

**Федеральное государственное учреждение «Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные основы  
биотехнологии» Российской Академии Наук»**

---

*на правах рукописи*

Слонимский Юрий Борисович

**Механизм функционирования белка восстановления  
флуоресценции (FRP) в регуляции фотозащиты у  
цианобактерий**

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Специальность 1.5.4. Биохимия

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Случанко Николай Николаевич

**Москва 2024**

## Оглавление

Список используемых сокращений .....	4
Введение .....	5
Обзор литературы .....	12
1. Фотосинтез и фотозащита.....	12
2. Структура и фотозащитные функции белка ОСР .....	19
3. Расположение и экспрессия гена FRP .....	26
4. Структура белка FRP и влияние аминокислотных замен на его активность.....	27
5. Взаимодействие ОСР и FRP .....	29
6. Многообразие белков ОСР .....	33
Материалы и методы исследования .....	35
1. Методы генной инженерии.....	35
1.1. Трансформация <i>E. coli</i> .....	35
1.2. Клонирование генов методом рестрикция-лигирование.....	35
1.3. Сайт-направленный мутагенез.....	36
1.4. Препаративная экспрессия белков.....	36
2. Выделение и очистка белков .....	37
2.1. Лизис и металл-аффинная хроматография .....	37
2.2. Вычитающая металл-аффинная ( $\text{Ni}^{2+}$ ) хроматография.....	38
2.3. Гель-фильтрация.....	38
2.4. Анионообменная хроматография .....	38
2.5. Выделение и очистка фикобилисом методом центрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы .....	39
3. Аналитические физико-химические методы .....	40
3.1. Электрофорез ДНК в агарозном геле .....	40
3.2. SDS-электрофорез по Лэммли.....	41
3.3. Нативный электрофорез по Шаубу-Перри .....	41
3.4. Спектрофотометрическое определение концентрации белков .....	42
3.5. Исследования кинетики R-O перехода белков ОСР .....	42
3.6. Тонкослойная хроматография.....	43

3.7. Исследование структуры FRP и его мутантных форм методом кругового дихроизма.....	43
3.8. Исследование взаимодействия белков ОСР с фикобилисомами с помощью флуоресцентной спектроскопии .....	44
3.9. Гель-фильтрация, сопряженная с регистрацией спектров поглощения.....	44
3.10. Метод химического «сшивания» глутаровым альдегидом.....	45
3.11. Метод дисульфидной «ловушки».....	46
4. Методы структурной биологии.....	47
4.1. Метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР).....	47
4.2. Кристаллизация GlОСРХ.....	48
4.3. Сбор дифракционных данных, решение и уточнение кристаллической структуры.....	48
5. Биоинформатические методы.....	49
Результаты исследования и их обсуждение .....	50
1. Исследование олигомерного состояния, структуры и функциональных свойств FRP гомологов.....	50
2. Роль N-концевого сегмента ОСР в регуляции взаимодействия с белком FRP.....	57
3. Возможная роль мономеризации FRP и модель структуры комплекса ОСР/FRP .....	63
4. ОСРХ из примитивной цианобактерии <i>Gloeobacter</i> способен ускоренно релаксировать и невосприимчив к действию FRP из других цианобактерий .	74
5. Обнаружение и характеристика FRP гомологов из протеобактерий .....	85
Заключение.....	90
Выводы .....	91
Список работ, опубликованных по теме диссертации .....	92
Список цитированной литературы .....	94
Приложение.....	104

## Список используемых сокращений

АФК – активные формы кислорода

ДТТ - дитиотреитол

МУРР – малоугловое рассеяние рентгеновского излучения

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПААГ – полиакриламидный гель

РСА – рентгеноструктурный анализ

ССК – светособирающий комплекс

ССК I – светособирающий комплекс I

ССК II – светособирающий комплекс II

ФС I – фотосистема I

ФС II - фотосистема II

ФБС – фикобилисома

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

НАДФ<sup>+</sup> - никотинамид аденин динуклеотид фосфат (окисленная форма)

НАДФН - никотинамид аденин динуклеотид фосфат (восстановленная форма)

МЭ – меркаптоэтанол

RMSD – от англ. Root Mean Squared Deviation, среднеквадратичное отклонение

NPQ – от англ. non-photochemical quenching, нефотохимическое тушение

ECH – эхиненон

CAN – кантаксантин

ZEA – зеаксантин

B $\beta$  – бета-каротин

ОСР – от англ. Orange Carotenoid Protein, оранжевый каротиноидный белок.

FRP – от англ. Fluorescence Recovery Protein, белок восстановления

флуоресценции фикобилисом.

GSH – глутатион (восстановленный)

GSSG - глутатион (окисленный)

## Введение

**Актуальность темы исследования.** Способность к фотосинтезу в живых организмах сопряжена с необходимостью не только эффективно поглощать энергию света, для чего в процессе эволюции возникли различные светособирающие комплексы, но и бороться с последствиями повышенного уровня освещенности, поскольку избыток энергии света губителен для клеток и может приводить к повреждению фотосинтетического аппарата. Цианобактерии, одна из крупнейших групп фотосинтетических микроорганизмов, хорошо адаптированы даже к экстремальным режимам освещения при помощи различных уникальных механизмов. Один из них - механизм фотозащиты, включающий диссипацию поглощенной энергии света через действие фотоактивного белка ОСР (от англ. Orange Carotenoid Protein). При фотоактивации ОСР происходит изменение спектра поглощения и цвета (красная форма ОСР) вследствие смещения каротиноида в N-концевой домен и разделения доменов ОСР. Именно в конформации с разделенными доменами ОСР осуществляет свою функцию - взаимодействует с фикобилисомами, обеспечивая тепловую диссипацию поглощенной ими энергии, что можно детектировать как тушение их флуоресценции. Несмотря на то, что фотоактивация ОСР обратима *in vitro*, адекватный физиологический ответ *in vivo* требует наличия у ОСР белка-партнера, обращающего его действие - т. н. белка восстановления флуоресценции (от англ. Fluorescence Recovery Protein, FRP). При делеции гена белка FRP и после облучения синим светом клеток цианобактерий флуоресценция фикобилисом восстанавливается лишь частично, что, по-видимому, обусловлено слишком медленной самопроизвольной диссоциацией ОСР от его комплекса с фикобилисомой. FRP способен взаимодействовать с ОСР и инактивировать его за счет ускорения его перехода в базовую оранжевую форму. Олигомерное состояние FRP в растворе и его роль в функционировании белка остается предметом дискуссии. Остается неясным также механизм действия FRP по ускорению перехода ОСР в оранжевую форму, и за счет каких структурных

детерминант FRP различает оранжевую и красную формы ОСР. По данным, полученным ранее с участием нашей лаборатории, взаимодействие белков ОСР и FRP происходит по нескольким участкам связывания и сопровождается мономеризацией FRP. Совершенно неожиданным является крайне широкое разнообразие как ОСР (в цианобактериях можно встретить до двух полноразмерных генов ОСР), так и FRP генов. Современная филогенетика разделяет ОСР на три неравные группы: ОСР1, ОСР2 и ОСРХ. Регуляция функционирования ОСР показана только для мажорной группы ОСР1, а для ОСР2 и крайне гетерогенной группы ОСРХ данный вопрос остается почти неизученным. Ключевые работы по исследованию взаимодействия ОСР и FRP были проведены лишь для пары белков ОСР1 и FRP из *Synechocystis* sp., оставляя нерешенным вопрос, насколько универсален механизм взаимодействия ОСР-FRP среди разных клад цианобактерий. Выяснение механизма действия FRP поможет пролить свет на способность цианобактерий адаптироваться к условиям меняющейся освещенности. Эти знания, в свою очередь, могут быть учтены в биотехнологическом использовании цианобактерий как источника биомассы и субстрата для получения биотоплива, а также могут быть полезны для разработки оптически контролируемых триггерных систем.

**Целью** работы являлось изучение молекулярного механизма взаимодействия белков OCP и FRP. Для достижения цели были поставлены следующий **задачи**:

1. Проверить регуляторное действие гомологов белка FRP из различных цианобактерий на активность OCP.
2. Локализовать основной участок взаимодействия белков OCP и FRP путем комбинации точечных замен и делеций.
3. Описать структуру комплекса белков OCP-FRP и определить параметры их взаимодействия.
4. Выявить структурные особенности гомологов OCP1 и OCPX, отвечающие за восприимчивость к действию белка FRP.

**Научная новизна полученных результатов.** Показана универсальность регуляторного действия FRP гомологов на фотоцикл OCP. Впервые установлена роль N-концевого сегмента (NTE) OCP в регуляции взаимодействия с FRP. Локализован участок взаимодействия OCP и FRP на поверхности C-домена OCP, занимаемой элементом NTE в темновой форме OCP. Предложена модель пространственной структуры комплекса OCP-FRP низкого разрешения на основе данных малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР) и разносторонних биохимических и биоинформатических данных. Полученная структурная модель верифицирована методом дисульфидной ловушки и сравнительным анализом с наиболее древним OCP (OCPX из *Gloeobacter*), для которого впервые удалось получить пространственную структуру. Предложены переименование и классификация группы OCPX в OCP3 с разбиением на подгруппы OCP3a, OCP3b, OCP3c, и т.д., а также описано многообразие гомологов FRP у бактерий за пределами группы цианобактерий.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Описан детальный механизм взаимодействия белков, позволяющих цианобактериям адаптироваться к меняющимся условиям освещения, и показано, как белок FRP влияет на функционирование OCP. Мы определили константу диссоциации и стехиометрию их комплекса, а также разработали подход для характеристики разнообразных мутантных форм OCP и FRP. В литературе известно, что при суперэкспрессии FRP тушение флуоресценции фикобилисом не наступает даже при облучении цианобактерий интенсивным синим светом. Изменяя соотношение концентраций OCP/FRP, можно добиться необходимого уровня фотозащиты при минимальной потере энергии в виде тепла, что может быть применимо в области биоинженерии и биотехнологии цианобактерий для увеличения эффективности продукции биомассы. Кроме того, систему взаимодействующих белков OCP-FRP можно использовать как платформу для создания новых оптически контролируемых систем, где каскадом молекулярных событий можно управлять при помощи света.

## Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Гомологи FRP из цианобактерий имеют относительно низкую идентичность аминокислотных последовательностей, но представляют собой димеры, сохраняющие свою функциональную активность на модельном белке OCP *in vitro*. Гомологи FRP существуют вне группы цианобактерий, они также представлены преимущественно димерами, но неактивны по отношению к модельному OCP из *Synechocystis*.
- 2) Раскрытие структурных доменов OCP, наблюдаемое при фотоактивации, инициирует узнавание OCP белком FRP. Удаление N-концевого сегмента белка OCP или ослабление контакта этого сегмента с C-доменом белка OCP за счет аминокислотной замены открывает участок связывания OCP с белком FRP. Фиксация NTE на C-домене OCP за счет дисульфидной ловушки препятствует связыванию FRP даже при фотоактивации OCP.
- 3) Получена модель пространственной структуры комплекса OCP/FRP в стехиометрии 1:2, которая объясняет как FRP обеспечивает ускорение конверсии OCP в «оранжевую» форму за счет облегчения воссоединения OCP доменов.
- 4) Выявлены структурные отличия OCP1 и OCPX паралогов, предположительно отвечающие за невосприимчивость OCPX к действию FRP. На поверхности N- и C-концевых доменов OCPX в зоне потенциального контакта с FRP были обнаружены замены на полярные и противоположно заряженные аминокислотные остатки, нарушающие взаимодействие между белками-партнерами

### **Апробация работы**

Результаты работы в виде стендовых докладов представлены на конференциях 43th FEBS Congress 2018 (Prague), 44th FEBS Congress 2019 (Krakow) и 45th FEBS Virtual Congress 2021.

### **Место выполнения работы и личный вклад автора**

Работа выполнена в ФИЦ Биотехнологии РАН. Автором диссертации совместно с научным руководителем разработаны подходы и направления в исследовании взаимодействия белков OCP и FRP. Экспериментальные исследования были выполнены диссертантом либо лично, либо при его непосредственном участии с коллективом коллег, проведен анализ данных, и сформулированы выводы. Обсуждение и подготовка статей к публикации проводилось совместно с научным руководителем и соавторами.

### **Связь работы с научными программами**

Работа была выполнена при финансовой поддержке грантов:

1. “Особенности белок-белковых взаимодействий в механизме фотозащиты цианобактерий”, РФФИ 18-04-00691.
2. “Белок-опосредованный транспорт каротиноидов: фундаментальный механизм и прикладные аспекты”, РФФИ-DFG 20-54-12018.
3. Субсидия МОН\_СИ «Разработка научно-методической базы для проведения исследований и подготовки кадров при решении структурных и динамических задач фундаментальной и прикладной биологии с использованием современных источников рентгеновского излучения и нейтронов», № 075-15-2021-1354

### **Публикации результатов исследования**

По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 7 научных статей в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus. Опубликовано 3 тезиса в приложении к журналам, индексируемым в Web of Science.

### **Структура и объем диссертационного исследования**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 104 страницах, иллюстрирована 38 рисунками и 1 таблицей. Список цитируемой литературы включает 106 наименований.

## Обзор литературы

### 1. Фотосинтез и фотозащита

Фотосинтез – процесс образования органических соединений из неорганических под действием света (Nelson et al., 2004; Blankenship, 2010; Johnson, 2016; Flamholz et al., 2020) является энергетической основой почти для всех живых организмов на планете Земля. Наибольшее распространение и успех получил кислородный фотосинтез (Croce et al., 2020; Sánchez-Baracaldo et al., 2020), сопровождающийся выделением кислорода как продукта окисления воды. Таким типом фотосинтеза обладают цианобактерии, эукариотические водоросли и высшие растения. По-видимому, эукариоты приобрели способность к фотосинтезу, вступив в симбиотические отношения с цианобактериями (Gray, 2017). Для обеспечения светозависимого переноса электронов при кислородном фотосинтезе необходимы два типа фотосистем - фотосистема II (ФСII) и фотосистема I (FSI) (Barber, 2002; Nelson et al., 2004; Caffarri et al., 2014; Croce et al., 2020). В высших растениях ФСII находится в гранах тилакоидов (стопки тилакоидных мембран) хлоропластов и катализирует окисление воды и выделение кислорода, тогда как FSI расположена в ламеллах тилакоидов (Kaftan et al., 2002) (тилакоиды, соединяющие граны) и через ферредоксин и ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup> редуктазу обеспечивает восстановление НАДФ<sup>+</sup> до НАДФН. Обе фотосистемы состоят из множества мембранных белковых комплексов (Jordan et al., 2001; Umena et al., 2011; Suga et al., 2015), связывающих молекулы хлорофилла, каротиноидов и других кофакторов. Каждая фотосистема включает коровый комплекс и периферическую антенную систему, которая обеспечивает сбор и перенос энергии света на реакционные центры (Nelson et al., 2004). Коровый комплекс обеих фотосистем в значительной степени консервативен, тогда как светособирающие комплексы (ССК) крайне разнообразны у различных видов (Croce et al., 2020; Lokstein et al., 2021). ССК всех фотосинтезирующих организмов могут быть разделены на три типа: мембранные пигмент-белковые комплексы (Lokstein et al.,

2021), водорастворимые пигмент-белковые комплексы (Adir, 2005) и заполненные пигментами мембранные везикулы (хлоросомы) (Pedersen et al., 2010).

Самыми распространенными типами организации ССК являются мембранные и водорастворимые пигмент-белковые комплексы (Lokstein et al., 2021). В зеленых водорослях и высших растениях эту роль выполняют мембранные ССК I и ССК II (Nelson et al., 2004; Pan et al., 2020; Lokstein et al., 2021), а в красных водорослях, глаукоцистофитовых водорослях и цианобактериях – водорастворимые фикобилисомы (ФБС) (Bryant et al., 1979; Adir, 2005; Chang et al., 2015; Lokstein et al., 2021).

При кислородном фотосинтезе ФСII инициирует фотохимическое событие, в котором образуется высокоэнергетический электрон, который в результате работы ЭТЦ и приводит к образованию АТФ и НАДФН (Johnson, 2016; Ruban et al., 2021). В результате работы ФСII происходит окисление воды с образованием кислорода. Данная реакция обеспечивается мощным окислителем в реакционном центре ФСII - гетеродимером хлорофилла. Он обладает крайне высоким окислительно-восстановительным потенциалом (Kato et al., 2009), неизбежно подвергая клетки повреждениям при избытке световой энергии, поступающей в ФСII (Kato et al., 2003; Nelson et al., 2015). Это приводит к необратимому повреждению ФСII, что вызывает деградацию одного из ключевых белков фотосистемы – D1 (субъединица реакционного центра) (Nixon et al., 2010; Vass, 2012). Из-за этого процесса происходит постоянная замена субъединицы D1 (Adir et al., 2005), а для селективной деградации белка необходим его N-концевой сегмент (Komenda et al., 2007). Цикл восстановления ФСII происходит в течение нескольких часов (Nixon et al., 2010). Поскольку колебания освещенности часто происходят в течение нескольких минут или даже секунд, цикл восстановления ФСII неэффективен в течение дня. Предотвращение фотоингибирования (Adir et al., 2005; Murata et al., 2012) удается достичь при помощи механизма, который уменьшает поток энергии на ФСII (Ruban, 2018; Ruban et al., 2021). Именно в этом заключается функция NPQ (от англ. Non-Photochemical Quenching, нефотохимическое тушение

флуоресценции) - безвредно рассеивать избыточную энергию в виде тепла (рис. 1) (Krause et al., 1991).

В процессе превращения энергии солнца в безопасную для клетки форму тепла NPQ занимает ключевую роль. У высших растений (одна из наиболее распространенных и биологически успешных групп организмов) NPQ запускается транстилакоидным протонным градиентом и, таким образом, этот процесс сопряжен с работой ЭТЦ при светозависимых реакциях фотосинтеза. Так, светосбор приходит в соответствие с энергетическими потребностями клетки.

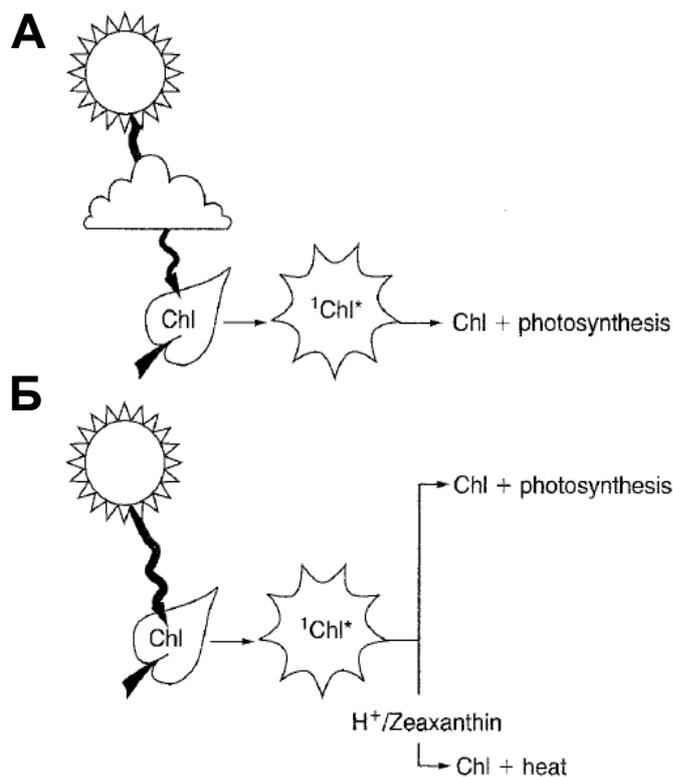


Рисунок 1. Схематическое изображение условий, при которых (А) вся или (Б) только часть солнечного света, поглощаемого хлорофиллом (Chl) в листе можно использовать для фотосинтеза (Demmig-Adams et al., 1996). В последнем случае часть поглощенной энергии света рассеивается в виде тепла. Энергия возбужденного синглетного хлорофилла ( $^1\text{Chl}^*$ ) может быть использована для фотосинтеза. Адаптировано из (Demmig-Adams et al., 1996).

Механистические детали этого процесса существенно отличаются у цианобактерий и высших растений, несмотря на вероятное происхождение хлоропластов высших растений от предка современных одноклеточных азотфиксирующих цианобактерий (Falcón et al., 2010). В высших растениях и зеленых водорослях за NPQ отвечает система ксантофиллового цикла (Demmig-Adams et al., 1996), а в цианобактериях – функционирование системы Оранжевого Каротиноидного Белка или OCP (от англ. Orange Carotenoid Protein) (Kirilovsky et al., 2013; Kirilovsky et al., 2016). Далее мы рассмотрим нефотохимическое тушение высших растений и сравним с процессом, протекающим в цианобактериях.

По современным представлениям NPQ высших растений происходит на уровне ССКП, где и расположен сайт тушения флуоресценции хлорофилла. Сам тушитель образуется как результат конформационных изменений в ССКП и, вероятно, задействует молекулу лютеина (Ruban et al., 2021). Изменение pH ( $\Delta$ pH) абсолютно необходимо для запуска процесса NPQ (Hager et al., 1994). Кроме того, этот процесс регулируется зеаксантином и белком PsbS. Зеаксантин образуется в результате т.н. ксантофиллового цикла - светозависимого превращение виолакسانтина в зеаксантин (рис. 2) (Demmig-Adams et al., 1996). При избытке солнечного света pH люмена тилакоидов снижается, что приводит к активации дезоксидазы (Pfundel et al., 1993), осуществляющей продукцию зеаксантина из виолакسانтина (рис. 2). Зеаксантин ускоряет формирование NPQ и замедляет темновое восстановление функционирования ССКП. Зеаксантин выступает в роли своеобразного аллостерического регулятора, усиливая чувствительность ССКП к  $\Delta$ pH. PsbS обладает чувствительностью к  $\Delta$ pH, но, напротив, ускоряет темновой переход ССКП в активное состояние (Ruban et al., 2021). Молекулярный механизм действия зеаксантина и PsbS остается неизученными.

Так или иначе, ксантофилловый цикл обеспечивает тепловую диссипацию энергии, поглощенной ССК, что защищает высшие растения и зеленые водоросли, предотвращая образование активных форм кислорода (АФК). Стоит также отметить, что действие зеаксантина не ограничивается взаимодействием с пигмент-

белковыми комплексами, сама молекула ксантофилла может взаимодействовать с АФК, обеспечивая защиту от окисления мембранных липидов (Navaux et al., 1999).

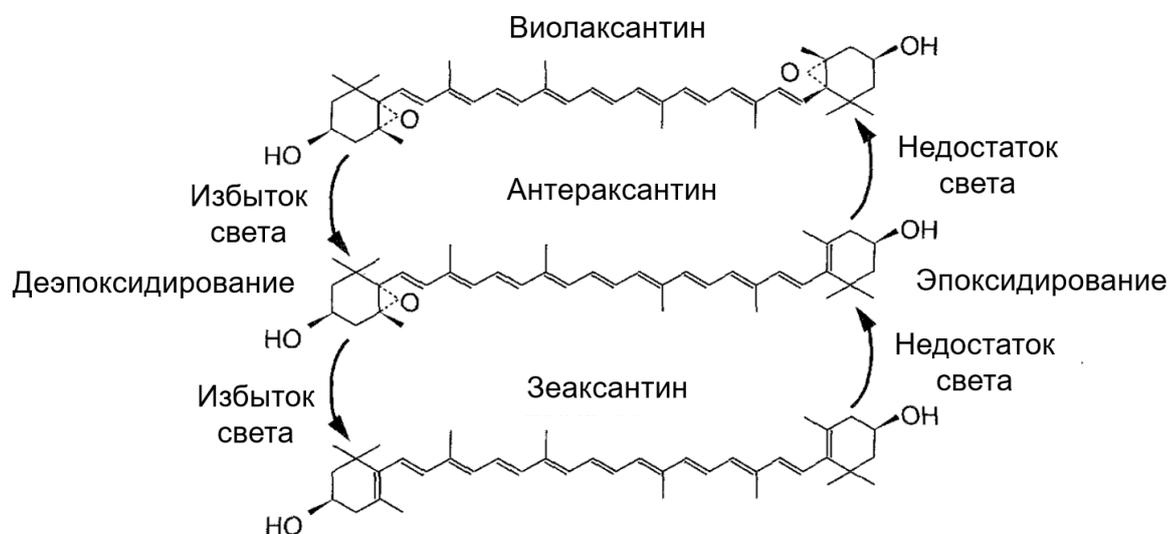


Рисунок 2. Схема ксантофиллового цикла и его регуляция избытком или недостатком света. Поэтапное удаление двух кислородных групп (эпоксигрупп) виолаксантина приводит к удлинению сопряженной системы двойных связей с девяти в виолаксантине до десяти в антераксантине и до одиннадцати в зеаксантине. Деэпоксирирование происходит в течение нескольких минут. Эпоксирирование происходит в течение нескольких минут или часов, но при дополнительном стрессе может занять несколько дней. Адаптировано из (Demmig-Adams et al., 1996).

Простое переложение механизма NPQ высших растений на механизм NPQ для цианобактерий, красных водорослей и глаукоцистофитовых водорослей невозможно, так как главными светособирающими комплексами у данных групп организмов являются водорастворимые фикобилисомы (ФБС), а не мембранные ССКІ и ССКІІ. Фикобилисомы представляют собой мегадальтонный пигмент-белковый комплекс, организованный в виде аллофикоцианинового ядра и исходящих из него стержней (рис. 3) (Bryant et al., 1979; Adir, 2005; Domínguez-Martín et al., 2022). Полный комплекс у большинства цианобактерий имеет форму

полудиска (Bryant et al., 1979), но у цианобактерий, лишенных тилакоидов, таких как представители родов *Gloeobacter* и *Anthocerotibacter*, может иметь веслоподобную форму и форму пучка (Guglielmi et al., 1981; Jiang et al., 2023). Фикобилисомы могут быть соединены как с ФС I, так и ФС II (Peterson et al., 1981; Rakhimberdieva et al., 2001; Watanabe et al., 2014; Li et al., 2021).

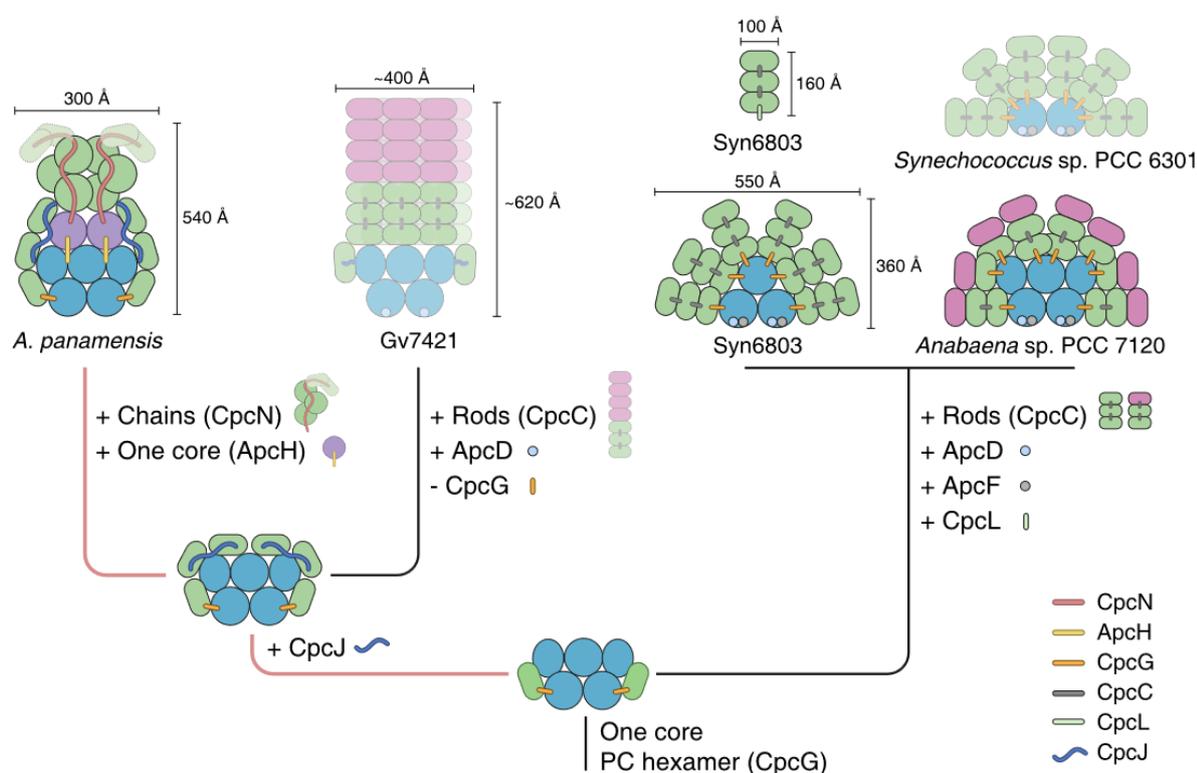


Рисунок 3. Модель эволюции ФБС у различных групп цианобактерий (Jiang et al., 2023). Появление и исчезновение отдельных компонентов ФБС показаны знаками плюс и минус соответственно. Цилиндры ядра окрашены в фиолетовый и ярко-синий цвета. Гексамеры фикозэритрина (Gv7421) и гексамеры фикозэритроцианина (*Anabaena* sp. PCC 7120) окрашены в розовый цвет, а гексамеры фикоцианина — в зеленый. ФБС из Gv7421 и *Synechococcus* sp. PCC 6301 были нарисованы бледными цветами, а линкер CpcGm (glr1262) не был показан, поскольку структуры высокого разрешения ФБС из этих двух штаммов еще не получены. Адаптировано из (Jiang et al., 2023).

Цианобактерии рассматривают как эволюционные предшественники хлоропластов высших растений и, пока не был локализован сайт NPQ для высших растений на уровне ССКП (Ruban et al., 2021), было логичным предположить, что они обладают общим механизмом NPQ. Однако светозависимое образование зеаксантина в цианобактериях обнаружено не было, а ферменты для синтеза лютеина у них отсутствуют. Тем не менее, сама диссипация энергии света цианобактериями была зафиксирована (El Bissati et al., 2000; Rakhimberdieva et al., 2004). Было показано, что в ответ на действие синего света (Rakhimberdieva et al., 2004) происходит обратимое тушение флуоресценции, нечувствительное к действию ингибиторов синтеза белка (El Bissati et al., 2000), то есть процесс не являлся следствием повреждения компонентов ФСII.

