

На правах рукописи



Акулинкина Дарья Валерьевна

**АССОЦИАЦИЯ СВЕТОИНДУЦИРУЕМЫХ СТРЕССОВЫХ H₂A/H₂B
БЕЛКОВ С ФОТОСИСТЕМАМИ КЛЕТОК ЦИАНОБАКТЕРИИ
Synechocystis PCC 6803**

Специальность 03.01.04 Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена в лаборатории биоэнергетики Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Юрина Надежда Петровна

Официальные оппоненты: **Пронина Наталья Александровна**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук, лаборатория управляемого
фотобиосинтеза, ведущий научный сотрудник

Мамедов Махир Джафар Оглы
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Московский
государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
Научно-исследовательский институт физико-химической
биологии им. А. Н. Белозерского, Отдел биоэнергетики,
лаборатория электрогенных фотопроцессов, ведущий
научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт фундаментальных проблем биологии Российской
академии наук

Защита состоится «25» февраля 2016 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

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 Hli_p (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 C-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.

Целью настоящей работы было выявить ассоциацию стресс-индуцируемых белков HliA/HliB с фотосистемами цианобактерии *Synechocystis* 6803 в нормальных условиях и в условиях светового стресса.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие экспериментальные задачи:

Задачи:

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.

Научная новизна работы.

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.

Научно-практическая значимость работы.

Полученные в работе данные об ассоциации стрессовых свето-индуцируемых белков с мономерами и тримерами фотосистемы 1 и комплексом фотосистемы 2 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.

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

Апробация работы. Результаты проделанной 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 Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология - Наука XXI века», Пушино, 2014; Seminar of ecology – 2015 with international participation, Sofia, 2015.

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 11 публикациях, в том числе в 3 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 2 статьях в сборниках и 6 тезисах материалов конференций.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, описания объектов и методов, результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (177 ссылок). Работа изложена на 134 страницах, включает 15 рисунков и 3 таблицы.

Сокращения принятые в тексте. ФС1 – фотосистема 1, ФС2 – фотосистема 2, ПААГ – полиакриламидный гель, CN-PAGE – неокрашенный нативный электрофорез в полиакриламидном геле, SDS-PAGE – электрофорез в ПААГ, в присутствии додецилсульфат натрия, β -DM - n-додецил- β -D-мальтозид, MALDI-TOF - времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, DCMU - 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевинной (диурон), АТФ – аденозинтрифосфат, NAD(P)H – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. В обзоре литературы приведены данные о локализации, структуре, распространении и некоторых функциях белков HliA/HliB. Особое внимание уделено рассмотрению изученных ранее функций и ассоциации белков HliA/HliB с ФС2, подробно рассмотрена их роль в процессе адаптации к изменению условий окружающей среды.

Материалы и методы.

Штаммы цианобактерий и условия выращивания. Объектом исследования служили клетки цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 (далее по тексту *Synechocystis*) дикого типа, а также мутанта, лишённого ФС2 (Δ psbDI, Δ psbDII, Δ psbC), мутанта, лишённого обеих фотосистем (Δ PsaA, Δ PsaB, Δ PsbD1, Δ PsbC, Δ PsbDII, Δ CP47), и мутанта Δ psaL, неспособного к образованию тримеров ФС1 вследствие нарушения гена *psaL*. Цианобактерии выращивали в жидкой среде BG-11 при 30°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 при низкой интенсивности света (5 мкмоль фотонов/м²·с) с добавлением 5 мМ глюкозы и антибиотиков (хлорамфеникол 20 мкг/мл, спектиномицин 20 мкг/мл). Мутант Δ psaL выращивали в присутствии канамицина (80 мкг/мл). Для создания условий светового стресса клетки дикого типа и мутантов без ФС2, выращенных в указанных выше условиях, освещали в течение 1 ч светом высокой интенсивности (150 мкмоль фотонов/м²·с). Использование не очень высокой интенсивности светового стресса имело целью предотвращение фотодеструкции и гибели клеток, особенно в случае мутанта без ФС2. При сравнительных исследованиях клеток дикого типа и мутанта без ФС2 клетки дикого типа были предварительно адаптированы к условиям выращивания мутанта.

Выделение тилакоидных мембран и фракционирование хлорофилл-белковых комплексов. Тилакоидные мембраны выделены по методу Шубина с соавт. (1992, 1993). Для экстракции нативных комплексов фотосистем из тилакоидной мембраны использовали мягкий неионный детергент n-додецил- β -D-мальтозид (β -DM), который добавляли в соотношении детергент : хлорофилл 15:1. После инкубации при 4°C в течение 30 мин лизат центрифугировали при 18 000 g в течение 10 мин. Хлорофилл-белковые комплексы выделяли с помощью анионообменной хроматографии на колонке DEAE-Toyoperl-650.

Определение содержания хлорофилла и активности комплексов ФС1.

Содержание хлорофилла *a* в образцах определяли в этаноловом экстракте.

Активность фракции тримеров ФС1 определяли по способности к фотоокислению P700 (первичного донора электрона реакционного центра ФС1) как фотоиндуцированное изменение поглощения при 810 нм (против 870 нм) при освещении действующим светом 730 нм. Измерения проводили с помощью флуориметра DUAL-PAM-101 с приставкой ED-P700 DW-101 («Walz, Effelrich», Германия). Об активности ФС2 судили по переменной флуоресценции, которую измеряли при помощи флуориметра PAM-101 с действующим светом 680 нм.

