

На правах рукописи

Слонимский Юрий Борисович

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

1.5.4. Биохимия

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва 2024**

Работа выполнена в лаборатории белок-белковых взаимодействий в «Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, заведующий лабораторией белок-белковых взаимодействий, ведущий научный сотрудник **Случанко Николай Николаевич**

**Официальные оппоненты:**

**Митькевич Владимир Александрович**, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, заместитель директора, главный научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии

**Зорина Анна Алексеевна**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, старший научный сотрудник лаборатории клеточной регуляции

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук»

Защита состоится « 05 » 12 2024 г. в 14-00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Орловский А. Ф.

## Общая характеристика работы

### 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 OCP (от англ. Orange Carotenoid Protein). При фотоактивации OCP происходит изменение спектра поглощения и цвета (красная форма OCP) вследствие смещения каротиноида в N-концевой домен и разделения доменов OCP. Именно в конформации с разделенными доменами OCP осуществляет свою функцию - взаимодействует с фикобилисомами, обеспечивая тепловую диссипацию поглощенной ими энергии, что можно детектировать как тушение их флуоресценции. Несмотря на то, что фотоактивация OCP обратима *in vitro*, адекватный физиологический ответ *in vivo* требует наличия у OCP 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 OCP от его комплекса с фикобилисомой. FRP способен взаимодействовать с OCP 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 OCP в оранжевую форму, и за счет каких структурных детерминант FRP различает оранжевую и красную формы OCP. По данным, полученным ранее с участием нашей лаборатории, взаимодействие белков OCP и FRP происходит по нескольким участкам связывания и сопровождается мономеризацией FRP. Совершенно неожиданным является крайне широкое разнообразие как OCP (в цианобактериях можно встретить до двух

полноразмерных генов OCP), так и FRP генов. Современная филогенетика разделяет OCP на три неравные группы: OCP1, OCP2 и OCPX. Регуляция функционирования OCP показана только для мажорной группы OCP1, а для OCP2 и крайне гетерогенной группы OCPX данный вопрос остается почти неизученным. Ключевые работы по исследованию взаимодействия OCP и FRP были проведены лишь для пары белков OCP1 и FRP из *Synechocystis* sp., оставляя нерешенным вопрос, насколько универсален механизм взаимодействия OCP-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 ОСП (ОСПХ из *Gloeobacter*), для которого впервые удалось получить пространственную структуру. Предложены переименование и классификация группы ОСПХ в ОСПЗ с разбиением на подгруппы ОСПЗa, ОСПЗb, ОСПЗc, и т.д., а также обнаружено 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 ОСП. Мы определили константу диссоциации и стехиометрию их комплекса, а также разработали подход для характеристики разнообразных мутантных форм ОСП и FRP. В литературе известно, что при суперэкспрессии FRP тушение флуоресценции фикобилисом не наступает даже при облучении цианобактерий интенсивным синим светом. Изменяя соотношение концентраций ОСП/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 ОСП-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 ОСП *in vitro*. Гомологи FRP существуют вне группы цианобактерий, они также представлены преимущественно димерами, но неактивны по отношению к модельному ОСП из *Synechocystis*.

2) Раскрытие структурных доменов ОСП, наблюдаемое при фотоактивации, инициирует узнавание ОСП белком FRP. Удаление N-концевого сегмента белка ОСП или ослабление контакта этого сегмента с C-доменом белка ОСП за счет аминокислотной замены открывает участок связывания ОСП с белком FRP. Фиксация NTE на C-домене ОСП за счет дисульфидной ловушки препятствует связыванию FRP даже при фотоактивации ОСП.

3) Получена модель пространственной структуры комплекса ОСП/FRP в стехиометрии 1:2, которая объясняет как FRP обеспечивает ускорение конверсии ОСП в «оранжевую» форму за счет облегчения воссоединения ОСП доменов.

4) Выявлены структурные отличия ОСП1 и ОСПХ паралогов, предположительно отвечающие за невосприимчивость ОСПХ к действию FRP. На поверхности N- и C-концевых доменов ОСПХ в зоне потенциального контакта с FRP были обнаружены замены на полярные и противоположно заряженные аминокислотные остатки, нарушающие взаимодействие между белками-партнерами

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

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. Достоверность результатов, полученных в ходе работы, подтверждается воспроизводимостью измерений и согласованностью результатов.

#### **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 конференций в сборниках, опубликованных в виде дополнительных выпусков журналов, индексируемых в Web of Science.

#### **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 ОСП 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.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 104 страницах. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Работа иллюстрирована 1 таблицей и 38 рисунками. Библиографический указатель включает 106 источника.

## 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.

**Методология диссертационного исследования.** Работа проведена с использованием современных биохимических, биофизических, молекулярно-биологических методов, а также методов структурной биологии.

