 5 — аппаратная функция ~16 пс. Точки — экспериментальные данные, сплошные линии — результат двухэкспоненциальной аппроксимации

ская активность фотосинтетического аппарата, регистрируемая по «красному» сдвигу, невысокая). Добавление внешнего донора электронов ТМФД-Н₂ увеличивает уровень восстановленности фотоактивного Бхл в ходе данных кинетических измерений.

Известно, что длительность флуоресценции антенных комплексов LH1 существенным образом зависит от состояния фотоактивного пигмента RC. В образцах с восстановленным RC длительность флуоресценции составляет ~80 пс. В случае окисленных RC длительность быстрого компонента кинетики затухания флуоресценции увеличивается до ~200 пс. Как видно из кинетик, приведённых на рис. 6, при добавлении ДИП и ТМФД-Н₂ поглощаемая световая энергия эффективнее используется в фотохимических реакциях в RC, и регистрируемое время флуоресценции сокращается. Причём, если сравнивать действие ДИП и ТМФД-Н₂ на длительность флуоресценции для концентраций, сопоставимых по ускорению восстановления P⁺ (1 мМ и 1 мкМ соответственно), то можно утверждать, что эффекты очень близки. Однако, как и в случае абсорбционных измерений при более высоких концентрациях ТМФД-Н₂, τ быстрого компонента кинетики флуоресценции продолжает

уменьшаться (рис. 6). Экстраполяция зависимостей, показанных на рис. 6, даёт величину около 80 пс. Исходя из литературных данных и результатов этой работы, мы полагаем, что величина 80 пс — это время захвата энергии возбуждения в LH1-комплексе реакционным центром, фотоактивный пигмент которого находится в восстановленной форме.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Следует отметить факт того, что, наряду с демонстрируемым выше ускорением доставки световой энергии (на ~10%) к фотоактивному пигменту RC в присутствии ДИП (рис. 6), одновременно наблюдается и определённое снижение эффективности переноса энергии от комплексов LH2 к LH1-RC. На это указывает рост в ~1,7 раза интенсивности флуоресценции LH2-комплекса с максимумом при 855 нм в стационарном спектре флуоресценции (рис. 1) и синхронное увеличение в ~1,6 раза вклада медленного (сотни пикосекунд) компонента кинетики затухания свечения, регистрируемого при 860 нм, который отражает собственную флуоресценцию LH2 (данные не показаны). К такому же выводу можно прийти, если срав-

нить вклады от медленного компонента кинетики затухания флуоресценции контрольных образцов и препаратов с добавлением 1 мМ ДИП, регистрируемых в полосе 880 нм (таблица). Важно отметить, что при добавлении ТМФД-Н₂ происходит только уменьшение времени жизни быстрого, порядка 100 пс, компонента, а соотношение амплитуд двух фаз практически не изменяется. Возможно, ДИП вызывает определённые нарушения пространственной упаковки липидов, приводящие к изменениям взаимного расположения комплексов LH2 и LH1-RC. Подобный эффект ранее мы обнаружили при воздействии на фотосинтетическую мембрану *Rba. sphaeroides* катионных антисептиков [22]. Данное сходство, возможно, связано с похожим модифицирующим воздействием этих антисептиков и ДИП на биомембрану. Для эффекта катионных антисептиков важны зарядовые взаимодействия с поверхностью мембраны, происходящие благодаря разнесённым в пространстве положительным зарядам на атомах азота в структуре молекул. В случае молекулы ДИП в используемых условиях также генерируется катион-радикал с локализуемыми на атомах азота положительными зарядами.

Обсуждая электрон-донорные возможности ДИП, отметим, что механизм окисления ДИП до сих пор является предметом дискуссий. Для вольтамперометрического окисления ДИП в водном растворе в работе Tabak et al. [30] рассматриваются два последовательных процесса, контролируемых одноэлектронной диффузией, или одностадийное окисление с участием двух электронов. Стехиометрия анодного окисления ДИП в водном растворе отвечает отрыву двух электронов от каждой молекулы ДИП, что сопровождается освобождением одного протона на окисляемую молекулу [31]. В работе David et al. [32] предполагается, что в результате электроокисления ДИП происходит реорганизация пиперидиновых колец, приводящая к появлению положительного заряда на их атомах азота. Донирование электронов молекулой ДИП в электрон-транспортную цепь кофакторов RC сопровождается образованием восстановленного гидрохинона (хинола) Q_B-H₂. Последний уходит в мембрану, быстро замещаясь убихиноном-10 из мембранного пула, размер которого составляет 20–30 молекул убихинона на один RC [33, 34]. Мембранный комплекс цитохрома bc₁ при окислении убихинола в присутствии молекулярного кислорода может продуцировать появление аниона супероксида [35]. Сопутствующее такой реакции поглощение мо-

лекулярного кислорода мембранами хромофоров пурпурных бактерий в условиях циклического транспорта электрона было показано уже давно [36]. Появляющийся в мембране супероксид может реагировать с ДИП. Последнее было продемонстрировано нами на препаратах изолированных RC, способных генерировать супероксидный радикал при освещении постоянным светом [37]. Тушение свободных радикалов молекулой ДИП могло бы быть связано, в том числе, с сопряжённым с отрывом электрона переносом протона от различных атомов азота [13].

Согласно современным представлениям [38], в ходе полного реакционного цикла, осуществляемого цитохромным bc₁-комплексом, две молекулы хинола окисляются до двух молекул хинона в Q_o-сайте комплекса на стороне мембраны, противоположной месту локализации хинонного акцепторного участка RC. Далее, два электрона из четырёх из Q_o-сайта могут восстанавливать подвижный переносчик электронов для фотоокисленного P⁺ – цитохром c₂, а другие два электрона восстанавливают 1 молекулу хинона из мембранного пула до хинола в Q_i-сайте комплекса на другой стороне мембраны. Последнее сопровождается дополнительно поглощением двух протонов из среды. При наличии молекулярного кислорода он легко диффундирует внутрь цитохромного bc₁-комплекса, где в Q_o-сайте в побочной реакции может восстанавливаться до супероксида [38]. Также сам молекулярный кислород может принимать атом водорода от молекулы хинола [35], продуцируя протонированный супероксид (O₂ H), который, диффундируя далее в водную фазу, генерирует супероксид при депротонировании.

В нашем случае перенос электронов на кислород, сопровождаемый протонированием появляющегося супероксида молекулами ДИП, возможно, является одним из источников наблюдаемой при активации хромофоров постоянным светом энергизации фотосинтетической мембраны в результате поглощения и трансмембранного перемещения протонов функционирующим цитохромным bc₁-комплексом. Вероятно также, что электрон-донорная способность ДИП приводит к активации индуцируемого светом циклического транспорта с участием водорастворимых подвижных молекул цитохрома c₂. Последние частично теряются в ходе препаративной процедуры выделения хромофоров [39]. Очевидно, поэтому в исходных препаратах хромофоров циклическая активность невысокая (рис. 2, кривая 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты данного исследования подтверждают, что обсуждаемые в литературе возможности влияния ДИП на взаимодействия мембранных белков и его электрон-донорные свойства могут оказывать реальное воздействие на активность функциональных мембранных белков. Это является дополнительным аргументом для учёта таких возможностей при изучении механизмов терапевтических эффектов ДИП, в том числе, включая его воздействие на активность трансмембранного белка P-gp, обеспечивающего множественную лекарственную устойчивость опухолей.

Вклад авторов. П.П. Нокс, Е.П. Лукашев, В.З. Пашенко – постановка задач, обсуждение результатов, написание текста; Е.П. Лукашев, Б.Н. Корватовский, С.Н. Горячев, Е.С. Аллахвердиев – проведение экспериментов, обработка результатов; Н.Х. Сейфуллина – приготовление препаратов для исследований.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jensen, B. O., Kleppe, R., Kopperud, R., and Nygaard, G. (2010) Dipyridamole synergizes with nitric oxide to prolong inhibition of thrombin-induced platelet shape change, *Platelets*, **22**, 8-19, doi: 10.3109/09537104.2010.517581.
- Shalinsky, D. R., Andreef, M., and Howell, S. B. (1990) Modulation of drug sensitivity by dipyridamole in multidrug resistant tumor cells *in vitro*, *Cancer Res.*, **50**, 7537-7543.
- Iuliano, L., Colavita, A. R., Leo, R., Praticò, D., and Violi, F. (1997) Oxygen free radicals and platelet activation, *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 999-1006, doi: 10.1016/s0891-5849(96)00488-1.
- Wessler, J. D., Grip, L. T., Mendell, J., and Giugliano, R. P. (2013) The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs, *J. Americ. Coll. Cardiol.*, **61**, 2495-2502, doi: 10.1016/j.jacc.2013.02.058.
- Aliter, K. F., and Al-Horani, R. A. (2021) Potential therapeutic benefits of dipyridamole in COVID-19 patients, *Curr. Pharm. Des.*, **27**, 866-875, doi: 10.2174/1381612826666201001125604.
- Liu, X., Li, Z., Liu, S., Sun, J., Chen, Z., et al. (2020) Potential therapeutic effects of dipyridamole in the severely ill patients with COVID-19, *Acta Pharm. Sin. B*, **10**, 1205-1215, doi: 10.1016/j.apsb.2020.04.008.
- Knox, P. P., Churbanova, I. Yu., Lukashev, E. P., Zakharova, N. I., Rubin, A. B., et al. (2000) Dipyridamole and its derivatives modify the kinetics of the electron transport in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Photochem. Photobiol.*, **56**, 68-77, doi: 10.1016/s1011-1344(00)00062-2.
- Knox, P. P., Lukashev, E. P., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., Seifullina, N. Kh., et al. (2000) Slowing of proton transport processes in the structure of bacterial reaction centers and bacteriorhodopsin in the presence of dipyridamole, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 213-217.
- Knox, P. P., Lukashev, E. P., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., and Borissevitch, G. P. (2001) Proton transfer in bacterial reaction centers and bacteriorhodopsin in the presence of dipyridamole, *Prog. React. Kinet. Mech.*, **26**, 287-298, doi: 10.3184/007967401103165217.
- Iuliano, L., Pratico, D., Ghiselli, A., Bonavita, M. S., and Violi, F. (1992) Reaction of dipyridamole with the hydroxyl radical, *Lipids*, **27**, 349-353, doi: 10.1007/BF02536149.
- Nepomuceno, M. F., Alonso, A., Pereira-Da-Silva, L., and Tabak, M., (1997) Inhibitory effect of dipyridamole and its derivatives on lipid peroxidation in mitochondria, *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 1046-1054, doi: 10.1016/s0891-5849(97)00135-4.
- Almeida, L. E., Castilho, M., Mazo, L. H., and Tabak, M. (1998) Voltammetric and spectroscopic studies of the oxidation of the anti-oxidant drug dipyridamole in acetonitrile and ethanol, *Anal. Chim. Acta*, **375**, 223-231, doi: 10.1016/S0003-2670(98)00501-7.
- Barzegar, A. (2012) Proton-coupled electron-transfer mechanism for the radical scavenging activity of cardiovascular drug dipyridamole, *PLoS One*, **7**, e39660, doi: 10.1371/journal.pone.0039660.
- Galati, G., and O'Brien, P. J. (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 287-303, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034.
- Knox, P. P., Timofeev, K. N., Gorokhov, V. V., Seifullina, N. Kh., and Rubin, A. B. (2017) Generation of radical form of dipyridamole at illumination of photosynthetic reaction centers of *Rb. sphaeroides*,

- Dokl. Biochem. Biophys.*, **473**, 118-121, doi: 10.1134/S1607672917020089.
16. Knox, P. P., Lukashov, E. P., Seyfullina, N. Kh., Gorokhov, V. V., and Rubin, A. B. (2017) The influence of dipyridamole and its derivatives on the membrane energization state of *Rhodobacter sphaeroides* bacterial chromatophores, *Biophysics*, **62**, 734-741, doi: 10.1134/S0006350917050153.
 17. Cartron, M. L., Olsena, J. D., Sener, M., Jackson, P. J., Brindley, A. A., et al. (2014) Integration of energy and electron transfer processes in the photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1769-1780, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.02.003.
 18. Sundström, V., Pullerits, T., and van Grondelle, R. (1999) Photosynthetic light harvesting: reconciling dynamics and structure of purple bacterial LH2 reveals function of photosynthetic unit, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2327-2346, doi: 10.1021/jp983722+.
 19. Freiberg, A., Allen, J. P., Williams, J. A. C., and Woodbury, N. W. (1996) Energy trapping and detrapping by wild type and mutant reaction centers of purple non-sulfur bacteria, *Photosyn. Res.*, **48**, 309-319, doi: 10.1007/BF00041022.
 20. Driscoll, B., Lunceford, C., Lin, S., Woronowicz, K., Niederman, R. A., and Woodbury, N. W. (2014) Energy transfer properties of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores during adaptation to low light intensity, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 17133-17141, doi: 10.1039/C4CP01981D.
 21. Caycedo-Soler, F., Rodrigez, F. J., Quiroga, L., Zhao, G., and Johnson, N. F. (2011) Energy conversion in purple bacteria photosynthesis, in *Photosynthesis* (Najafpour, M., ed.) INTECH, London, pp. 1-27, doi: 10.5772/26241.
 22. Strakhovskaya, M. G., Lukashov, E. P., Korvatovskiy, B. N., Kholina, E. G., Seifullina, N. Kh., et al. (2021) The effect of some antiseptic drugs on the energy transfer in chromatophore photosynthetic membranes of purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*, *Photosyn. Res.*, **147**, 197-209, doi: 10.1007/s11120-020-00807-x.
 23. Andersson, P. O., Gillbro, T., Ferguson, L., and Cogdell, R. J. (1990) Spectral shift of purple bacterial carotenoids related to solvent and protein polarizability, in *Current Research in Photosynthesis* (Baltshcheyfsky, M., ed.) Vol. II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-120.
 24. Vredenberg, V. J., and Ames, J. (1966) Absorption bands of bacteriochlorophyll types in purple bacteria and their response to illumination, *Biochim. Biophys. Acta*, **126**, 244-261, doi: 10.1016/0926-6585(66)90060-4.
 25. Barsky, E. L., and Samuilov, V. D. (1979) Blue and red shifts of bacteriochlorophyll absorption band around 880 nm in *Rhodospirillum rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **548**, 448-457, doi: 10.1016/0005-2728(79)90057-4.
 26. Kononenko, A. A., Venediktov, P. S., Chemeris, Yu. K., Adamova, N. P., and Rubin, A. B. (1974) Relation between electron transport-linked processes and delayed luminescence in photosynthesizing bacteria, *Photosynthetica*, **8**, 176-183.
 27. Junge, W. (1977) Membrane potentials in photosynthesis, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 503-536, doi: 10.1146/annurev.pp.28.060177.002443.
 28. McDermot, G., Prince, S. M., Freer, A. A., Hawthornthwaite-Lawless, A. M., Papiz, M. Z., et al. (1995) Crystal-structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria, *Nature*, **374**, 517-521, doi: 10.1038/374517a0.
 29. Poszak, A. W., Howard, T. D., Soutal, J., Gurdiner, A. T., Low, C. J., et al. (2003) Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodopseudomonas palustris*, *Science*, **302**, 1969-1972, doi: 10.1126/science.1088892.
 30. Tabak, M., Castilho, M., Almeida, L. E., and Mazo, L. H. (1998) Voltammetric studies of dipyridamole oxidation in aqueous micellar solutions, *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, S40, doi: 10.1016/s0891-5849(98)90119-8.
 31. Castilho, M., Almeida, L. E., Tabak, M., and Mazo, L. H. (2000) Voltammetric oxidation of dipyridamole in aqueous acid solutions, *J. Braz. Chem. Soc.*, **11**, 148-153, doi: 10.1590/S0103-50532000000200008.
 32. David, I. G., Iordache, L., Popa, D. E., Buleandra, M., David, V., et al. (2019) Novel voltammetric investigation of dipyridamole at a disposable pencil graphite electrode, *Turk. J. Chem.*, **43**, 1109-1122, doi: 10.3906/kim-1903-64.
 33. Crofts, A. R., and Wraight, C. A. (1983) The electrochemical domain of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **726**, 149-185, doi: 10.1016/0304-4173(83)90004-6.
 34. Mezzettia, A., Leibla, W., Breton, J., and Nabedryk, E. (2003) Photoreduction of the quinone pool in the bacterial photosynthetic membrane: identification of infrared marker bands for quinol formation, *FEBS Lett.*, **537**, 161-165, doi: 10.1016/s0014-5793(03)00118-2.
 35. Yin, Y., Yang, S., Yu, L., and Yu, C.-A. (2010) Reaction mechanism of superoxide generation during ubiquinol oxidation by the cytochrome *bc₁* complex, *J. Biol. Chem.*, **285**, 17038-17045, doi: 10.1074/jbc.M110.104364.
 36. Remennikov, V. G., and Samuilov, V. D. (1980) Interaction of photosynthetic electron transport chain components *Rhodospirillum rubrum* with oxygen, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **252**, 491-494.
 37. Knox, P. P., Lukashov, E. P., Timofeev, K. N., and Seifullina, N. Kh. (2002) Effects of oxygen on the dark recombination between photoreduced secondary quinone and oxidized bacteriochlorophyll in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 901-907, doi: 10.1023/a:1019966620850.

38. Husen, P., and Solov'yov, I. A. (2016) Spontaneous binding of molecular oxygen at the Q_o-site of the bcl complex could stimulate superoxide formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 12150-12158, doi: 10.1021/jacs.6b04849.
39. Michels, P. A. M., and Konings, W. N. (1978) Structural and functional properties of chromatophores and membrane vesicles from *Rhodospirillum rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 353-368, doi: 10.1016/0005-2736(78)90346-2.

THE EFFECTS OF DIPYRIDAMOLE ON MEMBRANE ENERGIZATION AND ENERGY MIGRATION PROCESSES IN THE *Rba. sphaeroides* CHROMATOPHORES

P. P. Knox^{1*}, E. P. Lukashev¹, B. N. Korvatovskiy¹, N. Kh. Seifullina¹, S. N. Goryachev¹, E. S. Allakhverdiev², and V. Z. Paschenko¹

¹ *Biophysics Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: knox@biophys.msu.ru*

² *Russian National Medical Research Center of Cardiology, 121552 Moscow, Russia*

The effect of dipyridamole (DIP) at concentrations up to 1 mM on the fluorescent characteristics of the light-harvesting complexes LH2 and LH1, as well as on their interaction and on the state of the photosynthetic electron transport chain in the chromatophores of bacteria *Rba. sphaeroides* was studied. DIP affects the efficiency of energy transfer from the light-harvesting complex LH2 to the core complex LH1-reaction center and leads to the appearance of a long-wave ("red") shift of the absorption band of light-harvesting bacteriochlorophyll molecules in the IR region of the spectrum at 840-900 nm. This shift is associated with the formation of an energized state of the membrane. It is shown that DIP is able to reduce the photo-oxidized bacteriochlorophyll of the reaction center and this ability leads to an increase in the flow of electrons along the electron transport chain and, thus, stimulates the generation of transmembrane potential on the chromatophore membrane. The results obtained are important in analyzing the possible mechanisms of the influence of DIP on the activity of membrane functional proteins. In particular, they may be important for the interpretation of the numerous therapeutic effects of DIP.

Keywords: chromatophores, membrane energization, energy migration, dipyridamole

СВОЙСТВА МУТАНТНЫХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ *Cereibacter sphaeroides* С ЗАМЕЩЕНИЕМ M206 Pe → Gln

© 2022 Т.Ю. Фуфина, О.А. Третчикова, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов, Л.Г. Васильева*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: vsulya@mail.ru

Поступила в редакцию 09.06.2022

После доработки 14.08.2022

Принята к публикации 14.08.2022

В структуре фотосинтетического реакционного центра (РЦ) пурпурной несерной бактерии *Cereibacter sphaeroides* консервативный аминокислотный остаток Pe-M206 расположен вблизи димера бактериохлорофилла P и мономерного бактериохлорофилла V_A, являющихся первичным донором и ближайшим акцептором электрона соответственно. Непосредственная близость Pe-M206 к C2-ацетильной группе бактериохлорофилла P_B, гидроксильной группе Tug-M210, C9-кето-группе бактериохлорофилла V_A, а также к молекуле воды вблизи этой группы позволяет использовать данный сайт для мутагенеза с целью исследования механизмов первичных фотохимических процессов в РЦ. Ранее было показано, что внесение аминокислотного замещения Pe → Glu в положении M204 (аналог положения M206 в РЦ *C. sphaeroides*) в РЦ близкородственной пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* заметно повлияло на кинетику образования состояния с разделенными зарядами P⁺H_A⁻, а замена Pe M204 на Gln привела к потере бактериохлорофилла V_A из структуры комплекса. В нашей работе показано, что одиночная I(M206)Q и двойная мутация I(M206)Q + F(M208)A в РЦ *C. sphaeroides* не приводят к изменению пигментного состава комплекса и существенно не влияют на редокс-потенциал первичного донора электрона. В то же время замещение Pe M206 на Gln повлияло на положение и амплитуды полос поглощения бактериохлорофиллов РЦ, привело к увеличению времени жизни возбужденного состояния первичного донора электрона P* с 3,1 пс до ~22 пс и снижению квантового выхода образования состояния P⁺Q_A до ~60%, что указывает на значительные изменения пигмент-белковых взаимодействий в окружении первичного донора P и ближайшего акцептора электрона V_A. Также было отмечено снижение устойчивости мутантных РЦ к тепловой денатурации, более выраженное для РЦ с двойным замещением I(M206)Q + F(M208)A и обусловленное, по-видимому, нарушением плотной упаковки белка вблизи бактериохлорофиллов P_B и V_A. Обсуждаются возможные причины различного влияния одинаковых мутаций на свойства двух высокомолекулярных РЦ из близкородственных пурпурных несерных бактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реакционный центр фотосинтеза, *Rhodobacter capsulatus*, *Cereibacter sphaeroides*, бактериохлорофилл, пурпурные несерные бактерии, фотохимическое разделение зарядов, квантовый выход разделения зарядов, пигментный состав, редокс-потенциал, первичный донор электрона, термостабильность мембранных белков.

DOI: 10.31857/S0320972522100104, EDN: BCUNMI

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтетические реакционные центры пурпурных бактерий (пб-РЦ), относительно более просто организованные структурные аналоги фотосистемы-2 высших растений, цианобактерий и водорослей, многие годы служат

удобной моделью для изучения механизмов преобразования световой энергии в химическую энергию разделенных зарядов. К настоящему времени наиболее изучены РЦ из *Blastochloris viridis*, *Rhodobacter sphaeroides* (далее будет использовано новое название *Cereibacter sphaeroides* [1]) и *Rhodobacter capsulatus*. Про-

Принятые сокращения: БФео – бактериофеофитин; БХл – бактериохлорофилл; ДТ – дикий тип; ЛДАО – детергент лаурилдиметиламиноксид; пб-РЦ – реакционные центры пурпурных бактерий; V_A и V_B – мономерные бактериохлорофиллы; H_A и H_B – мономерные бактериофеофитины; P – димер бактериохлорофилла; P_A и P_B – бактериохлорофиллы димера P; Q_A и Q_B – убихиноны.

* Адресат для корреспонденции.

структурные структуры двух первых РЦ расшифрованы с высоким разрешением [2, 3], а для РЦ *Rba. capsulatus* детальная структура пока не установлена, но, как полагают, она в целом сходна со структурой РЦ *C. sphaeroides* [4]. Трансмембранный пигмент-белковый комплекс РЦ *C. sphaeroides* состоит из трех субъединиц (L, M и H) и десяти кофакторов, интегрированных в мембрану, — четырех молекул бактериохлорофилла (БХл), двух молекул бактериофеофитина (БФео) H_A и H_B , двух хинонов Q_A и Q_B , молекулы каротиноида и атома негемового железа. Кофакторы организованы в две трансмембранные цепи переноса электрона (A и B), расположенные симметрично относительно оси симметрии 2-го порядка [4] (рис. 1, а). Известно, что в РЦ пурпурных бактерий только одна из цепей переноса электрона, A-цепь, является функционально активной. Два БХл, P_A и P_B , на периплазматической стороне мембраны образуют димер Р, выполняющий роль первичного донора электрона. Под воздействием света в РЦ инициируется серия быстрых трансмембранных реакций переноса электрона, сопровождающихся образованием состояний с разделенными зарядами. Квантовый выход фотоиндуцированного разделения зарядов в пб-РЦ близок к 100% [5].

К настоящему времени установлено, что белок пб-РЦ не только удерживает кофакторы внутри мембраны, но также участвует в регуляции их спектральных и окислительно-восстановительных свойств. Кроме того, ряд ами-

нокислотных остатков играет важную роль в процессе фотохимического разделения зарядов [6]. К таким остаткам относится, в частности, Тир-М210, расположенный вблизи димера БХл Р и мономерного БХл V_A . Установлено, что при передаче электрона от P^* на БХл V_A изменение конформации гидроксильной группы Тир-М210 приводит к понижению уровня энергии состояния с разделенными зарядами $P^+V_A^-$ и, таким образом, способствует стабилизации этого короткоживущего состояния [7, 8]. К существенным компонентам структуры РЦ относятся также молекулы воды в гидрофобной части комплекса. Так, было показано, что кристаллографически определяемая молекула воды вблизи С9-кето-группы БХл V_A (в литературе нередко обозначаемая как «вода-А») необходима для эффективного переноса электрона с P^* на V_A . При ее отсутствии время жизни состояния P^* в РЦ *C. sphaeroides* повышалось в 8 раз [9]. Показано, что в процессе образования состояния $P^+V_A^-$ формируется водородная связь между водой-А и С9-кето-группой БХл V_A [9, 10]. Предполагается, что вода-А входит в цепочку полярных атомов, участвующих в переносе электрона от возбужденного донора электрона P^* на ближайший акцептор БХл V_A [11]. Несмотря на значительный объем информации, накопленной к настоящему времени в отношении влияния белкового окружения на свойства кофакторов и процессы переноса электрона и протонов в пб-РЦ, вопрос о механизмах наиболее быстрых

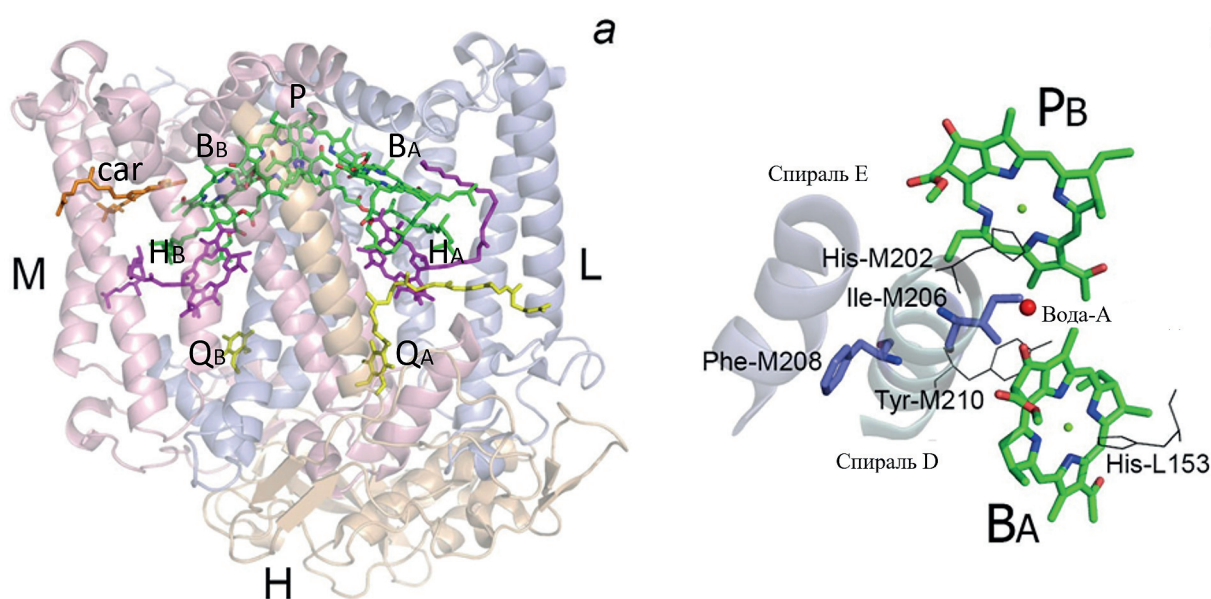


Рис. 1. Структура реакционного центра *C. sphaeroides* (PDB ID 3v3y) (а). L – L-субъединица; M – M-субъединица; H – H-субъединица; P – димер БХл; V_A и V_B – мономерные БХл; H_A и H_B – мономерные БФео; Q_A и Q_B – убикиноны; car – каротиноид. б – Белковое окружение бактериохлорофиллов P_B и V_A в структуре РЦ дикого типа (PDB ID 3v3y). Показано расположение Ile-M206, Phe-M208, Tyr-M210, воды-А, фрагментов α -спиралей D и E M-субъединицы

начальных этапов разделения зарядов остается предметом дискуссий.

Внесение направленных аминокислотных замещений в окружение кофакторов с целью изменения пигмент-белковых и белок-белковых взаимодействий служит одним из подходов к исследованию механизмов фотосинтетического переноса электрона в пб-РЦ [6]. В частности, в ряде работ внимание было акцентировано на высококонсервативном остатке Пе-M206, расположенном в непосредственной близости от БХл Р_В, С9-кето-группы мономерного БХл В_А, Туг-M210 и воды-А (рис. 1, б). Было показано, что в РЦ *C. sphaeroides* замены Пе-M206 на His и Туг существенно повлияли на оптические характеристики комплекса в области поглощения димера Р и мономерных БХл [12, 13]. Кроме того, было отмечено значительное падение квантового выхода образования состояния Р⁺Q_А⁻ и снижение количества РЦ I(M206)Н после его выделения из мембран и очистки с использованием детергента лаурилдиметиламинооксида (ЛДАО) [12, 14]. Было высказано предположение, что внесение полярного остатка гистидина в сайт M206 в область контакта L- и M-субъединиц могло повлиять на связывание кристаллографически определяемого гликолипида [15] и, таким образом, отразиться на стабильности структуры РЦ [14]. В РЦ *Rba. capsulatus* положение M204 соответствует положению M206 в РЦ *C. sphaeroides*. В работе Saggu et al. [16] показано, что мутация I(M204)E повлияла на подвижность ОН-группы Туг-M210, а замена I(M204)Q привела к потере БХл В_А из структуры комплекса [17]. Получение стабильных мутантных РЦ *C. sphaeroides* с аналогичными свойствами представляет интерес для изучения механизмов начальных этапов фотохимического процесса в этом РЦ.

В представленной работе были получены мутантные РЦ *C. sphaeroides* с одиночным I(M206)Q и двойным I(M206)Q + F(M208)A замещениями, исследованы их спектральные и фотохимические свойства, пигментный состав и термостабильность. Мутация M208 Phe → Ala была внесена для повышения гомологии белкового окружения Р и В_А в РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus*. Также авторами обсуждаются возможные причины различного влияния одинаковых мутаций на свойства и пигментный состав гомологичных РЦ из пурпурных несерных бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Направленные аминокислотные замещения в РЦ вносили методом ПЦР через

олигонуклеотидные праймеры, как описано ранее [18]. Путем определения последовательности ДНК ПЦР-фрагмента было подтверждено присутствие мутаций в гене *pufM*, кодирующем М-субъединицу РЦ. Модифицированный *puf*-оперон был клонирован в шаттл-вектор pRK-415 [19], полученная плазмида с помощью конъюгации была перенесена в штамм *C. sphaeroides* DD13 [20]. Клетки полученных рекомбинантных штаммов синтезировали РЦ с заданными мутациями и не содержали светособирающих комплексов [18]. В качестве контрольного реакционного центра псевдо-дикого типа (ДТ) использовали РЦ, выделенные из штамма *C. sphaeroides* DD13, который содержал производную pRK-415, несущую немодифицированные копии генов *puf-LMX* [18]. *C. sphaeroides* выращивали на среде Хатнера [21] в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл) и канамицина (5 мкг/мл). Реакционные центры выделяли методом ионообменной и аффинной хроматографии, как описано ранее [22, 23]. Для солюбилизации комплексов из мембран использовали детергент ЛДАО. Смену детергента после очистки РЦ осуществляли, как описано ранее [24]. Очищенные РЦ растворяли в 20 мМ Tris-HCl-буфере (рН 8,0), содержащем 0,2% холата натрия (ТХ) или 0,6% n-октил-глюкозида. Термостабильность РЦ исследовали при 48 и 55 °С в течение 60 мин путем регистрации термозависимых изменений амплитуды полосы Q_Y В, как описано ранее [24]. Измерение спектров поглощения производили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 («Shimadzu», Япония) при комнатной температуре. К образцам добавляли аскорбат натрия в концентрации 1 мМ для поддержания первичного донора электрона в восстановленном состоянии. Экстракцию и анализ пигментов проводили методом, описанным ранее [25], ошибку измерений определяли методом стандартного отклонения. Величину среднеточечного потенциала Р/Р⁺ определяли с помощью электрохимического титрования изолированных РЦ, используя феррицианид калия в качестве окислителя и аскорбат натрия в качестве восстановителя, как описано ранее [25]. Кинетики изменений поглощения с фемтосекундным разрешением в РЦ измеряли на установке, описанной ранее [26]. Импульсы света длительностью ~35 фс и частотой повторения 20 Гц получали с помощью титан-сапфирового лазера MaiTai SP («Spectra-Physics», США) и регенеративного усилителя Spitfire Ace («Spectra-Physics»). Энергию выходных импульсов Spitfire Ace ослабляли и использовали для накачки параметрического усилителя OPA800 CF («Spectra-Physics») с це-

лью получения импульсов возбуждения на длине волны 865 нм (вторая гармоника холостого пучка). Небольшую часть энергии импульсов из регенеративного усилителя использовали для генерации континуума в кювете с водой толщиной 5 мм в качестве импульсов зондирования. После кюветы с образцом спектры зондирующих импульсов измеряли с помощью CCD-камеры Pixis 400BR и спектрографа SpectraPro 2300i («Princeton Instruments», США) в области длин волн 750–1100 нм. Разностные спектры получали путем усреднения 500 спектров для каждой задержки времени. Возбуждающий луч с энергией ~1–5 мкДж фокусировали на образец так, чтобы выцветание первичного донора электрона составляло ~10%. Измерения проводили при комнатной температуре. Относительную поляризацию импульсов возбуждения устанавливали параллельно измерительному импульсу. Визуализацию структуры реакционного центра и моделирование аминокислотных замещений проводили с помощью программы PyMol [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В спектре поглощения изолированных РЦ ДТ, представленном на рис. 2, длинноволновая полоса $Q_Y P$ с максимумом при 865 нм принадлежит поглощению димера БХл Р, полоса поглощения с максимумом при 804 нм приписывается поглощению мономерных БХл ($Q_Y B$), а также высокоэнергетическому переходу в молекуле первичного донора электрона. Полоса $Q_Y H$ с максимумом при 760 нм соответствует

поглощению молекул БФео. В коротковолновой области спектра полоса при 599 нм отражает Q_X -переходы в молекулах БХл. При 532 нм расположен максимум полосы поглощения молекул БФео активной и неактивной цепей переноса электрона, $Q_X H$. Плечо в районе 500 нм принадлежит молекуле каротиноида. В коротковолновой области спектра поглощения изолированных РЦ ДТ расположена полоса $Core$ с максимумом при 363 нм и плечом на длинноволновом склоне полосы при 390 нм, отражающая поглощение всех бактериохлоринов РЦ (рис. 2).

В спектре поглощения мутантных РЦ с одиночным и двойным замещениями наблюдаются сходные изменения – заметное снижение амплитуды полосы $Q_Y P$ и коротковолновый сдвиг этой полосы на 7 нм. Кроме того, отмечается снижение амплитуды и длинноволновый сдвиг на 4 нм полосы $Q_Y B$ вблизи 800 нм (рис. 2). Сходство спектров поглощения РЦ I(M206)Q и РЦ I(M206)Q + F(M208)A свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения связаны с одиночной мутацией I(M206)Q, а замещение F(M208)A не оказало существенного влияния на спектральные свойства РЦ.

Пигментный анализ показал, что в мутантных РЦ соотношение БХл/БФео такое же, как и в РЦ ДТ (таблица). Эти результаты свидетельствуют о том, что аминокислотное замещение M206 Ile → Gln в РЦ *C. sphaeroides* не приводит к удалению мономерного БХл B_A из структуры комплекса, как это наблюдалось ранее в РЦ *Rba. capsulatus* с аналогичной мутацией I(M204)Q [17].

Значение среднеточечного потенциала P/P^+ для РЦ ДТ составило 490 ± 8 мВ,

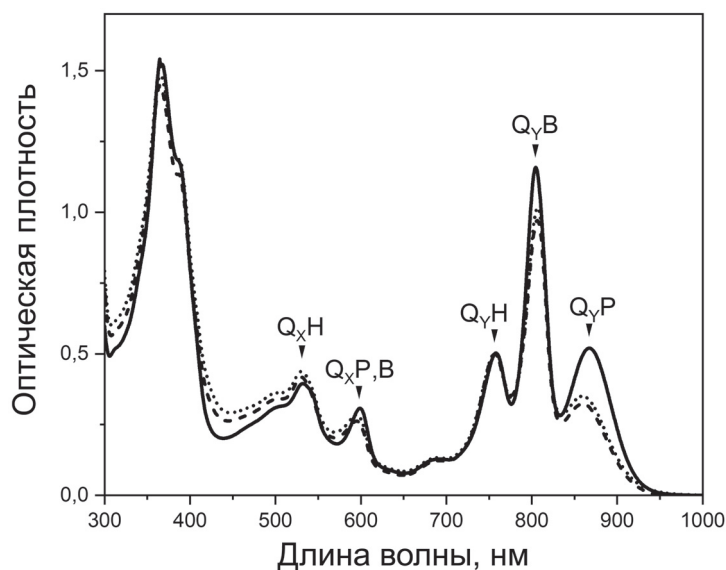


Рис. 2. Спектры поглощения изолированных РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (—), I(M206)Q (···) и I(M206)Q + F(M208)A (---), измеренные при комнатной температуре. Спектры нормированы по полосе $Q_Y H$ при 760 нм

Величина среднеточечного потенциала P/P^+ и пигментный анализ РЦ *C. sphaeroides*

РЦ	$E_m P/P^+$, мВ	БХл/БФео
ДТ	490 ± 8	$2,00 \pm 0,1$
I(M206)Q	470 ± 5	$1,98 \pm 0,1$
I(M206)Q + F(M208)A	475 ± 5	$1,98 \pm 0,1$

для РЦ I(M206)Q – 470 ± 5 мВ, для РЦ I(M206)Q + F(M208)A – 475 ± 5 мВ (таблица). Близкие, в пределах ошибки измерения, значения окислительного потенциала P в двух мутантных РЦ указывают на то, что обнаруженное небольшое понижение величины $E_m P/P^+$ является результатом внесения замещения M206 $Pe \rightarrow Gln$. Изменение величины $E_m P/P^+$ в сторону понижения позволяет также сделать заключение, что мутация I(M206)Q не привела к образованию водородной связи между Gln -M206 и С2-ацетильной группой БХл P_B , входящей в π -электронную систему макроцикла. На основании того, что величины $E_m P/P^+$ в РЦ ДТ и мутантных РЦ близки, можно предположить, что движущая сила фотохимической реакции ΔG в генетически модифицированных комплексах также существенно не изменилась. Учитывая, что замещение F(M208)A не оказало влияния на спектральные свойства и окислительный потенциал P , определение времени жизни P^* и квантового выхода образования состояния $P^+Q_A^-$ были проведены только для РЦ с одиночным замещением I(M206)Q.

На рис. 3 и 4 показаны результаты исследования динамики разделения зарядов в РЦ ДТ и I(M206)Q, полученные методом накачки-зондирования. Целью данного исследования было выяснение влияния замещения изолейцина на глутамин в позиции M206 на время жизни возбужденного состояния первичного донора электрона и квантовый выход образования состояния с разделенными зарядами $P^+Q_A^-$ в РЦ I(M206)Q.

На рис. 3 приведена кинетика затухания стимулированного излучения из возбужденного состояния при 930 нм в РЦ ДТ (рис. 3, открытые символы (o)) и РЦ I(M206)Q (рис. 3, закрытые символы (•)). В РЦ ДТ кинетика стимулированного излучения состояния P^* удовлетворительно описывается экспонентой с временем жизни $3,1 \pm 0,03$ пс. В РЦ I(M206)Q кинетика стимулированного излучения сохранила экспоненциальный характер, но время жизни увеличилось до $22 \pm 1,4$ пс. В реакционных центрах дикого типа время жизни возбужденного первичного донора электрона с заблокированным переносом электрона,

$$\tau = \frac{1}{\sum k_i} \approx 300 \text{ пс},$$

снижается до

$$\tau = \frac{1}{k_p + \sum k_i} \approx 3 \text{ пс},$$

когда канал переноса электрона открыт. Это позволяет оценить как константу скорости переноса электрона от возбужденного первичного донора в активную цепь кофакторов, $k_p \approx 3,3 \cdot 10^{-13}$ (1/с), так и квантовый выход разделения зарядов,

$$\varphi_p = \frac{k_p}{k_p + \sum k_i} \approx 0,99.$$

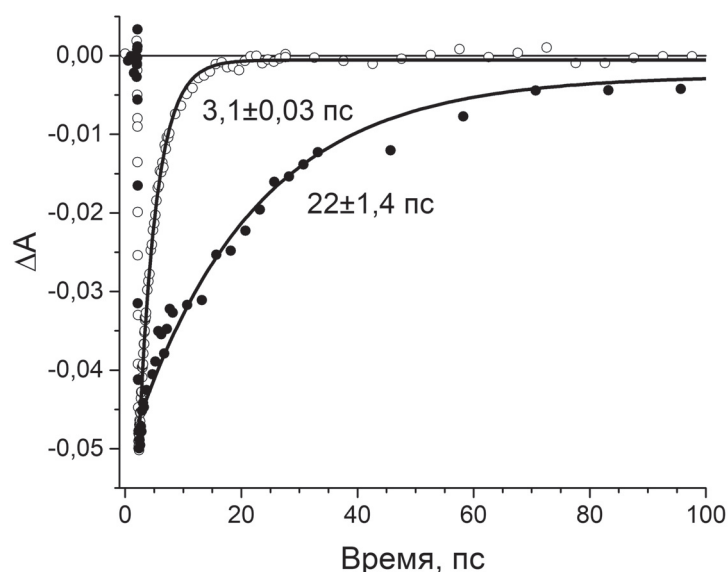


Рис. 3. Кинетика стимулированного излучения при 930 нм для РЦ ДТ *C. sphaeroides* дикого типа (o) и РЦ I(M206)Q (•). Сплошными линиями показана экспоненциальная аппроксимация кинетики изменений поглощения

В реакционных центрах мутанта I(M206)Q увеличение времени жизни возбужденного первичного донора электрона до

$$\tau = \frac{1}{k_p + \sum k_i} \approx 22 \text{ пс}$$

должно приводить к уменьшению константы скорости переноса электрона от возбужденного первичного донора в активную цепь кофакторов до $k_p \approx 4,2 \cdot 10^{-14}$ (1/с) и снижению квантового выхода разделения зарядов до

$$\varphi_p = \frac{k_p}{k_p + \sum k_i} \approx 0,92.$$

Для оценки квантового выхода разделения зарядов в РЦ мутанта РЦ I(M206)Q на рис. 4 приведены разностные спектры поглощения, измеренные на отдельных задержках времени. В РЦ ДТ (рис. 4, а) при импульсном возбуждении первичный донор электрона переходит в возбужденное состояние (кривая 1). К задержке времени ~ 20 пс происходит переход возбужденного P^* в состояние $P^+H_A^-$ с квантовым выходом 0,99 (кривая 2). На задержке времени 1600 пс можно наблюдать состояние $P^+Q_A^-$ (кривая 3). В РЦ мутанта I(M206)Q (рис. 4, б) при той же концентрации возбужденного первичного донора (кривая 1) состояние $P^+H_A^-$ образуется на задержке времени 260 пс с квантовым выходом $\sim 0,6$ (кривая 2). К задержке времени 1600 пс в РЦ I(M206)Q разностный спектр поглощения отражает состояние $P^+Q_A^-$ (кривая 3).

Разница в ожидаемой величине квантового выхода (92%) и фактической величине квантового выхода (60%) образования состояния $P^+Q_A^-$ в РЦ I(M206)Q может быть обусловлена изменением констант скорости как прямых, так и обратных реакций переноса электрона,

в частности, рекомбинации зарядов состояний $P^+B_A^-$ и $P^+H_A^-$.

