Успехи биологической химии, т. 57, 2017, с. 71-118

ОСОБЕННОСТИ БЕЛОК–БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МЕХАНИЗМЕ ФОТОЗАЩИТЫ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Н. Н. СЛУЧАНКО^{1,2}*,

©2017 г.

Ю.Б. СЛОНИМСКИЙ^{1,3}, Е.Г. МАКСИМОВ²

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва; ²Кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва;

³Кафедра биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

I. Введение. II. Строение светособирающих антенных комплексов цианобактерий. III. Обнаружение механизма тушения флуоресценции фикобилисом. IV. Участники нефотохимического тушения у цианобактерий. V. Ключевые белок-белковые взаимодействия. VI. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтезу принадлежит центральная роль в энергетике живых систем, поскольку именно этот процесс служит первичным источ-

Работа выполнена при поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 15-34-70007 «мол_а_мос» и гранта РФФИ № 15-04-01930а.

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; АФЦ – аллофикоцианин (АРС); РЦ – реакционный центр (фотосистемы); ТЭ – терминальный эмиттер; ФБС – фикобилисома; ФС1 и 2 – фотосистема 1 и 2; ФЦ – фикоцианин; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; АрсС (или L) – линкерный полипептид ядра ФБС с массой 7,8 кДа; Арс D, E, F – аллофикоцианин-подобные белки с максимумом флуоресценции около 680 нм; АРС660 – АФЦ с максимумом флуоресценции 660 нм; Аро-ОСР – апоформа ОСР; FRP – белок восстановления флуоресценции (fluorescence recovery protein); HCP – представитель группы спиральных каротиноид-связывающих белков (helical carotenoid proteins), гомологов N домена ОСР; L_{CM} – линкерный полипептид ФБС, обусловливающий связь ядра ФБС с мембраной (core-membrane linker polypeptide); NTE – N-концевой сегмент ОСР; NTF2 – ядерный транспортный фактор 2 (nuclear transport factor 2); OCP – оранжевый каротиноид-связывающий белок (orange carotenoid protein); ОСР^о – оранжевая форма ОСР; ОСР^R – красная форма ОСР; ОСР-W288A – ОСР с аминокислотной заменой W288A, аналог активированной формы ОСР; RCPкрасный каротиноид-связывающий белок (red carotenoid protein), N-концевой фрагмент ОСР.

^{*}Адрес для корреспонденции: nikolai.sluchanko@mail.ru

Н.Н.Случанко и соавт.

ником всей энергии, используемой живыми организмами в процессе жизнедеятельности. Процесс фотосинтеза представляет собой сложную совокупность реакций, происходящих за времена от 10^{-15} секунд (поглощение света) до 10^4 секунд (образование продуктов фотосинтеза). Понятие «первичные процессы фотосинтеза» включает фотофизические и фотохимические стадии фотосинтеза – процессы поглощения света, миграции энергии, разделения зарядов и формирование электрохимического потенциала в реакционных центрах фотосистем. Работы последних десятилетий показали очень высокую эффективность первичных процессов фотосинтеза благодаря специфике их структурной организации [1–9].

В светособирающем, или антенном, комплексе пигменты занимают строго определенные положения и ориентированы друг относительно друга. Кроме того, благодаря взаимодействию пигментов с различными аминокислотными группами белков, в антенном комплексе присутствует большой набор различных спектральных форм, поэтому пигменты образуют широкий общий спектр поглощения [10]. В результате сильного перекрывания спектров поглощения отдельных пигментов после возбуждения в антенне быстро устанавливается энергетическое равновесие, как между пигментами внутри антенны (в течение долей пикосекунд), так и между антенной и реакционным центром. При участии пигментов с различными спектральными характеристиками энергия направленно мигрирует к наиболее длинноволновым пигментам реакционного центра, где происходит захват энергии возбуждения и преобразование её в форму энергии разделенных зарядов [6].