### Материалы и методы исследования

Все белки, использованные в работе, были получены при их экспрессии в штамме *E. coli* BL21 (DE3) или BL21 (DE3), содержащем дополнительную плазмиду с кассетой ферментов для синтеза каротиноидов. В работе применены методы *генной инженерии*: клонирование методом рестрикция-лигирование и сайт-направленный мутагенез методом мегапраймерного ПЦР. Для очистки и физико-химической характеристики белков были применены *хроматографические* методы и методы *биохимии* (различные виды нативного и денатурирующего гель-электрофореза), а также *биофизики* (флуоресцентная и абсорбционная спектроскопия, круговой дихроизм). Взаимодействие белков детектировали методами гель-фильтрации с полноспектральной детекцией, а также методами нативного электрофореза, химического сшивания глутаровым альдегидом и дисульфидной ловушки. Активность FRP измеряли по изменению скорости перехода ОСР из красной в оранжевую форму методом абсорбционной спектроскопии. Для определения структуры комплексов белков были применены методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и монокристаллическая рентгеновская кристаллография.

Для анализа разнообразия и поиска новых гомологов ОСР и FRP мы применяли методы *биоинформатики* (BLAST, построение филогенетических деревьев методом Maximum Likelihood). Для получения первичных моделей белков для структурной биологии мы применяли методы вычислительной биологии (веб-сервер I-TASSER и нейросеть AlphaFold2).

## Основные результаты и их обсуждение

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

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, среди которых подавляющее большинство последовательностей обладают низкой долей идентичных аминокислотных остатков (мода распределения 50-55%). Для того, чтобы подтвердить или опровергнуть универсальность действия гомологов FRP мы построили филогенетическое дерево (данные не приведены) 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.

После успешного клонирования и наработки белков мы получили электрофоретически гомогенные препараты FRP из *Synechocystis* sp., *Anabaena variabilis* и *Arthrospira maxima* (рис. 1А, врезка). OCP из *Synechocystis* sp. (SynOCP) мы получили в особом штамме *E. coli*, продуцирующем каротиноид эхниненон (Maksimov et al., 2016). 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).



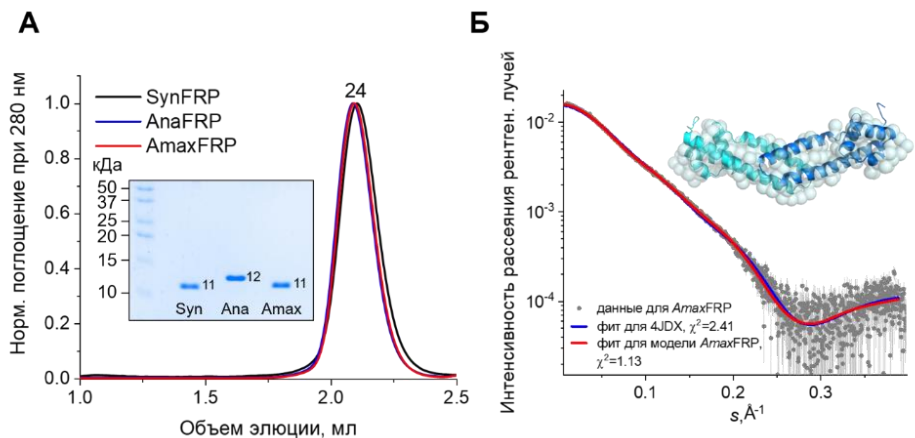


Рисунок 1. Характеристика гомологов белка FRP. (А) Определение олигомерного состояния гомологов FRP из цианобактерий *Synechocystis*, *Anabaena* и *Arthrospira* методом гель-фильтрации. Массы указаны в кДа. (Б) Фитирование кривой SAXS для AmaxFRP при концентрации белка 460 мкМ моделью, полученной с помощью I-TASSER, и моделью структуры 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.

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. 1А), 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, 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 описания его структуры в растворе (рис. 1Б). Экспериментально определенная методом МУРР масса составила 24 кДа, независимо подтверждая димерное состояние белка. Для фитирования

кривой рассеяния рентгеновского излучения раствором белка AmaxFRP (рис. 1Б, 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. 1Б). Стоит отметить высокое сходство построенной модели AmaxFRP с ранее описанным SynFRP. Таким образом, несмотря на существенные отличия в последовательностях белков (только 48.1% идентичности с SynFRP), 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. 2). В результате мы показали, что AnaFRP и AmaxFRP сохраняют свою функциональную активность и ускоряют R-O конверсию неродственного

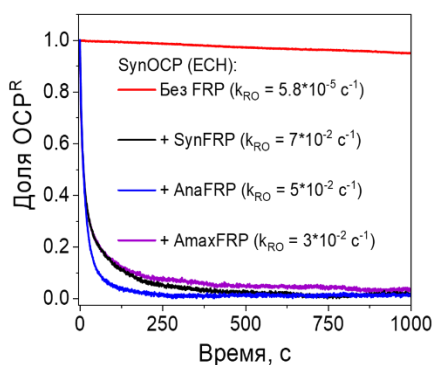


Рисунок 2. Активность гомологов FRP по ускорению R-O конверсии белка SynOCP (ECH) при +5°C и молярном соотношении FRP/OCP, равном 4.