Фракционирование пигмент-белковых и белковых комплексов тилакоидных мембран проводили с помощью нативного неокрашенного электрофореза в ПААГ CN-PAGE (Clear Native PAGE). К лизату тилакоидных мембран *Synechocystis* 6803 добавляли десятикратный буфер для образца (200 мМ BisTris pH 7,0; 75% сахароза; 1 М 6-аминокапроновая кислота). Использовали градиентный ПААГ (5% - 10%). Электрофорез проводили на приборе фирмы Hoefer (США) при напряжении 200 В, в течение 4-5 ч. После окончания электрофореза дорожки сканировали, затем 1 дорожку использовали для электрофореза во втором направлении по методу Леммли.

SDS-PAGE. Электрофорез белков по методу Леммли проводился в Tris-глициновом буфере (25 мМ Tris; 250 мМ глицин; 0,1%-ный SDS, pH 7,5) при постоянной силе тока 120 мА в течение 2 ч. Использовали 12,5% ПААГ.

Вестерн-блоттинг. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили в камере для блоттинга в Tris-глициновом буфере для переноса (25 мМ Tris; 250 мМ глицин; 20%-ный этанол, 0,02%-ный SDS, pH 7,5) в течение часа при 200 мА. Затем мембрану с перенесенными белками помещали на 1 ч при 4°C в блокирующий буфер TBST (50 мМ Tris/HCl; 200 мМ NaCl; 0,1%-ный Tween 20, pH 7,5) с добавлением 5%-ного сухого обезжиренного молока и затем добавляли первичные антитела. Были использованы поликлональные антитела кролика к HliA/HliB (1:4000) («Abcam», США). Мембрану инкубировали с антителами в течение ночи при 4°C и постоянном помешивании. В качестве вторичных антител использовали антикроличьи IgG козла, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:10000) («AgriSera», Швеция). Каждый этап сопровождали многократным промыванием мембран буфером TBST. Иммунные комплексы на мембране выявляли с помощью флуоресцентной системы детекции ECL («GE Healthcare», Великобритания), сигналы регистрировали на рентгеновскую пленку («Retina», Германия). Пленку сканировали, данные обрабатывали с помощью программы Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Идентификация белков с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF.

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

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

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3,3 (Bruker Daltonics, Германия).

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

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/м²·с). В случае мутанта без ФС2 клетки подвергали световому стрессу (150 мкмоль фотонов/м²·с) в течение 2 ч. К образцам добавляли буфер (50 мМ трицин pH 8,3; 100 мМ NaCl; 5 мМ MgCl₂) с 1 мМ KCN, 100 мкМ метилвиологена (акцептор электронов, принимает их от ФС1), 2 мМ аскорбиновой кислоты (донор электронов), 40 мкМ 2,6-дихлорфенолиндифенола (ДХФИФ) и 0,5 мкМ 3-(3,4-дихлорфенил)-1-диметилмочевины (Диурон) (ингибитор ФС2). Тилакоидные мембраны вносили в ячейку так, чтобы концентрация хлорофилла составляла 20 мкг/мл. Скорость электронного транспорта выражали в мкмоль O₂/ч·мг хлорофилла.

Результаты и обсуждение представлены в третьей главе диссертационной работы.

1. Солюбилизация тилакоидных мембран и выделение хлорофилл-белковых комплексов.

Тилакоидные мембраны лизировали мягким неионным детегентом β -DM, используя соотношение хлорофилл : детергент 1:15. В предварительных экспериментах для солюбилизации 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 Wang с соавт. (2008).

При фракционировании хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран цианобактерии *Synechocystis* с помощью анионообменной хроматографии были получены три 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. 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* [Карапетян, 2012].

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. 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.

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

С помощью вестерн-блоттинга изучали ассоциацию белков HliA/HliB с тримерами ФС1 из клеток дикого типа, выросших в условиях умеренного освещения ($40 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$). Установлено, что белки HliA/HliB ассоциированы как с фракцией тримеров ФС1, так и с фракцией, содержащей

мономеры ФС1 и комплекс ФС2 (рис. 1, в). Клетки цианобактерий дикого типа подвергали действию умеренного светового стресса. Для этого клетки, выращенные в условиях нормального освещения (40 мкмоль фотонов/м²·с), освещали светом высокой интенсивности (150 мкмоль фотонов/м²·с, 1 ч).