В литературе неоднократно отмечалась относительно высокая стабильность РЦ пурпурных бактерий [28]. Также известно, что некоторые аминокислотные замены могут способствовать как ослаблению, так и укреплению структуры этого комплекса [13, 29]. Влияние мутаций в положении M206, внесенных в данной работе или описанных ранее для РЦ I(M206)H [12] и РЦ I(M206)Y [13], на стабильность структуры РЦ было исследовано методом регистрации термозависимых изменений амплитуды полосы Q_Y В при температуре 48 °С [24]. В составе буфера для растворения РЦ был использован детергент холат натрия, способствующий стабилизации комплекса [24]. Сравнительное исследование показало, что после 60 мин инкубирования в данных условиях амплитуда Q_Y -полосы мономерных БХЛ при 804 нм в РЦ I(M206)Y уменьшалась менее, чем на 5%, как и в РЦ ДТ, в то время как в РЦ I(M206)Q она уменьшалась на $\sim 10\%$. Наименьшей устойчивостью к температурной денатурации обладали РЦ I(M206)Q + F(M208)A и I(M206)H, их инкубирование при 48 °С в течение 60 мин приводило к 20%-ному снижению амплитуды полосы Q_Y В (рис. 5). Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о дестабилизирующем влиянии замещения I(M206)H на структуру РЦ *C. sphaeroides*, более выраженном в присутствии детергента ЛДАО [14]. Таким образом, показано, что двойная мутация I(M206)Q + F(M208)A, целью которой было повышение гомологии белкового окружения молекул Р и B_A в РЦ *C. sphaeroides*

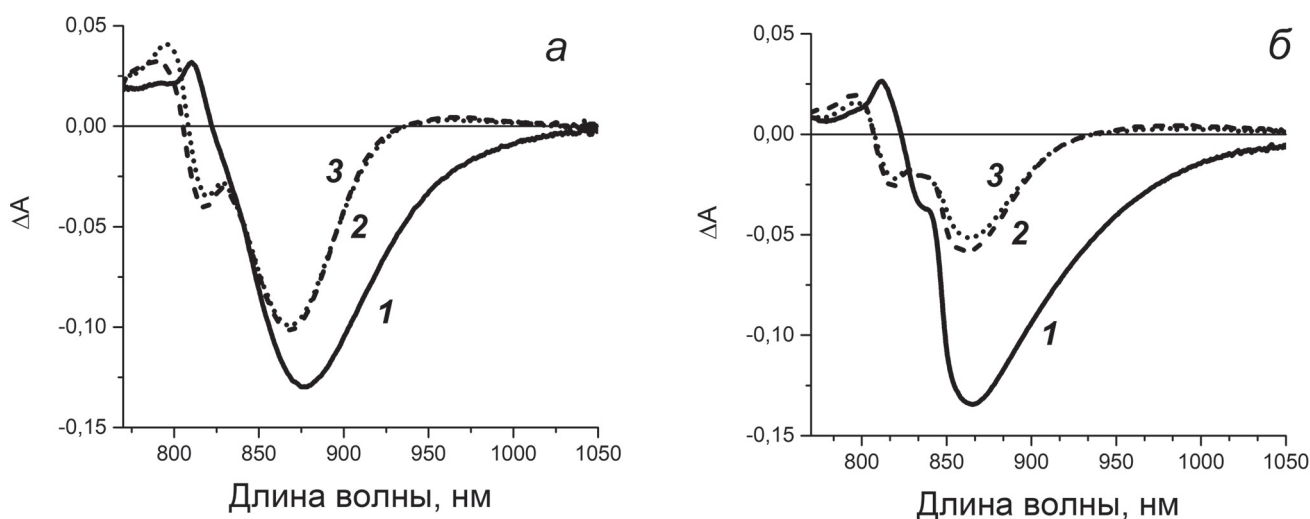


Рис. 4. Разностные «свет–минус–темнота» спектры поглощения, измеренные на задержках времени 0,3 пс (1), 20 пс (2) и 1600 пс (3) для РЦ ДТ *C. sphaeroides* (а) и на задержках времени 0,3 пс (1), 260 пс (2) и 1600 пс (3) для РЦ I(M206)Q (б) при возбуждении в Q_Y полосу Р

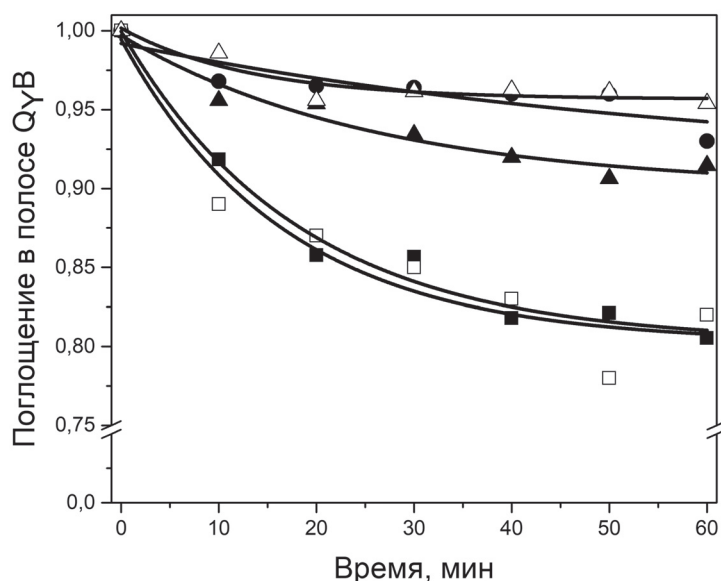


Рис. 5. Изменение поглощения в Q_y В области в спектре РЦ дикого типа (●), I(M206)Q (▲), I(M206)Q + F(M208)A (■), I(M206)Y (△) и I(M206)H (□) пурпурной бактерии *C. sphaeroides*, измеренные в течение 60 мин инкубации при 48 °С в ТХ-буфере

и *Rba. capsulatus*, оказала большее дестабилизирующее влияние на структуру комплекса, по сравнению с одиночной мутацией I(M206)Q. Результаты, приведенные на рис. 5 позволяют предположить, что замещение M206 Ile → Tyr не повлияло на термостабильность РЦ или даже привело к небольшой стабилизации структуры комплекса, например, как было ранее показано для РЦ с замещением M197 Phe → His [29]. Однако при нагревании в буфере с детергентом *n*-октил-глюкозидом при 48 и 55 °С РЦ I(M206)Y проявляли значительно меньшую устойчивость к термальной денатурации по сравнению с РЦ дикого типа (данные не приведены). Таким образом, относительно высокая термостабильность структуры мутантных РЦ I(M206)Y, очевидно, объясняется стабилизирующим действием детергента холата натрия, показанным ранее [24].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как упоминалось во введении, Ile-M206 расположен в непосредственной близости от молекул предполагаемых участников первого этапа разделения зарядов (рис. 1, б). Моделирование аминокислотного замещения I(M206)Q с помощью программы PyMol показывает 16 возможных положений боковой группы Gln в положении M206. В зависимости от положения этой группы замещение M206 Ile → Gln потенциально может изменить взаимодействия любой из перечисленных молекул с их окружением, что должно повлиять на квантовый выход

разделения зарядов в мутантных РЦ. Так, показано, что мутация I(M204)E в РЦ *Rba. capsulatus* привела к образованию водородной связи между внесенным остатком Glu и гидроксильной группой Tyr-M210, что повлияло на кинетику образования состояния $P^+H_A^-$ [16].

В данной работе показано, что аминокислотное замещение I(M206)Q заметно повлияло на спектральные свойства димера Р и мономерных БХл. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что различные факторы могут влиять на положение и амплитуду полосы Q_y Р. Среди них ориентация С2-ацетильной группы БХл, расстояние между макроциклами в димере, электростатическое окружение и другие [30, 31]. Согласно полученным данным, окислительный потенциал Р, и, очевидно, ориентация С2-ацетильной группы БХл Р_В в мутантных РЦ не претерпели значительных изменений. Gln, как и Ile, является нейтральной аминокислотой, поэтому в результате мутации I(M206)Q изменения электростатического окружения Р также не ожидается. Таким образом, причина спектральных изменений в области поглощения димера БХл остается неясной. В связи с перекрытием полос Q_y В и Q_y Р уменьшение поглощения в области Q_y В вблизи 800 нм в мутантных РЦ, по-видимому, связано со снижением амплитуды полосы Q_y Р. Учитывая расположение сайта мутации, длинноволновый сдвиг и снижение амплитуды полосы поглощения Q_y В может свидетельствовать об образовании новых взаимодействий БХл В_А с белком. Как одно из предположений, в мутантных РЦ боковая группа Gln-M206 могла обра-

зовать водородную связь с близкой к месту мутации С9-кето-группой БХл В_А. В этом случае перенос электрона от Р* на В_А через цепочку полярных связей, о котором говорилось выше, окажется затруднен. Как показано в данной работе, в мутантных РЦ I(M206)Q время жизни возбужденного состояния первичного донора электрона Р* составляет ~22 пс, что свидетельствует о значительном замедлении переноса электрона с Р* на БХл В_А и согласуется с этим предположением.

Ранее аналогичное 8-кратное замедление затухания состояния Р* наблюдали в РЦ *C. sphaeroides* с замещением G(M203)L [9]. Структура этого РЦ показала, что в результате мутации вода-А оказалась стерически вытеснена боковой группой лейцина M203. В спектрах поглощения РЦ G(M203)L наблюдали небольшой коротковолновый сдвиг полосы Q_Y Р без уменьшения дипольной силы этой полосы, а также коротковолновый сдвиг полосы Q_Y В без снижения ее амплитуды [9]. Поскольку спектры поглощения РЦ I(M206)Q, описанные в данной работе, и РЦ G(M203)L, описанного ранее [9], существенно отличаются в области полосы Q_Y В (рис. 2), можно предположить, что характер изменений межмолекулярных взаимодействий, вызванный внесением Gln-M206, отличается от изменений, вызванных замещением Gly-M203 на Leu. Для уточнения деталей этих взаимодействий необходима информация о пространственной структуре РЦ I(M206)Q.

Для РЦ I(M206)Q было отмечено уменьшение квантового выхода образования состояния с разделенными зарядами Р⁺Q_А⁻ до ~60% от величины квантового выхода в РЦ ДТ (рис. 4). Наряду с предположением о том, что данная мутация могла повлиять на скорости как прямых, так и обратных реакций переноса электрона (см. раздел «Результаты исследования»), также можно ожидать, что внесение аминокислотного замещения в участок D-спирали M-субъединицы вблизи кофакторов активной цепи фотопереноса электрона могло привести к изменению динамики белка. В недавней работе Dods et al. [32] были показаны заметные изменения конформаций E α-спирали L-субъединицы и D α-спирали M-субъединицы, происходящие в процессе фотохимической реакции, и, по-видимому, связанные с эффективным протеканием этого процесса.

Несмотря на то что генетическая система для направленного мутагенеза и структурно-функциональных исследований РЦ *Rba. capsulatus* была получена раньше, чем для

других пурпурных бактерий [33], закристаллизовать этот комплекс и расшифровать его структуру до настоящего времени не удалось. В работе Foloppe et al. [34] была сделана попытка гомологического моделирования структуры РЦ *Rba. capsulatus* на основе известных к тому времени структур пурпурных бактерий *B. viridis* и *C. sphaeroides* с разрешениями 2,3 Å и 2,8 Å соответственно. Относительно невысокое разрешение структуры РЦ *C. sphaeroides*, используемой для гомологического моделирования, значительно ограничивало возможности этого подхода. Тем не менее были обнаружены небольшие, но достоверные различия во взаимной ориентации мономерных БХл и БФео В-цепи между РЦ *C. sphaeroides* и моделью РЦ *Rba. capsulatus* [34]. Значимых различий в белковом окружении кофакторов активной цепи А, выходящих за пределы ошибки разрешения структуры РЦ *C. sphaeroides*, найдено не было.

До недавнего времени пурпурные несерные бактерии *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* относились к одному роду *Rhodobacter* [1], а их РЦ считались высокогомологичными комплексами [35]. В нашей работе показано, что свойства РЦ *C. sphaeroides* с замещением I(M206)Q существенно отличаются от свойств мутантных РЦ близкородственной бактерии *Rba. capsulatus* с аналогичной заменой I(M204)Q, в которых эта мутация приводила к утере БХл В_А из структуры РЦ [17]. Эти результаты являются достаточно неожиданными, если учитывать высокую консервативность Ile-M206 в РЦ пурпурных бактерий, значительное сходство общей архитектуры двух пигмент-белковых комплексов, одинаковый состав кофакторов, особенности взаимодействия хромофоров с их белковым окружением [36], а также высокую (77%) общую степень гомологии белковых последовательностей этих РЦ [35]. Особенно высока гомология белкового окружения бактериохлорофиллов функционально активных цепей переноса электрона, достигающая 96% для α-спирали D M-субъединиц РЦ.

Предположение о возможных причинах различного влияния замещения Ile → Gln в аналогичных позициях M206 и M204 в РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* может быть сделано на основе экспериментальных данных, полученных ранее Wang et al. [37]. В этой работе было проведено сравнение свойств изолированных РЦ четырех пурпурных бактерий, включая *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus*. Были отмечены разные положения максимумов полос Q_Y Р в спектре поглощения этих РЦ, разные положения максимумов полосы окислен-

ного донора электрона P^+ при 1250 нм, а также отличия в дипольной силе этих полос. Кроме того, было показано различное влияние ионных детергентов на положения максимумов полос $Q_Y P$ в РЦ этих двух бактерий [37]. Одновременно в работе Rautter et al. [38] было показано, что электронная структура P в мембраносвязанных и изолированных РЦ *C. sphaeroides* была одинакова, тогда как в РЦ *Rba. capsulatus* она менялась после выделения этих пигмент-белковых комплексов из мембран. Wang et al. [37] предположили, что РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* отличаются друг от друга характером связывания и электростатического взаимодействия фосфолипидов мембраны с димером БХл и его окружением. Поскольку сайт внесенной мутации M206/M204 расположен непосредственно в белковом окружении P , мы предполагаем, что эти отличия могли послужить причиной различного влияния аминокислотного замещения Ile \rightarrow Gln на свойства РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus*. Также нельзя исключать существование отличий в расстояниях между аминокислотным остатком в положении M206/M204 и ближайшими кофакторами, которые могли послужить причиной разных последствий аналогичного аминокислотного замещения и для выявления которых требуется расшифровка структуры *Rba. capsulatus*.

В данной работе также показано, что аминокислотные замещения I(M206)Q и I(M206)Q + F(M208)A повлияли на устойчивость структуры РЦ к повышенным температурам. Для РЦ двойного мутанта снижение термостабильности было более выражено, чем для РЦ I(M206)Q. Одной из возможных причин изменения стабильности мутантных РЦ может быть повышение подвижности трансмембранной α -спирали D M-субъединицы РЦ (рис. 1, б) за счет уменьшения парциального молекулярного объема аминокислотных остатков в положениях M206 и M208 в результате внесения мутаций. Так, замещение гидрофобного остатка Ile на полярный Gln приводит к локальному уменьшению объема остатка в положении M206 на 11,7 см³/моль, а замещение гидрофобных остатков Phe \rightarrow Ala в положении M208 уменьшает парциальный объем в данном участке на 38,6 см³/моль [39]. Таким образом, суммарное уменьшение парциального молекулярного объема остатков M206 и M208 в D-спирали M-субъединицы за счет двойной мутации I(M206)Q + F(M208)A составляет 50,3 см³/моль, что сопоставимо с объемом небольшого аминокислотного остатка. Можно ожидать, что такое изменение приводит к нарушению плот-

ной упаковки трансмембранного участка белка вблизи бактериохлорофиллов P и V_A , ослаблению Ван-дер-Ваальсовых и гидрофобных взаимодействий в этой области и, как следствие, к снижению стабильности мутантных РЦ. Следует также заметить, что 28 аминокислотных остатков D-спиралей M-субъединиц РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* отличаются только одним остатком в положении M208 [35], и этот сайт в РЦ *C. sphaeroides* является местом связывания гликолипида [15]. Можно предположить существование различий во взаимодействии двух РЦ с этим липидом, что также могло послужить причиной дестабилизации РЦ *C. sphaeroides* после внесения замещения M208 Phe \rightarrow Ala.

Таким образом, в данной работе получен и охарактеризован новый мутантный РЦ *C. sphaeroides* с аминокислотным замещением Ile \rightarrow Gln в положении M206 вблизи молекул БХл P_V и V_A в активной цепи кофакторов. Показано, что данная мутация не приводит к изменению пигментного состава комплекса, но заметно влияет на спектральные свойства кофакторов, близких к месту мутации, на время жизни P^* и на квантовый выход разделения зарядов, что, возможно, связано с образованием новых межмолекулярных взаимодействий в активной цепи кофакторов. Свойства РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* с одинаковым замещением Ile \rightarrow Gln в аналогичных позициях отличаются значительно, что, возможно, объясняется различиями во взаимодействиях этих комплексов с липидами фотосинтетической мембраны.

Вклад авторов. Л.Г. Васильева – концепция и руководство работой; Т.Ю. Фуфина, О.А. Третчикова, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов – проведение экспериментов; Л.Г. Васильева, Т.Ю. Фуфина, О.А. Третчикова, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов – обсуждение результатов исследования; Л.Г. Васильева, Т.Ю. Фуфина, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов – написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания № 122041100204-3.

Благодарности. Авторы выражают благодарность М.М. Леоновой за ее вклад в начальный этап работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hordt, A., Lopez, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., et al. (2020) Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of *Alphaproteobacteria*, *Front. Microbiol.*, **11**, 468, doi: 10.3389/fmicb.2020.00468.
- Wöhri, A. B., Wahlgren, W. Y., Malmerberg, E., Johansson, L. C., Neutze, R., K et al. (2009) Lipidic sponge phase crystal structure of a photosynthetic reaction center reveals lipids on the protein surface, *Biochemistry*, **48**, 9831-9838, doi: 10.1021/bi900545e.
- Selikhhanov, G., Fufina, T., Vasilieva, L., Betzel, C., and Gabdulkhakov, A. (2020) Novel approaches for the lipid sponge phase crystallization of the *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center, *IUCrJ*, **7**, 1084-1091, doi: 10.1107/S2052252520012142.
- Komiya, H., Yeates, T. O., Rees, D. C., Allen, J. P., and Feher, G. (1988) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: symmetry relations and sequence comparisons between different species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9012-9016, doi: 10.1073/pnas.85.23.9012.
- Wraight, C. A., and Clayton, R. K. (1974) The absolute quantum efficiency of bacteriochlorophyll photooxidation in reaction centres of *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 246-260, doi: 10.1016/0005-2728(74)90009-7.
- Леонова М. М., Фуфина Т. Ю., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2014) Исследование пигмент-белковых взаимодействий в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий. Глава в кн. Современные проблемы фотосинтеза, том 1 (под ред. Аллахвердиева С. И., Рубина А. Б., Шувалова В. А.), Ижевский Институт компьютерных исследований, Москва–Ижевск, с. 157-196.
- Alden, R. G., Parson, W. W., Chu, Z. T., and Warshel, A. (1996) Orientation of the OH dipole of tyrosine (M)210 and its effect on electrostatic energies in photosynthetic bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem.*, **100**, 16761-16770, doi: 10.1021/jp961271s.
- Yakovlev, A. G., Vasilieva, L. G., Shkuropatov, A. Ya., Bolgarina, T. I., Shkuropatova, V. A., et al. (2003) Mechanism of charge separation and stabilization of separated charges in reaction centers of *Chloroflexus aurantiacus* and of YM210W(L) mutants of *Rhodobacter sphaeroides* excited by 20 fs pulses at 90 K, *J. Phys. Chem. A*, **107**, 8330-8338, doi: 10.1021/jp0300647.
- Potter, J. A., Fyfe, P. K., Frolov, D., Wakeham, M. C., van Grondelle, R. B. R., et al. (2005) Strong effects of an individual water molecule on the rate of light-driven charge separation in the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center, *J. Biol. Chem.*, **280**, 27155-27164, doi: 10.1074/jbc.M501961200.
- Robert, B., and Lutz, M. (1988) Proteic events following charge separation in the bacterial reaction center: resonance Raman spectroscopy, *Biochemistry*, **27**, 5108-5114, doi: 10.1021/bi00414a024.
- Yakovlev, A. G., Jones, M. R., Potter, J. A., Fyfe, P. K., Vasilieva, L. G., et al. (2005) Primary charge separation between P* and B_A: electron-transfer pathways in native and mutant GM203L bacterial reaction centers, *Chem. Phys.*, **319**, 297-307, doi: 10.1016/j.chemphys.2005.08.018.
- Болгарина Т. И., Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г., Шкuropatov А. В., Шувалов В. А. (2004) Замещение изолейцина M206 на гистидин в реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides* приводит к изменению структуры молекулы бактериохлорофилла специальной пары, *Доклады Академии наук*, **394**, 265-268, doi: 10.1023/b:dobi.0000017147.33235.b4.
- Фуфина Т. Ю., Селиханов Г. К., Проскуряков И. И., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2019) Свойства реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides* с аминокислотными замещениями Ile на Tyr в позициях L177 и M206, *Биохимия*, **5**, 739-744, doi: 10.1134/S0006297919050110.
- Васильева Л. Г., Фуфина, Т. Ю., Габдулхаков, А. Г., Шувалов, В. А. (2015) Разные последствия одинаковых симметричных мутаций вблизи димера бактериохлорофилла в реакционном центре *Rhodobacter sphaeroides*. *Биохимия*, **80**, 767-774, doi: 10.1134/S0006297915060012.
- Camara-Artigas, A., Brune, D., and Allen J. P. (2002) Interactions between lipids and bacterial reaction centers determined by protein crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11055-11060, doi: 10.1073/pnas.162368399.
- Saggu, M., Carter, B., Zhou, X., Faries, K., Cegelski, L., et al. (2014) Putative hydrogen bond to tyrosine M208 in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter capsulatus* significantly slows primary charge separation, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 6721-6732, doi: 10.1021/jp503422c.
- Carter, B., Boxer, S. G., Holten, D., and Kirmaier, C. (2012) Photochemistry of a bacterial photosynthetic reaction center missing the initial bacteriochlorophyll electron acceptor, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 9971-9982, doi: 10.1021/jp305276m.
- Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г., Фуфина Т. Ю., Болгарина Т. И., Шувалов В. А. (2005) Влияние замещения изолейцина L177 гистидином на пигментный состав и свойства реакционных центров пурпурной бактерии *Rhodobacter*

- sphaeroides*, *Биохимия*, **70**, 1527-1533, doi: 10.1007/s10541-005-0256-3.
19. Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trollinger, D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria, *Gene*, **70**, 191-197, doi: 10.1016/0378-1119(88)90117-5.
 20. Jones, M. R., Visschers, R. W., van Grondelle, R., and Hunter, C. N. (1992) Construction and characterization of a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* with the reaction center as the sole pigment-protein complex, *Biochemistry*, **31**, 4458-4465, doi: 10.1021/bi00133a011.
 21. Cohen-Basire, G., Siström, W. R., and Stanier, R. Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria, *J. Cell Comp. Physiol.*, **49**, 25-68, doi: 10.1002/jcp.1030490104.
 22. Goldsmith, J. O., and Boxer, S. G. (1996) Rapid isolation of bacterial photosynthetic reaction centers with an engineered poly-histidine tag, *Biochim. Biophys. Acta*, **1276**, 171-175, doi: 10.1016/0005-2728(96)00091-6.
 23. Fufina, T. Yu., Vasilieva, L. G., Khatypov, R. A., Shkuropatov, A. Ya., and Shuvalov, V. A. (2007) Substitution of isoleucine L177 by histidine in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center results in the covalent binding of P_A bacteriochlorophyll to the L subunit, *FEBS Lett*, **581**, 5769-5773, doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.032.
 24. Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г. (2021) Влияние детергентов и осмолитов на термостабильность нативных и мутантных реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **86**, 607-614, doi: 10.1134/S000629792104012X.
 25. Vasilieva, L. G., Fufina, T. Yu., Gabdulkhakov, A. G., Leonova, M. M., Khatypov, R. A., et al. (2012) The site-directed mutation I(L177)H in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center affects coordination of P_A and B_B bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407-1417, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.008.
 26. Хатыпов Р. А., Христин А. М., Фуфина Т. Ю., Шувалов В. А. (2017) Альтернативный путь индуцированного светом трансмембранного переноса электрона в фотосинтетических реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **82**, 916-922, doi: 10.1134/S0006297917060050.
 27. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL molecular graphics system, URL: <http://www.Pymol.Org>.
 28. Jones, M. R. (2008) Structural plasticity of reaction centers from purple bacteria, in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., and Beatty, N., eds) Springer, pp. 295-321.
 29. Holden-Dye, K., Crouch, L. I., Williams, C. M., Bone, R. A., Cheng, J., et al. (2011) Opposing structural changes in two symmetrical polypeptides bring about opposing changes to the thermal stability of a complex integral membrane protein, *Arch. Biochem. Biophys.*, **505**, 160-170, doi: 10.1016/j.abb.2010.09.029.
 30. Spiedel, D., Roszak, A. W., McKendrick, R., McAuley, K. E., Fyfe, P. K., et al. (2002) Tuning of the optical and electrochemical properties of the primary donor bacteriochlorophylls in the reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides*: spectroscopy and structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1554**, 75-93, doi: 10.1016/S0005-2728(02)00215-3.
 31. Haffa, A. L. M., Lin, S., Katilius, E., Williams, J. C., Taguchi, A. K. W., et al. (2002) The dependence of the initial electron-transfer rate on driving force in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 7376-7384, doi: 10.1021/jp0257552.
 32. Dods, R., Bath, P., Morozov, D., Gagner, V. A., Arnlund, D., et al. (2021) Ultrafast structural changes within a photosynthetic reaction centre, *Nature*, **589**, 310-314, doi: 10.1038/s41586-020-3000-7.
 33. Youvan, D. C., Ismail, S., and Bylina, E. J. (1985) Chromosomal deletion and plasmid complementation of the photosynthetic reaction center and light-harvesting genes from *Rhodospseudomonas capsulate*, *Gene*, **38**, 19-30, doi: 10.1016/0378-1119(85)90199-4.
 34. Foloppe, N., Ferrand, M., Breton, J., and Smith, J. C. (1995) Structural model of the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter capsulatus*, *Proteins*, **22**, 226-244, doi: 10.1002/prot.340220304.
 35. Michel, H., Epp, O., and Deisenhofer, J. (1986) Pigment-protein interactions in the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*, *EMBO J.*, **5**, 2445-2451, doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04520.x.
 36. Lancaster, C. R. D., Ermler, U., and Michel, H. (1995) The structures of photosynthetic reaction centers from purple bacteria as revealed by X-ray crystallography. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, *Advances in Photosynthesis and Respiration* v. 2. (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., eds) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 503-526, doi: 10.1007/0-306-47954-0_23.
 37. Wang, S., Lin, S., Lin, X., Woodbury, N. W., and Allen, J. P. (1994) Comparative study of reaction centers from purple photosynthetic bacteria: Isolation and optical spectroscopy, *Photosynth. Res.*, **42**, 203-215, doi: 10.1007/BF00018263.
 38. Rautter, J., Lenzian, F., Lubitz, W., Wang, S., and Allen, J. P. (1994) Comparative study of reaction centers from photosynthetic purple bacteria: electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopy, *Biochemistry*, **33**, 12079, doi: 10.1021/bi00206a010.
 39. Нолдинг Б. (2005) *Новейшие методы исследования биосистем*, Техносфера, Москва.

**PROPERTIES OF MUTANT PHOTOSYNTHETIC
REACTION CENTERS OF PURPLE NON-SULFUR BACTERIA
Cereibacter sphaeroides WITH SUBSTITUTION M206 Ile → Gln**

T. Yu. Fufina, O. A. Tretchikova, A. M. Khristin, R. A. Khatypov, and L. G. Vasilieva*

*Institute of Basic Biological Problems Federal Research Center Pushchino Scientific Center for Biological Research,
Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: vsyulya@mail.ru*

In the structure of the photosynthetic reaction center (RC) of the purple bacterium *Cereibacter sphaeroides* the highly conserved amino acid residue Ile-M206 is located near the primary electron donor P and the accessory bacteriochlorophyll molecule B_A, which is the nearest electron acceptor. Since Ile-M206 is close to the C2-acetyl carbonyl group of bacteriochlorophyll P_B, the hydroxyl group of Tyr-M210, the C9-keto group of bacteriochlorophyll B_A, and a water molecule near the latter group, this site is useful for introducing mutations in order to study mechanisms of primary photochemical processes in the RC. Previously it was shown, that in the RC of the closely related purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*, the Ile → Glu substitution at M204 position (analog of M206 in the RC of *C. sphaeroides*) significantly affected the kinetics of the P⁺H_A⁻ state formation whereas M204 Ile → Gln replacement led to the loss of BChl B_A molecule from the complex structure. In the present work, it is shown that introduction of the single I(M206)Q or double I(M206)Q + F(M208)A amino acid substitutions in the RC of *C. sphaeroides* do not change the pigment composition or redox properties of primary electron donor. However, substitution of Ile M206 by Gln affected positions and amplitudes of the absorption bands of bacteriochlorophylls, increased lifetime of the primary electron donor P* excited state from 3.1 ps to 22 ps, and decreased quantum yield of the P⁺Q_A⁻ state to 60%. These data suggest significant changes in pigment-protein interactions near the primary electron donor P and the nearest electron acceptor B_A. A considerable decrease in thermal stability of the RC I(M206)Q + F(M208)A was also noticed that apparently associated with disturbance of the dense packing of the membrane protein environment of bacteriochlorophylls P_B and B_A. Possible reasons for different effects of identical mutations on the properties of the two highly homologous RCs from closely related purple non sulfur bacteria are discussed.

Keywords: photosynthesis reaction center, *Rhodobacter capsulatus*, *Cereibacter sphaeroides*, bacteriochlorophyll, purple non sulfur bacteria, photochemical charge separation, quantum yield, pigment composition, redox potential, primary electron donor, thermal stability of membrane proteins

КОМПЛЕКС LH2 ИЗ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *Allochrodatum vinosum* – ПРИРОДНЫЙ СЕНСОР СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

© 2022 З.К. Махнева, Т.Н. Смолова, М.А. Большаков*, А.А. Москаленко

ФИЦ ПНЦБИ, Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: lfbv22@gmail.com

Поступила в редакцию 01.06.2022

После доработки 19.08.2022

Принята к публикации 19.08.2022

Установлено, что в гетерогенной модельной системе, которая состояла из двух типов комплексов: реакционного центра или кор-комплекса фотосистемы 2 высших растений и комплекса LH2 серной бактерии *Allochrodatum vinosum*, при освещении в красную полосу поглощения хлорофилла светом с длиной волны 662 нм регистрируется окисление бактериохлорофилла (БХл) 850 комплекса LH2. Показано, что этот процесс вызывает синглетный кислород, который генерируется в комплексах фотосистемы 2, а затем частично диффундирует в комплекс LH2, где окисляет БХл850. Методом ВЭЖХ установлено, что при этом образуется продукт окисления БХл – 3-ацетил-хлорофилл. Процесс окисления БХл850 ингибируется тушителями синглетного кислорода (тролокс и аскорбат натрия). Предполагается, что комплекс LH2 из серной бактерии *Alc. vinosum* можно использовать для определения генерации синглетного кислорода хлорофилл-содержащими образцами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: серные фотосинтезирующие бактерии, комплекс LH2, комплексы фотосистемы 2, синглетный кислород, свет 662 нм, окисление БХл850.

DOI: 10.31857/S0320972522100116, **EDN:** BDH1NQ

ВВЕДЕНИЕ

Пурпурные фотосинтезирующие бактерии имеют один из самых простых фотосинтетических аппаратов, который состоит, как правило, из двух светособирающих комплексов (LH1 и LH2), а также реакционного центра (RC). Их интенсивное исследование началось во второй половине прошлого века с изучения возможности получения этих комплексов в чистом виде. Впервые такой результат (комплекс LH2 и смесь комплексов LH2–LH1–RC) был получен на мембранах фотосинтезирующей несерной бактерии *Cereibacter* (ранее *Rhodobacter sphaeroides*) при использовании центрифугирования [1]. Позднее один из авторов данной работы, используя электрофорез в ПААГ, разделил комплексы LH2 и LH1–RC из мембран *Allochrodatum vinosum* (старое название *Allochrodatum minutissimum*), обработанных неионным детергентом Triton X-100 (неопубликованные данные). На основе этих данных

был создан аппарат и разработана методика для выделения комплексов LH2 и LH1–RC из мембран *Alc. vinosum* в препаративных количествах [2, 3]. Выделенные этим методом комплексы LH1–RC позволили коллективу авторов, в котором ведущую роль играл В.А. Шувалов, впервые получить «экспериментальные доказательства фотосенсибилизированного бактериохлорофиллом (БХл) переноса электрона с цитохрома *c* на пигментный комплекс P-760 (с участием бактериофеофитина-760, а также бактериохлорофилла-800) в реакционных центрах *Chromatium minutissimum*» и впервые высказать предположение о том, что бактериофеофитин является первичным акцептором электрона в RC фотосинтезирующих бактерий [4, 5].

Основным комплексом (по количеству пигментов и копий в клетке) фотосинтезирующих бактерий является комплекс LH2, который поглощает энергию квантов света, переводит её в энергию электронного возбуждения и передаёт последнюю к комплексам LH1, а далее – к RC.

Принятые сокращения: АцХл – 3-ацетил-хлорофилл; БХл – бактериохлорофилл; Хл – хлорофилл; LH1 и LH2 – светособирающие комплексы; RC – реакционный центр; ФС II – фотосистема 2; кор-комплексы – кислород-выделяющие комплексы.

* Адресат для корреспонденции.

Этот комплекс построен из двух типов гидрофобных полипептидов (α и β), количество которых варьирует в пределах 8–12 пар у разных бактерий. С полипептидами нековалентно связаны БХл и каротиноиды в соотношении: 2 полипептида/3 БХл/1 каротиноид. Таким образом, один комплекс содержит 24–36 молекул БХл и 8–12 молекул каротиноидов. Существенно, что эти пигменты поглощают в разных областях спектра. Полосы поглощения БХл локализованы при ~385 нм (полоса Core), ~590 нм (Q_x -переход), при ~800 и ~850 нм (в ближней ИК-области, Q_y -переходы БХл), а каротиноидов – в области ~400–550 нм [6–9].

Известно, что каротиноиды являются вспомогательными пигментами бактериального фотосинтеза и выполняют *in vivo* несколько функций, в частности, светособирающую, структурную, защитную и т.д. ([10–12] и представленные там ссылки). Например, общепринято, что защитные свойства каротиноидов *in vivo* основаны на их способности эффективно дезактивировать триплетные состояния БХл, а также тушить синглетный кислород, который образуется при взаимодействии кислорода с указанными триплетными состояниями БХл ([12–14] и представленные там ссылки). Занимаясь изучением свойств комплексов LH2 из серных фотосинтезирующих бактерий и вхо-

дящих в их состав пигментов, мы обнаружили принципиально иную функцию каротиноидов у некоторых серных бактерий, а именно их способность генерировать синглетный кислород при освещении комплексов LH2 (или мембран) в сине-зелёную область спектра, в которой поглощают эти пигменты [15–17]. Данная функция была выявлена благодаря необычным свойствам молекул БХл850 комплекса LH2, у которых во втором пиррольном кольце в положении 7' и 8' присутствуют два свободных протона. При действии любого окисляющего агента на комплекс LH2 из *Alc. vinosum* эти протоны отрываются с образованием двойной связи, что, в свою очередь, приводит к образованию в молекуле БХл хлорофилл-подобной системы сопряжённых двойных связей, и она переходит в 3-ацетил-хлорофилл (АцХл), который, в принципе, может быть промежуточным продуктом окисления. На спектре поглощения этот эффект проявляется как уменьшение длинноволновой полосы поглощения БХл850 комплекса LH2 в ближней ИК-области и появление небольшого максимума АцХл при 700 нм [18]. Ранее мы предположили, что способность БХл850 в комплексе LH2 окисляться синглетным кислородом означает, что он может быть использован как природный сенсор этого агента [19]. Данное предположение про-

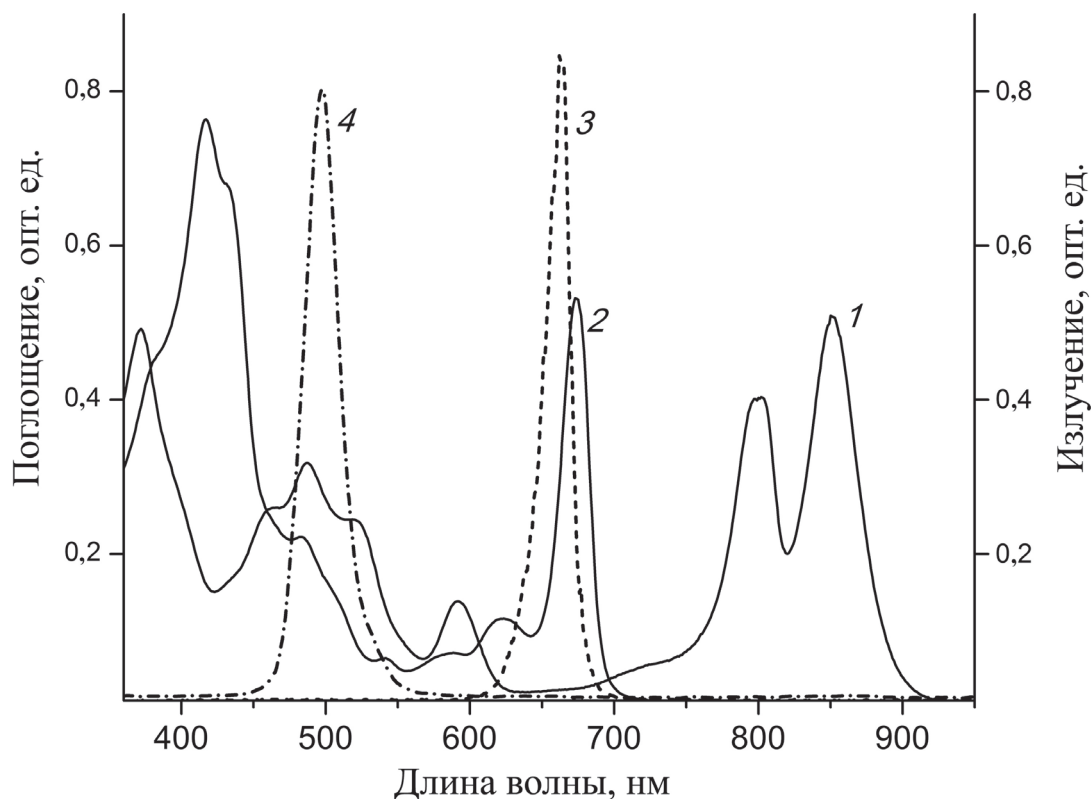


Рис. 1. Спектры поглощения комплекса LH2 из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. vinosum* (1) и RC ФС II из шпината (2). Спектры излучения светодиодов с максимумами при 662 нм (3) и 498 нм (4)

стимулировало нас изучить возможность использования комплекса LH2 для определения возможности генерации синглетного кислорода в системах, которые бы включали образцы, способные к выделению последнего. В качестве подобных препаратов были использованы комплексы фотосистемы 2 (ФС II) высших растений. Полученные результаты, которые позволили положительно ответить на данное предположение, представлены в настоящей работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были образцы из бактерий и растений. Комплекс LH2 выделен из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. vinosum*, штамм МГУ (старое название *Alc. minutissimum*), получен из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Методики выращивания бактерии, выделения мембран и комплексов LH2 подробно описаны ранее [20, 21]. Фрагменты мембран, обогащённых ФС II, получали из листьев шпината [22], из которых выделяли кислород-выделяющие комплексы – кор-комплексы [23]. Изолированные РС ФС II выделяли на колонке Toyopearl DEAE 650S («Toyo Soda», Япония) [24], с модификациями [25].

Спектры поглощения используемых препаратов (комплекс LH2 и РС ФС II) показаны на рис. 1. Известно, что спектр поглощения комплекса РС ФС II отличается от кор-комплекса только соотношением полос в области 410–435 нм благодаря обогащению первого феофитином, поэтому спектр поглощения кор-комплекса ФС II на рис. 1 не показан.

В опытах использованы как отдельные образцы, так и их смесь. Во втором случае поглощение каждого комплекса в длинноволновом максимуме составляло около 1 оптической единицы. В качестве источника света были использованы светодиоды мощностью 30 Вт с максимумом длины излучения при 662 и 498 нм («Lcfocus green», Китай). Длина излучения светодиодов подбиралась таким образом, чтобы они излучали в области, где поглощает Хл и практически не поглощает БХл (светодиод 662 нм) или в области поглощения бактериальных каротиноидов (светодиод 498 нм), которые обозначены как свет 662 и 498 соответственно. Спектры излучения указанных светодиодов представлены на рис. 1. Для экспериментов были применены специальные держатели светодиодов, включающие металлическую пластину, на одной стороне которой был закреплён большой радиатор с вентилятором, а на другой

имелись отверстия для крепления светодиода. Для лучшего отведения тепла от светодиода была использована термопаста. Сам светодиод сверху был прикрыт стеклянной линзой, которая обеспечивала более равномерное световое поле и дополнительную защиту образца от возможного перегрева. Эксперименты с освещением образцов проводились непосредственно в кюветном отделении спектрофотометра Cary 50 («Agilent Technology», США) при комнатной температуре (~24 °С). Для этого была изготовлена фальш-крышка с отверстием, которая закреплялась на спектрофотометре с открытой собственной крышкой так, чтобы центр её отверстия совпадал с центром кюветы. Указанное отверстие накрывали пластиной со светодиодом и радиатором. Расстояние от светодиода до центра кюветы составляло 6 см. Такая конструкция позволяла и проводить освещение образца, и регистрировать его спектр поглощения после выключения светодиода. Интенсивность светового потока светодиода была около 80 Вт/м². Ошибка измерения во всех опытах не превышала 5–10%.

Скорость выделения синглетного кислорода в препаратах ФС II определяли по светозависимому поглощению кислорода амперометрическим методом в ячейке с электродом Кларка, как описано ранее [26]. Образец освещали красным светом (светофильтр КС-11) интенсивностью 400 Вт/м² с помощью диапроектора ЛЭТИ 60М, лампа КГМ 220-500 (Россия) в течение 1–2 мин в термостатируемой ячейке при 25 °С. Измерения проводили при постоянном перемешивании, чтобы не допустить образования зоны с низкой концентрацией кислорода у поверхности электрода. Объем образца составлял 1 мл, а концентрация Хл варьировала в пределах 1,7–2,2 мкМ (РС и кор-комплекс соответственно). В качестве контроля использовали величину сигнала полярографа без освещения пробы светом или освещение красным светом растворов, не содержащих Хл. Электрод калибровали по сигналу при добавлении избытка дитионита в ячейку. Измерение светозависимого поглощения кислорода (выделение синглетного кислорода) изолированными РС и кор-комплексом ФС II в присутствии гистидина проводили, как описано ранее [27]. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Для ВЭЖХ-анализа освещение проводили в 0,2 мм термостатируемой кювете в течение 45 мин, а система со светодиодом была установлена вертикально. Для эксперимента использована смесь «кор-комплекс ФС II/комплекс LH2», плотность которой была увеличена в 5 раз, что позволило исключить лиш-

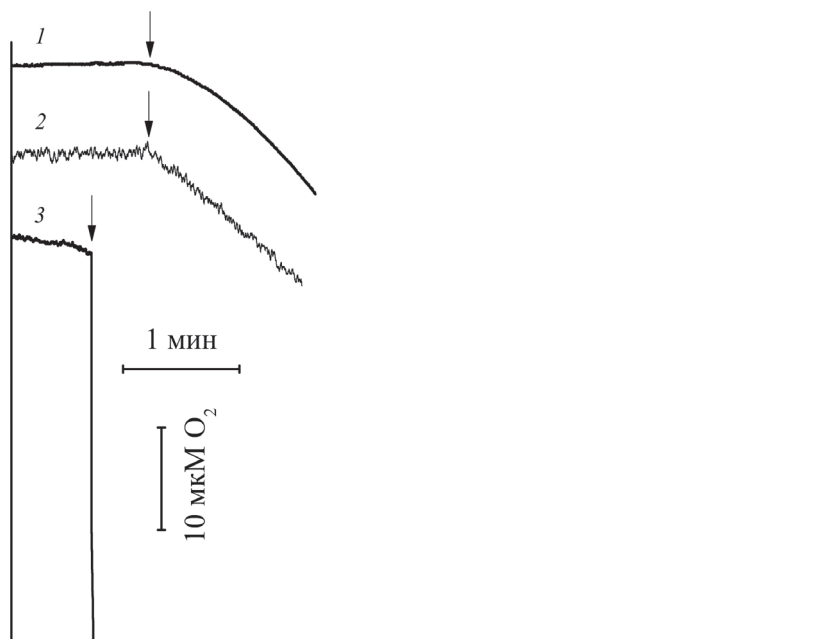


Рис. 2. Светозависимое поглощение кислорода изолированными RC (1) и кор-комплексом ФС II (2) в присутствии гистидина. Изменение концентрации кислорода в ячейке с электродом Кларка при добавлении дитионита (3)

ние манипуляции с образцом. Комплексы LH2 и ФС II разделяли электрофорезом в ПААГ по разработанной нами методике [3]. Комплекс LH2 элюировали из геля и концентрировали центрифугированием в пробирках («Millipore», США). Пигменты экстрагировали смесью ацетон/метанол (7/2, v/v) и переводили в этилацетат. Пигментный анализ комплексов LH2 до и после освещения проводили с помощью ВЭЖХ-системы Shimadzu («Shimadzu», Япония), используя колонку с обращённой фазой Agilent Zorbax SB-C18 5 мкм $4,6 \times 250$ мм («Agilent», США). Каротиноиды, БХл и его продукты окисления идентифицировали по времени удержания на колонке и по спектру поглощения с помощью программного обеспечения LC solution («Shimadzu») [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ранее при изучении процесса фотоокисления БХл850 в комплексах LH2 из серных бактерий мы использовали разные типы светофильтров: стеклянные, широкополосные интерференционные и узкополосные (стандартные) интерференционные [15–17, 29]. Все они имели существенные недостатки, так как могли обеспечить высокую интенсивность освещения только при широкой полосе пропускания (стеклянные фильтры) или более узкую полосу пропускания при существенном снижении интенсивности светового потока (интерферен-

ционные светофильтры). Поэтому для данной работы были применены фотодиоды с узкой полосой излучения, которые по параметрам полуширины (21–32 нм) были близки к стандартным интерференционным светофильтрам (10–15 нм). На первом этапе необходимо было убедиться, что освещение светом с длиной волны 662 нм не вызывает изменений в спектре поглощения комплекса LH2 (рис. 3, а).

На этом рисунке хорошо видно, что даже после 30 мин освещения светом 662 нм изменения в спектре поглощения комплекса LH2 незначительны и не превышают 0,05 ед. оптической плотности. На разностном спектре образца в ближней ИК-области появляется отрицательная полоса с максимумом при 864 нм и положительная – с максимумом при 837 нм (результаты не показаны). Можно предположить, что при освещении светом 662 нм основным процессом в комплексе является смещение небольшой части полос БХл в коротковолновую область. Для сравнения на рис. 3, б приведены результаты изменений в спектре поглощения комплекса LH2 при освещении светом 498 нм, при действии которого на каротиноиды идёт образование синглетного кислорода. В этом случае полоса поглощения уменьшается в 2 раза и смещается на 14 нм в коротковолновую область. Одновременно появляется полоса поглощения окисленного БХл (АцХл) с максимумом при 700 нм. Аналогичные результаты были получены ранее при использовании стеклянных и интерференционных светофиль-

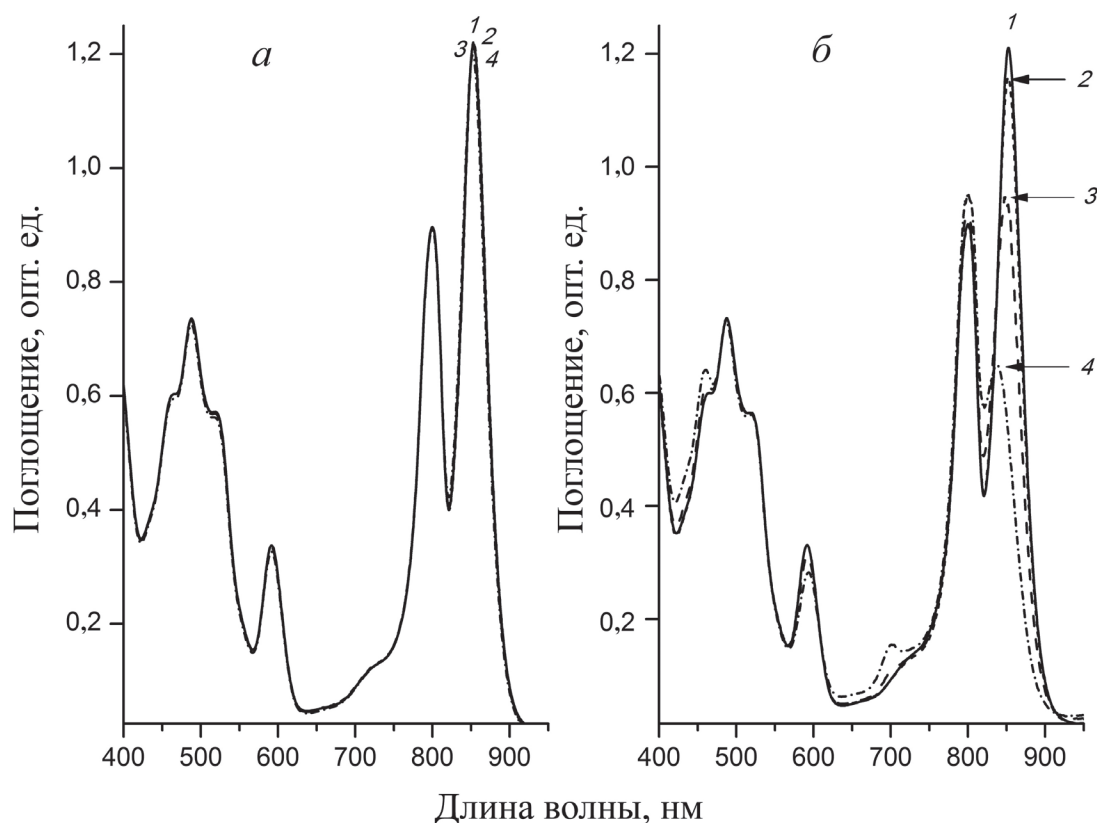


Рис. 3. Изменения в спектре поглощения комплекса LH2 из *Alc. vinosum* при освещении светом 662 нм (а) и светом 498 нм (б): 1 – контроль, 2 – 2 мин, 3 – 10 мин, 4 – 30 мин

тров [15–17, 29]. Отметим, что в нашей работе и цитируемых статьях отмечено монотонное увеличение полосы поглощения АцХл. Это может свидетельствовать о том, что в рассматриваемом процессе и образце АцХл является первичным продуктом окисления. Следует отметить, что окисление БХл в разных типах растворителей происходит иначе: кроме АцХл (до четырёх разных типов), который в модельных системах является промежуточным продуктом окисления, в образцах обнаружено присутствие ещё 6 продуктов окисления БХл (бесцветных или с открытым кольцом) [30].