SynOCP, хотя максимальной скоростью R-O конверсии закономерно обладает пара белков SynOCP/SynFRP (рис. 2).

Это означает, что как структура, так и способность ускорять R-O конверсию сохраняется у гомологов FRP.

Однако оставался вопрос, как именно взаимодействует белок FRP с OCP, и как это взаимодействие ускоряет R-O конверсию.

## 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. 3А) открепляется от С-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 родством к FRP, чем «красная» (Sluchanko et al., 2017). Кроме того, было показано, что SynFRP взаимодействует с изолированным С-доменом белка OCP (Moldenhauer et al., 2017).

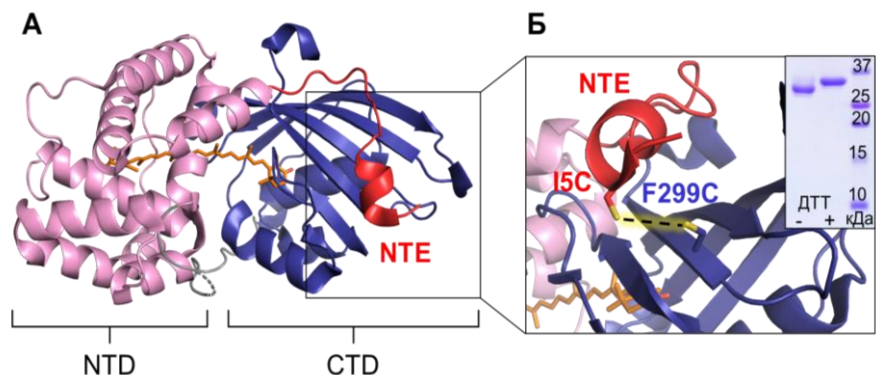


Рисунок 3. Дизайн варианта OCP с N-концевым сегментом (NTE), иммобилизованным на поверхности С-домена за счет образования внутримолекулярного дисульфидного мостика. (А) Структура белка OCP (PDB ID: 3MG1). N-концевой и С-концевой домены окрашены розовым и синим, соответственно. N-концевой сегмент (NTE) выделен красным. (Б) Область SynOCP с заменами I5C и F299C, при окислении которых образуется дисульфидный мостик, иммобилизующий NTE на С-домене.

Объединив эти факты, мы предположили, что при диссоциации NTE от С-концевого домена экспонируется участок взаимодействия OCP и FRP, а при завершении фотоцикла и переходе в «оранжевую» форму NTE конкурирует с FRP за связывание на С-домене и вытесняет FRP. Это означало бы, что NTE закрывает основной участок взаимодействия FRP на С-домене OCP. Для проверки этой гипотезы мы получили OCP с двумя аминокислотными заменами на цистеины, позволяющий получать дисульфидный мостик между NTE и С-доменом при их окислении (oxSynOCP<sup>oc</sup>) (рис. 3Б).

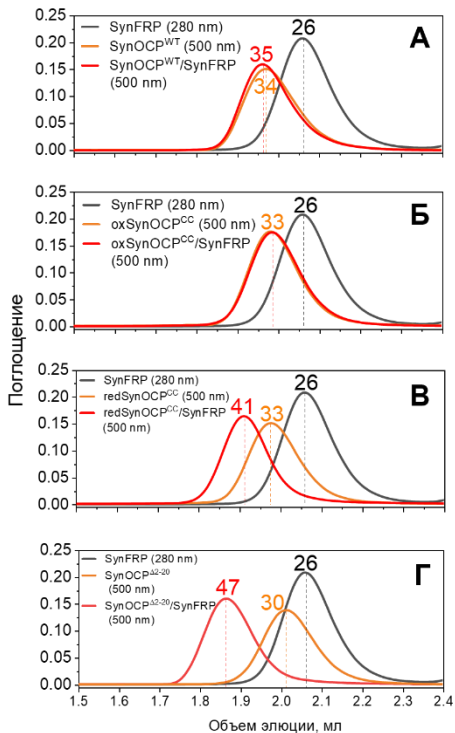


Рисунок 4. Взаимодействие белка SynFRP с «оранжевыми» формами SynOCP<sup>WT</sup> (А), oxSynOCP<sup>CC</sup> (Б), redSynOCP<sup>CC</sup> (В) и SynOCP<sup>Δ2-20</sup> (Г). Образцы, содержащие индивидуальные белки SynFRP (200 μM), SynOCP<sup>WT</sup>, oxSynOCP<sup>CC</sup>, redSynOCP<sup>CC</sup> и SynOCP<sup>Δ2-20</sup> (20 μM каждый) или их смеси с SynFRP наносили на колонку Superdex 200 Increase 5/150.

