

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
Институт биохимии имени А.Н. Баха

На правах рукописи



Акулиникина Дарья Валерьевна

**АССОЦИАЦИЯ СВЕТОИНДУЦИРУЕМЫХ СТРЕССОВЫХ $HspA/HspB$
БЕЛКОВ С ФОТОСИСТЕМАМИ КЛЕТОК ЦИАНОБАКТЕРИИ
Synechocystis PCC 6803**

03.01.04 Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор
Юрина Н.П.

Москва - 2016

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Фоторецепторы	12
1.1.1. Фитохромы.....	13
1.1.2. Криптохромы	14
1.1.3. Фототропины	16
1.2. Световой сигналинг.....	19
1.3. Фотоингибирование	21
1.4. Мультигенное семейство белков светособирающих комплексов.....	25
1.5. Эволюция семейства белков LHC.....	30
1.6. Классификация белков семейства CAB	33
1.6.1. Белки, содержащие одну трансмембранную спираль	33
1.6.2. Белки, содержащие две трансмембранные спирали.....	35
1.6.3. Белки, содержащие три трансмембранные спирали.....	36
1.6.4. Белки, содержащие четыре трансмембранные спирали	41
1.7. Индуцируемые интенсивным светом белки (Hlips) цианобактерий: фотопротекция и локализация	43
1.7.1. Фотосинтетический аппарат цианобактерий	43
1.7.2. Hli белки цианобактерий	44
1.7.3. Гены <i>hli</i> и регуляция их экспрессии.....	46
1.7.4. Ассоциация Hli белков с ФС2.....	48
1.7.5. Фотозащитная роль Hli белков при биогенезе ФС2	50
1.7.6. Роль Hli белков в метаболизме хлорофилла.....	56
1.7.7. Белки, слитые с Hli-доменом	60
1.7.8. Ассоциация Hli белков с ФС1	62
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	64

2.1. Штаммы цианобактерий.....	64
2.2. Условия выращивания.....	64
2.3. Выделение тилакоидных мембран	65
2.4. Лизис тилакоидных мембран.....	65
2.5. Ионообменная хроматография	65
2.6. Определение содержания хлорофилла и активности комплексов ФС1	66
2.7. Определение фотохимической активности ФС1 с помощью флуориметра DUAL-PAM-101.....	66
2.8. Определение фотохимической активности ФС1 по поглощению O ₂ в системе искусственных донора и акцептора.....	66
2.9. Определение концентрации белка по методу Бредфорд	67
2.10. Нативный электрофорез в ПААГ	68
2.11. Электрофорез белков в ПААГ по методу Леммли.....	70
2.12. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану	71
2.13. Идентификация белков с помощью Вестерн-блот анализа.....	71
2.14. Обнаружение иммунных комплексов.....	72
2.15. Обнаружение иммунных комплексов с помощью однокомпонентного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина	73
2.16. Идентификация белков с помощью MALDI-TOF	74
2.17. Конфокальная микроскопия	75
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	77
3.1. Соллюбилизация тилакоидных мембран и выделение хлорофилл-белковых комплексов	77
3.2. Ассоциация белков HliA/HliB с тримерами ФС1 клеток дикого типа <i>Synechocystis</i>	78
3.3. Ассоциация белков HliA/HliB с мономерами ФС1 у мутанта, дефицитного по ФС2	80
3.4. Ассоциация белков HliA/HliB с пигмент-белковыми комплексами у мутанта ΔPsaL (без тримеров ФС1)	82
3.5. Влияние условий выращивания клеток на ассоциацию белков HliA/HliB с тримерами ФС1	84

3.6. Индукция HliA/HliB в клетках мутанта <i>Synechocystis</i> , дефицитного по ФС1 и ФС2	86
3.7. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия клеток дикого типа и мутантов <i>Synechocystis</i>	88
3.8. Определение локализации белков HliA/HliB с помощью двумерного электрофореза и MALDI-TOF.....	90
3.9. Активность ФС1 клеток дикого типа и мутанта, дефицитного по ФС2, различающихся по содержанию белков HliA/HliB	95
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ.....	106
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	107
БЛАГОДАРНОСТИ.....	128
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	129

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- ФМН – флавинмоноклеотид
- ФС1 – фотосистема 1
- ФС2 – фотосистема 2
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- АТФ – аденозинтрифосфат
- Lhc – light-harvesting proteins
- Cab – chlorophyll *a/b*-binding proteins
- ССК – светособирающий комплекс
- Elip – early light-induced proteins
- Ohp – one helix proteins
- Scp - small Cab-like protein
- Hlip - high light-inducible protein
- DCMU - 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина (диурон)
- DBMIB - 2,5-дибром-3-метил-6-изопропил-пара-бензохинон
- ОСР - оранжевый каротиноид-связывающий белок
- RC47 - интермедиант сборки ФС2 без CP43
- RCII - субкомплекс, состоящий из D1, D2 и фактора сборки Ycf48
- RCII* - субкомплекс RCII, который содержит дополнительный фактор сборки Ycf39
- Proto IX - протопорфирин IX
- BG-11 - жидкая среда для выращивания цианобактерий
- MOPS – 3-[N-morpholino]propane-sulfonic acid
- β -DM - n-додecil- β -D-мальтозид
- ДТ – дикий тип клеток
- ДХФИФ - 2,6-дихлорфенолиндофенола
- ПААГ – полиакриламидный гель
- SDS - додецилсульфат натрия

CN-PAGE – неокрашенный нативный электрофорез в полиакриламидном геле

SDS-PAGE – электрофорез в ПААГ, в присутствии додецилсульфат натрия

ECL - enhanced chemiluminescence

ТМБ - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight (времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация)

ТФУ – трифторуксусная кислота

НАД(Ф)Н – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НАД(Ф)Н-ОР – НАД(Ф)Н оксидоредуктаза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Для нормального функционирования фотосинтезирующих организмов в условиях светового стресса в ходе эволюции возникли многочисленные защитные механизмы, в которых участвуют различные ферменты, неферментативные антиоксиданты и стрессовые (защитные) белки. Важную роль в защите фотосинтетического аппарата цианобактерий от деструкции играют светоиндуцируемые стрессовые белки Hliр (high-light inducible proteins) или SCPs (small Cab-like proteins). Эти белки, необходимые для выживания организмов в условиях высокой интенсивности света, обнаруживают сходство с хлорофилл *a/b*-связывающими белками светособирающих комплексов (Cab) растений и, по-видимому, являются их эволюционными предшественниками. Белки Hli локализованы в тилакоидной мембране, содержат одну трансмембранную спираль, хлорофилл-связывающий домен и характеризуются низкой молекулярной массой 6–10 кДа. Эти белки у цианобактерий кодируются светоиндуцируемыми генами *hli*, которые обнаружены во всех секвенированных к настоящему времени геномах цианобактерий; число копий генов *hli* зависит от вида и экотипа цианобактерий.

У цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 идентифицированы пять белков Hli, четыре из которых представляют собой низкомолекулярные белки HliA/HliB, HliC/HliD; пятый белок является С-концевым фрагментом феррохелатазы. Гены, кодирующие HliA–HliD, индуцируются различными стрессовыми условиями, включающими не только свет высокой интенсивности, но и низкую температуру, а также голодание по источникам азота и серы, что затрудняет выяснение механизма индукции синтеза этих белков.

Особый интерес представляют два белка этого семейства – HliA и HliB, т.к. именно они являются особенно важными для выживания клеток

Synechocystis в условиях светового стресса. Данные о связывании этих белков с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран цианобактерий разноречивы. Было показано, что HliA и HliB у *Synechocystis* ассоциированы с тримерами, но не с мономерами фотосистемы 1 (ФС1), и необходимы для их стабилизации. С другой стороны, было обнаружено, что белки HliA и HliB *Synechocystis* связаны с белком CP47 фотосистемы 2 (ФС2), но не с ФС1. Сведения о связывании этих важных белков с хлорофилл-белковыми комплексами ФС1 тилакоидных мембран цианобактерий разноречивы.

Цель исследования

Выявление ассоциации стресс-индуцируемых белков HliA/HliB с фотосистемами цианобактерии *Synechocystis* 6803 в нормальных условиях и в условиях светового стресса.

Задачи исследования

1. Выделить мономеры и тримеры ФС1 из клеток дикого типа и мутантов *Synechocystis* 6803 и охарактеризовать их по спектральным параметрам и составу белков.
2. Идентифицировать HliA/HliB в составе ФС1 и комплекса ФС2 в клетках цианобактерий с помощью вестерн-блот анализа.
3. Выявить ассоциацию HliA/HliB белков с хлорофилл-белковыми комплексами клеток дикого типа и мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС2. Идентифицировать фотосинтетические белковые комплексы и белки с помощью двумерного электрофореза в ПААГ и масс-спектрометрии MALDI-TOF.
4. Исследовать влияние гетеротрофного питания на ассоциацию (световую индукцию) HliA/HliB белков с пигмент-белковыми комплексами.
5. Установить, синтезируются ли HliA/HliB белки у мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС1 и ФС2.

6. Изучить влияние HliA/HliB белков на активность ФС1.

Методы исследования

В работе использовались классические биохимические и молекулярно-биологические методы исследования. Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли в соответствии с общепринятыми алгоритмами.

Научная новизна и практическая значимость

Проведенные исследования ассоциации HliA/HliB белков с фотосистемами цианобактерии с использованием мутантов, дефицитных по ФС2 и по обеим фотосистемам и не содержащим тримеров ФС1, впервые показали, что HliA/HliB белки ассоциированы не только с тримерами, но и с мономерами ФС1. Ассоциация HliA/HliB белков как с ФС1, так и с комплексом ФС2 указывает на универсальную роль этих белков в защите хлорофилл-белковых комплексов от светового стресса. Впервые было показано, что HliA/HliB белки синтезируются в клетках *Synechocystis*, не содержащих фотосистемы 1 и 2. Показано, что выращивание клеток в среде с глюкозой при низкой освещенности не влияет на ассоциацию HliA/HliB белков с хлорофилл-белковыми комплексами. Обнаружено, что отсутствие тримеров ФС1 не влияет на связывание HliA/HliB белков с мономерами ФС1 и комплексами ФС2. Модифицирована методика фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран цианобактерий, подобраны более мягкие условия для выделения фотосистем.

Полученные в работе данные об ассоциации стрессовых свето-индуцируемых белков с мономерами и тримерами ФС1 и комплексом ФС2 предполагают универсальную роль этих белков в защите фотосинтетического аппарата от избыточного света. Исследование локализации стрессовых свето-индуцируемых белков имеет не только самостоятельный научный интерес, но и позволяет расширить представления о защитных функциях свето-индуцируемых Hli белков. Эти данные могут быть использованы для

изучения регуляции процессов фотосинтеза, определяющего продуктивность сельскохозяйственных растений.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Выводы, представленные в этой работе, полностью подтверждены экспериментальными данными. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Используемые методики исследования и проведенные расчеты корректны, полученные экспериментальные закономерности статистически достоверны.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. При оптимальных условиях освещения светоиндуцируемые HliA/HliB белки присутствуют в тилакоидных мембранах клеток дикого типа, а также мутантов *Synechocystis* без ФС2, без обеих фотосистем и не содержащих тримеры ФС1.
2. HliA/HliB белки ассоциированы не только с тримерами, но и с мономерами ФС1.
3. Отсутствие тримеров ФС1 у мутанта $\Delta psal$ не влияет на ассоциацию HliA/HliB белков с мономерами ФС1 и комплексом ФС2.
4. Частичный переход цианобактерий на гетеротрофное питание не влияет на световую индукцию HliA/HliB белков.
5. Светоиндуцируемые стрессовые белки HliA/HliB ассоциированы с основными хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран цианобактерий и играют универсальную роль в защите фотосистем.

Апробация работы

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 2 статьи в сборниках и 6 тезисов материалов конференций.

Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях и конкурсах: IV Съезд биофизиков России, Нижний Новгород, 2012; международная молодежная научно-практическая конференция «Биофизика биоэнергетических процессов», Звенигород, 2013; XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2013», Москва, 2013; International conference «The problem of the origin of life» and Youth scientific school «Molecular and cellular basis of the early evolution of life», Moscow, 2014; 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - Наука XXI века», Пущино, 2014; Seminar of ecology – 2015 with international participation, Sofia, 2015.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Свет является источником энергии, обеспечивающей рост растений, водорослей и цианобактерий за счет фотосинтеза. Однако свет обладает и неблагоприятным действием на фотосинтезирующие организмы. Избыточный свет, поглощенный фотосинтетическим аппаратом, стимулирует образование вредных для фототрофов активных форм кислорода (АФК), таких как супероксидные радикалы (O_2^-), гидроксильные радикалы (OH^-), пероксид водорода (H_2O_2) и синглетный кислород (1O_2) [Harari-Steinberg et al., 2001]. Поскольку растения должны быстро реагировать на изменяющиеся условия окружающей среды и часто экстремальные световые условия, в ходе эволюции у них выработались фотосенсорные сети сигнальных путей, которые позволяют им достичь оптимального фотосинтеза, сводя к минимуму вредное влияние избыточного света. У растений имеются сложные фоторецепторные системы, способные отслеживать световые условия и непрерывно приспосабливать к ним светозависимые физиологические процессы и развитие.

1.1. Фоторецепторы

Растения способны различать почти все характеристики света, включая направление, длину волны и продолжительность освещения, используя при этом три основных класса фоторецепторов, «узнающих» разные длины волн: поглощающие красный/дальний и красный свет фитохромы, поглощающие синий свет/УФ-А криптохромы и фототропины. Недавно идентифицирован рецептор УФ-В света (280-320 нм), белок UVR8 (UVB Resistance 8) [Holtan et al., 2011]. У *Arabidopsis* дополнительно к трем основным фоторецепторам (фитохромы, криптохромы и фототропины) недавно обнаружены фоторецепторы синего света: ZTL (ZEITLUPE), FKF1 (FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX) и LKP2 (LOV KELCH PROTEIN 2). Семейство белков ZTL/FKF1/LKP2 обладает уникальной комбинацией доменов:

абсорбирующий синий свет LOV-домен (light-oxygen-voltage), сходный с флавинсвязывающей областью фототропинов *Arabidopsis*, и домены, участвующие в протеосомной деградации белков, – F-box домен и kelch-повторы (широко распространенный мотив в белках про- и эукариот, впервые обнаруженный в kelch ORF1 белке дрозофилы. kelch мотив состоит из ~ 50 аминокислотных остатков и содержит 4 консервативных гидрофобных остатка, за которыми следуют два остатка глицина. Каждый kelch мотив образует четыре тяжа β -структуры, напоминающей «лезвие» пропеллера. В белках этот мотив встречается в виде повторов, образующих пропеллер, в котором отдельные «лезвия» расположены вокруг центральной оси). Предполагают, что семейство белков ZTL/FKF1/LKP2 участвует в регуляции суточных ритмов и фотопериодичности цветения, контролируя зависимую от синего света деградацию белков [Bae and Choi, 2008; Ito et al., 2012].

1.1.1. Фитохромы

Фитохромы представляют собой димерные белки, в типичных случаях состоящие из двух идентичных апобелков, ковалентно связанных с фитохромобилином – линейным тетрапиррольным билином, который служит хромофором и определяет способность того или иного фитохрома поглощать красный (666 нм) и дальний красный (730 нм) свет. Красный свет (666, 730 нм) вызывает структурные изменения фитохромобилина (обратимую фотоизомеризацию у двойной связи C15-C16) и обратимый переход фитохрома из биологически неактивной конформации (Pr форма) в биологически активную (Pfr форма). Таким образом, фитохромы действуют подобно «переключателям», которые включаются красным светом и выключаются дальним красным светом. Взаимопревращения Pr и Pfr, сопровождающиеся изменениями конформации белка, необходимы для передачи светового сигнала.

Число фитохромов у разных видов растений различно. У *Arabidopsis* обнаружены пять фитохромов (PhyA – PhyE), которые опосредуют ответные

реакции на красный и дальний красный свет. Среди них фитохром А (PhyA), в основном, ответствен за восприятие постоянного дальнего красного света, в то время как PhyB ответствен, в основном, за восприятие постоянного красного света [Bae and Choi, 2008]. У большинства видов растений фитохромы кодируются небольшим семейством генов. Фитохромы *Arabidopsis* кодируются 5 различными генами (*PhyA* - *PhyE*). Эти гены ответственны за регуляцию ответных реакций на красный свет, включая прорастание семян, фотоморфогенез проростков, избегание тени, цветение и многие другие адаптивные ответные реакции. Фитохромы локализованы в цитоплазме. Они являются протеинкиназами. У высших растений фитохромы имеют домен, сходный с гистидинкиназой, но гистидинкиназная активность у них не обнаружена. Фитохромы способны к автофосфорилированию по остаткам серина/треонина [Chory, 2010].

Синий свет с помощью фоторецепторов (криптохромов и фототропинов) регулирует у высших растений такие реакции, как движение хлоропластов, подавление элонгации гипокотилия, циркадный тайминг, экспрессия генов и открывание устьиц.

1.1.2. Криптохромы

В криптохромах хромофорными группами служат флаavin и птерин (или деазафлаavin). Светособирающим хромофором является птерин. Белки криптохромов родственны ДНК-фотолиазам – ферментам, которые участвуют в восстановлении повреждений ДНК, вызванных УФ-светом. Хотя криптохромы не могут непосредственно восстанавливать ДНК, первичные акты захвата света у них такие же, как у фотолиаз. Криптохромная фоторецепторная система локализована в ядре. Предполагают наличие светозависимого транспорта криптохромов через ядерную мембрану [Kleine et al., 2007]. Криптохромы контролируют биосинтез антоцианов и каротиноидов. От криптохромного сигнала зависит экспрессия генов халконсинтазы, халконизомеразы, дигидрофлавонолредуктазы и других ферментов биосинтеза антоцианов. Криптохромный сигнал тормозит рост

гипокотилля на свету, контролирует процессы деэтиоляции и устьичную проводимость [Kleine et al., 2007].

У *Arabidopsis* идентифицированы 4 основных фоторецептора синего света: два криптохрома (Cry1 и Cry2) и 2 фототропина (Phot1 и Phot2). Криптохром 1 (Cry1) – основной рецептор синего/УФ-А света, участвует в фотоморфогенезе и играет решающую роль в ответных реакциях *Arabidopsis* на свет высокой интенсивности, ведущий к окислительному повреждению. У *cry1*-мутантов *Arabidopsis* нарушается регуляция экспрессии многих генов, среди которых гены, кодирующие редокс-белки (At2g41480, At5g44440 и At1g75270), транскрипционные факторы (At1g75240, At2g33860 и At5g60450), ферменты фенилпропаноидного пути и белки, связанные с ответными реакциями на стресс (глутатионпероксидаза 7 – At4g31870; глутатион-S-трансферазы – At1g10370 и At1g02940; убихинонметилтрансфераза – At2g41040; фермент, участвующий в биосинтезе пиридоксина, PDX2 – At5g60540). В экспрессии генов транскрипционных факторов PAP1 и PAP2, связанных с биосинтезом флавоноидов, у *Arabidopsis* также принимает участие Cry1. Центральное место в криптохромном сигналинге занимает светозависимое расщепление конститутивного белка, участвующего в фотоморфогенезе (constitutive photomorphogenic 1, COP1). С-концевой домен Cry1 взаимодействует с белком COP1 (Е3 убиквитинлигазой), который участвует в светорегулируемом расщеплении транскрипционных факторов, таких как транскрипционный фактор с доменом типа «лейциновой молнии» HY5 (long hypocotyl 5), HYH (гомолог HY5), HFR1 (long hypocotyl in far-red) и LAF1 (long after far-red light 1). Вызванные светом конформационные изменения криптохромов, индуцируют структурную модификацию COP1, что приводит к освобождению HY5, связанного с COP1 в темноте. Сигнальная система Cry1-COP1-HY5, по всей видимости, участвует в индукции ответных реакций растений на свет высокой интенсивности [Kleine et al., 2007]. Фоторецептор Cry2 функционирует, в основном, при низких интенсивностях синего света.

В отличие от Cry1, Cry2 быстро разрушается под действием УФ-А, синего и зеленого света. На синем свете низкой интенсивности этот рецептор ингибирует элонгацию гипокотыля. Оба криптохромы – Cry1 и Cry2 – являются основными регуляторами ранних индуцируемых синим светом генов [Chory, 2010; Jarvi et al., 2007].

1.1.3. Фототропины

Фототропины Phot1 и Phot2 – мембранные рецепторы синего света. В проростках *Arabidopsis* оба фототропина контролируют фототропизм. В зрелых листьях *Arabidopsis* фототропины влияют на форму листьев, регулируют накопление хлоропластов и открывание устьиц. Хлоропластную реакцию избегания интенсивного света контролирует Phot2. Свет влияет на уровень экспрессии генов фототропинов. В проростках *Arabidopsis* экспрессия *phot1* подавляется, а экспрессия *phot2* активируется светом. В регуляции транскрипции фототропинов участвуют криптохромная и фитохромная рецепторные системы *Arabidopsis*. Основными фоторецепторами, которые регулируют транскрипцию *phot1*, являются Cry1 и PhyB. Экспрессия *phot2* зависит от обоих криптохромов и PhyA [Łabuz et al., 2012]. Фототропины идентифицированы у семенного растения *Arabidopsis thaliana*, папоротника *Adiantum capillus-veneris*, мха *Physcomitrella patens* и зеленой водоросли *Mougeotia scalaris* [Goh, 2009]. Две копии гена *phot1* (*phot1a* и *phot1b*) и одна копия гена *phot2* картированы в геноме риса.

Фототропины *Arabidopsis* имеют фотосенсорный N-конец, состоящий из двух LOV-доменов, которые встречаются в рецепторных белках, ответственных за фототропизм, хемотропизм и потенциал-зависимые мембранные процессы, и C-концевой серин/треонин киназный домен, относящийся к семейству AGC (цАМФ-зависимая протеинкиназа, цГМФ-зависимая протеинкиназа и фосфолипид-зависимая протеинкиназа С). В темноте LOV-домены нековалентно связываются с флавиномононуклеотидом (ФМН). Синий свет индуцирует ковалентное связывание хромофора ФМН с

консервативным остатком цистеина каждого из LOV-доменов. При этом изменяется конформация белка и киназная активность. Phot1 и Phot2 обладают разной фотосенсорной чувствительностью к синему свету. Это приводит к оптимизации фотосинтеза, что способствует росту растений в условиях низкой освещенности [Goh, 2009]. Phot1 (мол. масса 120 кДа), который является протеинкиназой, функционирует при различных интенсивностях синего света, в то время как Phot2 функционирует только на интенсивном синем свете. Этот рецептор играет основную роль в хлоропластной реакции избегания интенсивного света и вместе с Cry1 защищает растения от избыточного освещения [Kleine et al., 2007]. Предполагают, что в мембране фототропины образуют гетеродимер и нарушение функционирования одного из фототропинов приводит к нарушению фототропизма [Harari-Steinberg et al., 2001]. В отличие от криптохромов, фототропины играют вспомогательную роль в регуляции транскрипции чувствительных к синему свету генов. Только ограниченное число генов находится под их контролем. Фототропины опосредуют такие ответные реакции растений, как движение хлоропластов, фототропизм и открывание устьиц. Геном *Arabidopsis* кодирует также три Zeitlupe-подобных белка (Zeitlupe в переводе с немецкого языка означает замедленное действие). Этот термин впервые был использован при описании мутантных локусов растений с удлинённым суточным ритмом), которые являются рецепторами УФ-В света. Функция этих рецепторов отлична от других фоторецепторов: они «запускают» экспрессию специфических групп генов, которые не чувствительны к другим качественным характеристикам света, в том числе к УФ-А, что, вероятно, способствует адаптации растений к повреждающему действию УФ-В света [Peschke and Kretsch, 2011].

Фоторецепторы регулируют развитие растений на протяжении всего жизненного цикла. Они воспринимают световые сигналы и инициируют внутриклеточные сигнальные пути, включающие протеолитическое расщепление сигнальных компонентов и репрограммирование транскрипции.

Механизмы передачи светового сигнала фоторецепторами в деталях неизвестны. Наличие протеинкиназных доменов в фоторецепторных белках позволяет предполагать участие фосфорилирования в световом сигналинге. Показано участие криптохромов в опосредованном синим светом автофосфорилировании. Механизмы взаимоотношения различных фоторецепторов неизвестны, хотя есть данные о прямом физическом взаимодействии между ними и общими для них партнерами, локализованными в ядре или в цитоплазме. Так, партнерами PhyA являются транскрипционный фактор bHLH-типа PIF3, цитоплазматический фитохром-связывающий белок PKS1, нуклеозиддифосфаткиназа NDPK2. Партнером Cry2 является ядерный белок CIB1, который связывается с G-боксами в промоторах светорегулируемых генов [Chory, 2010]. Выяснение роли отдельных фоторецепторов в развитии растений представляет значительные трудности, в связи с тем, что некоторые фоторецепторы обладают синергичным действием, в то время как другие являются антагонистами. Совокупность имеющихся данных указывает на разнообразие и специфичность фоторецепторов у растений.

1.2. Световой сигналинг

«Декодирование» световых сигналов, воспринятых фоторецепторами, т.е. превращение их в биологические сигналы, осуществляется путем взаимодействия фоторецепторов с другими белками в цитозоле или в ядре. Так, известно более 20 белков, взаимодействующих с фитохромами [Bae and Choi, 2008]. Среди них идентифицированы белки FHY1 и FHL, стимулирующие транслокацию PhyA в ядро, регулятор ответа ARR4, который стабилизирует Pfr форму PhyB, репрессор фотоморфогенеза COP1, действующий как E3 убиквитинлигаза, фосфатаза 5 – PAPP5, которая дефосфорилирует Pfr форму PhyA и PhyB и др.

В общей форме механизм передачи световых сигналов, ведущий к репрограммированию экспрессии генов, можно представить следующим образом. Фоторецепторы связываются с негативными транскрипционными факторами типа «спираль-петля-спираль», такими как PIF3 и PIF5 (подобный PIF3), активируют убиквитилирование и тем самым способствуют расщеплению негативных транскрипционных факторов 26S протеасомами, которые действуют преимущественно на убиквитилированные белки. Фоторецепторы связываются также с белком COP1. COP1 – консервативный доменный белок, активность которого в растительных клетках коррелирует с его локализацией в цитоплазме (на свету) или в ядре (в темноте). Мишенями COP1 у растений служат позитивные транскрипционные факторы, такие как HY5, HYH, HFR1 и LAF1, а также фоторецепторы, включая фитохром А и криптохром. COP1 действует на позитивные светочувствительные транскрипционные факторы как E3 убиквитинлигаза, вызывая их убиквитин-зависимое протеасомное расщепление [Yi and Deng, 2005]. Предполагают, что COP1 действует в комплексе с другими белками [Bae and Choi, 2008]. В темноте E3 убиквитинлигаза играет ключевую роль в подавлении фотоморфогенетического развития растений. Свет ингибирует E3 убиквитинлигазную активность COP1. Однако каким образом фоторецепторы участвуют в подавлении активности COP1 неизвестно.

Доказано в опытах на дрожжах и *Arabidopsis*, что COP1 взаимодействует с Cry1, но этот процесс не зависит от света [Yi and Deng, 2005]. Светозависимый механизм, лежащий в основе подавления активности COP1 с участием криптохрома, неизвестен. Так как мишенями COP1 являются транскрипционные факторы, участвующие в фотоморфогенезе, такие как HY5, HYH, LAF1 и др., а также взаимодействующие с COP1 В-бок белки, такие как CONSTANS (CO), SALT TOLERANCE (STO) и его гомолог STN1, COP1 считают центральным звеном в передаче светового сигнала при развитии растений [Holtan et al., 2011]. Наряду с транскрипционными факторами в передаче светового сигнала участвуют также регуляторы транскрипции, такие как Sig5, субъединица сигма-фактора хлоропластной РНК-полимеразы, а также протеазы FtsH. У высших растений важную роль в передаче светового сигнала и функционировании сигнальных систем играют процессы фосфорилирования/дефосфорилирования белков. Однако в деталях молекулярные механизмы передачи сигнала остаются неизвестными [Muramatsu and Nihara, 2012; Jung et al., 2008; Юрина и др., 2012]. Световая энергия, поглощенная при фотосинтезе светособирающими антеннами, преобразуется в энергию химических связей реакционными центрами ФС1 и ФС2, в которых происходит первичное накопление световой энергии в форме лабильных соединений с высоким энергетическим потенциалом. В дальнейшем в ходе реакций фотосинтеза восстанавливается НАДФ, образуются АТФ, углеводы и другие стабильные органические соединения.

1.3. Фотоингибирование

В условиях светового стресса, когда избыточно поглощенная световая энергия не может быть использована в фотохимических реакциях, происходит фотоингибирование. Процесс сопровождается фотоокислением пигментов, деструкцией каротиноидов, обесцвечиванием хлорофиллов и разрушением структур хлоропластов [Adamska, 1997; Карапетян, 2007; Karapetyan, 2008; Kleine et al., 2007]. Интенсивный свет вызывает у растений значительные изменения в экспрессии многих генов, локализованных в разных компартментах клетки [Dunaeva and Adamska, 2001]. Клетки справляются с высокой интенсивностью света индукцией или репрессией генов. Так, установлено, что свет высокой интенсивности индуцирует экспрессию генов белков Elip, аскорбатпероксидазы (APX2), актина, металлотioneина, белка LEA (late embryogenesis abundant), белка RHL41 (responsive to high light) и др. Около 100 генов в геноме *Arabidopsis* активируются в условиях светового стресса, значительная часть которых (70%) активируется также засухой [Dunaeva and Adamska, 2001; Kimura et al., 2003; Estavillo et al., 2011]. Свет высокой интенсивности индуцирует экспрессию ряда транскрипционных факторов, в числе которых DREB2A (Drought Response Binding 2A) и ZAT10 (Zinc finger protein 10 of *Arabidopsis thaliana*) [Kimura et al., 2001]. Последний может регулировать до 18% транскриптома *Arabidopsis* [Kleine et al., 2007]. В то же время в этих условиях экспрессия многих генов, связанных с биосинтезом пигментов, подавляется [Muramatsu and Nihara, 2012]. Механизмы, с помощью которых воспринимается избыточное освещение, а также каким образом информация передается в ядро, чтобы инициировать генетически детерминированную ответную реакцию, неизвестны. Установлено, что с экспрессией генов фотосинтеза, локализованных в геномах хлоропластов и ядра, коррелируют редокс-состояние пула пластохинонов и изменения в концентрации АБК [Estavillo et al., 2011].