Возбужденные состояния молекул являются реакционно активными, и многие пигменты за время жизни возбужденного состояния способны взаимодействовать с молекулярным кислородом, что приводит к образованию его активных форм (АФК) [10]. Свойства АФК, их роль в окислительных реакциях хорошо известны. Образование АФК неизбежно сопровождает фотосинтез и дыхание, однако, наряду с регуляторными функциями. АФК могут представлять собой и угрозу для живой клетки. Для нейтрализации образующихся АФК существует ряд ферментных систем (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза и т.д.), которые способны эффективно инактивировать образующиеся свободные радикалы [11]. Фотосинтетические антенные комплексы находятся в особой группе риска, поскольку через них проходит огромный поток энергии, запасаемой в виде энергии химических связей. Более того, скорость окисления пула акцепторов электронов ЭТЦ значительно уступает скорости их восстановления [12]. Поэтому при высокой интенсивности светового потока фотосинте-

зирующие клетки неизбежно оказываются в ситуации, в которой светособирающие антенные комплексы оказываются им временно не нужны. В этом случае антенные комплексы представляют угрозу для фотосинтетического аппарата и метаболизма клетки, поскольку замена поврежденных пигмент-белковых комплексов требует значительных энергетических и временных затрат. Наряду с пространственным удалением антенны от реакционного центра (так называемые state transitions) [13–15], могут реализовываться принципиально другие регуляторные фотозащитные механизмы. Последние позволяют временно снизить поток энергии от антенных комплексов к реакционным центрам (РЦ) фотосистем.

Общим принципом функционирования фотозащитных механизмов у высших растений и цианобактерий является введение в структуру антенного комплекса особой молекулы, способной в определенном (узком) месте перехватывать на себя поток энергии возбуждения за счет так называемого *нефотохимического тушения¹*. Данный процесс снижает вероятность образования АФК, и в этом заключается принципиальное отличие фотозащитных механизмов от других антиоксидантных систем, направленных на борьбу с уже образовавшимися АФК.

Несмотря на то, что цианобактерии являются излюбленным и относительно просто устроенным объектом для исследований процессов фотосинтеза, механизм их фотозащиты, основанный во многом на белок-белковых взаимодействиях, был открыт менее 15 лет назад и до сих пор таит множество загадок. Стоит, однако, отметить, что эта область исследований исключительно быстро развивается, поэтому вполне резонно ожидать новых открытий и уточнений в самом ближайшем будущем.

В данном обзоре будут рассмотрены современные представления о структурной и функциональной организации пигмент-белковых и белок-белковых комплексов, участвующих в регуляции нефотохимического тушения антенных комплексов цианобактерий – фикобилисом. Как и у высших растений и зеленых водорослей, у цианобактерий роль функциональной молекулы – тушителя энергии возбуждения выполняют каротиноиды, однако особенности строения

¹Данный термин может применяться для описания любых процессов диссипации энергии, противоположных фотохимическому, т.е. приводящему к запасанию энергии возбуждения в виде разделенных зарядов или восстановленных эквивалентов. Тем не менее, в среде физиологов растений нефотохимическое тушение часто и незаслуженно отождествляется лишь с тушением флуоресценции хлорофилла каротиноидами ксантофилового цикла вследствие тепловой диссипации энергии.

Н.Н.Случанко и соавт.

водорастворимых антенных комплексов цианобактерий привели к созданию водорастворимой белковой системы, обеспечивающей работу фотозащитного механизма.

II. СТРОЕНИЕ СВЕТОСОБИРАЮЩИХ АНТЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Фотосинтетический аппарат цианобактерий, как и многих других фотосинтетиков, представлен двумя взаимодействующими между собой фотосистемами (ФС1 и ФС2). Светосбор осуществляется коровыми (прим. - от англ. core) антеннами реакционных центров (РЦ), содержащими хлорофилл [16]. У цианобактерий дополнительными светосборщиками являются фикобилисомы (ФБС) – мультибелковые комплексы, расположенные на поверхности тилакоидной мембраны и примыкающие к ФС1 и ФС2 [17–19]. ФБС состоят из содержащих хромофоры фикобилипротеинов и неокрашенных линкерных полипептидов [20-22]. Молекулы фикобилипротеинов обычно содержат два вида субъединиц (α и β), каждая из которых ковалентно связана с фикобилиновым хромофором, представляющим собой линейный тетрапиррол [20]. Для цианобактерии Synechocystis sp. штамм PCC6803 (далее Synechocystis 6803) характерны ФБС полудисковидной формы, основными фикобилипротеиновыми компонентами которой служат С-фикоцианин и аллофикоцианин [17-20, 23]. Ядро ФБС, примыкающее к стромальной поверхности тилакоидной мембраны, расположено в центре полудиска и представлено в виде трех цилиндров, состоящих из состыкованных друг с другом тримеров аллофикоцианина (рис. 1). Связь ФБС с фотосинтетической мембраной обеспечивается линкерным полипептидом L_{CM}(CM обозначает «core-membrane junction»), который состоит из нескольких доменов и участвует также в сборке ядра ФБС [21, 24]. От ядра в радиальном направлении отходят шесть боковых цилиндров (стержней), каждый из которых состоит из стопки гексамеров фикоцианина (рис. 1А). Энергия света, поглощенного фикобилинами, передается на хлорофилл РЦ ФС1 и ФС2, что позволяет увеличить эффективность фотосинтеза за счет использования света в спектральной области, где поглощение хлорофилла неэффективно [16, 18, 19, 25, 26].