белку SynFRP вытеснять NTE даже в отсутствии фотоактивации. Для прямой проверки роли NTE мы решили полностью удалить данный сегмент (первые 20 аминокислотных остатков). Получив вариант SynOCP<sup>Δ2-20</sup> в холоформе, мы

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 шивки. Для разделения окисленной и восстановленной фракций белка мы использовали ионообменную хроматографию. В результате мы получили электрофоретически гомогенный препарат холоформы с внутримолекулярным дисульфидным мостиком (рис. 3Б, врезка), сохраняющей свое мономерное состояние. Далее мы перешли к исследованию взаимодействия с FRP методом гель-фильтрации (рис. 4). При добавлении SynFRP к SynOCP<sup>WT</sup> мы обнаружили слабый сдвиг пика OCP (кажущаяся масса 35 кДа) вследствие транзитного взаимодействия с SynFRP (рис. 4А), тогда как в случае oxSynOCP<sup>CC</sup> взаимодействие полностью пропадало (рис. 4Б). В то же время, восстановленная форма redSynOCP<sup>CC</sup>, в которой NTE не был иммобилизован на С-доме OCP, демонстрировала образование стабильного комплекса с FRP (рис. 4В). По-видимому, введение цистеинов в данные положения в белке SynOCP ослабляют контакт NTE с С-домом OCP и позволяет

проверили его взаимодействие с SynFRP. Согласно полученным профилям гель-фильтрации, при добавлении избытка SynFRP происходило образование комплекса SynOCP $\Delta^{2-20}$ /SynFRP с кажущейся массой комплекса 47 кДа (рис. 4Г), что по молекулярной массе белков соответствовало стехиометрии комплекса OCP/FRP 1:1. 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 (данные не показаны). Так нам удалось независимо подтвердить стехиометрию 1:1 для комплекса OCP/FRP.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что основной участок взаимодействия с FRP расположен на С-домене и экранируется NTE, и именно это обеспечивает слабое взаимодействие белка FRP с OCP в его «оранжевой» форме. Кроме того, при удалении NTE у SynOCP мы получили удобную систему для проверки взаимодействия гомологов и мутантных вариантов белка FRP, что также позволило оценить кажущуюся константу диссоциации этого комплекса.

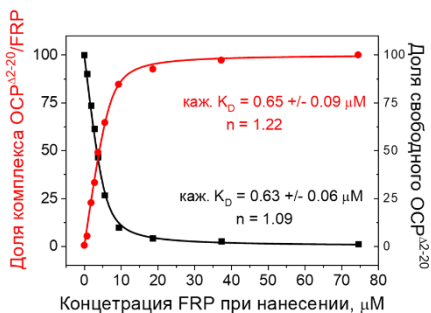


Рисунок 5. Кривые титрования, отражающие изменения амплитуд исчезающего пика свободного SynOCP $\Delta^{2-20}$  (черный) и появляющегося пика комплекса (красный). Для определения константы диссоциации комплекса использовали модель взаимодействия 1:1.

Для оценки константы диссоциации комплекса OCP/FRP мы воспользовались методом гель-фильтрации. Титрование SynOCP $\Delta^{2-20}$  возрастающим количеством SynFRP приводило к постепенному истощению пика исходного каротиноидного белка и появлению пика комплекса (данные не показаны), что позволило построить график зависимости доли комплекса OCP/FRP от концентрации SynFRP при нанесении (рис. 5).

При описании данной зависимости моделью взаимодействия 1:1 кажущаяся константа диссоциации составила 0.65 мкМ. Стоит отметить, что для аналога фотоактивированной формы SynOCP константа диссоциации,

определенная тем же методом, была равна 2-3 мкМ, что закономерно, так как в нем присутствует NTE, конкурирующий за тот же сайт связывания на С-домене.

Обнаруженный нами участок взаимодействия OCP и FRP на С-концевом домене и выявленная роль NTE показывали принцип распознавания OCP<sup>R</sup> белком FRP, но не объясняли того, как именно FRP ускоряет R-O конверсию. Это требовало структурных исследований комплекса OCP/FRP. Полученные нами данные гель-фильтрации и химического сшивания указывали на то, что белок FRP мономеризуется в ходе его взаимодействия с OCP. Обнаруженная мономеризация могла играть существенную роль в процессе функционирования FRP, что требовало проверки. Чтобы ответить на этот вопрос необходимо было получить не диссоциирующий димерный и мономерный варианты FRP.