Интенсивный свет вызывает репрессию генов, кодирующих белки ФС1 и белки кислородвыделяющего комплекса ФС2. При интенсивном освещении повреждаются реакционные центры фотосистем. Наиболее чувствительным звеном фотосинтетического аппарата к действию высоких интенсивностей света является ФС2, в частности, белок реакционного центра этой фотосистемы D1. Хотя механизм фотоповреждения ФС2 недостаточно изучен, доказано, что поврежденный белок D1 быстро разрушается и заменяется новосинтезированным белком, чтобы поддержать стационарный уровень функциональной ФС2 [Muramatsu and Nihara, 2012]. У высших растений и водорослей основную роль в удалении поврежденного белка D1 играют локализованные в тилакоидных мембранах протеазы FtsH и ассоциированная с мембранами сериновая протеаза Deg. Ген *psbA*, кодирующий белок D1, локализован в геноме пластид, в типичных случаях в виде одной копии. Экспрессия гена индуцируется светом высокой интенсивности [Baena-González et al., 2001]. В восстановлении фотоповрежденных реакционных центров ФС2 участвует Sig5, субъединица сигма-фактора хлоропластной РНК-полимеразы. Уровень экспрессии гена *sigD5* зависит от редокс-состояния ЭТЦ. В тилакоидных мембранах пластид функционирует уникальная система фосфорилирования/дефосфорилирования белков, которая также участвует в восстановлении фотоповрежденных мембранных белков ФС2 и её светособирающей антенны [Kleine et al., 2007].

Избыточный свет, поглощенный фотосинтетическим аппаратом, вызывает образование активных форм кислорода (АФК), при этом нарушается баланс между образованием и удалением различных форм АФК (например, H_2O_2 и OH^-), что приводит к перекисному окислению белков, липидов и ферментов, необходимых для осуществления собственных функций хлоропластов и клетки в целом [Kudoh and Sonoike, 2002]. Действие вредных форм АФК усиливается неблагоприятными факторами окружающей среды, подавляющими фотосинтетическую активность. Для нормального

функционирования в условиях светового стресса у фотосинтезирующих организмов в ходе эволюции возникли многочисленные защитные механизмы, которые предотвращают или сводят к минимуму образование нежелательных форм АФК при фотосинтезе. К таким защитным механизмам относятся изменения в светособирающих антеннах и/или реакционных центрах фотосистем, диссипация избытка энергии возбуждения, синтез антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, каталазы и глутатион S-трансферазы/пероксидазы, неферментативные антиоксиданты – каротиноиды, токоферолы, антоцианины и флавоноиды, а также защитные белки [Dunaeva and Adamska, 2001; Wang et al., 2008]. С фотозащитными механизмами связаны также (прямо или косвенно) протеазы пластид, такие как FtsH, Deg и SPPA [Wetzel et al., 2009]. Неферментативные антиоксиданты – каротиноиды и ксантофиллы, при высокой интенсивности света принимают участие в диссипации энергии возбуждения, снижая образование $1O_2$ [Wang et al., 2008].

Показано, что основными путями защиты фотосинтетического аппарата от избыточного света являются:

- 1) нефотохимическое тушение энергии, происходящее с участием белков Lhc2 [Demmig-Adams, 1990; Horton et al., 1996; Niyogy, 1999; Horton and Ruban, 2005];
- 2) диссипация поглощенной энергии [Schlodder et al., 2001];
- 3) оптимизация фотосинтетической цепи переноса электронов, благодаря быстрой перестройке фотосинтетического аппарата [Biggins and Bruce, 1989; Allen, 1992; Mullineaux and Emplin-Jones, 2005] или при длительной адаптации, благодаря изменению соотношения ФС1 и ФС2 [Fujita, 1997; Большевцева и др., 2003];
- 4) диссипация энергии катион-радикалами реакционных центров ФС1 и ФС2 [Karapetyan et al., 1999, 2006; Bukhov et al., 2001, 2002];

5) биосинтез новых комплексов, взамен подвергшихся деструкции [Demmig-Adams et al., 2006; Sonoike, 2006];

б) биосинтез индуцируемых светом стрессовых белков, таких как белки Eip [Grimm et al., 1989; Юрина и др., 2006] и Hli белки [Dolganov et al., 1995; Funk and Vermaas, 1999].

Важная роль среди защитных механизмов принадлежит именно защитным белкам. К таким белкам относят широко распространенное среди растений семейство ранних светоиндуцируемых белков Eip, коротко живущих белков тилакоидных мембран, которые экспрессируются в первые часы позеленения этиолированных проростков. Транскрипты Eip и соответствующие белки появляются значительно раньше, чем транскрипты и белки других светоиндуцируемых генов, на ранних стадиях деэтиоляции и исчезают до окончания развития хлоропластов [Kruse and Kloppstech, 1992; Harari-Steinberg et al., 2001]. Во взрослых зеленых растениях белки Eip отсутствуют. Белки Eip накапливаются в тилакоидных мембранах только в ответ на различные абиотические стрессы (световой и холодной стресс, высокая соленость почвы, УФ-В радиация, обезвоживание и др.), когда подавлена экспрессия хлорофилл *a/b*-связывающих белков (Cab), которые постоянно экспрессируются в тилакоидах [Wetzel et al., 2009; Montané and Kloppstech, 2000; Heddad et al., 2006; Rossini et al., 2006]. На этом основании предполагают, что белки Eip выполняют защитную функцию, которая может заключаться в связывании свободного хлорофилла, что предотвращает образование АФК и фотоокислительные повреждения компонентов клеток, или в связывании пигментов ксантофилльного цикла, что приводит к нефотохимической диссипации избытка поглощенной световой энергии [Muramatsu and Nihara, 2012; Montané and Kloppstech, 2000; Rossini et al., 2006; Casazza et al., 2005].

1.4. Мультигенное семейство белков светособирающих комплексов

Водоросли и растения обладают встроенными в мембраны светособирающими комплексами (Lhcs), которые собирают энергию фотонов и передают ее преимущественно к ФС2 для выделения кислорода, но есть также отдельные группы Lhcs, связанные с ФС1 [Boekema et al., 1995; Ven-Shem et al., 2003; Qin et al., 2015]. Все известные Lhcs содержат три трансмембранные α -спирали и связывают хлорофилл *a*, другие молекулы хлорофилла (*b* или *c*), каротиноиды и липиды [Kuhlbrandt et al., 1994; Liu et al., 2004]. Состав пигмента зависит от видов, изменчивость существует даже среди Lhc комплексов из одного организма [Pan et al., 2011]. Тем не менее, связывающий мотив для хлорофилла *a* высоко консервативен и часто встречается даже за пределами семейства Lhc. В итоге это привело к признанию более широкого семейства хлорофилл-*a/b*-связывающих (Cab) белков, которые вероятнее всего произошли от общего предка и независимо от "истинных" Lhc включают одну, две, три и четыре спирали Lhc-подобных белков [Jansson, 1999; Heddad et al., 2012]. Роль этих белков, как правило, мало изучена. Вероятно, они играют важную роль в фотозащите.

Elip и Elip-подобные белки (Ohr/Hlip, Ser) относятся к большой группе белков светового стресса и входят в состав мультигенного суперсемейства белков светособирающих комплексов (Lhc). Все члены этого мультигенного семейства содержат консервативный Lhc-мотив, являющийся частью трансмембранной альфа-спирали, локализованной в тилакоидной мембране [Teramoto et al., 2004].

Кроме Elip, к этому суперсемейству относятся также семейства белков Cab и Cab-подобных белков, субъединицы S ФС2 (PsbS) и недавно описанное семейство белков красных водорослей, подобных хлорофилл *a/b*-связывающим белкам, – RedCAP [Engelken et al., 2010]. К мультигенному семейству относят также феррохелатазу II, изоформу феррохелатазы, фермента, участвующего в биосинтезе порфиринов. Феррохелатаза II *Arabidopsis* имеет С-концевой домен, Lhc-мотив, обладающий значительным

сходством с трансмембранными спиралями Cab белков. Гомологичный Cab белкам C-концевой домен обнаружен также в феррохелатазе II *Synechocystis*. Происхождение этого домена у феррохелатаз II неизвестно [Teramoto et al., 2004]. По имеющимся данным Hlr и феррохелатаза выполняют различные функции, по крайней мере, в условиях интенсивного освещения [Jansson et al., 2000; Wang et al., 2008].

Белки семейства Eip близкородственны Cab белкам, которые также имеют три трансмембранных спирали. Сравнение аминокислотных последовательностей Eip и Cab белков показало, что Eip содержат, по крайней мере, 4 консервативных остатка, которые участвуют в связывании хлорофилла *a* в Cab белках. Однако у белков Eip взаимодействие между белками и хлорофиллом *a* значительно слабее, чем у белков Cab [Adamska, 1997]. Семейство Cab состоит из 12-14 собственно Cab белков и небольшого числа родственных белков. Белки Cab, называемые также Lhc белками, являются основными светособирающими хлорофилл *a/b*-связывающими белками высших растений. Поглощение света светособирающей антенной системой – самое раннее событие фотосинтеза [Teramoto et al., 2004]. Абсорбированная световая энергия распределяется между ФС1 и ФС2 путем изменения «переходных состояний» (state transitions) и избыток световой энергии рассеивается в виде тепла, чтобы избежать перевозбуждения реакционных центров. Уровень светособирающих антенных белков зависит от интенсивности света и регулируется на уровне транскрипции и/или трансляции их генов [Teramoto et al., 2004]. Когда растения или цианобактерии растут в условиях, при которых лимитирующим фактором является свет, большая часть белков, синтезирующихся в клетке, является светособирающими белками [Jansson et al., 2000].

Цианобактерии и красные водоросли имеют водорастворимый светособирающий комплекс – фикобилисомы, в которых фикобилины (фикоцианин, аллофикоцианин, фикоэритрин и др.) связаны с полипептидами антенн ковалентными связями. У высших растений и

зеленых водорослей периферическая антенна состоит из нескольких (10-13) гомологичных светособирающих хлорофилл *a/b*-связывающих белков, которые кроме хлорофилла *a* и хлорофилла *b* связывают каротиноиды – светособирающие пигменты, также участвующие в диссипации энергии при избыточном освещении [Teramoto et al., 2004; Klimmek et al., 2006; Umate, 2010]. Cab белки высших растений кодируются ядерными генами *Lhc*, синтезируются в виде предшественников в цитозоле и поступают в хлоропласты. Транзитный пептид отщепляется в строме хлоропластов и зрелый белок встраивается в тилакоидную мембрану. Cab белки содержат три трансмембранных спирали. Также, они содержат консервативный *Lhc*-мотив [Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007]. Трехмерная структура преобладающего белка Cab (*CabII*) свидетельствует о том, что три трансмембранных альфа-домена погружены в липидные бислои тилакоидных мембран [Teramoto et al., 2004]. Молекулярная масса Cab белков 20-24 кДа. Гены *Lhca* кодируют Cab белки, связанные с ФС1, гены *Lhcb* – с ФС2. Десять основных типов Cab белков (*Lhca1* – *Lhca4* и *Lhcb1* – *Lhcb6*) экспрессируются интенсивно, три дополнительных типа этих белков (*Lhca5*, *Lhca6*, *Lhcb4.3*) экспрессируются слабо или вообще не экспрессируются [Jansson et al., 1992; Klimmek et al., 2006]. Все Cab белки являются компонентами антенных комплексов реакционных центров фотосистем, состоящих из белковых субъединиц, кодируемых геномами ядра и хлоропластов. Каким образом достигается согласованная экспрессия различных белковых компонентов и сохраняется необходимый баланс белков, неизвестно. Предполагают, что редокс-состояние хлоропластов индуцирует ретроградные сигналы, поступающие из хлоропластов в ядро, изменяя экспрессию генов белков Cab [Klimmek et al., 2006; Юрина и Одинцова, 2007; Yurina and Odintsova, 2011].

Cab белки были предметом многих исследований, выяснявших их структуру, способность связывать хромофоры, участие в переносе энергии между фотосистемами, а также в сборке мультимерных комплексов

(LHCI/LHCII) и фотосистем [Klimmek et al., 2006]. Появление антенных белков фотосинтеза, состоящих из светособирающих хлорофилл *a/b*-связывающих белков нового типа явилось важной ступенью эволюции. Все высшие растения и зеленые водоросли, а также ряд других типов водорослей имеют такой тип организации антенной системы [Jansson et al., 2000]. По сравнению с фикобилисомами, не обладающими функцией диссипации энергии, Cab белки являются значительно более совершенными светособирающими белками. Они выполняют двойную функцию, осуществляя диссипацию энергии и перенос энергии между фотосистемами. Экспрессия генов, кодирующих белки Cab, регулируется в первую очередь интенсивностью и качеством света на транскрипционном уровне, а уровни мРНК белков Cab подвержены четким циркадным колебаниям. Гены *Lhc* наиболее интенсивно экспрессируются тогда, когда светосборка ограничивает рост растений, то есть, при свете низкой интенсивности. Уровень экспрессии генов *Lhc* очень высок в листьях и низок (или вообще отсутствует) в незеленых тканях. Так как потребность в эффективной светосборке ниже в условиях высокой интенсивности света, экспрессия генов *Lhc* в этих условиях подавляется.

Предполагают, что Cab белки высших растений возникли в эволюции из предсуществующих белков со сходными свойствами. Так как Cab белки красных водорослей связаны с ФС1, возможно, что Cab белки высших растений также возникли как хлорофилл *a/b*-связывающие белки, ассоциированные с ФС1 [Jansson et al., 2000]. Наиболее вероятными предками Cab белков считают цианобактериальные белки H1p [Jansson et al., 2000].

Таким образом, в мультигенное семейство ССК (светособирающих комплексов) входят многочисленные белки, содержащие от одной до четырех трансмембранных спиралей, обладающие различными функциями. У *Arabidopsis* идентифицировано 30 генов, кодирующих белки мультигенного семейства Lhc. В геноме тополя -39 [Kilian et al., 2008]. Так

как геномы *Arabidopsis* и тополя сходны, у большинства генов *Arabidopsis* есть ортологи в геноме тополя.

Несмотря на значительное сходство геномов *Arabidopsis* и тополя, между ними существуют различия. Так, некоторые белки кодируются одним геном у *Arabidopsis* (Lhca1, Lhca2, Lhcb3, Lhcb6, SEP1, SEP2 и OHP2), в то время как у тополя они кодируются двумя очень сходными с *Arabidopsis* генами. Белки L1p кодируются двумя генами у *Arabidopsis* и тремя генами у тополя, белок Lhcb1 кодируется пятью генами у *Arabidopsis* и четырьмя генами у тополя и т.д. [Kilian et al., 2008].

1.5. Эволюция семейства белков LHC

Эволюция этого сложного мультигенного семейства остается неясной. Предлагались различные схемы возможного происхождения белков суперсемейства Lhc. В большинстве из них постулировалось прямое происхождение этих белков от цианобактериальных Hcp путем ряда слияний и делеций генов [Heddad and Adamska, 2002]. Согласно одной из схем, в процессе эволюции из Hcp образовались дуспиральные белки, от которых путем внутренней дупликации генов произошли четырехспиральные белки, подобные PsbS (рис. 1.1). Четвертая трансмембранная спираль была утрачена и возникли трехспиральные белки типа Elip и Cab белков высших растений.

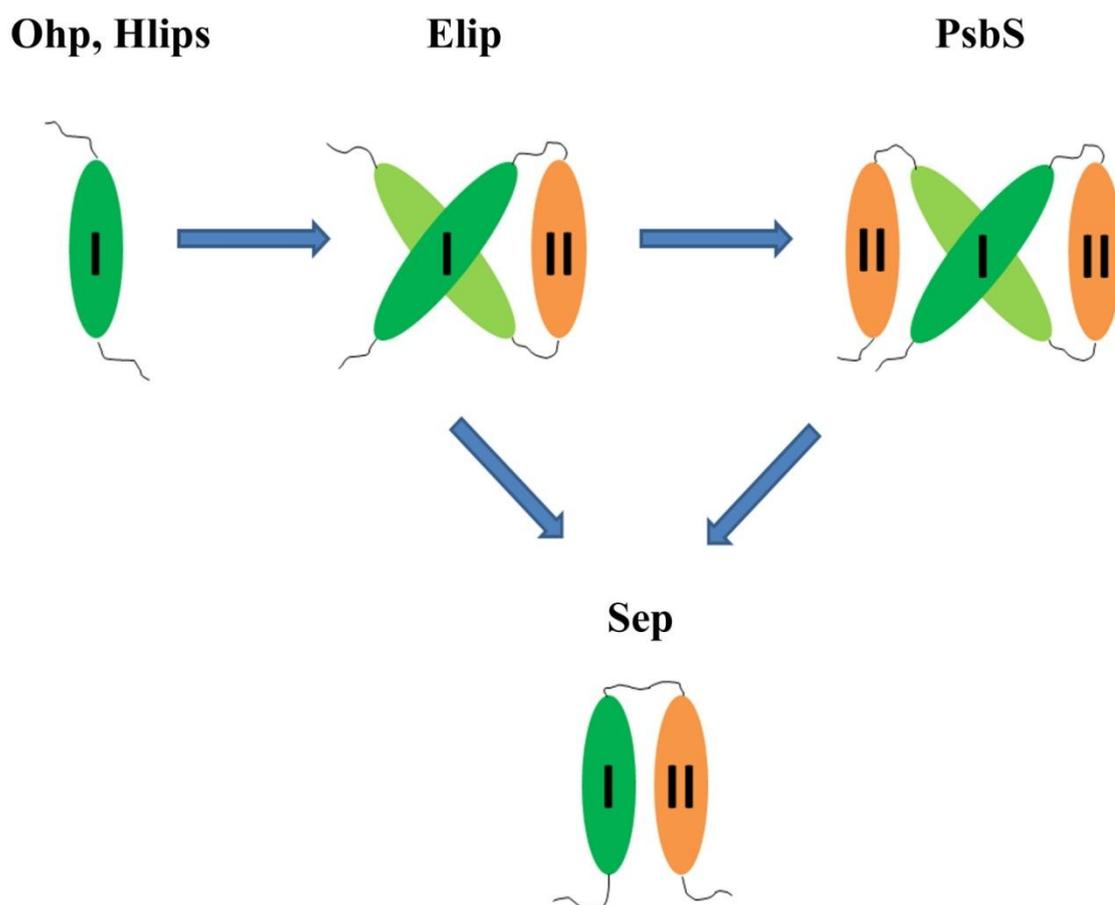


Рис. 1.1. Эволюция семейства белков LHC. Консервативные трансмембранные спирали - темно-зеленые и светлозеленые, полиморфные спирали – оранжевые [Sturm et al., 2013].

Доказательством того, что в эволюции белков мультигенного семейства ССК имела место внутренняя дупликация генов, служит значительное сходство I-ой и III-ей трансмембранных спиралей белков *Elip*, *Cab* и *PsbS* [Adamska, 2001]. Высказывалось также предположение, что предком белков суперсемейства ССК мог быть четырехспиральный интермедиат, сходный с *PsbS*. Поиск *Cab*-подобных последовательностей в секвенированных геномах 12 фотосинтезирующих эукариот, относящихся к разным систематическим группам, позволил создать новую гипотезу эволюции белков суперсемейства ССК [Engelken et al., 2010]. Были изучены глаукофиты *Cyanophora* и *Glaucocystis*, красные водоросли и диатомеи *Galdieria*, *Cyanidioschyzon*, *Phaeodactylum* и *Thalassiosira*, зеленые водоросли *Chlamydomonas* и *Ostreococcus*, высшие растения *Physcomitrella*, *Pinus*, *Arabidopsis* и *Oryza*, а также цианобактерии *Gloeobacter*, *Anabaena* и *Synechocystis*. Новизна предложенной модели состоит в том, что предполагается независимое происхождение семейств *PsbS* и *Cab* белков от цианобактериальных *Hip* путем двух независимых внутренних дупликаций генов [Engelken et al., 2010]. Весьма вероятно, что промежуточным звеном при эволюции древних *Hip* к их трехспиральным, подобным *Cab* белкам, и четырехспиральным, подобным *PsbS*, потомкам, являлись двуспиральные белки *Sep*. Это предположение подтверждается широким распространением *Sep* среди фотосинтезирующих эукариот, их отсутствием у цианобактерий, наличием консервативных хлорофилл-связывающих мотивов и консервативной вторичной структурой этих белков. *Sep*, подобно *Ohr*, обнаружены у красных водорослей и глаукофитов, что указывает на их раннее происхождение в эволюции. Эти белки могут быть важным ранее отсутствовавшим звеном в эволюции белков суперсемейства *Lhc*. *Elip*, по всей видимости, не являются предками ни *PsbS*, ни *Cab* белков и, возможно, возникли у фотосинтезирующих эукариот независимо [Engelken et al., 2010]. Все члены мультигенного семейства белков *Lhc* характеризуются высокими уровнями экспрессии при различных стрессовых условиях. Это может

означать, что у них не только общий путь эволюции, но имеется и определенное функциональное сходство, возможно связанное с защитой от стресса [Wang et al., 2008].

1.6. Классификация белков семейства САВ

Фотосинтезирующие эукариоты содержат Lhc-подобные белки, которые не участвуют в светосборке, они имеют другие функции. К семейству Cab-подобных белков относят четыре группы белков, которые различаются по числу трансмембранных альфа-спиралей: односпиральные Ohr (one helix protein) [Jansson et al., 2000]; двуспиральные Scp или Lil (stress-enhanced protein или light-harvesting-like proteins) и трехспиральные Elip (early light-inducible proteins) [Muramatsu and Hihara, 2012; Adamska, 2001; Andersson et al., 2003] и четырехспиральные (PsbS-подобные) белки [Heddad and Adamska, 2002]. Функции большинства белков семейства неизвестны. Предполагают, что эти белки участвуют не только в светосборке, но и в других, связанных с пигментами, процессах [Adamska, 1997; Rizza et al., 2011].

1.6.1. Белки, содержащие одну трансмембранную спираль

Односпиральные белки Ohr, которые у высших растений называют также малыми Cab-подобными белками Scp (small Cab-like protein) [Adamska, 2001], а у цианобактерий белками, индуцированными светом высокой интенсивности, Hlip (high light-inducible protein) [Dolganov et al., 1995], содержат единственную консервативную трансмембранную спираль, которая расположена почти перпендикулярно тилакоидной мембране.

Функция Ohr в растениях и водорослях неясна. В геноме *Arabidopsis* и других фотосинтезирующих эукариот представлены две группы *ohp* генов: *ohp1* и *ohp2*. Белки Ohr1 распространены повсеместно в фотосинтезирующих эукариотах, но отсутствуют в цианобактериях [Engelken et al., 2010]. Это кодируемый ядром интегральный белок тилакоидных мембран, молекулярная масса которого составляет 7 кДа. Ohr2 индуцируется сильным светом, но не другими стрессами, и, в отличие от Hlips и Ohr1, обладает коротким С-концевым гидрофобным элементом, который может быть встроен в тилакоидную мембрану [Engelken et al., 2010] и содержит 69 аминокислот. Ohr2 белок был найден в ассоциации с ФС1, фракция которой

была получена центрифугированием в градиенте сахарозы [Andersson et al., 2003]. Однако, локализация Oph2 в ФС1 до конца не ясна и нуждается в дальнейшем изучении.

Гены Hli белков первоначально были идентифицированы у цианобактерии *Synechococcus* PCC 7942 [Dolganov et al., 1995]. Гены аналогичных белков были обнаружены в геномах *Synechocystis* PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120, геноме цианелл *Cyanophora paradoxa* и геномах хлоропластов красных водорослей *Cyanidium caldarium* и *Porphyra purpurea* [Jansson et al. 2000]. В геноме *Synechocystis* PCC 6803 идентифицированы 4 гена *hli* (*hliA-hliD*) [Heddad et al., 2006]. Все гены *hli*, обозначаемые также как гены *scp*, индуцируются светом высокой интенсивности. Содержание Hli белков у *Synechocystis* PCC 6803 увеличивается в стрессовых условиях: при высокой интенсивности света, низкой температуре и дефиците питательных веществ [Wang et al., 2008; Chankova et al., 2014]. Показано, что на экспрессию гена *hliA* *Synechococcus* особенно влияет освещение синим или УФ светом. Регуляция экспрессии генов гомологичных белков у других цианобактерий и красных водорослей не изучена. Hlip – мембранные белки. Они связывают пигменты и, по-видимому, образуют димеры в тилакоидных мембранах [Jansson et al., 2000]. Hli белки *Synechocystis* PCC 6803 обладают значительным сходством со светособирающими хлорофилл *a/b*-связывающими белками растений и, по-видимому, являются их эволюционными предшественниками [Kilian et al., 2008; Юрина и др., 2013]. По аминокислотной последовательности они сходны также с С-концом феррохелатазы цианобактерий и пластид высших растений [Muramatsu and Nihara, 2012]. Точные функции Hli белков неизвестны.

Для цианобактериальных Hlip характерно наличие в середине единственной трансмембранной спирали домена, состоящего из 13 аминокислот, последовательность которого идентична у подавляющего большинства исследованных Hlip. Белок Oph2 *Arabidopsis* содержит 10 аминокислот этого домена, белки Elip и PsbS - 9, а белок Lhcb1,

светособирающий хлорофилл *a/b*-связывающий белок ФС2, – 4 [Jansson et al., 2000]. Так как общепризнано, что хлоропласты высших растений произошли от цианобактерий, захваченных примитивной эукариотической клеткой, большая часть генов которых в процессе эволюции была перенесена в ядро растительной клетки-хозяина, белок *Oph2 Arabidopsis* можно считать древнейшим белком фотосинтетического аппарата [Jansson et al., 2000].

1.6.2. Белки, содержащие две трансмембранные спирали

Двуспиральные белки *Sep* – белки, экспрессия которых усиливается при световом стрессе [Heddad and Adamska, 2000], содержат консервативную и полиморфную трансмембранные спирали, расположенные перпендикулярно тилакоидной мембране.

Два трансмембранных белка *Lil3* были идентифицированы в *Arabidopsis* в ассоциации с последним ферментом пути биосинтеза хлорофилла – геранил-гераниол-редуктазой [Tanaka et al., 2010], который редуцирует геранил-гераниол до фитола. Эта реакция может происходить либо до фитола и прилагается к хлорофиллиду, либо происходит после формирования геранил-геранил-хлорофилла [Tanaka et al., 2010]. Белки *Lil* не индуцируются при увеличении освещения и, таким образом, они вероятно не участвуют непосредственно в фотозащите. Мутант, дефицитный по *Lil3*, является, однако, хлоротичным и растет медленно из-за дестабилизации фермента геранил-гераниол-редуктазы, и как следствие происходит снижение доступности фитола и токоферрола [Tanaka et al., 2010]. Стабильность геранил-гераниол-редуктазы в *lil*-мутанте нарушена даже при низкой интенсивности света, которая напоминает постоянное понижение геранил-гераниол-редуктазы в мутанте *Synechocystis*, не содержащем HliD [Chidgey et al., 2014]. Следующее исследование группы Tanaka продемонстрировало, что геранил-гераниол-редуктаза может быть стабилизирована заякориванием этого фермента в мембране, даже в отсутствие *Lil3* [Takahashi et al., 2014]. Так как авторы не обнаружили пигменты на очищенных белках *Lil3*, они предположили, что функцией этих белков является так называемый «щит и

якорь» геранил-гераниол-редуктазы в мембранном домене. Однако белки L1l3 содержат консервативный хлорофилл-связывающий фрагмент и могут связывать синтезированный хлорофилл в фотоморфогенезе [Reisinger et al., 2008]. Геранил-гераниол-редуктаза взаимодействует с хлорофилл-синтазой для фитолиза хлорофилла [Rudiger et al., 2005], таким образом, вопрос о том, может ли L1l3 связывать пигменты и гасить адсорбцию энергии подобно HliD/HliC остается открытым. Совсем недавно Mork-Jansson [Mork-Jansson et al., 2015] идентифицировал L1l3 в пигмент-содержащих комплексах с последними ферментами пути синтеза хлорофилла, белком D2 и антенной Psb29, он предполагает защитную роль L1l3 в хлорофилл-белковом биосинтезе, похожем на цианобактериальные Hlips.

1.6.3. Белки, содержащие три трансмембранные спирали

Трехспиральные белки содержат две спирали (I и III), расположенные под углом 56° друг к другу, и короткую спираль II, почти перпендикулярную тилакоидной мембране [Green and Kühlbrandt, 1995]. Спирали I и III содержат консервативный хлорофилл-связывающий мотив (Lhc-мотив), состоящий примерно из 25 аминокислотных остатков, и очень сходны с соответствующими участками Cab белков, образующих периферическую светособирающую антенную систему ФС1 и ФС2 [Heddad and Adamska, 2000; Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007].

Elip являются интегральными белками тилакоидных мембран, широко распространенными у эукариотических фотосинтезирующих организмов. Именно эти белки хорошо охарактеризованы в растениях. Их экспрессия поразительно похожа на экспрессию Hlips.

Выделение Elip в нативной форме и анализ связанных с этими белками пигментов показали, что Elip могут связывать каротиноиды, хлорофилл *a* и лютеин [Harari-Steinberg et al., 2001; Adamska et al., 1999]. Неизвестно, связывают ли Elip также хлорофилл *b*. Наличие Elip-подобных белков у цианобактерий и красных водорослей, которые не содержат хлорофилла *b*,

указывает на то, что стабильность Elip может обеспечиваться одним хлорофиллом *a* [Adamska, 1997].

У высших растений и зеленых водорослей (*Chlamydomonas reinhardtii*) Elip кодируются геном ядра, синтезируются на цитоплазматических рибосомах и в виде предшественников поступают в хлоропласты, где подвергаются процессингу, протекающему с участием пептидазы стромы [Kruse and Kloppstech, 1992]. Зрелые формы Elip локализованы в тилакоидных мембранах, при этом N-конец молекул белка направлен в сторону стромы, а C-конец – в сторону люмена органелл. Скорость встраивания Elip в тилакоидные мембраны не зависит от температуры и регулируется скоростью процессинга этих белков [Adamska, 1997]. У красных водорослей (*Cyanidium caldarium* и *Porphyra purpurea*) Elip кодируются геномами пластид, у цианобактерий (*Cyanophora paradoxa* и *Synechococcus sp.*) – геномами цианелл [Dolganov et al., 1995]. Гены *Elip* секвенированы и клонированы у многих видов растений (гороха, ячменя, бобов, табака, шпината, томатов, тополя), включая модельные растения *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa* [Adamska, 1997; Kimura et al., 2001; Bruno and Wetzel, 2004; Klimmek et al., 2006; Umate, 2010]. У гороха и табака геномы содержат один ген *Elip*. У ячменя и аробидопсиса – два гена, кодирующих белки Elip1 и Elip2, которые несколько различаются по молекулярной массе и имеют 81,05% идентичных аминокислотных последовательностей. Геном тополя, сходный с геномом *Arabidopsis*, содержит три гена *Elip* [Klimmek et al., 2006]. В ядерном геноме риса обнаружены 6 локусов генов, кодирующих *Elip*: *Elip1-Elip6* [Umate, 2010].