Как было написано ранее, молекулы фикобилипротеинов состоят из α и β субъединиц в соотношении 1 : 1 с молекулярными массами около 16 и 18 кДа, соответственно [27–29]. Фикобилипротеины относят к кислым белкам с изоэлектрической точкой в области 4,25–4,85 ед. pH. Между двумя субъединицами отсутствуют дисульфидные связи,

присутствующие в α и β субъединицах остатки цистеинов участвуют в ковалентном связывании хромофорных групп – фикобилинов с помощью тиоэфирных связей [30, 31]. Обязательными в связывании хромофоров с апопротеином являются остатки Суѕа-84 и Суѕβ-84 [22]. Дополнительные хромофорные группы могут быть присоединены к α или β субъединице около 50-го и 150-го аминокислотных остатков. Число хромофоров в ($\alpha\beta$)₁-мономере соответствует разделению фикобилипротеинов на классы, так, например, ($\alpha\beta$)₁-мономер аллофикоцианина содержит два хромофора. Фикобилины относятся к незамкнутым, или линейным тетрапирролам, в основе химического строения которых лежат четыре пиррольных кольца, соединенных тремя моноуглеродными мостиками (рис. 1А).

Для фикобилипротеинов характерна выраженная способность к самоассоциации [32]. В неденатурирующих условиях в растворах не удается получить отделенные друг от друга α и β субъединицы фикобилипротеинов, образующих даже в крайне низкой концентрации (~10⁻⁷ M) ($\alpha\beta$)-гетеродимеры, которые принято (хотя и менее корректно) называть ($\alpha\beta$)₁-мономерами. Поверхность ($\alpha\beta$)₁-мономеров гидрофобна, что обеспечивает их стабильность только при низкой ионной силе [33]. Самопроизвольная олигомеризация сильно зависит от концентрации белка, и уже при 10⁻⁶ M в растворах преобладают ($\alpha\beta$)₂-тримеры и ($\alpha\beta$)₆-гексамеры фикобилипротеинов.

Согласно рентгеноструктурным данным, α - и β -полипептидные субъединицы содержат по две шпильки и восемь α -спиральных участков, за счет шести из которых формируется общая глобиновая структура этих белков [17, 27, 34]. Хромофорные группы располагаются в промежутках (карманах) между α -спиралями. Оставшиеся две α -спирали и две шпильки каждой субъединицы образуют взаимодействующие домены, за счет которых происходит образование ($\alpha\beta$)₁-мономеров. В свою очередь, мономеры, которые имеют пространственную форму дуг, образуют гидрофобный контакт между α -субъединицей одного мономера и β -полипептидом следующего, замыкаясь в кольцеобразный тример. Все тримеры, независимо от типа фикобилипротеинов, имеют форму плоских дисков диаметром 11,5 и толщиной 3 нм с отверстием треугольной формы, находящимся в центре диска и также равным 3 нм [31, 35] (см. рис 1).

Особое место среди фикобилипротеинов занимают аллофикоцианины (АФЦ), поскольку их структура и фотофизические свойства обеспечивают эффективный захват энергии возбуждения от коротковолновых форм фикобилипротеинов – фикоцианина (ФЦ) и фикоэритрина и передачу энергии возбуждения так называемым терми-

Н.Н.Случанко и соавт.



Рис. 1. А – Схематичное представление участка фотосинтетической мембраны цианобактерий, содержащего димер фотосистемы 2 (ФС2, оттенки зеленого цвета) с контактирующей фикобилисомой (стержни из фикоцианина показаны серым, компоненты цилиндров ядра – синим и пурпурным цветом). Вставки показывают строение одного из базальных цилиндров ядра и связанных хромофоров. Справа от схемы приведен «срез» ФБС на уровне расположения терминальных эмиттеров (ТЭ), хлорофиллы ФС2 показаны зеленым цветом, ОСР – желтым и оранжевым, L_{СМ} – фиолетовым. Модель носит иллюстративный характер и построена на основе кристаллографических структур ОСР, АФЦ и ФС2 (PDB 1M98, 1ALL и 3KZI, соответственно).