При освещении светом 662 нм смеси «РС ФС II/комплекс LH2» отмечено два процесса. Во-первых, это выцветание красной полосы РС ФС II на 60% за 30 мин, без смещения основного максимума этой полосы (рис. 4, а). Такой же эффект был отмечен при измерении скорости выделения синглетного кислорода в присутствии гистидина в работе Telfer et al. [27] и наших аналогичных экспериментах (результаты не показаны). Отметим, что все остальные изменения в данной смеси в области 360–650 нм тоже связаны с выцветанием полос поглощения Хл в РС ФС II. Во-вторых, в этих условиях выцветает длинноволновая полоса БХл850 комплекса LH2 на ≈10%, и одно-

временно её максимум смещается на 3–4 нм в коротковолновую область. Косвенно это свидетельствует о том, что происходит окисление БХл850. К сожалению, не удалось зафиксировать на спектре поглощения появления продукта окисления БХл, так как его полоса маскируется красной полосой РС ФС II. Если к комплексу LH2 был добавлен кор-комплекс, в котором присутствуют дополнительные молекулы Хл, локализованные в комплексах CP43 и CP47, то полоса БХл850 при освещении светом 662 нм выцветает на ≈20% (рис. 4, б). Это может свидетельствовать о том, что дополнительные молекулы Хл вносят вклад в генерацию синглетного кислорода и последующее окисление БХл850.

Из сравнения разностных спектров исследуемых образцов следует, что изменения в комплексе LH2 в смеси с препаратами ФС II при освещении светом 662 нм и в таком же индивидуальном комплексе при освещении светом 498 нм однотипны (рис. 5), что подтверждает факт взаимодействия синглетного кислорода, который образуется в комплексах ФС II, с БХл850 комплекса LH2. К сожалению, ни на одном из разностных спектров также не было зафиксировано появления полосы поглощения АцХл. Отметим, что даже при сильном окис-

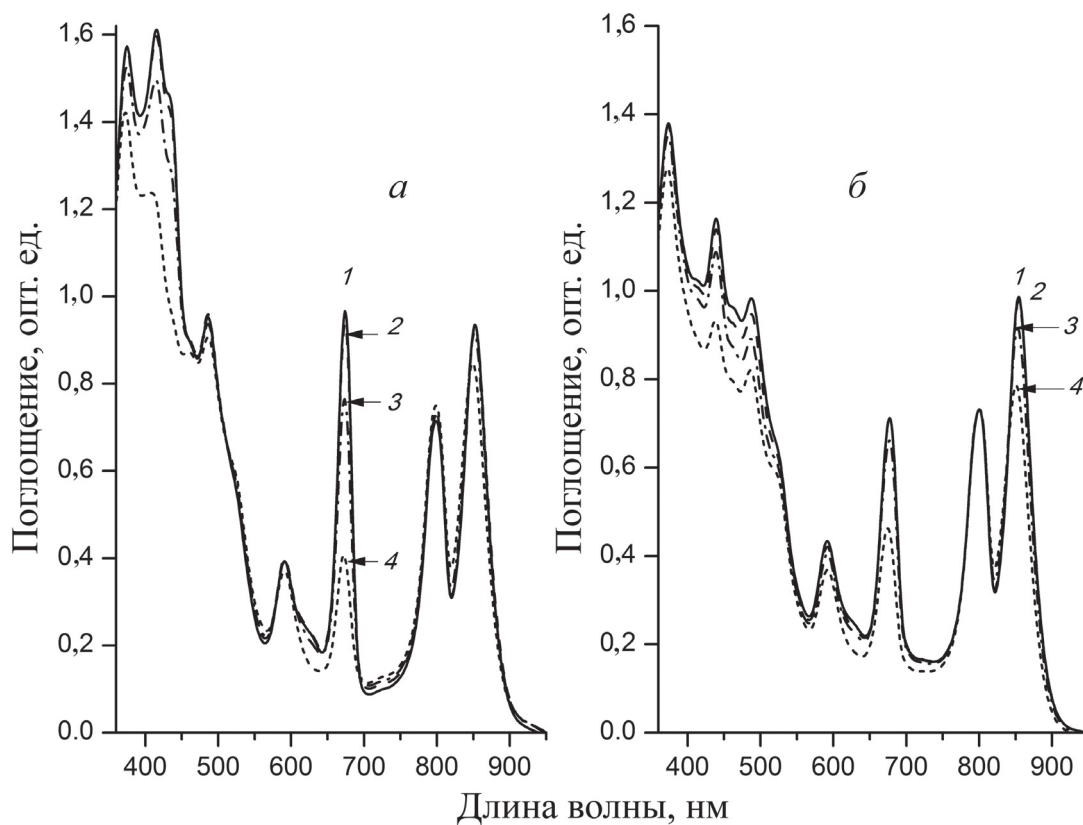


Рис. 4. Изменения в спектре поглощения смеси: «комплекс LH2 из *Alc. vinosum* и RC ФС II» (а) или «комплекс LH2 и кор-комплекс ФС II» (б) при освещении светом 662 нм: 1 – контроль, 2 – 2 мин, 3 – 10 мин, 4 – 30 мин

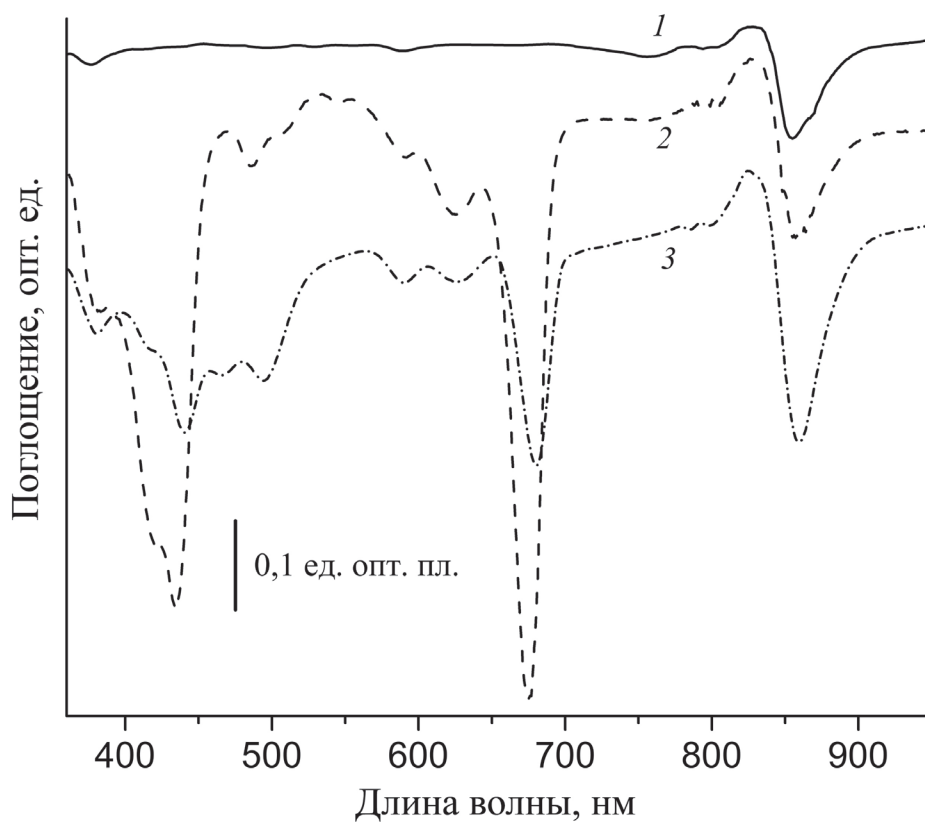


Рис. 5. Разностные спектры поглощения: 1 – «контрольный комплекс LH2 – освещение 5 мин светом 498 нм», 2 – «контрольный комплекс RC ФС II + комплекс LH2» – освещение 30 мин светом 662 нм, 3 – «контрольный кор-комплекс ФС II + комплекс LH2» – освещение 30 мин светом 662 нм

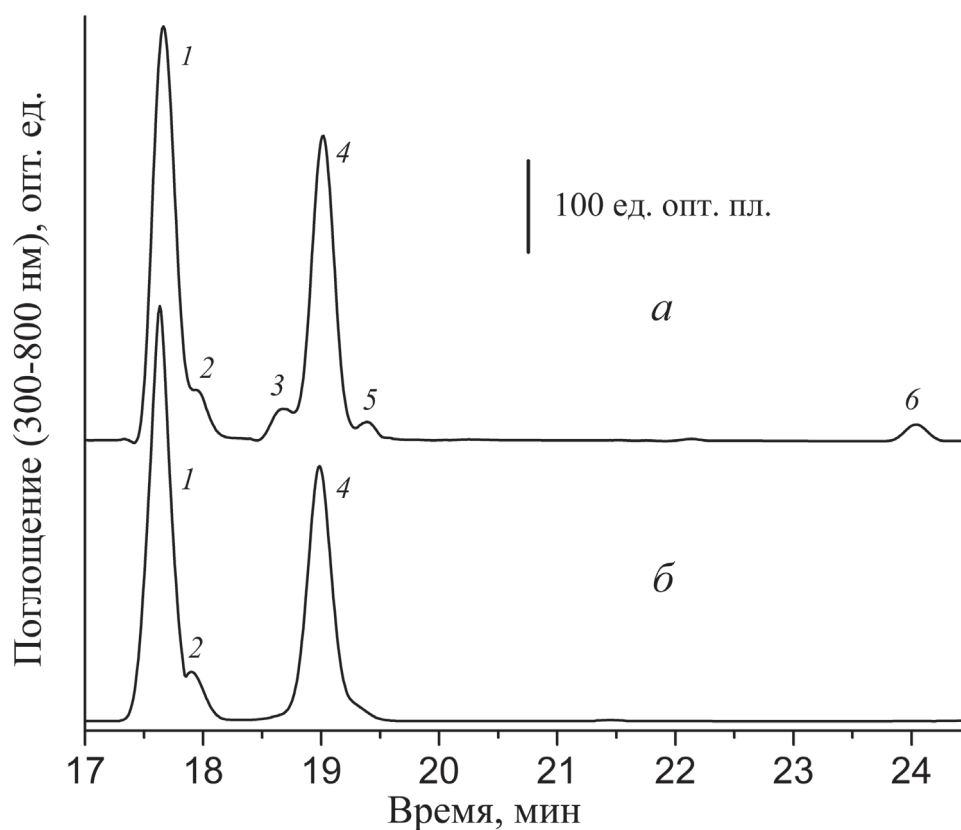


Рис. 6. ВЭЖХ-Анализ пигментов комплекса LH2 после освещения светом 662 нм в смеси «кор-комплекс ФС II + комплекс LH2 *Alc. vinosum*» (а), контрольный комплекс LH2 (б). Идентификация пиков: 1 – БХл, 2 – дидегидрородопин, 3 – АцХл, 4 – родопин, 5 – производное Хл, 6 – Хл

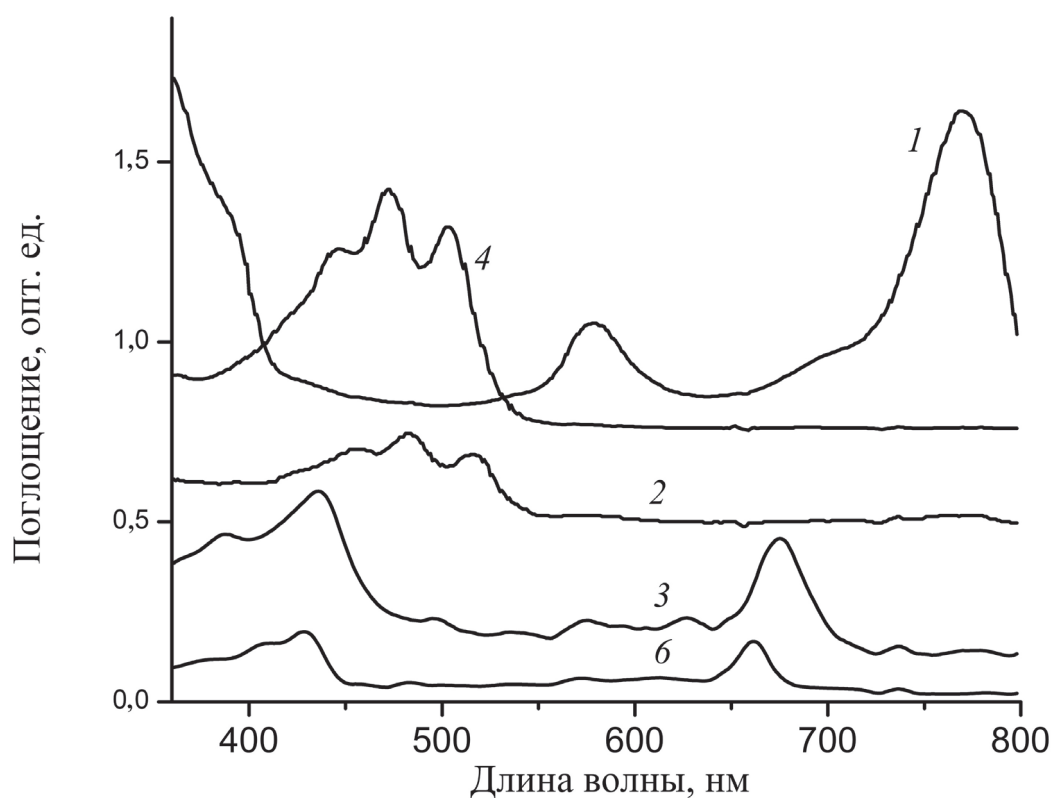


Рис. 7. Спектры поглощения пигментов: 1 – БХл, 2 – дидегидрородопин, 3 – АцХл, 4 – родопин, 6 – Хл. Номера спектров соответствуют номерам пиков на рис. 6

лении синглетным кислородом БХл850 комплекса LH2 этот продукт появляется только после 10 мин освещения образца светом 498 нм (рис. 3, б). Для того чтобы выявить возможное присутствие АцХл в образце «кор-комплекс ФС II /комплекс LH2» с помощью ВЭЖХ, было увеличено время освещения образца светом 662 нм до 45 мин.

Затем комплексы разделяли методом электрофореза в ПААГ, но получить чистый комплекс LH2 не удалось, в нём всегда присутствовала в небольшом количестве примесь кор-комплекса ФС II. Однако уменьшение длинноволновой полосы Хл в комплексе LH2, в отличие от смеси «кор-комплекс ФС II + комплекс LH2», позволило зафиксировать небольшое увеличение поглощения в области 690–710 нм, где поглощает АцХл (результаты не показаны).

Анализ пигментов методом ВЭЖХ подтвердил присутствие в таком комплексе продукта окисления БХл850 – АцХл (рис. 6).

Из спектров поглощения, полученных в процессе разделения пигментов ВЭЖХ, следует, что АцХл отличается от Хл по положению длинноволновой полосы: 675 и 661 нм соответственно (рис. 7). Поэтому идентифицировать их методом ВЭЖХ достаточно просто.

На последнем этапе работы была проведена оценка влияния тушителей синглетного кислорода – аскорбата натрия и тролокса, которые ранее успешно применялись при исследовании процесса окисления БХл850 в комплексе LH2 [28], на окисление Хл и БХл850 в смеси «препарат ФС II + комплекс LH2». Эти препараты по-разному взаимодействовали с РС и кор-комплексом ФС II. Тролокс эффективно предотвращал окисление Хл в РС ФС II, а аскорбат натрия – в кор-комплексе. Причины наблюдаемых различий неясны. Оба этих реагента подавляли окисление БХл850 в комплексе LH2 (рис. 8).

Отметим, что при таких концентрациях аскорбата натрия и тролокса аналогичный про-

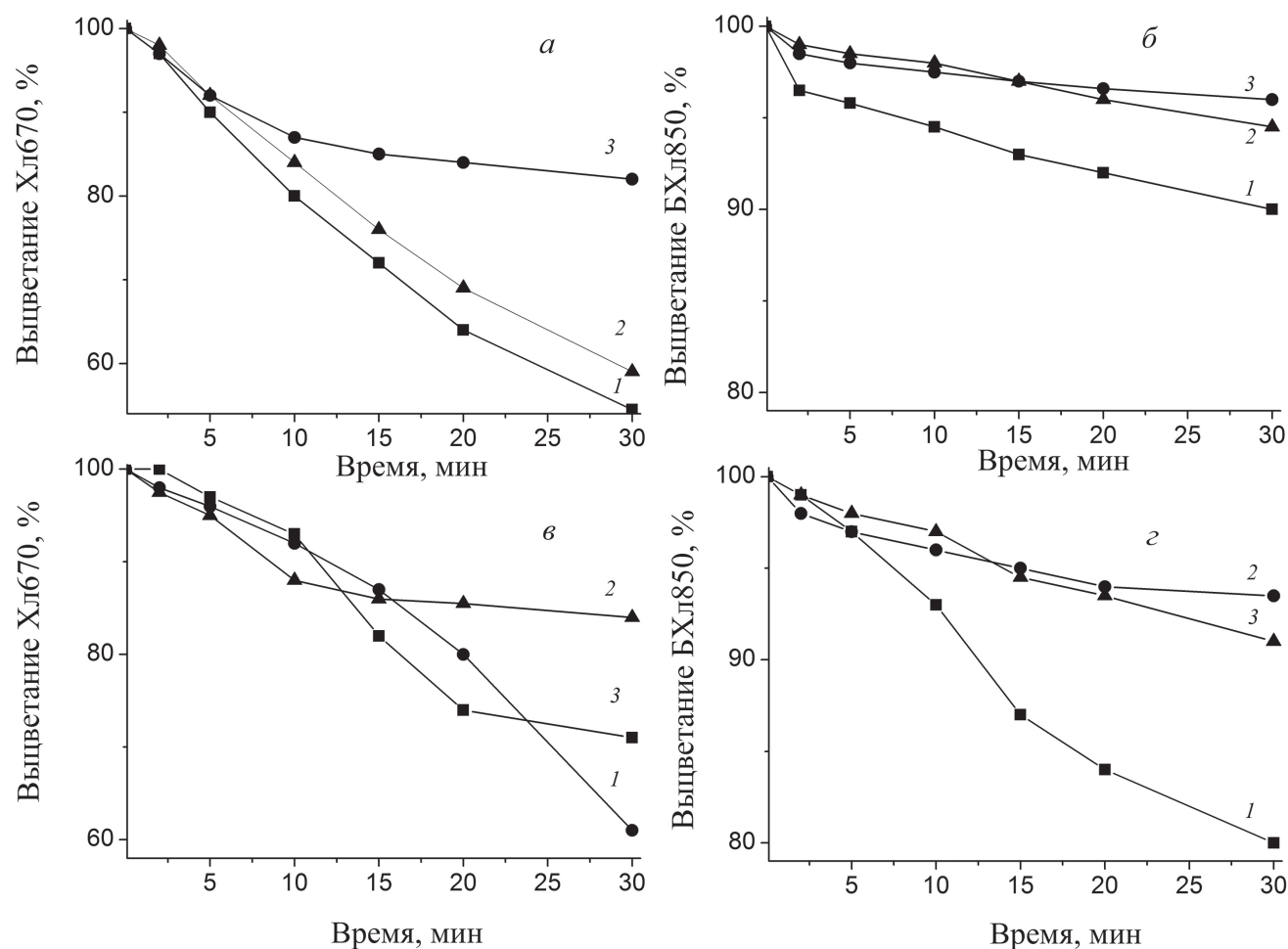


Рис. 8. Кривые выцветания длинноволновых форм пигментов Хл670 (а и в) и БХл850 (б и г) при освещении светом 662 нм в смеси «РС ФС II + комплекс LH2 *Alc. vinosum*» (а и б) и «кор-комплекс ФС II + комплекс LH2 *Alc. vinosum*» (в и г): 1 – контроль, 2 – +1 мМ аскорбата натрия, 3 – +100 мкМ тролокса

цесс в индивидуальном комплексе LH2 подавлялся на 90–95% [28]. Можно предположить, что комплекс ФС II и бактериальный комплекс, контактируя друг с другом, образуют зоны, которые ограничивают доступ тушителей к синглетному кислороду и, таким образом, снижают эффективность их действия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе проведено изучение взаимодействия фотосинтетических комплексов из разных организмов: высших растений и серных фотосинтезирующих бактерий. Комплексы ФС II растений способны к генерации синглетного кислорода под действием света 662 нм, а БХл850 бактериального комплекса LH2 является мишенью для синглетного кислорода и окисляется с образованием АцХл. Совокупность полученных результатов позволяет с достаточной долей уверенности утверждать, что в изученных системах подобный процесс имеет место. Можно предположить следующую упрощённую схему последовательности событий. Хл при возбуждении светом 662 нм взаимодействует с кислородом с образованием синглетного кислорода. Очевидно, что существенная часть последнего расходуется в комплексах ФС II (тушение синглетного кислорода, окисление Хл и т.д., см. рис. 4 и 5). Оставшийся синглетный кислород диффундирует из комплексов ФС II и затем или тушится в водной среде, или проникает в комплекс LH2, где окисляет БХл850 (рис. 6) с образованием АцХл (рис. 7 и 8). Понятно, что эффективность последнего процесса невелика.

Результаты представленной работы показывают, что каротиноиды не защищают БХл850 от окисления синглетным кислородом. Необходимо также отметить, что сам БХл способен эффективно тушить синглетный кислород [31]. По современным представлениям каротиноиды должны тушить синглетный кислород, переводя полученную от него энергию в тепло. Процессу тушения триплетов БХл каротиноидами посвящено достаточно много работ, и его обычно связывают с защитной функцией каротинов ([32–34] и представленные там ссылки). Однако работы, в которых этот процесс исследовался бы на бескаротиноидных мутантах и было бы показано, что БХл в них легко окисляется под действием света в присутствии кислорода с образованием АцХл, не проводились. Ранее мы установили, что отсутствие каротиноидов не влияет существенно на фотостабильность БХл у пурпурных фотосинтезирующих бакте-

рий [17]. Нам кажется, что защитная функция каротиноидов у этих бактерий несколько преувеличена, а тушение триплетов БХл связано не с защитой его от фотоокисления, а с удалением излишков энергии из системы, чтобы она была готова для приёма энергии новых квантов света. Фактически пигментная система комплекса LH2, состоящая из двух кольцевых кластеров БХл (БХл800 и БХл850), которые имеют контакт с молекулой каротиноида (3 БХл/1 каротиноид), способна решать именно такую задачу. Возникает вопрос, почему она не способна потушить синглетный кислород и предотвратить окисление БХл850 в указанном комплексе. Очевидно, что здесь важную роль играет как геометрия пигментной системы комплекса, так и пространственная организация процесса взаимодействия БХл850 и синглетного кислорода. В настоящее время неизвестно, какая часть молекулы каротиноида или БХл может наиболее эффективно взаимодействовать с синглетным кислородом. Однако не вызывает сомнений тот факт, что если синглетный кислород подходит к комплексу, например, с внешней стороны, в области, где расположен БХл850, то он начинает взаимодействовать с этим пигментом, а не с каротиноидом. Это взаимодействие, в свою очередь, приводит к окислению БХл850. Вопрос о том, почему БХл850 сам не тушит синглетный кислород, а окисляется этим агентом, остаётся открытым.

Другой важный аспект рассматриваемой проблемы связан с тем фактом, что окисление БХл850 регистрируется только у некоторых серных бактерий, а у несерных – нет. Подобная разница в поведении указанных бактерий в присутствии окислителя связана, возможно, с особенностями эволюции данных групп бактерий в разных условиях роста. Если взять за исходную точку бескислородную атмосферу Земли, то изначально у обеих групп бактерий отсутствовал механизм или особенности структуры комплексов для защиты пигментов от окисления кислородом, так как в них не было необходимости. Процесс накопления кислорода на Земле был медленным и постепенным, поэтому несерные бактерии смогли с помощью мутаций повысить устойчивость пигментов в светособирающих комплексах к фотоокислению в присутствии кислорода. В частности, произошло образование водородных и других типов связей у свободных протонов в молекулах БХл, что изменяло их редокс-потенциал и повысило устойчивость к окислению синглетным кислородом. Серные бактерии постоянно развивались в бескислородной среде. Если они попадали в кислородную среду, то кислород выступал в роли стрессового

фактора и ингибитора роста, что приводило к смерти клеток. Каждый такой переход происходил при всё более высоких концентрациях кислорода, и никакой эволюции защитных изменений пигментной системы в таких условиях не происходило. Поэтому фактически благодаря отсутствию эволюции в этом направлении организации комплексов LH2 серные бактерии смогли сохранить способность БХл850 к окислению синглетным кислородом.

Таким образом, комплекс LH2 из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. vinosum* представляет уникальную структуру, в которой кольцевой кластер молекул БХл850 упакован так, что его два протона во втором пиррольном кольце молекулы БХл остаются свободными. Это даёт возможность легко окислять БХл850, отрывая указанные протоны, с образованием новой системы сопряжённых двойных связей хлоринового типа. Мы полагаем, что этот процесс приводит к образованию АцХл. Он протекает, как показано в данной работе, при использовании комплекса LH2 в паре с комплексами

ФС II, которые способны к генерации синглетного кислорода под действием света.

Вклад авторов. А.А. Москаленко – концепция и руководство работой; З.К. Махнева, Т.Н. Смолова, М.А. Большаков – проведение экспериментов; З.К. Махнева, Т.Н. Смолова, М.А. Большаков, А.А. Москаленко – обсуждение результатов исследования; А.А. Москаленко – написание текста; М.А. Большаков – редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы благодарят Журавлеву З.А. (ИФПБ РАН) за помощь в выращивании бактериальных культур.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН (№ 122041100204-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bril, C. (1958) Action of a non-ionic detergent on chromatophores of *Rhodospseudomonas spheroids*, *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 458, doi: 10.1016/0006-3002(58)90223-3.
2. Москаленко А. А., Ерохин Ю. Е. (1971) в сб.: Электрофорез в полиакриламидном геле и его применение в биологии, сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности, Москва, с. 154-156.
3. Москаленко А. А., Ерохин Ю. Е. (1974) Выделение пигмент-липопротеиновых комплексов из пурпурных бактерий методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, *Микробиология*, **43**, 654-657.
4. Шувалов В. А., Климов В. В., Крахмалева Н. Н., Москаленко А. А., Красновский А. А. (1976) Фотопревращение феофитина в реакционных центрах *Rhodospirillum rubrum* и *Chromatium minutissimum*, *ДАН СССР*, **227**, 984-987.
5. Shuvalov, V. A., Klimov, V. V. (1976). The primary photoreactions in the complex cytochrome-P-890 P-760 (bacteriopheophytin₇₆₀) of *Chromatium minutissimum* at low redox potentials, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **440**, 587-599, doi: 10.1016/0005-2728(76)90044-x.
6. Freer, A., Prince, S., Sauer, K., Papiz, M., Hawthornthwaite-Lawless, A., et al. (1996) Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*, *Structure*, **4**, 449-462, doi: 10.1016/S0969-2126(96)00050-0.
7. Gabrielsen, M., Gardiner, A., and Cogdell, R. (2009) *In the Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., and Beatty, J. T., eds) Springer, Dordrecht, **28**, 135-153, doi: 10.1007/978-1-4020-8815-5_8.
8. Moskalenko, A. A., and Makhneva, Z. K. (2012) Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochrochromatium minutissimum* assembled without carotenoids, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **108**, 1-7, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.11.006.
9. Löhner A., Carey, A. M., Hacking, K., Picken, N., Kelly, S., et al. (2015) The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochrochromatium vinosum*, *Photosynth. Res.*, **123**, 23-31, doi: 10.1007/s11120-014-0036-2.
10. Cogdell, R., and Frank, H. (1987) How carotenoids function in photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **895**, 63-79, doi: 10.1016/S0304-4173(87)80008-3.
11. Frank, H., and Cogdell, R. (1996) Carotenoids in photosynthesis, *Photochem. Photobiol.*, **63**, 257-264, doi: 10.1111/j.1751-1097.1996.tb03022.x.
12. Cogdell, R. J., Howard, T. D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I., et al. (2000) How carotenoids protect bacterial photosynthesis, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **355**, 1345-1349, doi: 10.1098/rstb.2000.0696.
13. Britton, G. (2008) in *Carotenoids. Natural Functions* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., eds) Birkhauser Verlag, Switzerland, pp. 265-308, doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0.

14. Edge, R., and Truscott, T. G. (2018) Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids – a review, *Antioxidants*, **7**, 5-16, doi: 10.3390/antiox7010005.
15. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2019) Взаимодействие бактериохлорофилла с синглетным кислородом в мембранах пурпурных фотосинтезирующих бактерий: существует ли защитная функция каротиноидов? *Доклады Академии наук*, **486**, 504-508, doi: 10.31857/S0869-56524864504-508.
16. Makhneva, Z. K., Ashikhmin, A. A., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2020) Carotenoids are probably involved in singlet oxygen generation in the membranes of purple photosynthetic bacteria under light irradiation, *Microbiology*, **89**, 164-173, doi: 10.1134/S0026261720010099.
17. Makhneva, Z. K., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2021) Carotenoids do not protect bacteriochlorophylls in isolated light-harvesting LH2 complexes of photosynthetic bacteria from destructive interactions with singlet oxygen, *Molecules*, **26**, 5120, doi: 10.3390/molecules26175120.
18. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2016) Образование 3-ацетилхлорофилла в светособирающих комплексах пурпурных бактерий при химическом окислении, *Биохимия*, **81**, 282-294.
19. Махнева З. К., Москаленко А. А. (2022) Каротиноиды в комплексах LH2 из *Allochrochromatium vinosum* способны при освещении генерировать синглетный кислород, который окисляет БХл850, *Микробиология*, **91**, 466-474, doi: 10.31857/S0026365622300218.
20. Большаков М. А., Ашихмин А. А., Махнева З. К., Москаленко А. А. (2016) Влияние интенсивности освещения и ингибирования биосинтеза каротиноидов на сборку периферийных светособирающих комплексов пурпурной серной бактерии *Allochrochromatium vinosum* ATCC 17899, *Микробиология*, **85**, 403-414, doi: 10.7868/S0026365616040029.
21. Большаков М. А., Ашихмин А. А., Махнева З. К., Москаленко А. А. (2018) Влияние света разного спектрального состава на рост клеток и пигментный состав мембран пурпурных серных бактерий *Allochrochromatium minutissimum* и *Allochrochromatium vinosum*, *Микробиология*, **87**, 136-145, doi: 10.7868/S0026365618020040.
22. Berthold, D. A., Babcock, G. T., and Yocum, C. F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparations from spinach thylakoids membranes, EPR and electron-transport properties, *FEBS Lett.*, **134**, 231-234, doi: 10.1016/0014-5793(81)80608-4.
23. Enami, I., Kamino, K., Shen, J.-R., Satoh, K., and Katoh, S. (1989) Isolation and characterization of photosystem II complexes which lack light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins but retain three extrinsic proteins related to oxygen evolution from spinach, *Biochem. Biophys. Acta*, **977**, 33-39, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80006-4.
24. Nanba, O., and Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 109-112, doi: 10.1073/pnas.84.1.109.
25. Khristin, M. S., Nikitishena, O. V., Smolova, T. N., and Zastrizhnaya, O. M. (1997) Extraction of functionally active Photosystem II pigment-protein complexes from pea thylakoids and their purification on Sepharose DEAE 6B, *Biol. Membr (Moscow)*, **14**, 133-142.
26. Khorobrykh, S. A., Khorobrykh, A. A., Klimov, V. V., and Ivanov, B. N. (2002) Photoconsumption of oxygen in Photosystem II preparations under impairment of the water oxidizing complex, *Biochemistry*, **67**, 683-688, doi: 10.1023/A:1016154506817.
27. Telfer, A., Bishop, S. M., Phillips, D., and Barber, J. (1994) Isolated photosynthetic reaction-center of photosystem-II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen – Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13244-13253.
28. Ashikhmin, A., Makhneva, Z., and Moskalenko, A. (2014) The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis, *Photosynth. Res.*, **119**, 291-303, doi: 10.1007/s11120-013-9947-6.
29. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2019) Защита БХл850 от действия синглетного кислорода в мембранах серной фотосинтезирующей бактерии *Allochrochromatium vinosum* с помощью тушителей, *Микробиология*, **88**, 91-99, doi: 10.1134/S0026365619010129.
30. Limantara, L., Koehler, P., Wilhelm, B., Porra, R. J., and Scheer, H. (2006) Photostability of bacteriochlorophyll a and derivatives: potential sensitizers for photodynamic tumor therapy, *Photochem. Photobiol.*, **82**, 770-780, doi: 10.1562/2005-09-07-RA-676.
31. Krasnovsky, A.A., Jr. (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 29-36, doi: 10.1111/j.1751-1097.1979.tb09255.x.
32. Niedzwiedzki, D. M., Swainsbury, D. J. K., Canniffed, D. P., Hunter, C. N., and Hitchcock, A. (2020) A photosynthetic antenna complex foregoes unity carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer efficiency to ensure photoprotection, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **117**, 6502-6508, doi: 10.1073/pnas.1920923117.
33. Tamura, H., and Ishikita, H. (2020) Quenching of Singlet oxygen by carotenoids via ultrafast super-

- exchange dynamics, *J. Phys. Chem. A*, **124**, 5081-5088, doi: 10.1021/acs.jpca.0c02228.
34. Uragami, C., Sato, H., Yukihiro, N., Fujiwara, M., Kosumi, D., et al. (2020) Photoprotective mechanisms in the core LH1 antenna pigment-protein complex from the purple photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*, *J. Photoch. Photobiol. A: Chemistry*, **400**, 112628, doi: 10.1016/j.jphotochem.2020.112628.

LH2 COMPLEX FROM SULFUR BACTERIA *Allochromatium vinosum* – NATURAL SINGLET OXYGEN SENSOR

Z. K. Makhneva, T. N. Smolova, M. A. Bolshakov*, and A. A. Moskalenko

Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: lfbv22@gmail.com

It was established that in a heterogeneous model system, which consisted of two types of complexes: the reaction center or core complex of photosystem 2 of higher plants and the LH2 complex of the sulfur bacterium *Alc. vinosum*, BChl850 oxidation of the LH2 complex was recorded under illumination in the red Chl band by light at a wavelength of 662 nm. It has been shown that this process induces singlet oxygen, which is generated in photosystem 2 complexes and then partially diffuses into the LH2 complex, where it oxidizes BChl850. It was established by HPLC that this results in the formation of a product of BChl oxidation, 3-acetylchlorophyll. The BChl850 oxidation process is inhibited by singlet oxygen quenchers (Trolox and Na ascorbate). It is assumed that the LH2 complex from the sulfur bacterium *Alc. vinosum* can be used to determine the generation of singlet oxygen by chlorophyll containing samples.

Keywords: photosynthetic sulfur bacteria, LH2 complex, photosystem 2 complexes, singlet oxygen, light at 662 nm, BChl850 oxidation

ξ-КАРОТИН: ГЕНЕРАЦИЯ И ТУШЕНИЕ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА, СРАВНЕНИЕ С ФИТОФЛУИНОМ

© 2022 А.А. Ашихмин¹, А.С. Бендиксис², А.А. Москаленко¹, А.А. Красновский (мл.)^{2*}

¹ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия

² ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия; электронная почта: phoal@mail.ru

Поступила в редакцию 29.05.2022

После доработки 24.08.2022

Принята к публикации 24.08.2022

Известно, что фитофлуин и ξ-каротин – С₄₀-каротиноиды с короткой цепью сопряженных двойных связей (СДС) (5 и 7 соответственно), являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротиноидов в растительных клетках. Ранее, используя стационарные измерения фотосенсибилизированной фосфоресценции синглетного кислорода (¹O₂), мы впервые показали, что фитофлуин эффективно генерирует ¹O₂ в аэрированных растворах и поэтому может служить источником фотодинамического стресса при УФ-возбуждении живых клеток (Ашихмин и соавт. (2020) Биохимия, **85**, 907-915). В настоящей работе, используя новые импульсные светодиоды, аэрированный гексафторбензол в качестве растворителя и разрешенные во времени измерения фосфоресценции ¹O₂, мы подтвердили высокую эффективность генерации ¹O₂ фитофлуином, квантовый выход которой по этим данным ≈ 0,4. Обнаружено, что ξ-каротин фотосенсибилизирует образование ¹O₂, хотя квантовый выход этого процесса почти в 30 раз ниже, чем у фитофлуина. Установлено, что оба каротиноида тушат ¹O₂ в темноте, измерены константы скорости тушения, равные соответственно $(3,6 \pm 0,9) \times 10^7$ и $(2,1 \pm 0,2) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$, причем для ξ-каротина эта константа получена, вероятно, впервые. Данные показывают, что константы скорости тушения ¹O₂ обоими каротиноидами значительно (на 2 и 3 порядка соответственно) меньше, чем константа скорости ограниченных диффузий бимолекулярных процессов. Следовательно, протекторная способность каротиноидов – ингибирование ¹O₂ – относительно слабо выражена. Поэтому оба каротиноида можно рассматривать как потенциальные сенситизаторы фотодинамического стресса в клетках живых организмов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ξ-каротин, фитофлуин, синглетный кислород, фотосенсибилизация, фотодинамический стресс.

DOI: 10.31857/S0320972522100128, EDN: BDJBYO

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что фитоин, фитофлуин и ξ-каротин – С₄₀-каротиноиды с относительно короткими цепями сопряженных двойных связей (3–7 СДС) в клетках фотосинтезирующих организмов являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротинов и ксантофиллов, имеющих длинную цепь СДС [1]. Показано, что каротиноиды с числом СДС более 9 служат эффективными протекторами живых тканей, защищая их от фотоокислительного стресса ([1–7] и указанные там

ссылки). Полагают, что протекторные свойства этих каротиноидов основаны на их способности дезактивировать триплетные состояния хлорофиллов и бактериохлорофиллов, тушить синглетный кислород (¹O₂) и нейтрализовать свободные радикалы [1–7]. Напротив, изомеры зрительного пигмента – ретиналя (*транс*-формы, 11-*цис* и 13-*цис*) – полиена с короткой цепью СДС (6 СДС), эффективно фотосенсибилизируют образование ¹O₂ в неполярной среде в результате переноса энергии на кислород от триплетного состояния ретиналя [7–9]. Полагают, что именно этот процесс вызывает фотодинамическое повреждение сетчатки глаза [10]. Поэтому было высказано предположение, что полиены с короткой цепью СДС могут участвовать также в фотодинамическом повреждении фотосинтетических тканей [11]. В последнее

Принятые сокращения: ¹O₂ – синглетный кислород; СДС – сопряженная двойная связь; Φ_Δ – квантовый выход генерации ¹O₂.

* Адресат для корреспонденции.

время в серии работ лаборатории А.А. Москаленко (ИФБП РАН) получены экспериментальные данные, которые свидетельствуют о том, что каротиноиды LH2-комплексов пурпурных бактерий способны генерировать синглетный кислород и вызывать фотодеструкцию пигментов фотосинтетического аппарата, причем предполагается, что в фотосенсибилизации могут принимать участие как каротиноиды с короткой, так и с протяженной системой СДС [12–16]. До недавнего времени триплетные состояния каротиноидов и синглетный кислород не удавалось наблюдать при прямом фотовозбуждении каротиноидов, выделенных из фотосинтезирующих организмов. Триплетные состояния каротиноидов с протяженной системой СДС регистрировались лишь сенсублизированной за счет переноса энергии от триплетных состояний хлорофиллов и бактериохлорофиллов и других фотосенсибилизаторов ([1–6] и указанные там ссылки).

В связи с изложенным недавно мы приступили к систематическому фотофизическому исследованию способностей каротиноидов с разной длиной системы СДС путем прямого измерения фотосенсибилизированной каротиноидами фосфоресценции 1O_2 , используя многолетний опыт работы в этой области группы А.А. Красновского (ФИЦ биотехнологии РАН) и новые фосфоресцентные спектрометры, собранные этой группой [17]. В первой работе этой серии мы обнаружили, что фитофлуин (5 СДС) эффективно генерирует 1O_2 в аэробных растворах, тогда как фитоин (3 СДС) почти не активен [18]. Главная задача настоящей работы состояла в экспериментальном изучении способности ζ -каротина генерировать и тушить синглетный кислород в аэрированных растворах и сравнении полученных данных с аналогичными параметрами растворов фитофлуина. Действительно, по оценкам, приведенным в работах Bensasson et al. [4] и Niedzwiedzki et al. [6], триплетный уровень ζ -каротина выше синглет-

ного $^1\Delta_g$ -уровня кислорода. Кроме того, известно, что листья мутантов кукурузы, биосинтез каротиноидов которых заканчивается на стадии образования ζ -каротина (ζ -каротиновые мутанты кукурузы), отличаются низкой фотостойкостью и высоким выходом триплетных состояний хлорофилла [19]. Таким образом, можно предположить, что у ζ -каротина антиоксидантные свойства выражены слабо.

Структурные формулы исследуемых каротиноидов показаны на рис. 1.

В отличие от ранее проведенных экспериментов [18], в настоящей работе использованы новые более мощные светодиоды и новая электронная система их модуляции. Это позволило сравнить разрешенные во времени кинетические и стационарные измерения фосфоресценции в растворах каротиноидов. Применение новой техники позволило подтвердить высокую фотосенсибилизирующую активность фитофлуина и уточнить квантовый выход этого процесса, а также впервые достоверно установить, что ζ -каротин генерирует 1O_2 при фотовозбуждении. Измерены также константы скорости тушения 1O_2 изученными каротиноидами, причем для ζ -каротина, насколько нам известно, эта константа получена впервые. В ближайшей перспективе мы планируем применить разработанные экспериментальные подходы к исследованию генерации синглетного кислорода каротиноидами с более длинной цепью СДС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фитофлуин и ζ -каротин (*транс*-формы) были выделены из клеток пурпурной серной фотосинтезирующей бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* ATCC 51935^T. Клетки выращивали при 28 ± 2 °C в анаэробных условиях на среде Пфеннига, приготовленной самостоятельно согласно составу, приведенному в работе Imhoff и Grüper [20], при освещении белым светом

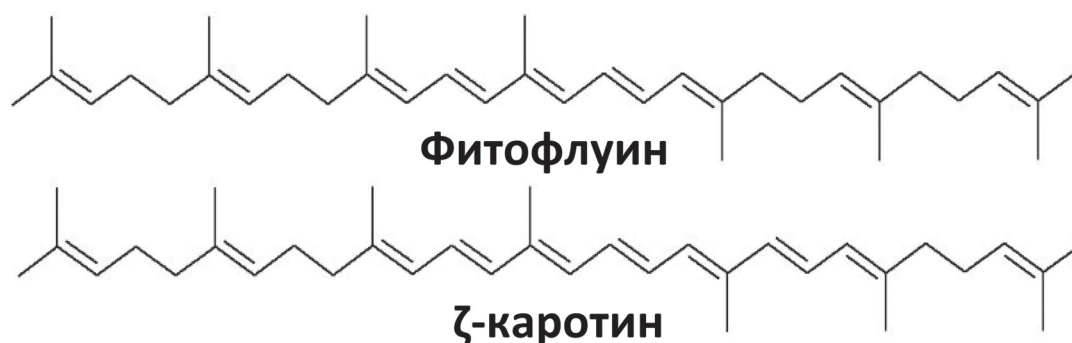


Рис. 1. Структурные формулы каротиноидов, исследованных в настоящей работе

лампы накаливания 90 Вт/м². Для накопления в клетках фитофлуина и ξ-каротина в среду для выращивания добавляли 53 мкМ дифениламина, который блокирует синтез каротиноидов с длинной цепью СДС [21]. Клетки разрушали методом ультразвукового дезинтегрирования, как описано в работе Ашихмина и соавт. [18].

Выделение каротиноидов проводили в два этапа. На первом этапе из мембран экстрагировали смесь фотосинтетических пигментов (каротиноиды и бактериохлорофилл), и затем получали общий экстракт каротиноидов по методике, описанной в работе Ashikhmin et al. [21]. На втором этапе отдельные каротиноиды выделяли методом ВЭЖХ на приборе Agilent 1200 («Agilent Technologies», США) с препаративной колонкой (10 × 250 мм) с обращенной фазой Waters Spherisorb ODS2 («Waters», США), используя градиент растворителей, описанный ранее [20]. Скорость подачи растворителей составляла 4 мл/мин. Разделение проводили при комнатной температуре. Всего было проведено четыре независимых выделения фитофлуина и ξ-каротина. Чистоту полученных каротиноидов дополнительно проверяли с помощью аналитической ВЭЖХ-системы Shimadzu («Shimadzu», Япония) при 22 °С, а также путем спектрофотометрии [21]. Примесь каротиноидов с большим количеством СДС в среднем составляла менее 0,1%.

Синглетный кислород исследовали путем измерения его собственной инфракрасной фосфоресценции при 1270 нм, которая возникает в результате переноса энергии от триплетного состояния молекул фотосенсибилизатора на кислород с последующим заселением возбужденного синглетного (¹Δ_g) состояния молекул кислорода. Это явление, впервые обнаруженное в растворах фотосенсибилизаторов в работах Красновского [22, 23], в настоящее время широко применяется в аналитической практике [24–27]. Измерения проводили с использованием спектрометра, принципиальная схема которого описана в работе Красновского и соавт. [17]. Спектрометр позволял регистрировать фосфоресценцию при стационарном светодиодном возбуждении, а также проводить измерение ее спектральных параметров (спектров излучения и возбуждения) и кинетики затухания после возбуждающей вспышки. Для измерения спектров возбуждения лаборатория располагала набором из пяти светодиодов с максимумами излучения при 347, 367, 400, 421 и 460 нм, полученными от фирм «Полироник» и «Артледс» (Россия). При измерении параметров фосфоресценции мощность излучения светодиодов на поверхно-

сти кюветы не превышала 10 мВт/см². Полуширина полос излучения светодиодов составляла 12–26 нм. Для разрешенных во времени измерений использованы новые импульсные светодиоды с максимумом излучения 365 нм (полуширина – 18 нм) и 395 нм (полуширина – 11 нм) («Полироник»), снабженные разработанным специально для наших исследований модулирующим электронным чипом. Излучение светодиодов фокусировали в пятно диаметром 5 мм на поверхности кварцевой кюветы (1 см) с исследуемым раствором. Интенсивность возбуждающего света контролировали измерителем мощности ThorLabs PM-100D с сенсорной фотоэлектрической головкой S120VC («ThorLabs», США) и измерителем мощности Ophir ORION-TH с термической сенсорной головкой 20C-SH («Ophir Optronics», Израиль).

Фосфоресценцию ¹O₂ измеряли под углом 90° по отношению к возбуждающему лучу с помощью охлаждаемого фотоумножителя ФЭУ-112 («Экран оптические системы», Россия) со спектральной характеристикой С-1 через отсекающие фильтры, которые пропускают ИК-излучение на λ ≥ 1000 нм, и один из трех сменных интерференционных фильтров с максимумами пропускания при 1230, 1270 и 1310 нм и полуширине 10 нм. Стационарную интенсивность фосфоресценции измеряли цифровым милливольтметром («Эконикс-Эксперт», Россия).