Детальный анализ спектра активации тепловой диссипации энергии был выполнен Рахимбердиевой М. Г. с соавторами на мутантном штамме *Synechocystis*, лишенным ФСII (Rakhimberdieva et al., 2004). Такой штамм был необходим для исследования изменения спектральных характеристик ФБС, так как спектры эмиссии ФБС и ФСII перекрываются. Интенсивный синий свет вызывал обратимое NPQ флуоресценции ФБС (рис. 4 А). Было определено, какие именно длины волн активируют этот процесс, и впервые показано, что спектр действия тепловой диссипации (рис. 4 Б) соответствует типичному спектру поглощения каротиноидов.

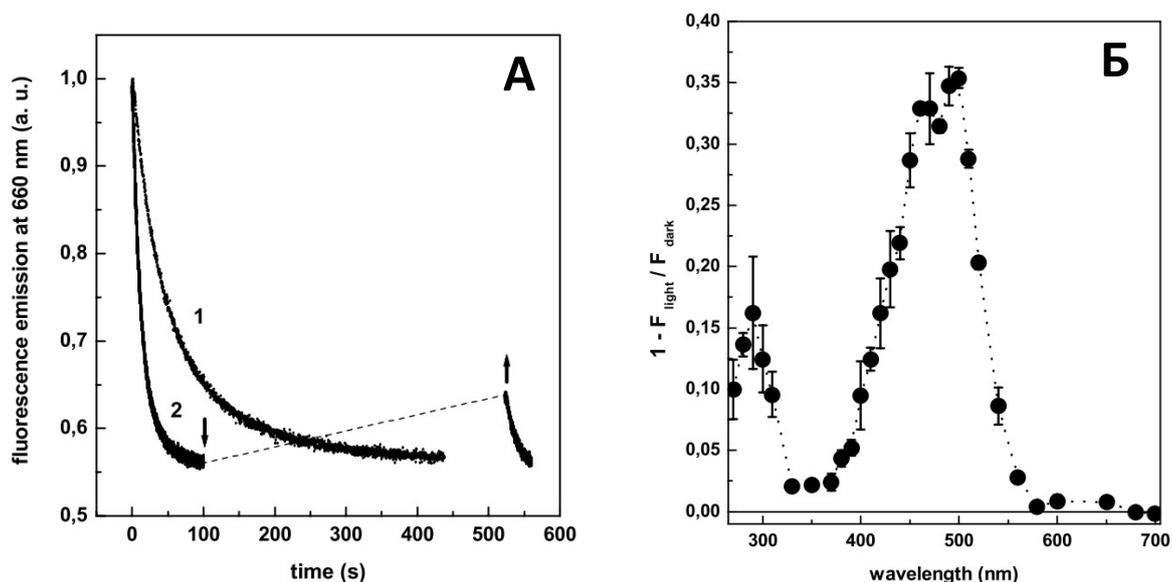


Рисунок 4. Нефотохимическое тушение флуоресценции фикобилисом (ФБС) (Rakhimberdieva et al., 2004). (А) Спектр действия нефотохимического тушения флуоресценции ФБС. (Б) Кинетика нефотохимического тушения флуоресценции ФБС при воздействии света с длиной волны 500 нм, Стрелка вниз обозначает выключение света, а стрелка вверх – повторное включение. Адаптировано из (Rakhimberdieva et al., 2004).

Полученные данные свидетельствовали о существовании формы каротиноида, взаимодействующей с ФБС. Экспериментальная проверка данной идеи легла в основу дальнейших исследований и позволила выявить функцию Оранжевого Каротиноидного Белка (Wilson et al., 2006).

## 2. Структура и фотозащитные функции белка ОСР

Выделение и описание ОСР произошло задолго до выяснения его функции (Holt et al., 1981; Wu et al., 1997; Kirilovsky et al., 2016). Авторами также был выделен так называемый красный каротиноидный белок (RCP), соочищаемый вместе с ОСР и представляющий собой, как было показано позднее, протеолитический N-концевой фрагмент ОСР (Wu et al., 1997). Был определен ген, кодирующий ОСР, по доступному тогда геному *Synechocystis* PCC 6803.

Структура ОСР была определена методом рентгеноструктурного анализа (Kerfeld et al., 2003). ОСР представляет собой водорастворимый двухдоменный белок (35 кДа), во внутренней полости которого расположена молекула кетокаротиноида (3-гидроксиэхиненона) (рис. 5 А). Два домена соединены протяженным линкером, образуют обширный междоменный интерфейс и дополнительно стабилизированы взаимодействием короткой N-концевой  $\alpha$ -спирали (NTE) с С-доменом.

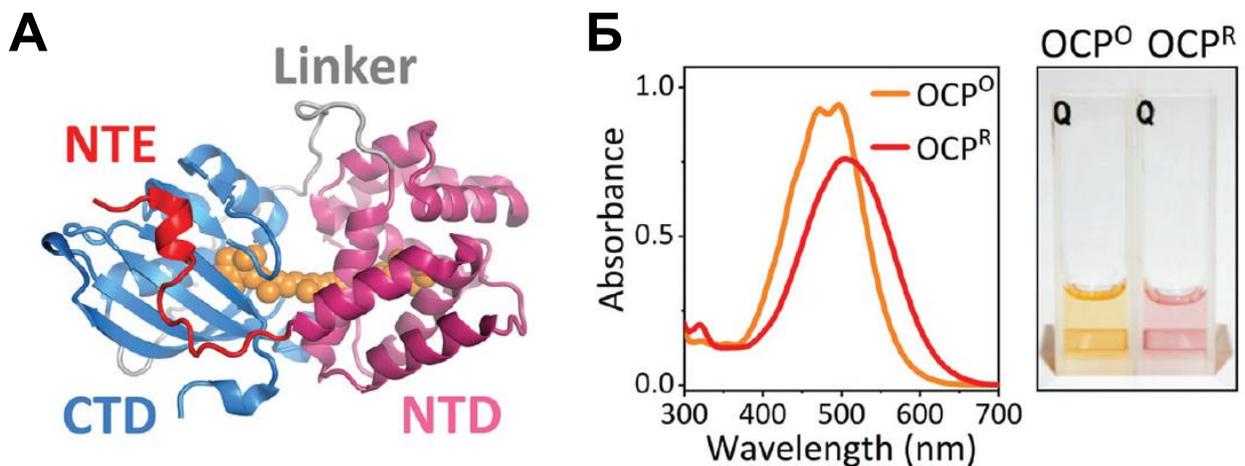


Рисунок 5. Структура и спектральная характеристика ОСР. (А) Структура ОСР из *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PDB: 4XB5). Каротиноид (окрашен оранжевым) расположен во внутренней полости белка между его N-концевым (NTD, окрашен розовым) и С-концевым (СТД, окрашен синим) доменами. Домены соединены т. н. линкерным полипептидом без регулярной вторичной структуры (окрашен серым) и дополнительно стабилизированы N-концевым сегментом (NTE, окрашен красным), содержащим короткую альфа-спираль и взаимодействующим с поверхностью СТД. (Б) Спектральные изменения и изменение цвета раствора ОСР при его фотоактивации. Адаптировано из (Slonimskiy et al., 2020).

В ответ на действие синего света (400-500 нм) белок претерпевает фотоактивацию (Wilson et al., 2008) (рис. 5 Б), происходит смещение каротиноида в N-концевой домен (Leverenz et al., 2014; Leverenz et al., 2015) и диссоциация

доменов (Liu et al., 2014; Gupta et al., 2015) (рис. 6).  $ОСР^R$  самопроизвольно превращается в  $ОСР^O$ , если интенсивность света снижается (Wilson et al., 2008). Для функционирования ОСР необходим кетокаротиноид эхиненон или гидроксизехиненон. Если ОСР содержит гидроксикаротиноид зеаксантин, то белок утрачивает способность к фотоактивации (Punginelli et al., 2009), а клетки цианобактерий, лишённые фермента CrtO, синтезирующего эхиненон, не обладают NPQ в ответ на действие синего света (Punginelli et al., 2009). Также была показана антиоксидантная активность ОСР по тушению синглетного кислорода даже в отсутствие фотоактивации ОСР (Sedoud et al., 2014).

Изменения в локальном окружении каротиноида при фотоактивации сопровождаются сдвигом спектра поглощения в длинноволновую область (Wilson et al., 2008; Maksimov et al., 2016) и изменением цвета (рис. 5 Б). Данное изменение цвета с оранжевого на красное дало названия нефотоактивированной «оранжевой» форме белка  $ОСР^O$  и фотоактивированной «красной» форме белка  $ОСР^R$ .

Было показано, что ОСР только после фотоактивации способен взаимодействовать с ФБС при помощи N-домена (Leverenz et al., 2014) и вызывать тушение их флуоресценции как *in vivo* в цианобактериях (Wilson et al., 2006), так и *in vitro* при добавлении ОСР к препарату очищенных ФБС и облучении синим светом (Gwizdala et al., 2011). В N-концевом домене ОСР одним из ключевых для взаимодействия с ФБС аминокислотных остатков является R155, замена которого на нейтральный или отрицательно заряженный аминокислотный остаток нарушает образование комплекса ОСР-ФБС (Wilson et al., 2012). Тушения флуоресценции фикобилисом можно добиться, добавляя к ФБС только N-домен ОСР, несущий кетокаротеноид, добавление холоформы C-концевого домена ОСР не приводит к тушению (Leverenz et al., 2014; Moldenhauer et al., 2017). Кроме того, аминокислотные замены на поверхности N-домена ОСР в области контакта с каротиноидом (аминокислотные остатки N104, I151, L51, G57) приводят к ослаблению взаимодействия с ФБС, что также косвенно подтверждает модель взаимодействия с ФБС через NTD (Wilson et al., 2022).

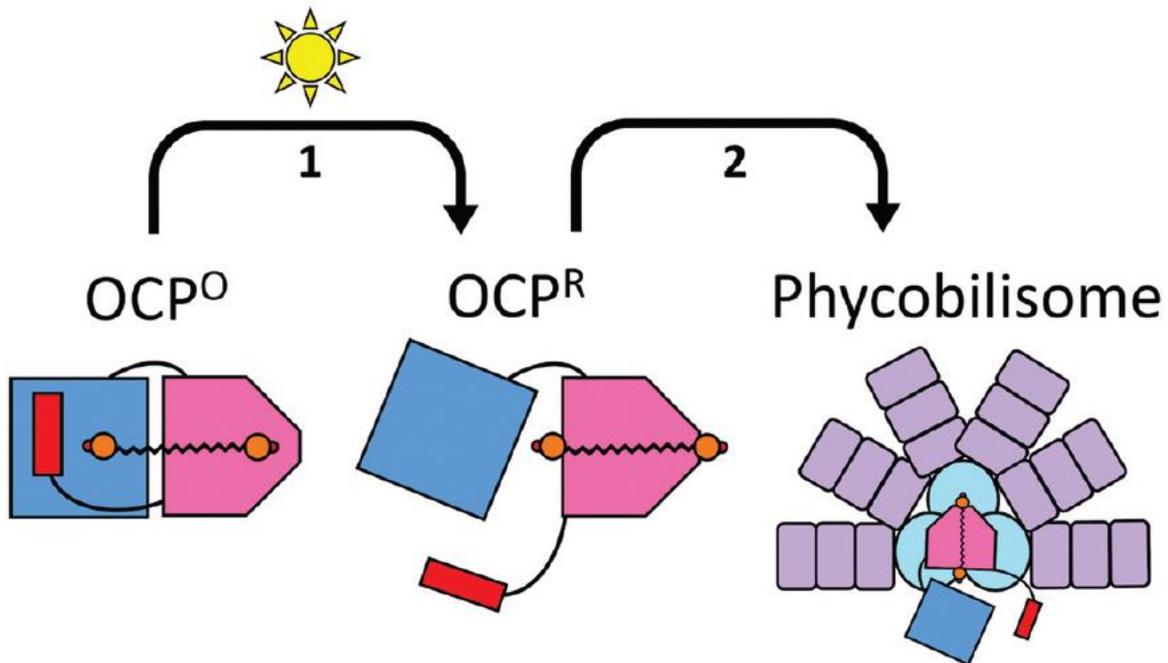


Рисунок 6. Упрощенная модель OCP-зависимого механизма фотозащиты (Slonimskiy et al., 2020). OCP (то же цветовое кодирование, что и для рис. 5) фотоактивируется и претерпевает структурные изменения (стадия 1). Только в таком фотоактивированном состоянии, при котором каротиноид переходит в NTD, а домены OCP разделяются, OCP способен связываться с ядром ФБС (обозначено голубыми кружками) и перехватывать энергию возбужденных светом пигментов ФБС (стадия 2). Адаптировано из (Slonimskiy et al., 2020).

Таким образом, цианобактерии, как и высшие растения, также обладают NPQ, полагающимся на действие каротиноидов на уровне светособирающих комплексов, однако принципиальные различия в структуре их ССК привели к формированию иного молекулярного механизма. Отметим, что, несмотря на то, что фикобилисомы являются светособирающими комплексами также у красных и глаукоцистофитовых водорослей, OCP в последних отсутствует (Niyogi et al., 2013).

Оставалось неясным, где находится сайт взаимодействия OCP и ФБС, какова стехиометрия их связывания и каким образом происходит передача энергии

электронного возбуждения с фикобилинов ФБС на молекулу каротиноида ОСР с дальнейшим рассеянием энергии в виде тепла. Исследование данного вопроса заняло более 10 лет с использованием набора биохимических и биофизических методов. При анализе мутантных форм ФБС было показано, что ОСР взаимодействует с аллофикоцианиновым ядром фикобилисомы (Gwizdala et al., 2011), что также косвенно подтверждалось спектральным анализом флуоресценции ФБС до и после тушения белком ОСР. Кириловски и соавторы оценили стехиометрию комплекса ОСР-ФБС как 1:1 в присутствии большого избытка ОСР (Gwizdala et al., 2011). Независимо методами спектроскопии для одиночных молекул было показано наличие двух состояний для комплекса ОСР-ФБС (Squires et al., 2019), что могло означать наличие двух сайтов взаимодействия ОСР-ФБС.

Наиболее детальная модель взаимодействия была показана при получении структуры комплекса ФБС-ОСР методом криоэлектронной микроскопии (Domínguez-Martín et al., 2022). Оказалось, что ОСР<sup>R</sup> действительно взаимодействует с аллофикоцианиновым ядром, как и было показано ранее, но с В и Т цилиндрами (рис. 7 А), в составе димеров. Во взаимодействии с ОСР участвуют АрсА и АрсВ (рис. 7 Б), но не АрсЕ (Stadnichuk et al., 2012; Zhang et al., 2014) или АрсС (Harris et al., 2016) как в моделях, представленных ранее. Важно отметить, что стехиометрия комплекса отличалась от оцененной Кириловски и соавторами, на одну фикобилисому приходится два димера ОСР (Domínguez-Martín et al., 2022), так как на фикобилисоме присутствуют два сайта связывания димеров ОСР, что хорошо соответствовало модели с двумя сайтами связывания ОСР, полученной методами спектроскопии (Squires et al., 2019).

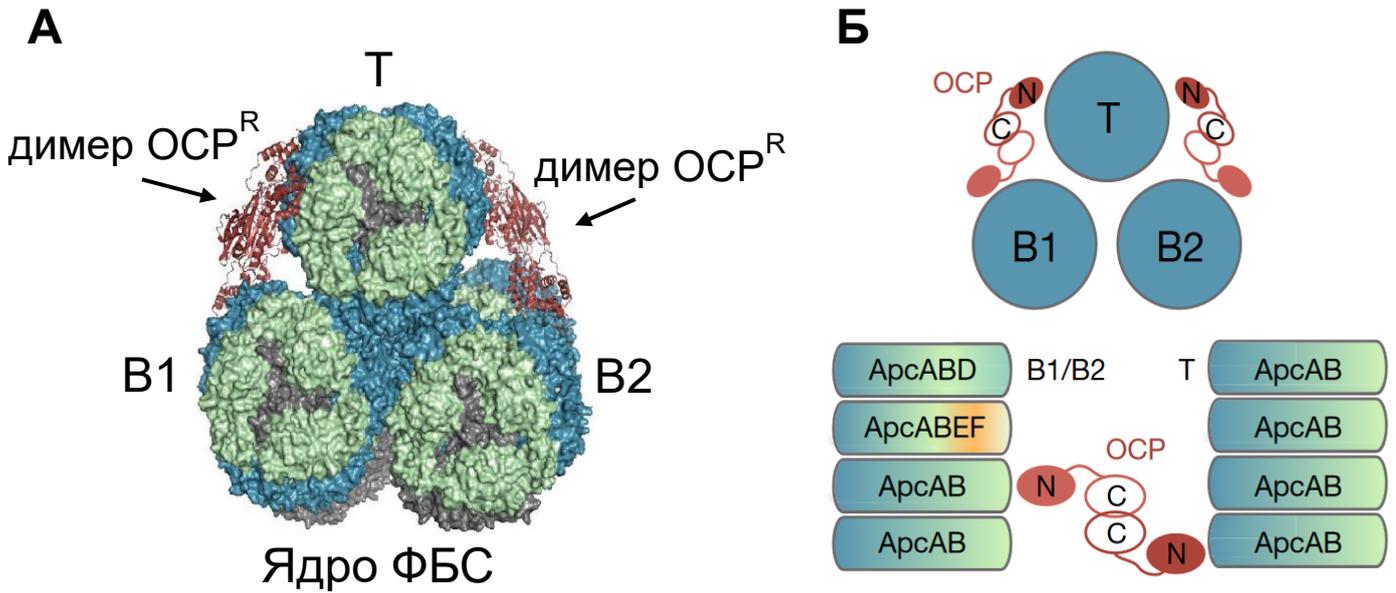


Рисунок 7. Структура комплекса  $OCP^R$ -ФБС. (А) Димеры  $OCP^R$  (окрашены красным) взаимодействуют с фикобилипротеинами аллофикоцианинового ядра ФБС (окрашены серым, зеленым и синим). Стержни ФБС удалены для ясности. (Б) Схематичное изображение комплекса ядра ФБС с  $OCP^R$  с указанием фикобилипротеинов в составе цилиндров Т, В1 и В2. Адаптировано из (Domínguez-Martín et al., 2022).

В ранних работах по реконструированию тушения флуоресценции фикобилисом было показано, что  $OCP$  после фотоактивации образует стабильный комплекс с ФБС и почти не диссоциирует из него даже в темноте (Gwizdala et al., 2011). Прочность комплекса, с одной стороны, объясняется условиями эксперимента: для стабилизации фикобилисом используют 0.7-0.8 М калий-фосфатный буфер (рН 7). В таких условиях комплекс  $OCP$ -ФБС слишком прочен и это препятствует диссоциации  $OCP$  и его последующему переходу в оранжевую форму. С другой стороны, в клетках цианобактерий мог присутствовать фактор, регулирующий связывание  $OCP$  с ФБС. Такой отрицательный регулятор был найден при нокаутировании генов, окружающих ген *ocp* (Boulay et al., 2010).

При нокауте соседнего с *osr* гена почти не происходило восстановления флуоресценции фикобилисом *in vivo* после облучения синим светом (рис. 8).

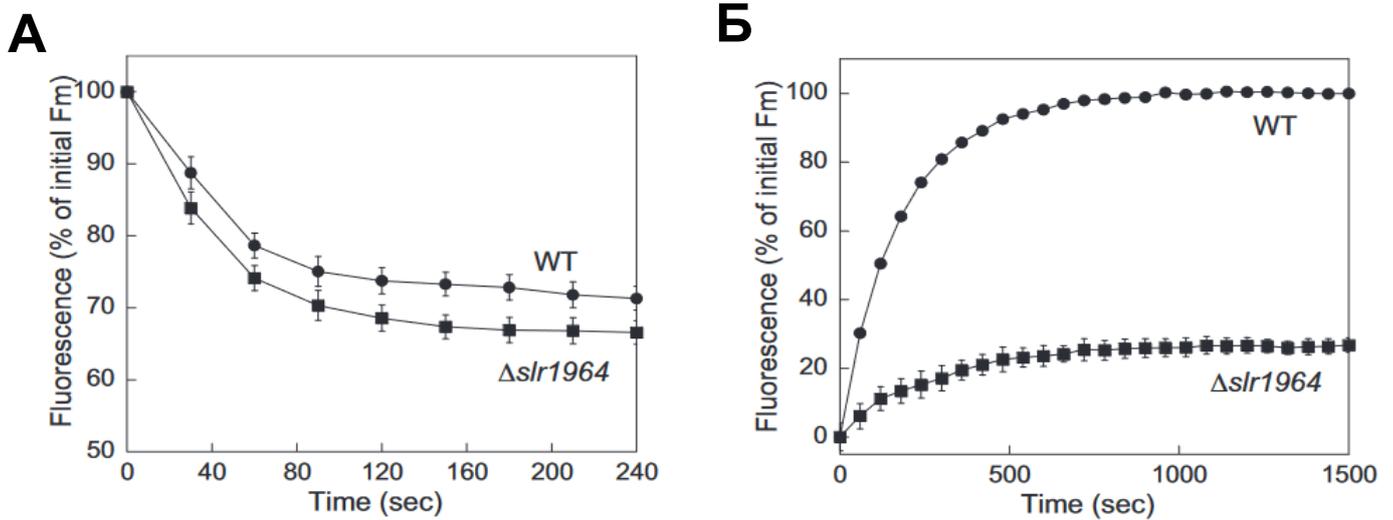


Рисунок 8. Роль белка FRP, кодируемого геном *slr1964*. (А) Снижение максимальной флуоресценции (Fm) при воздействии на клетки *Synechocystis* sp. PCC 6803 дикого типа (WT, кружки) и мутантных клеток  $\Delta slr1964$  (квадраты) фотонов  $740 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$  сине-зеленого света (400–550 нм). (Б) Увеличение Fm при воздействии слабого сине-зеленого света ( $80 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ ) после воздействия сине-зеленым светом с высокой интенсивностью, WT (Б, кружки),  $\Delta slr1964$  (Б, квадраты). Адаптировано из (Boulay et al., 2010).

Фактор восстановления флуоресценции фикобилисом назвали FRP (от англ. Fluorescence Recovery Protein). В *in vitro* экспериментах белок FRP драматически ускорял (Gwizdala et al., 2013; Sutter et al., 2013) переход  $\text{OCP}^{\text{R}}$  в  $\text{OCP}^{\text{O}}$  (R-O конверсия) и способствовал высвобождению OCP из комплекса с ФБС (Thurotte et al., 2017).

### 3. Расположение и экспрессия гена FRP

Гены *frp*, как правило, расположены непосредственно после или через ген относительно гена *osp* (Boulay et al., 2010). Тандемное расположение генов *osp* и *frp* изначально привели к гипотезе их котранскрипционной регуляции (Boulay et al., 2010). Однако, оказалось, что под нативными промоторами *osp* и *frp* не получается обнаружить мРНК, содержащую оба гена. Кроме того, даже после делеции гена *osp* можно детектировать транскрипт, содержащий *frp*, что означало наличие у *frp* собственного промотора (Boulay et al., 2010). Избыточная экспрессия FRP в клетках *Synechocystis* приводила к полной потере способности клеток к NPQ под действием синего света, что свидетельствует о необходимости поддерживать определенное соотношение концентрации OCP/FRP для корректной работы NPQ (Boulay et al., 2010; Gwizdala et al., 2013; Shirshin et al., 2017). К сожалению, точный уровень экспрессии FRP так и не был измерен, вероятно из-за относительно низкой концентрации его мРНК, тогда как для OCP этот параметр был успешно определен (Bao et al., 2017). Согласно оценке относительной концентрации белков методом иммуноблоттинга (Gwizdala et al., 2013), в клетках цианобактерии концентрация OCP значительно превышает концентрацию FRP, что находится в соответствии с *in silico* моделированием фотозащитного механизма (Shirshin et al., 2017).

Важно отметить, что не во всех геномах цианобактерий, в которых есть ген *osp*, может быть обнаружен ген *frp*. Несмотря на то, что *frp* есть в подавляющем большинстве цианобактерий, его отсутствие у отдельных групп цианобактерий при наличии функционального гена *osp* требовало объяснения.

#### 4. Структура белка FRP и влияние аминокислотных замен на его активность

Структура FRP была определена методом рентгеноструктурного анализа (Sutter et al., 2013; Bao et al., 2017). FRP представляет собой водорастворимый белок с молекулярной массой 14 кДа. Sutter и соавторы при определении структуры FRP методом РСА идентифицировали димерную и тетрамерную формы FRP. Впоследствии, однако, было показано, что в водном растворе FRP преимущественно представлен в димерном состоянии (Lu et al., 2016; Sluchanko et al., 2017).

Сам белок состоит из 4 альфа-спиралей и одной короткой  $3_{10}$  спирали, организованных в два субдомена, получивших название «голова» и «стержень». Стержень состоит из спиралей  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  (рис. 9 А), обеспечивающих гидрофобный интерфейс, который стабилизирует димер белка. Димер FRP также стабилизируется  $\pi$ -катионным взаимодействием между боковыми цепями остатков R60 и W50, а также водородными связями между остатками D54 и R60 (рис. 9 Б). Замена любого из них приводит к дисфункции FRP (Sutter et al., 2013; Lu et al., 2017), хотя мутантная форма R60K, по-видимому, сохраняет димерную форму (Sutter et al., 2013), типичную для кристаллической структуры FRP дикого типа. Остальные спирали FRP образуют головной субдомен (рис. 9 Б). Следует отметить тот факт, что существует альтернативная конформация полипептидной цепи FRP, в которой  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  образуют одну длинную  $\alpha 1'$ -спираль (рис. 9 А, справа). Такая конформация дает тетрамерную олигомерную форму (рис. 9 А, середина), но нельзя исключить, что это является артефактом при условиях кристаллизации. Тем не менее, различие в конформациях полипептидной цепи, наблюдаемое в структуре 4JDX, предполагает возможную структурную динамику FRP при его функционировании. Действительно, сравнение двух конформаций показывает возможность изгиба длинной спирали  $\alpha 1'$  (рис. 9 А). Остатки на поверхности белка FRP обладают примечательным распределением их консервативности (рис. 9 В):

они расположены только на одной стороне его димера. Стоит также отметить, что консервативные остатки образуют два отдельных участка в областях субдоменов стержня и головы FRP (рис. 9 В). Такое распределение аминокислотных остатков привело к гипотезе об их участии в активности FRP, что было убедительно продемонстрировано с помощью аминокислотных замен с последующим анализом их влияния на активность FRP (рис. 9 Б). Замены многих консервативных аминокислот негативно влияют на функцию FRP (Sutter et al., 2013; Lu et al., 2017; Thurotte et al., 2017); однако точный молекулярный механизм взаимодействия ОСП–FRP остается не до конца выясненным.

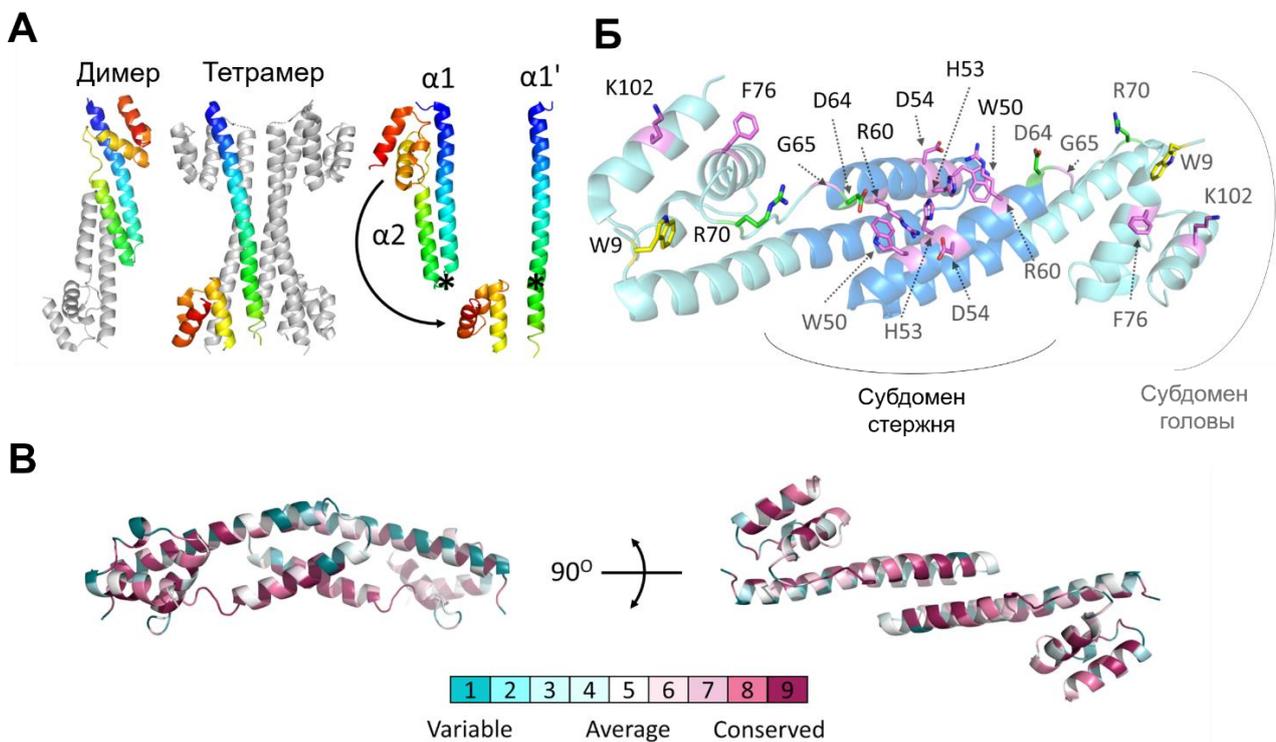


Рисунок 9. Структура и консервативность FRP (Slonimskiy et al., 2020). (А) Конформации FRP в структуре, полученной методом рентгеноструктурного анализа (PDB: 4JDХ). Две альтернативные конформации FRP образуют димерную и тетрамерную олигомерные формы. (Слева) Одна из субъединиц в каждой форме окрашена с обозначением N- (синий) и С-концов (красный), остальные субъединицы - серым цветом. (Справа) показан мысленный поворот полипептидной цепи FRP при переходе из димерной в тетрамерную формы. Звездочкой отмечена шарнирная область. (Б) Димер FRP с выделенным

известными аминокислотными заменами. Остатки помечены на обеих субъединицах черным и серым шрифтом соответственно. Отдельные субдомены FRP, «голова» и «стержень», окрашены голубым и синим цветом. Боковые группы окрашены согласно их влиянию на функциональную активность FRP: фиолетовый означает снижение активности, зеленый – увеличение активности, а желтый – отсутствие эффекта на активность. (B) Карта консервативности на структуре FRP (PDB: 4JDX) с использованием ConSurf, снизу представлена схема цветового кодирования переменных и консервативных участков. Адаптировано из (Slonimskiy et al., 2020).