Б – характерный для экспериментов *in vivo* (для мутантов, лишенных ФС1 и 2) и *in vitro* вид кинетик затухания флуоресценции ФБС до и после активации ОСР-зависимого нефотохимического тушения. Указаны времена жизни флуоресценции основных компонент кинетики.

В – локализация энергии возбуждения в системе ФБС–РЦ–ОСР согласно модели «энергетической воронки». 1. Изолированные фикобилипротеины характеризуются временами жизни возбужденного состояния порядка 1,6 нс. 2–3. В комплексе из нескольких спектральных форм фикобилипротеинов наблюдается перенос энергии возбуждения от коротковолновых форм к длинноволновым. Малый энергетический зазор между электронными уровнями АФЦ и ТЭ приво-

Окончание подписи к рис. 1 см. на сл. стр.

Окончание подписи к рис. 1

дит к тому, что при физиологических температурах происходит обратный (uphill) перенос энергии. В ядре ФБС количество ТЭ на порядок меньше, чем АФЦ. При высоких температурах, именно АФЦ вносит основной вклад во флуоресценцию ФБС, в то время как при низких температурах флуоресцируют ТЭ. 4. Когда ФБС связана с ФС, осуществляющей разделение зарядов (фотохимическое тушение), энергия электронного возбуждения ФБС эффективно передается на хлорофиллы фотосистем. При увеличении интенсивности светового потока происходит быстрое восстановление акцепторов электрона доступных РЦ фотосистем и, соответственно, снижение эффективности фотохимического тушения. Одновременно происходит активация ОСР и его связывание с сайтом в ядре ФБС (5), в результате чего появляется дополнительный канал дезактивации возбуждения.

нальным эмиттерам (ТЭ) и хлорофиллам реакционных центров (см. рис. 1). В ряде работ авторы отмечают сложную структуру спектров поглощения тримеров АФЦ [28, 36], а также зависимость формы спектров от температуры [33]. Основной максимум в спектре поглощения (650 нм) связывают с образованием тримеров и взаимодействием хромофоров, находящихся в соседних ($\alpha\beta$)₁-мономерах. При повышении температуры до 45 °C взаимодействие между хромофорами нарушается, при этом в спектрах поглощения увеличивается вклад компоненты с максимумом 610 нм, что соответствует поглощению мономеров. АФЦ, как и другие фикобилипротеины, относится к классу водорастворимых белков, и важнейшим фактором, влияющим на свойства АФЦ, являются сложные взаимодействия в системе хромофор–белок–вода. Изменение температуры является важнейшим фактором, влияющим на энергию взаимодействия в таких системах [37–39].

Особенности структурной организации ФБС и фикобилипротеинов необходимо учитывать при проведении экспериментов. Например, при низких температурах образование кристаллов льда внутри полости тримера может приводить к нарушению его структуры, сопоставимому с мономеризацией, что сопровождается снижением квантового выхода флуоресценции и искажениями спектра, не связанными с изменением эффективности миграции энергии или другими физиологически значимыми процессами [37–39]. Поэтому для правильной интерпретации и анализа низкотемпературных спектров флуоресценции ФБС *in vitro* или в клетках цианобактерий необходима правильная постановка эксперимента: оптимизация скорости замораживания, добавление криопротектора, использование время-разрешенных методов для оценки времен жизни и адекватная нормировка интенсивности сигнала флуоресценции. Следует отметить, что комплексы ФБС *in vitro* могут распадаться на отдельные

H.F	Ŧ.	Случанко	и	соавт.
-----	----	----------	---	--------

структурные элементы (стержни и ядра – см. рис. 1А), например, при использовании глицерина в качестве криопротектора [40]. Нарушение целостности ФБС приводит к росту квантового выхода ФЦ, и, соответственно, снижению контраста изменений интенсивности флуоресценции при изучении нефотохимического тушения. Именно поэтому в некоторых работах исследователи используют ядра ФБС как упрощенный и более стабильный модельный объект.