Для кинетических измерений частоту повторения и длительность импульсов светодиодов регулировали с помощью внешних генераторов импульсов. Длительность импульса в большинстве измерений составляла 10 мкс, частоту повторения импульсов изменяли в диапазоне 5–100 Гц [13]. Сигнал фотоумножителя через широкополосный (400 мГц) предварительный усилитель поступал на электронную плату, работающую в режиме разрешенного во времени счета фотонов («Парсек», Россия). Счетная плата, которая запускалась от дополнительного импульса генератора, синхронизированного с импульсом светодиода, делила временной интервал между вспышками на 256, 512 или 1024 канала. Сигнал платы через USB-порт поступал на персональный компьютер, который осуществлял обработку сигнала. Кинетические кривые были получены путем накопления импульсов фотоумножителя в каждом канале в интервале 2–30 мин. Квантовый выход генерации ¹O₂ (Φ_Δ) измеряли, используя в качестве эталона органический фотосенсибилизатор феналенон (perinaphthenone, 1H_phenalen-1-one) («Merck», США), который имеет широкую полосу поглощения с максимумом при 350 нм и заметное поглощение при 400 нм. Известно,

что квантовый выход фотогенерации $^1\text{O}_2$ феналеноном близок к 1 ($0,95 \pm 0,05$) [27, 28]. Эксперименты проводили, используя в качестве растворителя гексафторбензол (C_6F_6), специально очищенный для наших экспериментов («Пим-Инвест», Россия). Выбор этого растворителя обусловлен тем, что из-за отсутствия атомов водорода в его молекуле время жизни синглетного кислорода в гексафторбензоле очень велико (16 мс) [13], что облегчает обнаружение и исследование свойств $^1\text{O}_2$. Кроме того, гексафторбензол химически достаточно инертен и не вступает в химическое взаимодействие с каротиноидами и синглетным кислородом [17, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фитофлуин. В предшествующей работе для кинетических измерений мы располагали импульсным светодиодом с длиной волны 405 нм [18], т.е. в области, в которой фитофлуин очень слабо поглощает свет, поэтому ранее основные измерения были выполнены при стационарном возбуждении. В настоящей работе использован новый импульсный светодиод 365 нм, максимум спектра излучения которого практически совпадает с максимумом спектра

поглощения фитофлуина (368 нм). Представляло интерес выяснить, насколько совпадают результаты стационарных и кинетических измерений.

Для экспериментов подбирали такую мощность светового потока ($\leq 1,5$ мВт), при которой выцветание фитофлуина за время записи экспериментальных кривых не превышало 4%. При этой мощности фотовозбуждения фосфоресценция $^1\text{O}_2$, фотосенсибилизированная аэрированным растворителем без фитофлуина, на нашем спектрометре не обнаруживалась. При облучении раствора фитофлуина и феналенона светодиодными импульсами возникала быстро затухающая фосфоресценция $^1\text{O}_2$ в области 1270 нм, кривые затухания которой хорошо описываются экспонентами (рис. 2):

$$I_p = (I_p)_0 \exp(-k_{\text{obs}}t), \quad (1)$$

где I_p – интенсивность фосфоресценции в фотонах в единицу времени, $(I_p)_0$ – начальная интенсивность фосфоресценции, соответствующая нулевому времени; k_{obs} – константа скорости затухания фосфоресценции; t – время.

По оси ординат на рис. 2 отложено отношение числа импульсов фотоумножителя, накопленных за время измерения в каждом канале счетчика фотонов (I_p), нормированное на ско-

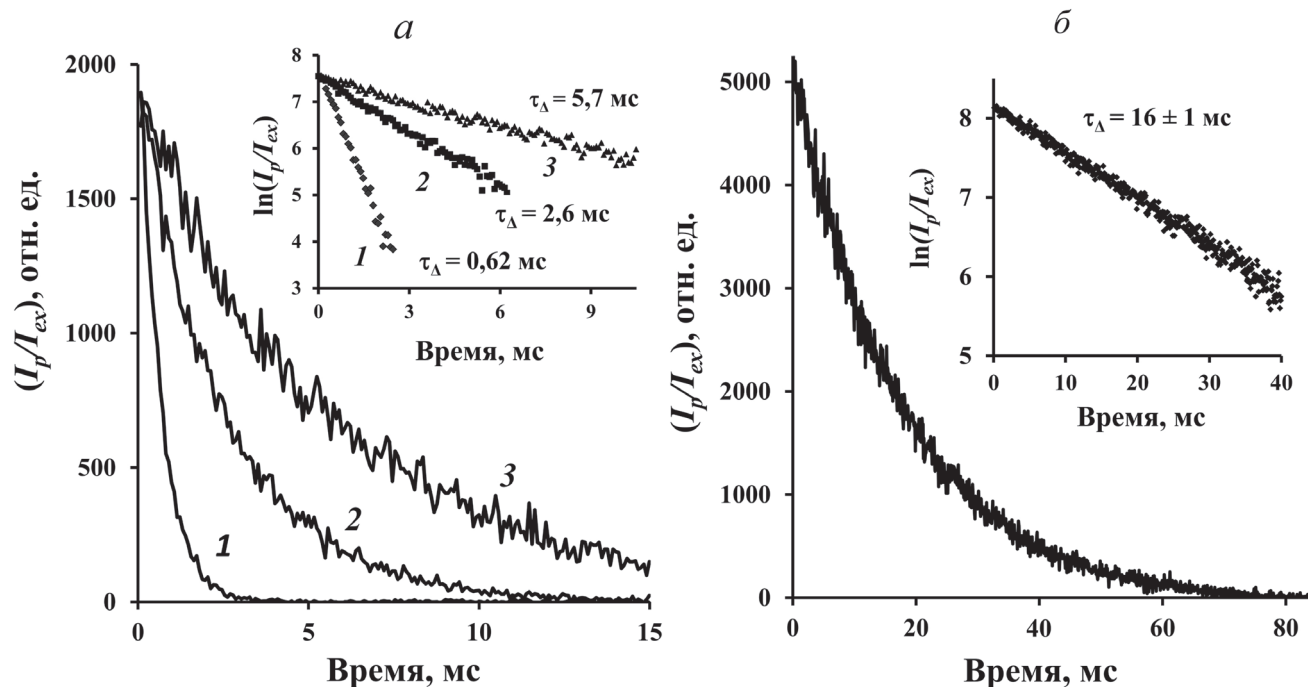


Рис. 2. Кривые затухания фосфоресценции синглетного кислорода в аэрированных растворах фитофлуина (а) и феналенона (б) в гексафторбензоле после облучения 10-микросекундными вспышками светодиода 365 нм с частотой повторения 20 Гц (а) и 10 Гц (б); (I_p/I_{ex}) – отношение интенсивности фосфоресценции (I_p) к скорости поглощения фотонов (I_{ex}) пигментами. На вставках показаны те же кривые затухания в полулогарифмическом масштабе. Средняя мощность светового потока светодиода составляла примерно 1,5 мВт. Время накопления сигнала 2 мин, ширина канала – 81,92 мкс. Концентрация растворов фитофлуина – 34 (1), 7,4 (2) и 2,5 (3) мкМ; концентрация феналенона – 17 мкМ

рость поглощения фотонов (I_{ex}) фотосенсибилизаторами:

$$I_{ex} = I_{LED}(1-T) = I_{LED}(1-10^{-A}), \quad (2)$$

где I_{LED} – скорость генерации фотонов светодиодом, T – коэффициент пропускания света раствором; A – оптическая плотность фотосенсибилизаторов в области излучения светодиода (365 нм). Очевидно, что отношение $(I_p)_0/I_{ex}$ прямо пропорционально квантовому выходу генерации синглетного кислорода при фотовозбуждении фотосенсибилизатора. Из рис. 2 видно, что величина $(I_p)_0/I_{ex}$ оставалась неизменной при более чем десятикратном уменьшении концентрации фитофлуина, тогда как время жизни фосфоресценции (τ_d) резко уменьшалось, а обратная величина – константа скорости затухания (k_{obs}) – резко увеличивалась с увеличением концентрации фитофлуина (рис. 2, а). Эти данные показывают, что квантовый выход генерации 1O_2 фитофлуином не зависит от его концентрации, тогда как увеличение концентрации фитофлуина приводит к тушению синглетного кислорода каротиноидом.

На рис. 2, б показана кинетика затухания фосфоресценции синглетного кислорода в аэрированном растворе фенолалена при отсутствии каротиноидов. Фенолален в исполь-

зованной концентрации слабо тушит синглетный кислород, поэтому время затухания фосфоресценции практически соответствует времени жизни 1O_2 в аэрированном гексафторбензоле (~16 мс) [17].

На рис. 3, а представлен спектр фосфоресценции в аэрированном растворе фитофлуина при стационарном возбуждении светодиодом 367 нм. Спектр имеет максимум при ~1270 нм, соответствующий максимуму спектра фосфоресценции 1O_2 . Точно такой же спектр получается при измерении начальной интенсивности фосфоресценции при импульсном возбуждении (не показано). На рис. 3, б показан результат оценки спектра возбуждения фосфоресценции в растворе фитофлуина с помощью набора стационарных светодиодов с разной длиной волны излучения. Спектры поглощения и возбуждения нормированы в точке 367 нм. Как видно из рис. 3, квантовая эффективность возбуждения фосфоресценции (I_p/I_{LED}) максимальна для светодиодов, длина волны излучения которых соответствует основным максимумам поглощения фитофлуина. В области 400 нм, где фитофлуин не поглощает свет, квантовая эффективность фосфоресценции близка к нулю. Полученные данные не оставляют сомнения в том, что фосфоресценция принадлежит 1O_2 , который генерируется в результате фотовозбуждения фитофлуина.

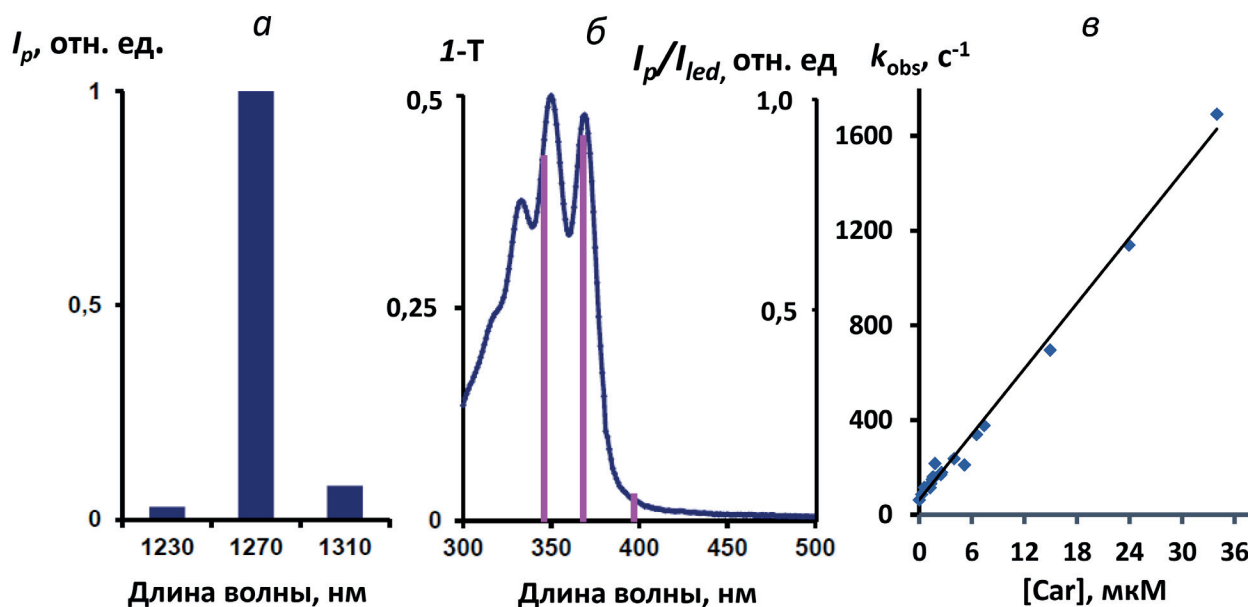


Рис. 3. Спектральные и кинетические параметры фосфоресценции синглетного кислорода в аэрированных растворах фитофлуина в гексафторбензоле. а – Спектр фосфоресценции, измеренный при стационарном возбуждении (367 нм) раствора фитофлуина (7,4 мкМ) с помощью набора из трех интерференционных светофильтров (I_p – интенсивность фосфоресценции при стационарном возбуждении). б – Спектр поглощения раствора фитофлуина 4 мкМ (T – коэффициент пропускания света раствором), и спектр возбуждения фосфоресценции того же раствора (вертикальные линии), измеренный с помощью трех стационарных светодиодов с длиной волны 347, 367 и 400 нм, I_{LED} – скорость излучения фотонов (фотоны в секунду) светодиодом; в – зависимость константы скорости затухания фосфоресценции 1O_2 (k_{obs}) после возбуждающей вспышки от концентрации фитофлуина в аэрированном гексафторбензоле

Из рис. 3, в видно, что зависимость константы скорости затухания фосфоресценции (k_{obs}) от концентрации фитофлуина определяется уравнением Штерна–Фольмера:

$$k_{\text{obs}} = (k_{\text{obs}})_0 + k_q \times [\text{Car}], \quad (3)$$

где $(k_{\text{obs}})_0$ – константа скорости затухания фосфоресценции в аэрированном гексафторбензоле ($\sim 60 \text{ с}^{-1}$ [17]). Следует отметить, что для этих измерений мы использовали четыре независимо выделенных препарата фитофлуина. Рис. 3, в показывает линейную функцию, полученную путем усреднения всех полученных данных, хотя при работе с каждым отдельным препаратом мы наблюдали несколько иной угол наклона прямой. В итоге, по этим данным, наиболее вероятная величина константы скорости тушения составляет $(3,6 \pm 0,9) \times 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, т.е. в пределах погрешности измерений соответствует тому значению, которое было получено нами ранее путем тушения фитофлуином фосфоресценции $^1\text{O}_2$, фотосенсибилизированной феналеноном [18].

Данные рис. 2 были использованы для расчета квантового выхода генерации синглетного кислорода (Φ_{Δ}) фитофлуином. Относительные значения Φ_{Δ} в растворах фитофлуина и феналенона, $(\Phi_{\Delta})_{\text{phyt}}/(\Phi_{\Delta})_{\text{phen}}$, очевидно, соответствуют относительным значениям параметра $(I_p)_0/I_{\text{ex}}$ в растворах этих фотосенсибилизаторов:

$$(\Phi_{\Delta})_{\text{phyt}}/(\Phi_{\Delta})_{\text{phen}} = [(I_p)_0/I_{\text{ex}}]_{\text{phyt}}/[(I_p)_0/I_{\text{ex}}]_{\text{phen}}. \quad (4)$$

Значения $(I_p)_0$ рассчитывали путем экстраполяции экспоненциальных кривых затухания фосфоресценции к нулевому моменту времени. Как указывалось, в растворах фитофлуина значения $(I_p)_0/I_{\text{ex}}$ не зависели от концентрации каротиноида, т.е. квантовые выходы генерации синглетного кислорода одинаковы при всех использованных концентрациях фитофлуина. Для количественных измерений, учитывая широкую полосу излучения светодиода (18 нм), величину I_{ex} для каротиноида и стандарта определяли как:

$$I_{\text{ex}} = I_{\text{LED}} [\int (I_{\text{LED}})_0 (1 - 10^{-A}) dv] / \int (I_{\text{LED}})_0 dv, \quad (5)$$

где I_{LED} – суммарная интенсивность излучения светодиода в фотонах в секунду, $(I_{\text{LED}})_0$ – контур спектральной полосы излучения светодиода, величина $(I_{\text{LED}})_0$ изменяется от 0 до 1, ν – частота, соответствующая длине волны излучения светодиода.

По данным кинетических измерений мы получили, что:

$$(\Phi_{\Delta})_{\text{phyt}}/(\Phi_{\Delta})_{\text{phen}} = [(I_p)_0/I_{\text{ex}}]_{\text{phyt}}/[(I_p)_0/I_{\text{ex}}]_{\text{phen}} = 0,41 \pm 0,06. \quad (6)$$

Отсюда следует, что квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ фитофлуином соответствует

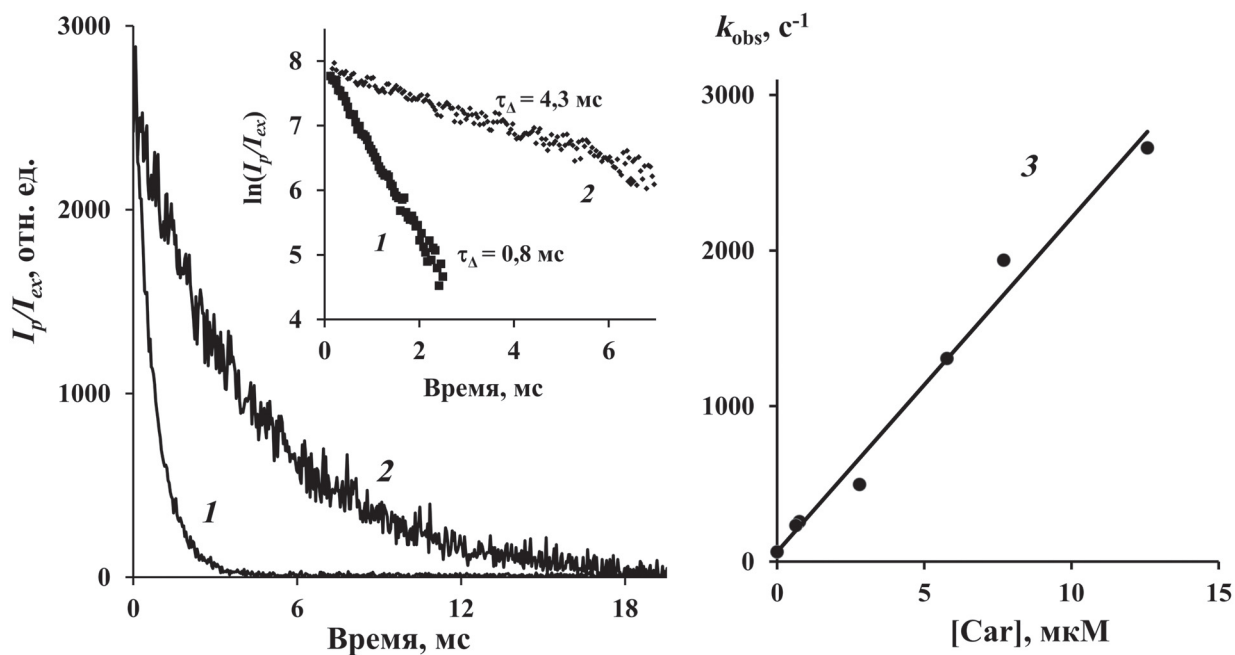


Рис. 4. Кривые затухания (1 и 2) и тушение фосфоресценции синглетного кислорода (1270 нм) в растворах ζ -каротина (1 – 5,9 μM ; 2 – 0,64 μM) в гексафторбензоле после облучения 10-микросекундными вспышками светодиода (395 нм) с частотой повторения 50 Гц. На вставке показаны кривые затухания в полулогарифмическом масштабе. Средняя мощность возбуждающего излучения светодиода – 5 мВт. Время накопления сигнала – 5 мин. 3 – Зависимость констант скоростей затухания фосфоресценции от концентрации ζ -каротина

$0,41 * 0,95 = 0,39 \pm 0,06$. Этот результат подтверждает описанный нами ранее факт, что фитофлуин эффективно генерирует синглетный кислород при фотовозбуждении [18]. Однако полученное в настоящей работе значение квантового выхода примерно вдвое меньше, чем опубликованное нами ранее [18]. Мы полагаем, что ранее точность измерений была ниже из-за того, что измерения выполняли, используя стационарную интенсивность фосфоресценции I_p , которая определяется не только квантовым выходом генерации синглетного кислорода фотосенсибилизаторами, но также и временем жизни фосфоресценции, которое при стационарных измерениях не контролируется.

ξ-каротин. Приемы, разработанные в экспериментах с растворами фитофлуина, были затем применены к растворам ξ-каротина. Для фотовозбуждения ξ-каротина использовали новый импульсный светодиод с длиной волны 395 нм. Для измерений подбирали такую мощность светового потока (≤ 5 мВт), при которой выцветание ξ-каротина за время регистрации экспериментальных кривых не превышало 2%. При облучении импульсами этого светодиода мы наблюдали фотосенсибилизированную фосфоресценцию 1O_2 при 1270 нм, кинетика затухания которой при двух сильно различающихся концентрациях

ξ-каротина показана на рис. 4 (кривые 1 и 2). Для наблюдения этих кинетических кривых потребовалось более длительное время накопления сигнала и более высокая средняя мощность светового облучения, чем при исследовании фитофлуина. Это показывает, что квантовый выход фосфоресценции в растворах ξ-каротина существенно ниже. Тем не менее начальная интенсивность этой фосфоресценции (I_p)₀ в исследованных растворах ξ-каротина превышала интенсивность фосфоресценции 1O_2 в чистом растворителе при отсутствии ξ-каротина более чем на два порядка величины (не показано).

Как видно из рис. 4 (кривые 1 и 2), скорость затухания фосфоресценции возрастает с увеличением концентрации каротина. Отсюда следует, что ξ-каротин эффективно тушит синглетный кислород. Тушение подчиняется уравнению Штерна–Фольмера (рис. 4, кривая 3). Константа скорости тушения, рассчитанная по этим данным для четырех независимых выделений ξ-каротина, составила $(2,1 \pm 0,2) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. Таким образом, ξ-каротин тушит 1O_2 на порядок сильнее, чем фитофлуин. Однако в обоих случаях константы скорости тушения в 100–1000 раз меньше констант скорости тушения 1O_2 , например β-каротином $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [15].

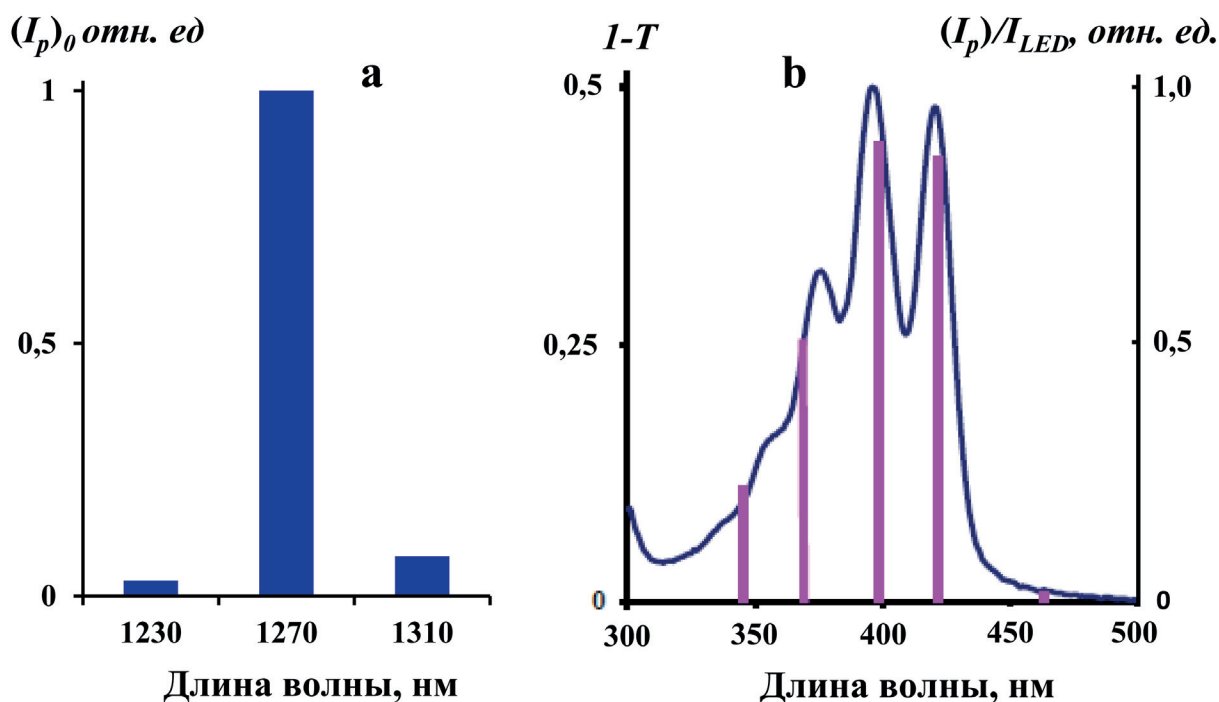


Рис. 5. Спектр фосфоресценции синглетного кислорода в растворе ξ-каротина (5,9 мкМ) в гексафторбензоле (а) при импульсном возбуждении светодиодом (395 нм), измеренный с помощью интерференционных светофильтров. Спектр поглощения ξ-каротина (сплошная линия), измеренный в единицах $I-T$ (б), где T – светопропускание раствора; вертикальные линии – спектр возбуждения фосфоресценции в единицах I_p/I_{LED} , измеренный при стационарном возбуждении набором из нескольких светодиодов с длиной волны излучения 347, 367, 400, 421 и 460 нм

Из рис. 5, а следует, что спектр фосфоресценции в аэрированном растворе ζ -каротина имеет максимум при ~ 1270 нм, т.е. соответствует максимуму фосфоресценции $^1\text{O}_2$. Рис. 5, б показывает, что спектр возбуждения этой фосфоресценции (зависимость квантовой эффективности фосфоресценции от длины волны возбуждения) соответствует спектру поглощения ζ -каротина. Таким образом, данные убедительно показывают, что ζ -каротин генерирует синглетный кислород при фотовозбуждении в аэрированном растворе.

Квантовый выход генерации синглетного кислорода (Φ_{Δ}) ζ -каротином измеряли методом сравнения относительных значений $(I_p)_0/I_{ex}$ в растворах ζ -каротина и феналенона по методике, аналогичной описанной выше для фитофлуина. Установлено, что в растворах ζ -каротина значения $(I_p)_0/I_{ex}$ не зависели от концентрации каротиноида, т.е. квантовые выходы генерации синглетного кислорода одинаковы при всех использованных концентрациях ζ -каротина. По данным кинетических измерений мы получили, что:

$$\frac{(\Phi_{\Delta})_{\text{car}}}{(\Phi_{\Delta})_{\text{phen}}} = \frac{[(I_p)_0/I_{ex}]_{\text{car}}}{[(I_p)_0/I_{ex}]_{\text{phen}}} = 0,015 \pm 0,003. \quad (7)$$

Отсюда следует, что квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ ζ -каротином соответствует $0,015 * 0,95 = 0,014 \pm 0,003$. Эта величина примерно в 30 раз меньше, чем у фитофлуина.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, с помощью новых импульсных светодиодов и разрешенных во времени измерений фосфоресценции $^1\text{O}_2$, показано, что фитофлуин и ζ -каротин, которые являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных C_{40} -каротиноидов у растений и бактерий, фотосенсибилизируют образование $^1\text{O}_2$ при фотовозбуждении, а невозбужденные молекулы этих каротиноидов тушат $^1\text{O}_2$. Результаты измерения квантовых выходов генерации и константы скорости тушения синглетного кислорода каротиноидами суммированы в таблице. Для ζ -каротина эти данные получены впервые.

Из таблицы видно, что каротиноиды сильно различаются по своей способности фотосенсибилизировать и тушить $^1\text{O}_2$. Фитофлуин — эффективный фотосенсибилизатор генерации $^1\text{O}_2$. ζ -Каротин примерно в 30 раз менее эффективен как фотосенсибилизатор, но на порядок более эффективен как тушитель.

Тем не менее константы скорости тушения $^1\text{O}_2$ каротиноидами в 100–1000 раз меньше, чем константа скорости ограниченных только диффузией бимолекулярных реакций ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Полученная нами константа скорости тушения синглетного кислорода фитофлуином в пределах экспериментальных погрешностей соответствует значению, которое было получено в нашей предшествующей работе [18] и согласуется с величиной верхнего предела этой константы, приведенной в работе Mathews-Roth et al. [2]. Для ζ -каротина эта константа, по-видимому, измерена в настоящей работе впервые. Из значений констант следует, что изученные каротиноиды не могут служить эффективными ингибиторами синглетного кислорода в живых системах. Это заключение находится в согласии с низкой фотоустойчивостью ζ -каротиновых мутантов кукурузы [19]. В связи с этим наиболее вероятно, что ζ -каротин и фитофлуин можно рассматривать как потенциальные фотосенсибилизаторы фотодинамического стресса в живых клетках, а не как протекторы их структур.

Предположительный механизм генерации синглетного кислорода каротиноидами показан на рис. 6. Известно, что главные полосы поглощения каротиноидов соответствуют переходу из основного на второй короткоживущий синглетный уровень их молекул, а переход из основного на первый синглетный уровень запрещен и имеет малую интенсивность [29]. Из полученных нами спектров действия фосфоресценции синглетного кислорода следует, что фотовозбуждение каротиноидов определяется заселением именно S_2 -состояния. Дальнейшие этапы предположительны. В результате спонтанной релаксации молекул происходит заселение состояния S_1 , а затем интерконверсия в T_1 -состояние. Перенос энергии с T_1 на молекулярный кислород приводит к образованию $^1\text{O}_2$ и излучению фосфоресценции. Не исключено, что тушение $^1\text{O}_2$ изученными каротиноидами является результатом обратного термоактивированного переноса энергии от синглетного кислорода на триплетный уровень каротиноида. Однако это требует отдельного обоснования и выходит за рамки предмета настоящей статьи.

Квантовые выходы генерации $^1\text{O}_2$ и константы скорости тушения $^1\text{O}_2$ каротиноидами в аэрированном гексафторбензоле

Каротиноид	СДС	Φ_{Δ}	$k_q, \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$
Фитофлуин	5	$0,39 \pm 0,06$	$(3,6 \pm 0,9) \times 10^7$
ζ -каротин	7	$0,014 \pm 0,003$	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^8$

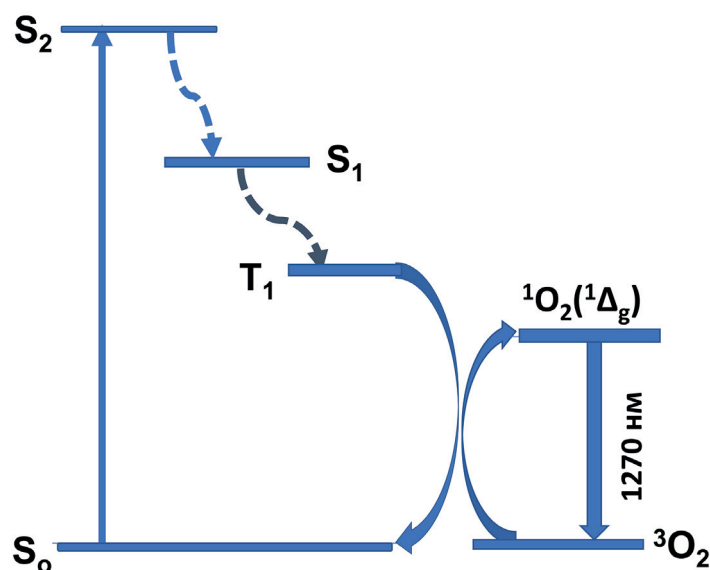


Рис. 6. Предположительная энергетическая диаграмма переходов в молекулах каротиноидов, приводящая к фотосенсibilизации образования $^1\text{O}_2$

Предложенная схема согласуется с литературными данными [4, 6], свидетельствующими о том, что энергия триплетных состояний исследованных каротиноидов (E_T) выше энергии $^1\Delta_g$ — состояния кислорода (0,96 эв). Согласно Bensasson et al. [4], значения E_T равны 1,45 и 1,12 эв соответственно для фитофлуина и ξ-каротина. Однако эти данные нельзя считать полностью достоверными, так как они рассчитаны путем экстраполяции эмпирической линейной зависимости между E_T^{-1} и числом СДС, полученной для синтетических полиенов с короткой СДС [4]. Прямые измерения фосфоресценции этих каротиноидов, которые позволили бы установить точную энергию их триплетных состояний, пока не выполнены.

Известно, что время жизни триплетного состояния ξ-каротина составляет 23 мкс [4]. Эта величина, полученная методом импульсного радиолиза, коррелирует с механизмом, приведенным на рис. 6. Нам не удалось найти в литературе константу скорости взаимодействия триплетного состояния ξ-каротина с кислородом. Однако она измерена в растворах синтетических аналогов — полиенов. Получено, что для всех каротиноидов эта константа равна $(2-4) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [30]. Кинетический анализ показывает, что при такой константе и обычной для аэрированных растворов концентрации кислорода (2–4 мМ) [31] все триплетные молекулы пигментов дезактивируются путем переноса энергии на растворенный кислород [23]. Таким образом, измеренные нами значения Φ_Δ примерно равны значениям квантового выхода триплетных состояний молекул каротиноидов.

В литературе, к сожалению, не описаны точные данные о квантовом выходе образования триплетных состояний у изученных в настоящей работе каротиноидов. Нам удалось найти только одну работу [4], в которой была сделана попытка количественно измерить этот параметр методом наносекундного импульсного фотолиза. Полученный для ξ-каротина квантовый выход практически равен нулю (меньше минимального, доступного для измерений авторами [4]). Отсюда следует, что, по нашим данным, квантовые выходы заселения триплетного состояния изученными каротиноидами существенно выше, чем следует из сделанных ранее методом флеш-фотолиза измерений [4].

Представляет интерес, что полученные нами квантовые выходы образования триплетного состояния каротиноидов и синглетного кислорода коррелируют с информацией о квантовом выходе флуоресценции каротиноидов. Известно, что фитофлуин излучает относительно сильную флуоресценцию из состояния S_1 (500 нм) с квантовым выходом $0,05 \pm 0,01$ при комнатной температуре [32, 33]. Литературных данных о квантовом выходе флуоресценции ξ-каротина нам найти не удалось. Однако известен квантовый выход флуоресценции из состояния S_1 у аналога — синтетического полиена с 7 СДС [34]. Он примерно на порядок ниже, чем у синтетического аналога с 5 СДС. Следовательно, можно предположить, что выход синглетного кислорода, долгоживущего триплетного состояния (T_1) и длинноволновой S_1 -флуоресценции каротиноидов, определяется вероятностью внутримолекулярного заселения S_1 -состояния при спонтанной дезактивации состояния S_2 .

Вклад авторов. А.А. Красновский мл., А.А. Ашихмин, А.А. Москаленко – концепция и руководство работой; А.А. Ашихмин – выделение каротиноидов; А.А. Красновский и А.С. Бендикис – конструирование приборов и проведение экспериментов; А.А. Ашихмин, А.С. Бендикис, А.А. Москаленко, А.А. Красновский мл. – обсуждение результатов исследования; А.А. Красновский мл., А.А. Ашихмин и А.С. Бендикис – написание текста и его редактирование.

Финансирование. Работа выполнена при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-1352.2021.1.4), Российского

фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00331-а) и государственных заданий ФИЦ Биотехнологии РАН (12241100080-3) и ФИЦ ПНЦБИ РАН (122041100204-3).

Благодарности. Авторы благодарят ООО «Полироник» (Москва) за техническую помощь и ООО «ПиМ-Инвест» (Москва) за предоставление и очистку растворителей, а также Журавлеву З.А. (ИФПБ РАН) за помощь в выращивании культуры *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Britton, G. (2008) Functions of Intact Carotenoids, in *Carotenoids. Natural Functions* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfanger, H., eds) Birkhauser Verlag, Switzerland, Vol. 4, pp. 189-212, doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0_10.
2. Mathews-Roth, M., Wilson, T., Fujimori, E., and Krinsky, N. (1974) Carotenoid chromophore length and protection against photosensitization, *Photochem. Photobiol.*, **19**, 217-222, doi: 10.1111/j.1751-1097.1974.tb06501.x.
3. Krinsky, N. (1974) Carotenoid protection against oxidation, *Pure Appl. Chem.*, **51**, 649-660, doi: 10.1351/pac197951030649.
4. Bensasson, R., Land, E. J., Maudinas, B. (1976) Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet pulse irradiation, *Photochem. Photobiol.*, **23**, 189-193, doi: 10.1111/j.1751-1097.1976.tb07240.x.
5. Cogdell, R. J., Howard, T. D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I., et al. (2000) How carotenoids protect bacterial photosynthesis, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **355**, 1345-1349, doi: 10.1098/rstb.2000.0696.
6. Niedzwiedzki, D. M., Swainsbury, D. J. K., Canniffed, D. P., Hunter, C. N., and Hitchcock, A. (2020) A photosynthetic antenna complex foregoes unity carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer efficiency to ensure photoprotection, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **117**, 6502-6508, doi: 10.1073/pnas.1920923117.
7. Edge, R., and Truscott, T. G. (2018) Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids – a review, *Antioxidants*, **7**, 5-16, doi: 10.3390/antiox7010005.
8. Красновский А. А. (мл), Каган В. Е. (1978) Генерация и тушение синглетного кислорода ретиналями, *Доклады АН СССР*, **242**, 229-232.
9. Krasnovsky, A. A., Jr., and Kagan, V. E. (1979) Photosensitization and quenching of singlet oxygen by pigments and lipids of photoreceptor cells of the retina, *FEBS Lett.*, **108**, 152-154, doi: 10.1016/0014-5793(79)81198-9.
10. Островский М. А., Федорович И. Б. (1994) Ретиналь как сенсibilизатор фотоповреждения ретинальсодержащих белков сетчатки глаза, *Биофизика*, **39**, 13-25.
11. Красновский А. А. (мл) (1986) Синглетный кислород в фотосинтезирующих организмах, *Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева (Российский химический журнал)*, издательство Химия, Москва, **31**, 562-567.
12. Махнева З. К., Ерохин Ю. Е., Москаленко А. А. (2007) Фотосенсибилизированное каротиноидами окисление димеров бактериохлорофилла светособирающих комплексов В800-850 в клетках *Allochro-matium minutissimum*, *Доклады Академии наук*, **416**, 408-411.
13. Махнева З. К., Большаков М. А., Ашихмин А. А., Ерохин Ю. Е., Москаленко А. А. (2009) Влияние синего света на стабильность структуры антенных комплексов из *Allochro-matium minutissimum* с разным содержанием каротиноидов, *Биологические мембраны*, **26**, 188-193.
14. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2020) Выделение синглетного кислорода мембранами пурпурных фотосинтезирующих бактерий при облучении светом происходит при возможном участии каротиноидов, *Микробиология*, **89**, 169-179, doi: 10.31857/S0026365620010097.
15. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2019) Взаимодействие бактериохлорофилла с синглетным кислородом в мембранах пурпурных фотосинтезирующих бактерий:

- существует ли защитная функция каротиноидов? Доклады Академии наук, **486**, 504-508, doi: 10.31857/S0869-56524864504-508.
16. Makhneva, Z. K., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2021) Carotenoids do not protect bacteriochlorophylls in isolated light-harvesting LH2 complexes of photosynthetic bacteria from destructive interactions with singlet oxygen, *Molecules*, **26**, 5120, doi: 10.3390/molecules26175120.
 17. Красновский А. А., Бендикис А. С., Козлов А. С. (2019) Кинетические измерения фосфоресценции синглетного кислорода методом разрешенного во времени счета фотонов в растворителях, не содержащих водородных атомов, *Биохимия*, **84**, 240-251, doi: 10.1134/S0320972519020076.
 18. Ашихмин А. А., Бендикис А. С., Москаленко А. А., Красновский А. А. мл. (2020) Фитофлуин – эффективный фотосенсибилизатор образования синглетного кислорода под действием УФ-А излучения, *Биохимия*, **85**, 907-915, doi: 10.31857/S0320972520070052.
 19. Красновский А. А. мл., Ковалев Ю. В., Фалуди-Даниэль А. (1980) Фосфоресценция и замедленная флуоресценция хлорофилла в мутантах кукурузы с аномальным составом каротиноидов, Доклады Академии наук СССР, **251**, 1264-1267.
 20. Imhoff, J. F., and Trüper, H. G. (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll *b*, *Arch. Microbiol.*, **114**, 115-121, doi: 10.1007/BF0041077220.
 21. Ashikhmin, A., Makhneva, Z., and Moskalenko, A. (2014) The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis, *Photosynth. Res.*, **119**, 291-303, doi: 10.1007/s11120-013-9947-6.
 22. Красновский А. А., мл. (1976) Фотосенсибилизированная люминесценция синглетного кислорода в растворе, *Биофизика*, **21**, 748-749.
 23. Krasnovsky A. A., Jr. (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 29-36, doi: 10.1111/j.1751-1097.1979.tb09255.x.
 24. Krasnovsky A. A., Jr. (1998) Phosphorescence studies of singlet oxygen in photobiochemical systems, *Membr. Cell Biol.*, **12**, 665-690.
 25. Krasnovsky A. A. Jr. (2008) Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **196**, 210-218, doi: 10.1016/j.jphotochem.2007.12.015.
 26. Schweitzer, C., and Schmidt, R. (2003) Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen, *Chem. Rev.*, **103**, 1685-1757, doi: 10.1021/cr010371d.
 27. Oliveros, E., Suardi-Murasecco, P., Aminian-Saghafi, T., and Braun, A. M. (1991) 1H-Phenalen-1-one: photophysical properties and singlet oxygen production, *Helv. Chim. Acta*, **74**, 79-90, doi: 10.1002/hlca.19910740110.
 28. Schmidt, R., Tanelian, C., Dunsbach, R., and Wolf, C. (1994) Phenalene, a universal compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (¹Δ_g) sensitization, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **79**, 11-17, doi: 10.1016/1010-6030(93)03746-4.
 29. Frank, H. A., and Christensen, R. L. (2008) Excited electronic states, photochemistry and photophysics of carotenoids, in *Carotenoids*, vol. 4, Chapt. 9, Birkhaeuser Verlag, Basel, pp. 167-188.
 30. Mathis, P., and Schenck, C. C. (1982) Functions of carotenoids in photosynthesis, in *Carotenoids chemistry and Biochemistry* (Britton, G., and Goodwin, T. W., eds) Pergamon Press, Oxford, New York, p. 339-351.
 31. Murov, S. L., Chermichael, I., and Hug, G. L. (1993) *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, p. 290.
 32. Cogdell, R. J., Gillbro, T., Andersson, P. O., Liu, R. S. H., and Asato, A. E. (1994) Carotenoids as accessory light-harvesting pigments, *Pure Appl. Chem.*, **66**, 1041-1046.
 33. Andersson, P. O., Takaichi, S., Cogdell, R. J., and Gillbro, T. (2001) Photophysical characterization of natural *cis*- carotenoids, *Photochem. Photobiol.*, **74**, 549-557, doi: 10.1562/0031-8655(2001)074<0549:pconcc>2.0.co;2.
 34. Andersson, P. O., Bachilo, S. M., Chen, R.-L., and Gillbro, T. (1995) Solvent and temperature effects on dual fluorescence in a series of carotenes. Energy gap dependence of the internal conversion rate, *J. Phys. Chem.*, **99**, 16199-16209, doi: 10.1021/j100044a002.

ξ-CAROTENE: GENERATION AND QUENCHING OF SINGLET OXYGEN, COMPARISON WITH PHYTOFLUENE

A. A. Ashikhmin¹, A. S. Benditkis², A. A. Moskalenko¹, and A. A. Krasnovsky, Jr.^{2*}

¹ Institute of Basic Biological Problems, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences”, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

² Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; E-mail: phoal@mail.ru

It is known that phytofluene and ζ -carotene, C_{40} carotenoids with a short chain of conjugated double bonds (CDB) (5 and 7, respectively), are universal precursors in the biosynthesis of colored carotenoids in plant cells. Previously, using mainly stationary measurements of photosensitized phosphorescence of singlet oxygen (1O_2), we discovered that phytofluene efficiently generates 1O_2 in aerated solution and therefore, can serve as a source of the UV photodynamic stress in living cells [Ashikhmin et al. (2020) *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 773-780]. In the present paper, by using novel pulsed light emitting diodes (LEDs), aerated hexafluorobenzene as a solvent and time-resolved measurements of 1O_2 phosphorescence we confirmed that phytofluene efficiently photosensitizes 1O_2 formation. The quantum yield of this process according to the novel experiments is about 0.4. An ability to generate 1O_2 was also found in aerated solutions of ζ -carotene although the quantum yield of this process is 30-fold lower than in phytofluene solutions. Both carotenoids were found to quench 1O_2 in the dark with the quenching rate constants equal to $(3,6 \pm 0,9) \times 10^7$ and $(2,1 \pm 0,2) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectively. To our knowledge, the rate constant of 1O_2 quenching by ζ -carotene has been reported in the present paper for the first time. It follows from the data obtained that the rate constants of 1O_2 quenching by both carotenoids are much (by 2-3 orders of magnitude) smaller than the rate constant of the diffusion-limited biomolecular reactions. Hence, both carotenoids are weak protectors against 1O_2 oxidative activity. It is more likely that they are potential promoters of photodynamic stress in living cells.

Keywords: ζ -carotene, phytofluene, singlet oxygen, photosensitivity, photodynamic stress

СРАВНЕНИЕ АБСОРБЦИОННОЙ ДИНАМИКИ СИНГЛЕТНЫХ ВОЗБУЖДЁННЫХ СОСТОЯНИЙ ХЛОРОФИЛЛОВ *a* И *d*

© 2022 Д.А. Черепанов^{1,2*}, А.А. Петрова², М.Д. Мамедов², А.И. Вишневская²,
Ф.Е. Гостев¹, И.В. Шелаев^{1,2}, А.В. Айбуш¹, В.А. Надточенко^{1,3}

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: tscherepanov@gmail.com

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.03.2022

После доработки 19.04.2022

Принята к публикации 06.05.2022

Методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» измерена абсорбционная динамика хлорофиллов *a* и *d* в тетрагидрофуране в диапазоне 400–870 нм. Получены спектры поглощения возбуждённых синглетных состояний S_1 хлорофиллов *a* и *d*, а также определена динамика сдвига полосы Q_y стимулированного излучения этих пигментов (Стоксов сдвиг полосы флуоресценции) во временном диапазоне от 60 фс до 4 пс. Измерена кинетика внутримолекулярной конверсии $Q_x \rightarrow Q_y$ (электронный переход $S_2 \rightarrow S_1$); характерное время релаксации составило 54 ± 3 фс для хлорофилла *a* и 45 ± 9 фс – для хлорофилла *d*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хлорофилл *a*; хлорофилл *d*; фемтосекундная лазерная спектроскопия; спектр возбуждённого состояния; динамика сдвига Стокса; внутримолекулярная конверсия.

DOI: 10.31857/S032097252210013X, EDN: BDNNTB

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтетический аппарат высших растений, водорослей и цианобактерий включает пигмент-белковые комплексы двух типов: светособирающую антенну, в которой около ста молекул различных пигментов интегрированы в общую белковую матрицу, и реакционный центр, в котором происходит разделение зарядов и создаётся трансмембранная разность электрического потенциала [1, 2]. Основным пигментом как антенны, так и реакционных центров большинства фотосинтезирующих организмов является хлорофилл *a* (Хл *a*). Фотосинтетические комплексы некоторых цианобактерий содержат длинноволновые формы хлорофилла *d* и *f* [3, 4], позволяющие использовать световую энергию инфракрасного диапазона [5, 6]. Изучение свойств возбуждённого

состояния Хл *d* стало в настоящее время особенно актуальным в связи с публикацией структуры высокого разрешения фотосистемы I (ФС I) из цианобактерии *Acaryochloris marina*, в которой этот пигмент играет ключевую роль в процессах поглощения света в ближнем инфракрасном диапазоне и в первичных реакциях разделения зарядов [7, 8].

Процессы миграции энергии в светособирающих комплексах и реакции разделения зарядов в реакционном центре происходят в одном масштабе времени (1–10 пс), поэтому для изучения этих процессов активно используют методы фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» [2]. Интерпретация переходных спектров в подобных экспериментах сильно облегчается, если известны спектральные характеристики нижнего возбуждённого состояния (S_1) хлорофилла в видимой и ближней инфракрасной областях [9, 10], однако в настоящее время спектры возбуждённого состояния Хл *d* не получены. В связи с этим исследование синглетного состояния Хл *d* имеет особую актуальность.

Принятые сокращения: ДМФ – N,N-диметилформамид; ТГФ – тетрагидрофуран; ФС – фотосистема; Хл – хлорофилл.

* Адресат для корреспонденции.