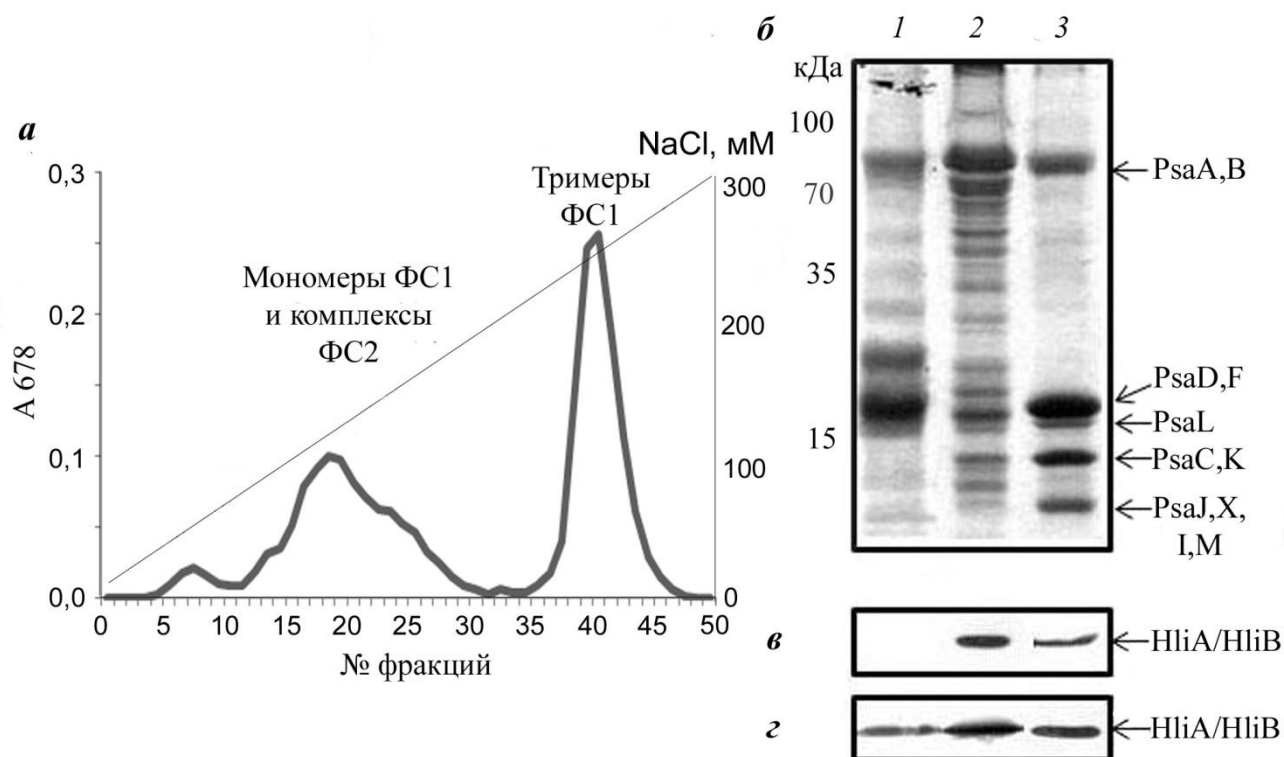


Рис. 1. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток *Synechocystis* дикого типа: а) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран с помощью анионообменной хроматографии; б) электрофореграмма белков тилакоидных мембран в SDS-PAGE: 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.

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.1, г). 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. Ассоциация белков HliA/HliB с мономерами ФС1 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.

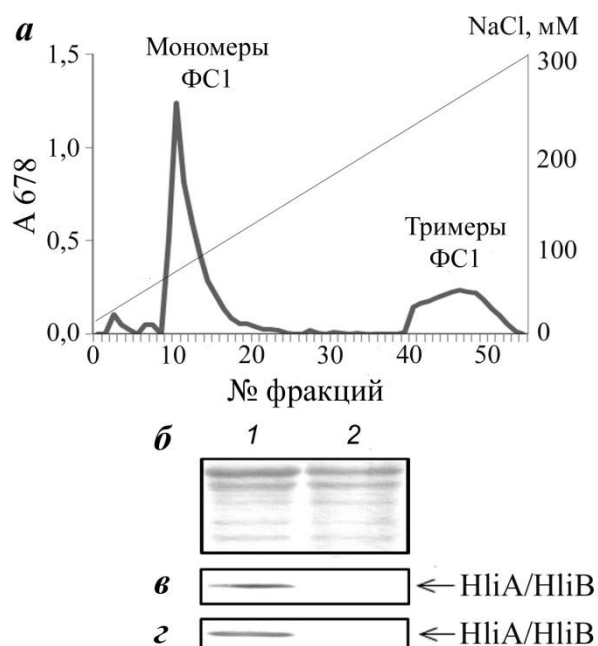


Рис. 2. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС2: а) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран с помощью анионообменной хроматографии; б) электрофореграмма белков тилакоидных мембран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

При фракционировании на анионообменной колонке хлорофилл-белковых комплексов мутанта выявлены три пика: тримеры ФС1, мономеры ФС1 и свободные пигменты. Как следует из рис. 2, а, содержание тримеров ФС1 понижено относительно содержания мономеров ФС1 у мутанта по сравнению с клетками дикого типа, выращенными в нормальных условиях освещения (рис. 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. 2, в). Клетки мутанта без ФС2 были подвергнуты световому стрессу (150 мкмоль фотонов/м²·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. 2, г) по сравнению с клетками, выращенными при умеренном освещении (40 мкмоль фотонов/м²·с). Белки HliA/HliB не обнаружены во фракции тримеров ФС1 мутанта после действия светового стресса (рис. 2, г). 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.

4. Ассоциация белков *HliA/HliB* с пигмент-белковыми комплексами мутанта *ΔpsaL* (без тримеров ФС1).

Для того чтобы выяснить, способны ли белки *HliA/HliB* взаимодействовать 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, в).