### **3. Возможная роль мономеризации FRP и модель структуры комплекса OCP/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 ~6.5 Å в составе димера FRP. При окислении цистеинов происходило бы образование двух дисульфидных мостиков между остатками C33 и C43 двух субъединиц FRP (oxFRPcc). Мы получили данные варианты FRP в высокоочищенном состоянии и подобрали условия для полного окисления варианта L33C/I43C (oxFRPcc). Далее препараты вариантов FRP мы охарактеризовали методами гель-фильтрации (рис. 6А), нативного электрофореза (рис. 6Б) и кругового дихроизма (рис. 6В).

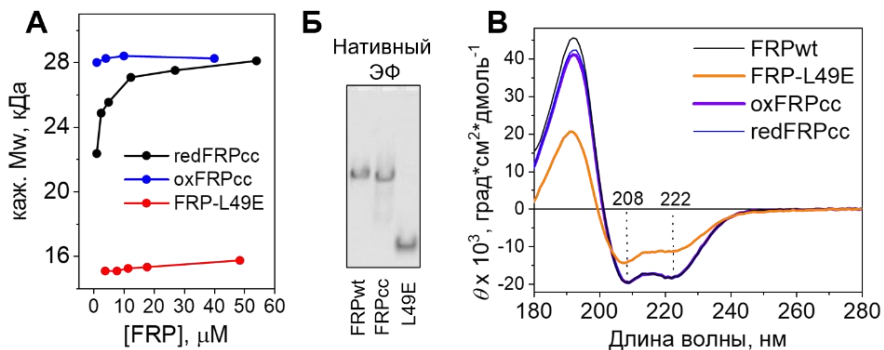


Рисунок 6. Олигомерное состояние белков redFRPcc, oxFRPcc и FRP-L49E, исследованное методом гель-фильтрации (А) в концентрационной серии и методом нативного электрофореза (Б). (В) КД-спектры FRPwt, FRP-L49E, oxFRPcc и redFRPcc (36 мкМ каждый). Положения пиков отмечены в нм.

Согласно графику зависимости кажущейся массы от концентрации FRP при нанесении на колонку на рис. 6А в результате замены L49E произошла почти полная диссоциация SynFRP на мономеры с кажущейся 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. 6Б) 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. 6В) мы выявили, что замена L49E 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.

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 oxFRPcc и ~100-

кратное снижение максимальной активности для FRP-L49E по сравнению с белком дикого типа (данные не показаны). Полученные результаты свидетельствовали о том, что мономеризация не была необходимым звеном в процессе действия FRP, однако существенно увеличивала его эффективность. Действие FRP-L49E, по-видимому, скомпрометировано частичным разворачиванием белка, тем не менее некоторая активность сохранялась, что мы объяснили сворачиванием FRP при связывании с OCP. Вероятно, FRP

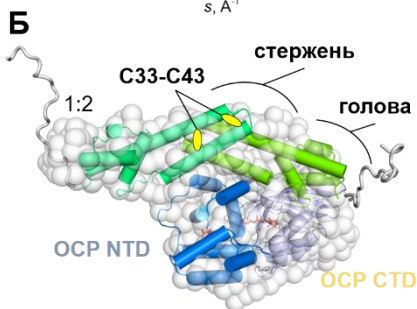
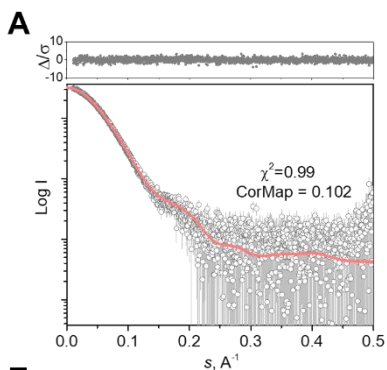


Рисунок 7. (А) Описание данных МУРР моделью комплекса OCP-FRP в стехиометрии 1:2, полученной в CORAL. (Б) Модель комплекса OCP-FRP 1:2, наиболее точно описывающая экспериментальные данные МУРР.

способен оказывать свое действие как в стехиометрии 1:1, так и 1:2. 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 вариант L33C/I43C сохранял способность взаимодействовать с SynOCP $\Delta^{2-20}$ , что позволило нам исследовать комплекс OCP/FRP методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и получить первую модель его структуры (рис. 7А и 7Б). В модели, наилучшим образом описывающей данные, субдомен головы одного из протомеров FRP направлен к поверхности С-домена, образуя мост к N-домену OCP, с поверхностью которого протомер FRP также образует контакт, но уже в области субдомена стержня FRP. Данный сценарий согласуется с распределениями электростатических поверхностных потенциалов и консервативности

16



аминокислотных остатков в области контакта белков, а также с анализом известных из литературы аминокислотных замен в FRP и OCP, снижающих активность FRP. Для дополнительной проверки нашей модели мы прибегли к методу дисульфидной ловушки (данные не приведены), и нам удалось независимо подтвердить топологию комплекса OCP-FRP (рис. 7Б). К сожалению, данная модель, несмотря на простоту и предсказательную силу, 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). Ответить на этот вопрос могла бы структура данного комплекса, полученная методом рентгеновской кристаллографии, но многочисленные попытки кристаллизации комплекса OCP/FRP не увенчались успехом.