Молекулярные массы предшественников Elip1 (At3g22840) и Elip2 (At4g14690) у *Arabidopsis* составляют, соответственно, 25.5 кДа и 21.5 кДа, молекулярные массы зрелых белков – 19.5 кДа и 16 кДа [Heddad and Adamska, 2000]. Экспрессия генов обоих белков индуцируется в различных стрессовых условиях, как результат избыточного воздействия [Adamska and Kloppstech, 1994; Montane et al., 1997; Heddad and Adamska, 2000]. Красный,

дальний красный и синий свет позитивно регулируют экспрессию генов *Elip1* и *Elip2*. В световом сигналинге участвуют PhyA и PhyB. Однако криптохромы и фототропины, по всей видимости, не нужны для индукции синим светом экспрессии генов обоих белков Elip. Возможно, что экспрессия генов Elip регулируется иным, неидентифицированным рецептором синего света [Adamska et al., 1992]. У *Arabidopsis* свет высокой интенсивности изменяет экспрессию около 700 генов, включая *APX2* и *Elip2* [Harari-Steinberg et al., 2001; Kimura et al., 2003]. Тепловой шок позитивно контролирует экспрессию генов *Elip1* и *Elip2*, но его действие не зависит от света [Harari-Steinberg et al., 2001]. Предполагают, что определенную роль в регуляции экспрессии генов Elip может играть редокс-состояние компонентов ЭТЦ. Активация светом высокой интенсивности промотора Elip у *Arabidopsis* подавлялась DCMU (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина), что ингибирует восстановление пула пластохинонов, и стимулировалась DBMIB (2,5-дибром-3-метил-6-изопропил-парабензохинон), что ингибирует окисление пула пластохинонов [Kimura et al., 2003].

На экспрессию генов *Elip* влияют также другие факторы, включая качество света, стадию развития клеток и температуру [Adamska, 1997]. Важную роль в регуляции экспрессии генов *Elip* играют фитогормоны. Цитокинины, стимулирующие рост растений, негативно влияют на экспрессию генов *Elip* и снижают образование белков Elip на 50% при световом стрессе [Pötter and Kloppstech, 1993]. Абсцизовая кислота, ингибирующая рост растений в условиях светового стресса, стимулирует экспрессию генов *Elip* [Umate, 2010; Heddad and Adamska, 2000; Adamska et al., 1992]. Несмотря на сходный механизм действия, АБК и метилжасмонат оказывают на экспрессию генов *Elip* противоположное действие, в то время как метилжасмонат и цитокинины, антагонисты метилжасмоната, действуют сходным образом [Wierstra and Kloppstech, 2000]. Механизмы регуляции экспрессии *Elip1* и *Elip2* различны. Транскрипционный фактор Nu5,

непосредственно участвующий в экспрессии генов светоиндуцируемых белков, активирует световую индукцию *Elip1*, но не *Elip2*. В проростках *Arabidopsis* экспрессия *Elip1* строго зависит от света, а транскрипты *Elip2* образуются и в темноте [Casazza et al., 2005]. Накопление транскриптов и белков *Elip1* увеличивается почти линейно с увеличением интенсивности света и коррелирует со степенью фотоинактивации и фотоповреждения реакционных центров ФС2, деградацией белка D1 и изменениями уровня пигментов. Накопление транскриптов *Elip2* наблюдается при фотоповреждении 40% реакционных центров ФС2. Экспрессия гена *Elip1* намного более чувствительна, чем экспрессия гена *Elip2*, к увеличению интенсивности света при комнатной температуре, в то время как экспрессия гена *Elip2* увеличивается при 4°C даже при низкой интенсивности освещения [Casazza et al., 2005; Rossini et al., 2006].

Гены *Elip1* интенсивно экспрессируются в набухших семенах, в то время как в прорастающих зародышах наблюдается интенсивная экспрессия двух генов *Elip* (*Elip1* и *Elip2*). Это позволяет предполагать, что у белков *Elip1* и *Elip2* разные физиологические функции [Heddad et al., 2006; Rizza et al., 2011; Осипенкова и др., 2010]. Конститутивная экспрессия *Elip2* в листьях *Arabidopsis* значительно снижает содержание хлорофилла в хлоропластах и вызывает также снижение уровня всех пигментов, но не изменяет состав, организацию и функционирование фотосистем [Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007].

Показано, что *Elip2* действует на 2 важные стадии биосинтеза хлорофилла: подавляет синтез 5-аминолевулиновой кислоты и активность Mg-хелатазы. На активность феррохелатазы и синтез гема *Elip2* не влияет. Освещение листьев *Arabidopsis* светом высокой интенсивности активирует экспрессию *Elip2* более чем в 3 раза [Kimura et al., 2003]. При суперэкспрессии *Elip2* содержание ряда предшественников хлорофилла (от протопорфирина IX до протохлорофиллида) сильно снижается [Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007]. Тот факт, что *Elip2* не влияет на состав, организацию

и функционирование фотосистем, предполагает, что физиологическая функция этих белков связана с регуляцией содержания хлорофилла в тилакоидах. Подавляя синтез хлорофилла, *Elip* предотвращают накопление свободного хлорофилла и, следовательно, окислительный стресс [Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007]. Однако у двойных мутантов *Arabidopsis* (*Elip1/Elip2*) незначительно понижено содержание хлорофилла. Это означает, что инактивация обоих генов *Elip* существенно не влияет на предотвращение окислительного стресса и защиту от фотоингибирования и ставит под сомнение фотопротекторную функцию этих белков [Casazza et al., 2005; Rossini et al., 2006].

Сообщалось, что гены *Elip* участвуют в опосредованном PhyB сигнальном пути, ведущем к прорастанию семян томатов [Auge et al., 2009]. Благодаря наличию Pfr, семена томатов могут прорасти в темноте. Продолжительное освещение семян дальним красным светом подавляет этот процесс за счет превращения Pfr в Pr. Полногеномный анализ транскриптома семян томатов показал, что единственный у томатов ген *Elip* активируется дальним красным светом и ингибируется красным светом. Гены *Elip* участвуют также в прорастании семян *Arabidopsis*. Они функционируют после транскрипционного фактора DAG1, относящегося к Dof семейству транскрипционных факторов, широко распространенному в растительном царстве, участвующему в регуляции жизненно важных для растений процессов. Однако *Elip* не являются прямыми мишенями DAG1. Молекулярные механизмы опосредованной DAG1 экспрессии генов *Elip* неизвестны [Rizza et al., 2011].

Мутации генов *Elip1* и *Elip2* противоположным образом влияют на прорастание семян *Arabidopsis*. Мутации генов *Elip1* замедляют прорастание, а мутации генов *Elip2* значительно (до трех раз) ускоряют прорастание по сравнению с семенами растений дикого типа. Получены данные, свидетельствующие о различной регуляции светом экспрессии генов *Elip* в

семенах. Предполагают, что регуляция содержания *Elip2* осуществляется через *PhyA*, в то время как регуляция *Elip1* через *PhyB* [Rizza et al., 2011].

На модельном растении *Tortula ruralis*, используемом при исследовании стресса, связанного с дефицитом воды, обнаружено, что экспрессия двух генов *Elip* (*Elip1* и *Elip2*) регулируется различными абиотическими стрессами, такими как медленное обезвоживание, быстрое обезвоживание/регидратация, солевой стресс, действие АБК и интенсивное освещение [Rizza et al., 2011].

1.6.4. Белки, содержащие четыре трансмембранные спирали

Среди семейств, относящихся к мультигенному суперсемейству *Cab*, только члены семейства *PsbS* являются четырехспиральными белками, у которых консервативные спирали I и III расположены под углом 56° друг к другу, а спирали II и IV почти перпендикулярны тилакоидной мембране [Funk et al., 1995]. Дополнительная спираль, гомологичная спирали II *Cab* белков, находится на N-конце белковых молекул. *PsbS* – структурный компонент (субъединица) ФС2. Доказано, что этот белок участвует в процессах, связанных с толерантностью растений к стрессам, а именно, в нефотохимическом тушении [Kilian et al., 2008]. У *Arabidopsis* идентифицирован один локус (AT1G44575), кодирующий *PsbS*, у риса – два локуса (LOC_Os01g64960 и LOC_Os04g59440), кодирующих *PsbS1* и *PsbS2*. Таким образом, у риса, геном которого похож на геном *Arabidopsis*, есть дополнительный механизм нефотохимического тушения [Umate, 2010]. Гены *psbS* экспрессируются одновременно с генами других членов семейства *Cab*, что указывает на функциональное сходство этих белков. Синий, красный и дальний красный свет индуцируют экспрессию *PsbS*. Эта светоиндуцируемая экспрессия зависит от фитохромов и *Cry1*. При освещении *Arabidopsis* дальним красным светом экспрессия *PsbS* зависит от транскрипционного фактора *FIN5*. На синем свету экспрессия *PsbS* индуцируется транскрипционным фактором *BIT1*, который функционирует после *Cry1* [Ruckle et al., 2012]. Свет по-разному влияет на экспрессию генов *PsbS* и

халконсинтазы, участвующей в биосинтезе фенилпропаноидов, и связанной, подобно PsbS, с толерантностью пластид к стрессам. FIN5 одинаково важен для экспрессии PsbS и халконсинтазы. ВТ1 более важен для экспрессии PsbS, чем для экспрессии халконсинтазы. У *end*-мутантов (enhanced deetiolation mutants) *Arabidopsis* экспрессия PsbS подавлена в большей степени, чем экспрессия халконсинтазы [Ruckle et al., 2012].

1.7. Индуцируемые интенсивным светом белки (Hips) цианобактерий: фотопротекция и локализация

1.7.1. Фотосинтетический аппарат цианобактерий

Наибольшее отличие между фотосинтетическими аппаратами растений и цианобактерий являются их антенные системы. В отличие от растений и зеленых водорослей цианобактерии содержат светособирающие органеллы – крупные мембрано-связанные гидрофильные белковые комплексы – фикобилисомы [Grossman et al., 1993]. Они состоят из фикобилипротеинов, содержащих в качестве хромофоров линейные тетрапирролы. В зависимости от вида цианобактерии и содержания генов, фикобилисомы состоят из хромофор-связывающих субъединиц аллофикоцианина, фикоцианина и/или фикоэритрина, фикоуробилина, фикоэритроцианина и нескольких линкерных белков. Содержание специфичных фикобилипротеинов и соотношение между различными пигментами позволяет цианобактериям абсорбировать свет в широком диапазоне.

Показано, что структура и функции фотосистем, а также транспорт электронов и синтез АТФ очень сходны у цианобактерий и хлоропластов [Fromme and Grotjohann, 2008]. В отличие от фотосистем растений, цианобактериальный комплекс ФС1 представлен в виде тримеров. Для тримеризации ФС1 необходима субъединица PsaL.

Фотосинтетический аппарат клеток легко изменяется в ответ на изменяющиеся условия окружающей среды и стресс. Условия освещения являются наиболее важным показателем изменяющейся окружающей среды. У фотосинтезирующих организмов в процессе эволюции развилось большое число способов адаптации к изменяющимся условиям. Акклиматизация к определенным условиям обеспечивается сложной регуляторной сетью, которая интегрирует много различных сигналов. В зависимости от условий выращивания у цианобактерий изменяется пигментный состав, спектральные характеристики светособирающей антенны и соотношение ФС1 к ФС2

[Mullineaux, 1992; Liu et al., 2013]. Показана корреляция между профилем экспрессии генов и акклиматизацией клеток к воздействию сильного света [Muramatsu and Nihara, 2012]. Например, экспрессия генов субъединиц ФС1 (*psa*), генов, кодирующих субъединицы фикобилисом (*cpc* и *apc*), и генов ферментов биосинтеза пигментов (*hem* и *chl*) репрессируется для уменьшения светособирающей способности клеток [Muramatsu and Nihara, 2012; Vermaas, 1996]. Предполагают, что индукция гена, кодирующего оранжевый каротиноид-связывающий белок (ОСР), приводит к включению защитного механизма фотосистем от избыточного света. Показано, что ОСР участвует в фотопротекции фотосинтетического аппарата на уровне фикибилисом [Kirilovsky and Kerfeld, 2013]. Цианобактерии содержат также низкомолекулярные Hli белки, сходные с белками семейства светособирающих белков и играющие фотопротекторную роль у цианобактерий [Dolganov et al., 2001; Staleva et al., 2015].

1.7.2. Hli белки цианобактерий

Цианобактерии лишены светособирающих комплексов высших растений, однако их геномы содержат семейство генов, кодирующих белки, сходные с первой или третьей трансмембранными спиралью Lhc. Первый цианобактериальный ген для такого Cab-подобного белка был идентифицирован в *Synechococcus* PCC 7942 два десятилетия назад, и в соответствии с его сильной индукцией при интенсивном освещении был назван high-light-inducible protein - HliP (индуцируемый светом высокой интенсивности белок) [Dolganov et al., 1995]. Впоследствии полный набор генов *hli* был идентифицирован в полностью расшифрованном геноме цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 [Kaneko et al., 1996; Funk and Vermaas, 1999]. Эти гены кодируют четыре небольших Hli белка, названных HliA-HliD. Обнаружен также Hli-домен, находящийся на С-конце фермента феррохелатазы [He et al., 2001; Kufryk et al., 2008]. Из-за сходства с трансмембранными спиралью белков семейства Cab белки Hli также называют низкомолекулярными Cab-подобными белками (SCPs – Small Cab-

like proteins). Гены *hli* были выявлены у всех цианобактериальных видов с полностью секвенированными последовательностями генома [Jansson et al., 2000; Muramatsu and Hihara, 2012]. Количество генов *hli* в цианобактериальных геномах варьируется, но даже примитивные цианобактерии *Gloeobacter violaceus*, не имеющие тилакоидов, обладают, по крайней мере, пятью генами, кодирующими гомологи HliP.

Hli белкам приписывают многочисленные функции, начиная от роли в регулировании биосинтеза хлорофилла [Xu et al., 2002; Vavilin and Vermaas, 2002; Hernandez-Prieto et al., 2011; Kilian et al., 2008; Muramatsu and Hihara, 2012] до транзитного связывания хлорофилла и каротиноидов [Xu et al., 2004]. Предполагают, что Hli белки участвуют в утилизации хлорофилла [Vavilin et al., 2007], нефотохимическом тушении энергии [Havaux et al., 2003; Jansson et al., 2000] и удалении синглетного кислорода [Sinha et al., 2012]. До недавнего времени прямых доказательств о существовании связывания HliPs с пигментами не было, но в последние годы появились сообщения о связывании хлорофилла и каротиноидов с HliPs и о стехиометрии их связывания [Knopova et al., 2014; Staleva et al., 2015]. Обнаружено, что белки HliP участвуют в процессе биогенеза хлорофилл-связывающих белков [Xu et al., 2002, 2004; Chidgey et al., 2014]. Предполагают, что Hli белки участвуют в стабилизации тримеров ФС1 в условиях интенсивного освещения [Wang et al., 2008]. Определенное функциональное значение может иметь также взаимодействие Hli белков (HliA и HliB) с белком Slr1128, функции которого неизвестны [Wang et al., 2008].

Гены, кодирующие HliA – HliD, индуцируются различными стрессовыми условиями, включая свет высокой интенсивности, низкую температуру и голодание по источникам N- и S-питания [He et al., 2001; Mikami et al., 2002]. Тот факт, что белки индуцируются не только интенсивным светом, но и другими видами стресса, затрудняет выяснение функций этих белков.

Показано, что мутанты цианобактерий с инактивированными генами *hliA* – *hliD* чувствительны к свету высокой интенсивности, отличаются по пигментации от клеток дикого типа и не способны к нефотохимической диссипации абсорбированной световой энергии [Havaux et al., 2003].

Особый интерес представляют два белка HliA и HliB, так как именно они являются критическими для выживания клеток *Synechocystis sp.* PCC 6803 в условиях светового стресса [Wang et al., 2008]. Обнаружено, что *hliA* и *hliB* функционально комплементарны [Xu et al., 2004]. Эти гены имеют высокую степень идентичности последовательности (87,1%) [He et al., 2001], что указывает скорее на сравнительно недавнюю дупликацию этого гена [Bhaya et al., 2002], чем на жесткие требования сохранения первичной структуры [Kufryk et al., 2008].

Экспрессия генов *hliA* и *hliB* и высокая степень сходства их последовательностей предполагает, что они играют сходную роль в клетке, обнаруживая тесную корегуляцию [Kufryk et al., 2008].

Получены разноречивые данные о локализации этих важных белков в хлорофилл-белковых комплексах тилакоидных мембран. Так показано, что HliA и HliB белки связаны с белком CP47 ФС2 и не связываются с тримерами и мономерами ФС1 [Hernandez-Prieto et al., 2011]. С другой стороны, обнаружено, что HliA и HliB ассоциированы с тримерами ФС1, но не с мономерами ФС1 и необходимы для стабилизации тримеров ФС1 [Wang et al., 2008]. Для лучшего понимания функций HliA/HliB необходимо знать с какими хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидной мембраны они взаимодействуют.

1.7.3. Гены *hli* и регуляция их экспрессии

Как уже отмечалось выше, в цианобактериях широко распространены гены *hli* (см. *Cyanobase*) [<http://www.cyanobase.org>]. Был проведен сравнительный анализ семейства *hli* на семи видах цианобактерий, включая четыре вида морских цианобактерий, адаптированных к высокой, средней или низкой освещенности, и трех штаммах пресноводных цианобактерий.

Отмечено, что выращивание на сильном свете морской цианобактерии *Prochlorococcus* MED4, обладающий наименьшим геномом, содержит в два раза больше генов *hli* (> 20), чем любой из остальных шести изученных видов. Предполагают, что некоторые из них, возможно, возникли при недавних дупликациях генов [Bhaya et al., 2002]. Кроме того, кластерный анализ показал специфичность некоторых генов *hli* морских или пресноводных видов, и в соответствии с этим, *hli* гены пресноводных одноклеточных более тесно связаны с генами *hli* пресноводных нитчатых видов, чем с генами *hli* одноклеточных морских штаммов [Bhaya et al., 2002].

Показано, что экспрессия гена *hli* регулируется семью видами стресса. Долганов и др. показали, что увеличение экспрессии гена *hli* прямо пропорционально интенсивности белого света и обратно пропорционально его длине волны [Dolganov et al., 1995], причем самая сильная индукция, обнаружена под действием ультрафиолетового света [Funk and Vermaas, 1999]. Позже, было обнаружено повышение уровня Hli белков при различных стрессовых условиях, включая сильный свет, недостаток азота или серы и низкую температуру [He et al., 2001]. Низкая интенсивность синего или ультрафиолетового света [Salem and van Waasbergen, 2004] и делеция ФС1 [Funk and Vermaas, 1999] индуцируют экспрессию генов *hli* у *Synechocystis*. У морских видов *Prochlorococcus* экспрессия генов *hli* также реагирует на дефицит азота [Tolonen et al., 2006] или вирусную инфекцию [Lindell et al., 2007].

Дальнейший анализ экспрессии генов *hli* в *Synechocystis* показал, что они находятся под контролем сенсорной гистидинкиназы Hik33 [Suzuki et al., 2001; Mikami et al., 2002]. Ортологи этой киназы, вероятнее всего, регулируют экспрессию *hli* и в других видах цианобактерий. Интересно, что гистидинкиназа Hik33 также имеет важное значение для синтеза в условиях высокой световой индукции дополнительных копий субъединицы D1 ФС2 и протеаз FtsH2 (Slr0228) и FtsH3 (Slr1604). Все эти белки необходимы для поддержания активности ФС2 на сильном свете. На основании этих

результатов предполагают, что функции Hlips связаны с ФС2. Этот важный мембранный комплекс чувствителен к светоиндуцированной потере фотохимической активности, обусловленной повреждением D1 белка [Nixon et al., 2010]. Потеря активности ФС2 может быть восстановлена с помощью так называемого репарационного цикла ФС2, который состоит из нескольких этапов [Komenda et al., 2012]. Они включают в себя мономеризацию и частичную разборку ФС2, деградацию поврежденного белка D1, катализируемую гетерогексамером протеаз FtsH2 и FtsH3 [Boehm et al., 2012] и его замену вновь синтезированной копией, и сборку и реактивацию ФС2. Многие цианобактерии содержат дополнительные копии гена *psbA*, кодирующего белок D1 и, подобно экспрессии генов *hli*, экспрессия этих *psbA*-копий также индуцируется сильным светом под контролем гистидинкиназы Hik33 [van Waasbergen et al., 2002]. У мутанта, не содержащего гистидинкиназу Hik33, нарушена экспрессия многих генов, включая гены, кодирующие Hlips [Tu et al., 2004]. Показано, что этот мутант содержит высокий уровень транскриптов генов *hli* в условиях низкой освещенности, а на сильном свете этот уровень увеличивается только незначительно [Tu et al., 2004].

1.7.4. Ассоциация Hli белков с ФС2

Все исследования, касающиеся локализации Hlips были проведены в основном на штамме *Synechocystis* PCC 6803. Было показано значительное накопление Hlips у мутантов, дефицитных по ФС1 [Funk and Vermaas, 1999]. На этом основании авторы предполагали, что Hli белки не связаны с ФС1. Первые попытки выделить Hlips и изучить их локализацию в фотосинтетическом аппарате были выполнены с использованием рекомбинантных штаммов, экспрессирующих Hli белки, слитые с His-меткой на С-конце [He, Dolganova et al. 2001]. Этот подход показал, что два Hli белка (HliA и HliB) *Synechocystis*, которые отличаются только по семи аминокислотным остаткам, быстро индуцируются светом и имеют сходную кинетику появления и исчезновения. Это привело к предположению, что

HliA и HliB белки могут быть избыточными копиями с одинаковыми функциями. Показано, что белок HliC также индуцируется очень быстро после воздействия на клетки сильного света, а индукция HliD происходит более медленно. После перехода клеток от высокой к низкой интенсивности света и HliC и HliD сохранялись в клетках намного дольше, чем HliA и HliB [He, Dolganova et al. 2001]. Соллюбилизация клеточных мембран и последующее фракционирование Hlip-связанных комплексов с помощью гель-фильтрации показали присутствие полипептидов HliA и HliB во фракции 100 кДа, тогда как полипептиды HliC и HliD обнаруживались во фракции 50 кДа [He, Dolganova et al. 2001]. Эти данные свидетельствуют о том, что Hlips функционируют в виде комплексов, и что подобные пары Hlip могут быть связаны друг с другом.

Первое комплексное исследование локализации белков HliA и HliB было выполнено в 2006 году [Promnares et al., 2006], в котором было доказано, что и HliA и HliB ассоциированы с ФС2. Показано, что сайт связывания HliA/HliB находится на антенне CP47 и расположен в непосредственной близости от небольшого трансмембранного полипептида PsbH ФС2. Последующее исследование расширило знания о локализации Hli белков и показало тесную взаимосвязь между HliB и HliC и их связывание с ФС2 [Yao et al., 2007]. Обнаружено, что для связывания HliB с CP47 не требуется белок HliC.

В отличие от других Hlips, HliD не был обнаружен в каком-либо комплексе ФС2, включая интермедианты сборки ФС2 без CP43 (RC47) [Yao et al., 2007; Diner et al., 2001]. Тем не менее, наличие HliC в ФС2 и сверхэкспрессия HliD в штамме с гиперэкспрессией HliC [Kufryk et al., 2008] на самом деле свидетельствует о связи между HliD и ФС2. Для того, чтобы понять эту связь необходимо рассмотреть этапы биогенеза ФС2. В соответствии с действующей моделью, комплекс ФС2 собран из четырех относительно самостоятельных белков. Высокомолекулярные хлорофилл-связывающие субъединицы ФС2 (D1, D2, CP43 и CP47) содержат пигменты и

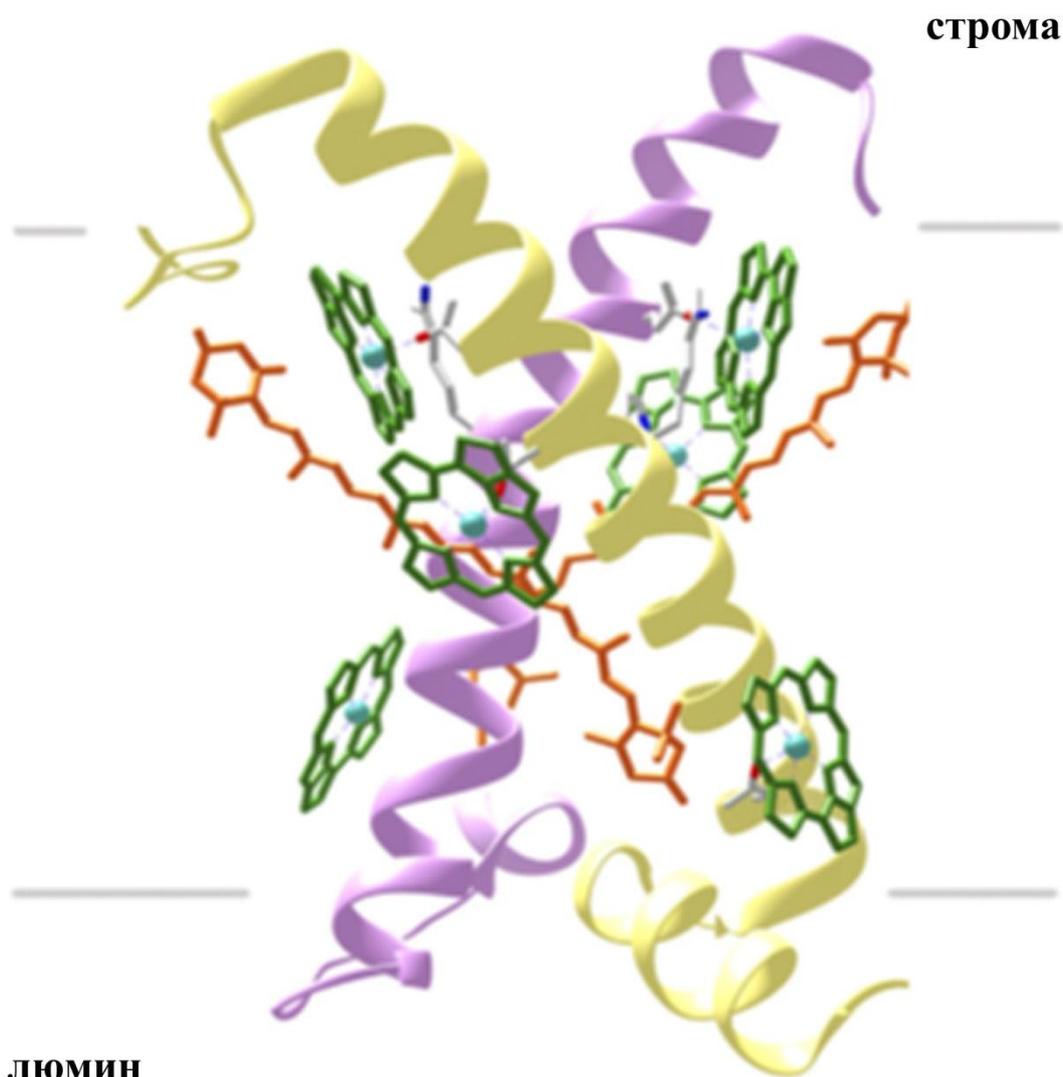
другие кофакторы, которые связаны с прилегающими небольшими субъединицами. Белки собираются поэтапно в порядке D1 + D2 + CP47 + CP43 [Komenda et al., 2012]. Мутанты, лишённые антенны CP47 накапливают два RCII суб-комплекса, состоящих из D1, D2 и фактора сборки Ycf48 [Komenda et al., 2008]. Недавно был описан и охарактеризован больший из этих двух комплексов, названный RCII*, который содержит дополнительный фактор сборки Ycf39 (Slr0399) и прочно связывает HliD и HliC [Кноррова et al., 2014]. Использование мутанта без D2 способствовало дальнейшему выяснению того, что Ycf39 и Hlipс также связывают свободный D1. В целом, все Hlipс *Synechocystis* (HliA-D), как было продемонстрировано [Кноррова et al., 2014], ассоциированы с комплексами ФС2, либо с полным коровым комплексом, с собранным промежуточным RC47, уже содержащим CP47 (HliA/HliB) либо с более ранними промежуточными комплексами до CP47 (HliC/HliD).

1.7.5. Фотозащитная роль Hli белков при биогенезе ФС2

Вероятно, Hlipс не играют существенной роли в цианобактериях, так как мутанты *Synechocystis* без всех Hlipс [He, Dolganov et al., 2001], включая С-концевой домен Hli феррохелатазы [Xu et al., 2002], являются жизнеспособными. Тем не менее, такие мутанты очень чувствительны к сильному свету или окислительному стрессу [Sinha et al., 2012; He et al., 2001], это указывает на то, что эти белки играют важную роль в процессе акклиматизации к стрессовым условиям.

Предполагают, что Hlipс связывают хлорофилл и каротиноиды [Xu et al., 2004], в поддержку этого предположения свидетельствует реконструкция связывания пигмента с Hlipс *Synechocystis* в опытах *in vitro* [Storm et al., 2008]. В первую очередь о доказательствах связывания пигмента с Hlipс свидетельствует характеристика изолированного комплекса Ycf39-Hlipс. Комплекс Ycf39-Hlipс содержит хлорофилл и β-каротин в соотношении 3:1 [Staleva et al., 2015], которое также соответствует связыванию пигмента, наблюдаемому в двух гомологичных трансмембранных спиральях I и III Lhc

белков растений [Liu et al., 2004]. Так как Ycf39 не содержит пигменты [Knopova et al., 2014; Staleva et al., 2015], то очевидно, что все молекулы хлорофилла и β -каротина связаны с Hlips. В Lhc, две из четырех молекул хлорофилла *a*, связанные с консервативным мотивом E_{xx}H/N_xR, координируются ионными парами глутамат-аргинина [Liu et al., 2004], для достижения такой конфигурации, Hlips должны сформировать олигомер. Была предложена гипотетическая модель димера Hlip, содержащего шесть молекул хлорофилла и 2 β -каротина [Staleva et al., 2015]. Димер Hlip представляет пару HliA/HliB белков. Предполагают, что такие кросс-формы из двух спиралей Hlip характерны для всего семейства Hlip.