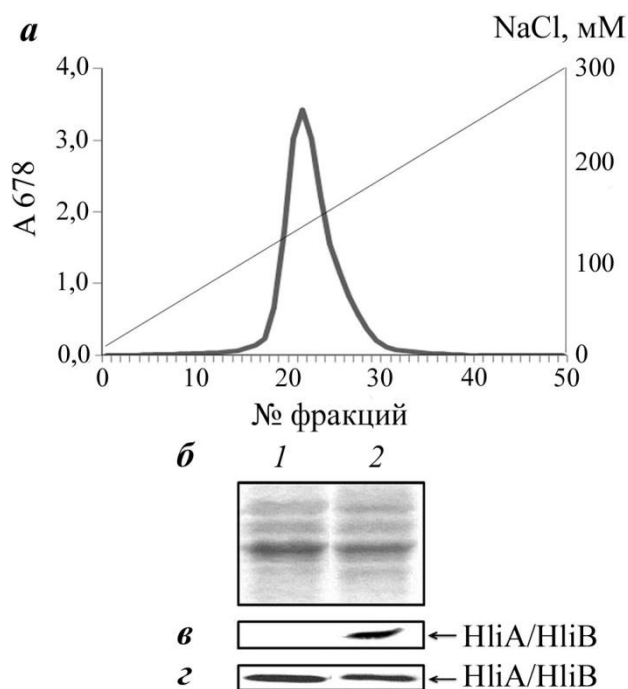


Рис. 3. Ассоциация белков *HliA/HliB* с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, не образующего тримеры ФС1: а) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран с помощью анионообменной хроматографии; б) электрофореграмма белков тилакоидных мембран в SDS-PAGE: 1 – фракции №19-21, 2 – фракции №24-27; в, з) вестерн-блот анализ *HliA/HliB* белков до и после светового стресса соответственно.

После действия светового стресса содержание белков *HliA/HliB*, связанных с мономерами ФС1 и комплексом ФС2, возрастало в 2 раза (рис. 3, г). Таким образом, в отсутствие тримеров ФС1 белки *HliA/HliB* взаимодействуют с мономерами ФС1 и комплексом ФС2.

5. Влияют ли условия 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 ($5 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$). Для того чтобы выяснить, влияют ли условия выращивания мутанта на ассоциацию HliA/HliB белков с хлорофилл-белковыми комплексами, клетки дикого типа выращивали в тех же условиях, как клетки мутанта без ФС2, и затем подвергали действию светового стресса. HliA/HliB белки идентифицированы в составе фракций, содержащих мономеры ФС1 и ФС2, а также во фракции, содержащей тримеры ФС1 (рис. 4, в).

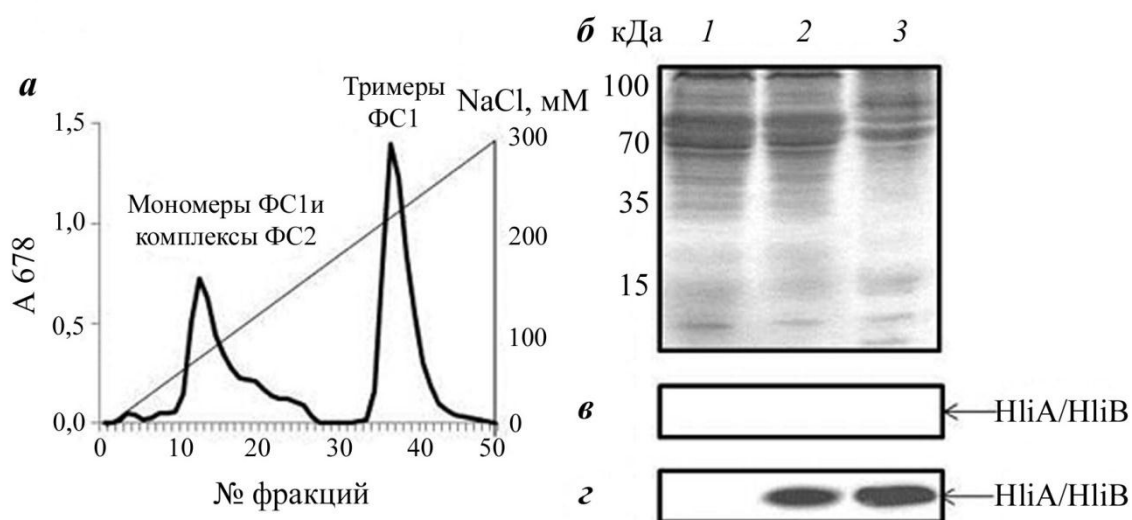


Рис. 4. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток *Synechocystis* дикого типа, выращенных в среде, содержащей глюкозу, и при низком освещении ($5 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$): а) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных 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 действия светового стресса соответственно.

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

6. *Индукция синтеза HliA/HliB в клетках мутанта Synechocystis 6803, дефицитного по ФС1 и ФС2.*

Для того чтобы выяснить, могут 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, как клетки мутанта без ФС2, после чего были подвергнуты световому стрессу.