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 обнаруженных нами FRP гомолога из протеобактерий (FRPH) *Thauera phenylacetica* и *Mesorhizobium ciceri*, которые не являются фотосинтезирующими организмами.

#### 4. OCPX из древней 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 (Бао et al., 2017). Почти все работы по исследованию механизма функционирования и структуры были выполнены на представителях OCP1, а именно на использованном нами ранее белке 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 SynOCP1, чтобы проверить его способность взаимодействовать с белком FRP. Мы получили данный белок в штамме *E. coli*, продуцирующем каротиноид эхиненон, и впервые охарактеризовали его функционально, сравнив с SynOCP1 (рис. 8А). Оказалось, что GIOCPX 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 GIOCPX (рис. 8Б).

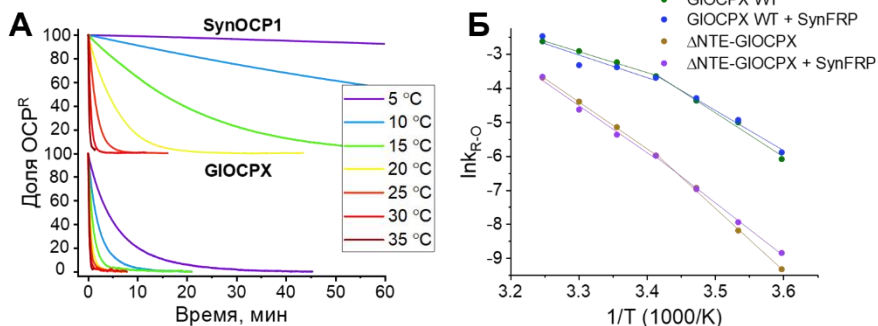


Рисунок 8. (А) Кинетики R-O конверсии SynOCP1 и GIOCPX при различных температурах. (Б) Графики Аррениуса для R-O конверсии GIOCPX WT и ΔNTE-GIOCPX до и после добавления SynFRP.

Мы выдвинули предположение, что NTE у GIOCPX может слишком сильно конкурировать с FRP за связывание, не давая ему возможности для посадки на С-домене. Мы получили вариант GIOCPX без этого структурного элемента ( $\Delta$ NTE-GIOCPX) и проверили влияние FRP на его R-O конверсию (рис. 8Б). Результаты эксперимента показали, что GIOCPX полностью невосприимчив к действию FRP, и в структуре белка GIOCPX присутствуют существенные отличия по сравнению с SynOCP1. При моделировании структуры GIOCPX нейросетью AlphaFold2 на поверхности С-домена и N-домена мы обнаружили несколько существенных отклонений от консенсусной последовательности OCP1. Среди них примечательна замена в GIOCPX F264S (нумерация SynOCP1) на поверхности С-домена в зоне потенциального контакта с FRP, обнаруженная недавно нашими коллегами (Steube et al., 2023), а также замены A26E, R27E, A133S, A137D (нумерация SynOCP1) на поверхности N-концевого домена.

Чтобы подтвердить или опровергнуть образование непродуктивного комплекса GIOCPX-FRP, мы исследовали взаимодействие FRP с  $\Delta$ NTE-GIOCPX методом гель-фильтрации, сравнивая с взаимодействием FRP с  $\Delta$ NTE-SynOCP1 (рис. 9А и 9Б). Как было показано выше,  $\Delta$ NTE-SynOCP1 взаимодействует с SynFRP с образованием комплекса с кажущейся массой 46 кДа (рис. 9А), тогда как  $\Delta$ NTE-GIOCPX не способен образовывать комплекс с FRP (рис. 9Б). На поверхности N-домена GIOCPX обнаруженные нами аминокислотные замены приводят к образованию отрицательно заряженной зоны и, соответственно, к отталкиванию отрицательно заряженного стержня FRP (рис. 9В и 9Г).