ЛЮМИН

Рис. 1.2. Структурная модель димера HliD, связанного с Chl-*a* и каротиноидами. Модель рассчитана на основании кристаллической структуры ЛНСII 18 гороха. Для молекул Chl-*a* приведены только порфириновые кольца [Staleva et al., 2015].

Комплекс Ycf39-Hliр, как было показано, эффективно тушит энергию, поглощаемую хлорофиллом, и характеристика этого тушения с помощью фемтосекундной абсорбционной спектроскопии свидетельствует о прямой передаче энергии от возбужденного состояния хлорофилла в энергетическое состояние S1 связанного β-каротина [Staleva et al., 2015]. Описанный механизм объясняет две возможные функции Hliрs. Комплекс связывает хлорофилл и, следовательно, может выступать в качестве предполагаемого сборщика освобожденного хлорофилла, который иначе был бы летальным для клеток из-за его фотодинамической активности, и предотвращает образование синглетного кислорода [Sinha et al., 2012]. Если хлорофилл, связанный с Hliрs, возбужден, то энергия эффективно гасится, предотвращая образование синглетного кислорода. Ассоциация Ycf39-Hliр также снижает флуоресценцию хлорофилла промежуточного комплекса RCII* [Кноррова et al., 2014]. Это означает, что β-каротин, содержащий Hli белки, также гасит энергию, поглощенную хлорофиллом, связанным с этим комплексом. Ранее предположение о роли Hliрs в нефотохимическом тушении энергии в клетках *Synechocystis* было высказано на основании характеристики мутанта, дефицитного по четырем генам *hli* [Navaux et al., 2003]. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что белок D1 связан с Ycf39-Hliр [Кноррова et al., 2014]. Возможно, что β-каротин, связанный с Hliрs, либо непосредственно взаимодействует с хлорофиллами белка D1, либо энергия сначала передается к хлорофиллу, связанному с Hliрs, и затем гасится. В комплексе D1-D2 RCII хлорофиллы первичного донора имеют максимум поглощения, близкий к 680 нм, создание прямой передачи энергии от P680 к хлорофиллам в Hliрs (поглощение при 674 нм) маловероятно [Кноррова et al., 2014]. Кроме того, расположение P680 внутри комплекса RCII* не позволит передать энергию в отдаленные пигменты Hli белков. В противоположность этому, периферический хлорофилл связан с His118 из D1 и имеет максимум поглощения около 671 нм [Diner and Rappaport, 2002], он является хорошим кандидатом на взаимодействие хлорофилла с пигментами Hliр. Совместное

выделение комплекса Ycf39-HliP с D1 в отсутствие D2 также показывает, что D1 связывает хлорофилл еще до его присоединения к D2, и связывание с HliPs обеспечивает аналогичную защиту D1 при сборке комплекса RCII* [Diner and Rappaport, 2002].

В ходе сборки ФС2, следующим шагом после формирования комплекса RCII из D1 и D2 является прикрепление CP47. В образовавшемся комплексе RC47 комплекс Ycf39-HliP существует кратковременно, но CP47 может теперь связать HliA, HliB и HliC и, соответственно, эти HliPs были обнаружены в изолированном комплексе RC47 [Boehm et al., 2012]. Таким образом, вполне вероятно, что защитная функция заключается в том, что после связывания HliC и HliD с D1 в комплексе RCII, появляется возможность связывания HliA, HliB и HliC с CP47. На основании детальной структуры комплекса ФС2 цианобактерий (включая точное местоположение молекул хлорофилла *a* и β -каротина) [Ferreira et al., 2004; Guskov et al., 2009; Umena, 2011] и используя модель локализации пигмента в паре HliP, была предложена гипотетическая модель комплекса CP47-HliA/HliB [Staleva et al., 2015].

Авторы предполагают, что хлорофилл и/или β -каротин и Hli белки взаимодействуют с экспонированными хлорофиллами CP47, например, с хлорофиллом 620. Важно отметить, что хлорофиллы в антенне CP47 формируют два слоя, один близок к стромальной и второй близок к люминальной стороне мембраны. Хлорофилл 620 и другие экспонированные хлорофиллы расположены в основном на люминальной стороне мембраны, что способствует эффективному тушению энергии люминального пигментного слоя ФС2. В то время как стромальная сторона может быть потушена излучающим красную флуоресценцию хлорофиллом, связанным с His114 белка CP47 и стабилизированным водородными связями с Thr5 PsbH [D'Haene et al., 2015].

Обнаружено, что Hli белки остаются связанными с коровым комплексом ФС2 даже после присоединения белка CP43. Это указывает на

то, что Hlps, связанные с CP47, возможно, также участвуют в тушении энергии, поступающей от хлорофиллов, связанных с другими хлорофилл-связывающими белками ФС2 [Diner and Rappaport, 2002]. Интересно, что не входящий в комплекс ФС2 белок CP43, присутствует в большом количестве в клетках *Synechocystis*, по-видимому, не связан с Hli белками [Komenda et al., 2012]. С другой стороны, CP43 может временно ассоциировать с ФС1, которая действует в качестве эффективного тушителя флуоресценции CP43 [Komenda et al., 2012]. На этом основании Komenda и др. предполагают, что для защиты CP43 не требуется его ассоциация с Hli белками. До конца не ясно, ассоциированы ли Hli белки с коровым комплексом ФС2 только в процессе сборки фотосистем *de novo*, ассоциированы ли Hli белки с ФС2 при ее репарации в условиях стресса, и связаны ли Hli белки с полностью собранным комплексом ФС2 после переноса клеток на сильный свет.

Доказательства связи хлорофилла и β -каротина с HliC и HliD в *Synechocystis*, а также способность выполнять нефотохимическое тушение энергии, поглощаемой хлорофиллом, указывает на функцию Hlps: временно связывать хлорофилл, освобожденный из других хлорофилл-связывающих белков. Тем не менее, прямые и убедительные доказательства для этой функции до сих пор не найдены. Мутантные клетки, не содержащие ФС1 и Hlps, подвергнутые воздействию сильного света, показывают изменения в спектрах флуоресценции хлорофилла, которые могут быть отнесены к высвобождению хлорофилла из-за повреждения ФС2, и эти изменения сопровождаются высокой скоростью генерации синглетного кислорода [Sinha et al., 2012]. В отличие от этого, клетки без ФС1, содержащие Hlps выделяют гораздо меньше синглетного кислорода на сильном свете, и флуоресценция хлорофилла не показывает наличие свободных хлорофиллов, флуоресцирующих при более коротких волнах [Sinha et al., 2012]. Эти данные подтверждают способность Hlps связывать хлорофилл, освобожденный из ФС2, но из них не следует, что этот хлорофилл затем повторно используется для вновь синтезированных хлорофилл-связывающих

белков ФС2. Остается неясным, могут ли все хлорофиллы, связанные с Hlip, быть повторно использованы после удаления фитола и его повторного связывания [Vavilin and Vermaas, 2007], или же они непосредственно могут быть повторно использованы.

Получены интересные данные о наличии генов *hli* у вирусов, поражающих цианобактерии. Ассоциация Hlip с комплексами ФС2 и Hlip-опосредованная фотозащита ФС2 наиболее вероятно связаны с наличием генов *hli* в геномах некоторых морских цианофагов [Sullivan et al., 2005]. Эти бактериофаги также содержат *psbA* и *psbD* гены, кодирующие субъединицы D1 и D2 ФС2 [Millard et al., 2004], была показана экспрессия этих генов и синтез вирусных D1 и D2 белков в клетках хозяина цианобактерий [Lindell et al., 2005]. Вполне вероятно, что синтез фаговых D1 и D2 белков поддерживает выживание клеток-хозяев, пока частицы цианофага созревают. Предполагается, что присутствие генов *hli* фага и их предполагаемая экспрессия в клетке-хозяине имеет ту же цель, т.е. поддержку фотосинтеза хозяина с помощью защиты новообразованных комплексов ФС2 вирусного происхождения, которые дают энергию для выживания инфицированных клеток до созревания частиц фагов и освобождения их после лизиса клеток-хозяев.

1.7.6. Роль Hli белков в метаболизме хлорофилла

Обнаружено, что помимо присутствия HliC в комплексе RCII*, HliC и особенно HliD ассоциированы также с хлорофиллсинтазой, ферментом, присоединяющим фитол к хлорофиллиду [Chidgey et al., 2014]. Комплекс ChlG-Hlip был выделен вместе с инвертазой YidC, участвующей в синтезе мембранных белков, и рибосомами, что указывает на участие Hlip на самых ранних этапах биогенеза хлорофилл-связывающих белков. Во время этого процесса Hlip могут защитить компоненты пути биосинтеза хлорофилл-связывающих белков от фотоповреждения, вызванного случайно образовавшимися свободными молекулами хлорофилла или интермедиатами синтеза хлорофилла. О возможной роли Hlip в биосинтезе хлорофилла

указывается в ряде публикаций [Xu et al., 2004; Vavilin and Vermaas, 2002; Hernandez-Prieto et al., 2011]. Предполагают, что механизм синтеза мембранных белков тесно связан с ферментами биосинтеза тетрапирролов, и вместе они образуют крупный комплекс, участвующий в синтезе хлорофилл-связывающих белков [Sobotka, 2014].

Наиболее убедительные данные о регуляции биосинтеза хлорофилла белками Hlips были получены на мутантах *Synechocystis*, лишенных ФС1. Эти штаммы очень чувствительны к свету [Shen et al., 1993] и, следовательно, накопление определенных промежуточных продуктов биосинтеза хлорофилла (особенно при отсутствии HliD) может приводить к фотоповреждению или дестабилизации конкретного фермента биосинтетического пути. Действительно, у мутантов без ФС1, лишенных HliD и HliC, обнаружено ингибирование ранних стадий биосинтеза тетрапирролов [Xu et al., 2004]. Отсутствие HliD приводит к накоплению хлорофиллида в клетках дикого типа [Chidgey et al., 2014], а также у мутанта, дефицитного по ФС1 [Xu et al., 2004]. Учитывая связывание HliD с хлорофиллсинтазой, эти результаты подтверждают ключевую роль хлорофиллсинтазы в повторном связывании фитола при вторичном использовании хлорофиллида.

Как и биосинтез, так и время жизни хлорофилла в клетках *Synechocystis* также зависит от наличия Hlips [Xu et al., 2004; Vavilin et al., 2007]. Характеристика различных мутантов, дефицитных по нескольким *hli* генам, указывает на особую важность HliC в утилизации хлорофилла, удаление этого гена приводит к более значительному уменьшению времени жизни хлорофилла, по сравнению с инактивацией других *hli* генов [Xu et al., 2004; Vavilin et al., 2007]. Роль HliC неясна. Показано, что HliC белок вместе с HliD белком связаны с хлорофиллсинтазой, D1 или RCII*, но также они связаны с HliB в RC47 [Yao et al., 2007]. HliC белок самый короткий Hli белок у *Synechocystis*, и его последовательность аналогична домену Hlip из феррохелатазы, что предполагает возможную их взаимозависимость.

Короткий N-конец HliC по сравнению с другими Hlps возможно обеспечивает лучшую доступность пигментного сайта связывания для белков/пигментов стромы. Так, в гомодимере HliC или в гетеродимере с другими Hlps, связывание пигмента может быть не прочно, что позволяет осуществить доставку пигмента к белкам с высоким средством.

Вероятно, что роль Hlr в фотозащите биогенеза ФС2 и их регуляторная/защитная функция, связанная с метаболизмом хлорофилла, скорее всего, сильно перекрываются. Предполагается, что Hlps, как правило, работают на границе между последними этапами биосинтеза/реутилизации хлорофилла и синтезом и сборкой хлорофилл-связывающих белков. Все эти процессы находятся в рамках определенного домена мембраны под названием центр биогенеза [Komenda et al., 2012; Nickelsen and Rengstl, 2013; Rast et al., 2015].

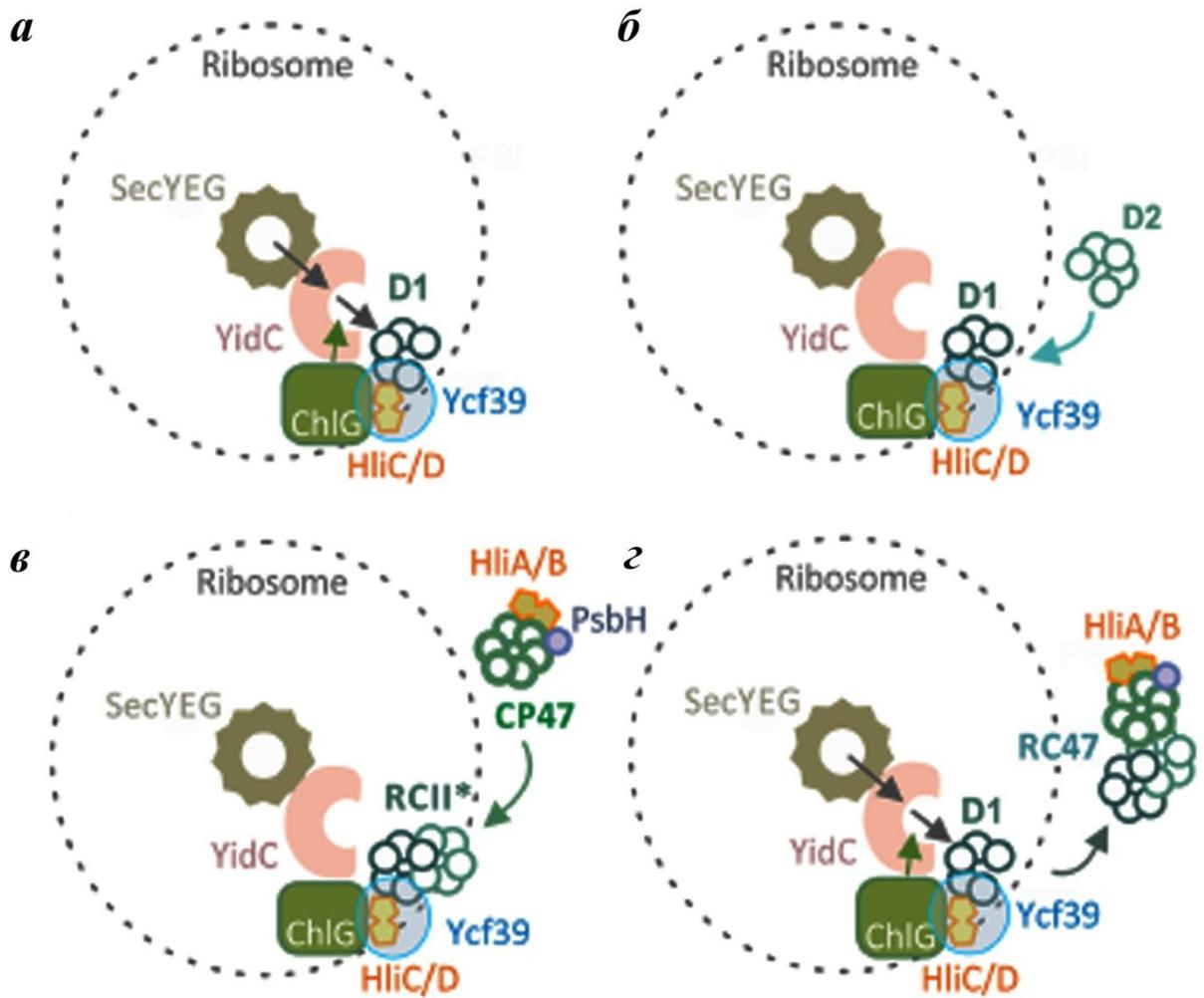


Рис. 1.3. Рабочая модель, основанная на современных представлениях о фотозащите начальных этапов биогенеза ФС2 с помощью олигомеров Hlips [Komenda and Sobotka, 2015]: *а*) фермент хлорофилл-синтаза (ChlG) связан с транслокационным аппаратом (SecYEG) через YidC инсертазу и защищен с помощью олигомера HliD/HliC. Вновь синтезированный D1 белок связан с HliD/HliC, который эффективно тушит поглощенную световую энергию. Белок Ycf39, функция которого неизвестна, также связан с HliD/HliC; *б*) во время следующего этапа сборки ФС2 белок D2 взаимодействует с D1 и олигомером HliD/HliC, который способен защитить образованный RCII*; *в*) белок CP47 защищен другим олигомером Hlips (HliA/HliB) после прикрепления CP47 к RCII*; *з*) собранный промежуточный комплекс RC47, содержащий HliA/HliB, удаляется из транслокационного аппарата.

Данный рисунок обобщает современные знания об участии отдельных Hlip *Synechocystis* в синтезе хлорофилл-связывающих белков ФС2 и их сборки.

1.7.7. Белки, слитые с Hli-доменом

Большинство генов *hli* кодируют небольшие белки с молекулярной массой, не превышающей 7 кДа, и имеют одну трансмембранную спираль и содержат домены, участвующие в связывании пигментов. Однако, обнаружены гены, кодирующие высокомолекулярные белки, содержащие в своей последовательности участки, слитые с Hli белками. Например, Hlip входит в состав С-конца феррохелатазы [Funk and Vermaas, 1999], важного фермента, катализирующего включение железа в протопорфирин IX (Proto IX) [Tanaka and Tanaka, 2007]. Proto IX – последний общий предшественник хлорофилла и гема, и, по-видимому, феррохелатаза играет важную регуляторную роль в этой точке разветвления пути биосинтеза тетрапирролов. Снижение активности феррохелатазы влияет на регуляцию всего пути биосинтеза тетрапирролов у *Synechocystis*, но не снижает содержания гема или фикобилисом [Sobotka et al., 2011; Sobotka et al., 2008]. С другой стороны, ингибирование ветви биосинтеза хлорофилла у различных мутантов, дефицитных по ФС2 [Sobotka et al., 2005], а также у мутантов без ФС1, приводит к сильному повышению активности феррохелатазы в клетке. Таким образом, как следствие, растущий уровень феррохелатазы приводит к тому, что содержание домена Hlip/Cab феррохелатазы также повышается. Высокая активность феррохелатазы может привести к более высокому содержанию гема, который может работать по механизму обратной связи, и ингибировать ранние стадии биосинтеза тетрапирролов для того, чтобы избежать накопления токсичных промежуточных продуктов биосинтеза [Meskauskiene et al., 2001]. Это стратегическое положение феррохелатазы в точке разветвления между биосинтезом хлорофилла и гема привело к предположению, что хлорофилл связывается с Hli/Cab-доменом белка и регулирует оптимальное разделение Proto IX между двумя основными

ветвями биосинтеза тетрапирролов [Xu et al., 2004; Sobotka et al., 2005]. Предполагают, что свободные хлорофилл-связывающие сайты в домене H₁P феррохелатазы частично ингибируют активность самой феррохелатазы. В отличие от этого, заполненные сайты H₁I-домена, когда доступно достаточное количество хлорофилла доступно, могут активировать фермент, чтобы перенаправить молекулы к синтезу гема и, тем самым, блокируют весь путь биосинтеза хлорофилла.

Однако, более поздние исследования мутанта *Synechocystis*, экспрессирующего укороченную феррохелатазу, не содержащую домен H₁P/Cab, не подтвердили эту модель [Sobotka et al., 2011]. Фенотипический анализ показал, что мутант, не содержащий домен H₁P феррохелатазы, не изменился по составу пигментов при низкой освещенности, но был чувствителен к сильному свету и накоплению хлорофиллида [Sobotka et al., 2011]. Как уже отмечалось, фермент феррохелатаза является важным регулятором тетрапиррольного пути, и не трудно представить, что случайное слияние феррохелатазы и H₁P (например, H₁IС) гарантирует, что оба белка будут всегда коэкспрессироваться и ко-локализоваться. Слияние, возможно, лучше синхронизировало общий поток тетрапиррольного пути.

Однако у ряда цианобактерий (*Gloeobacter violaceus*, *Pseudanabaena* sp. PCC 6802, *Pseudanabaena biceps*, *Synechococcus* sp. PCC 7502) феррохелатаза не содержит домен H₁P. Домен H₁P отсутствует также в феррохелатазе *Synechococcus* sp. JA-2-3B'a(2-13). У этой цианобактерии ген *hli* слит с геном, кодирующим гомолог белка *Synechocystis* Ssl2148 (*cyb1999*) [Kilian et al., 2008]. Функция белка Ssl2148 в *Synechocystis* неизвестна и, следовательно, важность этого слияния генов остается неясной. Есть две возможности объяснить, почему происходит слияние белков. Белки могут быть вовлечены в общие физиологические процессы или биохимические пути, когда их функция в этих процессах тесно связаны (например, два фермента, катализирующих последовательные стадии в пути биосинтеза). Белки также могут быть компонентами различных биохимических процессов,

происходящих в одном клеточном компартменте. В этом случае слитый белок может использоваться для правильного функционирования обоих соседних биохимических процессов.

1.7.8. Ассоциация Hli белков с ФС1

Не смотря на полученные убедительные доказательства об ассоциации Hli белков с ФС2, сведения об ассоциации Hli белков с ФС1 остаются противоречивыми. Получены данные о связи Hlips с ФС1. Wang и др. [Wang et al., 2008] предположительно идентифицировали Hlips в тримерах ФС1, выделенных с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы. Однако, этот метод имеет ограниченное разрешение. С помощью двумерного BN/SDS электрофореза, белок HliA был обнаружен в мономерах и димерах коровых комплексов ФС2, в RC47 и также в большом суперкомплексе в начале нативного геля, который содержал и ФС2 и ФС1. Этот суперкомплекс, как было показано, содержит фактор сборки ФС2, такой как Psb27, и участвует в биогенезе ФС2 [Komenda et al., 2012]. Тримеры ФС1 были локализованы в непосредственной близости от суперкомплекса и не содержали HliA. Другой результат был получен в исследовании Wang и др. [Wang et al., 2008]. Авторы выявили светоиндуцируемую ассоциацию HliA и HliB с белком Slr1128, ФС1 и IsiA. IsiA белок является CP43-подобной антенной, индуцируется при недостатке железа или при окислительном стрессе [Singh and Sherman, 2007]. Он обычно ассоциирован с тримерами ФС1, а суперкомплекс ФС1-IsiA имеет сходный размер с суперкомплексом ФС2-ФС1 [Krynicka et al., 2014; Wang et al., 2010]. В работе Daddy и др. показано, что HliA и HliB были ассоциированы с Slr1128, субъединицей ФС1 PsaD и IsiA [Daddy et al., 2015; Boehm et al., 2009]. Однако, в работах Sobotka и др. не наблюдали какую-либо аккумуляцию заметного количества IsiA в условиях сильного света и ассоциацию Hli с ФС1 [Koresna et al., 2012; Wang et al., 2008; Daddy et al., 2015].

В пользу предположения о том, что Hlips взаимодействуют с ФС1 свидетельствует работа Sinha и др. [Knopova et al., 2014]. Выделенные

Ycf39-Hip-комплексы всегда выделяются совместно с небольшим количеством тримеров ФС1. Учитывая возможную роль Ycf39 в утилизации хлорофилла, это совместное выделение может отражать временное объединение обоих комплексов в процессе передачи хлорофилла от тримера ФС1 к комплексу ФС2 [Komenda and Sobotka, 2015].

Действительно, тримеры ФС1 клеток *Synechocystis* используют большинство вновь синтезированного хлорофилла, который затем распределяется на другие хлорофилл-связывающие белки [Koresna et al., 2012]. Таким образом, основной цианобактериальный мембранный комплекс, с которым ассоциированы Hips, является ФС2. ФС2 является наиболее светочувствительным фотосинтетическим комплексом, который требует высокий уровень защиты против фотодеструкции [Nixon et al., 2010]. В отличие от этого ФС1 является гораздо более стабильной, и необходимость в фотозащите ФС1 по сравнению с ФС2 весьма ограничена. Тем не менее, ассоциация Hips с ФС1, например, во время передачи хлорофилла от ФС1 к ФС2, не может быть исключена, хотя убедительных доказательств недостаточно. Таким образом, несмотря на значительный прогресс в изучении структуры и функций Hips, многие вопросы, касающиеся этих белков, остаются еще неизученными.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Штаммы цианобактерий

Объектом исследования служили клетки дикого типа цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 (далее *Synechocystis* 6803) и мутантов, дефицитных по фотосистеме 2 (ФС2) ($\Delta psbDI$, $\Delta psbDII$, $\Delta psbC$) [Shen et al., 1993], неспособных к образованию тримеров ФС1 вследствие отсутствия *psaL* [Chitnis and Chitnis, 1993] и дефицитные по ФС1 и ФС2 ($\Delta PsaAB$, $\Delta PsbD_1C$, $\Delta PsbB$, $\Delta PsbD_2$). Мутанты любезно предоставлены И.В. Еланской (кафедра генетики биологического факультета МГУ).

2.2. Условия выращивания

Цианобактерии выращивали на жидкой среде BG-11 [Rippka et al., 1979] при 28°C в условиях постоянного освещения флуоресцентными лампами дневного света и аэрацией окружающим воздухом с помощью магнитной мешалки до середины логарифмической фазы роста. Клетки дикого типа и мутанта, неспособного к образованию тримеров ФС1, выращивали при умеренной интенсивности света 40 мкмоль фотонов/м²·с. Клетки мутанта без ФС2 выращивали в фотомиксотрофных условиях при низкой интенсивности света (5 мкмоль фотонов/м²·с) с добавлением 10 мМ глюкозы и антибиотиков (хлорамфеникол 20 мкг/мл, эритромицин 15 мкг/мл и спектиномицин 20 мкг/мл). Клетки мутанта без ФС1 и ФС2 выращивали аналогичных условиях, что и клетки мутанта без ФС2 (5 мкмоль фотонов/м²·с, хлорамфеникол 20 мкг/мл, эритромицин 15 мкг/мл и спектиномицин 20 мкг/мл). Для создания условий светового стресса клетки дикого типа и мутантов, выращенных в указанных выше условиях, освещали в течение 1 ч светом высокой интенсивности (150 мкмоль фотонов/м²·с). Использованная не очень высокая интенсивность светового стресса была выбрана для того, чтобы предотвратить фотодеструкцию и гибель клеток, особенно в случае мутанта без ФС2 и мутанта без ФС1 и 2. При

сравнительных исследованиях клеток дикого типа и мутанта без ФС2 клетки дикого типа были предварительно адаптированы к фотомиксотрофным условиям.

2.3. Выделение тилакоидных мембран

Клетки разрушали с помощью Френч-пресса (процедуру повторяли три раза для каждого препарата) или механически с кварцевым песком в среде для выделения тилакоидных мембран: 50 mM MOPS, pH 7,0; 0,4 mM сахараза; 10 mM NaCl; 1 mM фенилметилсульфонилфторид (среда А). Гомогенат центрифугировали для удаления неразрушенных клеток и их фрагментов при 5000 g в течение 10 мин. Тилакоидные мембраны из надосадочной жидкости осаждали центрифугированием при 50 000 g в течение 1 ч. Тилакоидные мембраны отмывали от фикобилисом средой А.

2.4. Лизис тилакоидных мембран

Для экстракции нативных комплексов фотосистем из тилакоидной мембраны использовали мягкий неионный детергент n-додецил- β -мальтозид (n-Dodecyl- β -D-maltoside, β -DM), который добавляли в соотношении детергент:хлорофилл 15:1. После инкубации при 4°C в течение 30 мин лизат центрифугировали при 18 000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость использовали для ионообменной хроматографии.

2.5. Ионообменная хроматография

Для выделения тримеров и мономеров ФС1 и комплекса ФС2 использовали модифицированную методику выделения с помощью анионообменной хроматографии на колонке DEAE-Toyoperl-650 [Shubin et al., 1992, 1993].

Надосадочную жидкость наносили на колонку DEAE-Toyoperl 650M (1,5 x 20 см), предварительно уравновешенную средой А. Элюцию хлорофилл-белковых комплексов проводили линейным градиентом NaCl (0–

300 мМ) в среде А. Поглощение фракций измеряли при 678 нм. Белки, содержащиеся в выделенных фракциях, осаждали холодным ацетоном при -20°C.

2.6. Определение содержания хлорофилла и активности комплексов ФС1

Содержание хлорофилла а в образцах определяли в этаноловом экстракте по формуле:

$$[\text{Chla}] (\text{mg/ml}) = 1,21 \times \text{OD}_{664} - 0,17 \times \text{OD}_{625} [\text{Lichtenthaler}, 1987].$$

Активность комплекса ФС1 определяли по способности к фотоокислению П700 (первичного донора электрона реакционного центра ФС1) как фотоиндуцированное изменение поглощения при 870 нм с действующим светом 730 нм с помощью флуориметра DUAL-PAM-101 с приставкой ED-P700 DW-101 (Walz, Effeirich, Германия).

2.7. Определение фотохимической активности ФС1 с помощью флуориметра DUAL-PAM-101

Фотоиндуцированное изменение поглощения реакционного центра ФС1 (П700) мембран клеток ДТ и мутанта без ФС2 регистрировали при 810 нм (против 870 нм) при помощи флуориметра DUAL-PAM-101 с приставкой ED-P700 DW-101 (Walz, Effeirich, Германия) [Schreiber et al., 1988]. В качестве источника действующего света > 710 нм (интенсивность 14 W м⁻²) использовали управляемую лампу (102-FR) на основе светодиодов («Walz», Германия). Измерения проводили в буфере (50 мМ трицин, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, pH 8,3) в присутствии 0,5 мМ аскорбата натрия при концентрации хлорофилла 10 мкг/мл. Длительность освещения образца – 20 с.

2.8. Определение фотохимической активности ФС1 по поглощению O₂ в системе искусственных донора и акцептора

Реакция Меллера – перенос электронов от воды на кислород. Восстановление кислорода может происходить в обеих фотосистемах. При

этом поглощение кислорода может компенсировать его выделение в ходе окисления H_2O . В результате единственным продуктом этого процесса будет АТФ, синтезируемая при псевдоциклическом фотофосфорилировании. Псевдоциклический поток электронов приводит к образованию активных форм кислорода. Количество выделяемого кислорода можно измерить с помощью электрода Кларка и таким образом определить скорость транспорта электронов.