В данной работе представлены спектры поглощения возбуждённых синглетных состояний S_1 хлорофиллов *a* и *d* в тетрагидрофуране (ТГФ) в диапазоне 400–870 нм, полученные методом фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование», а также динамика сверхбыстрых внутримолекулярных электронных переходов $S_2 \rightarrow S_1$ и Стоксова сдвига полосы флуоресценции Q_y двух указанных хлорофиллов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракция хлорофиллов осуществлялась на рассеянном свете. Хл *a* экстрагировали из листьев шпината обработкой ацетоном в течение 10 мин, за которой следовало смешивание с гексаном. Хл *a* отделяли от других пигментов методом тонкослойной хроматографии с использованием подвижной фазы, состоящей из смеси гексана и ацетона в соотношении 7/3. Экстракцию Хл *d* из тилакоидных мембран, выделенных из цианобактерии *A. marina*, проводили с помощью диметилсульфоксида (ДМСО) [11], для удаления молекул неполярных пигментов использовали циклогексан.

Идентификацию и чистоту хлорофилла в экстракте определяли с помощью УФ-видимой- и ИК-спектроскопии. Хл хранили в N,N-диметилформамиде (ДМФ) при -80°C .

Оптические изменения регистрировали в оптическом диапазоне 400–900 нм на временных задержках от 60 фс до 500 пс. Экспериментальная установка и методика измерений были описаны ранее [10]. Возбуждение раствора Хл *d* осуществлялось фемтосекундным лазерным импульсом с максимумом на 640 нм (полуширина – 35 нм, длительность – 25 фс, энергия – 45 нДж), для возбуждения раствора Хл *a* использовался импульс с максимумом на 615 нм (полуширина – 35 нм, длительность – 24 фс, энергия – 10 нДж). Абсорбционные измерения проводились при углах поляризации 0, 54,7 и 90 градусов относительно поляризации возбуждающего импульса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рис. 1, *a* приведён переходный спектр Хл *d* в ТГФ на временной задержке 1 пс (сплошная линия, ТА).

Возбуждение Хл *d* фемтосекундным импульсом с максимумом на 640 нм индуцировало образование синглетных состояний S_1 (переход $Q_y(1,0)$) и S_2 (переход $Q_x(0,0)$), которые

соответствуют полосе поглощения 650 нм [12]. Время электронной конверсии $S_2 \rightarrow S_1$ различных модификаций хлорофилла составляет около 100 фс [13], поэтому переходный абсорбционный спектр на задержке 1 пс представляет суперпозицию спектра выцветания основного состояния S_0 (отрицательный вклад) и спектра поглощения первого возбуждённого состояния S_1 (положительный вклад). Кроме того, в дальнем красном диапазоне присутствует стимулированное излучение, обусловленное переходом $S_1 \rightarrow S_0$ (отрицательный вклад). Для количественной интерпретации на рис. 1, *a* приведён стационарный спектр поглощения Хл *d* в ТГФ, взятый с обратным знаком (штрих-пунктир, A_0). Переходный спектр был нормирован по спектру поглощения Хл *d* на длине волны 455 нм (полоса Core), коэффициент экстинкции которого ($\Delta\epsilon_{445}$) составляет $8,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [14].

На рис. 1, *b* сплошной линией (1) показан спектр поглощения Хл *d* в первом возбуждённом состоянии S_1 . Он был получен сложением переходного спектра (ТА), линейного спектра поглощения Хл *d* в ТГФ (2) и модельного спектра флуоресценции полосы Q_y (3), с помощью которого учитывался вклад стимулированного излучения. Спектр флуоресценции был смоделирован зеркальным отражением спектра поглощения A_0 относительно максимума полосы Q_y . Амплитуду и сдвиг Стокса спектра флуоресценции $\Delta\lambda$ определяли методом нелинейной регрессии, амплитуда составила 60% от амплитуды полосы Q_y спектра поглощения Хл *d*, а величина сдвига Стокса полосы Q_y в красную сторону была равна 6 нм. Аналогичным образом был получен спектр поглощения возбуждённого состояния Хл *a* (рис. 1, *b*).

Наблюдаемый сдвиг минимума полосы Q_y переходного спектра в длинноволновую сторону (Стоксов сдвиг полосы флуоресценции) обусловлен понижением энергии возбуждённого состояния за счёт внутримолекулярных релаксационных процессов и поляризации растворителя [15]. На рис. 2 представлена динамика сдвига полос Хл *a* и Хл *d*, полученная описанным выше методом для переходных спектров на временных задержках от 60 фс до 4 пс. Экспериментальные данные были аппроксимированы суммой двух экспоненциальных компонент, их параметры приведены в таблице.

Быстрая компонента релаксации со временем $\tau_1 = 0,13\text{--}0,14$ пс в обоих случаях характеризуется близкой по величине амплитудой сдвига Стокса ($\Delta\lambda_1 = 2,4\text{--}3,1$ нм). Характерное время τ_2 медленной компоненты релаксации равно

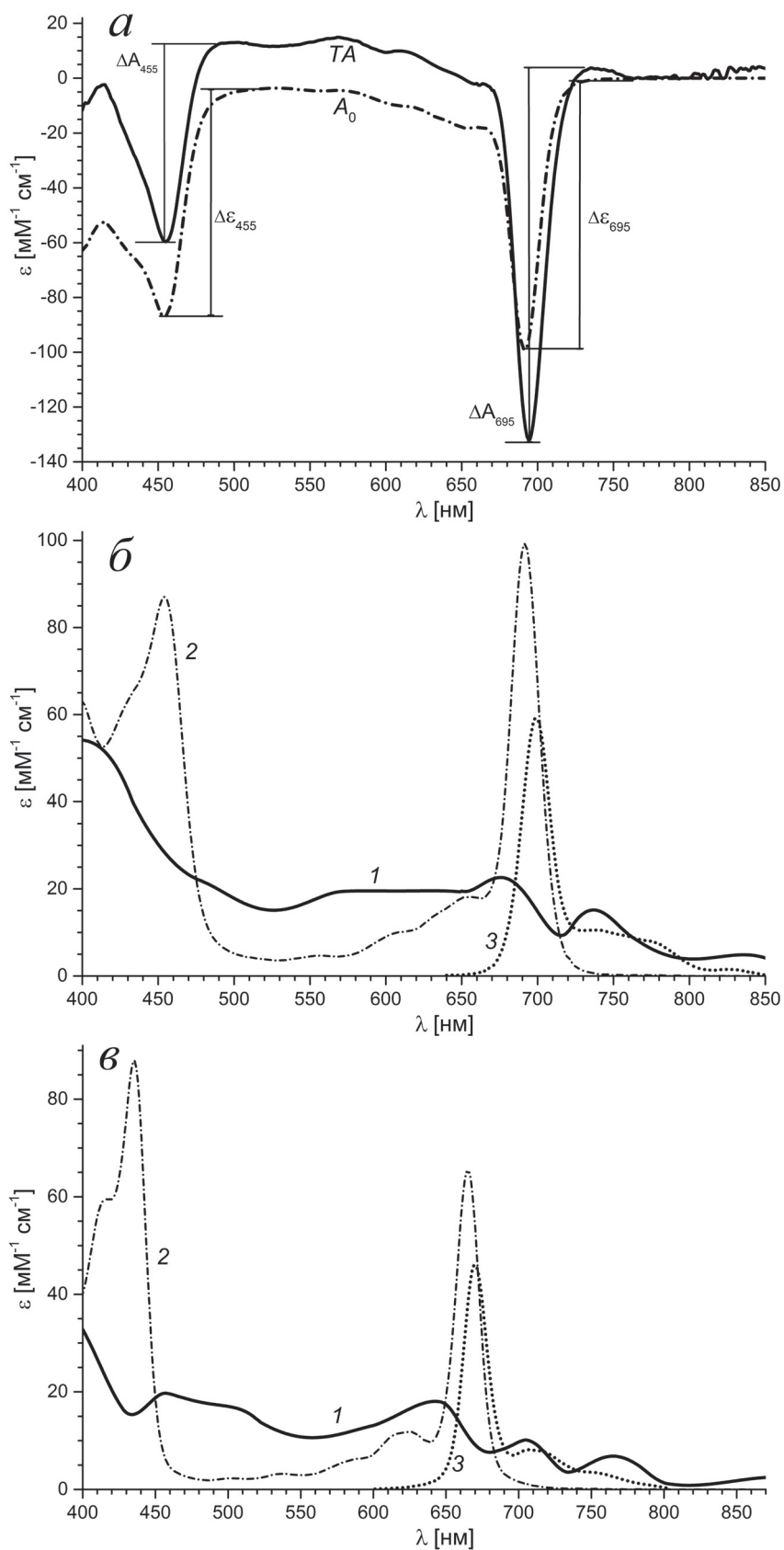


Рис. 1. Спектры хлорофиллов *a* и *d* в тетрагидрофуране. *a* – Переходный спектр возбуждённого Хл *d* на задержке 1 пс (ТА) и инвертированный линейный спектр поглощения Хл *d* в основном состоянии (A_0). *б* – Спектры поглощения возбуждённого S_1 (1, сплошная линия) и основного S_0 (2, штрих-пунктир) электронных состояний Хл *d*, а также модельный спектр стимулированного излучения Хл *d* (3, точки). *в* – Спектры поглощения состояний S_1 (1, сплошная линия) и S_0 (2, штрих-пунктир), а также модельный спектр стимулированного излучения (3, точки) Хл *a*

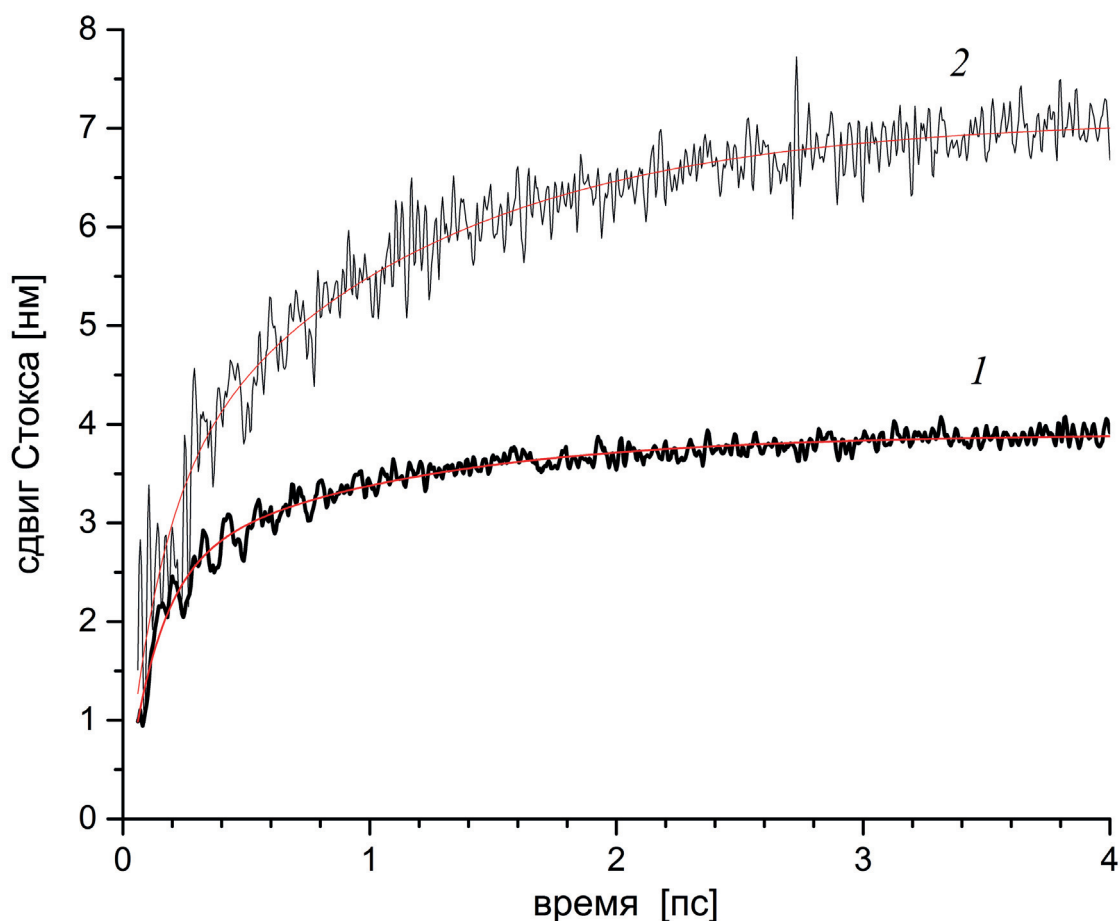


Рис. 2. Изменение во времени величины сдвига Стокса для Хл *a* (1) и Хл *d* (2)

1,0–1,1 пс, однако медленная компонента сдвига Стокса Хл *d* ($\Delta\lambda_2 = 4,0$ нм) существенно превосходит по величине сдвиг Хл *a* ($\Delta\lambda_2 = 1,5$ нм). Медленная компонента обусловлена взаимодействием дипольного момента возбуждённого состояния Хл с окружающим растворителем (диэлектрическая проницаемость ТГФ равна 7,6). Присутствие дополнительной кетонной группы в макроцикле Хл *d* усиливает перераспределение электронной плотности в возбуждённом состоянии, что соответствует большей величине сдвига Хл *d* по сравнению с Хл *a*. Быстрая компонента отражает внутримолекулярную релаксацию

порфиринового макроцикла, и в случае Хл *a* динамика сдвига Стокса на временах ≤ 1 пс содержит выраженные когерентные низкочастотные осцилляции.

На рис. 3 показано изменение амплитуды выцветания полосы Q_y для Хл *a* (толстые линии) и Хл *d* (тонкие линии) во времени. Экспериментальные данные приведены для двух углов оптической поляризации – параллельной (верхние кривые) и ортогональной (нижние кривые). Для ортогональной компоненты полосы выцветания Хл *a* приведены две повторности (точки), которые демонстрируют, что небольшие отклонения от экспонен-

Характерные времена и амплитуды двух экспоненциальных компонент сдвига Стокса Хл *a* и Хл *d*

Компоненты	Быстрая		Медленная		Сумма
	τ_1 (пс)	$\Delta\lambda_1$ (нм)	τ_2 (пс)	$\Delta\lambda_2$ (нм)	
Хл <i>a</i>	$0,13 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,05$	$3,9 \pm 0,15$
Хл <i>d</i>	$0,14 \pm 0,02$	$3,1 \pm 0,24$	$1,10 \pm 0,03$	$4,0 \pm 0,12$	$7,1 \pm 0,36$

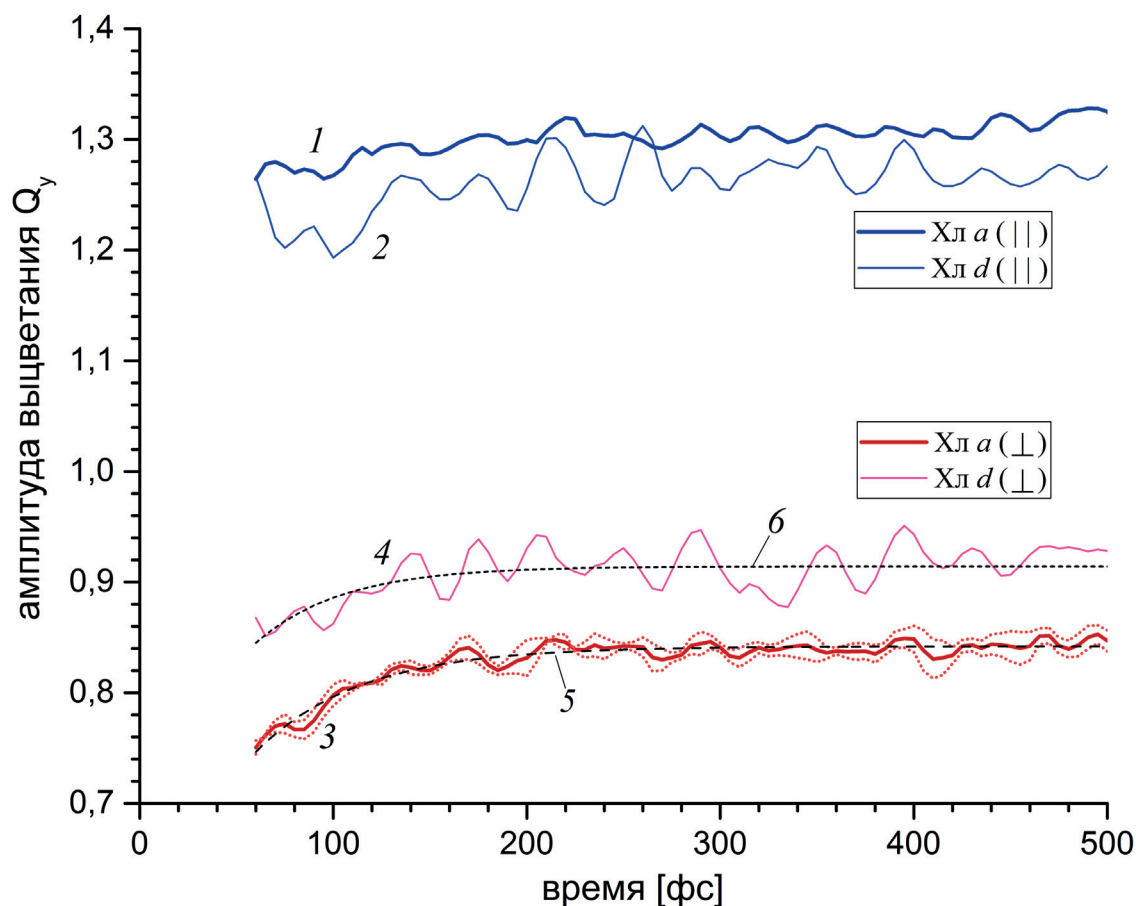


Рис. 3. Изменение во времени суммарной амплитуды выцветания полосы Q_y для Хл *a* (толстые линии 1 и 3) и Хл *d* (тонкие линии 2 и 4). Экспериментальные данные приведены для параллельных – синие кривые сверху (1 и 2) и ортогональных – красные кривые внизу (3 и 4) поляризационных компонент поглощения. Для ортогональной компоненты полосы выцветания Хл *a* приведены две повторности (не показана). Кривые нормированы относительно магической поляризационной компоненты (не показана). Изменение поглощения во временном диапазоне 100 фс отражает появление стимулированного излучения в результате электронного перехода $S_2 \rightarrow S_1$, характерное время которого составляет 54 фс для Хл *a* (толстый пунктир, 5) и 45 фс – для Хл *d* (тонкий пунктир, 6)

циальной динамики (разреженный пунктир) имеют систематический характер (обусловлены когерентной динамикой ТГФ, данные не показаны).

Увеличение амплитуды выцветания во временном диапазоне 100 фс отражает появление дополнительного стимулированного излучения в результате электронного перехода $S_2 \rightarrow S_1$ [13], характерное время этой внутримолекулярной конверсии составило 54 ± 3 фс для Хл *a* и 45 ± 9 фс – для Хл *d* (аппроксимации экспериментальных данных экспоненциальной зависимостью показаны пунктирными линиями). Увеличение стимулированного излучения полосы Q_y в результате электронного перехода $S_2 \rightarrow S_1$ происходит преимущественно в ортогональной компоненте поляризации, данная анизотропия обусловлена тем обстоятельством, что вектор дипольного момента перехода Q_x ортогонален вектору перехода Q_y [12].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хл *a* является основным пигментом в фотосинтетическом аппарате растений, водорослей и большинства цианобактерий. Он участвует как в процессах поглощения и передачи световой энергии в светособирающих комплексах, так и в первичных фотохимических реакциях разделения зарядов в реакционных центрах ФС I и ФС II. Спектры первого синглетного возбуждённого состояния Хл *a* в видимом диапазоне до 670 нм были неоднократно описаны в литературе [16–18], однако для идентификации короткоживущих интермедиатов фотохимических реакций в фотосинтетических комплексах наибольший интерес представляет ближний инфракрасный диапазон в области 680–800 нм. Ранее нами был получен спектр возбуждённого состояния Хл *a* в ДМФ [19], в котором есть несколько заметных отличий от спектра Хл *a* в ТГФ, представленном на рис. 1, в.

Главное отличие двух работ связано с методом моделирования спектра стимулированного излучения. В работе Cherepanov et al. [19] спектр стимулированного излучения аппроксимировался одной гауссовой компонентой, ширина которой была равна ширине полосы $Q_y(0,0)$ линейного спектра поглощения Хл *a* в ДМФ. Однако в этой аппроксимации не учитывалось, что спектр флуоресценции Хл *a* в области 700–730 нм включает вибронную полосу перехода 0-1 и во многом является зеркальным отражением спектра поглощения, поэтому в области 700–730 нм стимулированное излучение должно включать спутанную полосу перехода $Q_y(0,1)$ [20]. В результате в спектре Хл *a* из работы Cherepanov et al. [19] в области 710–740 нм возник артефактный минимум, тогда как спектр S_1 на рис. 1, *в* имеет в этой области локальный максимум. Второе отличие также связано с аппроксимацией спектра стимулированного излучения. В работе Cherepanov et al. [19] его относительная амплитуда составила 92% от амплитуды полосы $Q_y(0,0)$ линейного спектра поглощения, тогда как в спектре на рис. 1, *в* амплитуда стимулированного излучения равна 70% от амплитуды поглощения. В результате спектр S_1 на рис. 1, *в* имеет локальный минимум в области 680 нм, который отсутствует в работе Cherepanov et al. [19]. Наконец, в области Core 400–450 нм имеют место заметные различия как в спектрах основного (S_0), так и в спектрах возбуждённого (S_1) состояний Хл *a*. По всей видимости, эти различия возникают из-за существенной разницы в диэлектрической проницаемости ДМФ ($\epsilon = 37$) и ТГФ ($\epsilon = 7,6$), так как электронные переходы Хл *a* в области Core смещены из-за сильных эффектов электрон-фононного сопряжения [21].

В нескольких работах проводились измерения внутримолекулярной конверсии $S_n \rightarrow S_1$ для Хл *a* в различных растворителях. В работе Shi et al. [22] использовался метод время-разрешённой флуоресценции с фемтосекундным истощением стимулированного излучения (FS-TR-SEP-FD) для исследования флуоресценции Хл *a* в различных растворителях. Для Хл *a* в растворе ТГФ оценка времени перехода $S_2 \rightarrow S_1$, согласно работе Shi et al. [22], составила 138 фс, что вдвое превышает время 54 фс, полученное выше. Различие может быть связано с тем, что кросс-корреляционная функция между импульсом накачки и зондирующим импульсом в работе Shi et al. [22] имела длительность около 130 фс, поэтому более быстрые процессы в указанной работе не могли быть разрешены. В наших измерениях длительность

как возбуждающего, так и зондирующего импульса была равна 24 фс, поэтому кросс-корреляционная функция составляла ~48 фс, что дало возможность разрешить более быструю динамику внутримолекулярной конверсии.

В работе Bricker et al. [13] измеряли безызлучательную релаксацию высокоэнергетических возбуждённых состояний $S_n \rightarrow S_1$ до низшего возбуждённого состояния методом сверхбыстрой абсорбционной спектроскопии Хл *a* в этаноле, возбуждающий импульс был локализован в области Core на 442 нм и имел длительность 55 фс. Эффективное время переходов $S_n \rightarrow S_1$ составило 143 фс, на основании чего была получена оценка времени перехода $S_2 \rightarrow S_1$ – 128 фс [13]. Однако время разрешения указанных измерений было ограничено кросс-корреляционной функцией ~110 фс, поэтому полученная оценка представляет лишь верхний предел для времени внутримолекулярной конверсии Хл *a*.

Нам не известно прямых экспериментальных измерений времени перехода $S_2 \rightarrow S_1$ для Хл *d*, однако в работе Reimers et al. [12] расчёт времени внутримолекулярной $S_2 \rightarrow S_1$ релаксации Хл *d* методом теории функционала плотности САМ-В3LYP дал оценку 119 фс, что почти втрое превышает время 45 фс, полученное в наших экспериментах.

В последнее десятилетие предметом пристального внимания стало изучение оксигенных фотосинтезирующих организмов, которые могут в разной степени замещать Хл *a* другими длинноволновыми и, следовательно, низкоэнергетическими молекулами Хл *d* и *f* в пигмент-белковых комплексах обеих фотосистем [3, 5, 23–26]. Цианобактерия *A. marina* была первым обнаруженным организмом, осуществляющим оксигенный фотосинтез, в котором универсальный хромофор Хл *a* почти полностью заменён на Хл *d* [27, 28]. Основной электронный переход Хл *d* смещён примерно на 30 нм в сторону более низких энергий по сравнению с Хл *a*, как в органических растворителях [29, 30], так и в пигмент-белковых комплексах обеих фотосистем [26, 31]. Красное смещение полосы поглощения Хл *d* соответствует понижению энергии возбуждённого состояния примерно на 100 мэВ, что существенно уменьшает движущую силу первичных процессов разделения зарядов в фотосинтетических комплексах с участием Хл *d*. В «канонической» ФС I из цианобактерий, содержащей Хл *a*, изменение свободной энергии при образовании первичной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ составляет по разным оценкам всего 30–160 мэВ [6, 32–34], поэтому

объяснение механизма разделения зарядов в фотосинтетических комплексах, содержащих длинноволновые формы низкоэнергетических молекул Хл *d*, представляет фундаментальную проблему [5, 25].

Пигмент-белковый комплекс ФС I из *A. marina* включает 1–2 молекулы Хл *a* [35, 36]. На основании измерений переходных спектров нестационарного поглощения (ТА) было высказано предположение, что молекула (молекулы) Хл *a* может входить в число кофакторов цепи переноса электрона реакционного центра ФС I из *A. marina*, например, выполняя роль первичного акцептора электрона в сайте еС3, что соответствует функции первичного акцептора А₀ в каноническом комплексе ФС I [37]. Недавние структурные исследования [7, 8] показали, что кофакторы в положениях еС3 представляют собой не Хл *a*, а скорее всего, феофитин *a* (свободный от магния макроцикл Хл *a*). Однако из-за недостаточного разрешения структурной модели, полученной методом одночастичной криоэлектронной микроскопии, не удалось однозначно отнести хромофоры в позициях еС2, расположенных в реакционном центре между Р740 и еС3, ни к Хл *d*, ни к Хл *a*. Молекула хлорофилла в этом сайте может действовать либо как первичный акцептор электрона, либо как первичный донор электрона, играя ключевую роль в функционировании фотосистемы ФС I. Таким образом, вопрос об участии Хл *a* или Хл *d* в первичной фотохимии ФС I из *A. marina* остаётся открытым, поэтому определение спектров возбуждённых состояний этих хромофоров позволяет более надёжно идентифицировать электронные состояния короткоживущих интермедиатов и уточнить мо-

лекулярный механизм первичных фотохимических реакций в ФС I.

Вклад авторов. Д.А. Черепанов, В.А. Надточенко – концепция и руководство работой, анализ фемтосекундных измерений, написание и редактирование текста статьи; А.А. Петрова, А.И. Вишневская – выращивание цианобактерии *A. marina* и выделение хлорофилла *d*; М.Д. Мамедов – выделение хлорофилла *a*; Ф.Е. Гостев, И.В. Шелаев, А.В. Айбуш – проведение фемтосекундных измерений.

Финансирование. Работы по выращиванию цианобактерии *A. marina*, выделению и спектральной характеристике хлорофилла *d*, а также измерение фемтосекундных спектров возбуждения хлорофиллов *a* и *d* выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-10085). Работы по выделению, характеристике хлорофилла *a* выполнены за счёт средств госзадания «Химико-физические механизмы взаимодействия интенсивного лазерного излучения с биологическими системами» (№ АААА-А19-119012990175-9).

Благодарности. В работе использовано оборудование (фемтосекундная установка) Центра коллективного пользования ФИЦ ХФ РАН «Анализ химических, биологических систем и природных материалов: масс-спектральная микроскопия и фемтосекундная лазерная микроскопия-спектроскопия» (рег. номер: 506694).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khatypov, R. A., Khmel'nitskiy, A. Y., Leonova, M. M., Vasilieva, L. G., and Shuvalov, V. A. (2008) Primary light-energy conversion in tetrameric chlorophyll structure of photosystem II and bacterial reaction centers: I. A review, *Photosynth. Res.*, **98**, 81-93, doi: 10.1007/s11120-008-9370-6.
2. Mamedov, M., Govindjee, Nadtochenko, V., and Semenov, A. (2015) Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms, *Photosynth. Res.*, **125**, 51-63, doi: 10.1007/s11120-015-0088-y.
3. Nürnberg, D. J., Morton, J., Santabarbara, S., Telfer, A., Joliot, P., et al. (2018) Photochemistry beyond the red limit in chlorophyll *f*-containing photosystems, *Science*, **360**, 1210-1213, doi: 10.1126/science.aar8313.
4. Gisriel, C., Shen, G., Kurashov, V., Ho, M. Y., Zhang, S., et al. (2020) The structure of Photosystem I acclimated to far-red light illuminates an ecologically important acclimation process in photosynthesis, *Sci. Adv.*, **6**, eaay6415, doi: 10.1126/sciadv.aay6415.
5. Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Voloshin, R. A., Korol'kova, D. V., et al. (2016) Chlorophylls *d* and *f* and their role in primary photosynthetic processes of cyanobacteria, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 201-212, doi: 10.1134/S0006297916030020.
6. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Aybush, A. V., Mamedov, M. D., et al. (2020) Evidence that chlorophyll *f* functions solely as an antenna pigment in far-red-light photosystem I from

- Fischerella thermalis* PCC 7521, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861** doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148184.
7. Hamaguchi, T., Kawakami, K., Shinzawa-Itoh, K., Inoue-Kashino, N., Itoh, S., et al. (2021) Structure of the far-red light utilizing photosystem I of *Acaryochloris marina*, *Nat. Commun.*, **12**, 1-10, doi: 10.1038/s41467-021-22502-8.
 8. Xu, C., Zhu, Q., Chen, J., Shen, L., Yi, X., et al. (2021) A unique photosystem I reaction center from a chlorophyll *d*-containing cyanobacterium *Acaryochloris marina*, *J. Integr. Plant Biol.*, **63**, 1740-1752, doi: 10.1111/jipb.13113.
 9. Reimers, J. R., Biczysko, M., Bruce, D., Coker, D. F., Frankcombe, T. J., et al. (2016) Challenges facing an understanding of the nature of low-energy excited states in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 1627-1640, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.06.010.
 10. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Petrova, A. A., et al. (2017) Mechanism of adiabatic primary electron transfer in photosystem I: Femtosecond spectroscopy upon excitation of reaction center in the far-red edge of the Q_Y band, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1858**, 895-905, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.008.
 11. Ritchie, R. J., Sma-Air, S., and Phongphattarawat, S. (2021) Using DMSO for chlorophyll spectroscopy, *J. Appl. Phycol.*, **33**, 2047-2055, doi: 10.1007/s10811-021-02438-8.
 12. Reimers, J. R., Cai, Z. L., Kobayashi, R., Rätsep, M., Freiberg, A., et al. (2013) Assignment of the Q-bands of the chlorophylls: coherence loss via Q_x-Q_y mixing, *Sci. Rep.*, **3**, 1-8, doi: 10.1038/srep02761.
 13. Bricker, W. P., Shenai, P. M., Ghosh, A., Liu, Z., Enriquez, M. G. M., et al. (2015) Non-radiative relaxation of photoexcited chlorophylls: Theoretical and experimental study, *Sci. Rep.*, **5**, 1-16, doi: 10.1038/srep13625.
 14. Kobayashi, M., Akutsu, S., Fujinuma, D., Furukawa, H., Komatsu, H., et al. (2013) Physicochemical properties of chlorophylls in oxygenic photosynthesis – succession of co-factors from anoxygenic to oxygenic photosynthesis, in *Photosynthesis* (Dubinsky, Z., ed.) pp. 47-90, doi: 10.5772/55460.
 15. Samanta, A. (2006) Dynamic Stokes shift and excitation wavelength dependent fluorescence of dipolar molecules in room temperature ionic liquids, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 13704-13716, doi: 10.1021/jp060441q.
 16. Shepanski, J. F., and Anderson, R. W. (1981) Chlorophyll-*a* excited singlet state absorption measured in the picosecond time regime, *Chem. Phys. Lett.*, **78**, 165-173, doi: 10.1016/0009-2614(81)85577-7.
 17. Leupold, D., Struck, A., Stiel, H., Teuchner, K., Oberländer, S., et al. (1990) Excited-state properties of 20-chloro-chlorophyll *a*, *Chem. Phys. Lett.*, **170**, 478-484, doi: 10.1016/S0009-2614(90)87088-9.
 18. De Boni, L., Correa, D. S., Pavinatto, F. J., Dos Santos, D. S., and Mendonça, C. R. (2007) Excited state absorption spectrum of chlorophyll *a* obtained with white-light continuum, *J. Chem. Phys.*, **126**, 165102, doi: 10.1063/1.2722755.
 19. Cherepanov, D. A., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., Aibush, A. V., Mamedov, M. D., et al. (2020) Visible and near infrared absorption spectrum of the excited singlet state of chlorophyll *a*, *High Energy Chem.*, **54**, 145-147, doi: 10.1134/S0018143920020058.
 20. Rätsep, M., Linnanto, J. M., and Freiberg, A. (2019) Higher order vibronic sidebands of chlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *a* for enhanced excitation energy transfer and light harvesting, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 7149-7156, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b06843.
 21. Sirohiwal, A., Berraud-Pache, R., Neese, F., Izsák, R., and Pantazis, D. A. (2020) Accurate computation of the absorption spectrum of chlorophyll *a* with pair natural orbital coupled cluster methods, *J. Phys. Chem. B*, **124**, 8761-8771, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c05761.
 22. Shi, Y., Liu, J. Y., and Han, K. L. (2005) Investigation of the internal conversion time of the chlorophyll *a* from S₃, S₂ to S₁, *Chem. Phys. Lett.*, **410**, 260-263, doi: 10.1016/j.cplett.2005.05.017.
 23. Gan, F., Zhang, S., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. C., et al. (2014) Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light, *Science*, **345**, 1312-1317, doi: 10.1126/science.1256963.
 24. Chen, M., Li, Y., Birch, D., and Willows, R. D. (2012) A cyanobacterium that contains chlorophyll *f* – a red-absorbing photopigment, *FEBS Lett.*, **586**, 3249-3254, doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.045.
 25. Schmitt, F. J., Campbell, Z. Y., Bui, M. V., Hüls, A., Tomo, T., et al. (2019) Photosynthesis supported by a chlorophyll *f*-dependent, entropy-driven uphill energy transfer in *Halomicronema hongdechloris* cells adapted to far-red light, *Photosynth. Res.*, **139**, 185-201, doi: 10.1007/s11120-018-0556-2.
 26. Tomo, T., Allakhverdiev, S. I., and Mimuro, M. (2011) Constitution and energetics of photosystem I and photosystem II in the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **104**, 333-340, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.02.017.
 27. Schiller, H., Senger, H., Miyashita, H., Miyachi, S., and Dau, H. (1997) Light-harvesting in *Acaryochloris marina* – spectroscopic characterization of a chlorophyll *d*-dominated photosynthetic antenna system, *FEBS Lett.*, **410**, 433-436, doi: 10.1016/S0014-5793(97)00620-0.
 28. Miyashita, H., Adachi, K., Kurano, N., Ikemoto, H., Chihara, M., et al. (1997) Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll *d* as the major chlorophyll, *Plant Cell Physiol.*, **38**, 274-281, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029163.

29. Niedzwiedzki, D. M., and Blankenship, R. E. (2010) Singlet and triplet excited state properties of natural chlorophylls and bacteriochlorophylls, *Photosynth. Res.*, **106**, 227-238, doi: 10.1007/s11120-010-9598-9.
30. Nieuwenburg, P., Clarke, R. J., Cai, Z.-L., Chen, M., Larkum, A. W. D., et al. (2007) Examination of the photophysical processes of chlorophyll *d* leading to a clarification of proposed uphill energy transfer processes in cells of *Acaryochloris marina*, *Photochem. Photobiol.*, **77**, 628-637, doi: 10.1562/0031-8655(2003)0770628eotppo2.0.co2.
31. Hu, Q., Marquardt, J., Iwasaki, I., Miyashita, H., Kuran, N., et al. (1999) Molecular structure, localization and function of biliproteins in the chlorophyll *a/d* containing oxygenic photosynthetic prokaryote *Acaryochloris marina*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1412**, 250-261, doi: 10.1016/S0005-2728(99)00067-5.
32. Kleinherenbrink, F. A. M., Hastings, G., Blankenship, R. E., and Wittmershaus, B. P. (1994) Delayed fluorescence from Fe-S type photosynthetic reaction centers at low redox potential, *Biochemistry*, **33**, 3096-3105, doi: 10.1021/bi00176a044.
33. Giera, W., Ramesh, V. M., Webber, A. N., van Stokkum, I., van Grondelle, R., et al. (2010) Effect of the P700 pre-oxidation and point mutations near A₀ on the reversibility of the primary charge separation in Photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1797**, 106-112, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.09.006.
34. Holzwarth, A. R., Müller, M. G., Niklas, J., and Lubitz, W. (2005) Charge recombination fluorescence in photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 5903-5911, doi: 10.1021/jp046299f.
35. Ohashi, S., Miyashita, H., Okada, N., Iemura, T., Watanabe, T., et al. (2008) Unique photosystems in *Acaryochloris marina*, *Photosynth. Res.*, **98**, 141-149, doi: 10.1007/s11120-008-9383-1.
36. Itoh, S., Mino, H., Itoh, K., Shigenaga, T., Uzumaki, T., et al. (2007) Function of chlorophyll *d* in reaction centers of photosystems I and II of the oxygenic photosynthesis of *Acaryochloris marina*, *Biochemistry*, **46**, 12473-12481, doi: 10.1021/bi7008085.
37. Kumazaki, S., Abiko, K., Ikegami, I., Iwaki, M., and Itoh, S. (2002) Energy equilibration and primary charge separation in chlorophyll *d*-based photosystem I reaction center isolated from *Acaryochloris marina*, *FEBS Lett.*, **530**, 153-157, doi: 10.1016/S0014-5793(02)03446-4.

COMPARATIVE ABSORPTION DYNAMICS OF SINGLET EXCITED STATES OF CHLOROPHYLLS *a* AND *d*

D. A. Cherepanov^{1,2*}, A. A. Petrova², M. D. Mamedov², A. I. Vishnevskaya², F. E. Gostev¹,
I. V. Shelaev^{1,2}, A. V. Aybush¹, and V. A. Nadtochenko^{1,3}

¹ *Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: tscherepanov@gmail.com*

² *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

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

The transient absorption dynamics of chlorophylls *a* and *d* dissolved in tetrahydrofuran was measured by broadband femtosecond laser pump-probe spectroscopy in the spectral range from 400 to 870 nm. The absorption spectra of the excited singlet states S₁ of chlorophylls *a* and *d* were obtained, and the dynamics of the Q_y band shift of stimulated emission (the Stokes shift of fluorescence) was determined for these pigments in the time range from 60 fs to 4 ps. The kinetics of intramolecular conversion Q_x → Q_y (the electronic transition S₂ → S₁) has been measured; the characteristic relaxation time was 54 ± 3 fs for chlorophyll *a* and 45 ± 9 fs for chlorophyll *d*.

Keywords: chlorophyll *a*, chlorophyll *d*, femtosecond laser spectroscopy, excited state spectrum, Stokes shift dynamics, internal conversion

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ КАНАЛЬНЫХ РОДОПСИНОВ В ЗЕЛЕННЫХ И КРИПТОФИТОВЫХ ВОДОРΟΣЛЯХ БЕЛОГО И ЧЕРНОГО МОРЕЙ

© 2022 О.В. Карпова^{1*}, Е.Н. Виноградова^{1,2}, Е.С. Лобакова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: karпова_ov@mail.bio.msu.ru

² НИЦ «Курчатовский институт», НБИКС Геномный центр, 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.07.2022

После доработки 24.08.2022

Принята к публикации 24.08.2022

Канальные родопсины зеленых (Chlorophyta) и криптофитовых (Cryptophyta) водорослей при фотоактивации способны модулировать мембранный потенциал клетки и благодаря этому уникальному свойству широко применяются в оптогенетике – современном методе светозависимой регуляции биологических процессов. Для поиска новых генов, перспективных для оптогенетики, мы разработали ПЦР-тесты на канальные родопсины. Были проанализированы 6 беломорских изолятов зеленых водорослей, принадлежащих к родам *Haematococcus* и *Bracteacoccus*, а также 2 образца криптофитовых водорослей *Rhodomonas* sp. из районов Белого и Черного морей. Наш метод позволил успешно выявить ранее идентифицированные канальные родопсины у водорослей рода *Haematococcus*, а также впервые обнаружить гены катионных канальных родопсинов в водорослях рода *Bracteacoccus*. Также идентифицированы отдаленно гомологичные гены анионных канальных родопсинов в образцах *Rhodomonas* sp. из районов Белого и Черного морей. Представленные результаты показывают, что разработанные ПЦР-тесты могут быть полезным инструментом для поиска уникальных генов родопсинов среди представителей Chlorophyta и Cryptophyta в широком диапазоне внутригрупповой гомологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: катионные канальные родопсины; анионные канальные родопсины; зеленые водоросли; криптофитовые водоросли; оптогенетика.

DOI: 10.31857/S0320972522100141, EDN: BDNOYX

ВВЕДЕНИЕ

Канальные родопсины выполняют функции фоторецепторов и встречаются преимущественно у водорослей, способных к фототаксису. Они относятся к семейству интегральных мембранных белков с семью трансмембранными α -спиралями (ТМ-1–ТМ-7) и ретиналем в качестве хромофора. Фотоизомеризация в ответ на поглощение света в области 400–700 нм приводит к конформационным изменениям белка, в результате которых родопсин напрямую осуществляет пассивный трансмембранный транспорт ионов по градиенту. Способность к светозависимому транспорту ионов является уникальным свойством канальных родопсинов, не известным ни для каких других природных белков [1].

Принятые сокращения: ССР – катионные канальные родопсины; АСР – анионные канальные родопсины.

* Адресат для корреспонденции.

Впервые катионные канальные родопсины (CrChR1 и CrChR2) были обнаружены в одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [2–4]. Было показано, что CrChR1 и CrChR2 являются светоактивируемыми каналами, проницаемыми для H^+ , Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , и вызывают деполяризацию мембраны за счет транспорта Na^+ и H^+ в клетки. Более того, посредством мембранной деполяризации при экспрессии CrChR2 в нейронах гиппокампа крысы удалось индуцировать светозависимую активацию [5]. Собственно, с этой новаторской работы 2005 г. и начинается становление оптогенетики как метода светозависимой регуляции биологических процессов путем гетерологичной экспрессии родопсинов в клетках-мишенях.

В оптогенетическом эксперименте для контроля генерации потенциалов действия в клетке должна присутствовать пара родопсинов с разными спектрами фотоактивации и разной селективностью каналов, катионных и анионных, для деполяризации и гиперполяризации

мембраны соответственно. Для деполяризации мембраны и стимуляции нейрональной активности используются катионные каналы родопсины (CCR, cation channel rhodopsin) [6]. CCR зеленых водорослей – единственные представители эукариотических родопсинов, сенсорные функции которых были экспериментально подтверждены *in vivo* [2]. Наиболее изучен CrChR2 из *C. reinhardtii* как прототип CCR – его кристаллическая структура, направленный мутагенез, механизм фотоактивации и т.д. Именно CrChR2 и его производные наиболее часто используются в оптогенетических исследованиях в качестве активирующих молекул.

Впервые гены природных анионных каналов родопсинов (ACR, anion channel rhodopsin) были идентифицированы при геномном анализе водоросли *Guillardia theta* (Cryptophyta) [7]. Оказалось, что криптофитовые GtACR1 и GtACR2 способны индуцировать фототоки до 10^3 выше, чем галородопсины, традиционно использовавшиеся для гиперполяризации мембраны и тушения нейронов [8], и, таким образом, являются идеальными кандидатами для оптогенетических исследований.

Основная сложность оптогенетического подхода заключается в подборе родопсинов для каждой данной задачи и, как следствие, в необходимости увеличения количества и функционального разнообразия идентифицированных родопсинов с уникальными характеристиками: высокой световой чувствительностью, быстрыми фотоциклами, высокой амплитудой фототока и скоростью инактивации [9]. Впечатляющие успехи оптогенетики, включая частичное восстановление зрения у человека после родопсиновой терапии [10], указывают также на возрастающий потенциал этого инновационного метода для коммерциализации. По данным 2021 г., идентифицировано около 100 генов CCR зеленых водорослей (Chlorophyceae) и по крайней мере 50 генов ACR криптофитовых (Cryptophyceae), только небольшая часть которых охарактеризована [11]. В открытом доступе гены-кандидаты для оптогенетики представлены преимущественно в виде синтетических продуктов, лицензированных для дальнейшего применения. Все это свидетельствует о важности и необходимости разрабатывать собственную базу для оптогенетических исследований и в первую очередь искать продуцентов новых уникальных родопсинов.

С этой целью мы разработали ПЦР-тесты для идентификации генов канальных родопсинов Chlorophyta и Cryptophyta и проанализировали 6 штаммов зеленых водорос-

лей беломорского бассейна из коллекции кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, а также образцы криптофитовых водорослей (Белое и Черное моря). Мы обнаружили и частично охарактеризовали гены CCR (37CCR, 98CCR1, 98CCR1-1) в двух штаммах *Haematococcus lacustris* (NAMSU-ВМ-6/13 и NAMSU-ВМ-7/15) и в штамме *Bracteacoccus aggregatus* NAMSU-ВМ-5/15 (34CCR), причем данные о наличии генов CCR в водорослях рода *Bracteacoccus* приводятся впервые. В черноморском изоляте криптофитовых водорослей удалось идентифицировать по одному гену CCR и ACR (*CryCCR*, *CryACR*), в то время как в природном образце криптофитовых беломорского бассейна обнаружен ген ACR, *RhoACR*. Обсуждаются возможности геномного анализа неохарактеризованных объектов водорослей и применение данных ПЦР для дальнейшего изучения генов родопсинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Происхождение штаммов зеленых водорослей (Chlorophyta) и природных образцов криптофитовых водорослей (Cryptophyta). Сбор проб микроводорослей осуществлялся в 2011–2016 гг. в ходе ежегодных экспедиций кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ на полуостров Киндо карельского берега Ругозерской губы Кандалакшского залива Белого моря, в окрестностях Беломорской биологической станции (ББС МГУ) им. Н.А. Перцова в бухте Пробкиной Губки (С.Ш. 66°32'24"; В.Д. 33°11'2").

Chlorophyta. Штамм *H. lacustris* NAMSU-ВМ-7/15 был изолирован из пресноводного образца, полученного на территории ББС МГУ. Все остальные исследованные штаммы *H. lacustris* (IPPAS Н-2018; NAMSU-ВМ-6/13; NAMSU-ВМ-К/15; NAMSU-ВМ-4/13) были получены из литоральных образцов воды разной солености (0–25‰) [12, 13].

Штамм *B. aggregatus* NAMSU-ВМ-5/15 был изолирован из образца озерной воды (6‰) [13]. В дополнение к беломорскому образцу был проанализирован штамм *Bracteacoccus* sp. SykoA Ch-040-10 (почва, Приполярный Урал) из Коллекции живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми НЦ УРО РАН.

Cryptophyta. Образцы некультивируемых форм криптомонад получали из меромиктического озера Кисло-Сладкое на побережье Кандалакшского залива Белого моря (глубина – 3,6 м, соленость – свыше 24‰). В период размножения водорослей (июль–август) боль-

шие объемы озерной воды подвергали центрифугированию, клеточные осадки обрабатывали реагентом RNeasy (ThermoFisher Scientific, США), после чего хранили при -20°C .

Обогащенная культура черноморского изолята криптофитовых *Rhodomonas* sp. OVPo-2021a (штамм IBSS-59) была получена из коллекции ФИЦ ИнБЮМ РАН, Севастополь.

Условия культивирования. Chlorophyta. Альгологически чистые культуры *H. lacustris* и *B. aggregatus* были получены многократными пересевами на твердой среде BG-11 [14], содержащей 2% агара, и поддерживались в жидкой среде BG-11 при 15°C в культивационной камере («Liebherr», Германия) при освещении белым светом 20 мкмоль квантов ФАР $\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ [14]. Для получения активно растущих культур штаммы зеленых водорослей пересевали в свежую среду BG-11 и инкубировали 1–2 недели при 25°C и освещении белым светом 40 мкмоль квантов ФАР $\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$.