III. ОБНАРУЖЕНИЕ МЕХАНИЗМА ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИКОБИЛИСОМ

Полностью секвенированный геном и способность к фотогетеротрофному росту сделали одноклеточную цианобактерию Synechocystis 6803 удобным объектом для исследования белок-белковых взаимодействий и, в частности, регуляции процессов светосбора и тепловой диссипации энергии в пигмент-белковых комплексах ФБС [32]. Поскольку in vitro эксперименты с ФБС связаны с рядом методических ограничений (см. ниже), получение мутантов Synechocystis 6803, лишенных одного или нескольких компонентов фотосинтетического аппарата, позволило исследовать многие функции и особенности ФБС *in vivo*. Например, интересные данные были получены с помощью мутантов СК и PAL [25]. В ФБС мутанта СК, в результате делеции четырех генов, отсутствуют α- и β-субъединицы фикоцианина и два линкерных полипептида. У мутанта РАL в результате введения дополнительных делеций в гены, кодирующие субъединицы АФЦ, полностью утрачена фикобилипротеиновая антенна, что подтверждено данными иммунологического анализа и флуоресцентной спектроскопии [41]. Сравнение скорости восстановления первичного хинонного акцептора электрона в ФС2 позволило установить, что ядро ФБС увеличивает эффективное сечение поглощения ФС2 в 2,5 раза, а наличие в ФБС дополнительных цилиндров из ФЦ (стержней) увеличивает эффективность светосбора ФС2 на порядок [16, 19, 25, 34].

Идея о том, что цианобактерии так же, как и хлоропласты высших растений, способны к тепловой диссипации поглощенной энергии света, существовала давно. В частности, при изучении адаптации цианобактерий к желтому свету в 1986 году было показано, что в таких условиях наблюдается диссипация около 35 % энергии, поглощенной ФБС [42]. Однако конкретный механизм и спектр активации этого процесса были выявлены лишь спустя 15 лет.

При изучении изменения состояния ЭТЦ (state transitions) и влияния на него текучести мембран был вновь обнаружен процесс

безызлучательной (тепловой) диссипации энергии. При воздействии интенсивным синим светом исследователи наблюдали обратимый, независимый от температуры, ингибиторов белкового синтеза и блокаторов восстановления убихинона процесс тепловой диссипации энергии [43]. Следовательно, этот процесс не был обусловлен повреждением компонентов ФС2 (процесс обратим даже в присутствии ингибиторов трансляции) или изменением состояния ЭТЦ (окисление пула убихинолов не влияло на процесс). Однако природа и механизм этого процесса оставались совершенно непонятными.

Следует отметить, что сильное перекрывание спектров флуоресценции хлорофилла фотосистем и ФБС (при комнатной температуре), а также наличие переходных процессов, связанных с изменением квантового выхода флуоресценции хлорофилла ФС2, затрудняют оценку влияния различных экспериментальных факторов на флуоресценцию ФБС [25]. Поэтому важным этапом для изучения процессов регуляции тепловой диссипации энергии в ФБС стало создание мутантов, лишенных фотосистем. Использование мутанта Synechocystis, лишенного ФС2, позволило М.Г. Рахимбердиевой с соавт. в лаборатории Н.В. Карапетяна в институте биохимии им. А.Н. Баха провести детальный анализ спектра действия (активации) тепловой диссипации энергии [44, 45]. Было впервые показано, что интенсивный сине-зеленый свет вызывает обратимое 40 % тушение флуоресценции ФБС, а форма спектра действия соответствует характерным S0-S2 переходам в спектре поглощения каротиноидов. Полученные данные свидетельствовали о существовании некой неизвестной формы каротиноида, (регулируемо) взаимодействующей с водорастворимыми ФБС, и, соответственно, эта форма также должна была быть водорастворимой, что, однако, не соответствовало физико-химическим свойствам каротиноидов.

Несмотря на то, что водорастворимый белок, содержащий каротиноид с неизвестной физиологической активностью, был открыт и охарактеризован задолго до экспериментов Рахимбердиевой с соавт., потребовалось еще несколько лет для выявления функции оранжевого каротиноид-связывающего белка (ОСР – от англ. Orange Carotenoid Protein). Этот шаг был сделан в работе группы Дианы Кириловски с соавт. [46], которая показала, что инактивация гена *slr1963*, кодирующего белок ОСР в *Synechocystis 6803*, приводит к полному исчезновению тушения флуоресценции ФБС в клетках цианобактерий на интенсивном сине-зеленом свету. Результаты этих экспериментов, безусловно, явились прорывом в понимании регуляции фотозащитных механизмов в клетках цианобактерий.