Для определения скорости транспорта электронов фотосистемы 1 измеряли поглощение кислорода с помощью электрода Кларка. Для измерений использовали тилакоидные мембраны, выделенные из клеток дикого типа и мутанта без ФС2, выращенных при низком освещении (5 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$). В случае мутанта без ФС2 клетки подвергали световому стрессу (150 мкмоль фотонов/ $m^2 \cdot c$) в течение 2 ч. К образцам добавляли буфер (50 мМ трицин pH 8,3; 100 мМ NaCl; 5 мМ $MgCl_2$) с 1 мМ KCN, 100 мкМ метилвиологена (акцептор электронов, принимает их от ФС1), 2 мМ аскорбиновой кислоты (донор электронов), 40 мкМ 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) и 0,5 мкМ 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевины (Диурон) (ингибитор ФС2). Тилакоидные мембраны вносили в ячейку так, чтобы концентрация хлорофилла составляла 20 мкг/мл. Скорость электронного транспорта выражали в мкмоль O_2 /ч·мг хлорофилла.

2.9. Определение концентрации белка по методу Бредфорд

Данный метод основан на прямом связывании белков с красителем Кумасси G-250. Связывание осуществляется за счет электростатического взаимодействия сульфонильных групп красителя с некоторыми аминокислотными остатками белков (триптофана, аргинина, тирозина, фенилаланина и гистидина), при этом цвет раствора из красновато-коричневого становится голубым.

Краситель в растворе имеет максимум поглощения при 470 нм, а комплекс Кумасси – белок - при 595 нм [Bradford, 1976].

К 60 мкл суммарного белка добавляли 60 мкл 20% трихлоруксусной кислоты для осаждения белков. Центрифугировали 10 мин. при 12000 g. Осадок растворяли в 60 мкл 0,1н NaOH. Отбирали 14 мкл суммарного белка, растворенного в NaOH, добавляли 86 мкл 0,15М NaCl и 3 мл раствора Кумасси G-250 (10% Кумасси бриллиантовый голубой G-250, 5% этанол, 8,5% ортофосфорная кислота). Далее измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 595 нм. В контроль добавляли 100 мкл 0,15М NaCl.

Для определения концентрации белка строили калибровочный график с использованием бычьего сывороточного альбумина.

2.10. Нативный электрофорез в ПААГ

Нативный электрофорез в ПААГ использовали для разделения не денатурированных белковых комплексов [Jarvi et al., 2011; Стручкова и Кальясова, 2012]. В работе нативный электрофорез использовали для разделения хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран *Synechocystis* 6803. К лизату тилакоидных мембран добавляли десятикратный буфер для образца (200 мМ BisTris pH 7,0; 75% сахара; 1 М 6-аминокапроновая кислота). Использовали градиентный ПААГ (5% - 10%).

Растворы для электрофореза:

Акриламид-метиленбисакриламид (раствор АА)

- 48% акриламид;
- 1,5% метиленбисакриламид.

Собирающий гель (4%):

- 7,5 мл раствора АА на 100 мл;
- 50 мМ BisTris/HCl, pH 7,0;
- 0,5 М 6-аминокапроновая кислота.

Разделяющий гель:

- 1,88 мл раствора АА для 5% геля, 3,75 мл – для 10%;

- 50 мМ BisTris/HCl, pH 7,0;
- 0,5 М 6-аминокапроновая кислота.

Катодный буфер:

- 50 мМ Tricine/NaOH, pH 7,0;
- 15 мМ BisTris/HCl, pH 7,0.

Анодный буфер:

- 50 мМ BisTris/HCl, pH 7,0.

Разделяющий гель полимеризовали следующим образом: к 10 мл раствора для разделяющего геля добавляли катализаторы (40 мкл 10% персульфата аммония и 4 мкл ТЕМЕД), перемешивали и заливали между стёклами с помощью перистальтического насоса и прибора для создания линейного градиента.

После полимеризации разделяющего геля, к раствору для собирающего геля добавляли катализаторы (на 10 мл раствора 80 мкл 10% персульфата аммония и 8 мкл ТЕМЕД). Далее заливали между стёклами и удаляли пузырьки воздуха под зубцами «гребёнки».

После того как гель полимеризовался (15-20 мин.), кассеты с гелем помещали в прибор для электрофореза. В верхнюю камеру прибора заливали катодный буфер, в нижнюю – анодный буфер. Образованные гребенкой «карманы» промывали буфером, после чего наносили по 50 мкг хлорофилла.

Электрофорез проводили на приборе фирмы Hoefer (США) при напряжении 200В, в течение 4-5 ч. После окончания электрофореза осторожно извлекали гель и удаляли собирающий гель. Дорожки сканировали, затем один 1D-гель использовали для электрофореза во втором направлении по методу Леммли [Laemmli, 1970]. Гель помещали в буфер для образца (62,5 мМ Tris/HCl, pH 6,8; 2,5 SDS; 5% меркаптоэтанол; 10% глицерин) на 20 минут, после чего дорожку помещали в пластину для электрофореза. Второй 1D-гель помещали на ночь в раствор для окрашивания (0,2% Кумасси R-250, 40% этанол, 5% уксусная кислота). Затем отмывали избытки красителя в отмывочной смеси (40% этанол, 5% уксусная

кислота) в течение 3-4 часов. После чего гель сканировали и сохраняли изображение для последующей цифровой обработки.

2.11. Электрофорез белков в ПААГ по методу Леммли

Для проведения электрофореза использовали стеклянные пластины, содержащие 2 слоя ПААГ: слой собирающего геля и слой разделяющего геля.

Растворы для электрофореза:

Акриламид-метиленбисакриламид (30:1) (раствор АА)

- 30% акриламид;
- 1% метиленбисакриламид.

Собирающий гель 5,5% ПААГ:

- 17,5 мл раствора АА на 100 мл;
- 0,13 М Трис/НСl, рН=6,8;
- 0,1% SDS.

Разделяющий гель – 12,5%% ПААГ:

- 42 мл раствора АА на 100 мл;
- 0,39 М Трис/НСl, рН=8,8;
- 0,1% SDS.

Пятикратный буфер Леммли (1 л):

- 15 г Трис;
- 72 г глицин.

Разделяющий гель полимеризовали следующим образом: к 20 мл раствора для разделяющего геля добавляли катализаторы (200 мкл 10% персульфата аммония и 20 мкл ТЕМЕД), быстро перемешивали и заливали между стеклами. Для собирающего геля добавляли катализаторы :на 6 мл раствора 60 мкл 10% персульфата аммония и 6 мкл ТЕМЕД.

После того как гель заполимеризовался, «карманы», образованные гребенкой, промывали буфером Леммли. Затем наносили белки фракций, полученных при ионообменной хроматографии, по 20 мкг суммарного белка,

либо вкладывали между пластинами дорожку с комплексами тилакоидных мембран, полученную с помощью нативного электрофореза. В верхнюю и нижнюю камеры прибора заливали буфер Леммли (1% SDS в однократном буфере Леммли).

Электрофорез проводили на приборе фирмы Hoefer (США) при напряжении 120В, в течение 2-2,5 ч. После окончания электрофореза осторожно извлекали гель и удаляли собирающий гель.

После электрофореза гель окрашивали в течение ночи (0,2% Кумасси R-250, 40% этанол, 5% уксусная кислота). Избыток красителя отмывали в отмывочной смеси (40% этанол, 5% уксусная кислота) в течение 3-4 часов. Затем гель сканировали и сохраняли изображение для последующей цифровой обработки.

2.12. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану

В работе использовали метод переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану по Тоубину [Towbin et al., 1979], а также использовали нитроцеллюлозную мембрану 0,45 мкм (фирма Bio-Rad, Trans-Blot Transfer Medium). Метод основан на способности нитроцеллюлозной мембраны практически необратимо связывать белки.

Гель после электрофореза помещали в трансферный буфер для переноса белков (25 мМ Tris; 200 мМ глицин; 0,02% SDS; 20% этанол).

Перенос производили на приборе фирмы Hoefer (США) при исходном напряжении 220 мА в течение 1,5 ч. Гель вынимали и помещали в раствор для фиксации и окраски белков (0,2% Кумасси R-250, 40% этанол, 5% уксусная кислота) для подтверждения переноса белков на мембрану. Нитроцеллюлозную мембрану использовали для инкубации с антителами и обнаружения белков методом Вестерн-блоттинга.

2.13. Идентификация белков с помощью Вестерн-блот анализа

В работе использовали высокочувствительный метод иммунодетекции белков ECL (enhanced chemiluminescence) для определения иммобилизованных антигенов в сложных белковых смесях.

Метод позволяет определить до 10 нг белка, связанного с мембраной.

Для блокирования неспецифических сайтов связывания белков на нитроцеллюлозной мембране готовили блокирующий буфер (5% сухое обезжиренное молоко в буфере TBST).

Буфер TBST:

- 50 мМ Tris/HCl, pH-7,5;
- 200 мМ NaCl;
- 0,1% Tween 20.

Нитроцеллюлозную мембрану со связанными белками помещали в блокирующий буфер (10 мл на мембрану) на 1 ч при 4°C на мини-рокер-шейкере MR-1 фирмы BioSan. Затем добавляли первичные поликлональные антитела кроличьи HliA/HliB фирмы Abscam по 2,5 мкл на 10 мл (1:4000), оставляли на ночь на том же мини-рокер-шейкере при 4°C.

После инкубации с антителами мембраны промывали 2 раза по 10 мин в 10 мл TBST. Далее снова помещали в блокирующий буфер (10 мл на мембрану) и добавляли вторичные антитела (ослиные, антикроличьи, конъюгированные с пероксидазой хрена) по 0,4 мкл на 10 мл (1:20000). Мембраны инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Мембраны промывали буфером TBST 2 раза по 2 минуты, 3 раза по 5 минут.

Для обнаружения белков использовали методы ECL (enhanced chemiluminescence) и окрашивание 3,3',5,5'-тетраметилбензидином.

2.14. Обнаружение иммунных комплексов

Для проявки смешивали равные объёмы (по 0,5 мл на мембрану) растворов 1 и 2 для проявления. С помощью фильтровальной бумаги с мембраны, удаляли избытки буфера и наносили раствор для проявления. Инкубировали в течение 1-2 мин, после чего удаляли излишки раствора,

мембрану накрывали тонкой пленкой и экспонировали в темноте с рентгеновской пленкой Retina X-ray. Продолжительность экспозиции составляла 1-3 мин.

Для проявления рентгеновскую пленку сначала выдерживали в проявителе (5-7 мин), затем споласкивали водой и помещали в фиксаж на 7-10 мин.

Рабочие растворы:

Проявитель:

компоненты добавляются последовательно в воду, нагретую до 40°C.

- метол - 2,2 г;
- Na_2SO_3 - 72 г;
- гидрохинон - 8,8 г;
- $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 48 г;
- KBr - 4 г;
- вода - до 1 л.

Фиксаж:

- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 260 г;
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ - 17 г;
- NH_4Cl - 50 г;
- вода - до 1 л.

2.15. Обнаружение иммунных комплексов с помощью однокомпонентного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина

Для подтверждения результата использовали на порядок менее точный метод – определение белка с помощью 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМБ). Раствор наносили на нитроцеллюлозную мембрану после инкубации с антителами (не допуская высыхания мембраны). Инкубацию продолжали в течение 10-15 мин до появления интенсивно окрашенных полос. Для остановки реакции мембраны промывали дистиллированной водой.

Рентгеновские пленки и мембраны, обработанные ТМБ, сканировали, фотографии обрабатывали при помощи программы ImageJ [<http://rsbweb.nih.gov/ij/>]. Затем в программе Excel обрабатывали данные и строили графики.

2.16. Идентификация белков с помощью MALDI-TOF

MALDI - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (от англ. MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization). Это десорбционный метод «мягкой» ионизации, обусловленной воздействием импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом. Обычно используется в сочетании с времяпролетным масс-анализатором.

TOF (Time of Flight - времяпролетный) – принцип устройства анализатора масс-спектрометра, в котором заряженные частицы разделяются по времени пролета определенного расстояния. При этом время пролета частицы пропорционально отношению массы данной частицы к ее заряду.

Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле, окрашенном Coomassie Brilliant Blue, проводили следующим образом: кусочек геля размером 3-4 мм³ дважды промывали для удаления красителя в 100мкл 40% раствора ацетонитрила в 0,1М NH₄HCO₃ в течение 20 минут при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли 100мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 3,5мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0,05М NH₄HCO₃ с концентрацией 15мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 3ч при 37°C, затем к раствору добавляли 5,25мкл 0,5% ТФУ в 50% растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась следующим образом: на мишени смешивали по 1,5мкл раствора образца и 0,5мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (Aldrich, 10мг/мл в 20% водном ацетонитриле, 0,5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflextreme BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,01% (100ppm). Спектры получали в диапазоне масс 500-6500 m/z, выбирая мощность лазера, оптимальную для достижения наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была не хуже 2Да.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot [<http://www.matrixscience.com>]. Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3,3 (Bruker Daltonics, Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») провели поиск в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом геля. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >80 в базе данных NCBI считали определенными надежно ($p < 0,05$). Также были получены спектры фрагментации отдельных пептидов. С использованием программного обеспечения Biotoools 3,2 (Bruker Daltonics, Германия) проведен поиск по объединенным MS+MS/MS результатам. По полученным спектрам фрагментации были построены предполагаемые аминокислотные последовательности.

2.17. Конфокальная микроскопия

Использовали клетки, выращенные до середины логарифмической кривой роста. Клетки осаждали и промывали в PBS буфере (1,7 mM KH_2PO_4 ; 5,2 mM Na_2HPO_4 ; 150 mM NaCl, pH 7,4). Далее фиксировали смесью метанол/ацетон в соотношении 1:1 в течение 20 мин при -20°C . Затем клетки осаждали и трижды промывали буфером PBS. Далее проводили гидратацию

клеток в большом объеме буфера PBS в течение 60 мин при комнатной температуре. Клетки снова осаждали и добавляли первичные поликлональные антитела (HliA/HliB) 1:200 в блокирующем буфере (2% BSA, 0,2% Tween-20, 10% глицерин, 0,05% Na₃N в буфере PBS), оставляли на ночь при 4°C. Клетки промывали трижды в буфере PBS, добавляли вторичные антитела (Fitc) 1:50, инкубировали в течение 1 ч. Клетки снова промывали буфером PBS. Затем фиксировали на предметном стекле (10-15 мкл) в 80% глицерине и буфере PBS.

Снимки делали на микроскопе Leica TCS SP5. Условия съемки:

- 1) комплекс белков HliA/HliB с антителами – возбуждение при 488нм, излучение при 495-570 нм;
- 2) хлорофилл – возбуждение при 633, излучение при 640-750 нм.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью данной работы являлось определение локализации светоиндуцированных белков HliA/HliB в ФС1 цианобактерий *Synechocystis* PCC 6803, а также изучение возможных функций этих белков. Для исследования были использованы клетки дикого типа и мутанты, дефицитные по ФС2, мутанты, не образующие тримеры ФС1, и мутанты, не содержащие ФС1 и ФС2.

3.1. Соллюбилизация тилакоидных мембран и выделение хлорофилл-белковых комплексов

Тилакоидные мембраны лизировали мягким неионным детергентом β -DM, используя соотношение хлорофилл:детергент 1:15. В предварительных экспериментах для соллюбилизации тилакоидных мембран использовались различные концентрации β -DM (соотношение хлорофилл : детергент – 1:15; 1:18; 1:20). Для дальнейшей работы было выбрано соотношение хлорофилл : детергент 1:15, т.к. при этой концентрации достаточный выход хлорофилл-белковых комплексов сопровождался наименьшим образованием свободных пигментов. Такая же концентрация β -DM была использована в работе Ванг с соавт. [Wang et al., 2008]. При фракционировании хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран цианобактерии *Synechocystis* с помощью анионообменной хроматографии были получены три отдельных пика, охарактеризованных как с помощью абсорбционной спектроскопии, так и по составу белков и активности ФС1. Были выделены фракция тримеров ФС1, фракция, содержащая мономеры ФС1 вместе с комплексом ФС2, и фракция свободных хлорофиллов и каротиноидов (рис. 3.1, а). Содержание хлорофилла в тримерах ФС1 клеток дикого типа составляло в среднем $68 \pm 4\%$ от суммарного хлорофилла, т.е. большая часть хлорофилла тилакоидных мембран этой цианобактерии локализована в тримерах ФС1, как и у изученной ранее *Arthrospira platensis* [Rakhimberdieva et al., 2001].

Сравнение фотоиндуцированного изменения поглощения P700 в тримерах ФС1 и фотосинтетических мембранах клеток дикого типа указывало на активность выделенных тримеров ФС1. С помощью электрофореза в ПААГ установлено, что по составу белков фракция тримеров ФС1 из клеток дикого типа интактна, т.к. содержит все характерные для ФС1 белковые компоненты (рис. 3.1, б): высокомолекулярные PsaA и PsaB и низкомолекулярные белки (PsaD, F; PsaL; PsaE, C, K и PsaJ, X, I, M). Фракции, содержащие мономеры ФС1 и комплекс ФС2, представлены белками обеих фотосистем. Мономеры ФС1, полностью свободные от примеси ФС2, были выделены из клеток *Synechocystis*, лишенных ФС2.

3.2. Ассоциация белков HliA/HliB с тримерами ФС1 клеток дикого типа *Synechocystis*

С помощью вестерн-блоттинга изучали ассоциацию белков HliA/HliB с тримерами ФС1 из клеток дикого типа, выросших в условиях умеренного освещения (40 мкмоль фотонов/м²·с). Установлено, что белки HliA/HliB ассоциированы как с фракцией тримеров ФС1, так и с фракцией, содержащей мономеры ФС1 и комплекс ФС2 (рис. 3.1, в).

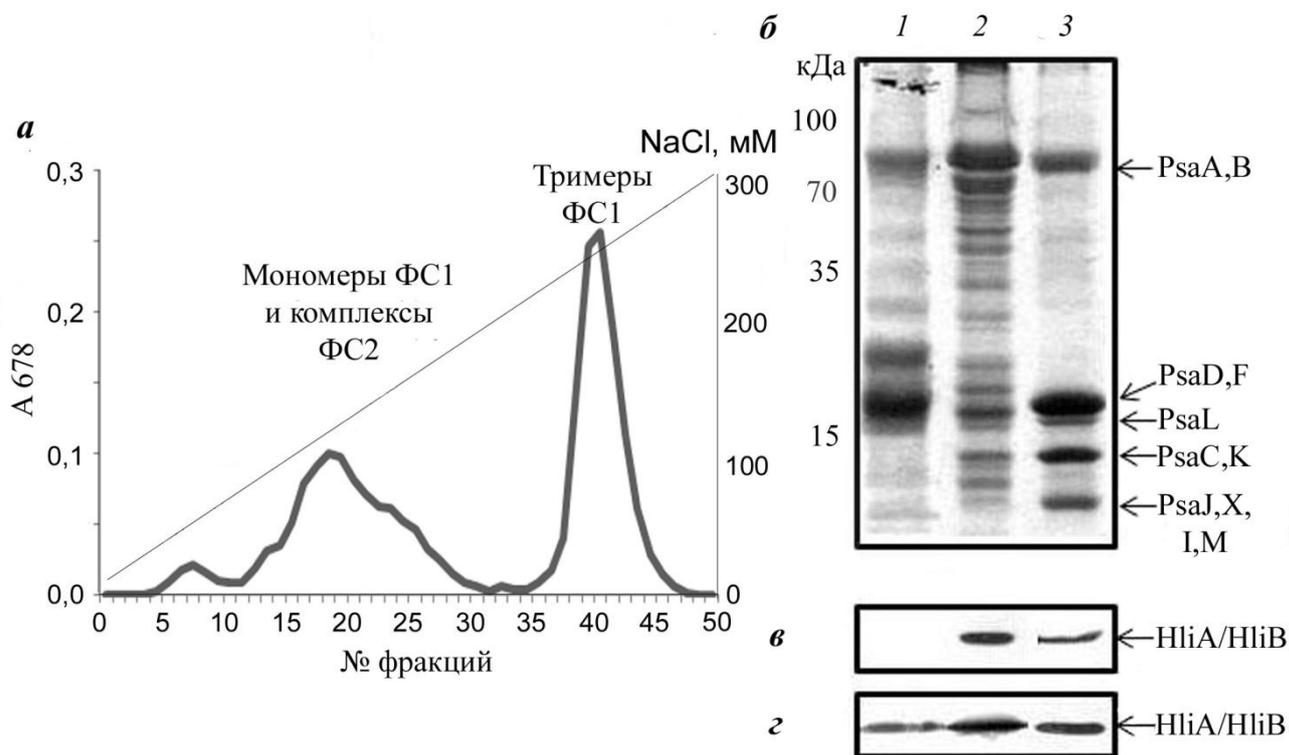


Рис. 3.1. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток *Synechocystis* дикого типа: *а*) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран с помощью анионообменной хроматографии; *б*) электрофореграмма белков тилакоидных мембран в SDS-PAGE: 1 – фракции №17-20, 2 – фракции №24-27, 3 – фракции №38-43; *в, г*) вестерн-блот анализ HliA/HliB белков до и после воздействия светового стресса соответственно.

Клетки цианобактерий дикого типа подвергали действию умеренного светового стресса. Для этого клетки, выращенные в условиях нормального света ($40 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$), освещали светом высокой интенсивности ($150 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$, 1 ч). Белки HliA/HliB обнаружены во фракции, содержащей мономеры ФС1 и комплекс ФС2 (фракции 17–20 и 23–26), и во фракции, содержащей тримеры ФС1 (рис. 3.1, з).

Установлено, что содержание HliA/HliB в тримерах ФС1 (фракции 40–43) после действия светового стресса увеличивается в 1,7 раза по сравнению с неосвещенными клетками.

3.3. Ассоциация белков HliA/HliB с мономерами ФС1 у мутанта, дефицитного по ФС2

Для того чтобы показать ассоциацию HliA/HliB с мономером ФС1, был использован мутант *Synechocystis*, лишенный ФС2 и содержащий в тилакоидных мембранах только ФС1. При фракционировании на анионообменной колонке хлорофилл-белковых комплексов мутанта выявлены три пика: тримеры ФС1, мономеры ФС1 и свободные пигменты. Как следует из рис. 3.2, а, содержание тримеров ФС1 понижено относительно содержания мономеров ФС1 у мутанта по сравнению с клетками дикого типа, выращенными в нормальных условиях (рис. 3.1, а). С помощью вестерн-блоттинга показано, что белки HliA/HliB ассоциированы только с фракцией мономеров ФС1 и не обнаружены во фракции тримеров ФС1 (рис. 3.2, б, в). Клетки мутанта без ФС2 были подвергнуты световому стрессу ($150 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$, 1 ч). После действия светового стресса белки HliA/HliB идентифицированы также во фракции, содержащей мономеры ФС1 (фракции 10–14), причем содержание HliA/HliB увеличивалось в 1,2 раза (рис. 3.2, з) по сравнению с клетками, выращенными при умеренном освещении ($40 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$).

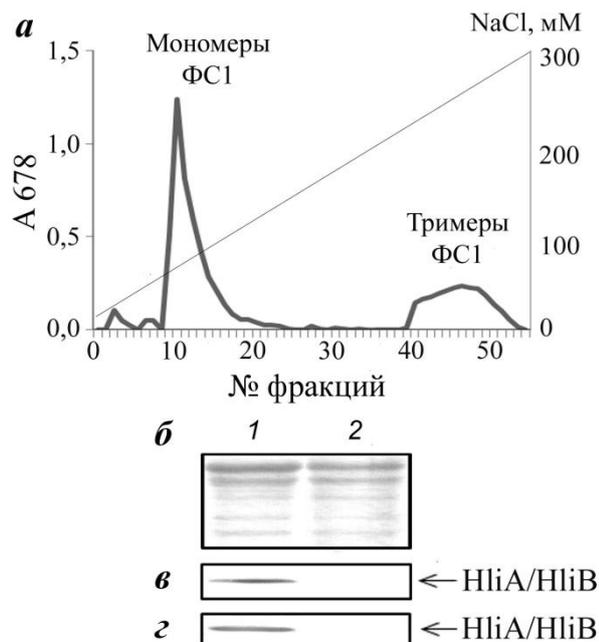


Рис. 3.2. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС2: а) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран с помощью анионообменной хроматографии; б) электрофореграмма белков тилакоидных мембран в SDS-PAGE: 1 – фракции №10-13, 2 – фракции №44-48; в, з) вестерн-блот анализ HliA/HliB белков до и после воздействия светового стресса соответственно.

Во фракции, содержащей тримеры комплексов ФС1, не удалось обнаружить белки HliA/HliB. Вероятно, это обусловлено тем, что при делеции ФС2 структура тилакоидной мембраны нарушена, и изменена структура тримера. По-видимому, эти изменения приводят к тому, что HliA/HliB не могут ассоциироваться с тримерами ФС1. Однако существует вероятность того, что у мутанта с делетированной ФС2 отсутствует необходимость синтеза белка HliA/HliB, т.к. здесь работают белки HliC и HliD.

Таким образом, исследование, проведенное на клетках мутантов *Synechocystis*, дефицитных по ФС2, показало, что белки HliA/HliB могут быть ассоциированы и с мономерами ФС1, и что синтез этих белков индуцируется умеренным световым стрессом.

3.4. Ассоциация белков HliA/HliB с пигмент-белковыми комплексами у мутанта Δ PsaL (без тримеров ФС1)

Для того чтобы выяснить, способны ли белки HliA/HliB ассоциироваться с мономерами ФС1 и комплексом ФС2 в отсутствие тримеров ФС1, изучали мутант без тримеров ФС1. При исследовании клеток мутанта, выращенных в нормальных условиях, белки HliA/HliB обнаружены во фракциях, содержащих мономеры ФС1 и ФС2 (рис. 3.3, в).

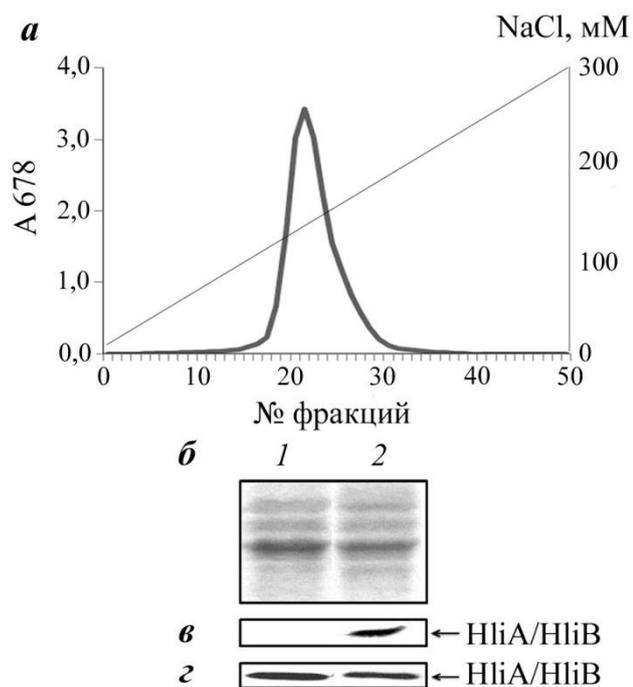


Рис. 3.3. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, не образующего тримеры ФС1: *a*) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран с помощью анионообменной хроматографии; *б*) электрофореграмма белков тилакоидных мембран в SDS-PAGE: 1 – фракции №19-21, 2 – фракции №24-27; *в,г*) вестерн-блот анализ HliA/HliB белков до и после воздействия светового стресса соответственно.

После действия светового стресса содержание белков HliA/HliB, связанных с мономерами ФС1 и комплексом ФС2, возрастало в 2 раза.

Как ранее было показано, использованным способом не получается разделить мономеры ФС1 и ФС2. Однако результаты исследований клеток, подвергнутых воздействию сильного света, несколько отличаются от клеток, выращенных на умеренном свете. Исследуемый белок HliA/HliB обнаружен во всех исследуемых фракциях, в том числе и во фракции, содержащей каротиноиды.

Таким образом, в отсутствие тримеров ФС1 белки HliA/HliB ассоциируются с мономерами ФС1 и комплексом ФС2.

3.5. Влияние условий выращивания клеток на ассоциацию белков HliA/HliB с тримерами ФС1

Условия выращивания мутанта, дефицитного по ФС2, отличаются от условий выращивания клеток дикого типа. Т.к. у мутантов, не содержащих ФС2, нарушен фотосинтез, их культивировали в среде, содержащей глюкозу в качестве источника энергии, при низкой интенсивности света (5 мкмоль фотонов/м²·с). Для того чтобы выяснить, влияют ли условия выращивания мутанта на ассоциацию HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами, клетки дикого типа выращивали в тех же условиях, что и клетки мутанта без ФС2 (рис. 3.4), и затем подвергали действию светового стресса.

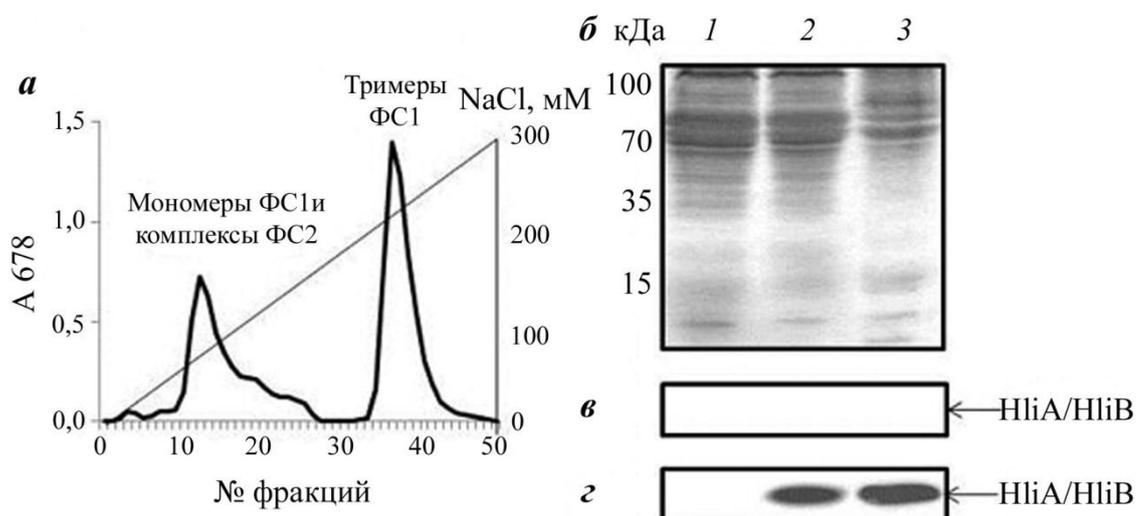


Рис. 3.4. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток *Synechocystis* дикого типа, выращенных в среде, содержащей глюкозу, и при низком освещении (5 мкмоль фотонов/м²·с): а) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран с помощью анионообменной хроматографии; б) электрофореграмма белков тилакоидных мембран в SDS-PAGE: 1 – фракции №12-16, 2 – фракции №19-23, 3 – фракции №37-40; в,г) вестерн-блот анализ HliA/HliB белков до и после воздействия светового стресса соответственно.