Cryptophyta. Культуру черноморского изолята *Rhodomonas* sp. OVPo-2021a поддерживали в среде Уолна на основе стерильной морской воды [15] при $12\text{--}15^{\circ}\text{C}$ в культивационной камере при освещении белым светом 20 мкмоль квантов ФАР $\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$.

Выделение геномной ДНК из зеленых водорослей и образцов криптофитовых водорослей проводили с использованием набора для выделения ДНК FastDNA («MP Biomedicals», США). Для экстракции ДНК образцы (около 100 мг сырого веса) лизировали механическим

разрушением в дезинтеграторе FastPrep-24™ 5G в присутствии микробусин Lysing Matrix type A («MP Biomedicals»). Препараты геномной ДНК, выделенные из образцов криптофитовых водорослей, были проанализированы по 18S-рДНК для определения таксономической принадлежности.

Разработка ПЦР-тестов для определения генов канальных родопсинов. Подбор ПЦР-праймеров производился для высококонсервативных участков генов канальных родопсинов на основании гомологии последовательностей, опубликованных ранее (Chlorophyta) или выявленных нами при анализе транскриптомных баз данных *Rhodomonas* (Cryptophyta), MMETSP1091 и MMETSP1389 [16].

Уровень гомологии определяли с помощью метода множественного выравнивания последовательностей CLUSTAL Omega EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk). Для поиска генов канальных родопсинов в базах данных в качестве мишеней использовали короткие консервативные последовательности в алгоритме tBLASTn (NCBI BLAST).

Подбор и анализ ПЦР-праймеров проводили с помощью программы OligoAnalyzer («Integrated DNA Technologies», США).

ПЦР и анализ ПЦР-продуктов. ПЦР выполняли на образцах геномной ДНК (до 10 нг на пробу) с использованием препарата DreamTaq PCR Master Mix («ThermoFisher Scientific», США). Продукты ПЦР фракционировали гель-электрофорезом в 1%-ной ага-

Таблица 1. Референтные гены канальных родопсинов Chlorophyta и Cryptophyta

Тип родопсина	Организм	Наименование гена	GenBank	Источник
Катионные канальные родопсины, CCR	Chlorophyta			
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	сенсорный опсин В, <i>CrChR2</i>	AF508966	[2]
	<i>Haematococcus pluvialis (lacustris)</i>	канальный опсин 1, <i>HpChR1</i>	JN596950	
	Cryptophyta			
	<i>Guillardia theta</i> CCMP2712	катионный канальный родопсин, <i>GiCCR1</i>	KU761994	[18]
		катионный канальный родопсин, <i>GiCCR2</i>	KU761992	
катионный канальный родопсин, <i>GiCCR3</i>		KU761993		
Анионные канальные родопсины, ACR	синтетический ген <i>ACR1</i>		KP171708	[7]
	синтетический ген <i>ACR2</i>		KP171709	

Таблица 2. ПЦР-праймеры, использованные в работе

Наименование	5'→3' последовательность	Источник*
18S 381F	TCCGGAGAGGGAGCMTGAGA	[19]
18S 1204R	CCCGYGTGAGTCAAATTA	
CCR_fwd	YGGHTGGGARGAGRTBTACGT	
CCR_rev	CCCTTGGGMACDGRTRTGGTA	
RhACR4_fwd	TGGGARGCMGTBTAYCTKCC	
RhACR6_rev	CGTCCAGGACTCGGAACACAGTG	
RhACR11_fwd	TGGCTYATCACNTGYCCSATYATGCT	
RhACR12_rev	GATGATSCCGTACASGTTCTTGCA	
RhACR13_rev	GATGATYCCRTAGAKGTTCTTGCA	
RhACR14_rev	GATGATGCCGTATGTGTTCTTGCA	
RhCCR_fwd	GARCARAAYATGCTYGGDGTNTTCATC	
RhCCR_rev	GAACCTTSTGGAASTCCTCYTCGTC	

* Все CCR- и ACR-специфические праймеры разработаны в данной статье.

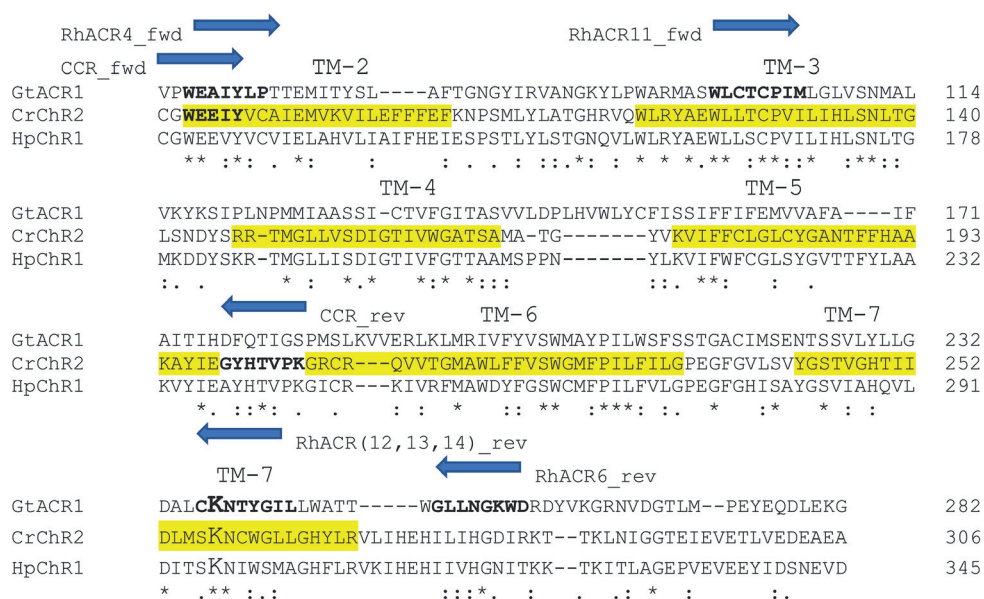


Рис. 1. Локализация ПЦР-праймеров в области консервативного функционального фрагмента TM-1–TM-7 канальных родопсинов Chlorophyta (CrChR2, HpChR1) и Cryptophyta (GtACR1). Трансмембранные спирали TM-2–TM-7 определены с помощью программы NCBI Conserved Domain Search (выделены желтым цветом). Участок присоединения ретиналя в TM-7 выделен крупным шрифтом. Точная локализация праймеров показана аминокислотными остатками, выделенными жирным шрифтом

розе, фрагменты ДНК элюировали из геля с помощью набора Cleanup Mini («Евроген», Россия), после чего анализировали секвенированием по методу Сэнгера (ЦПК Геном при ИМБ РАН, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск генов катионных канальных родопсинов, CCR, в микроводорослях Chlorophyta. Для анализа генов родопсинов из коллекции зеле-

ных водорослей были отобраны штаммы с фотосенсорными органеллами как потенциальные носители подобных генов [17]. Среди них 5 изолятов рода *Haematococcus* и 2 штамма рода *Bracteacoccus*.

Для разработки ПЦР-теста на родопсины CCR в качестве референтных генов мы использовали ген *HpChR1*, кодирующий канальный опсин 1 из *Haematococcus pluvialis (lacustris)* и ген *CrChR2*, кодирующий уже упоминавшийся ранее сенсорный опсин В из *C. reinhardtii* (табл. 1 и 2).

На рис. 1 показано выравнивание аминокислотных последовательностей *HpChR1* и *CrChR2* в области функционального участка родопсина, включающего трансмембранные спирали ТМ-1–ТМ-7, и расположение рабочих праймеров (CCR_fwd; CCR_rev) относительно консервативных доменов.

Результаты типичного ПЦР-анализа родопсинов CCR на образцах геномной ДНК приведены на рис. 2. Очевидные различия в ПЦР-спектрах между родами *Haematococcus* и *Bracteacoccus* указывают на то, что, предположительно, геномы анализированных штаммов *Haematococcus* содержат по 2 гена CCR, в то время как в штамме рода *Bracteacoccus* присутствует единственный ген CCR.

Полученные ПЦР-фрагменты генов CCR штаммов *Haematococcus* и *Bracteacoccus* были отсекувенированы (GenBank: ON643073–643077; табл. 3), и определены их ближайшие гомологи (табл. 3). Фрагменты генов *37CCR* и *98CCR1* размером около 800 п.н. из двух изолятов *H. lacustris* оказались практически идентичны ранее охарактеризованному гену родопсина 1 из *H. pluvialis*, *HpChR1* (GenBank: JN596950; 95% идентичности). А вот фрагмент гена *98CCR1-1* размером около 1200 п.н. из *H. lacustris* (NAMSU-BM-7/15) не имеет гомологии с *HpChR1*, но идентичен другому гену, предположительно, канального родопсина из *H. lacustris* (GenBank: MH845643; 98% идентичности). Ближайшим охарактеризованным гомологом гена *98CCR1-1* является ген канального опсина 2 из *Chlamydomonas raudensis* (GenBank: JN596949; 83% идентичности). Гены *34CCR* и *40CCR* – первые CCR, обнаруженные в микроводоросли рода *Bracteacoccus*, – еще менее гомологичны своему ближайшему гомологу, гену опсина В из *C. reinhardtii*, *CrChR2* (GenBank: AF508966; 77% идентичности).

Обращает на себя внимание сложная структура генов CCR из штаммов *Haematococcus* и *Bracteacoccus*: так, например, во фрагменте гена *98CCR1-1* четко определяются границы 4-х экзонов и 3-х интронов, что отражается на

протяженности гомологичной последовательности (37% длины фрагмента). В случае фрагмента гена *34CCR* обнаруживаются 2 области гомологии с *CrChR2*, которые составляют всего 20% его длины. При этом, по предварительным данным нашего анализа транскрипта *34CCR*, указанный фрагмент гена *34CCR* включает по 2 полных экзона и интрона, а также по неполному экзону и интрону.

При анализе транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов найденных генов обнаруживаются консервативные трансмембранные участки ТМ-2–ТМ-5, характерные для родопсинов (рис. 3).

Поиск генов канальных родопсинов в микроводорослях Cryptophyta. В криптофитовых микроводорослях идентифицированы гены канальных родопсинов обоих типов, CCR и ACR, что делает эти микроорганизмы уникальным ресурсом для развития инструментальной базы оптогенетики [1]. Однако работа с этим объектом имеет специфические особенности из-за небольшой распространенности в природе и сложностей (или невозможности) культивирования. Именно по этим причинам впервые о наличии свыше 40 генов канальных родопсинов было предсказано на основании анализа генома *G. theta* [7], первого представителя Cryptophyta, чей геном был полностью

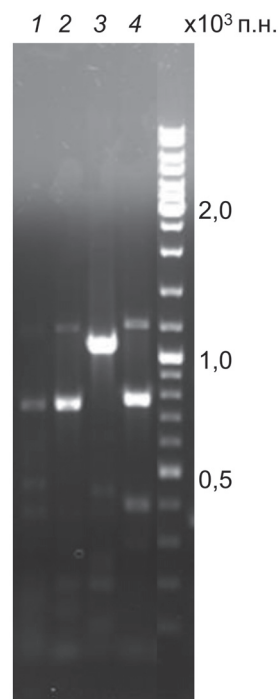


Рис. 2. ПЦР-анализ генов катионных канальных родопсинов в штаммах зеленых водорослей. Дорожки: 1 – *Haematococcus lacustris* (NAMSU-BM-4/13); 2 – *H. lacustris* (NAMSU-BM-6/13); 3 – *Bracteacoccus aggregatus* (NAMSU-BM-5/15); 4 – *H. lacustris* (NAMSU-BM-7/15)

Таблица 3. Идентифицированные гены катионных канальных родопсинов Chlorophyta

Наименование	Организм	GenBank	Гомолог		
			Наименование	Идентичность/ протяженность гомологии, %	GenBank
98CCR1-1, фрагмент гена	<i>H. lacustris</i> NAMSU-BM-7/15	ON643074	<i>H. lacustris</i> канальный родопсин (предположительно)	98/37	MH845643
98CCR1, фрагмент гена		ON643073	<i>H. pluvialis (lacustris)</i> канальный опсин 1, <i>HpChR1</i>	95/45	JN596950
37CCR, фрагмент гена	<i>H. lacustris</i> NAMSU-BM-6/13	ON643075		95/50	JN596950
34CCR, фрагмент гена	<i>B. aggregatus</i> NAMSU-BM-5/15	ON643076	<i>C. reinhardtii</i> сенсорный опсин B, <i>CrChR2</i>	77/20	AF508966
40CCR, фрагмент гена	<i>Bracteacoccus sp.</i> SykoA Ch-040-10	ON643077		75/19	AF508966

секвенирован. И до настоящего времени используется единственный подход к поиску родопсинов у криптофитовых водорослей: анализ данных по геномам/транскриптомам родственных видов с последующим синтезом генов-кандидатов и их гетерологичной экспрессией для проверки фотохимической активности. В своей работе мы также применили методы биоинформатики, но при создании ПЦР-систем для анализа генов родопсинов в неохарактеризованных природных образцах Cryptophyta.

В качестве объектов были использованы изоляты Cryptophyta – природный образец *Rhodomonas sp.* беломорского бассейна (не-

культивируемая форма) и обогащенная культура (поддерживаемая в лабораторных условиях) черноморской криптонады *Rhodomonas sp.* OVPo-2021a. Предварительный 18S-анализ показал, что беломорский изолят идентичен *Rhodomonas sp.*, ранее обнаруженному в том же районе (GenBank: JN934672; [20]).

К началу нашего проекта были опубликованы данные по родопсинам ACR и CCR *G. theta* и ряда лабораторных штаммов *Rhodomonas*: аминокислотные и кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности функциональных участков родопсинов TM-1–TM-7 [7, 18]. Этой информации, очевидно, было недостаточно для анализа высокогомологичных последо-

	---TM-2	TM-3	
37CCR	-----AQVLI AIFHEIESPSTMYLSTGNQVLWSX-YGEWLLSCPVI LIHLSNLTGR		50
98CCR1	-----AHVLI AIFHEIESPSTLYLSTGNQVLWLR-YAEWLLSCPVI LIHLSNLTGM		50
HpChR1	EVYVCVIELAHVLI AIFHEIESPSTLYLSTGNQVLWLR-YAEWLLSCPVI LIHLSNLTGM		179
CrChR2	EYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR-YAEWLLTCPVILIHLSNLTGL		141
98CCR1-1	-----IYHEFDHPCTLYLSTGNWILWLR-YGEWLLTCPVILIHLSNITGL		44
34CCR	-----CTVTQVNGVVPWLR-YGEWLLTCPVILIHLSNLTGL		36
40CCR	-----TPLAQNTASGCSPGPVI LIHLSNLTGL		27
		.. *****:**	
	TM-4	TM-5	
37CCR	KDEXCKRTMGLGISDIGPMVHGTSEHMSPANYRKVIVRFWGLWY-----		94
98CCR1	KDDYSKRTMGLLIRDIGTIVSGTTAAMSPPNYLKV-----		85
HpChR1	KDDYSKRTMGLLISDIGTIVFGTTAAMSPPNYLKVIFWFCGLSYGVTTFYLAAKVYIEAY		239
CrChR2	SNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMA-TGYVKVIFFCGLGCLCYGANTFFHAAKAYIEGY		200
98CCR1-1	KNDYNKRTMWLLVSDIGCVVMGVTAALC-YDYKKWIFYCLGLCYGSNTYFHAAK-----		97
34CCR	KNNYSKRTMMLLMSDLGTIVMGITAALS-SSPIKIIFFCIGLCYGCNTWFHAAKV-----		90
40CCR	KNNYSKRTMMLLISDLGTIVMGVTSALS-ASPVKIIFFCIGLCYGCNTWFHAAKV-----		81
	.. :*** * : *:* * * : .. . *		

Рис. 3. Гомология транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов генов 37CCR, 98CCR1, 98CCR1-1, 34CCR, 40CCR и катионных канальных родопсинов CrChR2 (*C. reinhardtii*) и HpChR1 (*H. lacustris*). Желтым цветом выделены трансмембранные спирали TM-2–TM-5

Таблица 4. Идентифицированные гены канальных родопсинов *Rhodomonas* sp. (Стурторфута)

Наименование	Организм	Происхождение	GenBank	Транскрипт	Гомолог				
					Наименование	Идентичность/протяженность гомологии, %	GenBank	Транскрипт	Источник
Гены анионных канальных родопсинов, ACR									
<i>RhACR_9525</i>	<i>Rhodomonas</i> sp. ССМР768	база данных MMETSP1091		SAMNT_0042109525	R8ACR2	79/54	MW55758		[11]
<i>RhACR_1877</i>				CAMNT_0042061877	R1ACR_877	100/58	KX879685		[21]
<i>RhACR_6447</i>				CAMNT_0042066447	R1ACR_447	97/63	KX879686		[22]
<i>RhACR_8927</i>				CAMNT_0042108927	R1ACR_653	90/38	MG831193		
<i>RhACR_7741</i>				CAMNT_0049477741	R1ACR_741	92/61	KX879687		
<i>RhACR_6367</i>				CAMNT_0049496367	R1ACR_367	100/60	KX879684		
<i>RhACR_1591</i>				CAMNT_0049531591	R1ACR_447	93/63	KX879686		[21]
<i>RhACR_3799</i>				CAMNT_0049533799	R1ACR_799	100/59	KX879688		
<i>RhACR_3053</i>	CAMNT_0049513053	R1ACR_877	99/56	KX879685					
<i>RhACR_8653</i>	CAMNT_0049478653	R1ACR_653	100/44	MG831193		[22]			
<i>CryACR</i> , фрагмент гена	<i>Rhodomonas</i> sp. OVPO-2021a штамм IBSS-59	изолят Стурторфута, Черное море ФИЦ ИНБЮМ РАН	ON643079		R1ACR_447	95/75	APZ76716		[21]
					RhACR_1591*	83/73			
<i>RhoACR</i> , фрагмент гена	<i>Rhodomonas</i> sp.	природный образец, Белое море	ON643080		R2ACR_853	56/61	APZ76719		[21]
					RhACR_1591*	77/20			

Таблица 4 (продолжение)

Наименование	Организм	Происхождение	GenBank	Транскрипт	Гомолог			Источник
					Наименование	Идентичность/протяженность гомологии, %	GenBank	
Гены катионных канальных родопсинов, CCR								
<i>RhCCR_1959</i>				SAMNT_0042061959	100/100		MMETSP1091 DN28851_c0_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_6333</i>				SAMNT_0042066333	92/100		MMETSP1091 DN29084_c6_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_6679</i>		база данных MMETSP1091		SAMNT_0042106679	100/100		MMETSP1389 DN30485_c0_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_8499</i>				SAMNT_0042108499	100/100		MMETSP1091 DN29084_c2_g1_i1.p1	[11]
<i>RhCCR_1525</i>	<i>Rhodomonas</i> sp. CCMP768			SAMNT_0049531525	100/100		MMETSP1389 DN30485_c0_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_4213</i>				SAMNT_0049534213	100/100		MMETSP1389 DN30320_c0_g2_i1.p1	
<i>RhCCR_4967</i>		база данных MMETSP1389		SAMNT_0049494967	100/100		MMETSP1091 DN28851_c0_g1_i1.p1	
<i>RhCCR_5533</i>				SAMNT_0049495533	100/100		MMETSP1389 DN28221_c0_g1_i1.p1	
<i>CryCCR</i> , фрагмент гена	<i>Rhodomonas</i> sp. OVPo-2021a штамм IBSS-59	изолат Стурторфута, Черное море ФИЦ ИНБЮМ РАН	ON643078		58/64	ANC73518		[18]
					84/56			

Примечание. * обозначает транскрипты; % гомологии указан для нуклеотидных последовательностей. Все остальные гомологи идентифицированы в режиме трансляции BLASTx и являются продуктами синтетических генов.

Данные GenBank и % гомологии указаны на уровне белка.

вательностей и дизайна ПЦР-тестов, поэтому мы провели независимый поиск нативных полноразмерных транскриптов ACR и CCR в двух базах данных транскриптома *Rhodomonas* sp. CCMP768, MMETSP1091 и MMETSP1389 (The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project; www.marinemicroeukaryotes.org).

На рис. 1 показаны области гомологии родопсина ACR1 *G. theta* и родопсинов CCR зеленых водорослей, совпадающие с консервативными участками TM-2–TM-7. Структурная гомология с канальными родопсинами иной ионной специфичности оказалась неожиданным свойством родопсинов ACR криптофитовых [7]. В свою очередь, родопсины CCR криптофитовых образуют отдельную группу, гомологичную бактериальным родопсинам насосного типа [18]. Таким образом, семейство канальных родопсинов отличается большим разнообразием и предоставляет различные примеры структурной и функциональной конвергенции.

Для поиска ACR-транскриптов в базах данных транскриптома *Rhodomonas* sp. CCMP768 (MMETSP1091 и MMETSP1389) мы использовали короткие мишени, соответствующие консервативным трансмембранным спиральям ACR1 *G. theta*: TM-3 (WARMASWLCTCPIMLGLVSN); TM-2 (WEAIYLPPTTEMITYSLAF) и TM-7 (NTSSVLYLLGDALCKNTYGILLWATTWGLL). При поиске генов CCR мы ограничились использованием одной мишени, наиболее консервативной среди известных генов CCR *G. theta* трансмембранной спирали TM-3 (RYADYMLTCLPLVMDL). Среди выявленных транскриптов отбирались содержащие все анализируемые мишени и наиболее полноразмерные (табл. 4). Как видно из результатов, представленных в табл. 4, нам удалось идентифицировать нативные транскрипты для ранее охарактеризованных генов канальных родопсинов ACR и CCR референтного штамма *Rhodomonas* sp. CCMP768. Сравнение наших результатов со сводными данными по анализу генов CCR и ACR из *Rhodomonas* sp. CCMP768 [11] подтверждает, что идентификация родопсиновых генов проведена в полном объеме. Более того, был идентифицирован ген *RhACR_9525*, ранее не охарактеризованный в *Rhodomonas* sp. CCMP768.

На основании анализа группы ACR-транскриптов были определены консервативные последовательности и созданы наборы праймеров для ПЦР-анализа (табл. 2). Расположение рабочих праймеров относительно консервативных доменов белка ACR продемонстрировано также на рис. 1.

Для наибольшей представленности генов ACR при анализе мы использовали ген-

специфические ПЦР-праймеры в сочетании с вырожденными, в том числе и для одних и тех же участков генов (например, праймеры RhACR12R, RhACR13R и RhACR14R; рис. 1). Из-за кодон-оптимизации генов ACR, представленных в базе данных GenBank, идентификацию ПЦР-продуктов проводили в режиме BLASTx для поиска охарактеризованных белков ACR. Путем перебора праймеров на геномной ДНК черноморского изолята *Rhodomonas* sp. был получен ACR-специфический ПЦР-фрагмент, *CryACR* (праймеры RhACR11_fwd + RhACR12_rev или RhACR11_fwd + RhACR14_rev), кодирующий продукт, гомологичный R1ACR_447 из *Rhodomonas* sp. CCMP768 (95% идентичности; табл. 4).

При анализе тотальной ДНК из природного беломорского образца, содержащего *Rhodomonas* sp., для выявления генов ACR одного раунда ПЦР оказалось недостаточно: ACR-специфический ПЦР-продукт (праймеры RhACR11_fwd + RhACR13_rev) был получен только после предварительной амплификации геномной ДНК с праймерами RhACR4_fwd + RhACR6_rev (рис. 1). Фрагмент гена *RhoACR* кодирует продукт, отдаленно гомологичный R2ACR_853 из *Rhodomonas* sp. CCAC1630 (56% идентичности; табл. 4). При этом оба идентифицированных гена, *CryACR* и *RhoACR* (GenBank: ON643079, ON643080; табл. 4), в разной степени гомологичны нативному транскрипту RhACR_1591 из *Rhodomonas* sp. CCMP768 (табл. 4), что также указывает на отдаленное родство *RhoACR* с известными генами ACR и на его возможную функциональную уникальность.

Для анализа генов CCR были использованы вырожденные праймеры RhCCR (табл. 2), а также ген-специфические праймеры для RhCCR_1959, наименее гомологичного в группе CCR-транскриптов из *Rhodomonas* sp. CCMP768 (данные не приводятся). Гомологи *RhCCR_1959* не были обнаружены; также безрезультатными пока остаются поиски генов CCR в беломорском изоляте *Rhodomonas* sp. Однако с помощью праймеров RhCCR в черноморском штамме *Rhodomonas* sp. удалось идентифицировать специфический ПЦР-фрагмент, *CryCCR* (GenBank: ON643078; табл. 4), кодирующий продукт, гомологичный ранее охарактеризованному катионному канальному родопсину из *G. theta*, GtCCR2 (58% идентичности; табл. 4). Существенно большую гомологию (84% идентичности) фрагмент гена *CryCCR* демонстрирует с нативным транскриптом RhCCR_4213 из *Rhodomonas* sp. CCMP768 (табл. 4).

На рис. 4 показана гомология транслированных аминокислотных последовательностей

твержденной экспрессией (GenBank: JN596950, MH845643). Всего же в *H. lacustris* на основании анализа полного генома (GenBank: BLLF01000480) предсказаны 4 гена ССР, что свидетельствует о чувствительности нашего ПЦР-анализа не менее 50% в масштабах объекта. Несмотря на эффективность ПЦР-теста для поиска генов родопсинов, более детальное исследование генов, основанное на ПЦР-анализе геномной ДНК, представляется проблематичным из-за сложной организации родопсиновых генов у Chlorophyta: так, например, в составе предсказанных полноразмерных генов ССР из *H. lacustris* идентифицированы 12 и 15 экзонов (GenBank: GFH12230; GFH23030). Более перспективным, по нашим предварительным данным, является анализ 5'-фрагментов транскриптов ССР, соответствующих функциональному продукту ТМ-1–ТМ-7. Вся необходимая исходная информация для такого анализа – ПЦР-праймеры для фрагмента ТМ-2–ТМ-7 и соответствующие геномные последовательности – уже имеется в результате ПЦР-тестов.

Для поиска генов родопсинов в криптофитовых водорослях *Rhodomonas* sp. универсальными ПЦР-тестами ограничиться не удалось из-за разнообразия этих генов внутри рода *Rhodomonas*: от 2 до 8 генов каждого типа, АСР и ССР, у *Rhodomonas lens* и *Rhodomonas* sp. ССМР768 соответственно ([11] и табл. 4). Исходя из этого, мы разработали наборы ПЦР-праймеров для отдельных подгрупп родопсиновых генов (табл. 2). Примечательно, что с помощью практически идентичного ПЦР-теста мы обнаружили отдаленно гомологичные гены АСР, *CryACR* и *RhoACR*, в черноморском и беломорском образцах *Rhodomonas* sp. Особый интерес, на наш взгляд, представляет ген, кодирующий *RhoACR*: можно предположить, что в силу арктического происхождения организма родопсин *RhoACR* может обладать уникальными свойствами.

Полагаем, что разработанный нами тест может быть полезным инструментом для поиска уникальных генов анионных канальных родопсинов среди представителей *Rhodomonas* в широком диапазоне внутригрупповой гомологии.

При ПЦР-анализе на большую группу генов ССР мы идентифицировали специфический фрагмент, *CryССР*, в черноморском изоляте *Rhodomonas* sp. (табл. 4), однако соответствующего ПЦР-продукта при анализе беломорского образца *Rhodomonas* sp. обнаружить не удалось. Очевидно, с учетом низкого родства исследованных изолятов *Rhodomonas* sp. и сложного геномного состава беломорского образца

(по существу, природного сообщества) потребуются дополнительные усилия для доработки ПЦР-тестирования низкоомологичных генов ССР в *Rhodomonas* sp.

Необходимо подчеркнуть, что предлагаемые системы ПЦР-анализа предназначены для первичного тестирования объектов на наличие и уникальность генов канальных родопсинов. Дальнейшая схема эксперимента выстраивается в зависимости от потенциальной ценности гена-кандидата, а также от типа и доступности образца-источника генетического материала. При отсутствии данных по референтным геномам *Rhodomonas*, представляется логичным продолжение анализа родопсиновых генов на экспрессионном уровне. При исследовании культивируемых изолятов *Rhodomonas* sp. возможен целевой анализ 5'-фрагментов транскриптов родопсинов, соответствующих функциональному продукту ТМ-1–ТМ-7, как уже обсуждалось применительно к родопсином из зеленых водорослей. В наиболее типичном случае, когда необходимо исследовать уникальные природные образцы, включающие представителей рода *Rhodomonas*, лучшие возможности предоставляет анализ библиотек, построенных с использованием препаратов полиА-РНК.

Вклад авторов. Е.С. Лобакова, О.В. Карпова – концепция и руководство работой; Е.Н. Виноградова, О.В. Карпова – проведение экспериментов; Е.С. Лобакова, О.В. Карпова, Е.Н. Виноградова – обсуждение результатов исследования; О.В. Карпова – написание текста; Е.С. Лобакова, Е.Н. Виноградова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2021-1396 от 26.10.2021 г.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Ханайченко А.Н. (ФИЦ ИнБЮМ РАН, Севастополь) и Федоренко Т.А. (МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва) за предоставление культур и рекомендации по выращиванию. Исследование выполнено при поддержке научно-образовательной школы МГУ «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2022) Emerging diversity of channelrhodopsins and their structure-function relationships, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 800313, doi: 10.3389/fncel.2021.800313.
2. Sineshchekov, O. A., Jung, K.-H., and Spudich, J. L. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8689-8694, doi: 10.1073/pnas.122243399.
3. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., et al. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science*, **296**, 2395-2398, doi: 10.1126/science.1072068.
4. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., et al. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945, doi: 10.1073/pnas.1936192100.
5. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263-1268, doi: 10.1038/nn1525.
6. Deisseroth, K. (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1213-1225, doi: 10.1038/nn.4091.
7. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Liu, X., Janz, R., and Spudich, J. L. (2015) Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics, *Science*, **349**, 647-650, doi: 10.1126/science.aaa7484.
8. Nakao, S., Kojima, K., and Sudo, Y. (2021) Microbial rhodopsins as multi-functional photoreactive membrane proteins for optogenetics, *Biol. Pharm. Bull.*, **44**, 1357-1363, doi: 10.1248/bpb.b21-00544.
9. Klapoetke, N. C., Murata, Y., Kim, S. S., Pulver, S. R., Birdsey-Benson, A., et al. (2014) Independent optical excitation of distinct neural populations, *Nat. Methods*, **11**, 338-346, doi: 10.1038/nmeth.2836.
10. Sahel, J. A., Boulanger-Scemama, E., Pagot, C., Arleo, A., Galluppi, F., et al. (2021) Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy, *Nat. Med.*, **27**, 1223-1229, doi: 10.1038/s41591-021-01351-4.
11. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Wang, Y., Brown, L. S., et al. (2021) Cation and anion channelrhodopsins: sequence motifs and taxonomic distribution, *mBio*, **12**, e0165621, doi: 10.1128/mBio.01656-21.
12. Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., et al. (2014) Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia), *Mar. Drugs*, **12**, 4504-4520, doi: 10.3390/md12084504.
13. Chekanov, K., Fedorenko, T., Kublanovskaya, A., Litvinov, D., and Lobakova, E. (2020) Diversity of carotenogenic microalgae in the White Sea polar region, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **96**, fiz183, doi: 10.1093/femsec/fiz183.
14. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales), *Bacteriol. Rev.*, **35**, 171-205, doi: 10.1128/br.35.2.171-205.1971.
15. Walne, P. R. (1970) Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilus*, *Fish. Invest.*, **26**, 162.
16. Keeling, P. J., Burki, F., Wilcox, H. M., Allam, B., Allen, E. E., et al. (2014) The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing, *PLoS Biol.*, **12**, e1001889, doi: 10.1371/journal.pbio.1001889.
17. Jékely, G. (2009) Evolution of phototaxis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **364**, 2795-2808, doi: 10.1098/rstb.2009.0072.
18. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2016) Structurally distinct cation channelrhodopsins from Cryptophyte algae, *Biophys. J.*, **110**, 2302-2304, doi: 10.1016/j.bpj.2016.05.001.
19. Wang, Y., Tian, R. M., Gao, Z. M., Bougouffa, S., and Qian, P.-Y. (2014) Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis, *PLoS One*, **9**, e90053, doi: 10.1371/journal.pone.0090053.
20. Krasnova, E. D., Pantyulin, A. N., Matorin, D. N., Todorenko, D. A., Belevich, T. A., et al. (2014) Cryptomonad alga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta, Pyrenomonadaceae) bloom in the redox zone of the basins separating from the White Sea, *Microbiology*, **83**, 270-277, doi: 10.1134/S0026261714030102.
21. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Rodarte, E. M., Janz, R., Morelle, O., et al. (2017) The expanding family of natural anion channelrhodopsins reveals large variations in kinetics, conductance, and spectral sensitivity, *Sci. Rep.*, **7**, 43358, doi: 10.1038/srep43358.
22. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Hemmati, R., Janz, R., Morelle, O., et al. (2018) Extending the time domain of neuronal silencing with cryptophyte anion channelrhodopsins, *eNeuro*, **5**, ENEURO.0174-18.2018, doi: 10.1523/ENEURO.0174-18.2018.
23. Chekanov, K., Litvinov, D., Fedorenko, T., Chivkunova, O., and Lobakova, E. (2021) Combined production of astaxanthin and β -carotene in a new strain of the microalga *Bracteacoccus aggregatus* BM5/15 (IPPAS C-2045) cultivated in photobioreactor, *Biotechnology*, **10**, 643, doi: 10.3390/biotechnology10070643.

IDENTIFICATION OF THE CHANNEL RHODOPSIN GENES IN THE GREEN AND CRYPTOPHYTE ALGAE FROM THE WHITE AND BLACK SEAS

O. V. Karpova^{1*}, E. N. Vinogradova^{1,2}, and E. S. Lobakova¹

¹ Department of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: karpova_ov@mail.bio.msu.ru

² Kurchatov Institute National Research Center, 123182 Moscow, Russia

Due to the unique capability of modulating cell membrane potential upon photoactivation, the channel rhodopsins of green (Chlorophyta) and cryptophyte (Cryptophyta) algae are widely employed in optogenetics, a modern method of light-dependent regulation of the biological processes. In order for search of new perspective genes, the optogenetics candidates, we have developed the PCR tests for the rhodopsins of cation and anion channels. We have analysed 6 isolates of green algae *Haematococcus* and *Bracteacoccus* from the White Sea region and 2 specimens of *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta) from the regions of White and Black Seas. Using our PCR test we have demonstrated the known *Haematococcus* rhodopsin genes and have discovered the novel rhodopsin genes in the genus of *Bracteacoccus*. We have also identified 2 distantly homologous anion channel rhodopsins in the cryptophytes *Rhodomonas* sp. from White and Black Seas. These results indicate that the developed PCR tests might be useful tools for a wide-range screening of the Chlorophyta and Cryptophyta algae to identify the unique channel rhodopsin genes.

Keywords: cation channel rhodopsins, anion channel rhodopsins, green algae, cryptophyte algae, optogenetics

ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА NOTCH1 ДЛЯ ПРОГРЕССИИ КАРЦИНОМ ЛЁГКОГО И ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 М.В. Васильева¹, Н.В. Хромова¹, Б.П. Копнин¹, В.Б. Дугина², П.Б. Копнин^{1*}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: pbkopnin@mail.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.06.2022

После доработки 26.08.2022

Принята к публикации 27.08.2022

Рак лёгкого и колоректальный рак являются одними из самых распространённых типов рака и характеризуются неблагоприятным прогнозом с относительно высокой вероятностью летального исхода. Одну из ключевых ролей в прогрессии данных типов злокачественных новообразований играют мутации генов, кодирующих компоненты основных внутри- и межклеточных сигнальных путей, в частности *NOTCH1*, продуктом которого является одноименный рецептор Notch1 сигнального пути Notch. Сигнальный путь Notch принимает участие в поддержании гомеостаза эпителия кишечника и структурно-функциональных элементов лёгких, поэтому неудивительно, что его конститутивная активность и гиперактивность, возникающая в результате соматических мутаций генов, продукты которых непосредственным образом задействованы в его запуске, может приводить к прогрессии указанных типов рака. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на фенотип, характеристики и Notch-зависимые сигнальные пути клеток карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека. Для подавления экспрессии *NOTCH1* методом РНК-интерференции была выбрана наиболее эффективная последовательность миРНК из нескольких вариантов, отобранных по результатам биоинформатического анализа, и получены соответствующие клеточные сублинии, A549 и HCT116. Исследование основных биологических характеристик данных сублиний *in vitro* показало, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к снижению темпов клеточной пролиферации, способности к колониеобразованию в адгезивных условиях и миграционной активности в камере Бойдена. ПЦР-анализ выявил достоверное снижение экспрессии некоторых целевых генов сигнального пути Notch, потенциально вовлечённых в механизмы формирования и поддержания более инвазивного и злокачественного фенотипа клеток. Эксперименты *in vivo* на иммунодефицитных бестимусных самках мышей линии Balb/c nu/nu подтвердили полученные результаты *in vitro*: подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению темпов роста подкожных ксенографтов, сформированных клетками исследуемых сублиний. Таким образом, ингибирование экспрессии гена, кодирующего рецептор Notch1, потенциально приводит к снижению злокачественных характеристик клеток карцином лёгкого и толстой кишки человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рак лёгкого, колоректальный рак, сигнальный путь Notch, опухолевая прогрессия, пролиферация, инвазия, исследования на иммунодефицитных мышах.

DOI: 10.31857/S0320972522100153, **EDN:** BDPANV

ВВЕДЕНИЕ

Рак лёгкого и колоректальный рак являются одними из самых распространённых типов рака и характеризуются неблагоприятным прогнозом с относительно высокой вероятностью летального исхода. По данным Нацио-

нального института онкологии США (<https://www.cancer.gov/>), на рак лёгкого и бронхов приходилось 12,4% всех диагностированных случаев онкологических заболеваний в 2021 г., в то время как 5-летняя относительная выживаемость составляла всего 21,7% (по данным за 2011–2017 гг.). На колоректальный рак прихо-

Принятые сокращения: ЗНО – злокачественные новообразования; миРНК – малая интерферирующая РНК; GSI – ингибиторы γ -секретазы.

* Адресат для корреспонденции.

дилось 7,9% всех случаев, а 5-летняя относительная выживаемость составляла 64,7%.

Мутации генов, кодирующих компоненты основных внутри- и межклеточных сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в прогрессии злокачественных новообразований (ЗНО). По данным портала Национального института онкологии США GDC (National cancer institute Genomic Data Commons Portal, <https://portal.gdc.cancer.gov/>), мутации *NOTCH1* выявлены в половине случаев при раке лёгкого и бронхов и практически в 70% случаев – при колоректальном раке.

Ген *NOTCH1* кодирует один из четырёх одноимённых трансмембранных рецепторов семейства Notch у человека (Notch1–4). При связывании с соответствующим лигандом запускается серия протеолических расщеплений рецептора с высвобождением его внутриклеточного домена NICD1 (Notch intracellular domain), который транслоцируется в ядро и запускает экспрессию ряда целевых генов [1]. Сигнальный путь Notch, в частности, играет одну из ключевых ролей в поддержании гомеостаза эпителия кишечника, а также формировании альвеол, эпителия, стромы и сосудистой сети лёгких. Однако, согласно литературным данным, конститутивная активность и гиперактивность сигнального пути Notch, возникающая в результате соматических мутаций генов, продукты которых непосредственным образом задействованы в его запуске, может приводить к неконтрольной пролиферации, нарушению клеточного цикла и механизмов клеточной гибели, повышению выживаемости, приобретению более злокачественного и/или локомоторного фенотипа, изменению активности Notch-зависимых сигнальных путей, обладающих проонкогенным потенциалом при раке лёгкого и колоректальном раке [2, 3]. Таким образом, подавление экспрессии гена, кодирующего рецептор Notch1, потенциально может способствовать нормализации клеточного фенотипа и снижению темпов опухолевой прогрессии.

Актуальность изучения сигнального пути Notch не вызывает сомнений, при этом на сегодняшний день опубликовано большое количество литературных данных по исследованию последствий его ингибирования. Однако большинство из них посвящено либо ингибированию всех членов семейства сигнального пути Notch, либо ограничивается изучением узкого набора молекулярно-биологических характеристик клеток с подавленной экспрессией гена, кодирующего один из рецепторов семейства Notch, поэтому целью настоящего исследо-

вания является комплексное изучение влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на фенотип и биологические характеристики опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*, а также на экспрессию целевых генов сигнального пути Notch, вовлечённых в ключевые механизмы прогрессии ЗНО, на клеточных моделях карцином лёгкого и толстой кишки человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе были использованы клеточные линии карцином лёгкого A549 (ATCC® CCL-185™) и толстой кишки HCT116 (ATCC® CCL-247™) человека, полученные из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection). Клетки выращивали в среде для культивирования эукариотических клеток HyClone DMEM high glucose («Cytiva», США), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки HyClone Defined Fetal Bovine Serum («Cytiva», США) и 20 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия), в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С.

РНК-интерференция *NOTCH1*. Для получения стабильных клеточных сублиний A549 и HCT116 с подавленной экспрессией *NOTCH1* специфические шпилечные структуры малых интерферирующих РНК (миРНК), содержащие одну из пяти вариантов 21-нуклеотидных последовательностей (соответствуют позициям мРНК *NOTCH1* версии NM_017617.5), выбранных нами с помощью инструментов базы данных National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), были синтезированы («Евроген», Россия) и клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1-puro («Sigma-Aldrich», США). Вектор pLKO.1-puro shGFP («Sigma-Aldrich») был использован в качестве контроля.

Экспериментальными векторами совместно со вспомогательными плазмидами pDR8.2, pVSV-G («Addgene», США) были трансфицированы клетки-паковщики 293T (ATCC® CRL-3216™) в присутствии GeneJuice transfection reagent («Merck Millipore», Германия). Трёхжды после трансфекции супернатанты, содержащие вирусные частицы, собирали раз в сутки и фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм («Merck Millipore»). Исследуемые клеточные культуры были инфицированы вирусными частицами в присутствии реагента Polybrene (10 мкг/мл, «Merck Millipore»), затем подвергались дальнейшей селекции в среде, содержащей 1 мкг/мл пурамицина («Sigma-Aldrich»), в течение 5–6 дней.

По результатам анализа тотальной РНК и белка данных клеток была оценена эффективность использованных конструкций.

Полимеразная цепная реакция. Тотальная РНК была выделена из инфицированных клеток с помощью реагента Trizol («Invitrogen», США). Количество РНК в пробах было детектировано с помощью спектрофотометра NanoDrop1000 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция обратной транскрипции была проведена для синтеза первой цепи кДНК с помощью обратной транскриптазы М-MLV («Promega», США). Стандартная ПЦР-реакция проводилась с помощью ПЦР-амплификатора Bio-Rad Dyad DNA Engine («Bio-Rad», США), после чего полученную реакционную смесь разделяли электрофоретически в 1,5%-ном агарозном геле. Относительную интенсивность флуоресценции полос оценивали с помощью Total Lab ver. 2.0 («Nonlinear Dynamics», США). Образцы нормировали по количеству ПЦР-про-

дукта *TUBA1A*. Интенсивность флуоресценции полос контрольных сублиний на диаграммах принята за единицу. Реакцию ПЦР в реальном времени проводили на ПЦР-амплификаторе Bio-Rad CFX96 Real-Time System («Bio-Rad»), используя реагенты SYBR Green I («Евроген»). С помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager были получены значения *Ct* для целевых и референсного (*TUBA1A*) генов. Относительные уровни экспрессии были вычислены с использованием $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -метода. Используемые в работе пары праймеров и размеры получаемых продуктов представлены в таблице.

Иммуноблоттинг. Тотальные лизаты готовили из клеточных культур по достижению ими субконфлюентного монослоя с использованием буфера Lysis-M («Roche», США). Количество белка в пробах определялось методом Бредфорда. Лизаты электрофоретически разделялись в 8–12%-ном гради-

Праймеры и размеры получаемых продуктов

Ген	Последовательности праймеров (5'→3')	Размер продукта
<i>NOTCH1</i>	F – CACCCATGACCACTACCCAGTT R – CCTCGGACCAATCAGAGATGTT	250
<i>TUBA1A</i>	F – GTTGGTCTGGAATTCTGTCTCAG R – AAGAAGTCCAAGCTGGAGTTC	288
<i>SNAIL1</i>	F – ACTGCAACAAGGAATACCTCAG R – GCACTGGTACTTCTTGACATCTG	242
<i>HES1</i>	F – ACACGACACCGGATAAACCAA R – GCCGCGAGCTATCTTTCTTCA	150
<i>TWIST1</i>	F – CACGAGCGGCTCAGCTACGC R – CGCTGCCCGTCTGGGAATCAC	313
<i>NANOG</i>	F – AAGGTCCCGGTCAAGAAACAG R – CTTCTGCGTCACACCATTGC	237
<i>POU5F1</i>	F – GTGTTTCAGCCAAAAGACCATCT R – GGCCTGCATGAGGGTTTCT	156
<i>NES</i>	F – GCGGCTGCGGGCTACTGAAA R – ATCCAAGACGCCGGCCCTCT	281
<i>SOX2</i>	F – TGGACAGTTACGCGCACAT R – CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	215
<i>C-MYC</i>	F – GGCTCCTGGCAAAAGGTCA R – CTGCGTAGTTGTGCTGATGT	119
<i>WNT1</i>	F – TCCCCTTTGTCCTGCGTTTT R – TGTTCAATGGCTCCACGACA	231
<i>CDH1</i>	F – GTCTGTAGGAAGGCACAGCC R – TGCAACGTCGTTACGAGTCA	285

Примечание. F – forward, прямой праймер; R – reverse, обратный праймер.

ентном Ds-Na-ПААГ с помощью системы Mini-PROTEAN («Bio-Rad») и переносились на PVDF-мембрану с низкой автофлуоресценцией («Merck Millipore») с помощью системы полусухого переноса белков Power Blotter System («Invitrogen»). Для блокировки мест неспецифического связывания антител использовался SuperBlock («Thermo Fisher Scientific»). Мембраны инкубировали с первичными антителами к Notch1 (C-20, 1 : 500, «Santa Cruz Biotechnology», США), α -тубулину (B-5-1-2, 1 : 500, «Santa Cruz Biotechnology»), затем с соответствующими вторичными — Alexa Fluor 488 (1 : 2000, «Thermo Fisher Scientific»). Визуализацию полос проводили с помощью сканера Typhoon 9410 («GE Healthcare», США). Относительную интенсивность флуоресценции полос оценивали с помощью Total Lab ver. 2.0. Образцы нормировали по количеству α -тубулина. Интенсивность флуоресценции полос контрольных сублиний на диаграммах принята за единицу.

Световая микроскопия. Микрофотографии живых клеточных культур в фазовом контрасте получали с помощью микроскопа Axiovert 200 с использованием лицензированного программного обеспечения AxioVision («Carl Zeiss», Германия).

In vitro тесты. Определение скорости роста клеточных культур. Клетки сублиний НСТ116 и А549 высевали на чашку Петри в количестве $0,5 \times 10^5$. Каждые 48 ч в течение 6 дней проводили подсчёт количества клеток с помощью камеры Горяева.

Определение миграционной активности клеток в камере Бойдена. Анализ проводили в плашке с интегрированными камерами Бойдена с диаметром пор 8 мкм, на фильтр которых высевали $0,5 \times 10^5$ клеток. Спустя сутки инкубации клетки, оставшиеся на верхней поверхности фильтра, удаляли, мигрировавшие клетки фиксировали холодным (-20°C) чистым метанолом, окрашивали связывающимся с ДНК 1 мкМ раствором красителя DAPI (4',6'-диамидино-2-фенилиндол) («Sigma-Aldrich») в фосфатно-солевом буфере (PBS). Миграционную активность определяли подсчётом клеток на нижней поверхности фильтра с помощью микроскопа Axiovert 200.