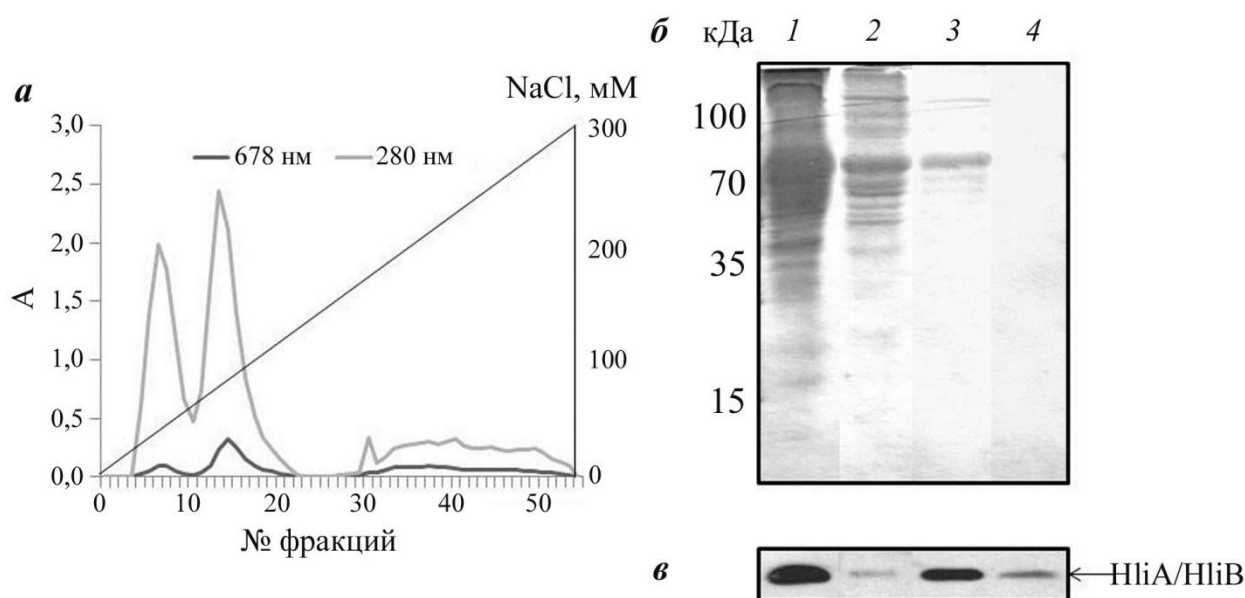


Рис. 5. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС1 и ФС2: а) профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран с помощью анионообменной хроматографии; б) электрофореграмма белков тилакоидных 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 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 (рис. 5, а). При исследовании данного мутанта белки HliA/HliB были идентифицированы во фракциях, содержащих белки (рис. 5, в).

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.

7. Определение ассоциации белков HliA/HliB с комплексами тилакоидных мембран с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Мембранные белковые комплексы, выделенные из клеток дикого типа и мутантов *Synechocystis* фракционировали с помощью CN-PAGE, а затем белки каждого белкового комплекса фракционировали с помощью SDS-PAGE (рис. 6).

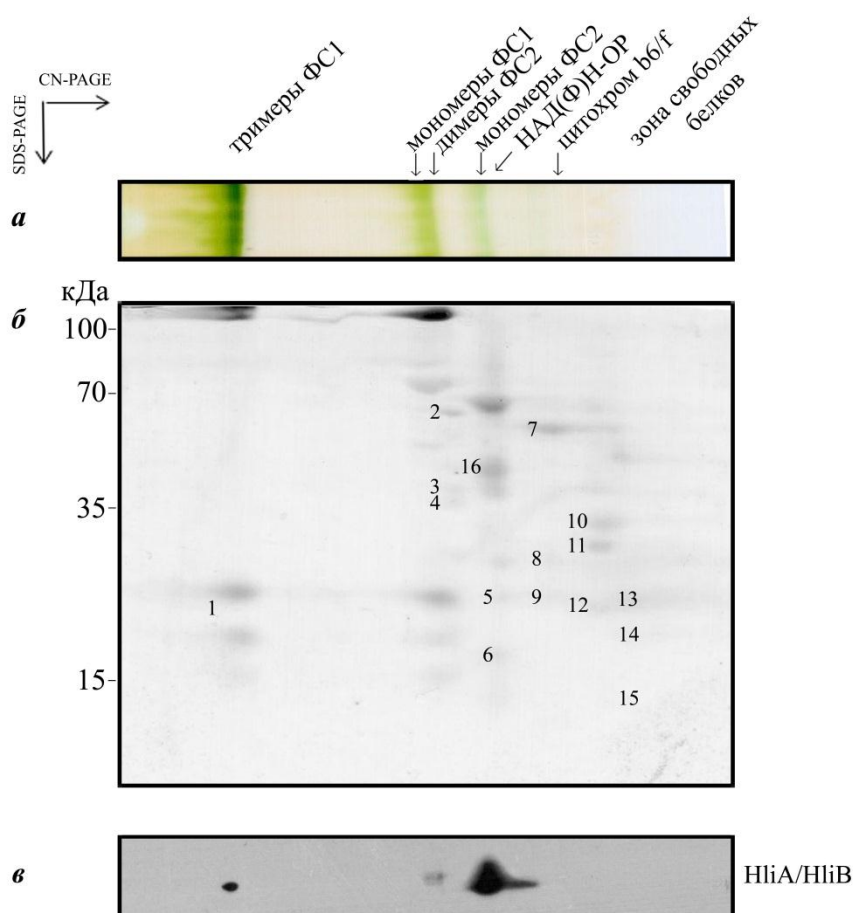


Рис. 6. Двумерная электрофореграмма и вестерн-блот анализ белковых комплексов тилакоидных мембран клеток *Synechocystis* дикого типа: а) электрофореграмма фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран в ПААГ в нативных условиях; б) электрофореграмма белков комплексов тилакоидных 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 действия светового стресса.