С помощью иммуноблотинга не удалось идентифицировать белки HliA/HliB ни в одной из фракций, содержащей хлорофилл-белковые комплексы.

Только после воздействия светового стресса на клетки дикого типа удалось идентифицировать белки HliA/HliB в составе фракций, содержащих мономеры ФС1 и ФС2, а также во фракции, содержащей тримеры ФС1 (рис. 3.4, в).

Показано, что выращивание в среде с глюкозой при низкой освещенности не приводит к отсутствию HliA/HliB в тримерах ФС1 дикого типа. Таким образом, отсутствие HliA/HliB в тримерах ФС1 мутанта без ФС2 не обусловлено условиями выращивания.

3.6. Индукция HliA/HliB в клетках мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС1 и ФС2

Для того чтобы выяснить, способны ли белки HliA/HliB синтезироваться в клетке в отсутствие фотосистем, изучали мутант, дефицитный по ФС1 и ФС2. Клетки мутанта были выращены в тех же условиях, что и клетки мутанта без ФС2, после чего были подвергнуты воздействию светового стресса.

При фракционировании лизата тилакоидных мембран мутанта, дефицитного по ФС1 и ФС2, обнаружены пики, частично совпадающие с пиками фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран клеток дикого типа. При исследовании данного мутанта белки HliA/HliB были идентифицированы во фракциях, содержащих белки.

Таким образом, показано, что в отсутствие сформированных комплексов ФС1 и ФС2 после воздействия сильного света обнаружено присутствие HliA/HliB в составе белков тилакоидных мембран мутанта.

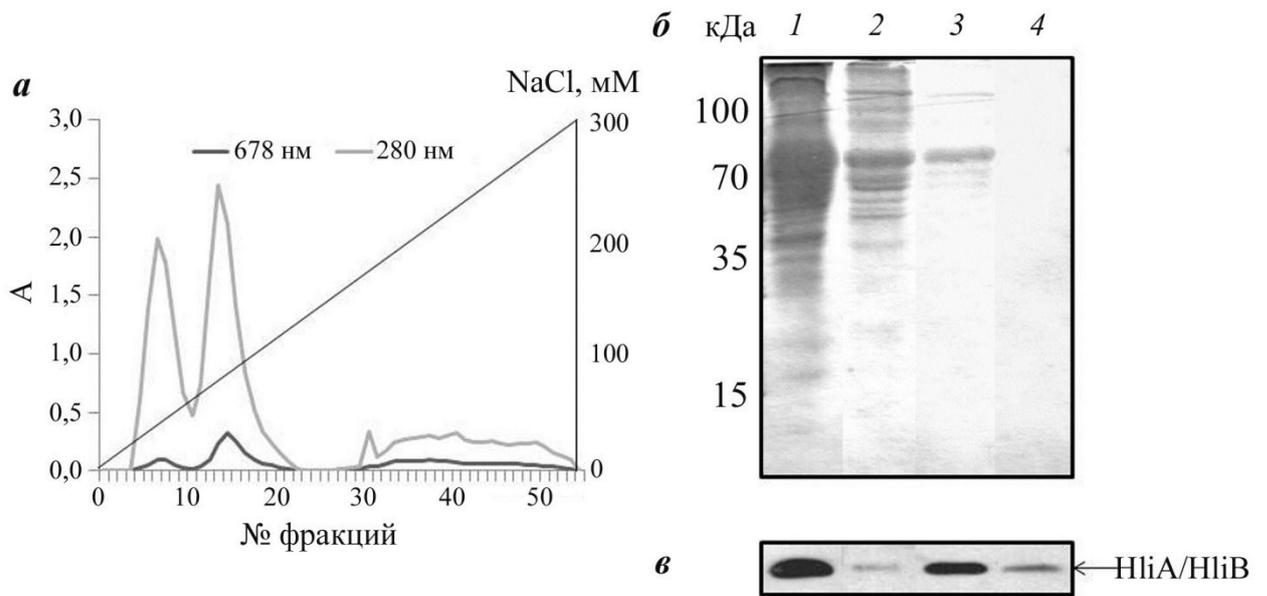


Рис. 3.5. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС1 и ФС2: а) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран с помощью анионообменной хроматографии; б) электрофореграмма белков тилакоидных мембран в SDS-PAGE: 1 – фракции №13-17, 2 – фракции №30-32, 3 – фракции №36-39, 4 – фракции №47-50; в) вестерн-блот анализ HliA/HliB белков после воздействия светового стресса.

3.7. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия клеток дикого типа и мутантов *Synechocystis*

Для изучения субклеточной локализации HliA/HliB белков были исследованы клетки *Synechocystis* дикого типа и трех мутантов (мутант без ФС2, мутант без тримеров и мутант, не содержащий ФС1 и ФС2) с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

На рис. 2.6 показано, что тилакоидные мембраны расположены вдоль клеточной мембраны в пристеночном слое. HliA/HliB белки совпадают по локализации с тилакоидными мембранами, поэтому клетки в центре менее окрашены, чем на периферии клеток. Установлено, что в клетках мутантов без фотосистем HliA/HliB белки обнаружены в тилакоидных мембранах. Таким образом, из полученных данных следует, что HliA/HliB белки синтезируются в клетках цианобактериях даже в отсутствие фотосистем. Это подтверждаем полученные выше данные.

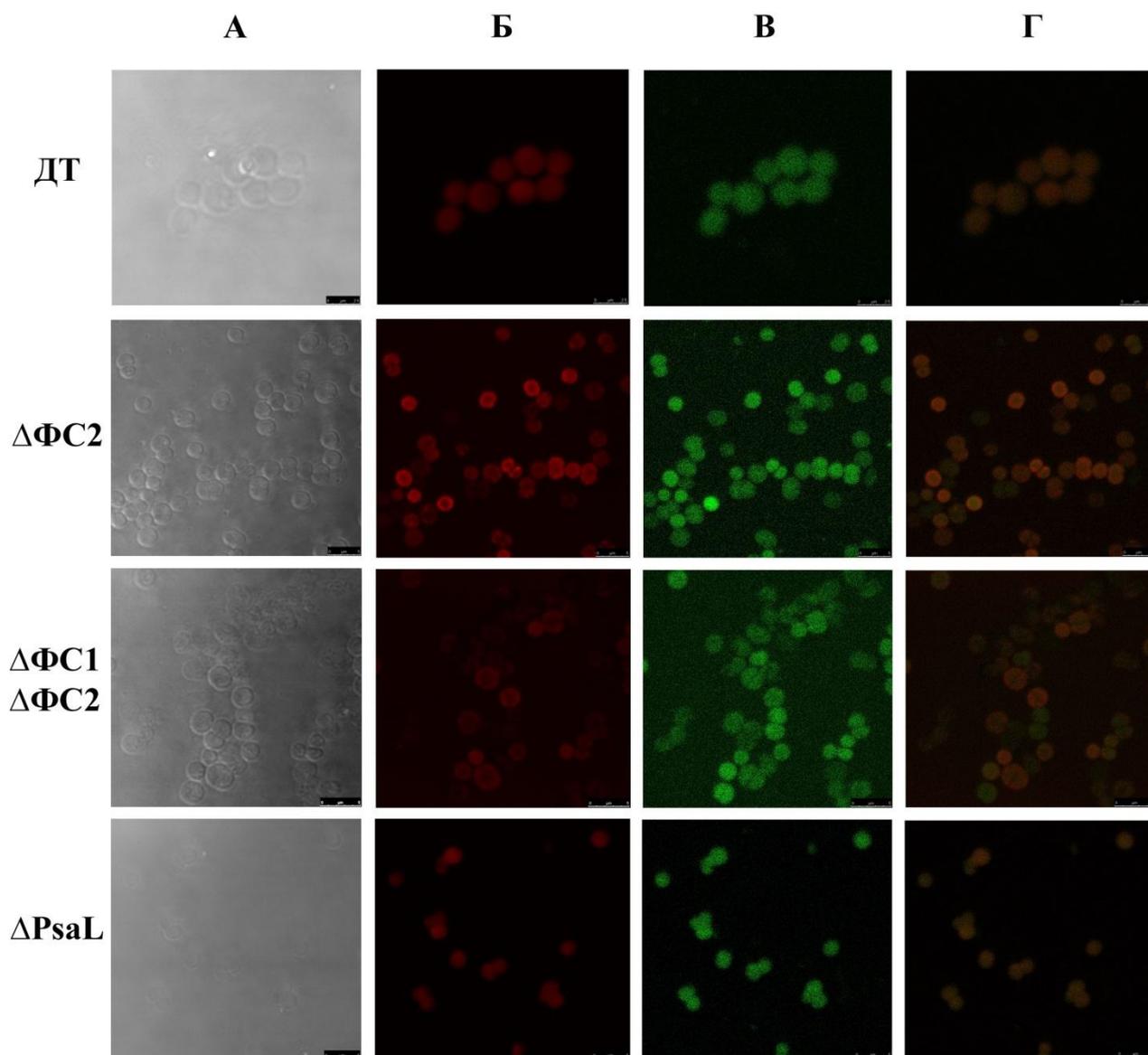


Рис. 3.6. Конфокальная микроскопия клеток цианобактерии *Synechocystis*, после светового стресса. ДТ – дикий тип клеток, $\Delta\Phi C2$ – мутант, дефицитный по $\Phi C2$, $\Delta\Phi C1 \Delta\Phi C2$ – мутант, не содержащий $\Phi C1$ и $\Phi C2$, $\Delta PsaL$ – мутант, не образующий тримеры. А – клетки в проходящем свете, фазовый контраст; Б – автофлуоресценция хлорофилла; В – сигнал HiA/HiB белков, детектированный с помощью моноклональных антител в сочетании с вторичными FITC антителами; Г – наложение сигналов. Бар = 10 мкм.

3.8. Определение локализации белков HliA/HliB с помощью двумерного электрофореза и MALDI-TOF

При фракционировании лизата тилакоидных мембран с помощью электрофореза в ПААГ в нативных условиях удалось выделить следующие комплексы (рис. 3.7, *a*): тримеры ФС1, мономеры ФС1, комплексы ФС2, цитохромный комплекс, АТФ-азный комплекс, комплекс NAD(P)H-хинон-оксидоредуктазы, а также зону свободных белков, отделившихся от комплексов в процессе выделения и фракционирования. Далее для разделения комплексов на их белковые составляющие был проведен электрофорез в ПААГ-ДДС-Na.

С помощью иммуноблотинга были идентифицированы белки HliA/HliB в нескольких комплексах и в зоне свободных белков (рис. 3.7, *в*). Для того, чтобы определить, с какими именно комплексами и белками ассоциированы исследуемые белки, была проведена идентификация белковых пятен с помощью MALDI-TOF. Результаты приведены в табл. 1 (см. приложение).

Установлено, что белки HliA/HliB ассоциированы с тримерами ФС1, с комплексами ФС2 и с мономерами ФС1. Также HliA/HliB обнаружены в зоне свободных белков, эти результаты подтверждают предположение о том, что данные белки при использованном способе фракционирования большей частью отделяются от хлорофилл-белковых комплексов и, вероятно, поэтому они не были обнаружены в предыдущих исследованиях.

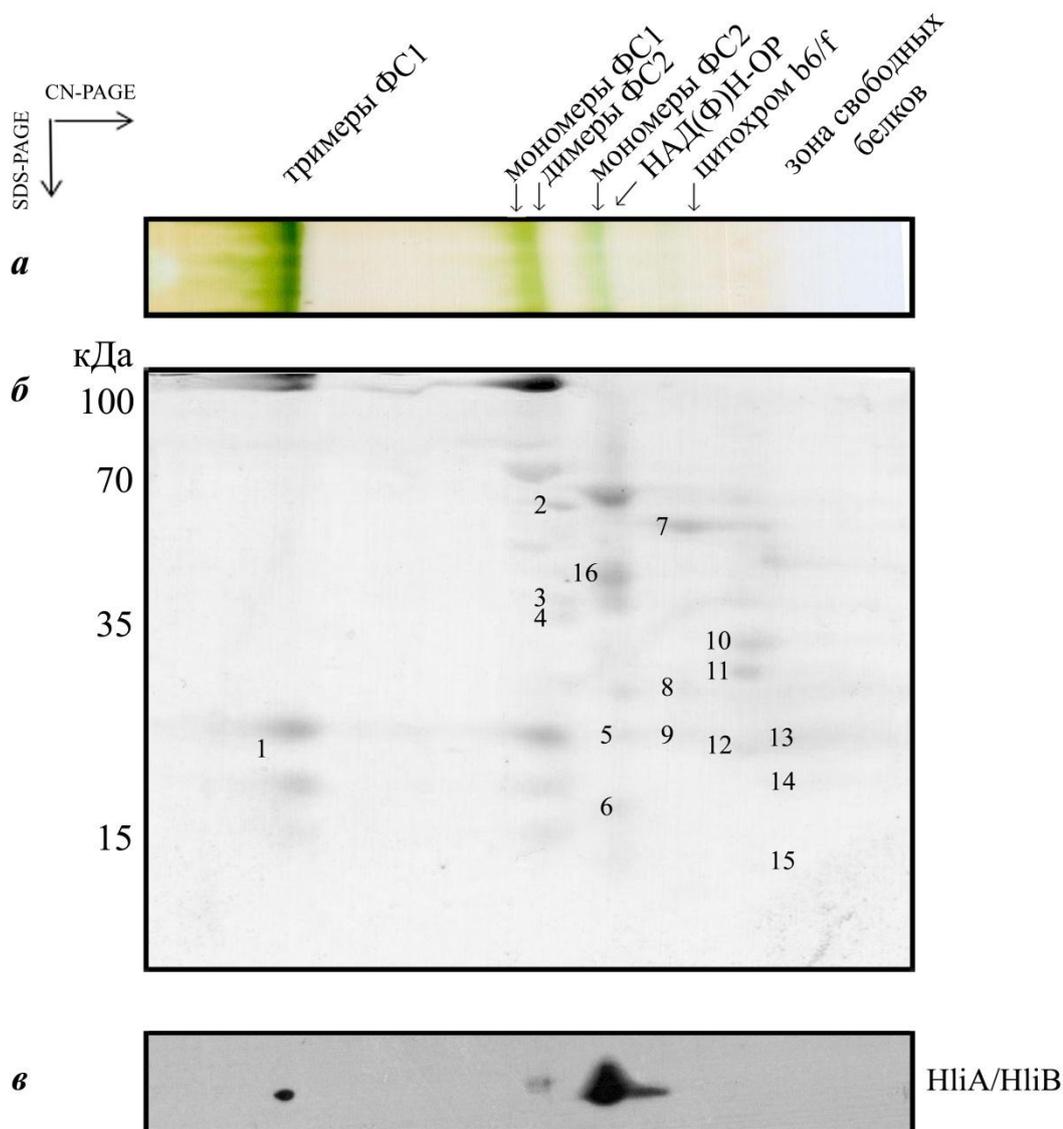


Рис. 3.7. Двумерная электрофореграмма и вестерн-блот анализ белковых комплексов тилакоидных мембран клеток *Synechocystis* дикого типа: *a*) электрофореграмма фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран в ПААГ в нативных условиях; *б*) электрофореграмма белков комплексов тилакоидных мембран в SDS-PAGE (1-16 – порядковые номера белковых пятен, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF); *в*) вестерн-блот анализ HliA/HliB белков после воздействия светового стресса.

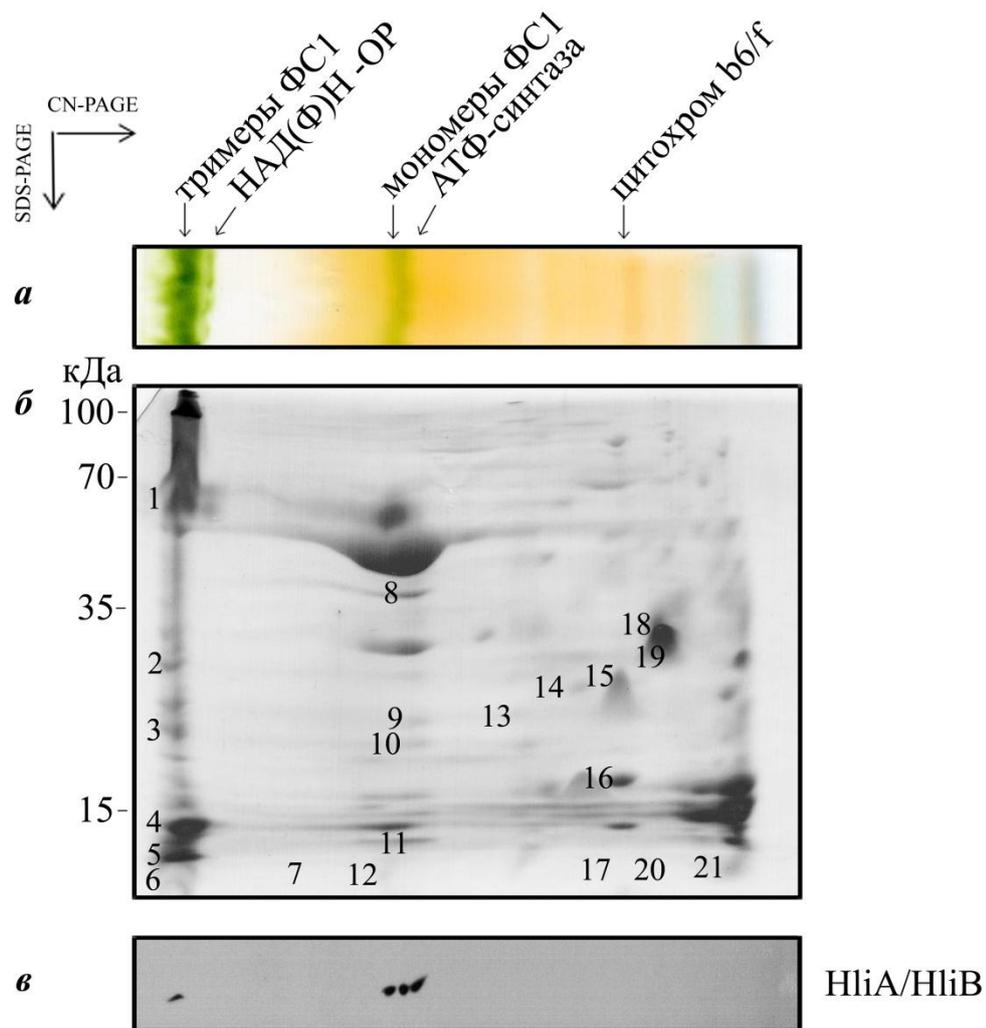


Рис. 3.8. Двумерная электрофореграмма и вестерн-блот анализ белковых комплексов тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС2: *a*) электрофореграмма фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран в ПААГ в нативных условиях; *б*) электрофореграмма белков комплексов тилакоидных мембран в SDS-PAGE (1-21 – порядковые номера белковых пятен, исследованных с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF); *в*) вестерн-блот анализ HliA/HliB белков после воздействия светового стресса.

При исследовании мутанта, дефицитного по ФС2, были определены все комплексы, содержащиеся в тилакоидных мембранах, за исключением комплекса ФС2 (рис. 3.8). В связи с отсутствием ФС2 зона свободных белков несколько увеличена.

С помощью иммуноблотинга удалось установить, что белки HliA/HliB ассоциированы с мономерами ФС1, также отмечен небольшой сигнал в области тримеров ФС1. С помощью MALDI-TOF удалось определить белки HliA/HliB в области свободных белков.

В мутанте, не содержащем ФС1 и ФС2, делетированы следующие белки: $\Delta PsaAB$, $\Delta PsbD_1C$, $\Delta PsbB$, $\Delta PsbD_2$. В связи с этим они не способны образовывать комплексы ФС1 и ФС2, однако были обнаружены остальные комплексы, такие как АТФ-азный комплекс, комплекс NAD(P)H-хинон-оксидоредуктазы, цитохромный комплекс.

Как показано на рис.3.9, белки HliA/HliB обнаружены в области свободных белков, как и у клеток дикого типа. Однако, с помощью MALDI не удалось идентифицировать изучаемые белки. Вероятно, это связано с тем, что количество белков HliA/HliB в геле было незначительным и его положение на электрофореграмме, окрашенной Кумасси, было трудно определить. При этом присутствие белков HliA/HliB определено с помощью иммуноблотинга (рис.3.9, з). Эти данные подтверждают полученные ранее с помощью анионообменной хроматографии о том, что белки HliA/HliB продолжают синтезироваться в клетке и в отсутствие ФС1 и ФС2.

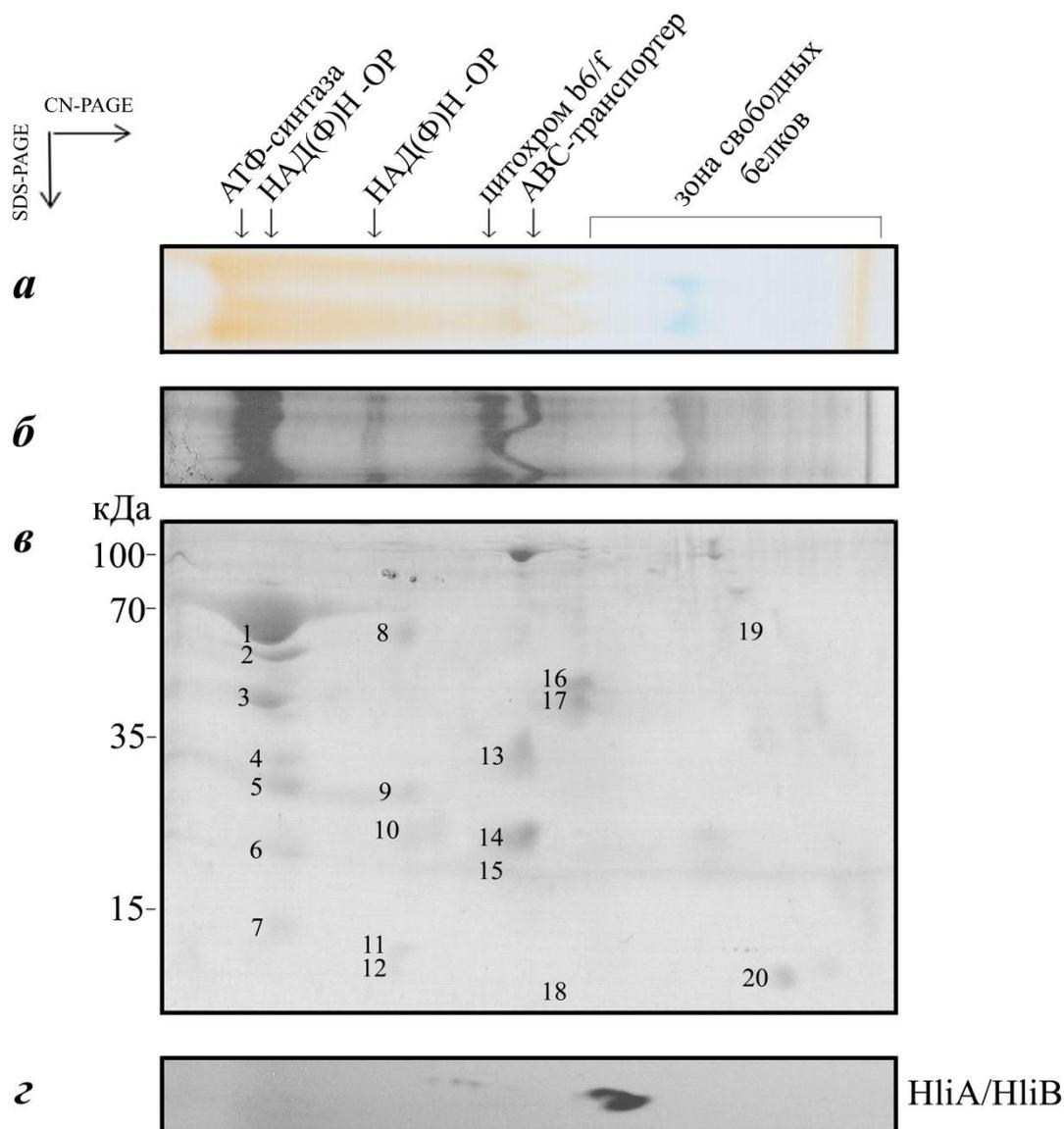


Рис. 3.9. Двумерная электрофореграмма и вестерн-блот анализ белковых комплексов тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС1 и ФС2: *a*) электрофореграмма фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран в ПААГ в нативных условиях; *б*) электрофореграмма фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран в ПААГ в нативных условиях, окрашенная Кумасси 250; *в*) электрофореграмма белков комплексов тилакоидных мембран в SDS-PAGE (1-20 – порядковые номера белковых пятен, исследованных с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF); *д*) вестерн-блот анализ HliA/HliB белков после воздействия светового стресса.

3.9. Активность ФС1 клеток дикого типа и мутанта, дефицитного по ФС2, различающихся по содержанию белков HliA/HliB

Для оценки влияния белков HliA/HliB на фотохимическую активность ФС1 изучали скорость электронного транспорта в ФС1 клеток дикого типа и мутанта, дефицитного по ФС2, с различным содержанием HliA/HliB белков. Были использованы два варианта сравнения.

1) сравнивали активность ФС1 клеток ДТ, у которых не удалось идентифицировать HliA/HliB с помощью вестерн-блот анализа, с клетками мутанта без ФС2. Клетки ДТ и мутанта выращивали при низком освещении и в присутствии глюкозы.

2) сравнивали активность ФС1 у дикого типа, выросшего при низкой освещенности, и у мутанта после действия светового стресса (150 мкмоль фотонов/м²·с, 1 ч).

Тилакоидные мембраны были выделены из клеток дикого типа и мутанта без ФС2, выращенных при низком освещении (5 мкмоль фотонов/м²·с, 1 ч). В случае мутанта без ФС2 клетки подвергали световому стрессу (150 мкмоль фотонов/м²·с, 1 ч) в течение 2 ч. Фотохимическую активность ФС1 оценивали по поглощению кислорода в результате транспорта электрона от донорной пары (DCIP/аскорбиновая кислота) через ФС1 к метилвиологену (МВ), который после фотовосстановления окисляется кислородом. Тилакоидные мембраны вносили в ячейку, так чтобы концентрация хлорофилла составляла 20 мкг/мл.

Скорость электронного транспорта выражали в мкмоль O₂/ч·мг хлорофилла.

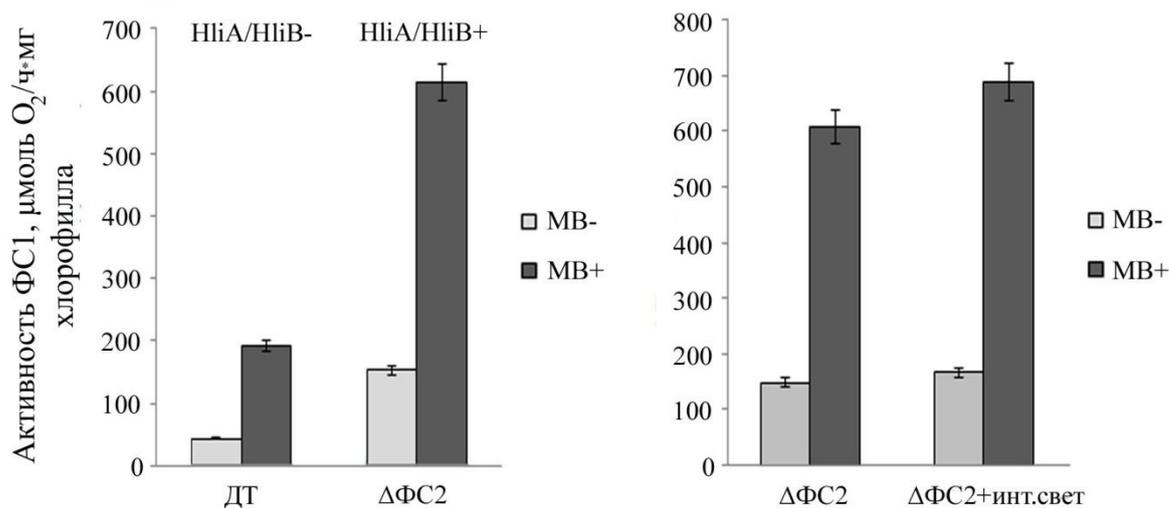


Рис. 3.10. Фотохимическая активность ФС1 тилакоидных мембран клеток *Synechocystis* дикого типа (ДТ) и мутанта, дефицитного по ФС2 (Δ ФС2). Инт. Свет – 150 мкмоль фотонов/м²·с, в течение 1 ч. В отсутствии HliA/HliB белков – «HliA/HliB-», в присутствии HliA/HliB белков – «HliA/HliB+». MB – метилвиологен (получено совместно с Ю.В. Большевцевой).

С помощью измерения метилвиологен-зависимого поглощения кислорода показано, что скорость электронного транспорта через ФС1 у мутанта без ФС2 значительно выше (в 4 раза), чем у клеток дикого типа (рис. 3.10).

Ранее было показано, что содержание HliA/HliB у мутанта без ФС2 в условиях светового стресса возрастает в 1,2 раза. Обнаружено, что скорость электронного транспорта у мутанта, выросшего при низкой освещенности, после светового стресса увеличивается на 15-17 % (рис. 3.10), что коррелирует с увеличением содержания HliA/HliB белков в условиях стресса (рис. 3.2). Наши результаты согласуются с опубликованными ранее данными литературы, полученными на мутантах *Synechocystis*, лишенных Hli белков. Таким образом, HliA/HliB белки важны для оптимальной фотохимической активности ФС1.

Обнаружены существенные отличия в активности ФС1 у дикого типа и мутанта без ФС2 (в 3-4 раза), которые, вероятно, связаны с содержанием

белков HliA/HliB. Не исключено, что локальные изменения в структуре пигмент-белковых комплексов привели к возрастанию его рыхлости и изменению сродства к донорам и акцепторам.