## 5. Взаимодействие OCP и FRP

Как только стала доступна структура FRP (Sutter et al., 2013) были высказаны предположения по поводу того, как белок FRP взаимодействует с OCP на основании коиммунопреципитации FRP с изолированными доменами OCP и молекулярного докинга (рис. 10) (Sutter et al., 2013). Основной сайт взаимодействия OCP-FRP в данной модели расположен на C-доме OCP, с которым контактирует высоко консервативный субдомен стержня FRP. Однако, предложенная Sutter и соавторами модель взаимодействия FRP с C-доме OCP никак не проясняла как FRP ускоряет R-O конверсию OCP. Кроме того, в процессе докинга пришлось удалить N-домен OCP из-за возникающего с ним пересечения полипептидной цепи FRP (рис. 10 А, выделение серым кружком). Как FRP взаимодействует с полноразмерным OCP, как FRP различает OCP<sup>R</sup> и OCP<sup>O</sup> оставалось неизвестным. Связывание FRP не приводило к снижению энергии активации R-O перехода OCP, но значительно ускоряло его благодаря увеличению предэкспоненциального фактора (Sluchanko et al., 2017).

Было показано, что FRP взаимодействует с OCP<sup>R</sup> или его стабильным аналогом (OCP<sup>W288A</sup>) значительно сильнее, чем с OCP<sup>O</sup> (Sluchanko et al., 2017). Комплекс OCP<sup>W288A</sup> и FRP имел стехиометрию 1:1, что привело к выводу о том, что димер FRP должен диссоциировать до мономеров при связывании с OCP

(Sluchanko et al., 2017; Thurotte et al., 2017). Дестабилизация димера FRP должна была сопровождаться существенными конформационными изменениями, например, такими, которые можно детектировать при переходе из димерной в тетрамерную форму в кристаллической структуре FRP (рис. 9 А).

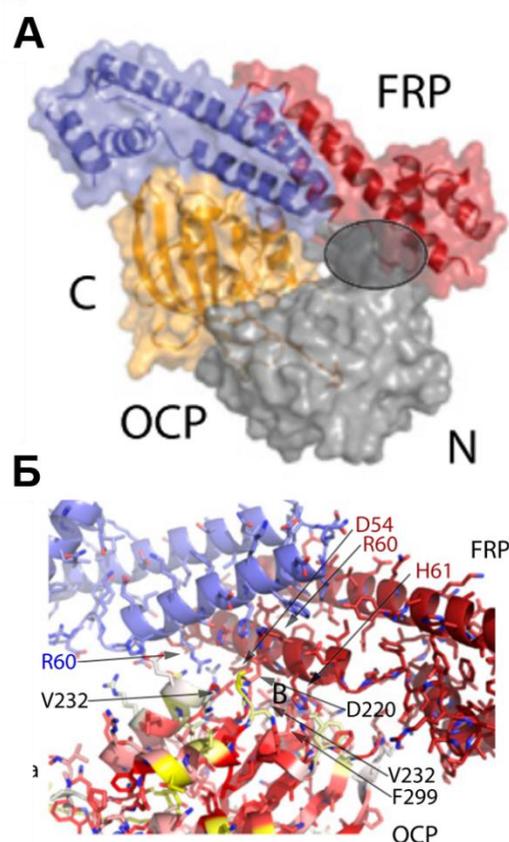


Рисунок 10. Первая модель взаимодействия OCP-FRP. (А) Докинг димера FRP на С-концевой домен OCP. N-концевой домен выделен серым цветом, С-концевой домен - оранжевым цветом. Серым кружком отмечено, что при построении модели взаимодействия на полноразмерный OCP должно происходить столкновение между FRP и N-концевым доменом OCP. (Б) Сайт взаимодействия между OCP и FRP. Аминокислотные остатки в OCP, участвующие во взаимодействии, отмечены черным цветом, а аминокислотные остатки субъединиц FRP – синим и красным. Адаптировано из (Sutter et al., 2013).

В пользу высокой конформационной динамики FRP говорили и данные по химической модификации FRP при взаимодействии с OCP. Включение химических меток аминокислотными остатками могло означать частичное разворачивание FRP в процессе взаимодействия с OCP (Lu et al., 2017).

Данные по мутагенезу OCP указывают на то, что ключевым для активности FRP является остаток F299 (Thurotte et al., 2017), замена которого приводит к потере способности FRP вызывать R-O конверсию OCP. Участок с F299 находится в области взаимодействия N-концевого сегмента (NTE) и C-домена OCP, а значит в состоянии OCP<sup>O</sup> эта область должна закрыта для FRP. Более того, FRP способен взаимодействовать с рекомбинантным изолированным C-доменом OCP, но не с изолированным N-доменом OCP (Moldenhauer et al., 2017). Эти косвенные данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что участок взаимодействия NTE и C-домена OCP и участок взаимодействия OCP с FRP пересекаются. Данную гипотезу подтверждает тот факт, что FRP более эффективно восстанавливает флуоресценцию ФБС, если с ФБС связан мутантный по NTE OCP, а не белок дикого типа (Thurotte et al., 2015). Фиксация NTE на C-доме OCP должна препятствовать ускорению R-O конверсии под действием FRP и взаимодействию с ним, а удаление NTE гипотетически может привести к постоянному взаимодействию с OCP без фотоактивации. Независимо из анализа мечения аминокислотных остатков на поверхности OCP и FRP при их взаимодействии следовало, что во взаимодействии OCP с FRP участвуют остатки на C-доме OCP и на головном субдоме FRP (Gupta et al., 2019). Участок взаимодействия, однако, сильно отличался от представленного ранее Sutter и соавторами. Другая модель, построенная на анализе аминокислотных замен на поверхности OCP, предполагала также вовлечение во взаимодействие с FRP аминокислотных остатков линкера OCP (Muzzorappa et al., 2019).

Поиск сайта взаимодействия OCP и FRP в том числе привел к анализу многообразия и консервативности белка OCP. Как правило, взаимодействующие белки коэволюционируют (Goh et al., 2000), а поверхности их контакта становятся комплементарными по форме, заряду и гидрофобности (Jones et al., 1996). Консервативность остатков в зоне белок-белкового взаимодействия имеет тенденцию быть выше по сравнению с остальной поверхностью белков, но одной консервативности недостаточно для предсказания белок-белковых взаимодействий (Keskin et al., 2008). Потенциально анализ последовательностей OCP и FRP, а также наличие решенных структур каждого из белков могли дать ответ о том, как взаимодействуют эти белки-партнеры. Однако, вопрос поиска поверхности взаимодействия OCP с FRP осложнился наличием нескольких линий паралога у OCP.

## 6. Многообразие белков OCP

При филогенетическом анализе белков OCP были выявлены 3 паралогических линии, названных OCP1, OCP2 и OCPX (Bao et al., 2017; Muzzorappa et al., 2019). Паралоги могут присутствовать в геномах цианобактерий во всех попарных комбинациях, но никогда не встречается все 3 полноразмерных гена OCP1, OCP2 и OCPX (рис. 11). Наиболее охарактеризованными остаются представители субклады OCP1, для которых и была показана регуляция белком FRP.

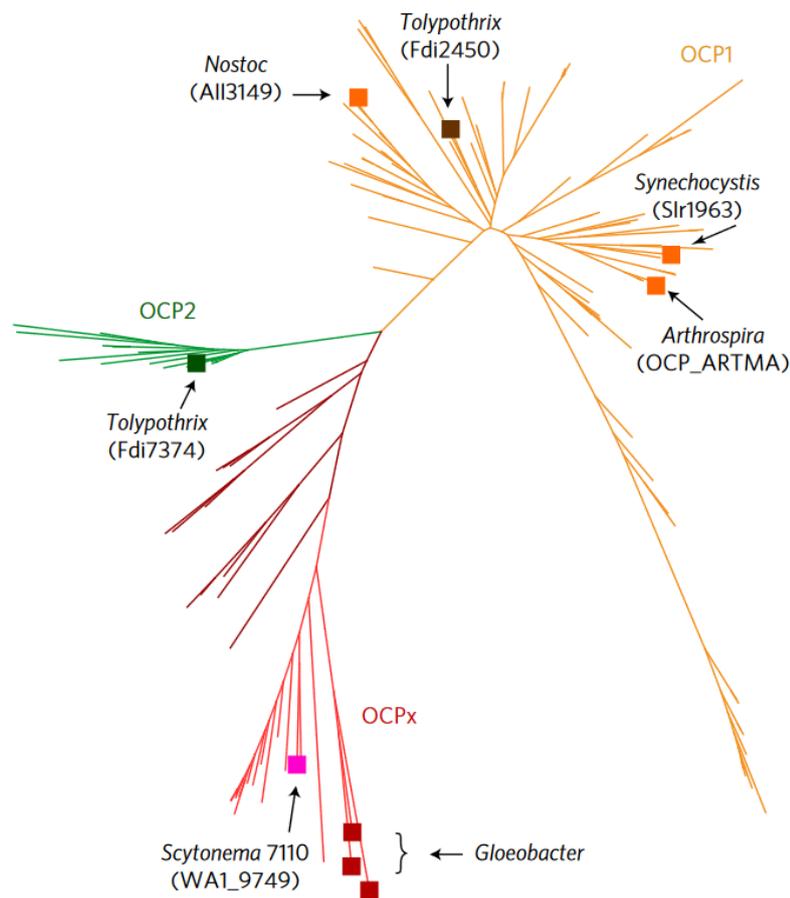


Рисунок 11. Филогенетическое дерево полноразмерных OCP с указанием паралогических субклад. Адаптировано из (Bao et al., 2017).

Примечательной особенностью является совстречаемость генов *ocp1* и *frp*. Если в геноме отсутствует ген *ocp1*, то и ген *frp* не может быть обнаружен. Это обстоятельство может означать, что FRP регулирует только представителей OCP1

клады, но не OCP2 и OCPX. Данная гипотеза требовала экспериментального подтверждения, однако до нашего исследования ни одна группа не исследовала прямого взаимодействия белков OCP2 или OCPX с FRP, но только возможность действия FRP на их фотоцикл (Bao et al., 2017; Muzzorappa et al., 2019). Было показано, что FRP не способен ускорять R-O конверсию OCP2 и OCPX, но не было показано, что FRP не может образовывать с ними комплекс (Bao et al., 2017; Muzzorappa et al., 2019). Потенциально FRP мог образовывать непродуктивные комплексы, не влияющие на фотоцикл OCP. Если FRP действительно не может взаимодействовать с OCP2 и OCPX, то это позволит произвести сравнительный анализ OCP1, OCP2 и OCPX и выявить сайт взаимодействия с FRP. Отметим, что для изолированных N- и C-доменов OCP2 была показана возможность их спонтанной реассоциации после облучения синим светом (Lechno-Yossef et al., 2017), что принципиально отличает OCP2 от OCP1, изолированные домены которого после фотоактивации необратимо диссоциируют (Moldenhauer et al., 2017). Такая особенность показывает эволюционный путь OCP1, как зависимого от регуляции белком-партнером FRP.

К настоящему моменту механизм взаимодействия OCP и FRP остается нерешенной проблемой, и мы сфокусировали наши усилия на поиске сайта взаимодействия и структуры их комплекса. Кроме того, мы обратили свое внимание на крайне низкий уровень идентичности среди гомологов FRP, что натолкнуло нас на проверку гипотезы об универсальности действия FRP.

## Материалы и методы исследования

### 1. Методы генной инженерии

#### 1.1. Трансформация *E. coli*

Плазмиды pET28b или pRSFDuet, содержащие целевые гены, использовали для трансформации химически компетентных клеток (Inoue et al., 1990) *E. coli* штаммов DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3) или T7 SHuffle. Компетентные клетки *E. coli*, хранившиеся при  $-80^{\circ}\text{C}$ , размораживали на льду в течение 15-20 мин. В жидкую суспензию клеток (50-100 мкл) стерильно вносили либо 1 мкл плазмиды в концентрации не менее 50 нг/мкл (при трансформации плазмидой), либо 10 мкл лигазной смеси и инкубировали клетки на льду в течение 30 мин. Проинкубированные клетки подвергали тепловому шоку на водяной бане при  $42^{\circ}\text{C}$  в течение 35 секунд, после чего сразу же переносили их в лед и охлаждали в течение 3 мин. Далее к клеткам добавляли 0,4 мл стерильной среды SOC (2% триптона; 0,5% дрожжевого экстракта; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM глюкозы) и подращивали в термошейкере при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1,5 часов. Клетки осаждали центрифугированием, стерильно удаляли супернатант, а осадок клеток ресуспендировали в остатке питательной среды и наносили на чашки Петри с агаризованной средой LB (40 г/л), содержащей один антибиотик или их комбинацию в зависимости от используемого вектора и штамма *E. coli*. Чашки Петри оставляли на ночь в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.2. Клонирование генов методом рестрикция-лигирование

Синтез кДНК генов, кодирующих целевые белки, проводили в компании IDT DNA Technologies (США). ДНК-конструкции, фланкированные сайтами рестрикции, обрабатывали эндонуклеазами *NdeI* и *XhoI*, лигировали с вектором pET28b по соответствующим сайтам и проводили трансформацию лигазной смесью химически компетентные клетки штамма *E. coli* DH5 $\alpha$ . Полученные конструкции несли N-концевой гексагистидиновых таг с сайтом для

высокоспецифичной 3С-протеазы (LEVL<sup>FQ</sup>GP). Все молекулярно-генетические конструкции были проверены ДНК секвенированием.

### 1.3. Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили методом мегапраймерного ПЦР (Smith et al., 1997). Замены в последовательностях производили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием т. н. мегапраймеров или протяженных праймеров (100-300 пар оснований), получаемых благодаря амплификации фрагментов гена с мутагенным праймером (15-20 пар оснований). В работе были использованы праймеры, указанные в таблице 1 (Приложение).

Мегапраймерный ПЦР проводили в два этапа с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (New England Biolabs, Великобритания). В качестве матрицы для ПЦР использовалась полученная ранее плазмидная ДНК, содержащая целевой ген. Во время второго этапа мегапраймерной ПЦР были использованы мегапраймеры, полученные во время первого этапа. В результате клонирования методом рестрикции-лигирования и последующей трансформации клеток *E.coli* штамма DH5 $\alpha$  получали целевую конструкцию. Дальнейший отбор клонов проводили методом ПЦР с использованием вектор-специфичных праймеров (к T7 промотору и T7 терминатору), амплифицируя клонированный ген и оценивая длину получаемых фрагментов.

### 1.4. Препаративная экспрессия белков

Все белки, использованные в работе, были получены при их экспрессии в штамме *E. coli* BL21 (DE3), T7 SHuffle или BL21 (DE3), содержащем дополнительную плазмиду pACCAR25 $\Delta$ crtX $\Delta$ crtZcrtO с кассетой ферментов для синтеза каротиноида эхиненона (ECH) (Maksimov et al., 2016). Синтез ECH обеспечивается продуктами генов *crtY*, *crtI*, *crtB*, *crtE* из *E. uredovora* и *crtO* из *Synechocystis* sp. PCC 6803. Продукт гена *crtO* вводит кетогруппы в положение 4 и

4'  $\beta$ -каротина с образованием эхиненона и кантаксантина. Культивация в течение 1 суток при +25 °С приводит к преимущественному накоплению эхиненона.

1 л среды LB (25 г/л) инокулировали 20 мл ночной культуры *E. coli* и выращивали полученную культуру клеток при +37 °С при интенсивном перемешивании в течение 2 часов до достижения оптической плотности при 600 нм равной 0.6. Охлаждали культуру до комнатной температуры, добавляли изопропилтиогалактозид до конечной концентрации 0.5 мМ и выращивали при температуре +25°С в течение 48 часов при интенсивном перемешивании.

## **2. Выделение и очистка белков**

Для очистки белков были применены хроматографические методы: металл-аффинная хроматография, ионообменная хроматография и гель-фильтрация.

### **2.1. Лизис и металл-аффинная хроматография**

Суспензионную культуру, экспрессировавшую целевой белок, осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 1 ч и ресуспендировали в буфере А (30 мМ Трис-НСl; рН 8.0; 300 мМ NaCl; 10 мМ имидазол). В полученную суспензию клеток добавляли ингибитор сериновых протеаз PMSF до конечной концентрации 0.5 мМ, после чего клетки обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе SONICS Vibra-cell (общее время УЗ-обработки составляло 10 мин: 20 сек УЗ-сигнал и 40 сек пауза, амплитуда 35-45%) на ледяной бане и центрифугировали при 20000 g в течение 45 мин. Полученный супернатант фильтровали через складчатый фильтр и наносили на колонку HisTrap HP (Cytiva, 5 мл), заряженную Ni<sup>2+</sup> и уравновешенную буфером А. После нанесения образца колонку промывали 75 мл буфера А, а содержащий гексагистиридиновый таг белок элюировали буфером Б (30 мМ Tris-HCl; рН 8.0; 300 мМ NaCl; 250 мМ имидазол). Фракции, содержащие по данным SDS-электрофореза наибольшее количество целевого белка, объединяли. К полученному препарату (~10 мл) добавляли 100 мкл 3С-протеазы (0.1 мг/мл) и

диализовали против 1 л буфера 3С (20 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ).

## 2.2. Вычитающая металл-аффинная (Ni<sup>2+</sup>) хроматография

После обработки целевого белка 3С-протеазой необходимо было удалить 3С и другие белки *E. coli*, которые обладают сродством к Ni<sup>2+</sup> и были элюированы вместе с белком, содержащим таг. После удаления тага 3С-протеазой целевой белок, как правило теряет сродство к Ni<sup>2+</sup>, что позволяет проводить т. н. вычитающую металл-аффинную хроматографию, суть которой в том, что только целевой белок, утративший таг не будет связан носителем и окажется во фракциях «проскока» и «отмывки» буфером А. Образец белка после 3С-протеолиза центрифугировали после диализа в течение ночи, а супернатант наносили на колонку на колонку HisTrap HP (Cytiva, 5 мл), заряженную Ni<sup>2+</sup> и уравновешенную буфером А, и собирали фракцию «проскока» и фракцию «отмывки» буфером А.

## 2.3. Гель-фильтрация

Полученные образцы концентрировали при помощи концентраторов Amicon (10 кДа или 30 кДа). Подготовленный образец объёмом не больше 4 мл наносили на колонку HiLoad Superdex 200 26/600 (GE Healthcare), уравновешенную буфером для гель-фильтрации (20 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 3 мМ бета-меркаптоэтанол, 3 мМ NaN<sub>3</sub>). Хроматографию проводили при скорости элюции 2.6 мл/мин. Фракции, содержащие наибольшее количество целевого белка, объединяли и хранили при +4 °С или замораживали при -80°С.

## 2.4. Анионообменная хроматография

Данный метод очистки применяли для отделения окисленной и восстановленной формы SynOCP<sup>cc</sup>. Поскольку окисленная и восстановленная форма белка обладают различными параметрами фотоактивации (окисленная форма даже при низкой температуре способна быстро возвращаться в оранжевую

форму), то это можно использовать для их разделения методом хроматографии. Препарат SynOCP<sup>cc</sup> после окисления в буфере, не содержащем восстановителей (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl), подвергали диализу против буфера Qa (20 mM Tris-HCl; pH 8.0; 10 mM NaCl; 0.1 mM ЭДТА). Образец наносили на колонку HiTrapQ 16/10 (Cytiva, 5 мл), уравновешенную буфером Qa. После нанесения образца колонку промывали 100 мл буфера Qa, а затем элюировали линейным градиентом NaCl – сначала 10-1000 mM NaCl со скоростью 2 мл/мин, собирая фракции по 2 мл. Полученные фракции анализировали методом электрофореза по Лэммли в отсутствие восстановителей (окисленная форма SynOCP<sup>cc</sup> обладает большей электрофоретической подвижностью по сравнению с восстановленной формой). Фракции, содержащие наибольшее количество окисленной формы целевого белка, объединяли.

## **2.5. Выделение и очистка фикобилисом методом центрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы**

Культуру клеток цианобактерии (*Synechocystis* sp. PCC 6803 или *Gloeobacter violaceus* PCC 7421) осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин, удаляли супернатант, а осадок клеток ресуспендировали в 0.65 M K-фосфатном буфере (pH 7,2), содержащим 0.5 M сахарозу. Повторяли центрифугирование при тех же условиях, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок клеток в том же буфере в таком объеме, чтобы концентрация клеток составила 0.2 мг (мокрой массы) на мл. Полученную суспензию дважды разрушали при помощи френч-пресса (Thermo electron) при 1500 пси и добавляли к лизированным клеткам детергент Тритон X-100 (2 % v/v конечная концентрация). Добавление детергента необходимо для эффективного разделения фикобилисом от фотосистем цианобактерий. Инкубировали лизат клеток при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 20 мин, а затем центрифугировали при 20000 g в течение 30 мин для осаждения клеточного дебриса и остатков нелизированных клеток. Окрашенный прозрачный супернатант (по 1 мл на

пробирку) наносили ровным слоем на сахарозный ступенчатый градиент, состоящий из ступеней 1, 4, 3, 1 мл 0.5 М, 0.75 М, 1.0 М и 2.0 М сахарозы в 0.75 М К-фосфатном буфере (рН 7) соответственно. Пробирки центрифугировали при 288000 g в течение 4 ч при (бакетный ротор SW 41 Ti, ультрацентрифуга Beckman L8-80M). Окрашенные фракции разделяли в соответствии с их границей раздела в градиенте сахарозы. Наиболее «тяжелые» фракции, находящиеся в слоях 0.75-1.0 М сахарозы соответствовали неповрежденным фикобилисомам (Guglielmi et al., 1981).

### **3. Аналитические физико-химические методы**

Для характеристики молекулярно-генетических конструкций, белков и их комплексов мы использовали различные виды гель-электрофореза, хроматографии, а также биофизики.

#### **3.1. Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Для анализа полученный ДНК конструкций мы использовали 0.8% агарозный гель, приготовленный на буфере TAE (40 mM Трис-ацетат, 1 mM ЭДТА) и содержащий 0,05% EtBr. К 0,5 мкл пробы ДНК добавляли 0,5 мкл 10-кратного буфера для образцов (SybEnzyme, РФ). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 180 V в течение 20 минут.

Для выделения и очистки полученных ДНК конструкций мы использовали 1% агарозный гель, приготовленный на буфере TAE и не содержащий EtBr. К 20 мкл пробы ДНК добавляли 0,5 мкл 10-кратного буфера для образцов (SybEnzyme, РФ). Электрофорез проводили при постоянном напряжении 100 V в течение 60 мин.

### 3.2. SDS–электрофорез по Лэммли

Для анализа белкового состава проб использовали метод SDS-электрофореза по Лэммли (Laemmli et al., 1970). Разделение проводили в 15% полиакриламидном геле (ПААГ). К анализируемым пробам добавляли 1/4 объёма 4-х кратного буфера для образцов (0.25 М Tris-HCl; pH 6.8; 8% SDS; 40% глицерин; 0.004% бромфеноловый синий; 5% МЭ), после чего пробы инкубировали в течение 5 мин при 95°C. В качестве катодного буфера использовали 0.19 М глицин-Tris, pH 8.6 и 0.1% SDS, в качестве анодного буфера использовали 0.25 М Tris-HCl, pH 8.6. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 200 V в течение 1 часа. Окрашивание гелей проводили в растворе Coomassie G-250 (0.3% Coomassie на 30% изопропанол и 10% уксусной кислоте), а отмывку - в воде.

### 3.3. Нативный электрофорез по Шаубу-Перри

Для характеристики мутантных форм SynFRP мы использовали метод электрофореза в нативных условиях в системе Шауба и Перри (Schaub et al., 1969). Белки разделяли в 15% ПААГ без концентрирующего геля. К окончанию инкубации к анализируемым пробам добавляли 1/4 объёма 4-кратного буфера для образцов (40 мМ глицин-Tris; pH 8.6; 25% глицерин; 0.004% бромфеноловый синий; 4% МЭ). В качестве электродного буфера использовали 0.08 М глицин-Tris, pH 8.6. Электрофорез проводили в течение 60 мин при напряжении 350 V.

При данных условиях стабильные комплексы белков остаются интактными. Взаимодействующие белки формируют отдельную полосу на геле с собственной электрофоретической подвижностью. Значения  $pI$  у всех мутантных форм белка FRP меньше 8.6, и, таким образом, при данном значении pH все они имеют суммарный отрицательный заряд, благодаря чему во время электрофореза движутся к аноду. Полученные гели окрашивали красителем Coomassie G-250 аналогично процедуре, описанной для SDS-электрофореза по Лэммли.

### **3.4. Спектрофотометрическое определение концентрации белков**

Для оценки концентрации полученных белков пользовались методом абсорбционной спектроскопии в УФ-диапазоне на приборе Nanophotometer N80 (Implen) по поглощению триптофана при 280 нм. Молярные и весовые коэффициенты экстинкции полученных белков, а также другие параметры (молекулярная масса, количество аминокислотных остатков (а.о)), изоэлектрическая точка (pI), количество остатков цистеина (Cys) и триптофана (Trp), были рассчитаны при помощи онлайн-сервиса ProtParam tool.

### **3.5. Исследования кинетики R-O перехода белков OCP**

Для исследования скорости перехода белков GluOCPX и SynOCP1 из фотоактивированной «красной» формы в базовую «оранжевую» форму мы разводили их препараты в буфере для гель-фильтрации до оптической плотности 0,2-0,6 при длине волны 495 нм. Спектры поглощения регистрировали на спектрометре Maya2000 Pro (Ocean Optics, USA), для фотоактивации использовали синий светодиод M455L3 (Thorlabs, США) с максимальной эмиссией при 455 нм, температуру образцов поддерживали термостатом Qpod 2e (Quantum Northwest, США). Кинетику перехода из «красной» в «оранжевую» форму (R-O конверсия) измеряли в температурном диапазоне от 35 °C до 5 °C с шагом в 5 °C. После изменения параметров температуры на термостате ожидали в течении 10-15 минут для равномерного распределения температуры в пробе. Белки фотоактивировали в течении получаса или до полного перехода в красную форму. После фотоактивации синий светодиод выключали и фиксировали переход из красной формы в оранжевую в промежутке от 10 минут до 12 часов в зависимости от образца и температуры. Детектировали поглощение в диапазоне 550-590 нм для оценки образования и убыли «красной» формы, базовую линию детектировали в диапазоне 670-710 нм, где почти отсутствует поглощение в препарате белков.

### 3.6. Тонкослойная хроматография

Полученные препараты каротиноид-связывающих белков анализировали на наличие в них тех или иных каротиноидов (ECH, CAN, ZEA или  $\beta\beta$ ) методом тонкослойной адсорбционной нормально-фазовой хроматографии. К 50 мкл раствора белка добавляли 100 мкл ацетона, после чего пробу тщательно перемешивали. Далее к пробе добавляли 50 мкл н-гексана и снова перемешивали. Пробу центрифугировали в течение 2 мин при 13400 rpm (миницентрифуга Eppendorf Minispin) для осаждения денатурировавшего белка. В супернатант погружали капилляры и наносили экстракт по каплям на заранее начерченную линию старта на пластине «Silufol» 15/5 см. Пластины помещали в камеру, уравновешенную смесью н-гексана и ацетона в соотношении 75:25 (v/v), так, чтобы линия старта находилась строго горизонтально на расстоянии не менее 1,5 см от верхней границы элюента. Камеру закрывали и ждали до тех пор, пока элюент не пройдет 9-10 см от старта. После завершения хроматографии отмечали границы проявившихся цветных пятен и измеряли величину Rf (расстояние от центра пятна до линии старта).

В качестве контролей использовали стандарты – препараты каротиноидов, ранее полученные в нашей лаборатории.

### 3.7. Исследование структуры FRP и его мутантных форм методом кругового дихроизма

Метод кругового дихроизма (КД) используется для анализа вторичной структуры белка. Как  $\alpha$ -спирали, так и  $\beta$ -складки обладают оптической активностью – по-разному поглощают лево- и право-поляризованный свет. Это позволяет вычислять долю элементов вторичной структуры в белках.

Образцы белка (0,5 мг/мл или 36 мкМ в расчете на мономер) в 30 мМ фосфатном буфере (pH 7,2) измеряли при 25 °C на Chirascan Circular Dichroism

Spectrometer (Applied Photophysics) в дальней ультрафиолетовой области (180-260 нм) в термостатируемой ячейке, кювете 0,2 мм, с шагом 1 нм и шириной щели 1 нм. Элементы вторичной структуры были рассчитаны путем разложения спектров КД с помощью Dichroweb (Whitmore et al., 2004). Для разложения спектров КД были применены методы CONTIN, SELCON3 и CDSSTR с использованием набора белков, оптимизированного для диапазона длин волн 185-240 нм.

### **3.8. Исследование взаимодействия белков ОСР с фикобилисомами с помощью флуоресцентной спектроскопии**

Фикобилисомы обладают интенсивной флуоресценцией, измерение интенсивности которой может быть использовано для оценки взаимодействия фикобилисом с каротиноид-связывающим белком. При связывании с фикобилисомами каротиноид-связывающий белок может вызывать тушение их флуоресценции. Измерение флуоресценции фикобилисом и их смеси с холоформой каротиноид-связывающих белков проводили с использованием термостатируемого мультимодального ридера CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Препараты фикобилисом были разбавлены в 0.75 М калий-фосфатном буфере (рН 7.2), содержащем 1 М сахарозу до оптической плотности ~0.1 при длине волны 621 нм. К полученным образцам добавляли препараты белков или 0.75 М калий-фосфатный буфер (рН 7.2), содержащий 1 М сахарозу, в качестве контроля. В лунки 96-луночного планшета раскапывали по 50 мкл опытных проб. В приготовленных пробах измеряли спектр эмиссии флуоресценции (525-800 нм) при длине волны возбуждения флуоресценции 500 нм при +25 °С.