Анализ способности к колониеобразованию. Для анализа колониеобразования в адгезивных условиях клетки высевали в количестве 500 клеток на 10-см чашку Петри, инкубировали 14 суток, фиксировали 70%-ным этанолом и окрашивали красителем Гимза («ПанЭко»). Количество и размер колоний рассчитывали с помощью программы Total Lab ver. 2.0,

используя модуль Colony Counter («Nonlinear Dynamics»).

Определение скорости роста ксенографтов in vivo. Исследования проводили на иммунодефицитных бестимусных самках мышей линии Balb/c nu/nu возрастом 7–8 недель, весом 15–20 г. Количество животных в каждой экспериментальной группе составляло 12–16 особей. Для определения скорости роста ксенографтов животным подкожно вводили суспензию клеток (10^6) в стерильном физиологическом растворе. Линейные параметры ксенографтов (т.е. их «длина» и «ширина») измеряли с помощью штангенциркуля раз в трое суток в течение 2,5–3 недель. На основании полученных данных был рассчитан их объём по следующей формуле: «ширина»² \times «длина» \times 0,5, где «ширина» \leq «длина», и были построены кривые зависимости данных объёмов от количества суток после инъекции клеток. По окончании исследования экспериментальных животных терминировали парами эфира и производили извлечение ксенографтов.

Статистический анализ. Данные на диаграммах и графиках представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего по результатам минимум трёх независимых экспериментов. Для оценки статистической значимости результаты были проанализированы с помощью *t*-теста Стьюдента. Значения $p < 0,05$ считались статистически достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение клеточных сублиний с подавленной экспрессией NOTCH1. Методами ПЦР-анализа и иммуноблоттинга нами была подтверждена экспрессия NOTCH1 на уровне мРНК и белка как в исходных клетках линий карцином лёгкого А549 и толстой кишки НСТ116 человека, так и в полученных нами контрольных клеточных сублиниях shGFP. На основании биоинформатического анализа нами были выбраны 5 последовательностей миРНК, потенциально позволяющих подавить экспрессию NOTCH1 методом РНК-интерференции (рис. 1, а). Наибольшую эффективность для обеих клеточных линий А549 и НСТ116, по данным ПЦР-анализа, в том числе в режиме реального времени, продемонстрировала последовательность №1 (5'-GATGCCAAATGCCTGCCAGAA-3', соответствующая позициям 1165–1185 мРНК NOTCH1) (рис. 1, б и в), что подтвердилось на уровне экспрессии белка по результатам иммуноблоттинга (рис. 1, г), поэтому она была выбрана для дальнейших исследований.

По данным световой микроскопии, клетки обеих контрольных сублиний характеризовались прерывистыми и фрагментированными меж-

клеточными контактами, в то время как клетки с подавленной экспрессией *NOTCH1* выглядели более эпителиоидными (рис. 1, д).

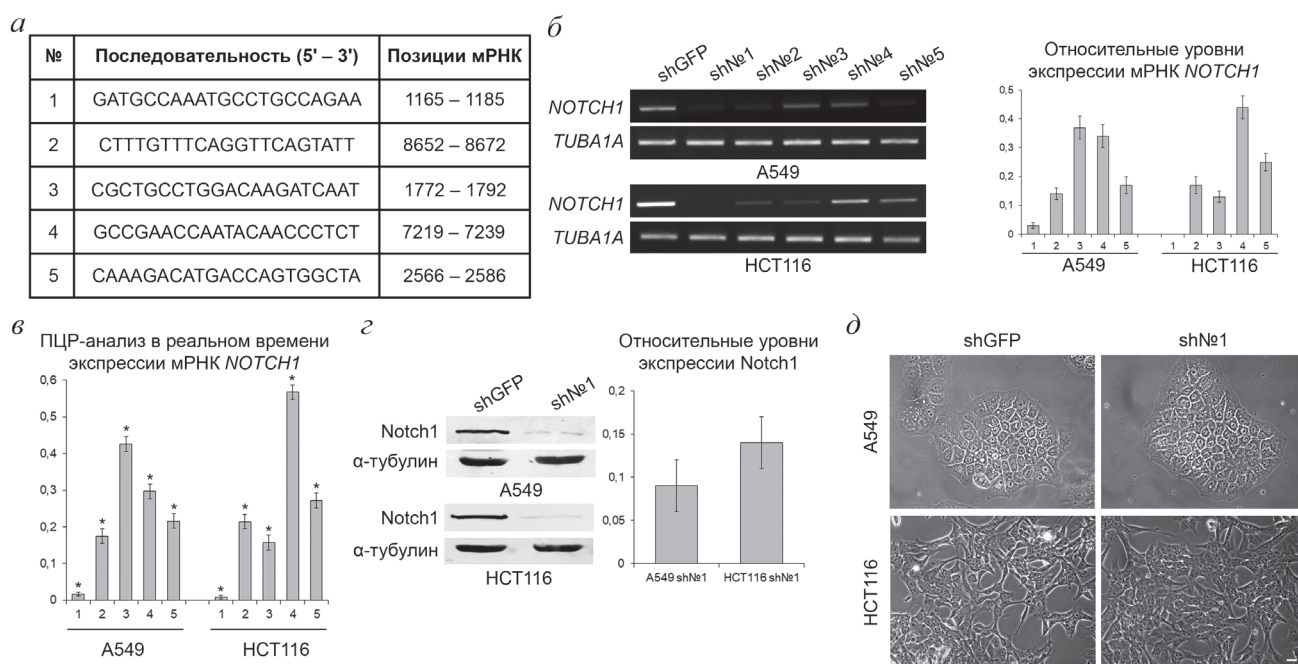


Рис. 1. Создание клеточных сублиний A549 и HCT116 с подавленной экспрессией *NOTCH1*. *а* – Выбранные нами варианты последовательностей миРНК для РНК-интерференции *NOTCH1*. *б* – ПЦР-анализ экспрессии *NOTCH1* в полученных клеточных сублиниях (слева) и диаграмма относительной интенсивности флуоресценции полос (справа). *в* – ПЦР-анализ в режиме реального времени экспрессии *NOTCH1* в полученных клеточных сублиниях. *г* – Иммуноблоттинг Notch1 в клеточных сублиниях с вариантом миРНК №1 (слева) и диаграмма относительной интенсивности флуоресценции полос (справа). *д* – Микрофотографии клеток сублиний shGFP и sh№1, масштаб – 20 мкм. Экспрессия *NOTCH1* (на уровнях мРНК и белка) на диаграммах нормирована относительно его экспрессии в клетках сублиний shGFP, которая принята за единицу; * $p < 0,05$

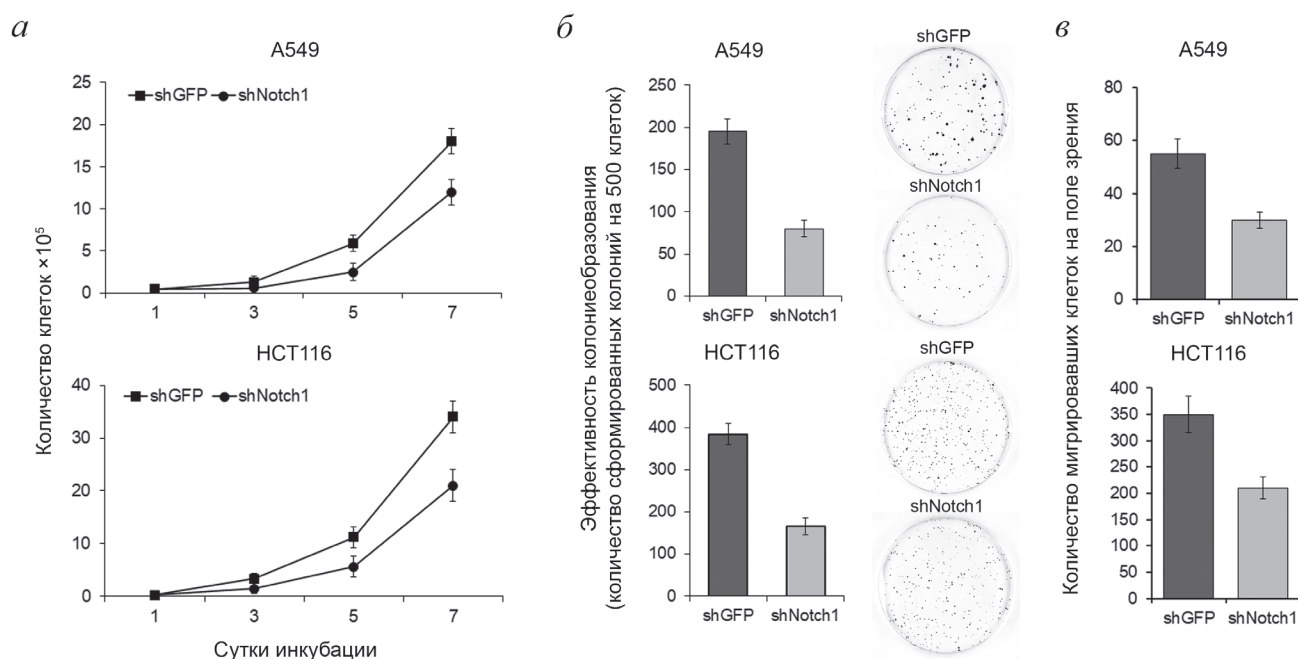


Рис. 2. Анализ основных биологических характеристик полученных клеточных сублиний A549 и HCT116 *in vitro*. Анализ клеточной пролиферации (*а*), анализ колониеобразования в адгезивных условиях (*б*) и миграционная активность клеток в камере Бойдена (*в*)

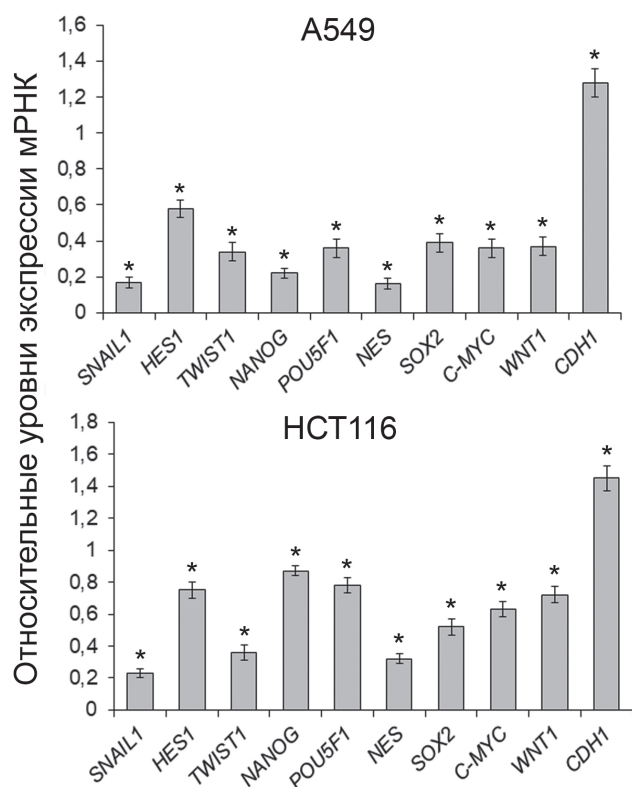


Рис. 3. ПЦР-анализ в режиме реального времени некоторых генов, задействованных в механизмах формирования и поддержания более инвазивного и злокачественного фенотипа клеток A549 и HCT116 при подавлении экспрессии *NOTCH1*; экспрессия каждого гена нормирована относительно его экспрессии в клетках сублинии shGFP, которая принята за единицу; * $p < 0,05$

Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на клеточный фенотип и морфологию. Следующим этапом нашей работы стал анализ основных биологических характеристик полученных клеточных сублиний A549 и HCT116 *in vitro*. Подавление экспрессии *NOTCH1* оказало непосредственное влияние на скорость пролиферации клеток обеих сублиний, A549 и HCT116, так, на 7-е сутки инкубации темпы пролиферации клеток сублиний sh№1 снизились до 1,6 раз по сравнению с контрольными (рис. 2, а). Эффективность колониеобразования в адгезивных условиях также снижалась в среднем в 2,4 раза при подавлении экспрессии *NOTCH1* (рис. 2, б). Миграционная активность клеток с подавленной экспрессией *NOTCH1* снижалась до 1,8 раз (рис. 2, в).

Полученные данные свидетельствуют о снижении инвазивного и пролиферативного потенциалов клеток карцином лёгкого и толстой кишки при подавлении экспрессии гена, кодирующего рецептор Notch1.

Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на Notch-зависимый сигналинг. Мы проанализировали влияние подавления экспрессии *NOTCH1*

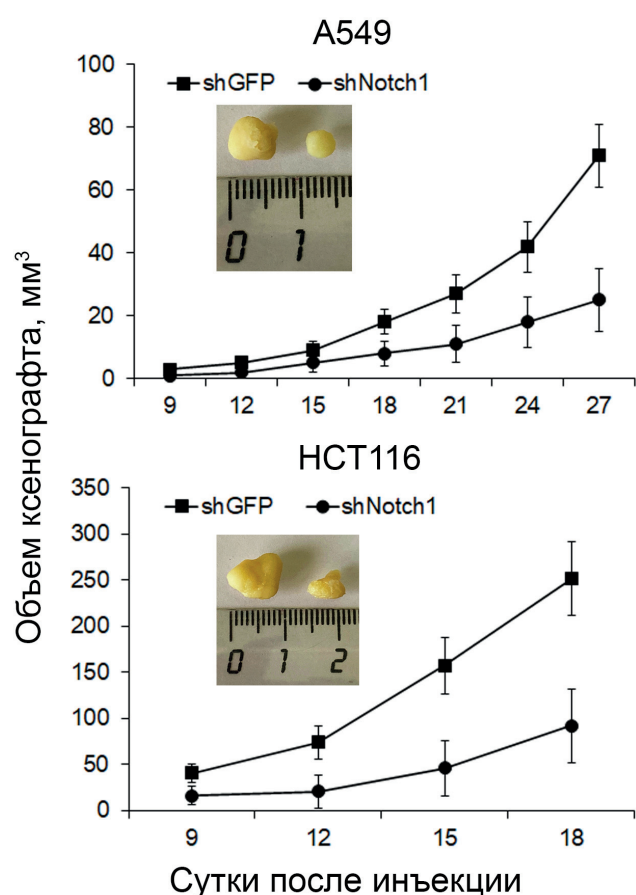


Рис. 4. Динамика роста подкожных ксенографтов, сформированных сублиниями A549 и HCT116, и фотографии извлечённых терминальных опухолей

на экспрессию некоторых генов, задействованных в механизмах формирования и поддержания более инвазивного и злокачественного фенотипа клеток карцином лёгкого и толстой кишки. По данным ПЦР-анализа в режиме реального времени было выявлено, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к статистически значимому снижению экспрессии таких генов, а также к увеличению экспрессии *CDH1* (белковый продукт – E-кадгерин, компонент межклеточных адгезионных контактов) (рис. 3).

Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на динамику роста опухолей. Для подтверждения полученных результатов *in vitro* было решено провести эксперименты *in vivo* по оценке влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на динамику роста подкожных ксенографтов, сформированных клетками исследуемых сублиний A549 и HCT116. Клетки с подавленной экспрессией *NOTCH1* действительно демонстрировали сниженные темпы роста ксенографтов (более чем в 2,5 раза на момент окончания эксперимента по сравнению с контрольными) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Характеристики опухолевых клеток, такие как пролиферативный, миграционный и инвазивный потенциал, обуславливают их способность к прогрессии, метастазированию, приобретению резистентности к химио- и радиотерапии, а также рецидивированию. В данной работе нами было продемонстрировано, что подавление экспрессии гена, кодирующего рецептор сигнального пути Notch (Notch1), приводит к снижению вышеперечисленных потенциалов *in vitro* и, как следствие, подавлению опухолевого роста *in vivo*. Экспрессия целевых генов сигнального пути Notch и активность Notch-зависимых сигнальных путей также задействованы в механизмах опухолевой прогрессии, поэтому нами была исследована экспрессия некоторых таких генов, отобранных по результатам анализа базы данных молекулярных путей KEGG PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), связанных с формированием клеточных контактов (*SNAIL1*, *WNT1*, *CDH1*) (<https://www.genome.jp/pathway/hsa04520+6615>), клеточной морфологией (*NES*) (<https://www.genome.jp/entry/K07609>), клеточным ростом и выживаемостью (*TWIST1*, *NANOG*) (<https://www.genome.jp/pathway/hsa05205+7291>), поддержанием плюрипотентности стволовых клеток (*POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*) (<https://www.genome.jp/pathway/hsa04550+5462>), протоонкогенов и регуляторов их экспрессии (*C-MYC*, *HES1*) (<https://www.genome.jp/pathway/map05224+K06054>). Согласно литературным данным, приобретение более эпителиоидного фенотипа опухолевыми клетками, осуществляемое, в частности, за счёт нормализации экспрессии E-кадгерина (*CDH1*), снижает их миграционный и инвазивный потенциалы, в частности, при раке лёгкого [4]. В данной работе мы продемонстрировали, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к достоверному снижению экспрессии вышеперечисленных генов (кроме *CDH1*) и повышению экспрессии E-кадгерина с приобретением более эпителиоидного фенотипа опухолевыми клетками карцином лёгкого и толстой кишки человека.

Важность разработки терапевтических возможностей для ингибирования сигнального пути Notch и его компонентов при лечении ЗНО различных нозологий не оставляет сомнений. На сегодняшний день существует несколько классов ингибиторов сигнального пути Notch, наиболее распространённым и многочисленным из которых является класс ингибиторов γ -секретазы – GSI (gamma-secretase inhibitors). γ -Секретаза осуществляет последний

этап серии протеолитических расщеплений рецепторов семейства Notch для высвобождения внутриклеточного домена NICD. Эффективное блокирование связывания γ -секретазы с частично расщеплёнными рецепторами семейства Notch приводит к невозможности запуска самого сигнального пути в опухолевых клетках [5]. GSI продемонстрировали высокую эффективность подавления опухолевого роста на различных моделях *in vitro* и *in vivo*, например, на трастузумаб-резистентном ErbB-2-позитивном раке молочной железы [6]. Однако, по результатам многочисленных доклинических исследований, применение GSI сильно ограничено из-за повышенной токсичности, выражающейся, в частности, метаплазией бокаловидных клеток кишечного эпителия, угнетением пролиферативного потенциала клеток кишечных крипт и атопическим дерматитом [7–10]. Детектированные «off-side» эффекты применения GSI обусловлены тем, что, кроме рецепторов Notch, γ -секретаза имеет более 90 известных субстратов в клетках человека, поэтому прогнозирование последствий их применения на сегодняшний день представляется невозможным.

Более того, авторы научных публикаций, посвящённых изучению ингибирования сигнального пути Notch на моделях клеточных линий человека, зачастую используют в своих работах именно GSI, однако исследования последних лет свидетельствуют о том, что глобальное ингибирование сигнального пути Notch с учётом многочисленных данных о многообразии ролей его компонентов в прогрессии солидных опухолей представляется не рациональной терапевтической стратегией. В частности, было продемонстрировано, что Notch1 и Notch2 антагонистично влияют на рост, инвазию и метастазирование при раке мочевого пузыря [11–13]. Таким образом, при разработке ингибиторов сигнального пути Notch и его компонентов необходимо учитывать, что они могут проявлять как опухоль-супрессирующие, так и онкогенные свойства в зависимости от типа ткани и микроокружения опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ингибирование экспрессии гена, кодирующего рецептор Notch1, потенциально приводит к снижению злокачественных характеристик клеток карцином лёгкого и толстой кишки человека *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, полученные в результате исследования данные могут иметь практическую ценность при разработке новых подходов в таргетной терапии.

Вклад авторов. М.В. Васильева — анализ литературных данных, получение экспериментальных данных, написание текста статьи; Н.В. Хромова — получение экспериментальных данных; Б.П. Копнин — статистическая обработка данных; В.Б. Дугина — получение экспериментальных данных; П.Б. Копнин — разработка концепции исследования, получение экспериментальных данных, написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00321).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Протокол исследования на животных одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kopan, R., and Ilgan, M. X. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism, *Cell*, **137**, 216-233, doi: 10.1016/j.cell.2009.03.045.
2. Radtke, F., Clevers, H., and Riccio, O. (2006) From gut homeostasis to cancer, *Curr. Mol. Med.*, **6**, 275-289, doi: 10.2174/156652406776894527.
3. Xu, K., Moghal, N., and Egan, S. E. (2012) Notch signaling in lung development and disease, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **727**, 89-98, doi: 10.1007/978-1-4614-0899-4_7.
4. Salon, C., Lantuejoul, S., Eymin, B., Gazzeri, S., Brambilla, C., et al. (2005) The E-cadherin-beta-catenin complex and its implication in lung cancer progression and prognosis, *Future Oncol.*, **1**, 649-660, doi: 10.2217/14796694.1.5.649.
5. Yang, G., Zhou, R., Guo, X., Yan, C., Lei, J., et al. (2021) Structural basis of γ -secretase inhibition and modulation by small molecule drugs, *Cell*, **184**, 521-533, doi: 10.1016/j.cell.2020.11.049.
6. Pandya, K., Meeke, K., Clementz, A. G., Rogowski, A., Roberts, J., et al. (2011) Targeting both Notch and ErbB-2 signalling pathways is required for prevention of ErbB-2-positive breast tumour recurrence, *Br. J. Cancer*, **105**, 796-806, doi: 10.1038/bjc.2011.321.
7. Van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., et al. (2005) Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells, *Nature*, **435**, 959-963, doi: 10.1038/nature03659.
8. Krop, I., Demuth, T., Guthrie, T., Wen, P. Y., Mason, W. P., et al. (2012) Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the γ -secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors, *J. Clin. Oncol.*, **30**, 2307-2313, doi: 10.1200/JCO.2011.39.1540.
9. Dumortier, A., Durham, A. D., Piazza, M. D., Vauclair, S., Koch, U., et al. (2010) Atopic dermatitis-like disease and associated lethal myeloproliferative disorder arise from loss of Notch signaling in the murine skin, *PLoS One*, **5**, e9258, doi: 10.1371/journal.pone.0009258.
10. Messersmith, W. A., Shapiro, G. I., Cleary, J. M., Jimeno, A., Dasari, A., et al. (2015) A Phase I, dose-finding study in patients with advanced solid malignancies of the oral γ -secretase inhibitor PF-03084014, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 60-67, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0607.
11. Greife, A., Jankowiak, S., Steinbring, J., Nikpour, P., Niegisch, G., et al. (2014) Canonical Notch signalling is inactive in urothelial carcinoma, *BMC Cancer*, **14**, 628, doi: 10.1186/1471-2407-14-628.
12. Maraver, A., Fernandez-Marcos, P. J., Cash, T. P., Mendez-Pertuz, M., Duenas, M., et al. (2015) NOTCH pathway inactivation promotes bladder cancer progression, *J. Clin. Invest.*, **125**, 824-830, doi: 10.1172/JCI78185.
13. Rampias, T., Vgenopoulou, P., Avgeris, M., Polyzos, A., Stravodimos, K., et al. (2014) A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer, *Nat. Med.*, **20**, 1199-1205, doi: 10.1038/nm.3678.

SIGNIFICANCE OF NOTCH1 EXPRESSION IN THE PROGRESSION OF HUMAN LUNG AND COLORECTAL CANCERS

M. V. Vasileva¹, N. V. Khromova¹, B. P. Kopnin¹, V. B. Dugina², and P. B. Kopnin^{1*}

¹ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 115478 Moscow, Russia; e-mail: pbkopnin@mail.ru

² Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

Lung and colorectal cancers are the most common types of cancer characterized by a poor prognosis and a high mortality rate. Mutations in the genes encoding components of the main intra- and extracellular signaling pathways, in particular the *NOTCH1* gene (Notch1, a member of the Notch family of receptors), play one of the key roles in progression of these malignancies. Notch signaling is involved in maintaining homeostasis of the intestinal epithelium and structural and functional lung elements. Therefore, it is not surprising that the constitutive activity and hyperactivity of Notch signaling due to somatic mutations in genes coding for the products directly involved into its activation, could lead to the progression of these cancer types. The aim of our study was to investigate how the *NOTCH1* downregulation via RNA interference (RNAi) affects the phenotype, characteristics, and Notch-dependent signaling of human A549 lung and HCT116 colorectal carcinoma cells. Several small harpin RNAs (shRNAs) were selected using the bioinformatic analysis and tested for their ability to suppress the *NOTCH1* expression. The most efficient one was used to produce the A549 and HCT116 cells with *NOTCH1* knockdown. The obtained cell lines demonstrated decreased proliferation rates, reduced colony-forming capacity under adhesive conditions, and decreased migration activity in a Boyden chamber. The *NOTCH1* knockdown also significantly decreased expression of some Notch signaling target genes potentially involved in the acquisition and maintenance of more invasive and malignant cell phenotype. *In vivo* experiments in immunodeficient athymic female Balb/c nu/nu mice confirmed the results obtained *in vitro*: the *NOTCH1* inhibition decreased the growth rates of the subcutaneous xenografts formed by A549 and HCT116 tumor cells. Therefore, downregulation of the gene encoding the Notch1 receptor potentially reduces malignant characteristics of human lung and colorectal carcinoma cells.

Keywords: lung cancer, colorectal cancer, Notch signaling, tumor progression, proliferation, invasion, nude mice assay

УДК 577.25

ВЛИЯНИЕ НОКДАУНА *Cc2d1a*/Freud-1 В ГИППОКАМПЕ У МЫШЕЙ ЛИНИИ ВТВР НА АУТИСТИЧЕСКИ-ПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ, СЕРТОНИНОВЫЕ 5-НТ_{1A} И ДОФАМИНОВЫЕ D2-РЕЦЕПТОРЫ, И НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ CREB И NF-κB

© 2022 И.И. Белокопытова, Е.М. Кондаурова, Е.А. Куликова,
Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко*, Н.К. Попова

ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: nauhenko2002@mail.ru

Поступила в редакцию 24.06.2022

После доработки 29.07.2022

Принята к публикации 24.08.2022

Механизмы возникновения аутизма вызывают чрезвычайный интерес в связи с его высокой распространённостью в человеческой популяции. В этом контексте привлекает внимание транскрипционный фактор Freud-1 (кодируется геном *Cc2d1a*), который регулирует множество внутриклеточных сигнальных путей, является сайленсером 5-НТ_{1A} серотониновых и D2 дофаминовых рецепторов. Нарушение функции Freud-1 приводит к развитию различных психопатологий. В данной работе мы обнаружили повышение экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе моделирующих аутистически-подобное поведение мышей линии ВТВР по сравнению с мышами линии С57В1/6J и исследовали как влияет нормализация экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей ВТВР на поведение, 5-НТ_{1A}- и D2-рецепторы и внутриклеточные сигнальные пути Creb и NF-κB. Через 5 недель после введения мышам ВТВР аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), несущего плазмиду рAAV_H1-2_shRNA-Freud-1_Syn_EGFP, кодирующую малую, образующую шпильку РНК, подавляющую экспрессию гена *Cc2d1a*/Freud-1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка, было обнаружено усиление тревожности и увеличение времени нахождения платформы и времени, необходимого для преодоления расстояния до платформы, в водном лабиринте Морриса, что, вероятно, связано с усилением стратегии активного избегания стресса. Однако нокдаун *Cc2d1a*/Freud-1 не повлиял на пространственную память и фосфорилирование транскрипционного фактора CREB, хотя такой эффект был обнаружен в нашей предыдущей работе на мышах линии С57В1/6J. Эти результаты позволяют предположить, что у мышей линии ВТВР нарушен CREB-зависимый эффекторный путь, что может играть важную роль в формировании аутистически-подобного фенотипа. Нокдаун *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей ВТВР не повлиял ни на экспрессию 5-НТ_{1A}- и D2-рецепторов, ни на экспрессию ключевых генов NF-κB сигнального пути (*Nfkb1* и *Rela*). Полученные нами данные позволяют заключить, что транскрипционный фактор Freud-1 играет существенную роль в патогенезе тревожности и активного избегания стресса при аутизме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нокдаун *Cc2d1a*/Freud-1, 5-НТ_{1A} серотониновый рецептор, D2 дофаминовый рецептор, CREB, NF-κB, мыши ВТВР, аутистически-подобное поведение.

DOI: 10.31857/S0320972522100165, EDN: KTMQIF

ВВЕДЕНИЕ

Расстройство аутистического спектра (РАС) – широкое понятие, которое используется для обозначения состояния, характеризующего дефицитом социального взаимодействия,

ограниченным повторяющимся поведением разной степени тяжести и, зачастую, нарушениями обучения. Хотя эти признаки и являются основой для диагностики аутизма, но механизмы развития этого состояния остаются неизвестными и, несомненно, сложными.

Принятые сокращения: РАС – расстройство аутистического спектра; AAV – аденоассоциированный вирусный вектор; *Cc2d1a*/Freud-1 – ген *Cc2d1a*, кодирующий транскрипционный фактор Freud-1; EGFP – зелёный флуоресцентный белок; 5-НТ_{1A}-рецепторы – серотониновые рецепторы.

* Адресат для корреспонденции.

Аутизм является одним из самых распространённых заболеваний среди детей. Современные оценки Центров по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) показывают, что 1 из 59 восьмилетних детей страдает аутизмом [1]. У людей с аутизмом наблюдаются изменения в строении и функционировании мозга. Так, например, возможно аномальное увеличение размера мозга, локальные аномалии в распределении серого и белого вещества, уменьшение мозолистого тела [2–5].

Транскрипционный фактор Freud-1 – это эволюционно консервативный белок, кодируемый геном *Cc2d1a* [6]. *Cc2d1a*/Freud-1 играет важную роль в дифференцировке нейронов [7] и независимо регулирует множество внутриклеточных сигнальных путей [8]. *Cc2d1a*/Freud-1 является мощным активатором NF-κB сигнального пути. NF-κB – это семейство факторов транскрипции, регулирующих иммунитет, воспаление и выживаемость клеток [9]. В соответствии с центральной ролью NF-κB-пути в воспалительных реакциях, существуют исследования нейробиологической основы некоторых психопатологий, которые предполагают участие NF-κB в этиологии этих расстройств [10]. Хотя точную патофизиологическую основу аутизма ещё предстоит найти, всё больше данных указывают на критическую роль нейровоспаления в механизме развития этого заболевания [11–14]. Кроме того, *Cc2d1a*/Freud-1 модулирует сигналинг транскрипционного фактора CREB, который связывается с регионом CRE (Ca^{2+} /сАМР-чувствительный элемент) в промоторах генов раннего ответа для их регуляции [8]. Было показано, что CREB регулирует дифференцировку, выживаемость нейронов, синаптическую пластичность и консолидацию памяти [15]. Мутации в гене *Cc2d1a*/Freud-1 связывают с различными психопатологиями, такими как шизофрения, умственная отсталость, социальный дефицит [16]. Исследования влияния сверхэкспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в серотониновых нейронах предполагают, что *Cc2d1a*/Freud-1 играет важную роль в регуляции серотониновых рецепторов (5-НТ_{1А}-рецепторов) при тревожности и депрессии [17]. При этом было показано, что полный нокаут гена *Cc2d1a*/Freud-1 летален [18–20]. Мыши с кондициональным нокаутом *Cc2d1a*/Freud-1 в серотониновых нейронах демонстрируют тревожно-депрессивное поведение, устойчивое к длительному лечению классическим антидепрессантом флуоксетином [21]. Нокаунт *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей приводит к выраженному антиде-

прессивному эффекту, сопровождающемуся нарушением пространственной памяти [22].

Нарушения развития нервной системы у людей, страдающих аутизмом, могут быть результатом дефектов нейрональной пластичности и проблем с синаптической передачей сигналов. Некоторые из этих проблем могут быть связаны с аномальными уровнями моноаминов (серотонин, дофамин, адреналин и норадреналин) в разных областях мозга [23]. Теория о связи развития аутизма с серотониновой системой возникла из большого числа противоречивых на сегодняшний момент данных, свидетельствующих об отклонениях в функционировании 5-НТ-системы у людей с аутизмом [24]. Известно, что транскрипционный фактор Freud-1 связывается с сайтами 5'-DRE и 3'-DRE в промоторе гена 5-НТ_{1А}-рецептора и блокирует транскрипцию гена этого рецептора [25]. В гене дофаминового рецептора D2 также были найдены последовательности, высокоомологичные DRE-элементам (D2-DRE). Было показано, что Freud-1 является сайленсером как дофаминовых D2-рецепторов, так и серотониновых 5-НТ_{1А}-рецепторов [26]. Рецепторы D2 играют важную роль в функционировании дофаминовой системы, которая участвует в механизмах мотивации, обучения и в регуляции двигательной активности [27, 28].

Несомненно, для исследования такой сложной психопатологии как аутизм необходимо иметь адекватные модельные объекты для исследований. Наиболее широко используемой на сегодняшний день моделью аутизма являются мыши линии T⁺Itpr^{3^{fl}}/J (BTBR). Эти животные отличаются поведенческими чертами, напоминающими симптомы аутизма у людей. К таким особенностям фенотипа исследователи относят дефицит социального взаимодействия и стереотипно повторяющееся поведение [29]. Кроме поведенческого сходства, мыши линии BTBR имеют нейроанатомические и физиологические черты, характерные для людей, страдающих аутизмом [30–32].

В предварительных исследованиях мы обнаружили повышение экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей линии BTBR по сравнению с мышами линии C57Bl/6J (рис. 1). На основе известных данных о ключевой роли *Cc2d1a*/Freud-1 в регуляции NF-κB-пути, серотониновой и дофаминовой систем, а также пути CREB можно предположить, что чрезмерная экспрессия гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе может играть значительную роль в формировании аутистически-подобного поведения у мышей BTBR. Для исследования этой гипотезы

тезы мы ввели в гиппокамп мышей BTBR аде-ноассоциированный вирусный вектор (AAV), несущий плазмиду, которая кодирует малую образующую шпильку РНК (shRNA) для подавления экспрессии гена *Cc2d1a/Freud-1*. Через 5 недель после введения вектора мы исследовали влияние локального снижения уровня гена *Cc2d1a/Freud-1* в гиппокампе мышей BTBR на пространственное обучение и память, на стереотипное и социальное поведение, на тревожность и на экспрессию основных генов, регулируемых транскрипционным фактором *Freud-1* (*Htr1a*, *Drd2*, *Creb1*, *Nfkb1*, *Rela*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Первую серию экспериментов проводили на самцах мышей инбредных линий BTBR и C57Bl/6J только для определения уровня мРНК гена *Cc2d1a* в гиппокампе и префронтальной коре. За 46–48 ч до выведения животных из эксперимента мышей линий BTBR и C57Bl/6J рассаживали по индивидуальным вентилируемым клеткам Optimice («Animal Care Systems», США) для снятия групповых эффектов.

Вторую серию экспериментов проводили только на самцах мышей инбредной линии BTBR. Для тестирования поведения мышей BTBR (через 5 недель после введения конструктов) за 46–48 ч до поведенческих тестов взвешивали (их средний вес составил ~ 35 г) и рассаживали по индивидуальным вентилируемым клеткам (Optimice, «Animal Care Systems») для снятия групповых эффектов. Оценку поведения проводили во время сумерек и начала ночной фазы (15:00–18:00). Всех животных во всех сериях эксперимента содержали в стандартных условиях SPF-вивария ИЦиГ СО РАН при искусственном 14-часовом освещении, постоянных влажности (60%) и температуре (23 °C) и свободном доступе к сбалансированному корму и воде.

Плазмида. Последовательности shRNA для подавления гена *Cc2d1a*, кодирующего *Freud-1*, были следующими: смысловая – 5'-gatccccagatcacctctgaggctgtcttcaagagagacagcctcagaggtatcttttttttgaaag-3' и антисмысловая – 5'-tcgactttccaaaaaagatcacctctgaggctgtctctctgaagacagcctcagaggtatctggg-3'.

Двухцепочечный олигонуклеотид был вставлен в вектор pAAV-Syn (0.5)-EGFP-H1-2 по сайтам эндонуклеаз рестрикции BglII и SalI под контроль промотора H1 [33]. Полученный вектор также содержал зелёный флуоресцентный белок (EGFP; плазмида, несущая ген *egfp*,

получена от профессора Е.Г. Понимаскина (МНН, Ганновер, Германия)) для контроля эффективности экспрессии плазмиды. Все этапы клонирования были проверены секвенированием по Сэнгеру. Плазмида, кодирующая случайную shRNA (не имеющая сродства к геному мыши), была получена от профессора Е.Г. Понимаскина. Оба аденоассоциированных вектора использовали промотор H1 как для экспрессии shRNA-Freud-1 в опытной группе животных, так и для случайной shRNA – в контрольной группе, в то время как EGFP находился под контролем синапсина промотора.

Клеточная культура и трансфекция клеток. Клетки HEK293FT субкультивировали в среде Eagle's medium с модификацией Dulbecco's (DMEM) («Sigma», США), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Gibco», США), 1% Gluta MAX («Gibco») и 1% пенициллина-стрептомицина («Gibco»). Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Каждые 2–3 дня (при достижении 70% конфлюэнтности) клетки разделяли и меняли среду. Клетки HEK293FT трансфицировали плазмидами с использованием полиэтиленимина (PEI; «Polysciences», США), следуя инструкциям производителя.

Получение аденоассоциированного вируса. Упаковку pAAV_SynH1-2_shRNA-Freud-1_Syn-EGFP или плазмиды, несущей случайную контрольную РНК, в аденоассоциированные вирусные капсиды выполняли путём котрансфекции плазмидами AAV-DJ и pHelper («Cell Biolabs, Inc.», США) в клетки HEK293FT [33]. Вирусные частицы собирали через 48 ч в соответствии с протоколом, описанным в 2003 г. Grimm et al. [34]. Количество полученных вирусных частиц определяли при проведении количественного ПЦР-анализа в реальном времени с праймерами (F: 5'-cctggtgctgtctcttatgagg-3'; R: 5'-tgacagtggtggcaatgc-3'). Серию разведенной исходной плазмиды известной концентрации использовали в качестве стандарта для определения количества вирусных частиц. Оба вектора, использованные в этом исследовании, показали сходные геномные титры (10⁹ вирусных частиц/мкл).

Стереотаксическая инъекция в гиппокамп. Для наркотизации животных использовали 400 мкл смеси (1/1) 2,2,2-трибромэтанола («Sigma») и 2-метил-2-бутанола («Sigma»), кожу на голове вскрывали, после этого мышей помещали в стереотаксическую рамку («TSE Systems», Германия). Затем в черепе делали 4 отверстия согласно координатам (AP: –1 мм, L: ± 1 мм, DV: 2,5 мм и AP: –2 мм, L: ± 2 мм, DV: 1,5 мм) [35]. Вирусные частицы, несущие

pAAV_SynH1-2_shRNA-Freud-1_Syn_EGFP (группа «опыт»), медленно вводили по 1 мкл в каждый гиппокамп с помощью шприца Гамильтона со скоростью 0,1 мкл/мин в течение 10 мин. После инъекции иглу удерживали в месте укола ещё 2 мин, чтобы минимизировать вытекание вирусной суспензии при извлечении иглы. В качестве контроля вводили таким же образом AAV, несущий случайную shRNA, не имеющую сродства к геному мыши (группа «контроль»). После двустороннего введения вирусных частиц разрез зашивали прерывистыми швами шёлковыми нитями, а животное помещали в клетку с подогревом до пробуждения от наркоза.

Через 5 недель мы проводили тестирование поведения (тесты «закапывание шариков», «водный лабиринт Морриса», «трёхкамерный социальный тест» и «приподнятый крестообразный лабиринт»). Все тесты, кроме теста закапывания шариков, были проведены с использованием видеосъемки и алгоритмов программного обеспечения Ethostudio, разработанных в нашей лаборатории [36]. Затем были выделены образцы гиппокампа и префронтальной коры для ОТ-ПЦР в реальном времени и Вестерн-блот-анализа. Количество протестированных животных: в опытной группе $n = 12$, в контрольной — $n = 13$.

Тест закапывание шариков. Восемнадцать шариков из стекла ($d = 1$ см) помещали на слой опилок толщиной 4 см в клетке Optimise. Мышь помещали в клетку с шариками на 30 мин. Спустя необходимое время мышь убирала и подсчитывали количество шариков. Шарик рассматривался как закопанный, если опилки покрывали его более чем на две трети.

Водный лабиринт Морриса. Эксперимент проводили, как было описано ранее [37]. Использовали круглый пластиковый матовый резервуар ($d = 100$ см и $h = 40$ см) белого цвета с полупрозрачным дном. Для наблюдения за животными использовалась методика проходящего освещения [38]. С помощью обезжиренного сухого молока воду (25 °C) делали непрозрачной. Поверхность воды была разделена на 4 сектора. В центре одного из секторов была расположена стеклянная платформа ($d = 5$ см и $h = 14,5$ см) на 1,0 см ниже уровня жидкости. На ближайшей к платформе стенке резервуара помещали черный треугольник (ближний ориентир). В течение 4-х дней мыши имели по 3 попытки в день для обучения находить скрытую платформу. Во время обучения мышь последовательно опускали в секторы на 60 с (перерыв между попытками — 15 с). Если мышь не смогла сама найти платформу, то её помещали на плат-

форму на 15 с. Во время учебных попыток измеряли следующие параметры: время достижения цели (с), длина пути к платформе (м) и кумулятивная дистанция — суммарное расстояние от животного до платформы (м). Далее, исходя из данных за 4 дня, были рассчитаны средние значения параметров.

На 5-й день платформа из резервуара была убрана, а мышь выпускали в центре резервуара. Мышам были предоставлены три попытки по 60 с, разделённые 15-секундными перерывами, при этом измеряли время в целевом секторе (%). Далее были рассчитаны средние значения для трёх испытаний.

Трёхкамерный социальный тест. Установка для тестирования представляла собой ящик, состоящий из двух боковых и одной центральной камеры с переходами между отсеками. На 1-м этапе тестирования животному предоставляли возможность ознакомиться со всеми камерами; на 2-м этапе в один из боковых отсеков помещали клетку с другим самцом, а в другой — клетку с неживым объектом (пластиковый кубик 4×4 см). Длительность каждого этапа составляла 10 мин. На 2-м этапе фиксировали время нахождения (с) около пустой клетки и около клетки с другим самцом мыши.

Приподнятый крестообразный лабиринт. Тест проводился в установке из серого пластика, у которой было две закрытых и две открытых части (длина — 30 см; ширина — 5 см). Закрытые части обрамлялись пластиковыми стенками (высота — 30 см). Конструкция была поднята над полом на 60 см и слабо освещалась рассеянным светом галогеновой лампы (25 Вт), которая располагалась на 1 м выше лабиринта. На 60 см выше установки располагался датчик для регистрации поведения животного. Мышь помещали в центр лабиринта головой в сторону закрытого рукава установки. С помощью программного обеспечения EthoStudio оценивалось время, проведённое в закрытых и открытых частях (%). Установка очищалась после каждого животного.

Извлечение гиппокампа и префронтальной коры. В первой серии экспериментов через 46–48 ч после рассадки по индивидуальным клеткам мышей линий BTBR и C57Bl/6J выводили из эксперимента методом декапитации, а их гиппокамп и префронтальную кору извлекали на льду, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °C до выделения общей РНК.

Во второй серии экспериментов через 46–48 ч после тестирования поведения мышей линии BTBR выводили из эксперимента методом декапитации, а их гиппокамп и пре-

фронтальную кору извлекали на льду, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до выделения общей РНК и белка.

ОТ-ПЦР. Выделение общей РНК. Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent («Lifetechnologies», США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученную РНК разводили водой до концентрации 0,125 мкг/мкл и хранили при -70°C . Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [39, 40].

Экспрессию генов определяли с помощью разработанного в нашей лаборатории количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами (таблица) [39–41]. Использовали два типа стандартов: внешний и внутренний. Внутренний стандарт (мРНК *Polr2a*) применяли для контроля обратной транскрипции в качестве основы для расчёта уровня мРНК исследуемых генов. В предварительных опытах не были выявлены различия в уровне мРНК *Polr2a* в исследуемых структурах мозга. Внешним стандартом служила ДНК мыши известной концентрации, что позволяло контролировать ПЦР и определять число копий мРНК исследуемых генов и *Polr2a* в образцах.

Реакция обратной транскрипции. Общая РНК (8 мкл или 1 мкг) была смешана со 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2,25 мкмольями стерильного KCl в объёме 16 мкл, денатурирована при 94°C в течение 5 мин на амплификаторе «БИС» М-120 («БИС-Н», Россия), после чего

был проведён отжиг при 41°C в течение 15 мин; затем было добавлено 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу М-MLV (200 ед.), Tris-HCl (рН = 8,3, 0,225 мкмоль), смесь dNTP (0,015 мкмоль каждого), DTT (0,225 мкмоль) и MnCl_2 (0,03 мкмоль). Полученная смесь (конечный объём – 31 мкл) была инкубирована при 41°C в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при температуре -20°C .

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (таблица), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании «Биосан» Россия. 1 мкл кДНК смешивали с 2,5 мкл ПЦР-буфера (содержит интеркалирующий краситель SYBR green I и референсный краситель ROX), 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP, 2,5 мкл 25 мМ MgCl_2 , 2,5 мкл смеси праймеров (прямого и обратного), 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы и стерильную воду (до конечного объёма 20 мкл). При приготовлении реакционной смеси были использованы наборы реагентов фирмы «Синтол» Россия. ПЦР была проведена на амплификаторе LightCycler 480 System («Roche», Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин при 94°C , 1 цикл; 10 сек при 94°C , 30 сек при соответствующей температуре отжига (таблица); 30 сек при 72°C , 40 циклов. Серию разведений геномной ДНК (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл) амплифицировали одновременно в отдельных пробирках и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кри-

Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{\text{отж.}}$, $^{\circ}\text{C}$	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>Cc2d1a</i>	F: 5'-gcaaagccgggcaacatcatc-3' R: 5'-tagcagaggtgggtgtagtgg-3'	60	181
<i>Htr1a</i>	F: 5'-ctgtgacctgtttatcgccttg-3' R: 5'-gtagtctatagggtcgggtattgc-3'	62	109
<i>Drd2</i>	F: 5'-cctggtacgatgatctggag-3' R: 5'-gcatggcatagtagtttagtggg-3'	63	99
<i>Creb1</i>	F: 5'-ctgcctcaggcgatgtaca-3' R: 5'-ttcattagacggacctctcttc-3'	63	145
<i>Nfkb1</i>	F: 5'-cgtctgtctctctctctcag-3' R: 5'-ctgcctcgggtacttctctc-3'	64	152
<i>Rela</i>	F: 5'-gcacctgtccaagagcac-3' R: 5'-gagttgtccacagatgccagg-3'	64	93
<i>Polr2a</i>	F: 5'-tgtgacaactccataaatgc-3' R: 5'-ctctcttagtgaatttgcgtact-3'	61	194

вая в координатах Ct (значение порогового цикла) – $\log P$ (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 System. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2a*, выполняющей функцию внутреннего стандарта.