Повышенная активность ФС1 (увеличение на 12-15% ± 5) у мутантов без ФС2 после стрессового действия коррелирует с увеличением содержания HliA/HliB. Это может свидетельствовать о защитной роли белков HliA/HliB.

При измерении на ПАМе активности ФС1 клеток дикого типа и мутанта без ФС2, выросших при низком свете, показано, что скорость темнового восстановления ФС1 и у дикого типа и у мутанта без ФС2 одинаковое.

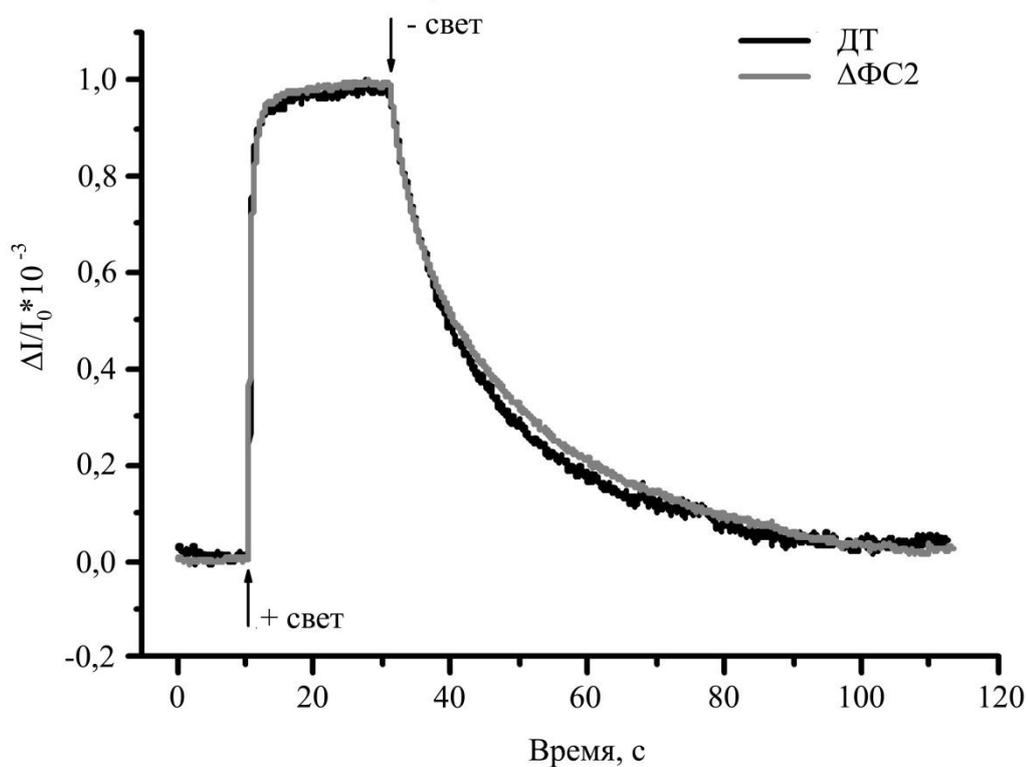


Рисунок 3.11. Активность ФС1 клеток *Synechocystis* дикого типа и мутанта, дефицитного по ФС2, выросших при низком свете (получено совместно с Ю.В. Большевцевой).

По-видимому, различие в скорости поглощения кислорода ФС1 появляется не за счет изменения сродства пигмент-белкового комплекса ФС1

к донору, а за счет изменения сродства пигмент-белкового комплекса ФС1 к акцептору.

Возможно, что метилвиологен (а также кислород) легче проникает к ФС1 за счет большей структурной доступности комплекса. Вероятно, благодаря HliA/HliB, ФС1 мутанта, дефицитного по ФС2, получает возможность сбрасывать электроны на метилвиологен быстрее, чем ФС1 клеток дикого типа.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отличие от высших растений у цианобактерий до 80% хлорофиллов клеток локализовано в комплексе ФС1 [Rakhimberdieva et al., 2001], который существует в тилакоидах преимущественно в виде тримеров [Shen et al., 1993; Kruip et al., 1999; Karapetyan et al., 1999; Карапетян и др., 2014]. Предполагают, что наличие тримеров ФС1 необходимо для большей стабильности комплекса и защиты от фотодеструкции [Wang et al., 2008; Karapetyan et al., 1999]. В состав хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран кроме коровых белков, таких как PsaA, PsaB, и низкомолекулярных белков входят дополнительные белки, такие как IsiA и Hli. В работе изучали ассоциацию HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тримеров и мономеров ФС1 тилакоидных мембран цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803. Большинство статей, посвященных изучению локализации белков Hli в хлорофилл-белковых комплексах, связано с исследованием их локализации в ФС2. Показано, что светоиндуцируемые белки HliA/HliB локализованы в ФС2 цианобактерий [Yao et al., 2007; Promnares et al., 2006; Hernandez-Prieto et al., 2011; Yao et al., 2012; Sinha et al., 2012]. Предполагают, что белки HliA/HliB участвуют в стабилизации хлорофилла для его повторного использования при репарации поврежденного комплекса ФС2 и биогенезе вновь синтезированных комплексов ФС2 [Staleva et al., 2015; Hernandez-Prieto et al., 2011; Yao et al., 2012]. Противоречивые данные были получены о локализации HliA/HliB в ФС1. Так, было обнаружено, что белки HliA/HliB не связаны с ФС1 *Synechocystis* [Hernandez-Prieto et al., 2011]. С другой стороны, показано, что белки HliA/HliB содержатся в тримерах ФС1 и не обнаруживаются в мономерах ФС1 цианобактерии [Wang et al., 2008]. Нами установлено, что белки HliA/HliB ассоциированы с тримерами ФС1 из клеток, выращенных при нормальных условиях, и их содержание увеличивается в 1,7 раза в условиях светового стресса. Наши результаты согласуются с данными Wang

с соавт. [Wang et al., 2008] относительно наличия белков Hli в тримерах ФС1 клеток дикого типа в стрессовых условиях. В работе Wang с соавт. [Wang et al., 2008] белки Hli не обнаружены во фракции, содержащей мономеры ФС1 и комплекс ФС2, что, возможно, обусловлено фотодеструкцией при использовании сильного светового стресса (200–400 мкмоль фотонов/м²·с в течение 12 ч). Сходные с нашими результатами данные о присутствии белков HliA/HliB в клетках, выращенных при низкой интенсивности света, были получены в ранее опубликованной работе Yao с соавт. [Yao et al., 2007].

При исследовании мутантов *Synechocystis* без ФС2 нами впервые показано, что в клетках цианобактерий, выращенных в нормальных условиях, белки HliA/HliB ассоциированы с мономерами ФС1 цианобактерии, и их содержание увеличивается в условиях светового стресса. Эти данные согласуются с работой, проведенной на клетках высших растений. Было показано, что эволюционный гомолог HliP – односпиральный белок Ohp *Arabidopsis thaliana* – связан с мономером ФС1 [Jansson et al., 2000].

Разноречивость полученных данных может быть обусловлена тем, что время обновления белков ФС1 существенно превышает таковое в ФС2 [Yao et al., 2012]. Из-за этого содержание дополнительных белков HliA/HliB, участвующих в реутилизации хлорофилла и ассоциированных с ФС1, ниже, чем в ФС2. Возможно, их содержание ниже уровня обнаружения методов, используемых в работах. Кроме того, отличия могут быть вызваны различными условиями культивирования клеток [Yao et al., 2012]. Связь Hli белков с мономерами и тримерами ФС1 не кажется удивительной, т.к. они, по-видимому, могут выполнять функции запасания и сохранения хлорофилла и являться белками-переносчиками хлорофилла при нарушениях ФС1 и синтезе насцентных комплексов ФС1, как это предполагается для ФС2. Считается, что Hli белки участвуют в системе координированной доставки пигментов и вновь синтезированных апобелков при биогенезе

фотосинтетических комплексов ФС1 и ФС2, уменьшая риск накопления фототоксичных несвязанных хлорофиллов [Chidgrey et al., 2014].

Как следует из наших данных, белки HliA/HliB могут быть ассоциированы как с мономерами, так и с тримерами ФС1, что предполагает локализацию сайта связывания этих белков на поверхности мономера ФС1, не экранируемой при олигомеризации. Сходная локализация на поверхности ФС1 характерна и для дополнительного белка IsiA [Boekema et al., 2001]. При исследовании мутантов без ФС2 нами установлено, что белки HliA/HliB не ассоциированы с тримерами ФС1. Тот факт, что относительное содержание тримеров ФС1 в клетках мутанта без ФС2 по сравнению с клетками дикого типа снижено (рис. 3.1, *a* и рис. 3.2, *a*), свидетельствует в пользу предположения о важности присутствия белков Hli для стабилизации тримеров ФС1 [Wang et al., 2008]. Тримеры ФС1, выделенные из клеток дикого типа и мутанта без ФС2, были фотохимически активны.

Не исключено, что существенные изменения структуры хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран у мутантов без ФС2 [Van de Meene et al., 2012] препятствуют связыванию HliA/HliB с тримерами ФС1. По-видимому, делеция ФС2 вызывает нарушение структуры хлорофилл-белковых комплексов тилакоидной мембраны и/или изменение структуры тримера ФС1, и это приводит к тому, что HliA/HliB не могут ассоциироваться с тримерами ФС1 у мутанта без ФС2. На изменения в структуре функционального мегакомплекса, состоящего из антенного комплекса фикобилисом, ФС1 и ФС2 [Liu et al., 2013], указывают данные по содержанию фикобилисом (максимум поглощения 625 нм).

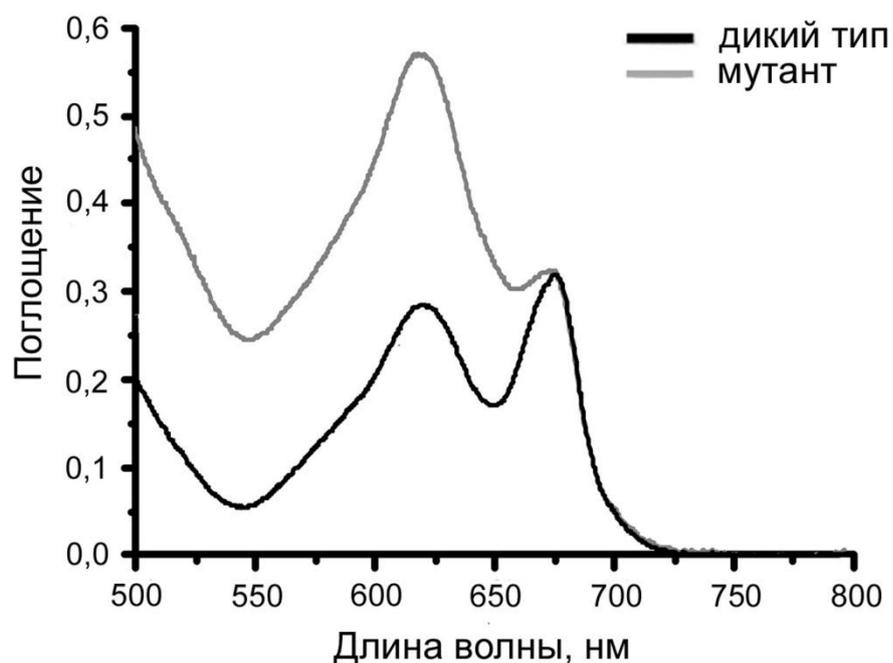


Рис. 4.1. Спектры поглощения клеток *Synechocystis* дикого типа и мутанта, дефицитного по ФС2. Спектры нормированы при максимуме поглощения хлорофилла (680 нм).

Судя по спектрам поглощения клеток цианобактерии дикого типа и мутанта без ФС2, нормированных в максимуме поглощения хлорофилла, содержание фикобилисом у мутанта без ФС2 вдвое выше, чем в клетках дикого типа цианобактерий (рис. 4.1). По-видимому, при делеции ФС2 структура мегакомплекса тилакоидной мембраны существенно нарушена, что также может приводить к изменениям в структуре тримеров ФС1, препятствующим ассоциации белков HliA/HliB.

Для проверки предположения о том, что условия выращивания клеток не приводят к делеции белков HliA/HliB в тримерах ФС1, клетки дикого типа были выращены в тех же условиях, что и мутант без ФС2. Белки HliA/HliB удалось идентифицировать в тримерах ФС1 клеток дикого типа после воздействия светового стресса. Таким образом, выращивание клеток в среде с глюкозой при низкой освещенности не влияет на ассоциацию белков

HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами. Только нарушения, связанные с мутацией - отсутствием ФС2, вызывают изменения в ассоциации Hli с тримерами ФС1. Как следует из рис. 3.2, в, у мутанта без ФС2 HliA/HliB экспрессируются даже при низком освещении (5 мкмоль фотонов/м²·с), в отличие от клеток дикого типа, у которых в этих условиях не обнаруживаются белки HliA/HliB (рис. 3.4, в). Это свидетельствует о том, что мутант более подвержен световому стрессу, и экспрессия стрессовых белков HliA/HliB у мутанта индуцируется даже в условиях низкой освещенности. Сходная экспрессия HliA/HliB при низкой освещенности показана для мутантов, лишенных ФС1 [Wang et al., 2008; Hernandez-Prieto et al., 2011].

Для выявления возможной взаимозависимости ассоциации HliA/HliB с мономерами и тримерами ФС1 был изучен мутант *ΔpsaL*, не содержащий тримеров ФС1. Обнаружено, что отсутствие тримеров ФС1 не влияет на связывание белков HliA/HliB с мономерами ФС1 и комплексами ФС2. По-видимому, изменения в тилакоидной мембране из-за отсутствия тримеров ФС1 не являются столь значительными и не приводят к изменениям в связывании белков HliA/HliB с другими хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидов.

Таким образом, на основании наших результатов можно заключить, что белки HliA/HliB могут связываться с основными хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран цианобактерий: мономерами ФС1, комплексом ФС2 [Yao et al., 2007] и тримерами ФС1. Ассоциация HliA/HliB как с ФС1, так и с ФС2 указывает на их универсальные функции в защите фотосистем цианобактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свет является источником энергии, обеспечивающей рост растений за счет фотосинтеза. Однако свет обладает и неблагоприятным действием на растения. Избыточный свет, поглощенный фотосинтетическим аппаратом, стимулирует образование вредных для растений активных форм кислорода, что может привести к фотодеструкции. Важную роль в защите фотосинтетического аппарата цианобактерий от деструкции играют светоиндуцируемые стрессовые белки Hliр, которые необходимы для выживания организмов в условиях высокой интенсивности света. В работе была изучена ассоциация HliA/HliB белков с хлорофилл-белковыми комплексами тримеров и мономеров ФС1 тилакоидных мембран цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803.

Нами установлено, что HliA/HliB белки ассоциированы с тримерами ФС1 клеток дикого типа, выращенных при нормальных условиях освещения, и их содержание увеличивается в 1,7 раза в условиях светового стресса.

Впервые показано, что белки HliA/HliB ассоциированы не только тримерами, но и с мономерами ФС1 цианобактерий, что предполагает локализацию сайта связывания этих белков на поверхности мономера ФС1, не экранируемой при образовании тримера.

В ходе настоящей работы было показано, что выращивание клеток в среде с глюкозой при низкой освещенности не влияет на ассоциацию белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами.

На мутанте $\Delta psal$, не содержащем тримеров ФС1, обнаружено, что отсутствие тримеров ФС1 не влияет на связывание белков HliA/HliB с мономерами ФС1 и комплексами ФС2.

На мутанте, не содержащем ФС1 и ФС2 ($\Delta PsaA$, $\Delta PsaB$, $\Delta PsbD1$, $\Delta PsbC$, $\Delta PsbDII$, $\Delta CP47$), показано, что HliA/HliB белки обнаруживаются в составе белков тилакоидных мембран мутанта. Это позволяет предположить, что HliA/HliB белки помимо защиты фотосинтетического аппарата от

избыточного света выполняют другие клеточные функции, такие как, например, регуляция биосинтеза хлорофилла.

Сравнение фотохимической активности ФС1 у клеток, содержащих и не содержащих HliA/HliB белки, указывает на важную роль этих белков для оптимальной активности фотосистемы.

Таким образом, на основании наших результатов можно заключить, что HliA/HliB белки могут связываться с основными хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран цианобактерий: с мономерами ФС1, с комплексом ФС2 и с тримерами ФС1. Ассоциация HliA/HliB белков как с ФС1, так и с ФС2, указывает на их универсальные функции в защите фотосистем цианобактерий. По-видимому, Hli белки являются переносчиками хлорофилла и участвуют в запасании и сохранении хлорофилла при биогенезе и фотодеструкции хлорофилл-связывающих белков ФС1 и ФС2.

Исследование локализации стрессовых свето-индуцируемых белков имеет не только самостоятельный научный интерес, но и расширяют представления о защите фотосинтетического аппарата от фотодеструкции. Эти данные могут быть использованы для изучения регуляции процессов фотосинтеза, определяющих продуктивность сельскохозяйственных растений.

ВЫВОДЫ

1. При оптимальных условиях освещения светоиндуцируемые HliA/HliB белки обнаружены в тилакоидных мембранах клеток дикого типа, а также мутантов *Synechocystis* без фотосистемы 2 (ФС2), без обеих фотосистем и не содержащих тримеры фотосистемы 1 (ФС1).
2. Впервые показано, что HliA/HliB белки ассоциированы не только с тримерами, но и с мономерами ФС1.
3. Показано, что отсутствие тримеров ФС1 у мутанта *ΔpsaL* не влияет на ассоциацию HliA/HliB белков с мономерами ФС1 и комплексом ФС2.
4. Частичный переход цианобактерий на гетеротрофное питание не влияет на световую индукцию HliA/HliB белков.
5. Обнаружено, что в тилакоидных мембранах мутантов *Synechocystis*, не содержащих ФС1 и комплекс ФС2, HliA/HliB белки присутствуют. Это позволяет предположить, что HliA/HliB белки выполняют разнообразные клеточные функции.
6. На основании полученных данных о том, что HliA/HliB белки находятся в ассоциированном состоянии как с тримерами и мономерами фотосистемы 1, так и с комплексом фотосистемы 2 выдвинуто предположение об универсальной роли этих белков в защите фотосинтетического аппарата от избыточного света.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Большевцева Ю.В., Мажорова Л.Е., Терехова И.В., Егорова Е.А., Шугаев А.Г., Рахимбердиева М.Г., Карапетян Н.В. Новый тип адаптации цианобактерии *Spirulina platensis* к световым условиям // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. С. 503-508.
2. Карапетян Н.В. Нефотохимическое тушение флуоресценции у цианобактерий // Биохимия. 2007. Т. 72 С. 1385–1395.
3. Карапетян Н.В., Большевцева Ю.В., Юрина Н.П., Терехова И.В., Шубин В.В. Длинноволновые хлорофиллы фотосистемы 1 цианобактерий: происхождение, локализация и функции // Биохимия. 2014. Т. 79. С. 283-292.
4. Осипенкова О.В., Одинцова М.С., Юрина Н.П. Влияние световой, гормональной и углеводной сигнальных систем на экспрессию генов ELIP у *gun*- мутантов *Arabidopsis thaliana* // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т.46. С. 363–371.
5. Стручкова И.В., Кальясова Е.А Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле // Электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет. 2012. С. 60.
6. Юрина Н. П., Погульская Е. Н., Карапетян Н. В. Действие фотодеструкции пластид из обработанных норфлуразоном проростков на экспрессию ядерных генов, кодирующих стрессовые белки хлоропластов ячменя // Биохимия. 2006. Т. 71, №4. С. 533-540.
7. Юрина Н.П., Мокерова Д.В., Одинцова М.С. Светоиндуцируемые стрессовые белки пластид фототрофов // Физиол. Растений. 2013. Т. 60, №5. С. 611–624.
8. Юрина Н.П., Одинцова М.С. Сигнальные системы растений: пластидные сигналы и их роль в экспрессии ядерных генов // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 485–498.

9. Юрина Н.П., Осипенкова О.В., Одинцова М.С. Тетрапирролы высших растений: биосинтез, его регуляция и их роль в передаче ретроградных сигналов // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 3–16.
10. Adamska I. ELIPs: light induced stress proteins // *Physiol. Plant.* 1997. - V. 100. P. 798–805.
11. Adamska I. The Elip family of stress proteins in the thylakoid membranes of pro- and eukaryote // *Regulation of Photosynthesis* / Eds Aro E.M., Andersson B. Dordrecht: Kluwer. 2001. P. 487–505.
12. Adamska I., Kloppstech K. Low temperature increases the abundance of early light-inducible transcript under light stress conditions // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 30221-30226.
13. Adamska I., Ohad I., Kloppstech K. Synthesis of the early light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress // *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 1992. - V. 89. P. 2610–2613.
14. Adamska I., Roobol-Boza M., Lindahl M., Andersson B. Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea/ // *J. Biochem.* 1999. V. 260. P. 453-460.
15. Allen J.F. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1098. P. 275-335
16. Andersson U., Heddad M., Adamska I. Light stress-induced one-helix protein of the chlorophyll *a/b*-binding family associated with photosystem I // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. P. 811–820.
17. Auge G.A., Perelman S., Crocco C.D., Sánchez R.A., Botto J.F. Gene expression analysis of light-modulated germination in tomato seeds // *New Phytol.* 2009. V. 183. P. 301–314.
18. Bae G., Choi G. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. V. 59. P. 281–311.
19. Baena-González E., Baginsky S., Mulo P., Summer H., Aro E.M., Link G. Chloroplast transcription at different light intensities. Glutathione-mediated

- phosphorylation of the major RNA polymerase involved in redox-regulated organellar gene expression // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. P. 1044–1052.
20. Ben-Shem A., Frolov F., Nelson N. Crystal structure of plant photosystem I // *Nature.* 2003. V. 426. P. 630-635.
21. Bhaya D., Dufresne A., Vaultot D., Grossman A. Analysis of the hli gene family in marine and freshwater cyanobacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. V. 215. P. 209-219.
22. Biggins J., Bruce D. Regulation of excitation energy transfer in organisms containing phycobilins // *Photosynth. Res.* 1989. V. 20. P. 1-34.
23. Boehm M., Nield J., Zhang P., Aro E.M., Komenda J., Nixon P.J. Structural and mutational analysis of band 7 proteins in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. P. 6425-6435.
24. Boehm M., Yu J., Reisinger V., Beckova M., Eichacker L.A., Schlodder E., Komenda J., Nixon P.J. Subunit composition of CP43-less photosystem II complexes of *Synechocystis sp* PCC 6803: implications for the assembly and repair of photosystem II // *Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci.* 2012. V. 367. P. 3444-3454.
25. Boehm M., Yu J.F., Krynicka V., Barker M., Tichy M., Komenda J., Nixon P.J., Nield J. Subunit organization of a *Synechocystis* hetero-oligomeric thylakoid FtsH complex involved in photosystem II repair // *Plant Cell.* 2012. V. 24. P. 3669-3683.
26. Boekema E.J., Hankamer B., Bald D., Kruij J., Nield J., Boonstra A.F., Barber J., Rogner M. Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 175-179.
27. Boekema E.J., Hifney A., Yakushevskaya A.E., Piotrowski M., Keegstra W., Berry S., Michel K.-P., Pistorius E.K., Kruij J. A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria // *Nature.* 2001. V. 412. P. 745-748.

28. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
29. Bruno A.K., Wetzel C.M. The Early light-inducible protein (ELIP) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit // *Exp. Bot.* 2004. V. 55. P. 2541–2548.
30. Bukhov N.G., Rajagopal S., Carpentier R. Characterization of P700 as a photochemical quencher in isolated photosystem I particles using simultaneous measurements of absorbance changes at 830 nm and photoacoustic signal // *Photosynth. Res.* 2002. V. 74. P. 295–302.
31. Bukhov N.G., Heber U., Wiese C., Shuvalov V.A. Energy dissipation in photosynthesis: Does the quenching of chlorophyll fluorescence originate from antenna complexes of photosystem II or from the reaction center? // *Planta.* 2001. V. 212. P. 749–758.
32. Casazza A.P., Rossini S., Rosso M.G., Soave C. Mutational and expression analysis of ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 58. P. 41–51.
33. Chankova S.G., Dimova E.G., Mitrovska Z., Miteva D., Mokerova D.V., Yonova P.A., Yurina N.P. Antioxidant and HSP70B responses in *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes with different resistance to oxidative stress // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2014. V.101. P.131–137.
34. Chidgey J.W., Linhartova M., Komenda J., Jackson P.J., Dickman M.J., Canniffe D.P., Konik P., Pilny J., Hunter C.N., Sobotka R. A cyanobacterial chlorophyll synthase-HliD complex associates with the Ycf39 protein and the YidC/Alb3 insertase // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 1267–1279.
35. Chitnis V. P., Chitnis P. R. PsaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 // *FEBS letters.* 1993. V. 336, №2. P. 330–334.
36. Chory J. Light signal transduction: an infinite spectrum of possibilities // *Plant J.* 2010. V. 61, P. 982–991.

37. Daddy S., Zhan J., Jantaro S., He C., He Q., Wang Q. A novel high light-inducible carotenoid-binding protein complex in the thylakoid membranes of *Synechocystis* PCC 6803 // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 9480.
38. Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin // *Biochim. Biophys. Act., Bioenergetics.* 1990. V. 1020, №1. P. 1-24.
39. Demmig-Adams B., Adams III W.W., Mattoo A.K. Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment // eds. In *Series Advances in Photosynthesis and Respiration.* Springer, Dordrecht. 2006. V. 21.
40. D'Haene S.E., Sobotka R., Bučinský L., Dekker J.P., Komenda J. Interaction of the PsbH subunit with a chlorophyll bound to histidine 114 of CP47 is responsible for the red 77K fluorescence of photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1847. P. 1327-1334.
41. Diner A., Schlodder E., Nixon P.J., Coleman W.J., Rappaport F., Lavergne J., Vermaas W.F.J., Chisholm D.A. Site-directed mutations at D1-His198 and D2-His197 of photosystem II in *Synechocystis* PCC 6803: sites of primary charge separation and cation and triplet stabilization // *Biochemistry.* 2001. V. 40, №31. P. 9265-9281.
42. Diner B.A., Rappaport F. Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002. V. 53. P. 551-580.
43. Dolganov N.A., Bhaya D., Grossman A.R. Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a/b* binding proteins of higher plants: evolution and regulation // *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 1995. V. 92. P. 636-640.
44. Dolganov Q. He, N., Bjorkman O., Grossman A.R. The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC6803. Expression and function in high light // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 306-314.
45. Dunaeva M., Adamska I. Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 5521-5529.

- 46.Engelken J., Brinkmann H., Adamska I. Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (Light-Harvesting Complex) antenna protein superfamily // *BMC Evolutionary Biology*. 2010. V. 10. P. 233–248.
- 47.Estavillo G.M., Crisp P.A., Pornsiriwong W., Wirtz M., Collinge D., Carrie C., Giraud E., Whelan J., David P., Javot H., Brearley C., Hell R., Marin E., Pogson B.J. Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high-light signaling in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 3992–4012.
- 48.Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center // *Science*. 2004. V. 303. P. 1831-1838.
- 49.Fromme P., Grotjohann I. Structure of photosystems I and II // *Bioenergetics*. 2008. V. 45. P. 33-72.
- 50.Fujita Y. A study on the dynamic features of photosystem stoichiometry: accomplishments and problems for future studies // *Photosynth. Res.* 1997. V. 53. P. 83-93.
- 51.Funk C., Adamska I., Green B.R., Andersson B., Renger G. The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 30141–30147.
- 52.Funk C., Vermaas W. A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 9397-9404.
- 53.Goh C.H. Phototropins and chloroplast activity in plant blue light signaling // *Plant Signal Behav.* 2009. V. 4. P. 693–695.
- 54.Green B.R., Kühlbrandt W.O. Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII // *Photosynth. Res.* 1995. V. 44. P. 139–148.
- 55.Grimm B., Kruse E., Kloppstech K. Transiently expressed early light-inducible thylakoid proteins share transmembrane domains with light-

- harvesting chlorophyll-binding proteins // *Plant Molec. Biol.* 1989. V. 13. P. 583-593.
56. Grossman A.R., Schaefer M.R., Chiang G.G., Collier J.L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions // *Microbiol. Rev.* 1993. V. 57. P. 725-749.
57. Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A., Saenger W. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. P. 334-342.
58. Harari-Steinberg O., Ohad I., Chamovitz D.A. Dissection of the light signal transduction pathways regulating the two early light-induced protein genes in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. P. 986–997.
59. Havaux M., Guedeney G., He Q.F., Grossman A.R. Elimination of high-light-inducible polypeptides related to eukaryotic chlorophyll *a/b*-binding proteins results in aberrant photoacclimation in *Synechocystis* PCC6803 // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1557. P. 21-33.
60. He Q., Dolganova N., Björkman O., Grossman A.R. The high-light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC 6803 // *J Biologic. chem.* 2001. Vol. 276, №1. P. 306-314.
61. Heddad M., Adamska I. Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll *a/b*-binding gene family // *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 2000. V. 97. P. 3741–3746.
62. Heddad M., Adamska I. The evolution of light stress proteins in photosynthetic organisms // *Comp. Funct. Genomics.* 2002. V. 3. P. 504–510.
63. Heddad M., Engelken J., Adamska I. Light stress proteins in viruses, cyanobacteria and photosynthetic eukaryote // in: J.J. Eaton-Rye, B.C. Tripathy, T.D. Sharkey (Eds.) *Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation.* 2012. P. 299-317.