### **3.9. Гель-фильтрация, сопряженная с регистрацией спектров поглощения**

Для оценки кажущейся массы, исследования олигомерного состояния полученных белков и их взаимодействия между собой использовали метод аналитической гель-фильтрации. Пробы объемом 10-20 мкл инкубировали при

комнатной температуре и наносили на колонку Superdex 200 Increase 5/150 (GE Healthcare), уравновешенную буфером для гель-фильтрации (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 3 mM МЭ).

Для калибровки колонки были использованы следующие стандарты молекулярных масс: БСА (66 кДа – мономер), овальбумин (43 кДа - мономер) и лактальбумин (14.5 кДа – мономер). По завершении гель-фильтрации строили калибровочный график в координатах  $\log M - V_e$ , где  $V_e$  – объем элюции (положение максимума пика) с использованием полученных для стандартов значений объемов элюции. Полученный график использовали для оценки кажущихся масс, соответствующих максимуму пиков белков на профиле элюции. Если не обозначено иное, при хроматографии поглощение детектировали в видимой области спектра (каротиноид-специфическое поглощение). Полученные данные мы аппроксимировали при помощи следующего уравнения (Sluchanko et al., 2017):

$$\Delta RT(x) = \Delta RT_{max} \cdot \left( \left( \frac{N + x + K_D}{2N} \right) - \sqrt{\left( \frac{N + K_D + x}{2N} \right)^2 - \frac{x}{N}} \right)$$

$\Delta RT$  – изменение времени удерживания,  $\Delta RT_{max}$  – максимальное изменение времени удерживания,  $N$  – концентрация сайтов связывания,  $x$  – концентрация титранта,  $K_D$  – константа диссоциации комплекса.

В данной работе была использована модификация данного уравнения, в которой вместо изменения времени удержания была использована амплитуда пика комплекса белков OCP/FRP или титруемого белка OCP.

### 3.10. Метод химического «сшивания» глутаровым альдегидом

Образование белкового комплекса можно зафиксировать с помощью химического сшивания глутаровым альдегидом. Карбонильные группы молекулы глутарового альдегида способны реагировать с аминогруппами аминокислотных

остатков, образуя с ними ковалентные связи, «сшивая» находящиеся близко друг к другу аминокислотные группы белков в составе комплекса.

Мы использовали данный метод для выявления комплексов SynFRP с SynOCP или SynOCP $\Delta^{2-20}$ . К преинкубированным пробам, содержащим только SynFRP, SynOCP $\Delta^{2-20}$ , SynOCP, или к смеси SynFRP с SynOCP $\Delta^{2-20}$  или SynOCP был добавлен свежий глутаровый альдегид до конечной концентрации 0.05 %. Данные пробы инкубировали при 30 °C в течение 15 мин, останавливая реакцию добавлением 4-х кратного буфера для образцов для SDS-электрофореза. Контрольные образцы были смешаны с буфером (10 mM HEPES, pH 7.6) без глутарового альдегида. Состав проб анализировали методом SDS-электрофореза по Лэммли (Laemmli, 1970).

### 3.11. Метод дисульфидной «ловушки»

Образование дисульфидных мостиков между остатками цистеинов в белках возможно только при оптимальной ориентации сульфгидрильных групп (Kufareva et al., 2016). Если два белка-партнера обладают остатками цистеинов, находящихся на расстоянии, позволяющем образовать химическую связь, то при образовании их комплекса может происходить окисление цистеинов с образованием ковалентной S-S связи. Идеальная дисульфидная связь имеет S $\gamma$ -S $\gamma$  расстояние 2,04±0,07 Å. Образование такой связи можно выявить при помощи SDS-электрофореза по Лэммли по появлению полосы, соответствующей комплексу белков в определенной стехиометрии. В потенциальном сайте взаимодействия двух белков-партнеров вводят аминокислотные замены на цистеины и проверяют способность белков взаимодействовать, а также способность образовывать S-S связи в условиях без восстановителей. Образование S-S связи у пары взаимодействующих белков локализует положение их контакта по введенным остаткам цистеинов.

## 4. Методы структурной биологии

Для определения структуры комплексов белков были применены методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и монокристаллическая рентгеновская кристаллография.

### 4.1. Метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР)

Упругое рассеяние рентгеновских лучей на белках и их комплексах позволяет выявить их форму, размер и некоторые детали структуры (например, ориентацию белков относительно друг друга в составе комплекса). В случае белков и их комплексов, размер которых находится в диапазоне 3-100 нм, рассеяние рентгеновских лучей детектируют под малыми углами ( $0.1-10^\circ$ ). Данные МУРР ( $I(s)$  против  $s$ , где  $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$ ,  $2\theta$  – угол рассеяния и  $\lambda = 1.24 \text{ \AA}$ ) от образцов мутантных форм SynFRP, SynOCP $\Delta^{2-20}$  и его комплекса с oxFRPcc были измерены при  $10^\circ\text{C}$  при помощи детектора Pilatus 2M на источнике излучения EMBL P12 beamline (PETRA III, DESY Гамбург, Германия). Образцы белков были приготовлены в буфере для гель-фильтрации, содержащем 3% v/v глицерин и 2 mM ДТТ вместо  $\beta$ -меркаптоэтанола (для FRP-L49E и SynOCP $\Delta^{2-20}$ ), или не содержащий восстановителей (для oxFRPcc and SynOCP $\Delta^{2-20}$ -oxFRPcc). Первичная обработка данных и статистический анализ были проведены при помощи SASFLOW пайплайна (Franke et al., 2012). ATSAS 2.8 (Franke et al., 2017) использовали для дальнейшего анализа данных и моделирования. PRIMUS (Konarev et al., 2003) был использован для проведения анализа Гинье.  $p(r)$  распределения были рассчитаны при помощи GNOM (Svergun, 1992). Структурная модель SynOCP $\Delta^{2-20}$  была получена с использованием известной структуры OCP мономера (PDB ID: 4XB5. Первые 13 N-концевых остатков от тага были моделированы при помощи CORAL (Svergun et al., 1995). Модель структуры комплекса SynOCP $\Delta^{2-20}$ -oxFRPcc (1:2) и их взаимное расположение изменяли при помощи CORAL так, чтобы минимизировать несоответствие между расчетным профилем рассеяния и экспериментальными данными. Димер FRPcc был зафиксирован, тогда как SynOCP $\Delta^{2-20}$  можно было

перемещать свободно без дополнительных ограничений. Итоговая модель с взаимным расположением белков согласовывалась с накопленными экспериментальными данными, электростатическим потенциалом поверхностей белков и анализом консервативности поверхности белков. Все структурные модели были визуализированы при помощи PyMOL.

#### **4.2. Кристаллизация GLOCPX**

Пробы концентрировали при помощи концентратора Amicon (10 кДа) до концентрации 15 мг/мл при 2500-3000 g. После концентрирования пробы центрифугировали при 20817 g в течение 15 мин. Супернатант, содержащий целевой белок передали на кристаллизационные скрининги: Crystal Screen (Hampton Research) и Index Screen (Hampton Research). Автор благодарит за помощь в проведении скрининга условий кристаллизации Ларису Варфоломееву.

#### **4.3. Сбор дифракционных данных, решение и уточнение кристаллической структуры**

Кристаллы ненадолго замачивали в 100% паратоновом масле (Hampton Research, США) непосредственно перед сбором дифракционных данных и замораживали в жидком азоте. Дифракционные данные были собраны при 100 K на установке ID30A-3 (ESRF, Франция). Индексация, интеграция и масштабирование были выполнены с помощью программы Dials (Winter et al., 2018). Решение структуры проводилось при помощи программы MOLREP (Vagin et al., 1997) с использованием начальной модели, полученной программой AlphaFold2 (Jumper et al., 2021). Уточнение модели проводили в программе REFMAC5 (Murshudov et al., 2011). Итоговую уточненную модель получали в COOT (Emsley et al., 2004) и депонировали в банк данных PDB (8A0H).

## 5. Биоинформатические методы

Для анализа разнообразия и поиска новых гомологов OCP и FRP мы применяли методы биоинформатики (BLAST, построение филогенетических деревьев методом Maximum Likelihood). Для построения филогенетического дерева OCP и FRP после нахождения гомологичных последовательностей мы отбирали только полноразмерные и невырожденные. Множественное выравнивание было получено при помощи T-COFFEE (Di Tommaso et al., 2011). Филогенетические деревья были построены при помощи MEGAX с использованием метода максимального правдоподобия (от англ. Maximum Likelihood method). Все позиции, включающие пропуски, были удалены из последующего анализа. Для получения первичных моделей белков для структурной биологии мы применяли методы вычислительной биологии (веб-сервер I-TASSER (Zhang, 2008) и нейросеть AlphaFold2 (Jumper et al., 2021)) при выборе параметров по умолчанию.

## Результаты исследования и их обсуждение

### 1. Исследование олигомерного состояния, структуры и функциональных свойств FRP гомологов

Исследования механизма функционирования белка FRP были и остаются крайне противоречивыми (Sutter et al., 2013; Lu et al., 2017; Sluchanko et al., 2017). Ключевые работы по данной проблеме были проведены лишь для пары белков OCP и FRP из *Synechocystis* sp. (SynOCP и SynFRP, соответственно), оставляя вопрос об универсальности механизма их взаимодействия среди разных клад цианобактерий неисследованным. Вопрос универсальности действия FRP встает особенно остро при рассмотрении разнообразия гомологов FRP (рис. 12 А), среди которых подавляющее большинство последовательностей обладают низкой долей идентичных аминокислотных остатков (мода распределения 50-55%, рис. 12Б). Для того, чтобы подтвердить или опровергнуть универсальность действия гомологов FRP мы построили филогенетическое дерево (рис. 12 А) и выбрали 2 репрезентативных представителей FRP из цианобактерий *Anabaena variabilis* (49.1% идентичности с SynFRP) и *Arthrospira maxima* (48.1% идентичности с SynFRP), в которых ранее уже был описан OCP.

Множественное выравнивание выбранных последовательностей и SynFRP выявило только 37.6% идентичных аминокислотных остатков (рис. 12 В).

После успешного клонирования и наработки белков мы получили электрофоретически гомогенные препараты FRP из *Synechocystis* sp., *Anabaena variabilis* и *Arthrospira maxima* (рис. 13 А, врезка), а также OCP из *Synechocystis* sp. (SynOCP) мы получили в особом штамме *E. coli*, продуцирующем каротиноид эхиненон (Maksimov et al., 2016).

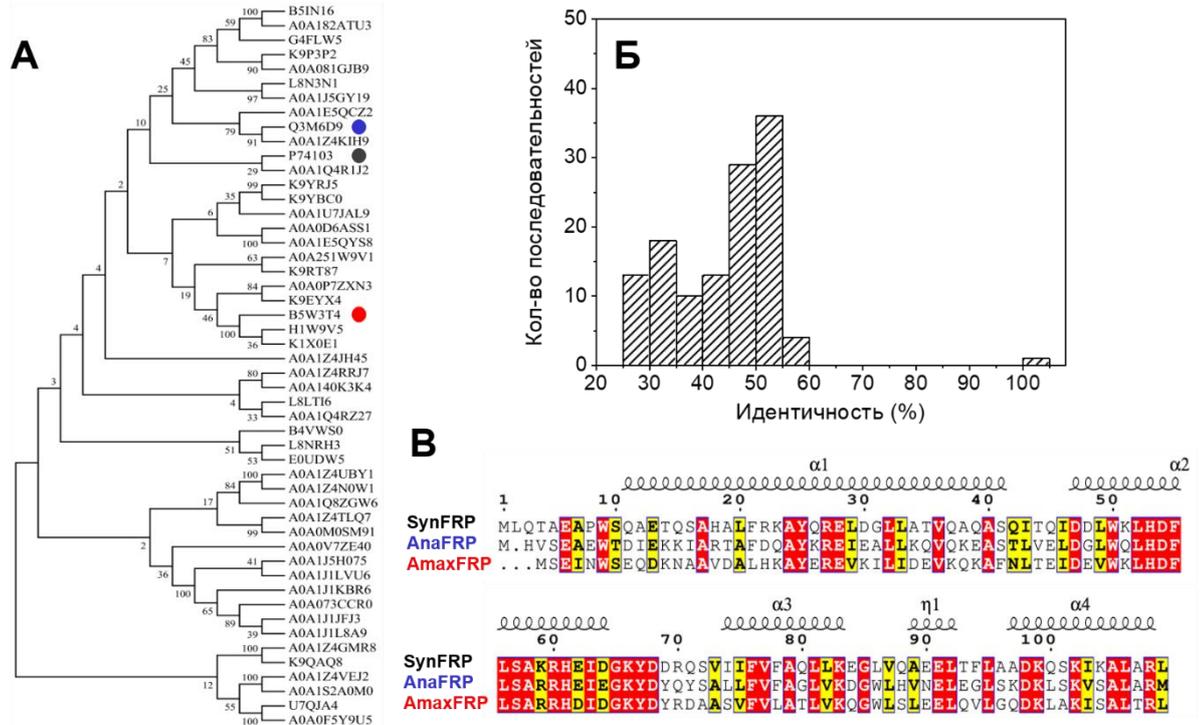


Рисунок 12. (А) Филогенетическое дерево 50 FRP-подобных последовательностей из цианобактерий. FRP гомологи из цианобактерий *Synechocystis* sp., *Anabaena variabilis* и *Arthrospira maxima* выделены черным, синим и красным цветом, соответственно. При построении дерева был использован метод максимального правдоподобия (Maximum likelihood). (Б) Распределение найденных последовательностей FRP гомологов при BLAST последовательности SynFRP против базы данных UniProtKB. (В) Множественное выравнивание гомологов FRP из *Synechocystis* (SynFRP), *Anabaena* и *Arthrospira*, охарактеризованных в дальнейшей работе, каждая позиция окрашена по цветовой схеме, указывающей общность физико-химических свойств аминокислотных остатков. Над выравниванием представлено соответствие элементам вторичной структуры SynFRP (PDB ID: 4JDX).

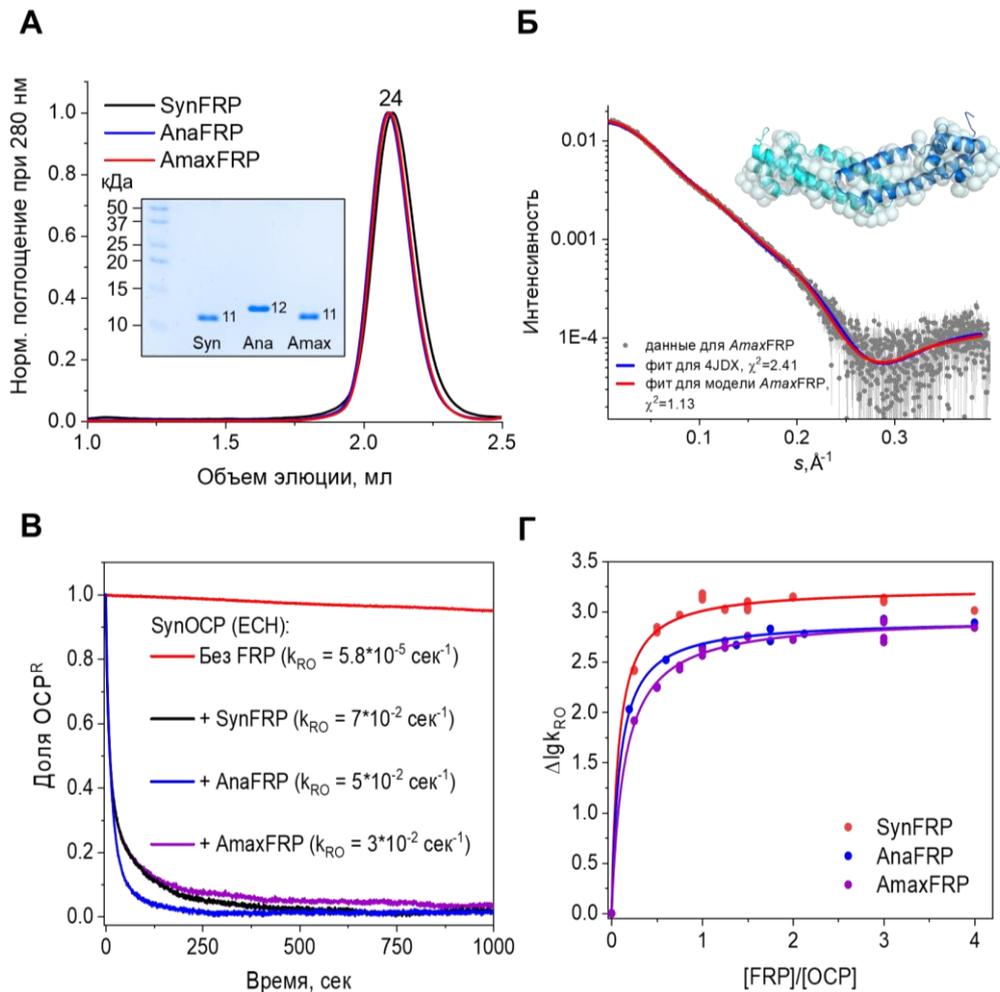


Рисунок 13. Характеристика гомологов белка FRP. (А) Определение олигомерного состояния гомологов FRP из цианобактерий *Synechocystis*, *Anabaena* и *Arthrospira* методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 Increase (5/150) при скорости элюции 0.45 мл/мин. Массы указаны в кДа. (Б) Фитирование кривой SAXS для AmaxFRP при концентрации белка 460 мкМ моделью, полученной с помощью I-TASSER (Zhang, 2008), и моделью структуры димера FRP из *Synechocystis* (PDB ID: 4JDX), на врезке изображено наложение модели димера AmaxFRP (субъединицы окрашены синим и бирюзовым), полученной с помощью I-TASSER, на лучшую *ab initio* шариковую модель (полупрозрачные голубые сферы), полученную с помощью GASBOR (Svergun et al., 2001). (В) Активность гомологов FRP по ускорению R-O конверсии белка SynOCP (ECH) при +5°C и молярном соотношении FRP/OCP, равном 4. (Г) График зависимости десятичного логарифма скорости R-O конверсии от молярного соотношения FRP/OCP.

Олигомерное состояние белка FRP в растворе и роль его олигомеров является предметом дискуссий. Тем не менее, можно с уверенностью сказать, что FRP из *Synechocystis* sp. (SynFRP) представлен преимущественно в димерной форме в широком диапазоне концентраций (Sluchanko et al., 2017). Для определения олигомерного состояния белков мы проводили аналитическую гель-фильтрацию и сравнивали олигомерное состояние уже описанного FRP из *Synechocystis* sp. (SynFRP) с олигомерным состоянием FRP из *Anabaena variabilis* (AnaFRP) и *Arthrospira maxima* (AmaxFRP). По данным гель-фильтрации (рис. 13 А), все вышеупомянутые белки представлены преимущественно в димерной форме согласно сравнению кажущейся массы (~24 кДа) и массы полипептидной цепи соответствующих белков (~11-12 кДа). Таким образом, несмотря на существенные различия в последовательностях белков гомологов FRP по сравнению с SynFRP (рис. 12 В), они сохраняют свое димерное состояние. Поскольку олигомерное состояние AnaFRP и AmaxFRP было одинаковым, только AmaxFRP был выбран для дальнейших структурных исследований. Мы воспользовались методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР) для получения его структуры в растворе (рис. 13 Б). Экспериментально определенная методом МУРР масса составила 24 кДа, независимо подтверждая димерное состояние белка. Для фитирования кривой рассеяния рентгеновского излучения раствором белка AmaxFRP (рис. 13 Б, врезка) мы использовали модель AmaxFRP, построенную помощью I-TASSER и модели структуры FRP из *Synechocystis* (PDB ID: 4JDX). Модель, построенная с помощью I-TASSER, была наилучшей (рис. 13 Б). Стоит отметить высокое сходство построенной модели AmaxFRP с ранее описанным SynFRP. Впоследствии нашими коллегами была описана структура FRP из цианобактерии *Tolypothrix* sp. - TolyFRP (идентичность 51 % по сравнению с SynFRP) (Bao et al., 2017). Было показано что этот гомолог также представляет собой димерный альфа-спиральный белок с RMSD наложения структур димеров SynFRP (PDB ID: 4JDX) и TolyFRP (PDB ID: 5TZ0), равным 1.72 Å (Bao et al., 2017).

Таким образом, несмотря на существенные отличия в последовательностях белков (только 48.1% идентичности с SynFRP для AmaxFRP и AnaFRP), структура и организация протомеров белка FRP сохраняется. Далее мы перешли к функциональной характеристике полученных гомологов.

Ранее было показано, что функциональная активность белка SynFRP заключается в ускорении перехода белка OCP из его красной (фотоактивированной) формы в оранжевую (базовую форму). Такой переход, называемый также R-O конверсия, существенно ускоряется, что также приводит к снижению амплитуды фотоконверсии. Для проверки гипотезы об универсальности механизма действия белка FRP мы решили проверить действие гомологов FRP на фотоцикл белка SynOCP. При низкой температуре (5°C) полная R-O конверсия SynOCP занимала около 12 ч, тогда как при добавлении SynFRP, AnaFRP или AmaxFRP существенно ускорялась (рис. 13 В). Мы оценили параметры скорости процесса R-O конверсии, описывая его экспоненциальным уравнением и построили зависимость десятичного логарифма скорости R-O конверсии от молярного соотношения белков FRP/OCP (рис. 13 Г). В результате нами было показано, что AnaFRP и AmaxFRP сохраняют свою функциональную активность и ускоряют R-O конверсию неродственного SynOCP, хотя максимальной скоростью R-O конверсии закономерно обладает пара белков SynOCP/SynFRP.

Это означает, что как структура, так и способность ускорять R-O конверсию сохраняется у гомологов FRP. Данные результаты являются фундаментальным основанием для сравнительного анализа последовательностей FRP гомологов и последующего выявления функционально значимых аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии белков OCP и FRP. Однако оставался вопрос, как именно взаимодействует белок FRP с OCP, и как это взаимодействие ускоряет R-O конверсию. Для SynFRP ранее было показано взаимодействие только с изолированным С-концевым, но не с N-концевым доменом OCP (Moldenhauer et al., 2017), что свидетельствовало в пользу того, что основной сайт взаимодействия OCP-FRP расположен на С-концевом домене OCP. Мы решили проверить

сохраняется ли данная закономерность для гомологов FRP. Согласно полученным профилям гель-фильтрации (рис. 14), ни AnaFRP, ни AmaxFRP не образует комплексов с N-доменом OCP (RCP), так как профили смеси белков не отличались от суммы профилей их компонентов (рис. 14 А-В). При анализе взаимодействия с изолированным С-концевым доменом (COCP) AnaFRP, как и SynFRP, образовывал комплексы COCP-FRP с большей кажущейся массой (рис. 14 Г, Д). В случае AmaxFRP, однако, мы не детектировали образование комплексов COCP-FRP (рис. 14 Е). Поскольку AmaxFRP сохраняет функциональную активность на полноразмерном OCP (рис. 13 В, Г), то с необходимостью гомолог сохраняет и способность взаимодействовать с полноразмерным двухдоменным белком OCP.

Все это могло свидетельствовать о том, что сайт взаимодействия OCP-FRP не может быть представлен просто как некая часть COCP, присутствует и сайт взаимодействия вне его, например, на RCP или в зоне контакта доменов OCP. Дальнейшая локализация сайта взаимодействия OCP-FRP требовала более изящных подходов.

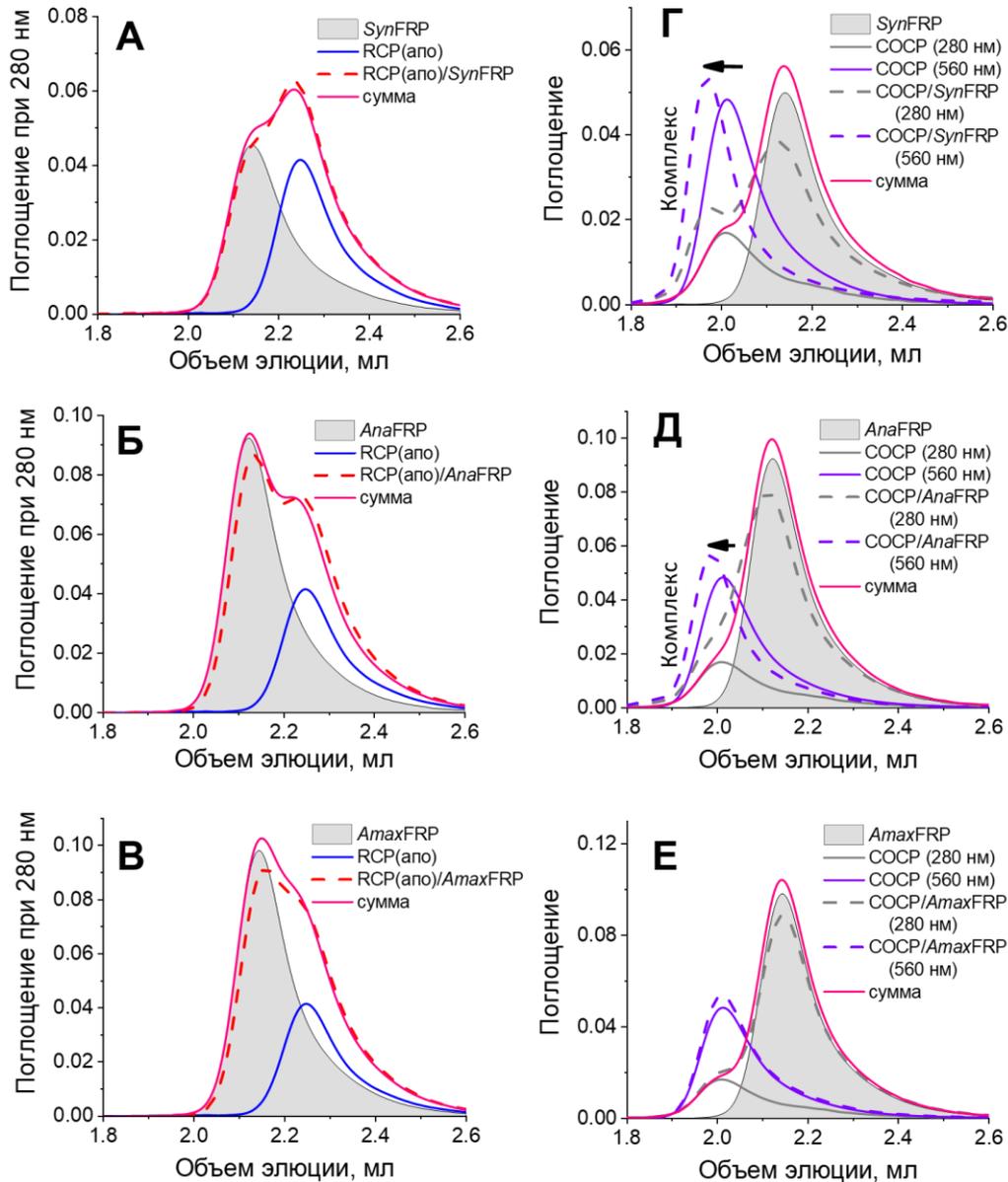


Рисунок 14. Взаимодействие SynFRP (А, Г), AnaFRP (Б, Д) или AmaxFRP (В, Е) с доменами ОСР – RCP (аро) (А–В) или СОСР (Г–Е), исследованное методом гель-фильтрации. Образцы, содержащие N- или С-концевые домены ОСР (10 мкМ), гомологи FRP (20 мкМ; полупрозрачные серые пики) или смеси доменов ОСР (10 мкМ) с гомологами FRP (20 мкМ) (пунктирные линии) наносили на колонку для гель-фильтрации. Алгебраические суммы отдельных профилей элюции при длине волны 280 нм также представлены на каждой панели для удобства сравнения.

## 2. Роль N-концевого сегмента OCP в регуляции взаимодействия с белком FRP

Исследования фотоцикла OCP указывали на то, что N-концевой сегмент (NTE) белка OCP (рис. 6) открепляется от C-домена OCP при фотоактивации и переходе в «красную» форму (Gupta et al., 2015). Ранее в нашей лаборатории было показано, что «оранжевая» форма OCP обладает меньшим сродством к FRP, чем «красная» (Sluchanko et al., 2017). Кроме того, было показано, что SynFRP взаимодействует с изолированным C-доменом белка OCP (Moldenhauer et al., 2017). Объединив эти факты, мы предположили, что при диссоциации NTE от C-концевого домена экспонируется участок взаимодействия OCP и FRP, а при завершении фотоцикла и переходе в «оранжевую» форму NTE конкурирует с FRP за связывание на C-домене и вытесняет FRP. Это означало бы, что NTE закрывает основной участок взаимодействия FRP на C-домене OCP. Для проверки этой гипотезы мы получили OCP с двумя аминокислотными заменами на цистеины, позволяющий получать дисульфидный мостик между NTE и C-доменом при их окислении (oxSynOCP<sup>cc</sup>) (рис. 15 А,Б).

SynOCP<sup>cc</sup> мы получили аналогично SynOCP дикого типа. В условиях без восстановителей белок самопроизвольно образовывал дисульфидный мостик, но препарат требовал очистки от небольшой доли молекул без сшивки. Для разделения окисленной и восстановленной фракций белка нами была проведена ионообменная хроматография при постоянном облучении синим светом. В результате мы получили электрофоретически гомогенный препарат холоформы с внутримолекулярным дисульфидным мостиком (рис. 15 Б, врезка), сохраняющей свое мономерное состояние.