При фракционировании лизата тилакоидных мембран с помощью электрофореза в ПААГ в нативных условиях удалось выделить следующие комплексы (рис. 6, а): тримеры и мономеры комплекса ФС1, димеры и мономеры комплекса 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 фракционирования комплексов был проведен электрофорез в SDS-PAGE.

С помощью иммуноблоттинга были идентифицированы HliA/HliB белки в нескольких комплексах и в зоне свободных белков (рис. 6, в). Для того, чтобы определить, с какими именно комплексами и белками ассоциированы

исследуемые белки, была проведена идентификация белковых пятен с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Установлено, что HliA/HliB белки ассоциированы с тримерами ФС1, комплексами ФС2 и мономерами ФС1. Белки HliA/HliB обнаружены также 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 обнаруживаются в зоне свободных белков.

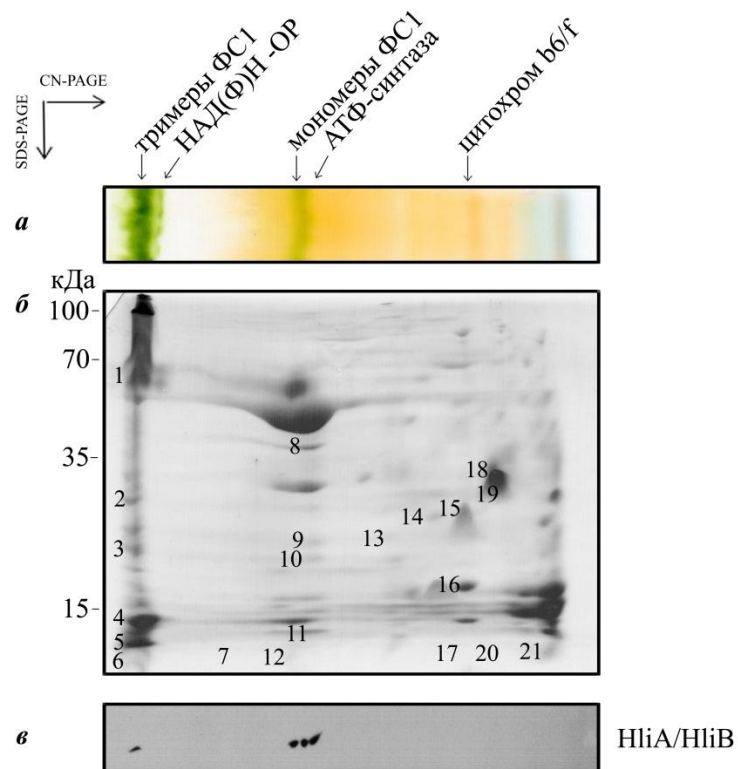


Рис. 7. Двумерная электрофореграмма и вестерн-блот анализ белковых комплексов тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС2: *a*) электрофореграмма фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран в ПААГ в нативных условиях; *б*) электрофореграмма белков комплексов 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 действия светового стресса.

При исследовании мутанта, дефицитного по ФС2, были выявлены все комплексы, содержащиеся в тилакоидных мембранах клеток дикого типа, за исключением комплекса ФС2 (рис. 7). С помощью иммуноблоттинга удалось установить, что HliA/HliB белки ассоциированы с мономерами ФС1. Отмечен также сигнал в области тримеров ФС1.

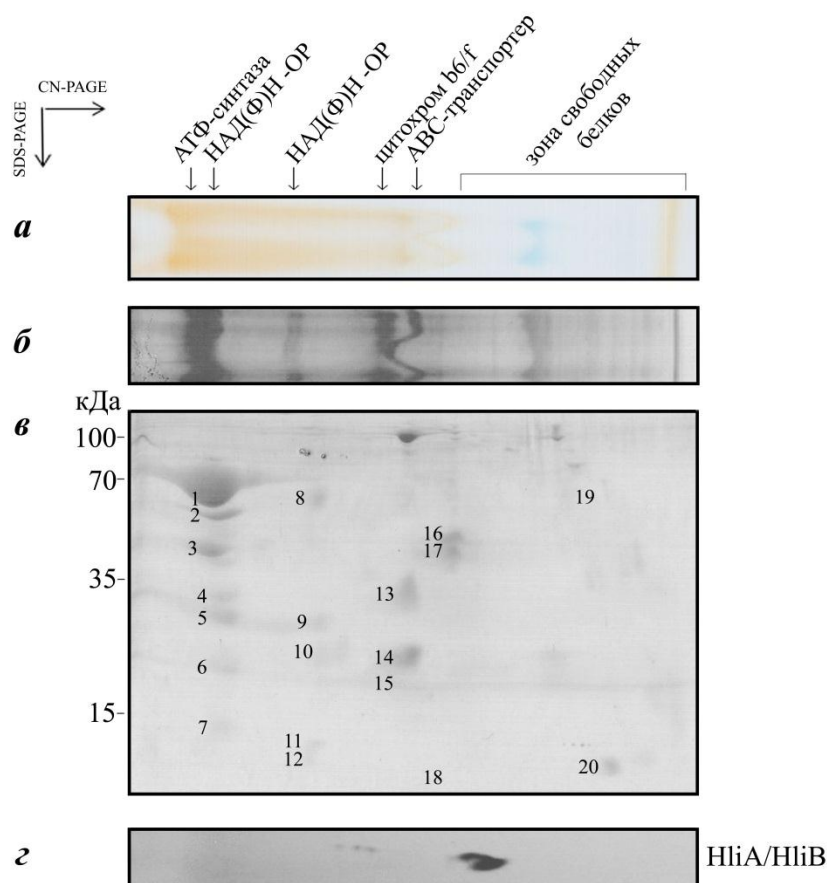


Рис. 8. Двумерная электрофореграмма и вестерн-блот анализ белковых комплексов тилакоидных мембран клеток мутанта *Synechocystis*, дефицитного по ФС1 и ФС2: а) электрофореграмма фракционирования хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран в ПААГ в нативных условиях; б) электрофореграмма фракционирования 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); г) вестерн-блот анализ HliA/HliB белков после светового стресса.