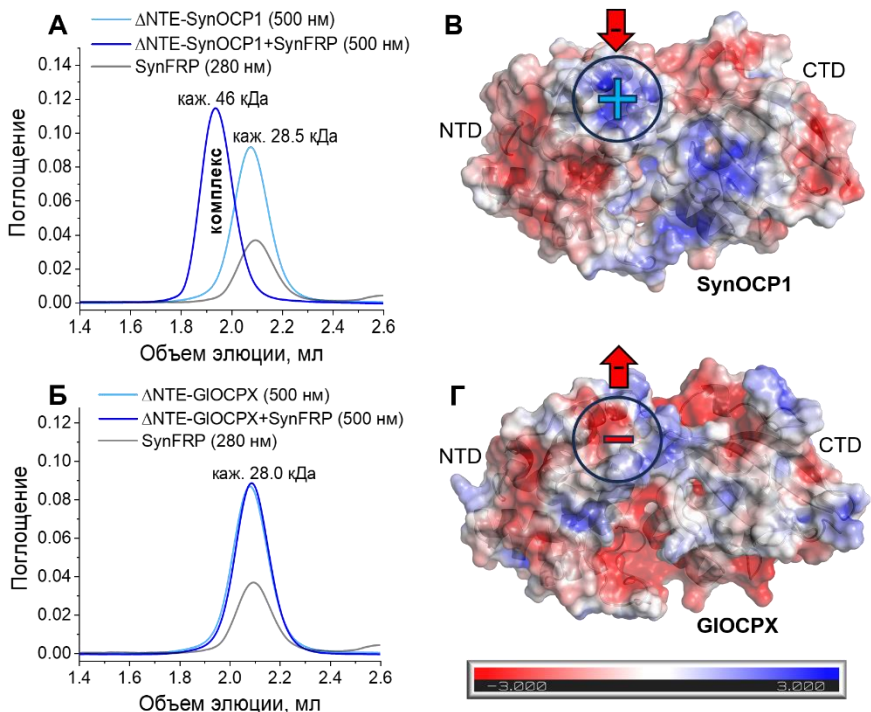


Рисунок 9. Взаимодействие SynFRP с  $\Delta$ NTE-SynOCP1 (А) и  $\Delta$ NTE-GIOCPX (Б) (по 20 мкМ каждого), проанализированное с помощью гель-фильтрации с использованием колонки Superdex 200 Increase 5/150. На рисунке выделена зона контакта отрицательно заряженного стержня FRP с SynOCP1 (PDB ID: 4XB5) (В) и GIOCPX (модель AlphaFold2) (Г). Структуры белков окрашены в соответствии с величиной электростатического потенциала от красного (-3 кТ/е) до синего (+3 кТ/е). Красной стрелкой обозначено притяжение отрицательно заряженного стержня FRP к N-домену SynOCP1 и, соответственно, отталкивание от N-домена GIOCPX.

Существенные функциональные отличия и отсутствие взаимодействия с SynFRP мотивировали нас исследовать структуру GIOCPX. После введения точечной замены E25A и кристаллизационного скрининга нам удалось получить дифрагирующие кристаллы и расшифровать структуру GIOCPX (рис. 10). Любопытно отметить, что отличия в деталях структуры GIOCPX при сравнении с SynOCP1 хорошо объясняют функциональные отличия белка (быструю R-O конверсию). Так, линкер GIOCPX в отличие от SynOCP1 содержит множество остатков пролина, находится в бороздке между доменами OCP (рис. 10) и образует с ними многочисленные контакты (данные не приведены), что стабилизирует всю структуру двухдоменного белка, снижая подвижность доменов относительно друг друга. Эти отличия соответствуют меньшей зависимости скорости R-O конверсии GIOCPX от температуры по сравнению с SynOCP1.

Стоит отметить отличия GIOCPX от SynOCP1 на поверхности С- и N-доменов. На С-домене NTE и CTT образуют сеть взаимодействий, которые могут препятствовать посадке FRP при фотоактивации OCP.

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 самого GIOCPX приводят к ускорению его R-O конверсии.

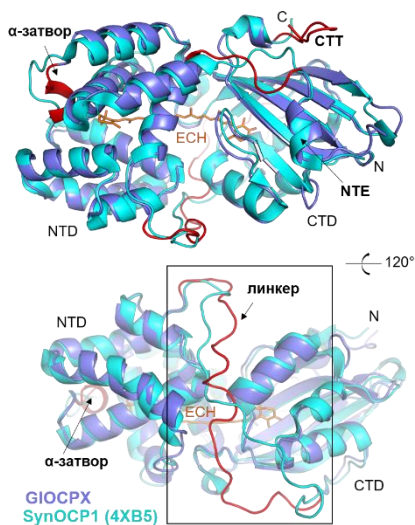


Рисунок 10. Сравнение структуры GIOCPX и SynOCP1. Две различные ориентации структуры GIOCPX (PDB: 8A0H, выделена фиолетовым), наложенной на структуру SynOCP1 (PDB: 4XB5, выделена бирюзовым). Отличительные особенности структуры GIOCPX выделены красным.