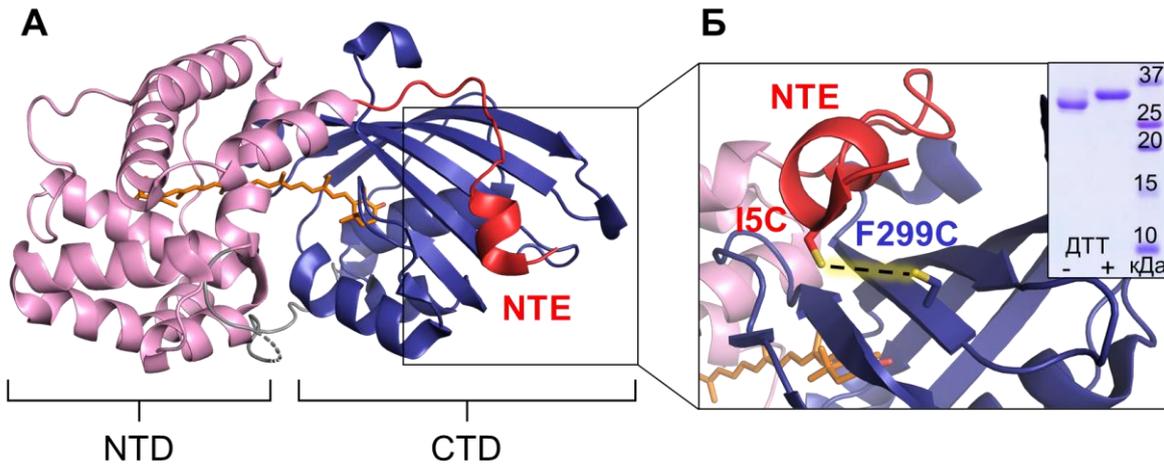


Рисунок 15. Дизайн варианта ОСР с иммобилизованным дисульфидным мостиком N-концевым сегментом (NTE). (А) Структура белка ОСР (PDB ID: 3MG1). N-концевой и С-концевой домены окрашены розовым и синим, соответственно. N-концевой сегмент (NTE) выделен красным. (Б) Область SynОСР с заменами I5С и F299С, при окислении которых образуется дисульфидный мостик, иммобилизующий NTE на С-доме. Пунктиром показано расстояние между атомами серы введенных цистеинов, равное 5.5 Å. На врезке изображена электрофореграмма конечного препарата oxSynОСР<sup>сс</sup>, окисление белка приводит к изменению электрофоретической подвижности, что позволяет оценить полноту внутримолекулярной сшивки дисульфидным мостиком.

Далее мы перешли к исследованию взаимодействия с FRP методом гель-фильтрации (рис. 16). При добавлении SynFRP к SynОСР<sup>WT</sup> мы обнаружили слабый сдвиг пика ОСР (кажущаяся масса 35 кДа) вследствие транзientного взаимодействия с SynFRP (рис. 16 А), в то время как в случае oxSynОСР<sup>сс</sup> взаимодействие полностью пропадало (рис. 16 Б). В то же время, восстановленная форма redSynОСР<sup>сс</sup>, в которой NTE не был иммобилизован на С-доме ОСР, демонстрировала образование стабильного комплекса с FRP (рис. 16 В). По-видимому, введение цистеинов в данные положения в белке SynОСР ослабляют контакт NTE с С-доменом ОСР и позволяет белку SynFRP вытеснить NTE даже в отсутствии фотоактивации. Для прямой проверки роли NTE мы решили полностью

удалить данный сегмент (первые 20 аминокислотных остатков). Получив вариант SynOCP $\Delta^{2-20}$  в холоформе, мы проверили его взаимодействие с SynFRP. Согласно полученным профилям, гель-фильтрации, при добавлении избытка SynFRP происходит образование комплекса SynOCP $\Delta^{2-20}$ /SynFRP с кажущейся массой комплекса 47 кДа (рис. 16 Г), что согласно молекулярной массе белков соответствует стехиометрии комплекса OCP/FRP 1:1.

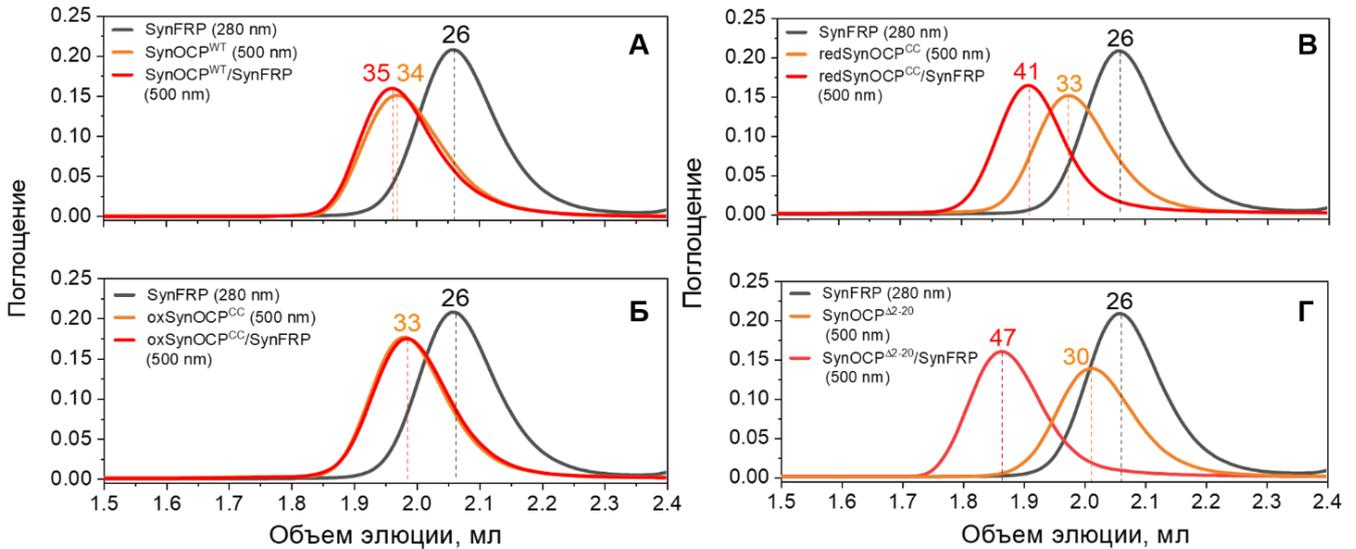


Рисунок 16. Взаимодействие белка SynFRP с “оранжевыми” формами SynOCP<sup>WT</sup> (А), oxSynOCP<sup>CC</sup> (Б), redSynOCP<sup>CC</sup> (В) и SynOCP $\Delta^{2-20}$  (Г) исследованные методом аналитической гель-фильтрации. Образцы, содержащие индивидуальные белки SynFRP (200  $\mu$ M), SynOCP<sup>WT</sup>, oxSynOCP<sup>CC</sup>, redSynOCP<sup>CC</sup> и SynOCP $\Delta^{2-20}$  (20  $\mu$ M каждый) или смеси соответствующих OCP вариантов с SynFRP наносили на колонку для гель-фильтрации.

Но, прежде чем оценивать константу диссоциации комплекса, мы решили подтвердить кажущуюся стехиометрию 1:1 комплекса OCP/FRP независимым методом, таким как химическая сшивка глутаровым альдегидом. Действительно, как в паре SynOCP $\Delta^{2-20}$ /SynFRP, так и SynOCP<sup>WT</sup>/SynFRP мы детектировали образование комплекса с массой 42 (13 + 30 кДа) и 49 кДа (13+36 кДа) соответственно (рис. 17). Так нам удалось независимо подтвердить стехиометрию 1:1 для комплекса OCP/FRP.

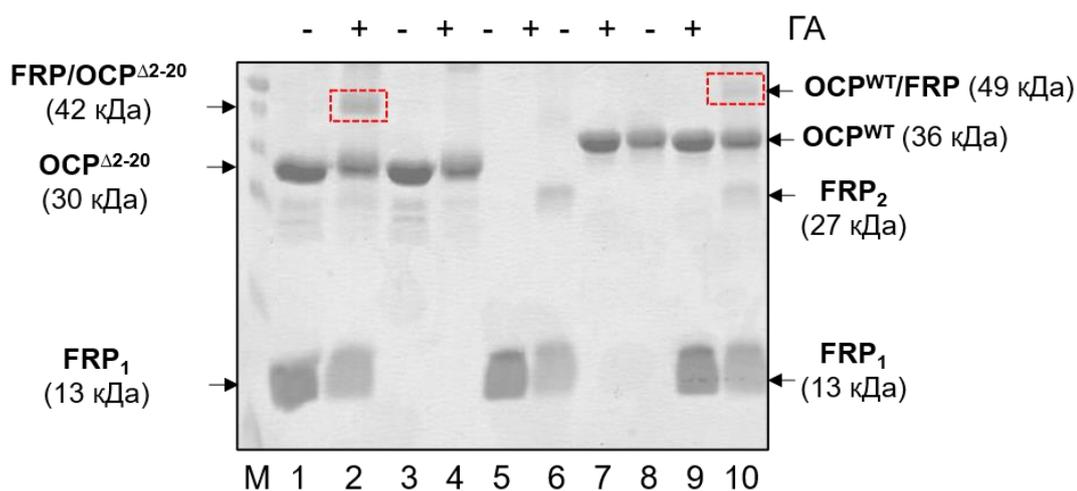


Рисунок 17. Определение стехиометрии комплекса OCP/FRP методом химического сшивания глутаровым альдегидом. На дорожки геля нанесены SynOCP $\Delta^{2-20}$ /FRP смесь (дорожки 1, 2), SynOCP $\Delta^{2-20}$  (дорожки 3, 4), SynFRP (дорожки 5, 6), SynOCP<sup>WT</sup> (дорожки 7, 8) и его смесь с SynFRP (дорожки 9, 10) до (-) и после (+) обработки 0.01% глутаровым альдегидом. Красным пунктиром выделены комплексы OCP-FRP, образующиеся в результате сшивания глутаровым альдегидом.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что основной сайт взаимодействия с FRP расположен на C-домене и действительно экранируется NTE, и именно это обеспечивает слабое взаимодействие белка FRP с OCP в его «оранжевой» форме. Кроме того, при удалении NTE у SynOCP нами была получена удобная система для проверки взаимодействия гомологов и мутантных вариантов белка FRP, что также позволило оценить кажущуюся константу диссоциации этого комплекса.

Для оценки константы диссоциации комплекса OCP/FRP мы воспользовались методом гель-фильтрации. Титрование SynOCP<sup>Δ2-20</sup> возрастающим количеством SynFRP приводило к постепенному истощению пика исходного каротиноидного белка и появлению пика комплекса OCP-FRP (рис. 18 А), что позволило построить график зависимости доли комплекса OCP/FRP от концентрации SynFRP при нанесении (рис. 18 Б). При описании данной зависимости моделью взаимодействия 1:1 кажущаяся константа диссоциации составила 0.65 мкМ.

Обнаруженный нами сайт взаимодействия OCP и FRP на С-концевом домене и выявленная роль NTE показывали принцип распознавания OCP<sup>R</sup> белком FRP, но не объясняли, как именно FRP ускоряет R-O конверсию, что требовало структурных исследований комплекса OCP/FRP. Согласно одной из гипотез, связывание FRP способствует сведению доменов OCP, уменьшая число попыток перехода из «красной» в «оранжевую» форму (Sluchanko et al., 2017). FRP, таким образом, должен иметь сайт взаимодействия на С-концевом домене и второй сайт взаимодействия на междоменном линкере или на N-концевом домене.

Кроме того, полученные нами данные гель-фильтрации и химического сшивания указывали на мономеризацию FRP в ходе его взаимодействия с OCP. Обнаруженная мономеризация могла играть существенную роль в процессе функционирования FRP, что требовало проверки. Ответить на этот вопрос

необходимо было получить недиссоциирующий димерный и стабильный мономерный варианты белка FRP.

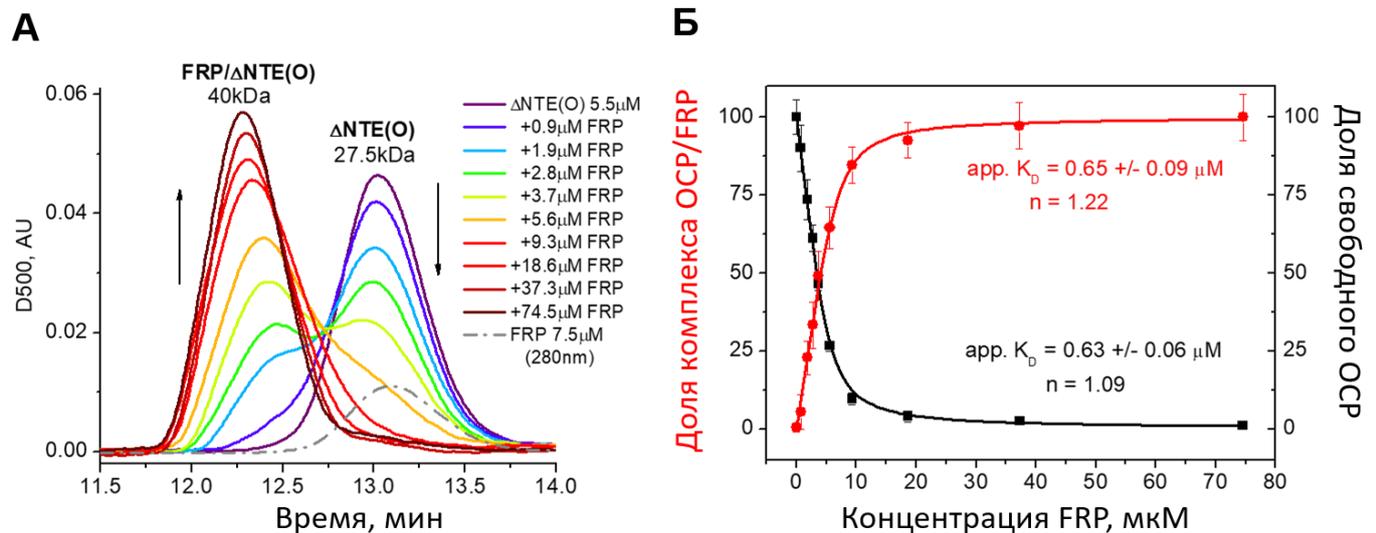


Рисунок 18. Определение кажущейся константы диссоциации комплекса OCP-FRP.

(А) Профили гель-фильтрации SynOCP $\Delta^{2-20}$ , SynFRP или их смесей при титровании белком FRP (в диапазоне концентраций 0–74,5 мкМ). Указаны положения SynOCP $\Delta^{2-20}$ , его комплекса с SynFRP и их кажущиеся молекулярные массы. (Б) Кривые титрования, отражающие изменения амплитуд либо исчезающего пика свободного SynOCP $\Delta^{2-20}$  (черный), либо появляющегося пика комплекса (красный). Для определения константы диссоциации комплекса использовали квадратическое уравнение связывания (Sluchanko et al., 2017). Стоит отметить, что для аналога фотоактивированной формы SynOCP константа диссоциации, определенная тем же методом, была равна 2-3 мкМ (Sluchanko et al., 2017), что закономерно, так как в нем присутствует NTE, конкурирующий за тот же сайт связывания на С-домене.

### 3. Возможная роль мономеризации FRP и модель структуры комплекса ОСП/FRP

Для стабилизации мономерной и димерной форм белка SynFRP мы применили две различные стратегии. Для получения стабильной мономерной формы FRP мы ввели в зону гидрофобного междоменного контакта замену L49E, так чтобы отрицательный заряд карбоксильной группы вызывал диссоциацию SynFRP димеров. Для получения стабильной димерной формы мы решили применить подход дисульфидной ловушки и ввели цистеины в позициях L33 и I43, расположенных на расстоянии  $\sim 6.5 \text{ \AA}$  в составе димера FRP (рис. 19).

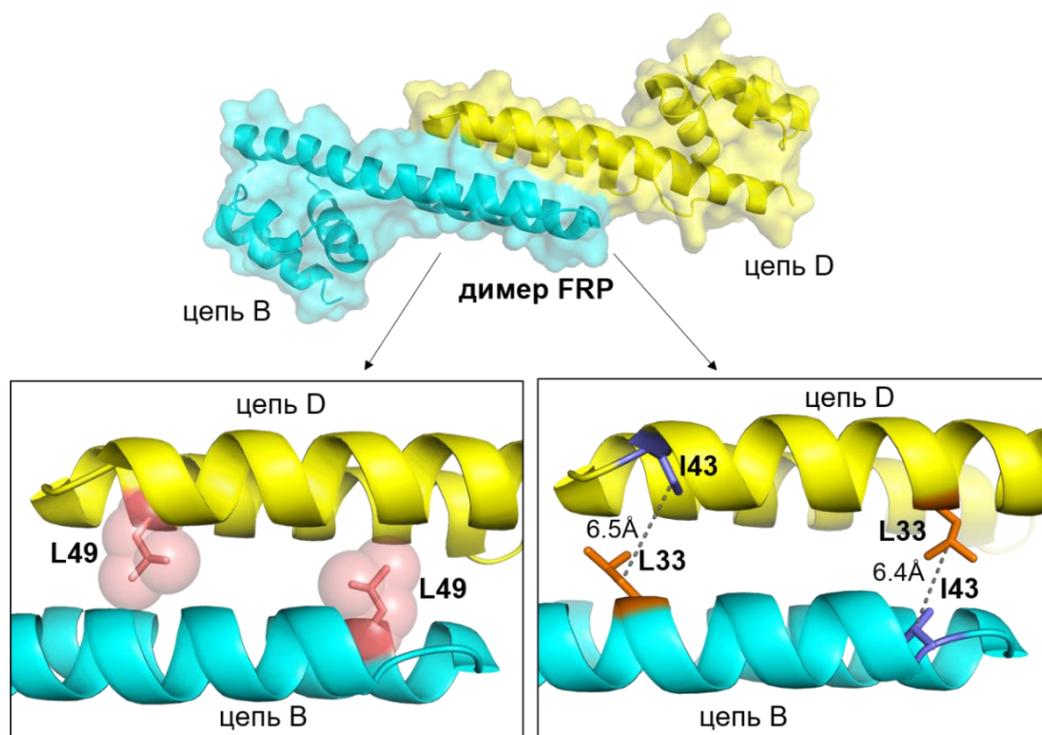


Рисунок 19. Дизайн димерного и мономерного FRP. Замена L49E приведет к введению двух заряженных групп участков димеризации FRP, а цистеины в позициях L33 и I43 при образовании дисульфидного мостика должны зафиксировать протомеры FRP вдоль всей длины области контакта.

При окислении цистеинов происходило бы образование двух дисульфидных мостиков между остатками С33 и С43 двух субъединиц FRP (oxFRPcc). Мы получили данные FRP варианты в высокоочищенном состоянии и подобрали условия для полного окисления L33C/I43C варианта (oxFRPcc) (рис. 20 А-В). Сшивка димеров FRPcc была подтверждена методом SDS-электрофореза после кипячения образцов с 20 мМ βМЕ. Важно отметить, что ZnSO<sub>4</sub> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывали видимую агрегацию образцов, тогда как H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> также влиял на электрофоретическую подвижность FRP, что указывает на нежелательную химическую модификацию белка (рис. 20 Б).

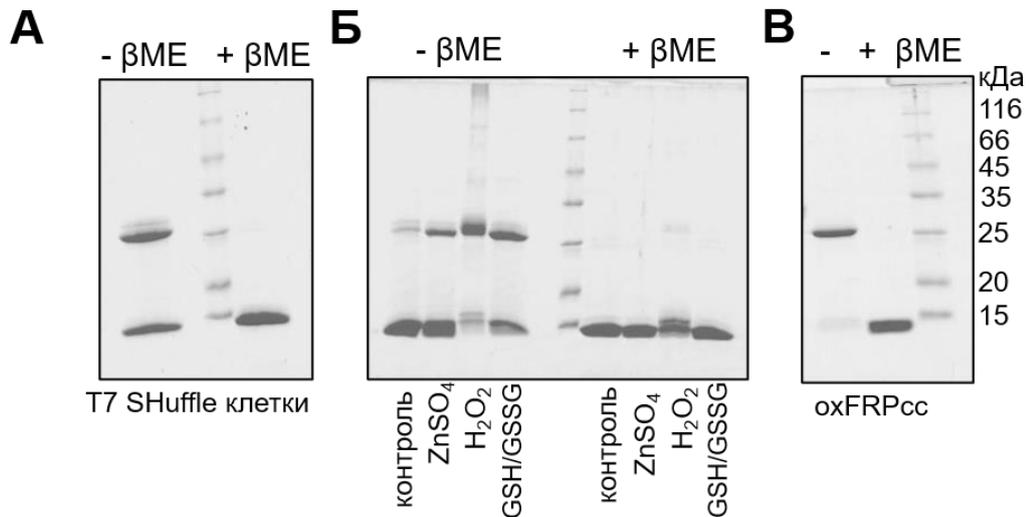


Рисунок 20. Образование FRPcc с дисульфидным мостиком путем окисления в различных условиях. (А) Нарработка белка FRPcc в клетках *E.coli* T7 SHuffle и очистка белка в отсутствие восстановителей приводило к неполной сшивке. Образующиеся ковалентно сшитые димеры FRP могут быть разрушены восстановлением в 20 мМ βМЕ при кипячении образца перед SDS-электрофорезом. (Б) ZnSO<sub>4</sub>, перекись водорода или GSH/GSSG использовались для оптимизации окисления FRPcc. Контроль соответствует необработанному образцу. (В) Сшивание мутанта FRPcc в оптимальных условиях привело к сшиванию >95% белка. Кипячение в буфере для образцов с 20 мМ βМЕ и SDS полностью разрушало ковалентный димер. Маркеры Mw (кДа) показаны справа от (В).

Далее препараты FRP вариантов мы охарактеризовали методами гель-фильтрации (рис. 21 А), нативного электрофореза (рис. 21 Б) и кругового дихроизма (рис. 21 В).

Согласно графику зависимости каж. массы от концентрации FRP при нанесении на колонку (рис. 21 А) в результате замены L49E произошла почти полная диссоциация SynFRP на мономеры с каж. массой 15.6 кДа. SynFRP с заменами L33C/I43C в восстановленной форме (redFRPcc) был представлен преимущественно димерами (каж. масса 29 кДа), хотя и показывал склонность к диссоциации при разведении. oxFRPcc сохранял свое димерное состояние в широком диапазоне концентраций. При нативном электрофорезе (рис. 21 Б) FRPcc почти не отличался по электрофоретической подвижности от белка дикого типа (FRPwt), тогда как подвижность FRP-L49E была существенно выше, подтверждая вывод о том, что введение отрицательных зарядов в участок димеризации приводит к полной диссоциации FRP на мономеры. При анализе спектров кругового дихроизма (рис. 21 В) мы выявили, что L49E замена приводила к снижению доли альфа-спиралей (от 60 до 40% альфа-спиралей), чего не происходило в FRPcc. По-видимому, при диссоциации мономеры SynFRP претерпевают частичное разворачивание, связанное с расплетением альфа-спиралей в области контакта протомеров SynFRP.

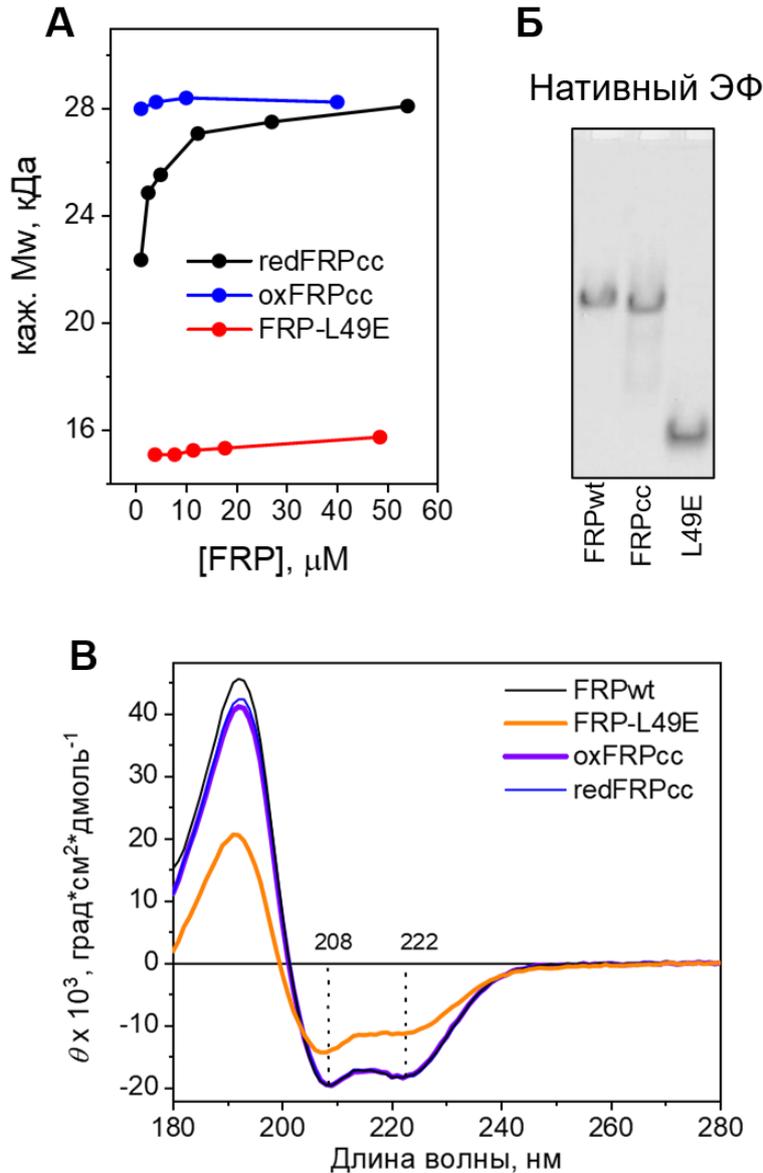


Рисунок 21. Олигомерное состояние белков redFRPcc, oxFRPcc и FRP-L49E, исследованное методом гель-фильтрации (А) в концентрационной серии и методом нативного электрофореза (Б). (В) КД-спектры FRPwt, FRP-L49E, oxFRPcc и redFRPcc (36 мкМ каждый). Положения пиков отмечены в нм.

После физико-химической характеристики вариантов FRP мы перешли к оценке их активности по ускорению R-O конверсии SynOCP.

Сравнение активности FRP вариантов было необходимо для выявления роли мономеризации в процессе действия FRP на фотоцикл OCP. Мы выявили ~10-

кратное снижение максимальной активности FRP в случае oxFRP<sub>ss</sub> и ~100-кратное снижение максимальной активности для FRP-L49E по сравнению с белком дикого типа (рис. 22 А). Полученные результаты свидетельствовали о том, что мономеризация не является необходимым звеном в процессе действия FRP, однако существенно увеличивает его эффективность. Действие FRP-L49E, по-видимому, скомпрометировано частичным разворачиванием белка, тем не менее активность сохранялась, что может быть объяснено сворачиванием FRP при связывании с OCP. По-видимому, FRP образует начальный комплекс 1:2, а затем может происходить его мономеризация с образованием комплекса 1:1. Мы решили охарактеризовать предполагаемый начальный комплекс OCP-FRP 1:2 методами структурной биологии.

Для получения структуры такого комплекса нам было необходимо избавиться от возможной гетерогенности комплексов 1:1 и 2:1. Полученный окисленный L33C/I43C вариант сохранял способность взаимодействовать с SynOCP<sup>Δ2-20</sup>, что позволило нам исследовать комплекс OCP/FRP методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и впервые получить модель его структуры (рис. 22 Б,В). В модели, наилучшим образом описывающей данные, субдомен головы одного из протомеров направлен к поверхности С-домена,

образуя мост к N-домену OCP, с поверхностью которого протомер также образует контакт, но уже в области субдомена стержня.

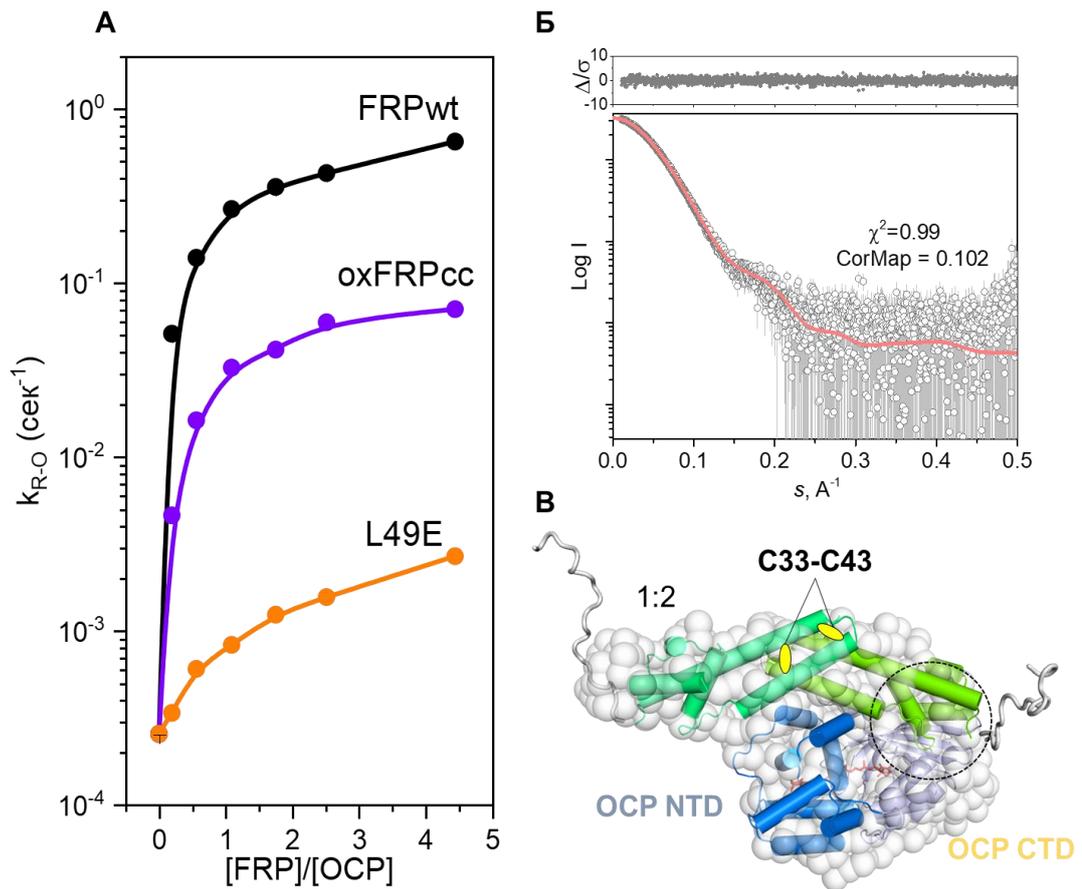


Рисунок 22 (А) Сравнение активности FRPwt, oxFRPcc и FRP-L49E. (Б) Фитирование кривой МУРР моделью комплекса OCP-FRP в стехиометрии 1:2, полученной в CORAL. (В) Структура комплекса OCP-FRP 1:2 в соответствии с данными, полученными методом МУРР. Во всех образцах отсутствовали восстановители, а степень сшивки oxFRPcc подтверждена электрофорезом по Лэммли.