В использованном мутанте отсутствуют следующие белки: Δ PsaAB, Δ PsbD₁C, Δ PsbB, Δ PsbD₂. В связи с этим такие мутанты не способны образовывать комплексы ФС1 и ФС2. Остальные комплексы, такие как АТФ-азный комплекс, комплекс NAD(P)H-хинон-оксидоредуктазы, цитохромный комплекс у этих мутантов обнаружены.

Как показано на рис. 8, HliA/HliB белки обнаружены в области свободных белков. Наличие HliA/HliB белков показано с помощью иммуноблотинга (рис. 8, г). Эти данные подтверждают результаты, полученные нами ранее с помощью анионообменной хроматографии, свидетельствующие о том, что HliA/HliB белки продолжают синтезироваться в клетке и в отсутствие ФС1 и ФС2.

8. Фотохимическая активность ФС1 клеток дикого типа и мутанта, дефицитного по ФС2, различающихся по содержанию HliA/HliB белков.

Для оценки влияния HliA/HliB белков на фотохимическую активность ФС1 изучали скорость поглощения O_2 в ФС1 у клеток дикого типа и мутанта, дефицитного по ФС2, в присутствии искусственной донорно-акцепторной системы (ДХФИФ, аскорбат, метилвиологен). В клетках дикого типа, выращенных в условиях низкого освещения, HliA/HliB белки не обнаружены (рис.4), тогда как в клетках мутанта без ФС2 эти белки были идентифицированы (рис.2). Проведено также сравнение активности ФС1 у мутанта без ФС2, выросшего при низкой освещенности, и у этого же мутанта после действия светового стресса ($150 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$, 1 ч).

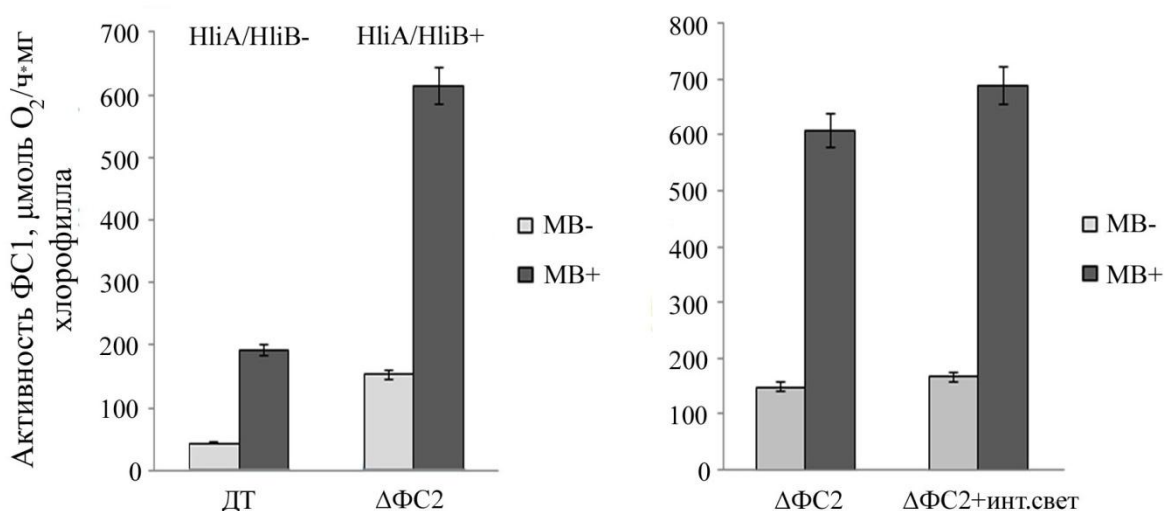


Рис. 9. Фотохимическая активность ФС1 тилакоидных мембран клеток *Synechocystis* дикого типа (ДТ) и мутанта, дефицитного по ФС2 (Δ ФС2). Инт. свет – $150 \text{ мкмоль фотонов/м}^2 \cdot \text{с}$, в течение 1 ч. В отсутствие HliA/HliB белков – HliA/HliB-, в присутствии HliA/HliB белков – HliA/HliB+. MB - метилвиологен (получено совместно с Ю.В. Бولычевцевой).