## 5. Характеристика гомологов FRP из протеобактерий

Отсутствие гена и действия FRP в древних цианобактериях наводило на предположение о заимствовании гена FRP путем горизонтального переноса генов. 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). При анализе геномов организмов, где встречаются такие последовательности, мы не смогли отыскать генов OCP, что указывает на принципиально другую функцию этих гомологов FRP. Тем не менее, такие гомологи могли бы быть потенциально активны по отношению к OCP и могли бы быть полезны при сравнительном анализе с цианобактериальными FRP. Поэтому мы решили получить пару представителей данных белков и проверить их активность по ускорению R-O конверсии модельного OCP1. Полученные нами рекомбинантные белки из *Thauera phenylacetica* (ThauFRPH) и *Mesorhizobium ciceri* (MesoFRPH) были представлены преимущественно димерами (кажущиеся массы пиков 27 и 23 кДа соответственно), как и цианобактериальные FRP, однако для MesoFRPH мы обнаружили также и тетрамеры с кажущейся массой 49 кДа (рис. 11А). Добавление FRPH не приводило к ускорению R-O конверсии SynOCP1 (рис. 11Б), но потенциально FRPH могли образовывать непродуктивные комплексы с SynOCP<sup>Δ2-20</sup>. Мы проверили, взаимодействуют ли FRPH с SynOCP<sup>Δ2-20</sup> методом гель-фильтрации (рис. 11В и 11Г). Профили гель-фильтрации свидетельствовали об отсутствии взаимодействия между белками. Таким образом, мы показали, что ThauFRPH и MesoFRPH действительно не способны регулировать активность 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. Поиск такой группы и реконструкция эволюции FRP - это предмет дальнейших перспективных исследований, стоящих за рамками данной работы. Наши данные указывают на то, что у гомологов белка FRP вне цианобактерий существуют функции, никак не связанные с регуляцией OCP и фотозащиты, что также является предметом будущих интересных исследований.

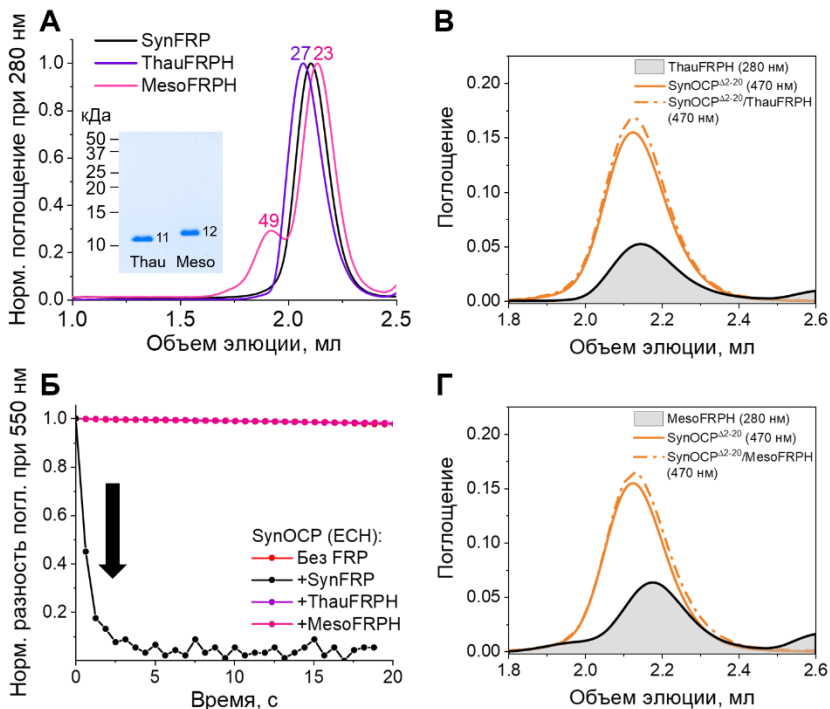


Рисунок 11. Характеристика гомологов белка FRP из протеобактерий. (А) Определение олигомерного состояния гомологов FRP из протеобактерий *Thauera* и *Mesorhizobium* методом гель-фильтрации. Массы указаны в кДа. (Б) Активность FRP гомологов по ускорению R-O конверсии SynOCP<sup>WT</sup> при молярном соотношении FRP/OCP равном 2:1 и температуре +15 °C. Взаимодействие ThauFRPH (Б) и MesoFRPH (В) с SynOCP<sup>Δ2-20</sup>, исследованное методом гель-фильтрации.

## Выводы

1. Основной участок взаимодействия белков OCP и FRP расположен на C-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 C-доменом OCP, а стержневой субдомен FRP за счет электростатического соответствия с поверхностью доменов OCP облегчает их воссоединение, ускоряя переход OCP в темную 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 C-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 международных рецензируемых журналах

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. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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 // *BBA - Bioenerg.* — 2017. — Vol. 1858. № 1. P. 1–11.
6. 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.
7. 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.
8. 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.