Данный сценарий был поддержан анализом распределения электростатических поверхностных потенциалов и консервативности аминокислотных остатков в области контакта белков (рис. 23 А,Б), анализа известных аминокислотных замен в FRP и OCP, снижающие активность FRP (рис. 9 Б). Важно отметить, что в предложенной модели комплекса OCP-FRP зона

контакта FRP отличается высокой консервативностью на вогнутой стороне и что связывание первого головного домена FRP происходит на OCP-CTD вместо NTE (показан желтым).

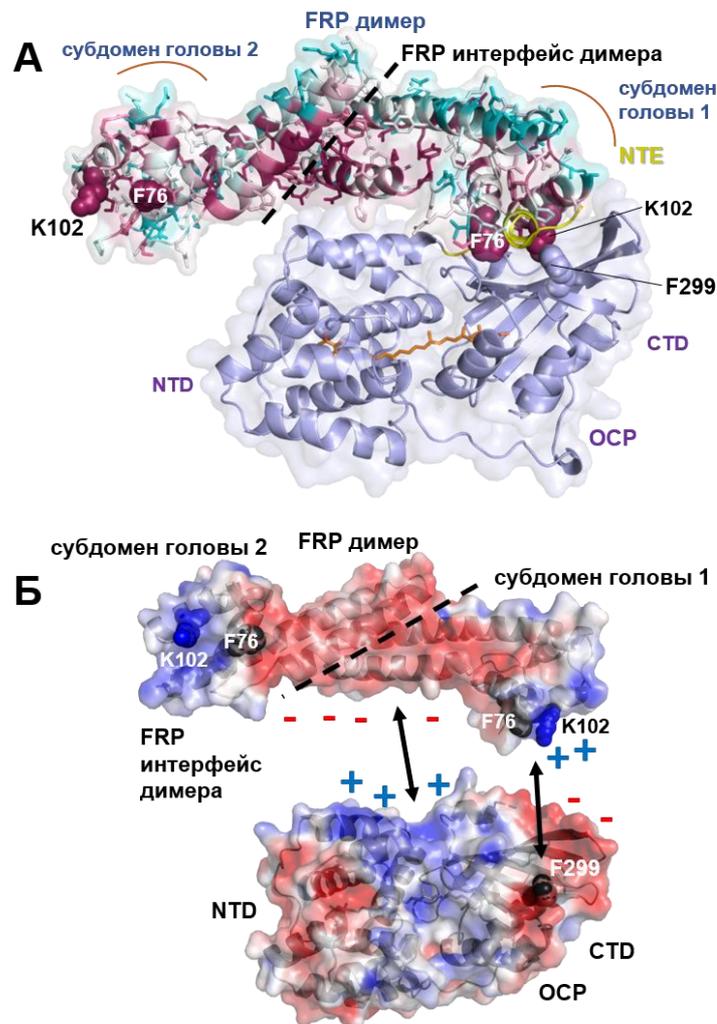


Рисунок 23. Проверка предложенной топологии комплексов OCP-FRP.

(А) Структурная модель комплекса 1:2 SynOCP $\Delta^{2-20}$ -FRP, полученная с помощью МУРР. Аминокислотные остатки FRP окрашены градиентом от консервативного (фиолетовый) до варибельного (голубой) с использованием Consurf (Ashkenazy et al., 2016). OCP показан светло-фиолетовым цветом, а каротиноид - оранжевым.

(Б) Распределение зон с положительным (синий) и отрицательным (красный) электростатическим потенциалом на поверхности FRP и OCP.

Предполагаемая область контакта белков также включает F299 OCP и K102 и F76 FRP, замены которых приводят к снижению активности FRP (рис. 24 А), что также было показано Лу и соавторами при характеристике вариантов FRP K102D и F76D (Lu et al., 2017).

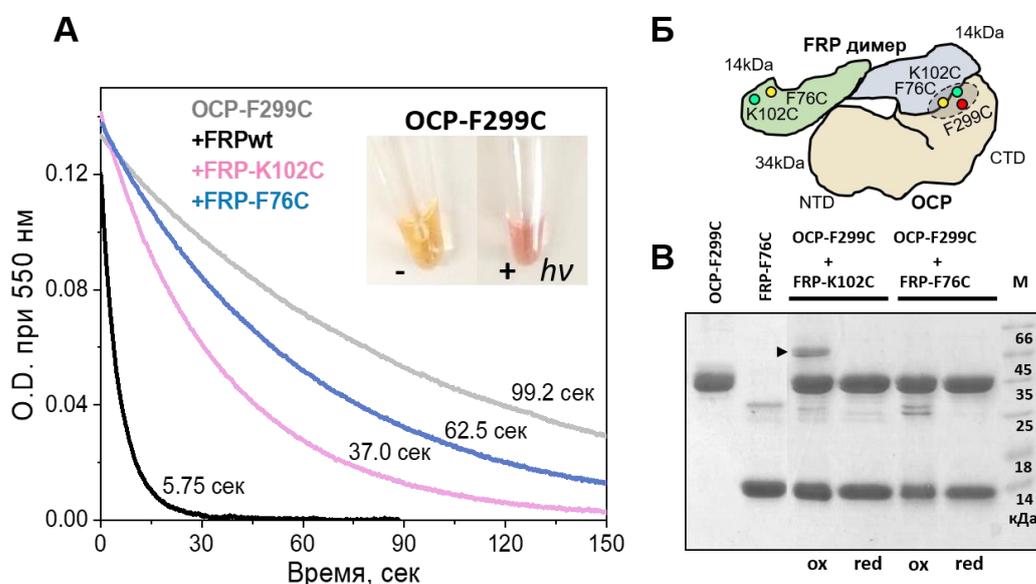


Рисунок 24. (А) Функциональное взаимодействие цистеиновых мутантов OCP и FRP, оцененное по способности вариантов FRP ускорять R–O-конверсию фотоактивированного OCP–F299C при 25 °C. Врезка показывает цвет образца OCP–F299C в темноте и под действием синего света.

(Б) Схематическое изображение комплекса 1:2 с позициями, выбранными для цистеинового мутагенеза и метода дисульфидной ловушки. Круг указывает на экспериментально выявленный интерфейс OCP–FRP. (В) Способность цистеиновых мутантов OCP образовывать сшитые дисульфидные гетерокомплексы с FRP при мягком окислении глутатионовой парой (GSH/GSSG). Для эксперимента использовали OCP-F299C в смеси с мутантами FRP-K102C или FRP-F76C. Маркеры Mw (M) указаны в кДа. Ox и Red обозначают отсутствие или присутствие  $\beta$ ME в буфере образцов. Стрелкой отмечена полоса 46 кДа, соответствующая комплексу OCP-FRP с дисульфидным мостиком, исчезающая при восстановлении.

Для дополнительной проверки нашей модели мы прибегли к методу дисульфидной ловушки (рис. 24 В), и нам удалось независимо подтвердить топологию комплекса OCP-FRP (рис. 23 А). Также свидетельством в пользу нашей модели стало использование нейросети AlphaFold2 для предсказания структуры комплекса OCP-FRP (рис. 25). Без указания каких-либо дополнительных ограничений нейросеть располагает головной субдомен FRP на поверхности С-домена OCP вместо NTE. Аминокислотные остатки K102 и F299 непосредственно контактируют друг с другом в согласии с предложенной нами моделью и методом дисульфидной ловушки (рис. 24 Б,В).

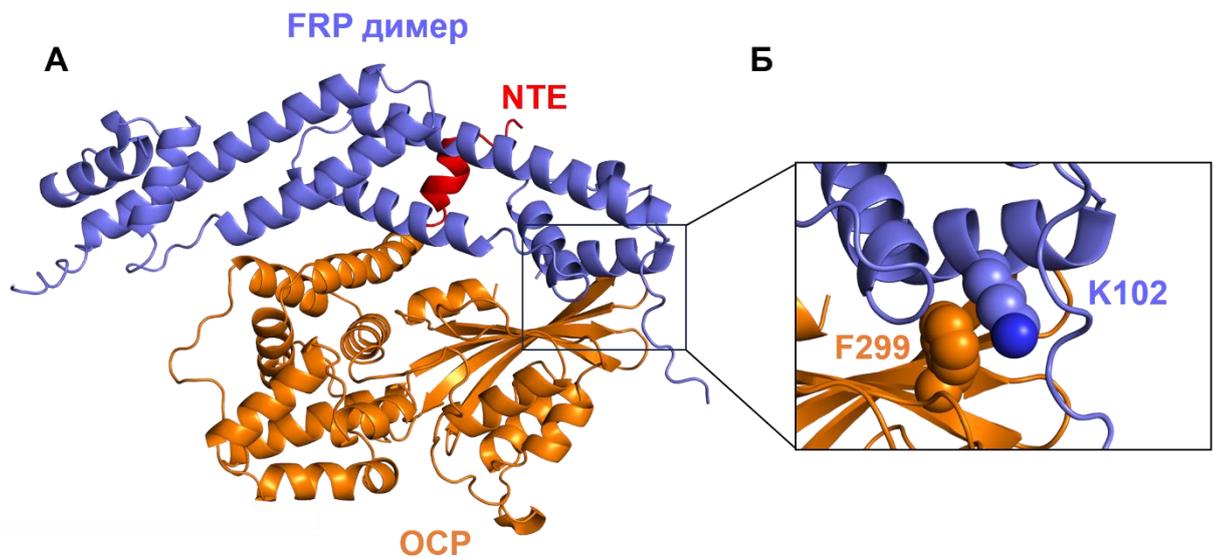


Рис. 25. (А) Структура комплекса OCP-FRP, предсказанная с помощью нейросети AlphaFold2 (Jumper et al., 2021). OCP показан оранжевым, NTE – красным, а FRP – синим цветом. (Б) Контакт аминокислотных остатков K102 и F299, использованных для характеристики комплекса OCP-FRP методом дисульфидной ловушки.

Несмотря на простоту и предсказательную силу, данная модель обладает низким пространственным разрешением и не позволяет подтвердить или опровергнуть модель частичного разворачивания субдомена головы FRP при его функционировании, высказанную проф. Бланкеншипом и соавторами (Lu et al., 2017). Для проверки этой гипотезы мы вновь решили воспользоваться методом

дисульфидной «ловушки» для стабилизации головного субдомена FRP с помощью внутримолекулярного дисульфидного мостика (рис. 26 А). Степень сшивки препарата FRP определяли методом электрофореза по Лэммли. Из-за внутреннего дисульфидного мостика происходит увеличение электрофоретической подвижности FRP (рис. 26 Б). Окисление введенных цистеинов было полным (более 95%), мы не обнаружили вторую полосу белка в отсутствие восстановителей. Дисульфидный мостик разрушается при обработке белка бета-меркаптоэтанолом в денатурирующих условиях (рис. 26 Б).

Введение дисульфидного мостика не привело к значимому снижению активности FRP (рис. 26 В), что позволяет сделать вывод о том, что для функционирования FRP субдомен «головы» и  $\alpha 1$ -спираль не должны претерпевать существенные конформационные изменения, как это было предложено Lu и соавторами (Lu et al., 2017).

В результате наших исследований нам удалось построить общую модель функционирования FRP по ускорению R-O конверсии и регуляции OCP, однако оставался вопрос как будет регулироваться OCP в случае, когда FRP у цианобактерии отсутствует. С другой стороны, мы обнаружили, что гомологи белка FRP существуют в организмах, в которых нет белка OCP и для которых вообще не показана способность к фотосинтезу. Для прояснения данных вопросов мы обратили свое внимание на OCP из примитивной цианобактерии *Gloeobacter*, в которой отсутствует FRP, а также решили исследовать два новых FRP гомолога из протеобактерий (FRPH) *Thauera phenylacetica* и *Mesorhizobium ciceri*, которые не являются фотосинтезирующими организмами.

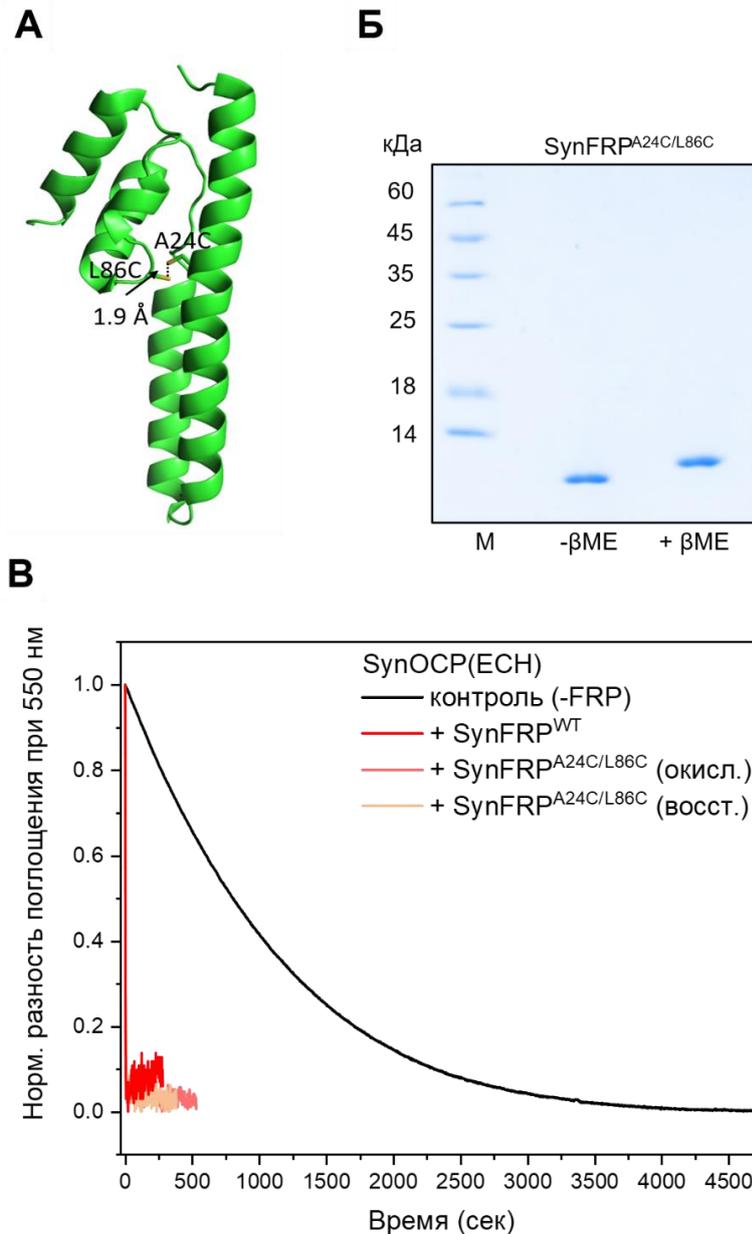


Рисунок 26. Влияние иммобилизации субдомена «головы» SynFRP на его активность. (А) Дизайн конструкции FRP с внутренним дисульфидным мостиком. Введение аминокислотных замен A24C и L86C позволяет образовать ковалентную связь и зафиксировать  $\alpha$ 1-спираль SynFRP на субдомene «головы». (Б) Определение степени сшивки препарата SynFRP<sup>A24C/L86C</sup> методом электрофореза по Лэммли. (В) Сравнение активности SynFRP<sup>wt</sup> и его цистеиновых мутантных форм на R-O конверсию SynOCP при 15°C.

#### **4. OCPX из примитивной цианобактерии *Gloeobacter* способен ускоренно релаксировать и невосприимчив к действию FRP из других цианобактерий**

Недавние исследования многообразия генов OCP и наборов генов, кодирующих гомологи доменов OCP показывают, что OCP можно разделить на 3 различные группы: OCP1, OCP2 и OCPX (Bao et al., 2017). Почти все работы по исследованию механизма функционирования и структуры были выполнены на представителях OCP1, а именно на использованном нами ранее SynOCP. Особое внимание привлекает тот факт, что, если в геноме цианобактерии нет ни одного гена OCP1, то обязательно отсутствует и ген FRP, что может означать, что только OCP1 регулируются белком FRP. Мы решили исследовать OCPX из *Gloeobacter* (GIOCPX) - самого далекого гомолога SynOCP, чтобы проверить его способность взаимодействовать с белком FRP. На данный момент секвенировано 4 генома глосеобактерий. Все четыре генома этих цианобактерий содержат по крайней мере один полный ген OCP (только OCPX), один или два гена HCP, ген STDH (отсутствует у *Anthocerotibacter panamensis*), но в них не удается обнаружить ген FRP (рис. 27). По крайней мере для одного из штаммов, *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, была показана экспрессия OCPX (подтверждена иммуноблоттингом и масс-спектрометрией), а также NPQ, индуцированный синим светом (Kuang et al., 2013).

Для дальнейшей работы мы выбрали OCPX из цианобактерии *Gloeobacter kilaueensis*, так как в ней присутствовал только один ген OCPX (рис. 27), в отличие от наборов OCP в других представителях рода *Gloeobacter*.

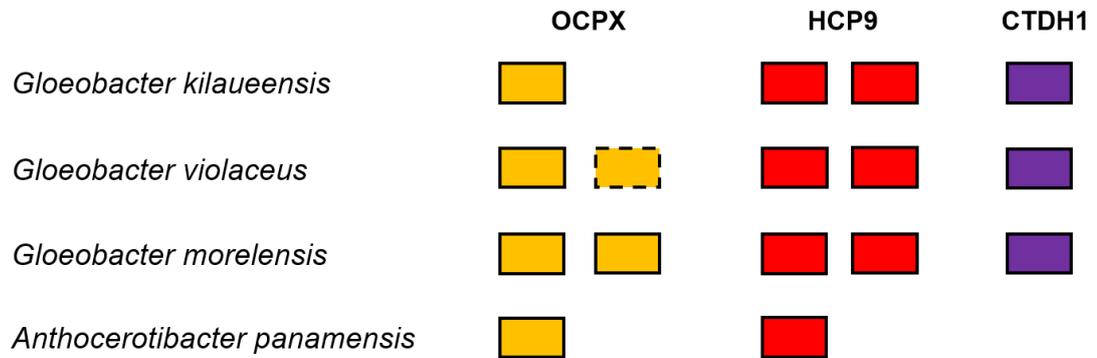


Рисунок 27. Количество генов OCP и гомологов его доменов у представителей *Gloeobacteria*. Пунктирная линия обозначает неполную последовательность OCPX, в которой отсутствуют первые ~50 остатков.

Мы получили данный белок в штамме *E. coli*, продуцирующем каротиноид эхиненон, и охарактеризовали его функционально, сравнив с SynOCP1 (рис. 28 А). GlOCPX обладает намного большей скоростью R-O конверсии в широком диапазоне температур, что может означать наличие дополнительных стабилизирующих факторов в структуре белка, позволяющих правильно сориентировать домены для перехода каротиноида из N-домена в междоменную полость белка.

Добавление SynFRP не приводило к ускорению R-O конверсии GlOCPX (рис. 28 Б). Мы выдвинули предположение, что NTE у GlOCPX может слишком сильно конкурировать с FRP за связывания, не давая ему возможности для посадки на C-домене. Мы получили данный вариант GlOCPX и проверили влияние FRP на его R-O конверсию (рис. 28 Б).

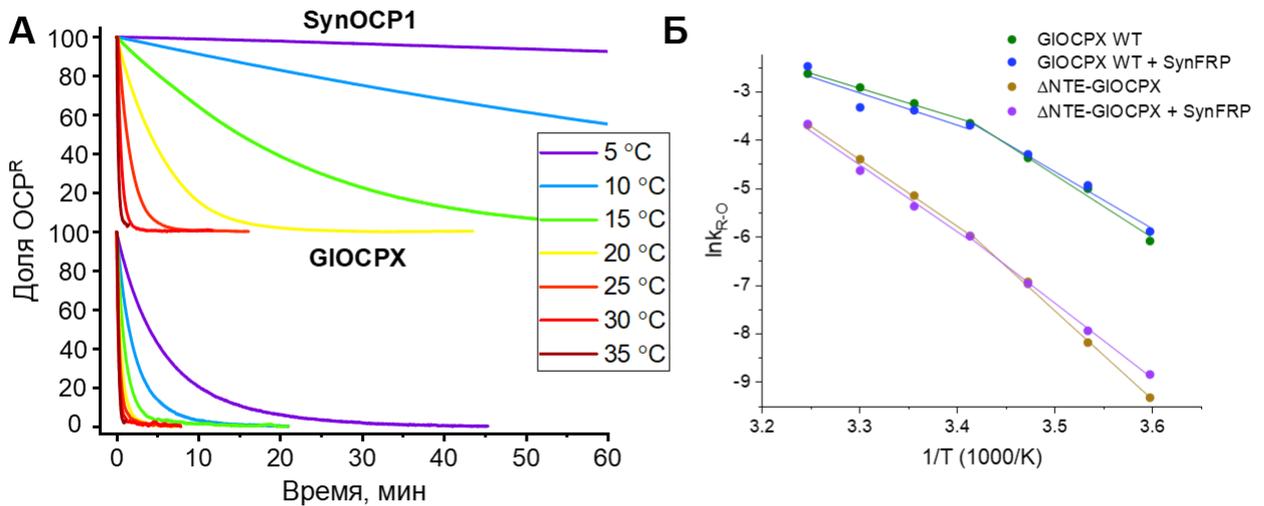


Рисунок 28. (А) Кинетики R-O конверсии SynOCP1 и GlOCPX при различных температурах. (Б) Графики Аррениуса для R-O конверсии GlOCPX WT и ΔNTE-GlOCPX до и после добавления SynFRP.

Результаты эксперимента позволяют заключить, что GlOCPX полностью невосприимчив к действию FRP и в структуре белка GlOCPX присутствуют существенные отличия по сравнению с SynOCP1. Невосприимчивость к действию FRP была показана и для другого представителя OCPX из *Scytonema hofmanni* PCC 7110 (Muzzorappa et al., 2019), однако непосредственно взаимодействие этих белков так и не было исследовано. При моделировании структуры GlOCPX нейросетью AlphaFold2 на поверхности С-домена и N-домена можно обнаружить несколько значительных отклонений от консенсусной последовательности OCP1. Среди них примечательна замена в GlOCPX F264S (нумерация SynOCP1) на поверхности С-домена в зоне потенциального контакта с FRP, обнаруженная недавно нашими коллегами (Steube et al., 2023), а также несколько замен на полярные и противоположно заряженные аминокислотные остатки A26E, R27E, A133S, A137D (нумерация SynOCP1) на поверхности N-концевого домена в зоне потенциального контакта с FRP (рис. 29).

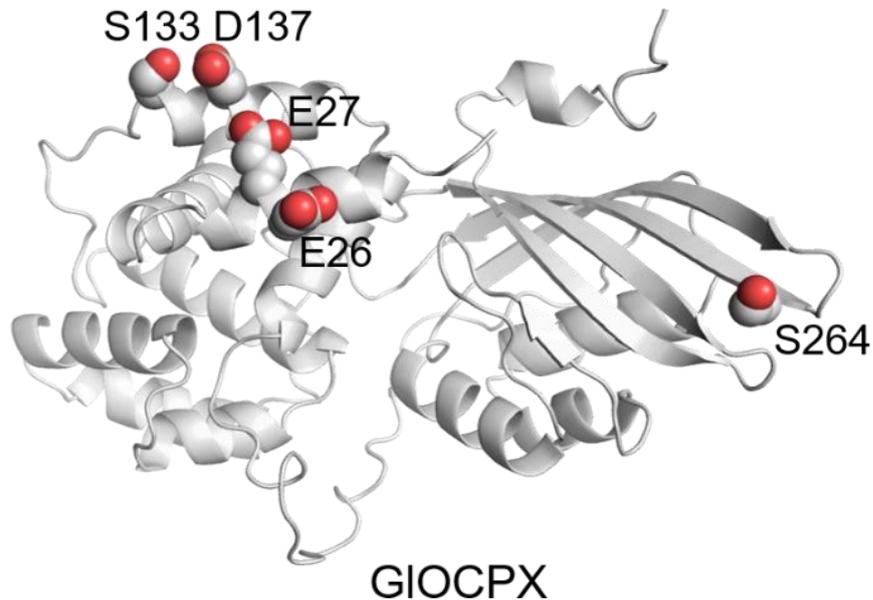


Рисунок 29. Моделирование структуры GIOCPX нейросетью AlphaFold2. На рисунке отмечены остатки на поверхности доменов, по-видимому, приводящие к отсутствию взаимодействия с белком FRP.

Мы исключили также возможность, что  $\Delta$ NTE-GIOCPX может образовывать непродуктивные комплексы FRP методом гель-фильтрации (рис. 30). При добавлении SynFRP к  $\Delta$ NTE-GIOCPX не происходило образование комплекса и смещения пика, содержащего  $\Delta$ NTE-GIOCPX (рис. 30 Б), как при добавлении SynFRP к  $\Delta$ NTE-SynOCP1 (рис. 30 А).

Для OCP1 было неоднократно показано, что после фотоактивации белок претерпевает структурные изменения (Gupta et al., 2015), позволяющие взаимодействовать с ФБС (Gwizdala et al., 2011) и вызывать NPQ (Kirilovsky et al., 2013), однако GIOCPX потенциально мог и не обладать такой функцией или утратить ее вторично. Кроме того, известно, что структура ФБС из *Gloeobacter* существенно отличается от типичных ФБС *Synechocystis* (Guglielmi et al., 1981).

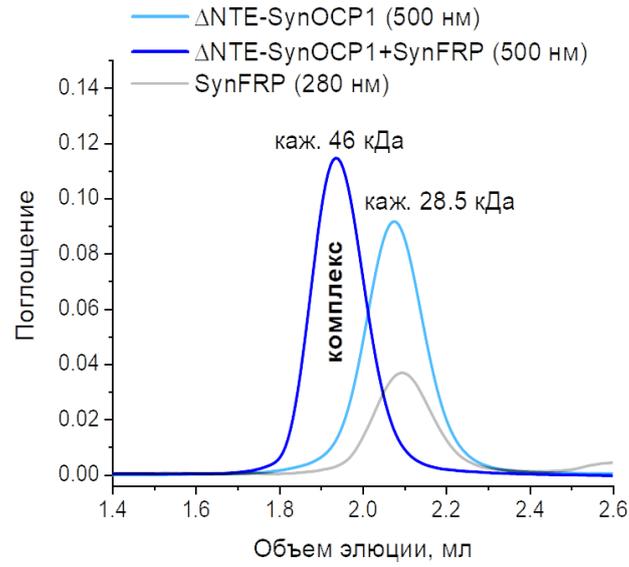
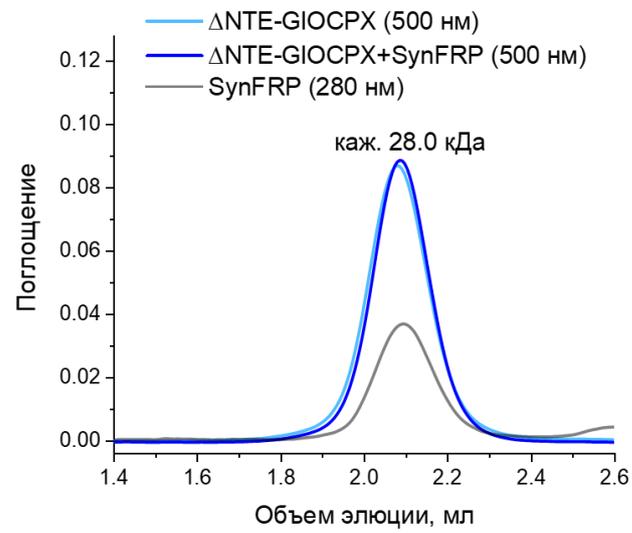
**А****Б**

Рисунок 30. Взаимодействие SynFRP с  $\Delta$ NTE-SynOCP1 (А) и  $\Delta$ NTE-GIOCPX (Б) (по 20 мкМ каждого), изученное с помощью гель-фильтрации.

Мы решили проверить способность ГЮСРХ вызывать тушение флуоресценции ФБС из *Gloeobacter* и для этого выделили и очистили ФБС из нативного источника (рис. 31).