- 64.Heddad M., Norén H., Reiser V., Dunaeva M., Andersson B., Adamska I. Differential expression and localization of early light-induced proteins in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 75–87.
- 65.Hernandez-Prieto M.A., Tibiletti T., Abasova L., Kirilovsky D., Vass I., Funk C. The small CAB-like proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803: their involvement in chlorophyll biogenesis for photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1807. P. 1143-1151.
- 66.Holtan H.E., Bandong S., Marion C.M., Adam L., Tiwari S., Shen Y., Maloof J.N., Maszle D.R., Ohto M., Preuss S., Meister R., Petracek M., Repetti P.P., Reuber T.L., Ratcliffe O.J., Khanna R. BBX32, an *Arabidopsis* B-Box protein, functions in light signaling by suppressing HY5-regulated gene expression and interacting with STH2/BBX21 // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 2109–2123.
- 67.Horton P., Ruban A., Walters R.G. Regulation of light harvesting in green plants // *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 1996. V. 47. P. 655-684.
- 68.Horton P., Ruban A.V. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection // *Journal of Experimental Botany.* 2005. V. 56. P. 365-373.
- 69.Ito S., Song Y.H., Imaizumi T. LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis* // *Mol. Plant.* 2012. V. 5. P. 573–582.
- 70.Jansson S. A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis* // *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. P. 236–240.
- 71.Jansson S., Andersson J., Kim S.J., Jackowski G.O. An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins // *Plant Mol. Biol.* 2000. V. 42. P. 345–351.
- 72.Jansson S., Pichersky E., Bassi R., Green B.R., Ikeuchi M., Melis A., Simpson D.J., Spangfort M., Staehelin L.A., Thornber J.P. A

- nomenclature for the genes encoding the chlorophyll *a/b*-binding proteins of higher plants // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1992. V. 10. P. 242–253.
73. Jarvi S., Suorsa M., Paakkarinen V., Aro E.-M. Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes // *J Biochem.* 2011. V. 439. P. 207-214.
74. Jiao Y., Lau O.S., Deng X.W. Light-regulation transcriptional networks in higher plants // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 217–230.
75. Jung K.H., Lee J., Dardick C., Seo Y.S., Cao P., Canlas P., Phetson J., Xu X., Ouyang S., An K., Cho Y.J., Lee G.C., Lee Y., An G., Ronald P.C. Identification and functional analysis of light-responsive unique genes and gene family members in rice // *PLoS Genetics.* 2008. V. 4. N. 8. e1000164.
76. Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Hosouchi T., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Naruo K., Okumura S., Shimpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe A., Yamada M., Yasuda M., Tabata S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions // *DNA Res.* 1996. V. 3. P. 109-136.
77. Karapetyan N.V. Protective dissipation of excess absorbed energy by photosynthetic apparatus of cyanobacteria: role of antenna terminal emitters // *Photosynth Res.* 2008. V. 7. P. 195–204.
78. Karapetyan N.V., Holzwarth A.R., Roegner M. The photosystem I trimer of cyanobacteria: molecular organization, excitation dynamics and physiological significance // *FEBS Lett.* 1999. V. 460. P. 395-400.
79. Karapetyan N.V., Schlodder E., van Grondelle R., Dekker J.P. The long wavelength chlorophylls of photosystem I // *Photosystem I.* Springer, Netherlands. 2006. P. 177-192.
80. Kilian O., Steunou A.S., Grossman A.R., Bhaya D. A. Novel two domain-fusion protein in cyanobacteria with similarity to the CAB/ELIP/HLIP

- superfamily: evolutionary implications and regulation // *Molecular Plant*. 2008. V. 1. P. 155–166.
81. Kimura M., Manabe K., Abe T., Yoshida S., Matsui M., Yamamoto Y.Y. Analysis of hydrogen peroxide-independent expression of the high-light-inducible ELIP2 gene with the aid of the ELIP2 promoter-luciferase fusions // *Photochem. Photobiol.* 2003. V. 77. P. 668–674.
82. Kimura M., Yoshizumi T., Manabe K., Yamamoto Y.Y., Matsui M. Arabidopsis transcriptional regulation by light stress via hydrogen peroxide-dependent and -independent pathways // *Genes Cells*. 2001. V. 6. P. 607–617.
83. Kirilovsky and Kerfeld, Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria // *Proceedings of the National Acad Sciences of the USA*. 2013. V. 110, №24. P. 10022–10027.
84. Kleine T., Kindgren P., Benedict C., Hendrickson L., Strand A. Genome-wide gene expression analysis reveals a critical role for CRYPTOCHROME1 in the response of *Arabidopsis* to high irradiance // *Plant Physiol*. 2007. V. 127. P. 1391–1406.
85. Klimmek F., Sjödin A., Noutsos C., Leister D., Jansson S. Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants // *Plant Physiol*. 2006. V. 140. P. 793–804.
86. Knoppova J., Sobotka R., Tichy M., Yu J., Konik P., Halada P., Nixon P.J., Komenda J., Discovery of a chlorophyll binding protein complex involved in the early steps of photosystem II assembly in *Synechocystis* // *Plant Cell*. 2014. V. 26. P. 1200-1212.
87. Komenda J., Knoppova J., Kopečna J., Sobotka R., Halada P., Yu J., Nickelsen J., Boehm M., Nixon P.J. The Psb27 assembly factor binds to the CP43 complex of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 // *Plant Physiol*. 2012. V. 158. P. 476-486.

88. Komenda J., Nickelsen J., Tichy M., Prasil O., Eichacker L.A., Nixon P.J. The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis sp.* PCC 6803 // *J. Biol. Chem.*. 2008. V. 283. P. 22390-22399.
89. Komenda J., Sobotka R. Cyanobacterial high-light-inducible proteins – protectors of chlorophyll-protein synthesis and assembly // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2015. doi:10.1016/j.2015.08.011.
90. Komenda J., Sobotka R., Nixon P.J. Assembling and maintaining the photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012. V. 15. P. 245-251.
91. Kopecna J., Komenda J., Bucinska L., Sobotka R. Long-term acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 to high light is accompanied by an enhanced production of chlorophyll that is preferentially channeled to trimeric photosystem I // *Plant Physiol.* 2012. V. 160. P. 2239-2250.
92. Kruip J., Karapetyan N.V., Terekhova I.V., Rogner M. In vitro oligomerisation of a membrane protein complexes: liposome based reconstitution of trimeric photosystem I from isolated monomers // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 18181–18188.
93. Kruse E., Kloppstech K. Integration of early light-inducible proteins into isolated thylakoid membranes // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 208. P. 195–202.
94. Krynicka V., Tichy M., Krafl J., Yu J., Kana R., Boehm M., Nixon P.J., Komenda J. Two essential FtsH proteases control the level of the Fur repressor during iron deficiency in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 // *Mol. Microbiol.* 2014. V. 94. P. 609-624.
95. Kudoh H., Sonoike K. Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature // *Planta*. 2002. V. 215. P. 541-548.

96. Kufryk G., Hernandez-Prieto M.A., Kieselbach T., Miranda H., Vermaas W., Funk C. Association of small CAB-like proteins (SCPs) of *Synechocystis sp.* PCC 6803 with Photosystem II // *Photosynthesis Res.* 2008. V. 95. P. 135-145.
97. Kuhlbrandt W., Wang D.N., Fujiyoshi Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography // *Nature.* 1994. V. 367. P. 614-621.
98. Łabuz J., Sztatelman O., Banaś A.K., Gabryś H. The expression of phototropins in *Arabidopsis* leaves: developmental and light regulation // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 1763–1771.
99. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227, №. 5259. P. 680-685.
100. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in Enzymology.* 1987. V. 148. P. 350–382.
101. Lindell D., Jaffe J.D., Coleman M.L., Futschik M.E., Axmann I.M., Rector T., Kettler G., Sullivan M.B., Steen R., Hess W.R., Church G.M., Chisholm S.W. Genome-wide expression dynamics of a marine virus and host reveal features of co-evolution // *Nature.* 2007. V. 449. P. 83-86.
102. Lindell D., Jaffe J.D., Johnson Z.I., Church G.M., Chisholm S.W. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection // *Nature.* 2005. V. 438. P. 86-89.
103. Liu H., Zhang H., Niedzwiedzki D.M., Prado M., He G., Gross M.L., Blankenship R.E. Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria // *Science.* 2013. V. 342. P. 1104-1107.
104. Liu Z.F., Yan H.C., Wang K.B., Kuang T.Y., Zhang J.P., Gui L.L., An X.M., Chang W.R. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 angstrom resolution // *Nature.* 2004. V. 428. P. 287-292.

105. Meskauskiene R., Nater M., Goslings D., Kessler F., Camp R., Apel K. FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 12826-12831.
106. Mikami K., Kanasaki Y., Suzuki I., Murata N. The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis sp* PCC 6803 // Mol. Microbiol. 2002. V. 46. P. 905-915.
107. Millard A., Clokie M.R., Shub D.A., Mann N.H. Genetic organization of the psbAD region in phages infecting marine *Synechococcus* strains // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 11007-11012.
108. Montane M.H., Dreyer S., Triantaphylides C., Kloppstech K. Early light inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by posttranscriptional regulation // Planta. 1997. V. 201. P. 293-301.
109. Montané M.H., Kloppstech K. The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? // Gene. 2000. V. 258. P. 1–8.
110. Mork-Jansson A., Bue A.K., Gargano D., Furnes C., Reisinger V., Arnold J., Kmiec K., Eichacker L.A. Lil3 assembles with proteins regulating chlorophyll synthesis in barley // PloS one. 2015.V. 10. P. 0133145.
111. Mullineaux C. W., Emlyn-Jones D. State transitions: an example of acclimation to low-light stress // Journal of experimental botany. 2005. V. 56, №411. P. 389-393.
112. Mullineaux C.W. Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterium // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1100. P. 285-292.
113. Muramatsu M., Hihara Y. Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses // J. Plant Res. 2012. V. 125. P. 11–39.
114. Nickelsen J., Rengstl B. Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2013. V. 64. P. 609-635.

115. Nixon P.J., Michoux F., Yu J., Boehm M., Komenda J. Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II // *Ann. Bot.* 2010. V. 106. P. 1-16.
116. Niyogi K. K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches // *Annu. Rev. of Plant Physiol. Plant Mol. Boil.* 1999. V. 50, №1. P. 333-359.
117. Pan X., Li M., Wan T., Wang L., Jia C., Hou Z., Zhao X., Zhang J., Chang W. Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. P. 309-U394.
118. Peschke F., Kretsch T. Genome-wide analysis of light-dependent transcript accumulation patterns during early stages of *Arabidopsis* seedling deetiolation // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 1353–1366.
119. Pötter E, Kloppstech K. Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 214. P. 779–786.
120. Promnares K., Komenda J., Bumba L., Nebesarova J., Vacha F., Tichy M. Cyanobacterial small chlorophyll-binding protein ScpD (HliB) is located on the periphery of photosystem II in the Vicinity of PsbH and CP47 subunits // *The Journal of Biological chemistry.* 2006. Vol. 281, № 43. P. 32705-32713.
121. Qin X., Suga M., Kuang T., Shen J.-R. Photosynthesis. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex // *Science.* 2015. V. 348. P. 989-995.
122. Rakhimberdieva M.G., Boichenko V.A., Karapetyan N.V., Stadnichuk I.N. Interaction of phycobilisomes with photosystem 2 dimers and photosystem 1 monomers and trimers of the cyanobacterium *Spirulina platensis* // *Biochemistry.* 2001. V. 40. P. 15780–15788.
123. Rast A., Heinz S., Nickelsen J. Biogenesis of thylakoid membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1847. P. 821-830.

124. Reisinger V., Ploscher M., Eichacker L.A. Lili3 assembles as chlorophyll-binding protein complex during deetiolation // FEBS Lett. 2008. V. 582. P. 1547-1551.
125. Rippka, R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. gen. Microbiol. 1979. V. 111. P.1–61.
126. Rizza A., Boccaccini A., Lopez-Vidriero I., Costantino P., Vittorioso P. Inactivation of the ELIP1 and ELIP2 genes affects *Arabidopsis* seed germination // New Phytol. 2011. V. 190. P. 896–905.
127. Rossini S., Casazza A.P., Engelmann E.C., Havaux M., Jennings R.C., Soave C. Suppression of both ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis* does not affect tolerance to photoinhibition and photooxidative stress // Plant Physiol. 2006. V. 141. P. 1264–1273.
128. Ruckle M.E., Burgoon L.D., Lawrence L.A., Sinkler C.A., Larkin R.M. Plastids are major regulators of light signaling in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2012. V. 159. P. 366–390.
129. Rudiger W., Bohm S., Helfrich M., Schulz S., Schoch S. Enzymes of the last steps of chlorophyll biosynthesis: modification of the substrate structure helps to understand the topology of the active centers // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 10864-10872.
130. Salem K., van Waasbergen L.G. Light control of *hliA* transcription and transcript stability in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942 // J. Bacteriol.. 2004. V.186. P. 1729-1736.
131. Salem K., van Waasbergen L.G. Photosynthetic electron transport controls expression of the high light inducible gene in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942 // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 651-658.
132. Schlodder E., Paul A., Cetin M. Triplet states in photosystem I complexes from *Synechococcus elongates* // Science Access. 2001. V. 3, №1.

133. Schreiber U., Bilger W., Klughammer C., Neubauer C. Application of the PAM fluorometer in stress detection // Applications of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis Research, Stress Physiology, Hydrobiology and Remote Sensing. – Springer Netherlands. 1988. P. 151-155.
134. Shen G., Boussiba S., Vermaas W.F. *Synechocystis sp* PCC 6803 strains lacking photosystem I and phycobilisome function // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 1853-1863.
135. Shubin V. V., Bezsmertnaya I. N., Karapetyan N. V. Isolation from *Spirulina* membranes of two photosystem I-type complexes, one of which contains chlorophyll responsible for the 77 K fluorescence band at 760 nm // FEBS letters. 1992. V. 309, №. 3. P. 340-342.
136. Shubin V.V., Tsuprun V.L., Bezsmertnaya I.N., Karapetyan N.V. Trimeric forms of the photosystem I reaction center complex preexist in the membranes of the cyanobacterium *Spirulina platensis* // FEBS Lett. 1993. V. 334. P. 79–82.
137. Singh A.K., Sherman L.A. Reflections on the function of IsiA, a cyanobacterial stress-inducible, Chl-binding protein // Photosynthesis Res. 2007. V. 93. P. 17-25.
138. Sinha R.K., Komenda J., Knoppova J., Sedlarova M., Pospisil P. Small CAB-like proteins prevent formation of singlet oxygen in the damaged photosystem II complex of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. P. 806-818.
139. Sobotka R. Making proteins green; biosynthesis of chlorophyll-binding proteins in cyanobacteria // Photosynthesis Res. 2014. V. 119. P. 223-232.
140. Sobotka R., Komenda J., Bumba L., Tichy M. Photosystem II assembly in CP47 mutant of *Synechocystis sp.* PCC 6803 is dependent on the level of chlorophyll precursors regulated by ferrochelatase // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 31595-31602.

141. Sobotka R., McLean S., Zuberova M., Hunter C.N., Tichy M. The C-terminal extension of ferrochelatase is critical for enzyme activity and for functioning of the tetrapyrrole pathway in *Synechocystis* strain PCC 6803 // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. P. 2086-2095.
142. Sobotka R., Tichy M., Wilde A., Hunter C.N. Functional assignments for the carboxyl-terminal domains of the ferrochelatase from *Synechocystis* PCC 6803: the CAB domain plays a regulatory role, and region II is essential for catalysis // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 1735-1747.
143. Sonoike K. Photoinhibition and protection of photosystem I // *Photosystem I.* Springer Netherlands. 2006. P. 657-668.
144. Staleva H., Komenda J., Shukla M.K., Šlouf V., Kaňa R., Polivka T., R S. Mechanism of photoprotection in the cyanobacterial ancestor of plant antenna proteins // *Nat. Chem. Biol.* 2015. V. 11. P. 287-291.
145. Storm P., Hernandez-Prieto M.A., Eggink L.L., Hooper J.K., Funk C. The small CAB-like proteins of *Synechocystis* sp. PCC 6803 bind chlorophyll. In vitro pigment reconstitution studies on one-helix light-harvesting-like proteins // *Photosynthesis Res.* 2008. V. 98. P. 479-488.
146. Sturm S., Engelken J., Gruber A., Vugrinec S., Kroth P.G., Adamska I., Lavaud J. A novel type of light-harvesting antenna protein of red algal origin in algae with secondary plastids // *BMC Evolutionary Biology.* 2013. V.13. P.159
147. Sullivan M.B., Coleman M.L., Weigele P., Rohwer F., Chisholm S.W. Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. P. e144.
148. Suzuki I., Kanasaki Y., Mikami K., Kanehisa M., Murata N. Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis* // *Mol. Microbiol.* 2001. V. 40. P. 235-244.
149. Takahashi K., Takabayashi A., Tanaka A., Tanaka R. Functional analysis of light-harvesting-like protein 3 (LIL3) and its light-harvesting

- chlorophyll-binding motif in *Arabidopsis* // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 987-999.
150. Tanaka R., Rothbart M., Oka S., Takabayashi A., Takahashi K., Shibata M., Myouga F., Motohashi R., Shinozaki K., Grimm B., Tanaka A. LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 16721-16725.
151. Tanaka R., Tanaka A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2007. V. 58. P. 321-346.
152. Teramoto H., Itoh T., Ono T.A. High-intensity-light-dependent and transient expression of new genes encoding distant relatives of light-harvesting chlorophyll-*a/b* proteins in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 1221–1232.
153. Tolonen A.C., Aach J., Lindell D., Johnson Z.I., Rector T., Steen R., Church G.M., Chisholm S.W. Global gene expression of *Prochlorococcus* ecotypes in response to changes in nitrogen availability // Mol. Syst. Biol. 2006. V. 2. P. 53.
154. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1979. V. 76, №. 9. P. 4350-4354.
155. Tu C.J., Shrager J., Burnap R.L., Postier B.L., Grossman A.R. Consequences of a deletion in *dspA* on transcript accumulation in *Synechocystis* sp. strain PCC6803 // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 3889-3902.
156. Tzvetkova-Chevolleau T., Franck F., Alawady A.E., Dall'Osto L., Carrière F., Bassi R., Grimm B., Nussaume L., Havaux M. The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2007. V. 50. P. 795–809.

157. Umate P. Genome-wide analysis of the family of light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins in Arabidopsis and Rice // *Plant Signal Behav.* 2010. V. 5. P. 1537-1542.
158. Umena Y., Kawakami K., Shen J.R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å // *Nature.* 2011. V. 473. P. 55-60.
159. van de Meene A. M. L., Sharp W.P., McDaniel J.H., Friedrich H., Vermaas W.F.J., and Roberson R.W. Gross morphological changes in thylakoid membrane structure are associated with photosystem I deletion in *Synechocystis sp.* PCC 6803 // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2012. V. 1818, №5. P. 1427-1434.
160. van Waasbergen L.G., Dolganov N., Grossman A.R. nblS, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 2481-2490.
161. Vavilin D., Vermaas W. Continuous chlorophyll degradation accompanied by chlorophyllide and phytol reutilization for chlorophyll synthesis in *Synechocystis sp.* PCC 6803 // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1767. P. 920-929.
162. Vavilin D., Yao D., Vermaas W. Small cab-like proteins retard degradation of photosystem II-associated chlorophyll in *Synechocystis sp.* PCC 6803 - Kinetic analysis of pigment labeling with N-15 and C-13 // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 37660-37668.
163. Vavilin D.V., Vermaas W.F.J. Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria // *Physiol. Plantarum.* 2002. V. 115. P. 9-24.
164. Vermaas W. Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803: Principles and possible biotechnology applications // *Journal of Applied Phycology.* 1996. V. 8, №4-5. P. 263-273.

165. Wang Q., Hall C.L., Al-Adami M.Z., He Q. IsiA is required for the formation of photosystem I supercomplexes and for efficient state transition in *Synechocystis* PCC 6803 // *PloS one*. 2010. V. 5, №5. P. e10432.
166. Wang Q., Jantaro S., Lu B., Majeed W., Bailey M., He Q. The high light-inducible polypeptides stabilize trimeric photosystem I complex under high light conditions in *Synechocystis* PCC 6803 // *Plant Physiol*. 2008. V. 147. P. 1239–1250.
167. Wetzel C.M., Harmacek L.D., Yuan L.H., Wopereis J.L., Chubb R., Turini P. Loss of chloroplast protease SPPA function alters high light acclimation processes in *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) // *J. Exp. Bot*. 2009. V. 60. P. 1715–1727.
168. Wierstra I., Kloppstech K. Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the early light-inducible proteins and other light-regulated genes in barley // *Plant Physiol*. 2000. V. 124. P. 833–844.
169. Xu H., Vavilin D., Funk C., Vermaas W. Multiple deletions of small cab-like proteins in the cyanobacterium *Synechocystis sp* PCC 6803 - consequences for pigment biosynthesis and accumulation // *J. Biol. Chem*. 2004. V. 279. P. 27971-27979.
170. Xu H., Vavilin D., Funk C., Vermaas W. Small Cab-like proteins regulating tetrapyrrole biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis sp* PCC 6803 // *Plant Mol. Biol*. 2002. V. 49. P. 149-160.
171. Yao D. C. I., Brune D. C., Vermaas W. F. J. Lifetimes of photosystem I and II proteins in the cyanobacterium *Synechocystis sp*. PCC 6803 // *FEBS letters*. 2012. V. 586. №2. P. 169-173.
172. Yao D., Kieselbach T., Komenda J., Promnares K., Prieto M.A.H., Tichy M., Vermaas W., Funk C. Localization of the small CAB-like proteins in photosystem II // *J. Biol. Chem*. 2007. V. 282. P. 267-276.
173. Yi C., Deng X.W. COP1 - from Plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis // *Trends Cell Biol*. 2005. V. 15. P. 618–625.

174. Yurina N., Odintsova M. Plant Organelles-to-nucleus retrograde signaling // Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives / Eds Shanker A.K., Venkateswarlu B. Rijeka: INTECH. 2011. P. 55–74.
175. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
176. <http://www.cyanobase.org>
177. <http://www.matrixscience.com>

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа стала возможна благодаря поддержке со стороны научного руководителя – заведующей лабораторией биоэнергетики «ФИЦ Биотехнологии» Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, доктора биологических наук, профессора Надежды Петровны Юриной. Очень признательна Надежде Петровне не только за предложение интересной темы для исследований, но и за постоянное внимание к работе, помощь, взаимопонимание, за обучение большому диапазону современных биохимических и молекулярно-биологических методов.

Хочу выразить глубокую благодарность и другим сотрудникам лаборатории биоэнергетики, а именно проф. Навасарду Вагановичу Карапетяну за ценные предложения в направлении исследований, интерпретацию полученных результатов и поддержку, а также к.б.н. Юлии Владимировне Большевцевой за помощь в проведении некоторых исследований и всестороннюю помощь в процессе выполнения работы.

Автор благодарит ведущего научного сотрудника Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова д.б.н. Еланскую И.В. за предоставление материалов для исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00533 и Программы 1.7П Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Данные масс-спектрометрии MALDI-TOF. Белки тилакоидных мембран клеток ДТ.

№	Accession	Mass	Score	Description
1	gi 300374	6842	180	photosystem I subunit E, PSI-E [Synechocystis]
2	gi 499174979	45505	227	MULTISPECIES: NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H [Synechocystis]
	gi 620123	53228	149	glutamate--ammonia ligase [Synechocystis sp.]
	gi 499174096	52966	149	glutamine synthetase [Synechocystis sp. PCC 6803]
3	gi 499175319	27328	127	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K 1 [Synechocystis sp. PCC 6803]
4	gi 499176520	22136	130	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499175319	27328	87	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K 1 [Synechocystis sp. PCC 6803]
5	gi 2673718	11205	226	phycocyanin alpha subunit [Synechocystis sp.]
6	gi 499174134	9443	161	cytochrome b559 subunit alpha [Synechocystis sp. PCC 6803]
7	gi 504219998	50271	386	photosystem II CP43 reaction center protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 1161272	51728	385	chlorophyll a-binding protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
8	gi 1008532	18143	276	phycocyanin beta subunit [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499173779	20081	200	ATP synthase subunit delta [Synechocystis sp. PCC 6803]
9	gi 499174273	17576	248	C-phycocyanin alpha chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499176667	16613	94	photosystem I reaction center subunit XI [Synechocystis sp. PCC 6803]
10	gi 499174794	17563	170	general secretion pathway protein G [Synechocystis sp. PCC 6803]
11	gi 499175791	25038	164	MULTISPECIES: cytochrome B6 [Synechocystis]
	gi 1008532	18143	154	phycocyanin beta subunit [Synechocystis sp. PCC 6803]
12	gi 499175792	17432	114	Cytochrome b6-f complex subunit 4

				[Synechocystis sp. PCC 6803]
13	gi 499174273	17576	208	C-phycoerythrin alpha chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499174917	17205	140	allophycoerythrin beta chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
14	gi 499174110	16467	241	hypothetical protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 1673344	6573	183	ssl0352 [Synechocystis sp. PCC 6803]
15	gi 1652683	7808	119	CAB/ELIP/HLIP superfamily [Synechocystis sp. PCC 6803]
16	gi 499173627	39696	212	Photosystem II protein D1 2 [Synechocystis sp. PCC 6803]

Таблица 2. Данные масс-спектрометрии MALDI-TOF. Белки тилакоидных мембран клеток $\Delta\Phi C2$

№	Accession	Mass	Score	Description
1	gi499173778	53932	329	ATP synthase subunit alpha [Synechocystis sp. PCC 6803]
2	gi499173777	34584	364	ATP synthase gamma chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
3	gi499174160	28884	536	phycobilisome rod-core linker polypeptide CpcG [Synechocystis sp. PCC 6803]
4	gi499175146	18237	148	photosystem I reaction center subunit III [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499173730	15634	100	photosystem I reaction center subunit II [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi752786127	17295	58	NAD(P)H-quinone oxidoreductase [Synechocystis sp. PCC 6803]
5	gi499175416	8140	135	photosystem I reaction center subunit IV [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi154483	8071	115	photosystem I subunit III [Synechocystis sp.]
	gi1653621	9457	59	nitrogen regulatory protein P-II [Synechocystis sp. PCC 6803]
6	gi499173762	8710	105	photosystem I reaction center subunit PsaK 1 [Synechocystis sp. PCC 6803]
7	gi1653621	9457	77	nitrogen regulatory protein P-II [Synechocystis sp. PCC 6803]
8	gi752786202	52845	201	ammonium transporter [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499175587	35036	172	hypothetical protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499175125	51772	122	ATP synthase subunit beta [Synechocystis sp. PCC 6803]
9	gi499173779	20152	251	ATP synthase subunit delta [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499173780	19793	160	ATP synthase subunit b [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499174274	18328	111	C-phycocyanin beta chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
10	gi499173780	19793	215	ATP synthase subunit b [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi47511	19776	185	ATPase subunit b [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499174273	17718	105	C-phycocyanin alpha chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi1001173	16874	100	slr0483 [Synechocystis sp. PCC 6803]

11	gi 499175126	14572	106	ATP synthase epsilon chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 292659758	14655	159	Chain A, Crystal Structure Of Cyanobacterial Psbq From Synechocystis Sp. Pcc 6803
12	gi 1653621	9457	83	nitrogen regulatory protein P-II [Synechocystis sp. PCC 6803]
13	gi 499174274	18328	196	C-phycoyanin beta chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499173779	20152	113	ATP synthase subunit delta [Synechocystis sp. PCC 6803]
14	gi 1001173	16874	156	slr0483 [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 526827911	22846	60	hypothetical protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
15	gi 499174274	18328	142	C-phycoyanin beta chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
16	gi 499175792	17503	172	cytochrome b6-f complex subunit 4 [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499176667	16613	128	photosystem I reaction center subunit XI [Synechocystis sp. PCC 6803]
17	gi 1673344	6573	123	ssl0352 [Synechocystis sp. PCC 6803]
18	gi 499175523	48613	191	ABC transporter substrate-binding protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499173885	39417	131	iron uptake protein A1 [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499175224	34850	97	orange carotenoid-binding protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499174535	49219	81	nitrate transporter NrtA [Synechocystis sp. PCC 6803]
19	gi 112490655	46095	235	Chain A, Crystal Structure Of The Periplasmic Nitrate-binding Protein NrtA From Synechocystis Pcc 6803
	gi 499174535	49219	226	nitrate transporter NrtA [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 499175523	48613	146	ABC transporter substrate-binding protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
20	gi 1673344	6573	205	ssl0352 [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 1653435	6259	83	ssr1951 [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi 740745412	5147	99	MULTISPECIES: chlorophyll A-B-binding protein [Synechocystis]
	gi 1652683	7879	98	CAB/ELIP/HLIP superfamily [Synechocystis sp. PCC 6803]

Таблица 3. Данные масс-спектрометрии MALDI-TOF. Белки тилакоидных мембран клеток ΔФС1 и ФС2.

№	Accession	Mass	Score	Description
1	gi499173778	53932	198	ATP synthase subunit alpha [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499175125	51701	195	ATP synthase subunit beta [Synechocystis sp. PCC 6803]
2	gi499174979	45505	333	MULTISPECIES: NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit H [Synechocystis]
3	gi499173777	34584	300	ATP synthase gamma chain [Synechocystis sp. PCC 6803]
4	gi499175319	27328	209	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K 1 [Synechocystis sp. PCC 6803]
5	gi499176520	22136	108	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit I [Synechocystis sp. PCC 6803]
6	gi752786127	17295	249	NAD(P)H-quinone oxidoreductase [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499176519	21509	201	NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain 6 [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499175320	20580	140	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit J [Synechocystis sp. PCC 6803]
7	gi499175466	14069	188	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M [Synechocystis sp. PCC 6803]
8	gi499174331	61308	205	Cytochrome c oxidase subunit 1 [Synechocystis sp. PCC 6803]
9	gi499176008	22771	143	hypothetical protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi504220076	22799	126	hypothetical protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
10	gi499173779	20081	180	ATP synthase subunit delta [Synechocystis sp. PCC 6803]
11	gi499175569	12390	172	nitrogen regulatory protein P-II [Synechocystis sp. PCC 6803]
12	gi499175569	12390	187	nitrogen regulatory protein P-II [Synechocystis sp. PCC 6803]
13	gi499174670	35209	130	apocytochrome f [Synechocystis sp. PCC 6803]
14	gi499175791	25038	120	MULTISPECIES: cytochrome B6 [Synechocystis]
15	gi499176732	18019	262	membrane protein [Synechocystis sp. PCC 6803]

	gi526873818	15012	102	hypothetical protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi1001173	16874	100	slr0483 [Synechocystis sp. PCC 6803]
16	gi499175523	48329	232	ABC transporter substrate-binding protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499174535	48935	115	nitrate transport protein NrtA [Synechocystis sp. PCC 6803]
17	gi499174535	48935	217	nitrate transport protein NrtA [Synechocystis sp. PCC 6803]
	gi499175523	48329	209	ABC transporter substrate-binding protein [Synechocystis sp. PCC 6803]
18	gi499174134	9443	140	cytochrome b559 subunit alpha [Synechocystis sp. PCC 6803]
19	gi499174546	35987	188	photosystem reaction center subunit H [Synechocystis sp. PCC 6803]
20	gi499175866	13138	76	plastocyanin [Synechocystis sp. PCC 6803]