Показано, что скорость восстановления O_2 в присутствии метилвиологена у мутанта без ФС2 в 4 раза выше, чем у клеток дикого типа (рис. 9). Как следует из рис.2, содержание HliA/HliB белков у мутанта без ФС2 в условиях светового стресса возрастает на 20%. Обнаружено также, что скорость поглощения O_2 в ФС1 у мутанта, выросшего при низкой освещенности, после светового стресса увеличивается на 15-17 % (рис. 9), что коррелирует с увеличением содержания HliA/HliB белков в условиях стресса (рис. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отличие от высших растений у цианобактерий до 80% хлорофиллов клеток локализовано в комплексе ФС1, который существует в тилакоидах преимущественно в виде тримеров. Предполагают, что наличие тримеров ФС1 необходимо для большей стабильности комплекса и защиты от фотодеструкции. 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 мы изучали локализацию HliA/HliB в хлорофилл-белковых комплексах 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. Предполагают, что белки HliA/HliB участвуют в стабилизации хлорофилла для его повторного использования при репарации поврежденного комплекса ФС2 и биогенезе вновь синтезированных комплексов. Противоречивые данные были получены о локализации HliA/HliB в ФС1. Так, было обнаружено, что белки HliA/HliB не связаны с ФС1 *Synechocystis*. С другой стороны, показано, что белки HliA/HliB содержатся в тримерах ФС1 и не обнаруживаются в мономерах ФС1 цианобактерии. Нами установлено, что HliA/HliB белки 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 ранее опубликованными данными относительно наличия белков Hli в тримерах ФС1 клеток дикого типа в стрессовых условиях. В работе Wang с соавт. (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 работе Yao с соавт. (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, в которой было показано, что эволюционный гомолог Hliр – односпиральный белок Ohp *Arabidopsis thaliana* – связан с мономером ФС1 [Andersson et al., 2003].

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

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. 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. 1, а и рис. 2, а), свидетельствует в пользу предположения о важной роли белков Hli в стабилизации тримеров ФС1. 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 препятствуют связыванию HliA/HliB с тримерами ФС1. По-видимому, отсутствие 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 взаимодействовать с тримерами ФС1 у мутанта без ФС2.

Для проверки предположения о том, что условия выращивания клеток не приводят к отсутствию белков HliA/HliB в тримерах ФС1, клетки дикого типа были выращены в тех же условиях, как мутант без ФС2. Белки HliA/HliB удалось

идентифицировать в тримерах ФС1 клеток дикого типа при световом стрессе. 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. 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. 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.

Для выявления возможной взаимозависимости ассоциации HliA/HliB с мономерами и тримерами ФС1 был изучен мутант Δ psaL, 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.

Сравнение активности ФС1 у клеток, содержащих и не содержащих HliA/HliB белки, указывает на их важную роль в 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 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.

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 $\Delta psal$ 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. 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Юрина Н.П., **Мокерова Д.В.**, Одинцова М.С. Светоиндуцируемые стрессовые белки пластид фототрофов // Физиология растений. 2013. Т.60. №5. стр. 611–624.
2. 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.
3. **Акулинкина Д.В.**, Болычевцева Ю.В., Еланская И.В., Карапетян Н.В., Юрина Н.П. Ассоциация светоиндуцируемых стрессовых белков HliA/HliB с тримерами и мономерами фотосистемы 1 в клетках цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 // Биохимия. 2015. Т.80. №10. стр. 1523-1532.
4. **Мокерова Д.В.**, Болычевцева Ю.В., Еланская И.В., Юрина Н.П., Карапетян Н.В. Стрессовые белки HlipA/B *Synechocystis* PCC 6803: локализация в фотосистемах // Сборник статей. Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», 2014, Минск, Беларусь, стр. 37-40.
5. **Akulinkina D.**, Yurina N. High-light inducible proteins HliA/HliB are essential for light stress-adaptation in cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 // Seminar of ecology – 2015 with international participation. Proceedings, 23-24 April 2015. Sofia, Bulgaria.

Материалы конференций:

1. **Мокерова Д.В.**, Болычевцева Ю.В., Юрина Н.П. Модификация выделения интактных тримеров комплексов фотосистемы 1 из цианобактерии *Synechocystis* sp.6803. 201 IV Съезд биофизиков России, 2012, Нижний Новгород, Россия, стр. 102.
2. **Мокерова Д.В.** Изучение локализации стрессовых белков HlipA и HlipB в фотосинтетическом аппарате *Synechocystis* sp. PCC 6803 клеток дикого типа и мутантов. Международная молодежная научно-практическая конференция «Биофизика биоэнергетических процессов», 2013, Звенигород, Россия, стр. 15.
3. **Мокерова Д.В.** Локализация стресс-индуцируемых белков HlipA и HlipB в фотосинтетическом аппарате цианобактерий *Synechocystis* PCC 6803. XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2013», 2013, Москва, Россия, стр. 306-307.
4. **Mokerova D.V.**, Bolichevtseva Yu.V., Elanskaya I.V., Karapetyan N.V., Yurina N.P. High Light-induced proteins (HlipA/B) – the evolutionary ancestor of light-

harvesting proteins: localization in photosystem 1 complexes of the cyanobacterium *Synechocystis*. International conference «The problem of the origin of life» and Youth scientific school «Molecular and cellular basis of the early evolution of life», 2014, Moscow, Russia, P. 49-50.

5. **Мокерова Д.В.**, Болычевцева Ю.В., Еланская И.В., Юрина Н.П. Светоиндуцируемые полипептиды HlrA и HlrB ассоциированы с комплексами фотосистем 1 и 2 цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803. 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - Наука XXI века», 2014, Пущино, Россия, стр. 391.

6. **Акуликина Д.В.**, Болычевцева Ю.В., Еланская И.В., Юрина Н.П. Светоиндуцируемые стрессовые белки HliA/HliB в клетках цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803: ассоциация с тримерами и мономерами фотосистемы 1. V съезд биофизиков России, 2015, Ростов-на-Дону, Россия, стр. 245.