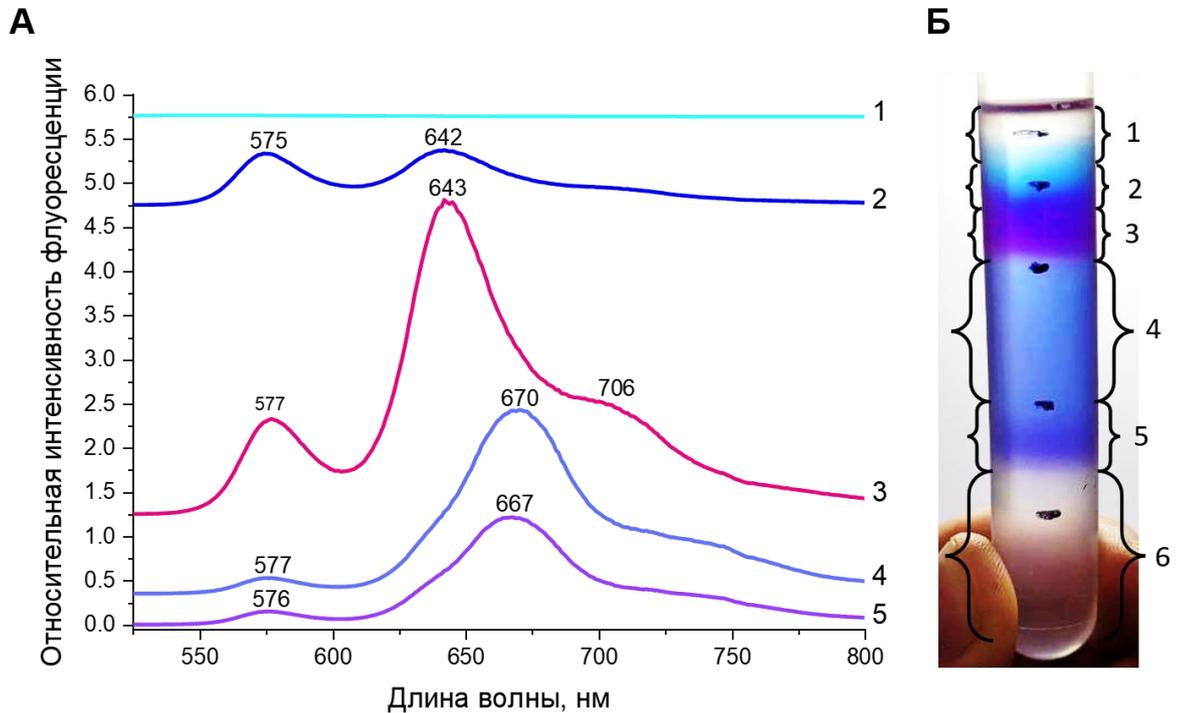


Рисунок 31. Характеристика фракций фикобилипротеинов после препаративного ультрацентрифугирования лизата клеток *Gloeobacter violaceus*. (А) – Спектры испускания флуоресценции (длина волны возбуждения флуоресценции 500 нм) фракций фикобилипротеинов в градиенте плотности сахарозы. Интактные фикобилисомы соответствуют фракциям 4 и 5. (Б) – Изображение центрифужной пробирки с разделенными фракциями фикобилипротеинов в градиенте плотности сахарозы.

Согласно данным литературы, наиболее тяжелые фракции фикобилипротеинов, находящиеся в 0,75-1 М сахарозе, соответствуют интактным фикобилисомам (фракции 4 и 5, рис. 31) (Guglielmi et al., 1981). Сравнение полученных спектров испускания флуоресценции фракций 4 и 5 также показали соответствие со спектрами флуоресценции нативных фикобилисом *Gloeobacter* также показало, что нам удалось получить неповрежденные ФБС. Препараты ФБС

мы использовали для анализа активности G1OCPX (рис. 32). Добавление G1OCPX без последующей фотоактивации не приводило к тушению флуоресценции ФБС, но под действием синего света происходило значительное снижение интенсивности флуоресценции (в 3.3 раза) и смещение максимума спектра испускания флуоресценции (на 16 нм) после 3 мин облучения синим светом (рис. 32). Действие G1OCPX было частично обратимым, после ночной инкубации в темноте, положение максимума спектра испускания флуоресценции практически вернулось к исходному значению (рис. 32). Полученные результаты свидетельствовали о том, что G1OCPX, как и другие ранее охарактеризованные ОСР, вовлечен в осуществление NPQ.

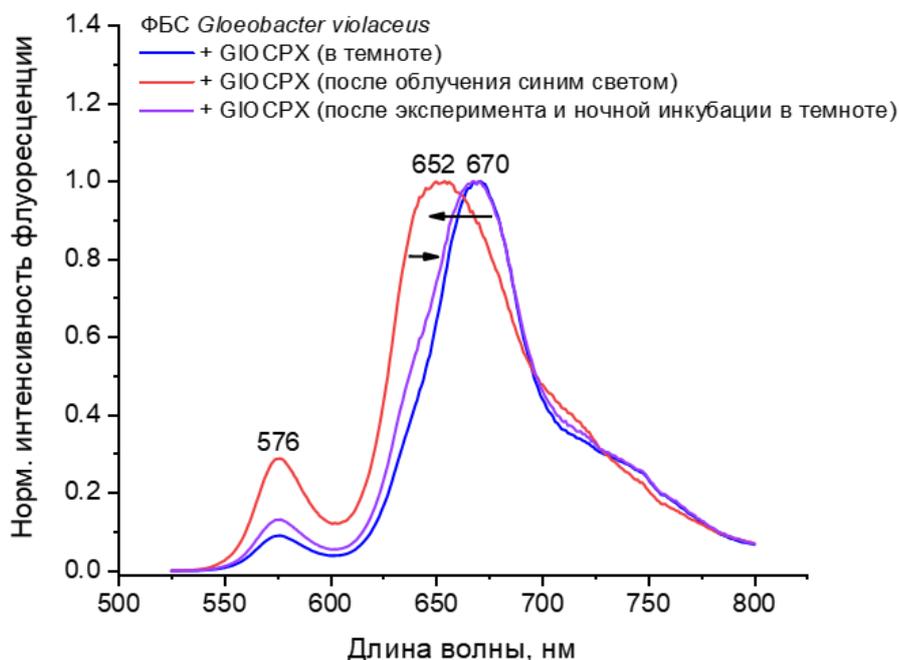


Рисунок 32. Тушение флуоресценции ФБС *Gloeobacter violaceus* при фотоактивации G1OCPX. Длина волны возбуждения флуоресценции 500 нм. Облучение препарата ФБС-ОСР синим светом производили аналогично методике, описанной для измерения фотоцикла ОСР, при +25°C.

Существенные функциональные отличия, способность взаимодействовать с ФБС и отсутствие взаимодействия с SynFRP мотивировали исследование

структуры GlOCPX. После введения точечной замены E25A и кристаллизационного скрининга нам удалось получить дифрагирующие кристаллы и решить структуру GlOCPX методом PCA (рис. 33 А). Любопытно отметить, как отличия в деталях структуры GlOCPX при сравнении с SynOCP1 хорошо объясняют функциональные отличия белка (быструю R-O конверсию). Так, линкер GlOCPX в отличие от SynOCP1 содержит множество остатков пролина и образует полярные контакты с доменами OCP (рис. 33 Б), что дополнительно стабилизирует структуру белка, снижая подвижность доменов друг относительно друга. Эти отличия соответствуют меньшей зависимости скорости R-O конверсии GlOCPX от температуры по сравнению с SynOCP1.

Стоит отметить отличия GlOCPX от SynOCP1 на поверхности С- и N-доменов. На С-домене NTE и СТТ образуют сеть взаимодействий, которые могут препятствовать посадке FRP при фотоактивации OCP. На поверхности N-домена нами также были обнаружены остатки, вводящие несколько отрицательных зарядов в зону контакта OCP с FRP и нарушающие консенсусную последовательность OCP1 (рис. 29).

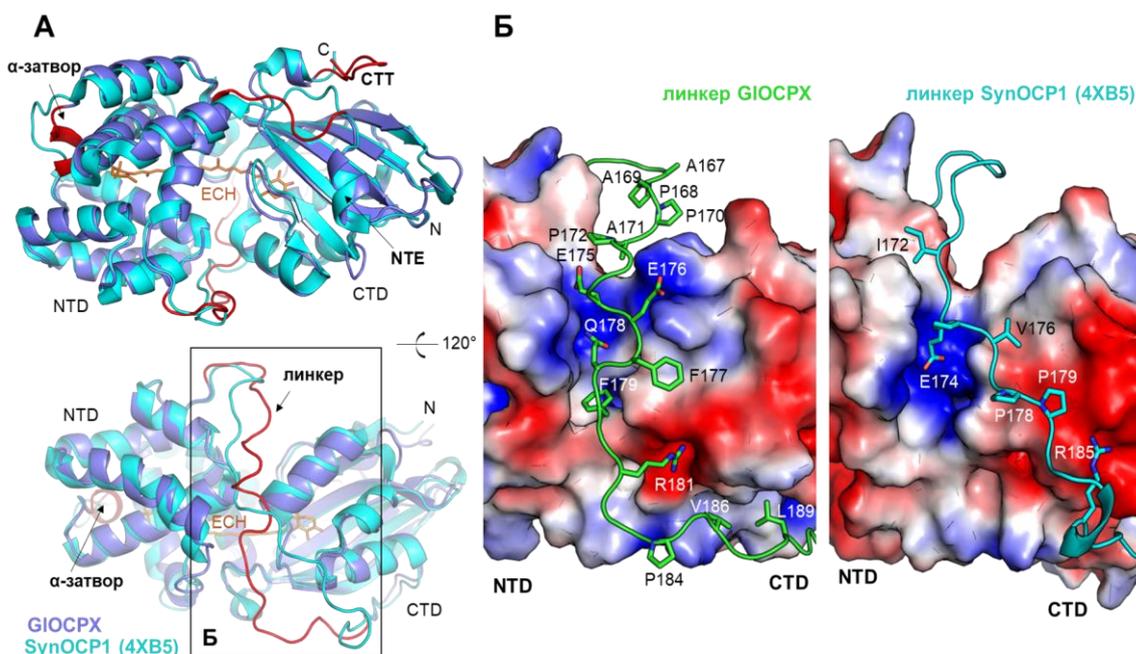


Рисунок 33. Сравнение структуры GIOCPX и SynOCP1. (А) Две различные ориентации структуры GIOCPX (PDB: 8A0H, выделена фиолетовым), наложенной на структуру SynOCP1 (PDB: 4XB5, выделена бирюзовым). Отличительные особенности структуры GIOCPX выделены красным. (Б) Различные взаимодействия линкера с доменами GIOCPX (слева) и SynOCP1 (справа). Ключевые остатки линкера выделены и подписаны, домены окрашены в соответствии с поверхностными зарядами от красного (-2кТ/е) до синего (+2кТ/е).

Таким образом, наша модель взаимодействия OCP1-FRP хорошо объясняет невосприимчивость OCPX для действия FRP. Выявленные нами особенности белка GIOCPX показывают принципиально другой эволюционный путь регуляции активности OCP, где вместо FRP элементы структуры GIOCPX приводят к ускорению его R-O конверсии.

Охарактеризовав OCPX из *Gloeobacter kilauensis*, мы решили проанализировать, насколько хорошо выбранная последовательность отражает кладу OCPX. Для этого мы построили филогенетическое дерево, основанное на последовательностях белков OCP1 с разрешенной трехмерной структурой и белков OCPX (рис. 34). Согласно этому анализу, гетерогенная кладя OCPX содержит

несколько подгрупп, из которых *Gloeobacteria* ОСРХ образуют отдельную подгруппу, наиболее удаленную от ветви ОСР1. На основе наблюдаемой гетерогенности, мы предлагаем переименовать кладу ОСРХ в ОСР3 (по аналогии с ОСР1 и ОСР2) с дальнейшим его подразделением как минимум на три подгруппы, учитывая структурные особенности линкера и С-концевого сегмента ОСР (рис. 35 Б,В). Гомологи, ближайšie к ОСРХ из *Gloeobacter*, составляют базальную субкладу ОСР3а (рис. 34 А), ближайшую к ней субкладу предлагается назвать ОСР3б (рис. 34 А). Остальные представители ОСР3 наиболее близки к ОСР1 и по-прежнему представляют собой неоднородную подгруппу, что позволяет предположить их временное наименование ОСР3с (с возможностью дальнейшего подразделения в ОСР3с, ОСР3d и т. д. в будущем).

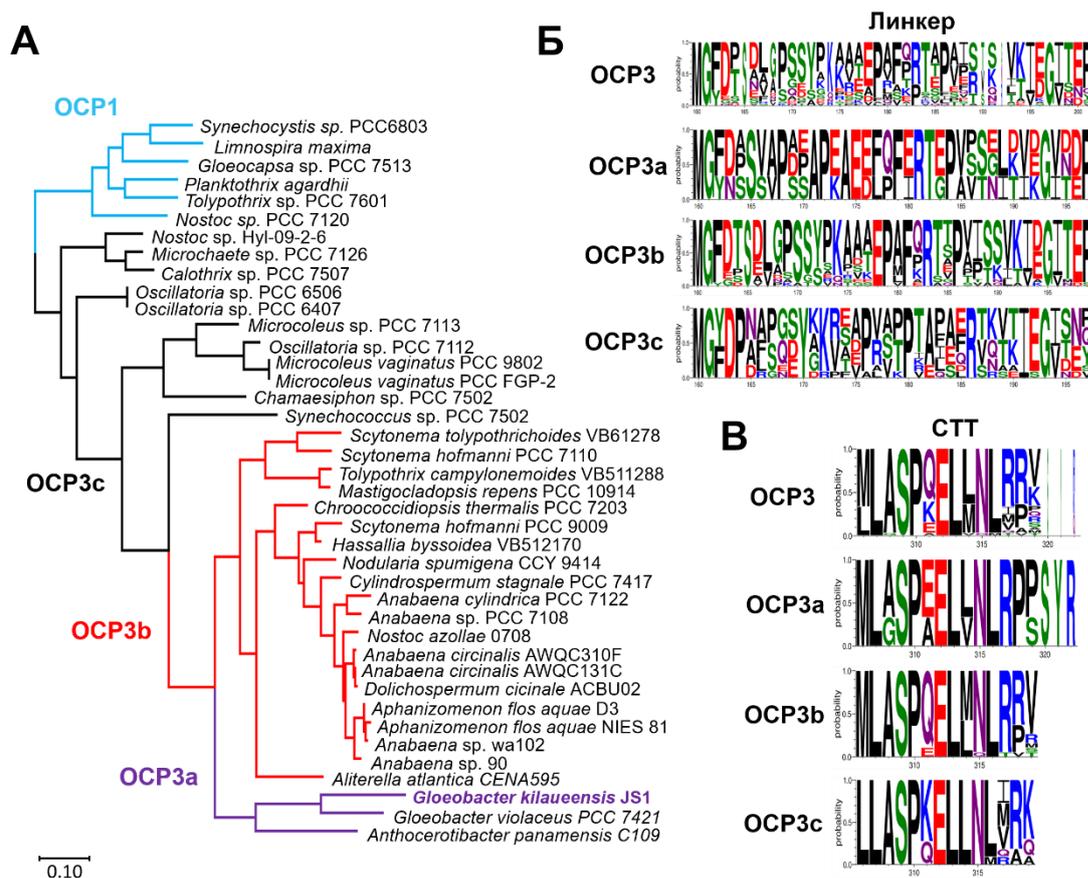


Рис. 34. Филогенетический анализ позволяет разделить гетерогенную кладу OCPX на 3 подгруппы. (А) Филогенетическое дерево из 36 последовательностей OCPX и 6 последовательностей OCP1 (голубой ветви) с известными кристаллическими структурами. Анализ был проведен с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood). Для укоренения дерева представители OCP1 использовались в качестве внешней группы (окрашены синим цветом). OCPX, использованный в этом исследовании, из *G. kilauensis*, отмечен жирным фиолетовым шрифтом. Б. WEBLOGO диаграммы линкерных последовательностей. В. WEBLOGO диаграммы последовательностей CTT (от англ. C-terminal termini).

## 5. Обнаружение и характеристика FRP гомологов из протеобактерий

Отсутствие гена и действия FRP в древних цианобактериях наводило на предположение о заимствовании гена FRP путем горизонтального переноса генов после отделения клады *Gloeobacteria* от остальных цианобактерий. Действительно, при поиске FRP гомологов в базах данных GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, RefSeq и WGS мы обнаружили множество FRP-подобных последовательностей из разных групп бактерий (преимущественно протеобактерий) (рис. 35).

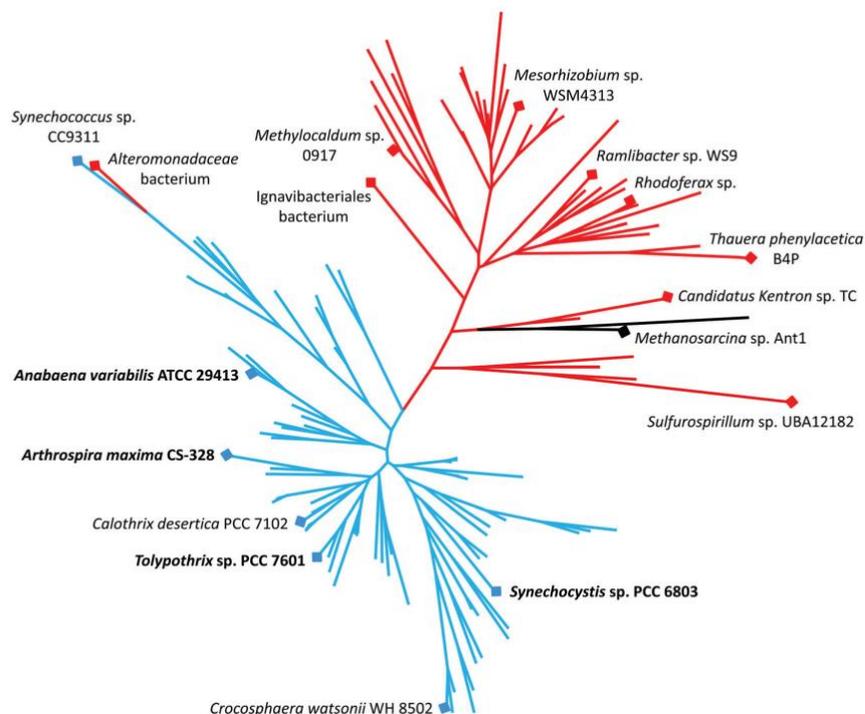


Рисунок 35. Филогенетическое дерево найденных FRP-подобных последовательностей (137 шт.). Экспериментально описанные белки FRP выделены жирным шрифтом. Также показаны представители нецианобактериальных гомологов FRP (FRPH), используемые для предсказания структуры. Цианобактериальные, архейные и другие нецианобактериальные FRP окрашены в синий, черный и красный цвета соответственно.

При анализе геномов организмов, где встречаются такие последовательности, мы не смогли отыскать генов OCP, что указывает на

принципиально другую функцию этих гомологов. Тем не менее, такие гомологи могли бы быть потенциально активны по отношению к ОСР и могли бы быть полезны при сравнительном анализе с цианобактериальными FRP. Предсказание структуры этих гомологов (FRPH) при помощи веб-сервера I-TASSER показывало высокое сходство со структурой FRP (рис. 36).

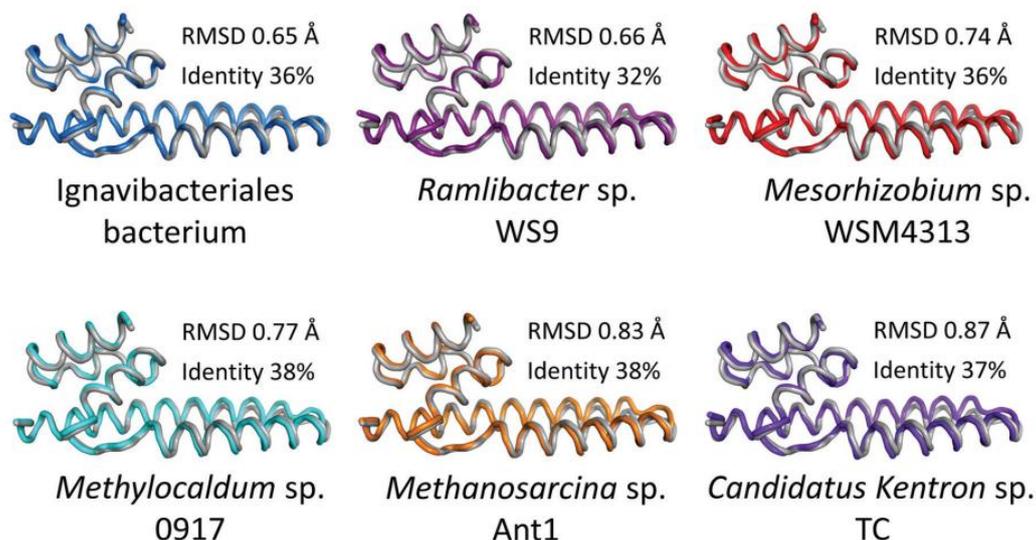


Рисунок 36. Сравнение структуры мономера FRP из *Tolypothrix sp.* PCC 7601 (окрашена серым) с предсказанными моделями структур FRPH. Показаны среднеквадратичное отклонение  $C\alpha$  (RMSD), рассчитанное с использованием I-TASSER, и соответствующие идентичности последовательностей, определенные при попарном выравнивании с использованием Clustal Omega. Лучшие модели были выбраны для представления и расчетов RMSD. Изображения и структурные наложения были сделаны с помощью PyMol.

Именно поэтому мы решили получить первых двух представителей данных белков и проверить их активность по ускорению R-O конверсии OCP1. Полученные нами рекомбинантные белки из *Thauera phenylacetica* (ThauFRPH) и *Mesorhizobium ciceri* (MesoFRPH) были представлены преимущественно в димерной форме (рис. 37) с кажущимися массами 27 и 23 кДа соответственно, однако для MesoFRPH также можно обнаружить тетрамерную форму с кажущейся массой 49 кДа.

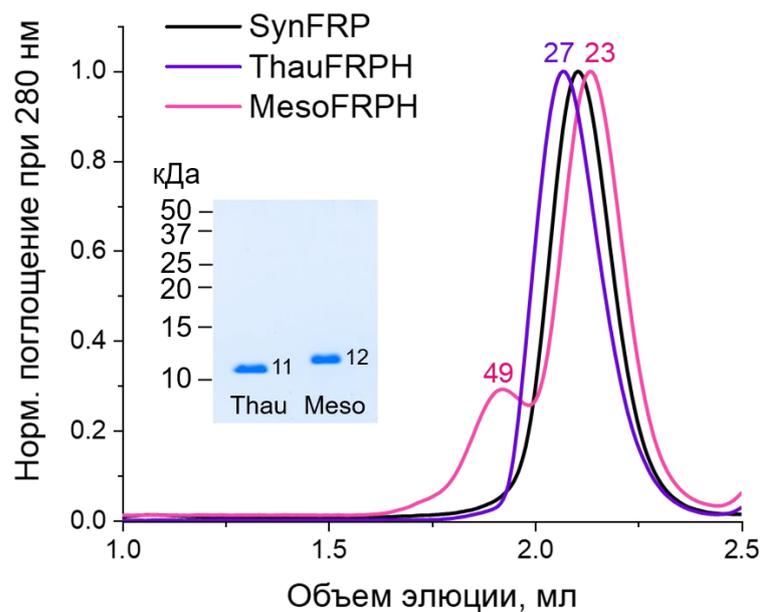


Рисунок 37. Характеристика олигомерного состояния FRPH из протеобактерий *Thauera phenylacetica* и *Mesorhizobium ciceri*. Олигомерное состояние FRPH определено методом гель-фильтрации. Массы указаны в кДа. На врезке изображена электрофореграмма FRPH с соответствующими кажущимися массами.

Таким образом, гомологи FRP из протеобактерий также являются преимущественно димерными белками, как и цианобактериальные FRP. Независимо от нас был исследован FRPH из протеобактерии *Pseudomonas borbori* (Steube et al., 2023) и было показано, что для этого FRPH характерно димерное олигомерное состояние. Кроме того, Steube и соавторам удалось получить первую структуру FRPH и экспериментально показать, что она обладает крайне высоким

сходством со структурой SynFRP (RMSD 2.08Å). Тем не менее, остается неясным, какова функция FRPH, анализ распределения химерной конструкции FRPH-mVenus в клетках *Pseudomonas borbori* показал равномерное распределение белка в экспоненциальную фазу роста и увеличение концентрации белка при голодании (Steube et al., 2023).

Из структурного сходства FRPH и FRP следует принципиальная возможность FRPH к воздействию на OCP (замедление или ускорение его R-O конверсии), даже если OCP в этих организмах отсутствует. Мы решили проверить, как полученные нами FRPH влияют на фотоцикл OCP. Добавление ThauFRPH и MesoFRPH к SynOCP не приводили к ускорению его R-O конверсии (рис. 38 А), однако они потенциально могли образовывать непродуктивные комплексы с SynOCP $\Delta^{2-20}$ . Мы проверили, взаимодействуют ли FRPH с SynOCP $\Delta^{2-20}$  методом гель-фильтрации (рис. 38 Б, В). Профили гель-фильтрации свидетельствовали об отсутствии взаимодействия между белками, так как при добавлении FRPH к SynOCP  $\Delta^{2-20}$  не происходило смещение пика SynOCP  $\Delta^{2-20}$ , детектируемое по поглощению при 470 нм. Так, мы показали, что ThauFRPH и MesoFRPH действительно не способны обеспечивать регуляцию активности OCP. Отсутствие их активности можно связать с тем, что мы выбрали представителей группы FRP-подобных белков, обособленных или эволюционно далеких от группы нецианобактериальных гомологов, давшей начало современным цианобактериальным FRP. В работе наших коллег FRPH из *Pseudomonas borbori* также не обладал способностью ускорять R-O конверсию OCP1 (Steube et al., 2023). Однако, реконструкция эволюционной истории FRP позволила выявить FRPH из бактерии клады *Desulfobacteriaceae*, наиболее близкий гомолог к потенциальному предку FRP цианобактерий (Steube et al., 2023). Такой FRPH обладал способностью к ускорению R-O конверсии OCP1. Таким образом, предок FRP цианобактерий

действительно мог быть получен ими путем горизонтального переноса генов из дельта-протеобактерий (Steube et al., 2023).

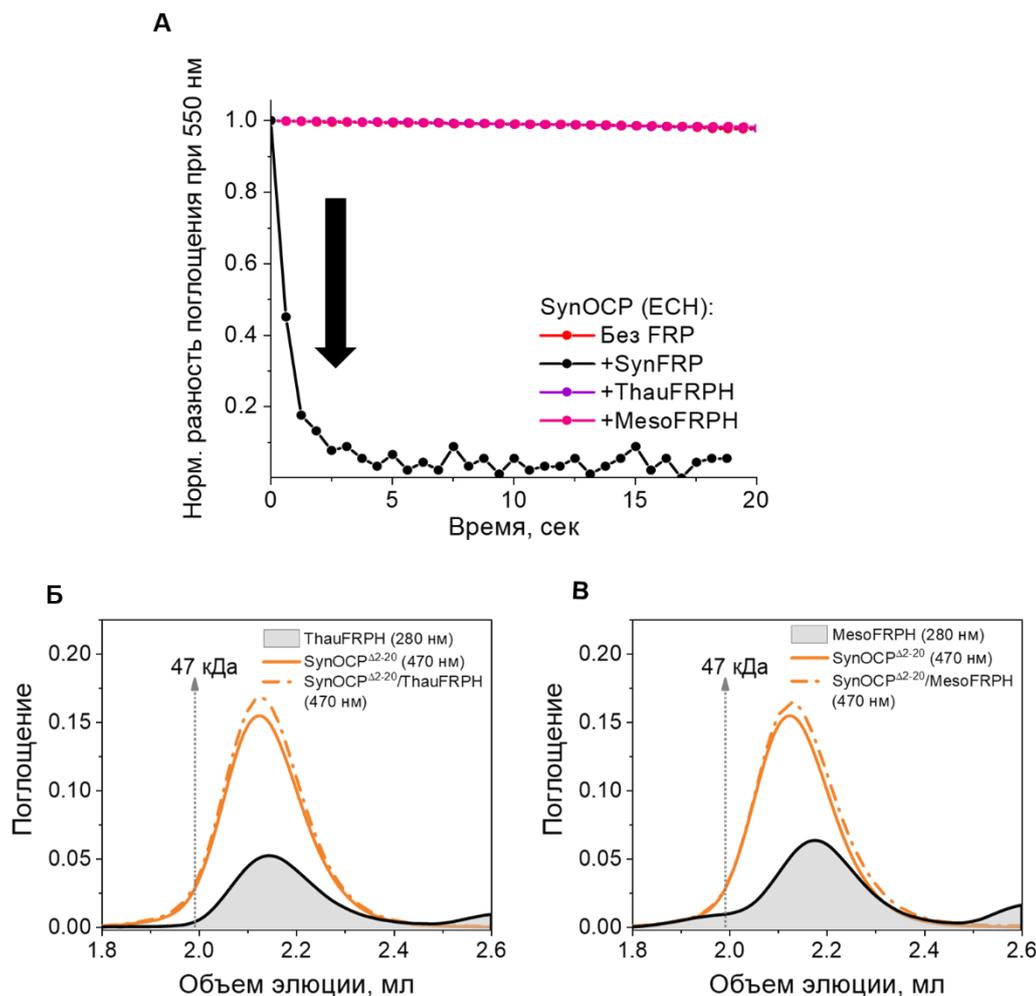


Рис. 38. Сравнение гомологов FRP из протеобактерий *Thauera phenylacetica* и *Mesorhizobium ciceri* с SynFRP. (А) Активность FRP гомологов по ускорению R-O конверсии SynOCP<sup>WT</sup> при молярном соотношении FRP/OCP равном 2:1 и температуре +15 °С. Взаимодействие ThauFRPH (Б) и MesoFRPH (В) с SynOCP $\Delta^{2-20}$ , исследованное методом гель-фильтрации.

## Заключение

В результате проделанной работы нам удалось как описать серию гомологов белка FRP и показать универсальность действия FRP на OCP1, так и локализовать и независимыми методами подтвердить основной участок взаимодействия белков OCP-FRP. В процессе исследования мы смогли зафиксировать и структурно охарактеризовать некоторые стадии этого динамического процесса, сопровождаемые изменением стехиометрии комплекса OCP-FRP. Рекрутирование FRP в комплекс (начальный комплекс), по-видимому, происходит на поверхности С-домена OCP после отхождения с этой поверхности N-концевого сегмента OCP (NTE) при фотоактивации OCP. В заякоривании FRP важны аминокислотные остатки поверхности субдомена «головы» FRP. Непосредственно перед диссоциацией из комплекса FRP должен вновь приобрести свою димерную конформацию, которая может быть утрачена в процессе взаимодействия с OCP.

Тем не менее, мономеризация FRP не является необходимым звеном для функционирования FRP, а само взаимодействие не приводит к локальному разворачиванию субдомена «головы» FRP. Второй сайт взаимодействия OCP-FRP вероятно расположен на N-концевом домене, что косвенно подтверждается отсутствием регуляции белком FRP на OCP-гомолах вне группы OCP1.