Вестерн-блот-анализ. Образцы гомогенизировали в 300 мкл лизирующего буфера (300 мМ NaCl, 100 мМ Tris-HCl (pH 8,4), 4 мМ EDTA, 0,2% (w/v) Triton X-100, 1 мМ Na₃VO₄, 2 мМ PMSF («Sigma») и коктейль ингибиторов протеазы («Thermo Fisher Scientific Inc.», США)), инкубировали в течение 60 мин на льду и центрифугировали (12 000 g в течение 15 мин). Супернатант переносили в чистые пробирки и хранили при температуре –80 °С. Концентрацию белка оценивали спектрофотометрически с использованием набора для анализа белка Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific Inc.») на NanoDrop 2000C («Thermo Fisher Scientific Inc.») и разводили до равной концентрации с помощью 2× буфера Лэммли. Белки денатурировали, прогревая пробы 10 мин при 65 °С. Выделенные белки (по 20 мкл каждого образца) разделяли методом электрофореза в 10%-ном SDS-PAAG, затем переносили на нитроцеллюлозную (для Freud-1, 5-НТ_{1А}, 5-НТ_{2А}, D2) или PVDF-мембрану (для CREB и pCREB) («Bio-rad Laboratories Ltd.», США) с помощью полусухого электроблоттинга Trans-BlotTurbo («Bio-rad Laboratories Inc») в течение 2 ч. Для иммунодетекции белка мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком (для Freud-1, 5-НТ_{1А}, D2) или 5%-ным BSA (для CREB и pCREB), разведённым в буфере TBS-T (Tris Bufferd Saline, «Bio-Rad Laboratories, Inc.») с добавлением 0,1% (v/v) Tween 20. Все мембраны блокировали 1 ч, промывали, а затем инкубировали с первичными антителами (кроличьи моноклональные или поликлональные первичные антитела к белкам Freud-1 (1 : 2000, «Abcam», Великобритания); 5-НТ_{1А} (1 : 1000, «Abcam»); D2DR (1 : 200, «Santa Cruz», США); pCREB (1 : 1000, «Abcam»); CREB (1 : 1000, «Abcam») и мышинные поликлональные первичные антитела к белку GAPDH (CAB932Hu01, 1 : 2500, «Cloud-Clone Corp.», США) в 5%-ном сухом молоке с TBS-T или в 5%-ной FBS с TBS-T, 16 ч при 4 °С. После детекции белка (как описано далее) мембрану отмывали от антител для повторной гибридизации с первичными антителами к GAPDH (внутренний контроль). Для детекции белка мембраны промывали в TBS-T (5 × 5 мин) с последующей инкубацией

со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (вторичные козы антитела против кроличьих иммуноглобулинов (1 : 10 000, «Invitrogen», США) в 5%-ном сухом молоке с TBS-T и антитела против мышинных иммуноглобулинов (1 : 20 000, «Abcam») в 5%-ной FBS с TBS-T), 1 час при комнатной температуре. После промывки мембрану обрабатывали субстратом Clarity Western ECL («Bio-Rad Laboratories Inc», США) в соответствии с инструкцией производителя. Полосы белка были визуализированы хемилюминесцентным сканером C-DiGit («LI-COR», США). Количественную оценку белковых полос проводили с помощью Image Studio («LI-COR»). Экспрессию белка выражали в относительных единицах, нормировали на экспрессию GAPDH, конститутивную для клеток мозга. Количество проанализированных образцов – $n \geq 9$ (в связи с использованием критерия Диксона для выявления и исключения крайних отклонений из анализа число образцов варьировало. Дополнительно количество проанализированных образцов указано на подписях к рисункам).

Флуоресцентная микроскопия срезов мозга мышей. Мышей транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4%-ным раствором параформальдегида под анестезией через 5 недель после инъекции AAV. Мозг извлекали и дополнительно фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 6 ч, затем погружали в 30%-ный раствор сахарозы в PBS на 2 дня. Последовательные срезы толщиной 14 мкм делали в криостате («Thermo Scientific», США). Ядра клеток окрашивали раствором бис-бензида (краситель Hoechst 33258, 5 мкг/мл в PBS, «Sigma-Aldrich», Германия). Наконец, срезы помещали в антиквантную среду (Fluoromount G; «Southern Biotechnology Associates», США) с последующим микроскопическим анализом с использованием микроскопа Zeiss AxioImager («Zeiss», Германия) с 10× и 40× объективами с воздушной иммерсией.

Статистический анализ. Результаты были представлены как $m \pm SEM$ (где m – среднее; SEM – стандартная ошибка среднего), а в тесте «закапывание шариков» добавлено значение медианы. Сравнение выборок проводилось с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным множественным сравнением по Фишеру для всех методов, кроме «водного лабиринта Морриса» и теста «закапывание шариков». Для теста «водный лабиринт Морриса» параметры в различные дни обучения анализировались с помощью ANOVA, используемым при повторных измерениях, с последующим сравнением по Фишеру.

Значения времени в целевом секторе в тесте без платформы сравнивали со случайным (25%) с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для теста «закапывание шариков» использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Достоверными считались различия при критерии значимости $p < 0,05$. Нормальности дисперсий проверялись с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Критерий Диксона использовался для выявления и исключения крайних отклонений из анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение уровня мРНК гена *Cc2d1a* в гиппокампе и префронтальной коре. Было показано существенное ($F_{1,20} = 5,22, p = 0,005$) повышение экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе интактных мышей линии ВТВР по сравнению с интактными мышами линии С57В1/6J (рис. 1) ($n = 11$ в каждой группе). В связи с этим была проведена дальнейшая работа по исследованию

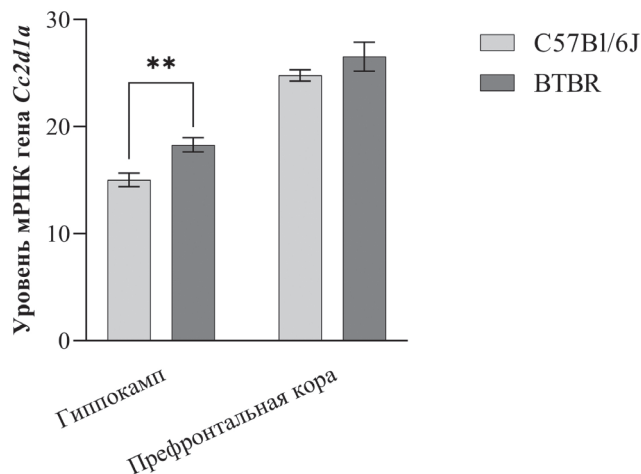


Рис. 1. Уровень мРНК гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линий ВТВР и С57В1/6J. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Polr2a*, $n = 11$. ** $p < 0,01$ – достоверное отличие при сравнении групп ВТВР и С57В1/6J

влияния снижения экспрессии гена *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе мышей линии ВТВР до уровня, обнаруженного в мозге интактных мышей линии С57В1/6J.

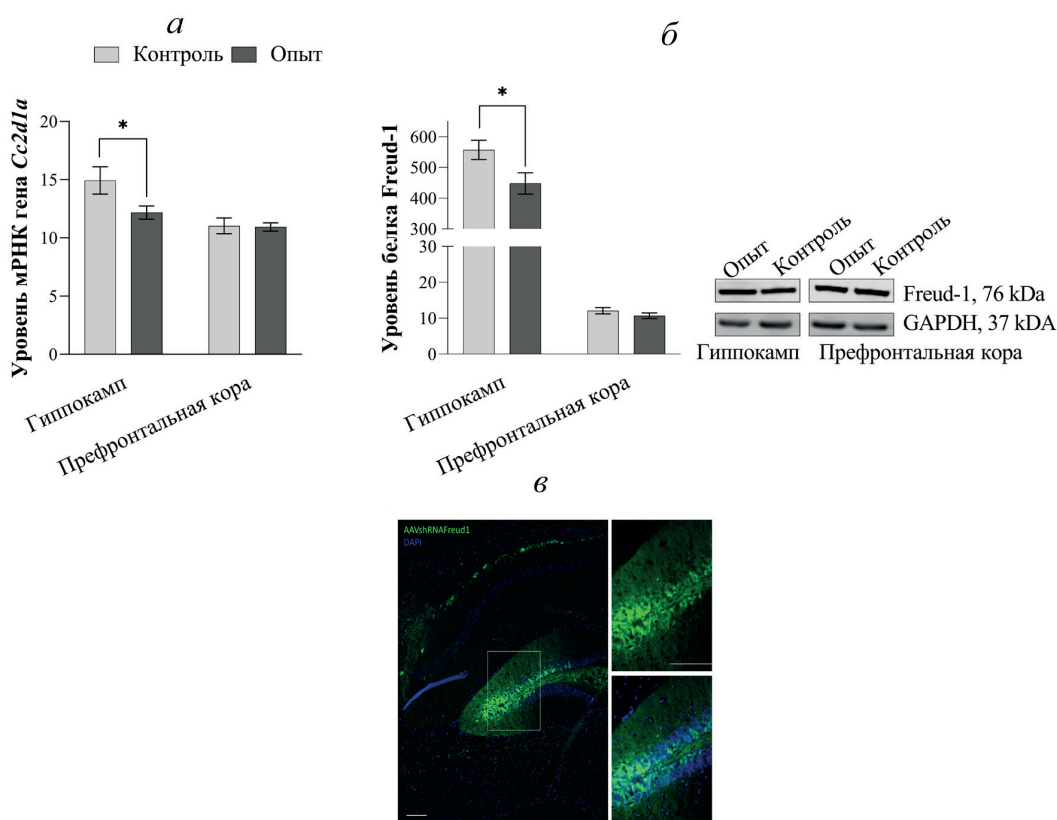


Рис. 2. Уровни мРНК гена *Cc2d1a* (а) и белка Freud-1 (б) в гиппокампе мышей ВТВР. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Polr2a*. Уровень белка представлен в относительных единицах хемилюминесцентного сигнала и нормирован на уровень белка GAPDH, $n = 11-13$. На рисунке показана количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала и результат иммуноблота на мембране. в – Об успешной AAV-опосредованной трансфекции свидетельствует экспрессия флуоресцентного зелёного белка EGFP, обнаруживаемая в клетках области СА1 и зубчатой извилины. Шкала – 100 мкм. * $p < 0,05$ – достоверное отличие при сравнении групп «контроль» и «опыт»

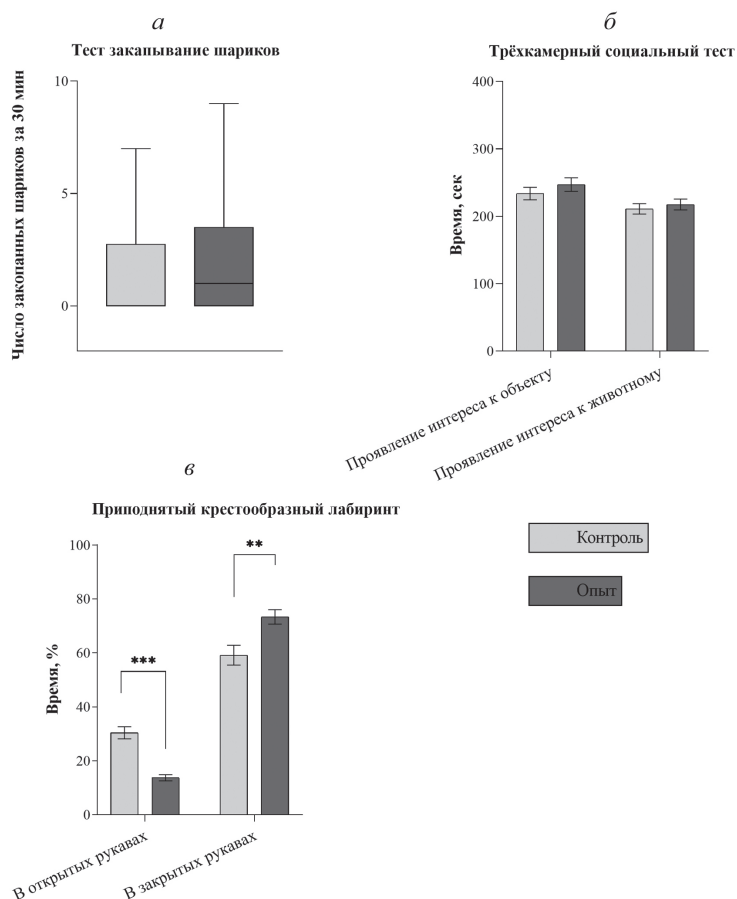


Рис. 3. Влияние снижения экспрессии гена *Cc2d1a* на число полностью закопанных шариков в тесте «закапывание шариков» (а), время проявления интереса к животному или объекту в трёхкамерном социальном тесте (б) и время в открытых и закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (в), $n = 10-13$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверное отличие при сравнении групп «контроль» и «опыт»

Влияние нокдауна гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии ВТВР на экспрессию гена *Cc2d1a*/Freud-1. Нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе привёл к достоверному падению уровня мРНК гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей из группы «опыт» ($F_{1,23} = 4,69$, $p = 0,04$), в префронтальной коре экспрессия этого гена осталась без изменений ($F_{1,24} = 1,26$, $p = 0,90$) (рис 2, а). Вестерн-блот-анализ показал достоверное снижение уровня белка Freud-1 в гиппокампе у опытной группы животных ($F_{1,20} = 5,43$, $p = 0,03$). В префронтальной коре изменения в экспрессии этого белка отсутствовали ($F_{1,20} = 1,38$, $p = 0,25$) (рис. 2, б) ($n = 13$ – в опытной группе, $n = 12$ – в контрольной группе). Кроме того, экспрессия плазмиды в месте инъекции была подтверждена при помощи флуоресцентной микроскопии срезов головного мозга (рис. 2, в).

Влияние нокдауна *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии ВТВР на поведение. Тест закапывание шариков. Количество закопанных шариков отражает выраженность стереотипного поведения животного. Влияния нокдауна *Cc2d1a*/Freud-1 в гиппокампе на

количество закопанных шариков выявлено не было, т.е. стереотипное поведение осталось без изменений ($U = 69$, $p = 0,61$) (рис. 3, а).

Трёхкамерный социальный тест. Трёхкамерный социальный тест служит для оценки степени выраженности социального поведения у животных. В результате анализа поведения животных в этой установке не было обнаружено достоверных отличий для мышей всех групп в исследовательском предпочтении к объекту ($F_{1,22} = 0,07$, $p = 0,79$) или другому животному ($F_{1,21} = 0,33$, $p = 0,56$) (рис. 3, б).

Приподнятый крестообразный лабиринт. Анализ данных теста «приподнятый крестообразный лабиринт» позволяет оценить тревожность животных. В группе «опыт» было обнаружено достоверное снижение времени нахождения в открытых рукавах лабиринта ($F_{1,23} = 46,10$, $p = 0,0009$) и увеличение – в закрытых ($F_{1,23} = 10,05$, $p = 0,004$) (рис. 3, в), что может говорить об усилении тревожности животных группы «опыт» по сравнению с контрольной группой животных.

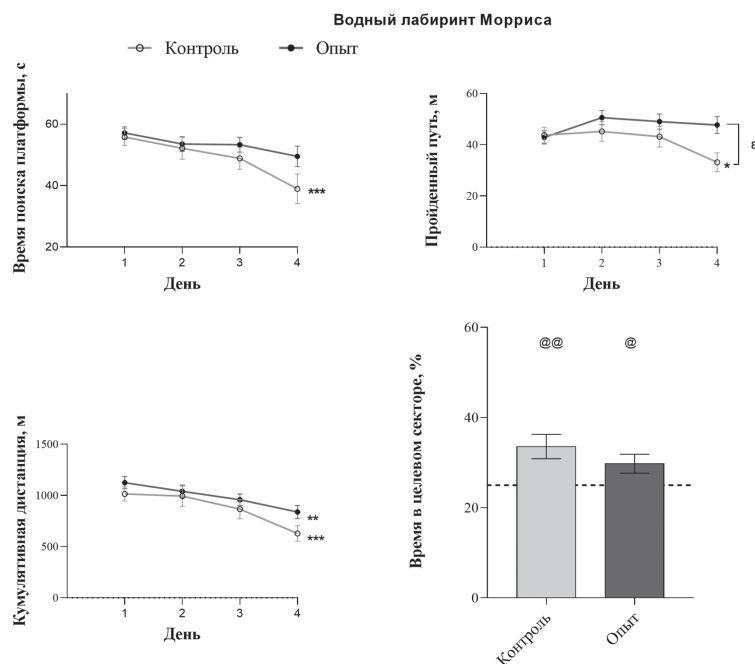


Рис. 4. Динамика изменения времени поиска платформы, пройденного пути, кумулятивной дистанции, а также время в целевом секторе на 5-й день в водном лабиринте Морриса; $n = 11-13$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверное отличие по сравнению с 1-м днём для групп «контроль» и «опыт»; $^{\epsilon} p < 0,05$ – достоверное отличие при сравнении групп «контроль» и «опыт» на 4-й день; $@ p < 0,01$, $@@ p < 0,01$ – достоверное отличие по сравнению со случайным нахождением в секторе (25%)

Водный лабиринт Морриса. Данный тест позволяет оценить память и способность мышей к обучению. Анализ ANOVA для повторных измерений показал эффект группы ($F_{1,23} = 4,98$, $p = 0,036$) – для пройденного пути и эффект измерения – для кумулятивной дистанции ($F_{3,69} = 9,6$, $p = 0,0001$) и для времени поиска платформы ($F_{3,69} = 6,3$, $p = 0,0007$). Мыши контрольной группы успешно обучались находить скрытую платформу, что отражалось в снижении времени поиска платформы ($p = 0,0001$) и пройденного пути к 4-му дню ($p = 0,018$) по сравнению с 1-м днём тестирования. Введение конструкта, несущего плазмиду rAAV_SynH1-2_shRNA-Freud-1, значительно повлияло на поведение животных в данном тесте. Время поиска платформы ($p = 0,06$) и длина пройденного пути ($p = 0,26$) у мышей опытной группы на 4-й день обучения достоверно не отличалось от такового на 1-й день обучения. При этом на 4-й день тестирования было обнаружено достоверное различие в длине пройденного пути ($p = 0,016$) между группами «опыт» и «контроль». Кумулятивная дистанция, однако, уменьшилась как в группе «контроль» ($p = 0,0001$), так и в группе «опыт» ($p = 0,002$). Интересно, что проверка запоминания положения платформы на 5-й день показала, что мыши обеих групп проводили достоверно больше времени в целевом секторе по сравнению со случайным значением – 25% («контроль»: $n = 12$, $t = 3,16$,

$p = 0,009$; «опыт»: $n = 13$, $t = 2,25$, $p = 0,04$). Статистически значимой разницы между опытными и контрольными животными по времени нахождения в целевом секторе найдено не было ($F_{1,23} = 1,25$, $p = 0,27$) (рис. 4).

Влияние нокдауна *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии ВТВР на экспрессию исследуемых генов и белков. Нокдаун гена *Cc2d1a* не повлиял достоверно на уровень мРНК гена *Htr1a* как в гиппокампе ($F_{1,24} = 0,63$, $p = 0,43$), так и в префронтальной коре ($F_{1,24} = 0,76$, $p = 0,39$) (рис. 5 а). Снижение уровня экспрессии гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей не повлияло на уровень белка 5-НТ_{1А} серотонинового рецептора как в гиппокампе ($F_{1,22} = 0,63$, $p = 0,43$), так и в префронтальной коре ($F_{1,20} = 0,76$, $p = 0,78$) (рис. 5, б).

Нокдаун гена *Cc2d1a* не повлиял на экспрессию гена *Drd2* в гиппокампе ($F_{1,26} = 0,17$, $p = 0,67$) и префронтальной коре ($F_{1,26} = 0,08$, $p = 0,77$) (рис. 5, в). Введение аденоассоциированного вирусного вектора не изменило экспрессию белка D2 дофаминового рецептора как в гиппокампе ($F_{1,22} = 0,73$, $p = 0,42$), так и в префронтальной коре ($F_{1,22} = 0,63$, $p = 0,53$) (рис. 5, г).

Экспрессия гена *Creb1* не отличалась в опытной и контрольной группах в гиппокампе ($F_{1,24} = 0,14$, $p = 0,71$). Однако в префронтальной коре уровень мРНК гена *Creb1* в группе «опыт» снизился относительно контрольной группы

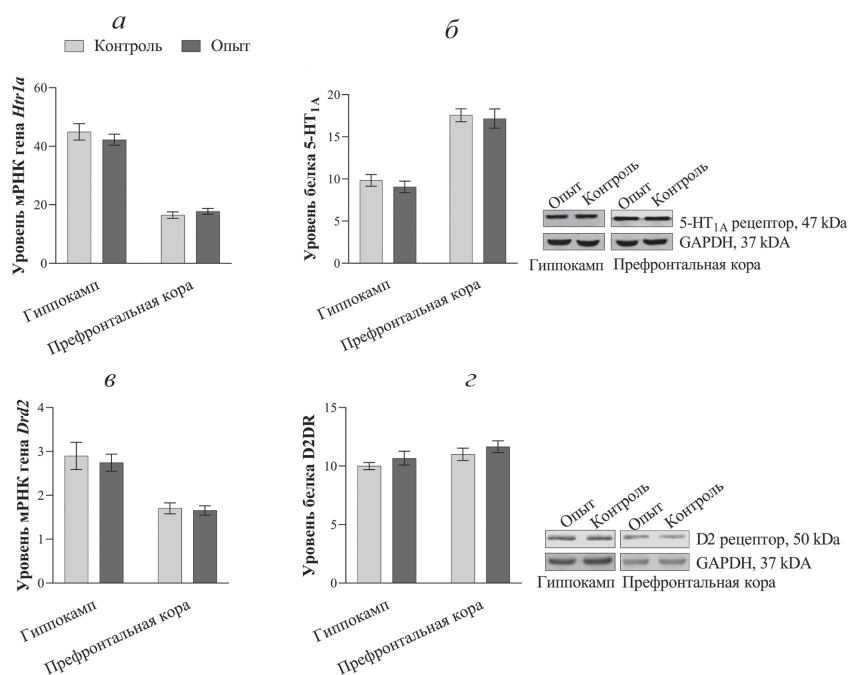


Рис. 5. Уровни мРНК генов *Htr1a*, *Drd2* (а и в) и белка 5-НТ_{1А}, D2-рецепторов (б и г) в гиппокампе и префронтальной коре мозга мышей. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Polr2a*. Уровень белка представлен в относительных единицах хемилюминесцентного сигнала и нормирован на уровень белка GAPDH. На рисунке показана количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала и результат иммуноблота на мембране, $n = 11-13$

животных ($F_{1,21} = 5,55$, $p = 0,028$) (рис. 6, а). Были измерены уровни белков CREB и pCREB, чтобы оценить степень фосфорилирования белка CREB. Было обнаружено, что снижение экспрессии гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей ВТВР не повлияло на фосфорилирование белка CREB ни в гиппокампе ($F_{1,18} = 1,02$, $p = 0,32$), ни в префронтальной коре ($F_{1,21} = 0,10$, $p = 0,74$) (рис. 6, б). Также экспрессия гена *Nfkb1* не различалась между контрольной и опытной группами животных как в гиппокампе ($F_{1,24} = 0,68$, $p = 0,79$), так и в префронтальной коре ($F_{1,24} = 0,66$, $p > 0,42$) (рис. 6, в). Кроме того, снижение уровня экспрессии гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей ВТВР достоверно не повлияло на уровень мРНК гена *Rela* как в гиппокампе ($F_{1,20} = 0,37$, $p = 0,54$), так и в префронтальной коре ($F_{1,25} = 0,29$, $p = 0,59$) (рис. 6, г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Расстройства аутистического спектра – это наследуемая и весьма гетерогенная группа фенотипов психического развития, диагностируемая более чем у 1% детей. Совокупность генетических факторов вносит существенный вклад в развитие этого синдрома, но на сегодняшний день ни одна индивидуальная мутация гена не была надёжно связана с РАС [42]. В этом исследовании в качестве гена кандидата, ответствен-

ного за развитие симптомов аутизма, рассмотрен ген *Cc2d1a*. Этот ген участвует в развитии нервной системы, регулирует большое количество внутриклеточных сигнальных путей и уже отмечен многими исследователями как ген, связанный с дефицитом коммуникативных и когнитивных способностей [16, 43–45].

В ходе данного исследования было обнаружено, что экспрессия гена *Cc2d1a* существенно выше в гиппокампе мышей линии ВТВР по сравнению с мышами контрольной линии С57В1/6J. Принимая во внимание тот факт, что чрезмерная экспрессия *Cc2d1a* может лежать в основе развития различных психопатологий [17], мы предположили, что снижение экспрессии *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии ВТВР до уровня, наблюдаемого в гиппокампе мышей линии С57В1/6J, может привести к коррекции каких-либо аутистически-подобных поведенческих черт у исследуемых животных.

Введение аденоассоциированного вирусного вектора, несущего плазмиду рAAV_SynH1-2_shRNA-Freud-1, значительно снизило экспрессию гена *Cc2d1a*, который кодирует транскрипционный фактор Freud-1. Следует отметить, что снижение уровня мРНК гена *Cc2d1a* составляет примерно 20%, что соответствует различиям в экспрессии *Cc2d1a*, наблюдаемым между мышами ВТВР и С57В1/6J. Уменьшение количества белка Freud-1 стало законо-

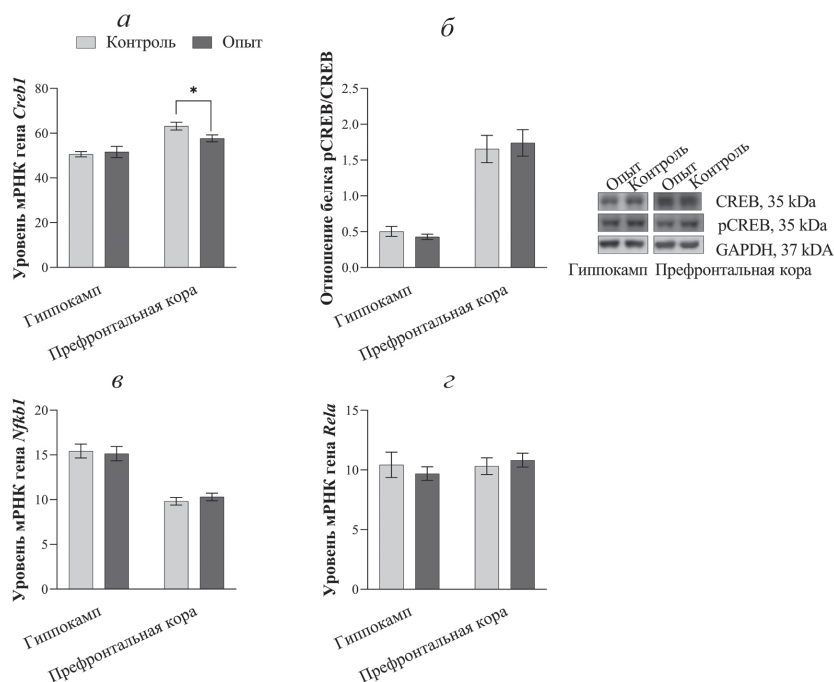


Рис. 6. Экспрессия генов *Creb1* (а), *Nfkb1* (в), *Rela* (г) и уровень фосфорилирования белка CREB (б) в гиппокампе и префронтальной коре мозга мышей. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Polr2a*. Уровень белка представлен в относительных единицах хемилюминесцентного сигнала и нормирован на уровень белка GAPDH. На рисунке показано количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала и результат иммуноблота на мембране, $n = 9-13$. * $p < 0,05$ – достоверное отличие при сравнении групп «контроль» и «опыт»

мерным следствием уменьшения уровня мРНК гена *Cc2d1a*.

Привнесённые в экспрессию гена *Cc2d1a* изменения привели к значительному усилению тревожности, отражённому в сокращении времени, проводимом животными в открытых рукавах, и соответственно увеличению времени в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта. В целом, полученные данные согласуются с данными о протревожном эффекте нокдауна гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии C57Bl/6J [22]. Необходимо отметить, что тревожность является одним из сопутствующих симптомов аутизма. Эта проблема распространена среди людей, страдающих аутизмом, с частотой от 11 до 84% [46]. Наши данные указывают на то, что ген *Cc2d1a* участвует в механизмах тревожности и, в частности, в механизмах тревожности при аутистически-подобном поведении.

В ходе данного исследования нами также было обнаружено, что нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей ВТВР приводит к значительному увеличению времени нахождения платформы и преодолённого расстояния до платформы в водном лабиринте Морриса у исследуемых животных. Можно было бы предположить, что нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе приводит к нарушению пространственного обучения и памяти, однако в день ре-теста без

платформы мыши ВТВР проводили более 25% времени в секторе, где ранее располагалась платформа. Это указывает на то, что животные запомнили местоположение платформы. Следовательно, можно предположить, что увеличение времени нахождения платформы и преодолённого расстояния до платформы у мышей ВТВР связано с высоким уровнем активного избегания стресса, наблюдаемого у этих животных [47], который ещё больше возрос в связи с протревожным эффектом нокдауна гена *Cc2d1a*. Крайне важно отметить, что, как нами было показано ранее, пространственная память нарушалась у мышей стандартной линии C57Bl/6J после нокдауна гена *Cc2d1a* в гиппокампе: в день ре-теста экспериментальные животные проводили в секторе, где ранее располагалась платформа, менее 25% времени [22].

Из литературных данных известно, что мыши с нокаутом по гену *Cc2d1a* имеют целый ряд поведенческих нарушений: когнитивный и социальные дефициты, тревога, гиперактивность и повторяющееся поведение [44]. Однако локальный нокдаун *Cc2d1a* в гиппокампе не оказал существенного влияния на социальный дефицит и стереотипное поведение мышей ВТВР.

Несмотря на важную роль Freud-1 в регуляции 5-НТ_{1A} [17] и D2-рецепторов [26], обнару-

жить эффект нокдауна *Cc2d1a* в гиппокампе на экспрессию генов этих рецепторов не удалось. Возможно, это связано с компенсаторными механизмами, запускающимися через 5 недель после нокдауна гена *Cc2d1a* [22].

Нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей BTBR не оказал существенного влияния ни на экспрессию ключевого эффектора Freud-1 – транскрипционного фактора CREB, ни на его фосфорилирование. Это указывает на то, что CREB не принимает участие в выявленных нами эффектах нокдауна гена *Cc2d1a* на поведение. Однако, как было показано в нашей предыдущей работе, у мышей стандартной линии C57Bl/6J нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе приводил к значительному снижению как уровня мРНК *Creb*, так и фосфорилирования белка [22]. Кроме того, подобное влияние на CREB было продемонстрировано и другим научным коллективом на мышах с дефицитом *Cc2d1a* [8]. Известно, что транскрипционный фактор CREB имеет критическое значение для формирования памяти [48]. В более ранних исследованиях показано, что нокдаун гена *Cc2d1a* нарушает пространственно-временную память в водном лабиринте Морриса [16, 22]. Однако у мышей BTBR нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе не повлиял ни на пространственную память, ни на фосфорилирование транскрипционного фактора CREB, в то время как у мышей C57Bl/6J было обнаружено и ухудшение пространственной памяти, и снижение фосфорилирования CREB [22]. Совместно эти данные указывают на нарушение CREB-зависимого эффекторного пути транскрипционного фактора Freud-1 в мозге мышей линии BTBR.

Широкий спектр внеклеточных лигандов и мембраносвязанных рецепторов активирует каскад NF-κB. Активация NF-κB в основном происходит по каноническим и неканоническим сигнальным путям. Канонический путь основывается на индуцируемой деградации IκB, что вызывает перемещение NF-κB (p65- и p50-субъединицы) в ядро и связывание с κB-сайтами ДНК в промоторах и энхансерах генов-мишеней [49]. Активация этого пути может как уменьшать, так и увеличивать сложность дендритов [50, 51], а также приводить к нейровоспалению и связанным с ним симптомам PAC [16]. Несмотря на то что роль Freud-1 в активации NF-κB сигнального пути не вызывает сомнения, локальный нокдаун *Cc2d1a* в гиппокампе мышей линии BTBR не оказал существенного влияния на уровни мРНК генов канонического сигнального пути NF-κB *Rela* (кодирует субъединицу p65 NF-κB-фактора) и *Nfkb1* (кодирует субъединицу p50 NF-κB-

фактора), что может указывать на нарушения в работе каких-то элементов данного сигнального пути. Также нельзя исключать существование дополнительных, ещё не изученных механизмов реализации эффектов Freud-1 на поведение, не связанных с CREB и NF-κB сигнальными путями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, транскрипционный фактор Freud-1 играет роль в патогенезе тревожности и в механизмах активного избегания стресса при аутизме. При этом нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей с аутистически-подобным поведением не нарушает их пространственную память, как у «нормальных» животных линии C57Bl/6J. Совместно с данными об отсутствии эффекта нокдауна гена *Cc2d1a* в гиппокампе мышей BTBR на фосфорилирование CREB наши результаты позволяют предположить, что у мышей линии BTBR нарушен CREB-зависимый эффекторный путь, что может играть важную роль в формировании аутистически-подобного фенотипа.

Вклад авторов. В.С. Науменко, Н.К. Попова, Е.М. Кондаурова – концепция и руководство работой; Е.А. Куликова, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко, И.И. Белокопытова – проведение экспериментов; В.С. Науменко, Е.М. Кондаурова – обсуждение результатов исследования; И.И. Белокопытова, В.С. Науменко – написание текста; В.С. Науменко, Н.К. Попова, Е.М. Кондаурова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00028). Содержание животных осуществлялось за счёт средств бюджетного проекта FWRN-2022-0023.

Благодарности. Исследование выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФНИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН (RFMEFI62119X0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с международными правилами обращения с животными (Directive 2010/63/EU EC) и Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (зарегистрирован 15.08.2016 № 43232).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Christensen, D. L., Baio, J., Van Naarden Braun, K., Bilder, D., Charles, J., et al. (2016) Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2012, *Morbid. Mortal. Weekly Rep. Surveill. Summaries*, **65**, 1-23, doi: 10.15585/mmwr.ss6503a1.
- Alexander, A. L., Lee, J. E., Lazar, M., Boudos, R., DuBray, M. B., et al. (2007) Diffusion tensor imaging of the corpus callosum in autism, *NeuroImage*, **34**, 61-73, doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.08.032.
- Ecker, C., Suckling, J., Deoni, S. C., Lombardo, M. V., Bullmore, E. T., et al. (2012) Brain anatomy and its relationship to behavior in adults with autism spectrum disorder: a multicenter magnetic resonance imaging study, *Arch. Gen. Psychiatry*, **69**, 195-209, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.1251.
- Hoischen, A., Krumm, N., and Eichler, E. E. (2014) Prioritization of neurodevelopmental disease genes by discovery of new mutations, *Nat. Neurosci.*, **17**, 764-772, doi: 10.1038/nn.3703.
- Lainhart, J. E. (2006) Advances in autism neuroimaging research for the clinician and geneticist, *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, **142C**, 33-39, doi: 10.1002/ajmg.c.30080.
- Basel-Vanagaite, L., Attia, R., Yahav, M., Ferland, R. J., Anteki, L., et al. (2006) The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation, *J. Med. Genet.*, **43**, 203-210, doi: 10.1136/jmg.2005.035709.
- Nakamura, A., Naito, M., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008) Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 5996-6009, doi: 10.1128/MCB.00114-08.
- Zamarbide, M., Mossa, A., Munoz-Llancao, P., Wilkinson, M. K., Pond, H. L., et al. (2019) Male-specific cAMP signaling in the hippocampus controls spatial memory deficits in a mouse model of autism and intellectual disability, *Biol. Psychiatry*, **85**, 760-768, doi: 10.1016/j.biopsych.2018.12.013.
- Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a000034, doi: 10.1101/cshperspect.a000034.
- Liao, X., and Li, Y. (2020) Nuclear factor kappa B in autism spectrum disorder: a systematic review, *Pharmacol. Res.*, **159**, 104918, doi: 10.1016/j.phrs.2020.104918.
- El-Ansary, A., and Al-Ayadhi, L. (2012) Neuroinflammation in autism spectrum disorders, *J. Neuroinflamm.*, **9**, 265, doi: 10.1186/1742-2094-9-265.
- Matta, S. M., Hill-Yardin, E. L., and Crack, P. J. (2019) The influence of neuroinflammation in autism spectrum disorder, *Brain Behav. Immun.*, **79**, 75-90, doi: 10.1016/j.bbi.2019.04.037.
- Theoharides, T. C., Asadi, S., and Patel, A. B. (2013) Focal brain inflammation and autism, *J. Neuroinflamm.*, **10**, 46, doi: 10.1186/1742-2094-10-46.
- Young, A. M., Chakrabarti, B., Roberts, D., Lai, M. C., Suckling, J., et al. (2016) From molecules to neural morphology: understanding neuroinflammation in autism spectrum condition, *Mol. Autism*, **7**, 9, doi: 10.1186/s13229-016-0068-x.
- Impey, S., McCorkle, S. R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J. M., Yochum, G. S., et al. (2004) Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions, *Cell*, **119**, 1041-1054, doi: 10.1016/j.cell.2004.10.032.
- Zamarbide, M., Oaks, A. W., Pond, H. L., Adelman, J. S., and Manzini, M. C. (2018) Loss of the intellectual disability and autism gene *Cc2d1a* and its homolog *Cc2d1b* differentially affect spatial memory, anxiety, and hyperactivity, *Front. Genet.*, **9**, 65, doi: 10.3389/fgene.2018.00065.
- Ou, X. M., Lemonde, S., Jafar-Nejad, H., Bown, C. D., Goto, A., et al. (2003) Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene, *J. Neurosci.*, **23**, 7415-7425, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-19-07415.2003.
- Al-Tawashi, A., Jung, S. Y., Liu, D., Su, B., and Qin, J. (2012) Protein implicated in nonsyndromic mental retardation regulates protein kinase A (PKA) activity, *J. Biol. Chem.*, **287**, 14644-14658, doi: 10.1074/jbc.M111.261875.
- Zhao, M., Raingo, J., Chen, Z. J., and Kavalali, E. T. (2011) *Cc2d1a*, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses, *J. Neurophysiol.*, **105**, 1506-1515, doi: 10.1152/jn.00950.2010.
- Chen, K. R., Chang, C. H., Huang, C. Y., Lin, C. Y., Lin, W. Y., et al. (2012) TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE)/CC2D1A is a key regulator linking RIG-I-like receptors to antiviral immunity, *J. Biol. Chem.*, **287**, 32216-32221, doi: 10.1074/jbc.C112.394346.
- Vahid-Ansari, F., Daigle, M., Manzini, M. C., Tanaka, K. F., Hen, R., et al. (2017) Abrogated Freud-1/*Cc2d1a* repression of 5-HT1A autoreceptors induces fluoxetine-resistant anxiety/depression-like behavior, *J. Neurosci.*, **37**, 11967-11978, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1668-17.2017.
- Kondaurova, E. M., Plyusnina, A. V., Ilchibaeva, T. V., Eremin, D. V., Rodnyy, A. Y., et al. (2021) Effects of a *Cc2d1a*/Freud-1 knockdown in the hippocampus on behavior, the serotonin system, and BDNF, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms222413319.
- Farook, M. F., DeCuypere, M., Hyland, K., Takumi, T., LeDoux, M. S., et al. (2012) Altered serotonin, dopamine and norepinephrine levels in 15q duplication

- and Angelman syndrome mouse models, *PLoS One*, **7**, e43030, doi: 10.1371/journal.pone.0043030.
24. Faraji, J., Karimi, M., Lawrence, C., Mohajerani, M. H., and Metz, G. A. S. (2018) Non-diagnostic symptoms in a mouse model of autism in relation to neuroanatomy: the BTBR strain reinvestigated, *Translat. Psychiatry*, **8**, 234, doi: 10.1038/s41398-018-0280-x.
25. Lemonde, S., Turecki, G., Bakish, D., Du, L., Hrdina, P. D., et al. (2003) Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide, *J. Neurosci.*, **23**, 8788-8799, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-25-08788.2003.
26. Rogaeva, A., Ou, X. M., Jafar-Nejad, H., Lemonde, S., and Albert, P. R. (2007) Differential repression by *freud-1/CC2D1A* at a polymorphic site in the dopamine-D2 receptor gene, *J. Biol. Chem.*, **282**, 20897-20905, doi: 10.1074/jbc.M610038200.
27. Ford, C. P. (2014) The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission, *Neuroscience*, **282**, 13-22, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.025.
28. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., and Caron, M. G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function, *Physiol. Rev.*, **78**, 189-225, doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.189.
29. Stephenson, D. T., O'Neill, S. M., Narayan, S., Tiwari, A., Arnold, E., et al. (2011) Histopathologic characterization of the BTBR mouse model of autistic-like behavior reveals selective changes in neurodevelopmental proteins and adult hippocampal neurogenesis, *Mol. Autism*, **2**, 7, doi: 10.1186/2040-2392-2-7.
30. Gould, G. G., Burke, T. F., Osorio, M. D., Smolik, C. M., Zhang, W. Q., et al. (2014) Enhanced novelty-induced corticosterone spike and upregulated serotonin 5-HT1A and cannabinoid CB1 receptors in adolescent BTBR mice, *Psychoneuroendocrinology*, **39**, 158-169, doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.09.003.
31. Gould, G. G., Hensler, J. G., Burke, T. F., Benno, R. H., Onaivi, E. S., et al. (2011) Density and function of central serotonin (5-HT) transporters, 5-HT1A and 5-HT2A receptors, and effects of their targeting on BTBR T+tf/J mouse social behavior, *J. Neurochem.*, **116**, 291-303, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07104.x.
32. Guo, Y. P., and Commons, K. G. (2017) Serotonin neuron abnormalities in the BTBR mouse model of autism, *Autism Res.*, **10**, 66-77, doi: 10.1002/aur.1665.
33. Wirth, A., Chen-Wacker, C., Wu, Y. W., Gorinski, N., Filippov, M. A., et al. (2013) Dual lipidation of the brain-specific *Cdc42* isoform regulates its functional properties, *Biochem. J.*, **456**, 311-322, doi: 10.1042/BJ20130788.
34. Grimm, D., Kay, M. A., and Kleinschmidt, J. A. (2003) Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6, *Mol. Ther.*, **7**, 839-850, doi: 10.1016/s1525-0016(03)00095-9.
35. Slotnick, B. M., and Leonard, C. M. (1975) *A Stereotaxic Atlas of the Albino Mouse Forebrain*, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Rockville, Maryland.
36. Khotskin, N. V., Plyusnina, A. V., Kulikova, E. A., Bazhenova, E. Y., Fursenko, D. V., et al. (2019) On association of the lethal yellow (A(Y)) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior, *Behav. Brain Res.*, **359**, 446-456, doi: 10.1016/j.bbr.2018.11.013.
37. Kulikov, A. V., Fursenko, D. V., Khotskin, N. V., Bazovkina, D. V., Kulikov, V. A., et al. (2014) Spatial learning in the Morris water maze in mice genetically different in the predisposition to catalepsy: the effect of intraventricular treatment with brain-derived neurotrophic factor, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **122**, 266-272, doi: 10.1016/j.pbb.2014.04.009.
38. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., and Kulikov, V. A. (2008) Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 345-351, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024.
39. Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., Voronova, I. P., Tikhonova, M. A., and Popova, N. K. (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard, *J. Neurosci. Methods*, **141**, 97-101, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.06.005.
40. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT(1A) serotonin receptor gene expression in the brain, *Mol. Biol. (Mosk)*, **40**, 37-44.
41. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and Kulikov, A. V. (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 197-203, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.008.
42. Grove, J., Ripke, S., Als, T. D., Mattheisen, M., Walters, R. K., et al. (2019) Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder, *Nat. Genet.*, **51**, 431-444, doi: 10.1038/s41588-019-0344-8.
43. Manzini, M. C., Xiong, L., Shaheen, R., Tambunan, D. E., Di Costanzo, S., et al. (2014) *CC2D1A* regulates human intellectual and social function as well as NF-kappaB signaling homeostasis, *Cell Rep.*, **8**, 647-655, doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.039.
44. Oaks, A. W., Zamarbide, M., Tambunan, D. E., Santini, E., Di Costanzo, S., et al. (2017) *Cc2d1a* loss of function disrupts functional and morphological development in forebrain neurons leading to cognitive and social deficits, *Cereb. Cortex*, **27**, 1670-1685, doi: 10.1093/cercor/bhw009.
45. Sener, E. F., Uytun, M. C., Bayramov, K. K., Zararsiz, G., Oztop, D. B., et al. (2016) The roles of *CC2D1A* and *HTR1A* gene expressions in autism spectrum disorders, *Metab. Brain Dis.*, **31**, 613-619, doi: 10.1007/s11011-016-9795-0.

46. White, S. W., Oswald, D., Ollendick, T., and Scahill, L. (2009) Anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorders, *Clin. Psychol. Rev.*, **29**, 216-229, doi: 10.1016/j.cpr.2009.01.003.
47. Defensor, E. B., Pearson, B. L., Pobbe, R. L., Bolivar, V. J., Blanchard, D. C., et al. (2011) A novel social proximity test suggests patterns of social avoidance and gaze aversion-like behavior in BTBR T+ tf/J mice, *Behav. Brain Res.*, **217**, 302-308, doi: 10.1016/j.bbr.2010.10.033.
48. Kida, S., Josselyn, S. A., Pena de Ortiz, S., Kogan, J. H., Chevere, I., et al. (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories, *Nat. Neurosci.*, **5**, 348-355, doi: 10.1038/nn819.
49. Sun, S. C. (2011) Non-canonical NF-kappaB signaling pathway, *Cell Res.*, **21**, 71-85, doi: 10.1038/cr.2010.177.
50. Gavalda, N., Gutierrez, H., and Davies, A. M. (2009) Developmental switch in NF-kappaB signalling required for neurite growth, *Development*, **136**, 3405-3412, doi: 10.1242/dev.035295.
51. Gutierrez, H., O'Keefe, G. W., Gavalda, N., Gallagher, D., and Davies, A. M. (2008) Nuclear factor kappa B signaling either stimulates or inhibits neurite growth depending on the phosphorylation status of p65/RelA, *J. Neurosci.*, **28**, 8246-8256, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1941-08.2008.

**EFFECT OF A *Cc2d1a*/Freud-1 KNOCKDOWN
IN THE HIPPOCAMPUS IN BTBR MICE
ON AUTISTIC-LIKE BEHAVIOR, SEROTONIN 5-HT_{1A}
AND D2 DOPAMINE RECEPTORS
AND INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS CREB AND NF-κB**

**I. I. Belokopytova, E. M. Kondaurova, E. A. Kulikova, T. V. Ilchibaeva,
V. S. Naumenko*, and N. K. Popova**

*Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: naumenko2002@mail.ru*

The mechanisms of autism are of extreme interest due to its high prevalence in the human population. In this regard, the transcription factor Freud-1 (encoded by the *Cc2d1a* gene), which regulates many intracellular signaling pathways and serves as a silencer for serotonin 5-HT_{1A} and dopamine D2 receptors. Disruptions of Freud-1 function leads to the development of various psychopathologies. In this study, we found an increase in the expression of the *Cc2d1a*/Freud-1 gene in the hippocampus of modeling autism-like behavior BTBR mice in comparison with C57Bl/6J mice and examined how the normalization of the *Cc2d1a*/Freud-1 gene expression in the hippocampus of BTBR mice affects behavior, 5-HT_{1A} and D2 receptors and Creb and NF-κB intracellular signaling pathways. 5 weeks after administration of an adeno-associated viral vector (AAV) carrying the pAAV_H1-2_shRNA-Freud-1_Syn_EGFP plasmid encoding a small hairpin RNA that suppresses the expression of the *Cc2d1a*/Freud-1 gene at both the mRNA and protein levels, we revealed an enhancement of anxiety and an increase in the time spent to find the platform and the distance traveled to the platform in the Morris water maze, which is probably associated with an increase in the strategy of active stress avoidance. However, *Cc2d1a*/Freud-1 knockdown did not affect spatial memory and CREB transcription factor phosphorylation, although such effect was found in our previous work on C57Bl/6J mice. These results suggest that the CREB-dependent effector pathway is impaired in BTBR mice, which may play an important role in the development of the autism-like phenotype. Knockdown of *Cc2d1a*/Freud-1 in the hippocampus of BTBR mice did not affect either the expression of 5-HT_{1A} and D2 receptors or the expression of key NF-κB signaling genes (*Nfkb1* and *Rela*). Our data allow us to conclude that the Freud-1 transcription factor plays a significant role in the pathogenesis of anxiety and active stress avoidance in autism.

Keywords: *Cc2d1a*/Freud-1 knockdown, 5-HT_{1A} serotonin receptor, D2 dopamine receptor, CREB, NF-κB, BTBR mice, autistic-like behavior