H.H.C	Случанко	и	соавт.
-------	----------	---	--------

В дальнейших работах группы Д. Кириловски наличие или отсутствие тушения флуоресценции ФБС *in vivo* стало ключевым критерием оценки эффективности белок-белкового взаимодействия между ОСР и участком ФБС [47–49]. Однако отсутствие понимания механизма действия ОСР в итоге привело к тому, что результаты этих экспериментов в данный момент требуют серьезного переосмысления (см. следующие разделы обзора).

Еще в ранних работах отмечалось, что адаптация клеток цианобактерий к сине-зеленому свету высокой интенсивности приводит не только к снижению интенсивности флуоресценции ФБС, но также и изменению формы спектра флуоресценции. После активации механизма диссипации энергии интенсивность флуоресценции в области 660–680 нм становится значительно ниже, что было интерпретировано как взаимодействие тушителя с неким сайтом, находящимся именно *в ядре* ФБС [50]. Эту идею (точнее, невозможность и неэффективность взаимодействия ОСР с фикоцианиновыми стержнями) поддержали все группы исследователей, что позволило сузить область поиска сайта белок-белкового взаимодействия ОСР и ФБС до ядра ФБС, состоящего из АФЦ и терминальных эмиттеров.

Снижение интенсивности флуоресценции ФЦ связано с высокоэффективным переносом энергии возбуждения от коротковолновых форм белков (ФЦ) к длинноволновым (ТЭ). Для изучения этих процессов были проведены исследования с помощью спектрофлуориметрии высокого временного разрешения и теоретические расчёты [51–56]. Было установлено, что активация ОСР-зависимого тушения в отсутствие фотосистем *in vivo*, а также в экспериментах *in vitro*, приводит к синхронному и сопоставимому по уровню снижению интенсивности флуоресценции ФБС и сокращению ее длительности на ~90 %. Это свидетельствует о том, что ОСР-зависимое тушение флуоресценции обусловлено захватом энергии возбуждения ФБС молекулой тушителя (каротиноидом). Время жизни возбужденного состояния каротиноида (S2) в органических средах или в составе ОСР не превышает 10 пс [52, 57–59], что на 2 порядка меньше характерного времени жизни возбужденного состояния фикобилипротеинов (~1,6 нс). Таким образом, перенос энергии возбуждения с хромофоров ФБС на ОСР приводит к исчезновению возбужденного состояния за счет тепловой диссипации, а скорость переноса энергии определяет эффективность тушения флуоресценции. Важно отметить, что, согласно данным [57, 59], и исходная, и фотоактивированная формы ОСР обладают практически одинаковыми временами жизни возбужденного состояния, следовательно, даже физиологически неактивная ОСРо потенциально

является прекрасным тушителем возбуждения. Это подчеркивает роль белок-белковых взаимодействий между ОСР и ФБС как необходимого условия для активации фотозащитных механизмов, при этом триггером этих взаимодействий, в свою очередь, является изменение белок-хромофорных взаимодействий в молекуле ОСР (см. ниже).

В работе [54] было показано, что переход между состояниями (потушенные и непотушенные ФБС) характеризуется плавным изменением длительностей и вкладов компонент кинетики затухания флуоресценции ФБС. Это говорит о постепенном изменении *расстояния* между донором и акцептором энергии возбуждения, а не об изменении доли потушенных ФБС за счет мгновенного образования/диссоциации комплекса ОСР–ФБС. Данный факт был интерпретирован как проявление межмолекулярного взаимодействия между ОСР и сайтом его связывания на фикобилисоме, что стимулировало дальнейшее исследование конформационных изменений ОСР при его фотоактивации *in vitro*.