FRP, по-видимому, был заимствован цианобактериями у протеобактерий путем горизонтального переноса генов уже после возникновения двухдоменного OCP. Коэволюция паралогической линии OCP1 и FRP привела к возникновению современной системы регуляции фотозащиты у цианобактерий.

## Выводы

1. Основной участок взаимодействия белков OCP и FRP расположен на С-домене OCP в области прилегания к нему N-концевого сегмента OCP.
2. N-концевой сегмент OCP позволяет регулировать взаимодействие с белком FRP. Стабильный комплекс OCP/FRP может быть получен при удалении N-концевого сегмента OCP даже в нефотоактивированной форме OCP.
3. Построена модель пространственной структуры комплекса мономерного OCP с димером FRP, согласно которой димер FRP своим головным субдоменом взаимодействует с С-доменом OCP, а стержневой субдомен FRP за счет электростатического соответствия с поверхностью доменов OCP облегчает их воссоединение, ускоряя переход OCP в темновую форму.
4. Эволюционно наиболее примитивный вариант OCP демонстрирует высокую скорость спонтанной релаксации, особенно при низких температурах, и невосприимчив к регуляции под действием FRP в силу наличия дополнительных стабилизирующих элементов структуры на поверхности С-домена и нарушения комплементарности зарядов в зоне контакта OCP-FRP.
5. Широкая представленность гомологов FRP у протеобактерий и их отсутствие у наиболее древних цианобактерий позволяют предположить, что фотозащитная функция FRP была приобретена цианобактериями в ходе эволюции в результате горизонтального переноса генов.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации****Статьи в рецензируемых журналах из списка базы данных Web of Science  
(WoS)**

1. Sluchanko N.N., **Slonimskiy Y.B.**, Moldenhauer M., Friedrich T., Maksimov E.G. Deletion of the short N-terminal extension in OCP reveals the main site for FRP binding // FEBS Lett. — 2017a. — Vol. 591. № 12. P. 1667–1676. **IF 3.5 (WoS)**
2. Sluchanko N.N., **Slonimskiy Y.B.**, Maksimov E.G. Features of Protein – Protein Interactions in the Cyanobacterial Photoprotection Mechanism // Biochem. Mosc. — 2017b. — Vol. 82. № 13. P. 1592–1614. **IF 2.5 (WoS)**
3. Sluchanko N.N., **Slonimskiy Y.B.**, Shirshin E.A., Friedrich T., Maksimov E.G., Moldenhauer M. OCP–FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria // Nat. Commun. — 2018. — Vol. 9. P. 3869. **IF 16.6 (WoS)**
4. **Slonimskiy Y.B.**, Maksimov E.G., Lukashev E.P., Moldenhauer M., Jeffries C.M., Svergun D.I., Friedrich T., Sluchanko N.N. Functional interaction of low-homology FRPs from different cyanobacteria with Synechocystis OCP // BBA - Bioenerg. — 2018. — Vol. 1859. № 5. P. 382–393. **IF 4.3 (WoS)**
5. **Slonimskiy Y.B.**, Maksimov E.G., Lukashev E.P., Moldenhauer M., Friedrich T., Sluchanko N.N. Engineering the photoactive orange carotenoid protein with redox-controllable structural dynamics and photoprotective function // BBA - Bioenerg. — 2020. P. 148174. **IF 4.3 (WoS)**
6. **Slonimskiy Y.B.**, Maksimov E.G., Sluchanko N.N. Fluorescence recovery protein: a powerful yet underexplored regulator of photoprotection in cyanobacteria// Photochem Photobiol Sci. — 2020 — Vol. 19. № 6. P. 763-775. **IF 3.4 (WoS)**
7. **Slonimskiy Y.B.**, Zupnik A.O., Varfolomeeva L.A., Boyko K.M., Maksimov E.G., Sluchanko N.N. A primordial Orange Carotenoid Protein: Structure, photoswitching activity and evolutionary aspects // Int. J. Biol. Macromol. — 2022. — Vol. 222. P. 167–180. **IF 8.2 (WoS)**

**Тезисы докладов**

1. **Y. Slonimskiy**, E. Maksimov, N. Sluchanko (2018) Low homology FRPs from different cyanobacteria functionally interact with Synechocystis OCP, FEBS Open Bio, том 8, с. 390. IF 2.5 (WoS)
2. **Y. Slonimskiy**, V. Botnarevskii, E. Maksimov, T. Friedrich, N. Sluchanko (2019) Engineered disulfide in the orange carotenoid protein enables control of its structural dynamics associated with photoprotection function and carotenoid transfer, FEBS Open Bio, том 9, с. 306-307. IF 2.5 (WoS)
3. **Y. Slonimskiy**, E. Maksimov, E. Lukashev, M. Moldenhauer, T. Friedrich, N. Sluchanko (2021) Engineered disulfide in the orange carotenoid protein enables control of its structural dynamics associated with photoprotection function and carotenoid transfer, FEBS Open Bio, том 11, с. 185-186. IF 2.5 (WoS)

### Список цитированной литературы

1. Thurotte A., Lopez-Igual R., Wilson A., Comolet L., Bourcier de Carbon C., Xiao F., Kirilovsky D. Regulation of Orange Carotenoid Protein Activity in Cyanobacterial Photoprotection // *Plant Physiol.* — 2015. — Vol. 169. № 1. P. 737–747.
2. Adir N. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: Reconstructing a giant // *Photosynth. Res.* — 2005. — Vol. 85. № 1. P. 15–32.
3. Adir N., Zer H., Shochat S., Ohad I. Photoinhibition — a historical perspective // *Discoveries in Photosynthesis Advances in Photosynthesis and Respiration.* / под ред. Govindjee et al. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. P. 931–958.
4. Ashkenazy H., Abadi S., Martz E., Chay O., Mayrose I., Pupko T., Ben-Tal N. ConSurf 2016 : an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules // *Nucleic Acids Res.* — 2016. — Vol. 44. № May. P. W344–W350.
5. Bao H., Melnicki M.R., Pawlowski E.G., Sutter M., Agostoni M., Lechno-Yossef S., Cai F., Montgomery B.L., Kerfeld C.A. Additional families of orange carotenoid proteins in the photoprotective system of cyanobacteria // *Nat. Plants.* — 2017. — Vol. 3. P. 17089.
6. Barber J. Photosystem II: a multisubunit membrane protein that oxidises water // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 2002. — Vol. 12. № 4. P. 523–530.
7. Blankenship R.E. Early Evolution of Photosynthesis // *Plant Physiol.* — 2010. — Vol. 154. № 2. P. 434–438.
8. Boulay C., Wilson A., D’Haene S., Kirilovsky D. Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2010. — Vol. 107. № 25. P. 11620–11625.
9. Bryant D.A., Guglielmi G., Marsac N.T. de, Castets A.M., Cohen-Bazire G. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model // *Arch. Microbiol.* — 1979. — Vol. 123. № 2. P. 113–127.
10. Caffarri S., Tibiletti T., Jennings R., Santabarbara S. A Comparison Between Plant Photosystem I and Photosystem II Architecture and Functioning // *Curr. Protein Pept. Sci.* — 2014. — Vol. 15. № 4. P. 296–331.
11. Chang L., Liu X., Li Y., Liu C.-C., Yang F., Zhao J., Sui S.-F. Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II. // *Cell Res.* — 2015. — Vol. 25. № 6. P. 726–37.

12. Croce R., Van Amerongen H. Light harvesting in oxygenic photosynthesis: Structural biology meets spectroscopy // *Science*. — 2020. — Vol. 369. № 6506. P. eaay2058.
13. Demmig-Adams B., Adams W. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis // *Trends Plant Sci.* — 1996. — Vol. 1. № 1. P. 21–26.
14. Di Tommaso P., Moretti S., Xenarios I., Orobitz M., Montanyola A., Chang J.-M., Taly J.-F., Notredame C. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension // *Nucleic Acids Res.* — 2011. — Vol. 39. P. W13–W17.
15. Domínguez-Martín M.A., Sauer P.V., Kirst H., Sutter M., Bina D., Greber B.J., Nogales E., Polívka T., Kerfeld C.A. Structures of a phycobilisome in light-harvesting and photoprotected states // *Nature*. — 2022. — Vol. 609. № 7928. P. 835–845.
16. El Bissati K., Delphin E., Murata N., Etienne A., Kirilovsky D. Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms. // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2000. — Vol. 1457. № 3. P. 229–242.
17. Emsley P., Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* — 2004. — Vol. 60. № 12. P. 2126–2132.
18. Falcón L.I., Magallón S., Castillo A. Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast // *ISME J.* — 2010. — Vol. 4. № 6. P. 777–783.
19. Flamholz A., Shih P.M. Cell biology of photosynthesis over geologic time // *Curr. Biol.* — 2020. — Vol. 30. № 10. P. R490–R494.
20. Franke D., Petoukhov M.V., Konarev P.V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H.D.T., Kikhney A.G., Hajizadeh N.R., Franklin J.M., Jeffries C.M., Svergun D.I. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions // *J. Appl. Crystallogr.* — 2017. — Vol. 50. № 4. P. 1212–1225.
21. Franke D., Kikhney A.G., Svergun D.I. Automated acquisition and analysis of small angle X-ray scattering data // *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.* — 2012. — Vol. 689. P. 52–59.
22. Goh C.-S., Bogan A.A., Joachimiak M., Walther D., Cohen F.E. Co-evolution of proteins with their interaction partners // *J. Mol. Biol.* — 2000. — Vol. 299. № 2. P. 283–293.
23. Gray M.W. Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later // *Mol. Biol. Cell*. — 2017. — Vol. 28. № 10. P. 1285–1287.

24. Guglielmi G., Cohen-Bazire G., Bryant D.A. The structure of *Gloeobacter violaceus* and its phycobilisomes // *Arch. Microbiol.* — 1981. — Vol. 129. № 3. P. 181–189.
25. Gupta S., Guttman M., Leverenz R.L., Zhumadilova K., Pawlowski E.G., Petzold C.J., Lee K.K., Ralston C.Y., Kerfeld C.A. Local and global structural drivers for the photoactivation of the orange carotenoid protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2015. — Vol. 112. № 41. P. E5567–E5574.
26. Gupta S., Sutter M., Remesh S.G., Dominguez-Martin M.A., Bao H., Feng X.A., Chan L.-J.G., Petzold C.J., Kerfeld C.A., Ralston C.Y. X-ray radiolytic labeling reveals the molecular basis of orange carotenoid protein photoprotection and its interactions with fluorescence recovery protein // *J. Biol. Chem.* — 2019. — Vol. 294. P. 8848–8860.
27. Gwizdala M., Wilson A., Omairi-Nasser A., Kirilovsky D. Characterization of the *Synechocystis* PCC 6803 Fluorescence Recovery Protein involved in photoprotection // *BBA - Bioenerg.* — 2013. — Vol. 1827. № 3. P. 348–354.
28. Gwizdala M., Wilson A., Kirilovsky D. In vitro reconstitution of the cyanobacterial photoprotective mechanism mediated by the Orange Carotenoid Protein in *Synechocystis* PCC 6803. // *Plant Cell.* — 2011. — Vol. 23. № 7. P. 2631–2643.
29. Hager A., Holocher K. Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease // *Planta.* — 1994. — Vol. 192. P. 581–589
30. Harris D., Tal O., Jallet D., Wilson A., Kirilovsky D., Adir N. Orange carotenoid protein burrows into the phycobilisome to provide photoprotection. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2016. — Vol. 113. № 12. P. E1655–62.
31. Havaux M., Niyogi K.K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1999. — Vol. 96. № 15. P. 8762–8767.
32. Holt T., Krogmann D.W. A carotenoid-protein from cyanobacteria // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* — 1981. — Vol. 637. № 3. P. 408–414.
33. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene.* — 1990. — Vol. 96. № 1. P. 23–28.
34. Jiang H.-W., Wu H.-Y., Wang C.-H., Yang C.-H., Ko J.-T., Ho H.-C., Tsai M.-D., Bryant D.A., Li F.-W., Ho M.-C., Ho M.-Y. A structure of the relict phycobilisome from a thylakoid-free cyanobacterium // *Nat. Commun.* — 2023. — Vol. 14. № 1. P. 8009.

35. Johnson M.P. Photosynthesis // *Essays Biochem.* — 2016. — Vol. 60. № 3. P. 255–273.
36. Jones S., Thornton J.M. Principles of protein-protein interactions // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 1996. — Vol. 93. P. 13–20.
37. Jordan P., Fromme P., Witt H.T., Klukas O., Saenger W., Krauß N. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution // — 2001. — Vol. 411. P. 909–917
38. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature.* — 2021. — Vol. 596. № 7873. P. 583–589.
39. Kaftan D., Brumfeld V., Nevo R., Scherz A., Reich Z. From chloroplasts to photosystems: in situ scanning force microscopy on intact thylakoid membranes // *EMBO J.* — 2002. — Vol. 21. № 22. P. 6146–6153.
40. Kato M.C., Hikosaka K., Hirotsu N., Makino A., Hirose T. The Excess Light Energy that is neither Utilized in Photosynthesis nor Dissipated by Photoprotective Mechanisms Determines the Rate of Photoinactivation in Photosystem II // *Plant Cell Physiol.* — 2003. — Vol. 44. № 3. P. 318–325.
41. Kato Y., Sugiura M., Oda A., Watanabe T. Spectroelectrochemical determination of the redox potential of pheophytin *a*, the primary electron acceptor in photosystem II // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2009. — Vol. 106. № 41. P. 17365–17370.
42. Kerfeld C.A., Sawaya M.R., Brahmamdam V., Cascio D., Ho K.K., Trevithick-Sutton C.C., Krogmann D.W., Yeates T.O. The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein // *Structure.* — 2003. — Vol. 11. № 1. P. 55–65.
43. Keskin O., Gursoy A., Ma B., Nussinov R. Principles of Protein–Protein Interactions: What are the Preferred Ways For Proteins To Interact? // *Chem. Rev.* — 2008. — Vol. 108. № 4. P. 1225–1244.
44. Kirilovsky D., Kerfeld C.A. The Orange Carotenoid Protein: a blue-green light photoactive protein. // *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* — 2013. — Vol. 12. № C. P. 1135–1143.
45. Kirilovsky D., Kerfeld C.A. Cyanobacterial photoprotection by the orange carotenoid protein // *Nat. Plants.* — 2016. — Vol. 2. № 12. P. 16180.

46. Komenda J., Tichý M., Prášil O., Knoppová J., Kuvíková S., De Vries R., Nixon P.J. The Exposed N-Terminal Tail of the D1 Subunit Is Required for Rapid D1 Degradation during Photosystem II Repair in *Synechocystis* sp PCC 6803 // *Plant Cell*. — 2007. — Vol. 19. № 9. P. 2839–2854.
47. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J., Svergun D.I. PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Crystallogr.* — 2003. — Vol. 36. № 5. P. 1277–1282.
48. Krause G.H., Weis, E. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1991. — Vol. 42. P. 313–349.
49. Kuang T., Lu C., Zhang L. Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future: 15th International Conference on Photosynthesis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
50. Kufareva I., Gustavsson M., Holden L.G., Qin L., Zheng Y., Handel T.M. Disulfide Trapping for Modeling and Structure Determination of Receptor // *Methods in Enzymology*. : Elsevier, 2016. P. 389–420.
51. Laemmli U.K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4 // *Nature*. — 1970. — Vol. 227. P. 680–685.
52. Lechno-Yossef S., Melnicki M.R., Bao H., Montgomery B.L., Kerfeld C.A. Synthetic OCP heterodimers are photoactive and recapitulate the fusion of two primitive carotenoproteins in the evolution of cyanobacterial photoprotection // *Plant J.* — 2017. — Vol. 91. № 4. P. 646–656.
53. Leverenz R.L., Jallet D., Li M.-D., Mathies R.A., Kirilovsky D., Kerfeld C.A. Structural and Functional Modularity of the Orange Carotenoid Protein: Distinct Roles for the N- and C-Terminal Domains in Cyanobacterial Photoprotection // *Plant Cell*. — 2014. — Vol. 26. № 1. P. 426–437.
54. Leverenz R.L., Sutter M., Wilson A., Gupta S., Thurotte A., Bourcier de Carbon C., Petzold C.J., Ralston C., Perreau F., Kirilovsky D., Kerfeld C.A. A 12 A carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection // *Science*. — 2015. — Vol. 348. № 6242. P. 1463–1466.
55. Li M., Ma J., Li X., Sui S.-F. In situ cryo-ET structure of phycobilisome–photosystem II supercomplex from red alga // *eLife*. — 2021. — Vol. 10. P. e69635.
56. Liu H., Zhang H., King J.D., Wolf N.R., Prado M., Gross M.L., Blankenship R.E. Mass spectrometry footprinting reveals the structural rearrangements of cyanobacterial orange carotenoid protein upon light activation // *BBA - Bioenerg.* — 2014. — Vol. 1837. № 12. P. 1955–1963.

57. Lokstein H., Renger G., Götze J. Photosynthetic Light-Harvesting (Antenna) Complexes—Structures and Functions // *Molecules*. — 2021. — Vol. 26. № 11. P. 3378.
58. Lu Y., Liu H., Saer R.G., Zhang H., Meyer C.M., Li V.L., Shi L., King J.D., Gross M.L., Blankenship R.E. Native Mass Spectrometry Analysis of Oligomerization States of Fluorescence Recovery Protein and Orange Carotenoid Protein: Two Proteins Involved in the Cyanobacterial Photoprotection Cycle // *Biochemistry*. — 2016. P. acs.biochem.6b01094.
59. Lu Y., Liu H., Saer R., Li V.L., Zhang H., Shi L., Goodson C., Gross M.L., Blankenship R.E. A Molecular Mechanism for Nonphotochemical Quenching in Cyanobacteria // *Biochemistry*. — 2017. — Vol. 56. № 22. P. 2812–2823.
60. Maksimov E.G., Moldenhauer M., Shirshin E.A., Parshina E.A., Sluchanko N.N., Klementiev K.E., Tsoraev G.V., Tavraz N.N., Willoweit M., Schmitt F.J., Breitenbach J., Sandmann G., Paschenko V.Z., Friedrich T., Rubin A.B. A comparative study of three signaling forms of the orange carotenoid protein // *Photosynth. Res.* — 2016. — Vol. 130. № 1–3. P. 389–401.
61. Moldenhauer M., Sluchanko N.N., Buhrke D., Zlenko D. V., Tavraz N.N., Schmitt F.-J.J., Hildebrandt P., Maksimov E.G., Friedrich T. Assembly of photoactive orange carotenoid protein from its domains unravels a carotenoid shuttle mechanism // *Photosynth. Res.* — 2017. — Vol. 133. № 1–3. P. 327–341.
62. Murata N., Allakhverdiev S.I., Nishiyama Y. The mechanism of photoinhibition in vivo: Re-evaluation of the roles of catalase,  $\alpha$ -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* — 2012. — Vol. 1817. № 8. P. 1127–1133.
63. Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* — 2011. — Vol. 67. № 4. P. 355–367.
64. Muzzopappa F., Wilson A., Kirilovsky D. Interdomain interactions reveal the molecular evolution of the orange carotenoid protein // *Nat. Plants*. — 2019. — Vol. 5. № October. P. 1076–1086.
65. Nelson N., Ben-Shem A. The complex architecture of oxygenic photosynthesis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2004. — Vol. 5. № 12. P. 971–982.
66. Nelson N., Junge W. Structure and Energy Transfer in Photosystems of Oxygenic Photosynthesis // *Annu. Rev. Biochem.* — 2015. — Vol. 84. № 1. P. 659–683.

67. 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. — Vol. 106. № 1. P. 1–16.
68. Niyogi K.K., Truong T.B. Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2013. — Vol. 16. № 3. P. 307–314.
69. Pan X., Cao P., Su X., Liu Z., Li M. Structural analysis and comparison of light-harvesting complexes I and II // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* — 2020. — Vol. 1861. № 4. P. 148038.
70. Pedersen M.Ø., Linnanto J., Frigaard N.-U., Nielsen N.Chr., Miller M. A model of the protein–pigment baseplate complex in chlorosomes of photosynthetic green bacteria // *Photosynth. Res.* — 2010. — Vol. 104. № 2–3. P. 233–243.
71. Peterson R.B., Dolan E., Calvert H.E., Ke B. Energy transfer from phycobiliproteins to Photosystem I in vegetative cells and heterocysts of *Anabaena Variabilis* // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* — 1981. — Vol. 634. P. 237–248.
72. Pfundel E.E., Dilley R.A. The pH Dependence of Violaxanthin Deepoxidation in Isolated Pea Chloroplasts. // *Plant Physiol.* — 1993. — Vol. 101. № 1. P. 65–71.
73. Punginelli C., Wilson A., Routaboul J.-M., Kirilovsky D. Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the Orange Carotenoid Protein // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* — 2009. — Vol. 1787. № 4. P. 280–288.
74. Rakhimberdieva M.G., Boichenko V.A., Karapetyan N.V., Stadnichuk I.N. Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis* // *Biochemistry.* — 2001. — Vol. 40. № 51. P. 15780–15788.
75. Rakhimberdieva M.G., Stadnichuk I.N., Elanskaya I. V., Karapetyan N. V. Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem II-deficient mutant of *Synechocystis* sp. // *FEBS Lett.* — 2004. — Vol. 574. № 1–3. P. 85–88.
76. Ruban A.V. Light harvesting control in plants // *FEBS Lett.* — 2018. — Vol. 592. № 18. P. 3030–3039.
77. Ruban A.V., Wilson S. The Mechanism of Non-Photochemical Quenching in Plants: Localization and Driving Forces // *Plant Cell Physiol.* — 2021. — Vol. 62. № 7. P. 1063–1072.
78. Sánchez-Baracaldo P., Cardona T. On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria // *New Phytol.* — 2020. — Vol. 225. № 4. P. 1440–1446.

79. Schaub M.C., Perry S.V. The relaxing protein system of striated muscle. Resolution of the troponin complex into inhibitory and calcium ion-sensitizing factors and their relationship to tropomyosin // *Biochem J.* — 1969. — Vol. 115. № 5. P. 993–1004.
80. Sedoud A., Lopez-Igual R., Ur Rehman A., Wilson A., Perreau F., Boulay C., Vass I., Krieger-Liszkay A., Kirilovsky D. The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher // *Plant Cell.* — 2014. — Vol. 26. № 4. P. 1781–1791.
81. Shirshin E.A., Nikonova E.E., Kuzminov F.I., Sluchanko N.N., Elanskaya I.V., Gorbunov M.Y., Fadeev V.V., Friedrich T., Maksimov E.G. Biophysical modeling of in vitro and in vivo processes underlying regulated photoprotective mechanism in cyanobacteria // *Photosynth. Res.* — 2017. — Vol. 133. P. 261–271.
82. Slonimskiy Y.B., Maksimov E.G., Sluchanko N.N. Fluorescence recovery protein: a powerful yet underexplored regulator of photoprotection in cyanobacteria // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2020. — Vol. 19. № 6. P. 763–775.
83. Sluchanko N.N., Klementiev K.E., Shirshin E.A., Tsoraev G. V., Friedrich T., Maksimov E.G. The purple Trp288Ala mutant of *Synechocystis* OCP persistently quenches phycobilisome fluorescence and tightly interacts with FRP // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 2017. — Vol. 1858. № 1. P. 1–11.
84. Smith A.M., Klugman K.P. “Megaprimer” Method of PCR-Based Mutagenesis: The Concentration of Megaprimer is a Critical Factor // *BioTechniques.* — 1997. — Vol. 22. № 3. P. 438–442.
85. Squires A.H., Dahlberg P.D., Liu H., Magdaong N.C.M., Blankenship R.E., Moerner W.E. Single-molecule trapping and spectroscopy reveals photophysical heterogeneity of phycobilisomes quenched by Orange Carotenoid Protein // *Nat. Commun.* — 2019. — Vol. 10. № 1. P. 1172.
86. Stadnichuk I.N., Yanyushin M.F., Maksimov E.G., Lukashev E.P., Zharmukhamedov S.K., Elanskaya I.V., Paschenko V.Z. Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 2012. — Vol. 1817. № 8. P. 1436–1445.
87. Steube N., Moldenhauer M., Weiland P., Saman D., Kilb A., Ramírez Rojas A.A., Garg S.G., Schindler D., Graumann P.L., Benesch J.L.P., Bange G., Friedrich T., Hochberg G.K.A. Fortuitously compatible protein surfaces primed allosteric control in cyanobacterial photoprotection // *Nat. Ecol. Evol.* — 2023. — Vol. 7. № 5. P. 756-767.
88. Suga M., Akita F., Hirata K., Ueno G., Murakami H., Nakajima Y., Shimizu T., Yamashita K., Yamamoto M., Ago H., Shen J.-R. Native structure of photosystem II at

1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses // *Nature*. — 2015. — Vol. 517. № 7532. P. 99–103.

89. Sutter M., Wilson A., Leverenz R.L., Lopez-Igual R., Thurotte A., Salmeen A.E., Kirilovsky D., Kerfeld C.A. Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2013. — Vol. 110. № 24. P. 10022–10027.

90. Svergun D., Barberato C., Koch M.H.J. CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates // *J. Appl. Crystallogr.* — 1995. — Vol. 28. № 6. P. 768–773.

91. Svergun D.I. Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria // *J. Appl. Cryst.* — 1992. — Vol. 25. P. 495–503.

92. Svergun D.I., Petoukhov M.V., Koch M.H.J. Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering // *Biophys. J.* — 2001. — Vol. 80. № 6. P. 2946–2953.

93. Thurotte A., Bourcier de Carbon C., Wilson A., Talbot L., Cot S., López-Igual R., Kirilovsky D. The cyanobacterial Fluorescence Recovery Protein has two distinct activities: Orange Carotenoid Protein amino acids involved in FRP interaction // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 2017. — Vol. 1858. № 4. P. 308–317.

94. 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. — Vol. 473. № 7345. P. 55–60.

95. Vagin A., Teplyakov A. MOLREP : an Automated Program for Molecular Replacement // *J. Appl. Crystallogr.* — 1997. — Vol. 30. № 6. P. 1022–1025.

96. Vass I. Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* — 2012. — Vol. 1817. № 1. P. 209–217.

97. Watanabe M., Semchonok D.A., Webber-Birungi M.T., Ehira S., Kondo K., Narikawa R., Ohmori M., Boekema E.J., Ikeuchi M. Attachment of phycobilisomes in an antenna–photosystem I supercomplex of cyanobacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2014. — Vol. 111. № 7. P. 2512–2517.

98. Whitmore L., Wallace B.A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data // *Nucleic Acids Res.* — 2004. — Vol. 32. № Web Server. P. W668–W673.

99. Wilson A., Ajlani G., Verbavatz J.-M., Vass I., Kerfeld C.A., Kirilovsky D. A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. // *Plant Cell*. — 2006. — Vol. 18. № 4. P. 992–1007.

100. Wilson A., Punginelli C., Gall A., Bonetti C., Alexandre M., Routaboul J.-M., Kerfeld C.A., Grondelle R. van, Robert B., Kennis J.T.M., Kirilovsky D. A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2008. — Vol. 105. № 33. P. 12075–12080.
101. Wilson A., Gwizdala M., Mezzetti A., Alexandre M., Kerfeld C.A., Kirilovsky D. The essential role of the N-terminal domain of the orange carotenoid protein in cyanobacterial photoprotection: importance of a positive charge for phycobilisome binding. // *Plant Cell.* — 2012. — Vol. 24. № 5. P. 1972–83.
102. Wilson A., Muzzopappa F., Kirilovsky D. Elucidation of the essential amino acids involved in the binding of the cyanobacterial Orange Carotenoid Protein to the phycobilisome // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* — 2022. — Vol. 1863. № 1. P. 148504.
103. Winter G., Waterman D.G., Parkhurst J.M., Brewster A.S., Gildea R.J., Gerstel M., Fuentes-Montero L., Vollmar M., Michels-Clark T., Young I.D., Sauter N.K., Evans G. DIALS: implementation and evaluation of a new integration package // *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* — 2018. — Vol. 74. № 2. P. 85–97.
104. Wu Y.P., Krogmann D.W. The orange carotenoid protein of *Synechocystis* PCC 6803 // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 1997. — Vol. 1322. № 1. P. 1–7.
105. Zhang H., Liu H., Niedzwiedzki D.M., Prado M., Jiang J., Gross M.L., Blankenship R.E. Molecular mechanism of photoactivation and structural location of the cyanobacterial orange carotenoid protein // *Biochemistry.* — 2014. — Vol. 53. № 1. P. 13–19.
106. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction // *BMC Bioinformatics.* — 2008. — Vol. 9. № 1. P. 40.

## Приложение

Таблица. 1. Нуклеотидные последовательности праймеров.

Название	Последовательность
OCP_I5C_forward	GCCGTTTACCTGTGATAGCGCACGTG
OCP_I5C_reverse	ATGGTGGCTGGATCCGGA
OCP_F299C_forward	GGCAAATCTGTTTTGTTGCC
OCP_F299C_reverse	TTCCGGATTCAGCAGAAAAC
FRP_L49E_forward	GATTGATGATGAGTGGAAACTGCATG
FRP_L33C/I43C_reverse	CAATCTGGGTACACTGGCTTGCCTGTGCCTGAACGGT TGCACACAGACCATCCAGTTC
FRP_F76C_forward	GTGATCATTGTGTTTTTGCAC
FRP_F76C_reverse	GCTCTGACGATCATCATATTTG
FRP_K102C_forward	TAAACAGAGCTGCATCAAAGCACTGGC
FRP_K102C_reverse	TCTGCTGCCAGAAAGGTC
T5_forward	GTGAGCGGATAACAATTTACACAC
pQE_reverse	CATTA CTGGATCTATCAACAGGAG
T7_forward	TAATACGACTCACTATAGGG
T7_rev	CGGGCTTTGTTAGCAGCCG
FRP_A24C_reverse	ACGCTGATAGCATTACGAAAC
FRP_L86C_forward	AAAGAAGGTTGCGTTCAGGCAG
FRP_NdeI_forward	ATTACATATGCTGCAGACCGCAG
FRP_XhoI_reverse	ATAACTCGAGTTACAGACGTGCCAG
GIOCPX_d2- 17_forw_deletion	ATTACATATGAGTCGCATCCCAGC
GIOCPX_E25A_rev	ATTAAACTCCGCTAAAATAGC