Как отмечалось выше, энергетическое взаимодействие ОСР и ФБС можно рассматривать в рамках теории Фёрстера. Однако расчет расстояния между донором и акцептором энергии, основанный на изменениях квантового выхода донора, является нетривиальной задачей, поскольку переход S0-S1 запрещен по правилам симметрии, поэтому о положении S1 невозможно судить по спектрам поглощения ОСР. Исследования ОСР с помощью фемтосекундной абсорбционной спектроскопии позволили обнаружить уровень S1 в районе 714 нм (1,74 эВ) [60]. В то же время, уровень S1 терминальных эмиттеров соответствует энергии ~1,81 эВ (685 нм), что значительно ниже уровня S2 каротиноида в ОСР^R (510 нм, 2,43 эВ). Таким образом, спектр флуоресценции фикобилисомы намного лучше перекрывается с поглощением S0-S1, чем S0-S2 ОСР. Опираясь на экспериментальные данные об эффективности тушения флуоресценции ФБС при взаимодействии с ОСР [54, 56] и имеющиеся модели комплексов ОСР-ФБС [61-64], можно решить обратную задачу и оценить величину интеграла перекрывания спектра поглощения ОСР и флуоресценции ядра фикобилисомы. Расчеты показывают, что наблюдаемые в эксперименте эффективности миграции энергии не могут быть достигнуты, если осуществляется перенос исключительно на уровень S2 каротиноида. Это обусловлено малой величиной интеграла перекрывания спектра флуоресценции ядра ФБС и поглощения каротиноида S0–S2. Следствием этого является низкая скорость миграции энергии, которая не позволила бы ОСР конкурировать с реакционными центрами фотосистем за поток энергии. Поскольку

Н.Н.Случанко и сс	равт.
-------------------	-------

наблюдаемые в эксперименте скорости миграции энергии от ФБС к ОСР значительно выше, можно утверждать, что в энергетическое взаимодействие вовлечены и другие электронные уровни ОСР. Квантово-механические расчеты позволяют теоретически оценить вклад энергетического взаимодействия между возбужденным состоянием ФБС и электронными уровнями ОСР, а также рассчитать соответствующие константы скоростей миграции энергии [55], однако при построении модели необходимо опираться на данные, полученные из эксперимента.

При интерпретации кинетических данных следует учитывать сильное перекрывание спектров поглощения и флуоресценции АФЦ и терминальных эмиттеров, которое приводит к тому, что при комнатной температуре наблюдается обратный (uphill) перенос энергии возбуждения от терминальных эмиттеров к АФЦ [53, 54]. Следует отметить, что оценка влияния ОСР-зависимого тушения флуоресценции ФБС на процессы переноса энергии внутри ФБС с помощью спектрофлуориметрии с пикосекундным временным разрешением и последующим глобальным анализом данных мало информативна, поскольку сокращение времени жизни флуоресценции терминальных эмиттеров, рассматриваемых в роли акцепторов энергии возбуждения в модели, влияет на форму фронта нарастания флуоресценции и, соответственно, на кажущиеся константы скорости переноса энергии [56], что по сути делает сравнение некорректным. Вероятно, образование комплекса ОСР с ФБС не влияет на скорость миграции энергии между различными спектральными формами ФЦ, при плотностях потоков возбуждающего света, исключающих одновременное возбуждение нескольких пигментов. Наблюдаемые в нормальных условиях эффекты (снижение длительности флуоресценции всех форм) говорят об эффективной разгрузке возбужденного состояния хромофоров в ядре ФБС, расположенных наиболее близко к месту контакта ОСР и ФБС и каротиноиду, соответственно, сокращение длительности флуоресценции хромофоров вдали от ядра обусловлено снижением вероятности обратного переноса энергии и вклада флуоресценции длинноволновых форм.

К сожалению, сложность измерения и интерпретации данных о временах жизни флуоресценции (как и в случае с множеством других объектов) привели к тому, что данные о наличии или отсутствии тушения ФБС *in vivo* на ряде интересных мутантов ОСР были получены с помощью методов стационарной спектроскопии [47, 49, 65]. Поэтому вопрос о способности к тушению различных спектральных форм мутантов ОСР остается открытым. Однако достоверным, судя по

всему, является утверждение, что сайт взаимодействия ОСР с ФБС находится в N домене ОСР, поскольку в отсутствие С домена N-концевой фрагмент ОСР, получивший название RCP (от англ. Red Carotenoid Protein) [66], способен эффективно тушить флуоресценцию ФБС [67]. Таким образом, считается, что после активации ОСР взаимодействует с ядром ФБС [68] при помощи N домена [67, 69] (см. ниже). Это согласуется также с данными о том, что аминокислотный остаток N домена R155, образующий солевой мостик с E244 C домена, необходим для взаимодействия с ФБС. Замена R155L или R155E препятствовала тушению флуоресценции ФБС при фотоактивации ОСР, тогда как замена E244L не приводила к таким последствиям [69]. Любопытно, что близкая замена R155K не препятствовала тушению флуоресценции ФБС, но существенно дестабилизировала взаимодействие ОСР^к с ФБС, приводя к быстрому восстановлению флуоресценции ФБ после прекращения фотоактивации [69]. В то же время, стоит отметить, что остаток R155 не является консервативным у ОСР и может заменяться, например, на остаток глутамина, что может объяснить менее стабильную связь между доменами у таких вариантов ОСР и большую скорость их фотоактивации [70].

Несмотря на высокую значимость описанных открытий, многие аспекты механизма тушения флуоресценции ФБС под действием ОСР являются непонятными до сих пор и требуют дальнейших исследований как на уровне всей системы в целом, так и на уровне отдельных ее участников.

IV. УЧАСТНИКИ НЕФОТОХИМИЧЕСКОГО ТУШЕНИЯ У ЦИАНОБАКТЕРИЙ

ОСР – СЕНСОР И ЭФФЕКТОР НЕФОТОХИМИЧЕСКОГО ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИКОБИЛИСОМ

Если сам факт участия ОСР в фотозащите ФБС на данный момент неопровержимо доказан и ни у кого не вызывает сомнений, то конкретный механизм фотоактивации ОСР и его белок-белковых взаимодействий с ФБС до сих пор является объектом научных дискуссий. Поразительно, но тот факт, что ОСР является фотоактивным белком и под действием света может переходить из оранжевой (ОСР^о) в красную форму (ОСР^R), был обнаружен лишь после установления его структуры, функции и многих физико-химических свойств [47, 71] – спустя 27 лет после его открытия и описания в 1981 году [66]. Хотя о существовании различных спектральных форм ОСР стало известно при первом же его выделении из клеток, по неизвестным

Н.Н.Случанко и соавт.

причинам, влияние света на спектральные характеристики ОСР не проверялось вплоть до 2008 года.

Безусловно, установление атомарной структуры ОСР методом рентгеноструктурного анализа [72, 73] стало важнейшим событием в истории изучения фотозащитных механизмов. Оказалось, что ОСР представляет собой водорастворимый двухдоменный белок (35 кДа), во внутренней полости которого расположена молекула асимметричного кето-каротиноида (3-гидроксиэхиненона). Структура N домена этого белка уникальна для ОСР, тогда как С домен относится к суперсемейству так называемых NTF2-подобных белков (от англ. nuclear transport factor 2). Два домена соединены протяженным линкером, образуют обширный междоменный интерфейс и дополнительно стабилизированы взаимодействием короткой N-концевой α-спирали (NTE) с С доменом (рис. 2).

Несмотря на обилие экспериментальных данных, полученных к настоящему времени, полная последовательность конформационных превращений при фотоактивации ОСР неизвестна. Обычно, рассуждая о физиологической роли ОСР, выделяют две стадии фотоцикла – (1) стабильная оранжевая форма, ОСРо, не вызывающая тушения ФБС, и (2) красная активированная (или сигнальная) форма, ОСР^R, взаимодействие с которой приводит к тушению флуоресценции ФБС [47, 74, 75]. Поскольку эти две формы отличаются по спектрам поглощения и визуально, по цвету образца (рис. 2), в научной литературе красный цвет препарата ОСР стал отождествляться с активным состоянием, и наоборот. Однако это допущение не всегда верно, поскольку цвет (поглощение) препарата ОСР зависит от длины сопряжения π-системы в полиеновой цепи каротиноида. Пространственное расположение сопряженных двойных связей определяют белок-хромофорные взаимодействия, а возможность взаимодействия с ФБС и тушения флуоресценции диктуют белокбелковые взаимодействия между ядром ФБС и ОСР. Иначе говоря, могут существовать красные формы ОСР, не вызывающие тушения флуоресценции ФБС (возможно, из-за нарушенного взаимодействия с ФБС), и оранжевые формы, способные к тушению [49, 65, 69]. Как отмечалось выше, спектральные характеристики каротиноида принципиально не влияют на длительность его пребывания в возбужденном состоянии и, соответственно, его способность к безызлучательной диссипации энергии возбуждения. Для индукции тушения флуоресценции ФБС необходимо сближение ОСР и сайта в ядре ФБС, т.е. образование комплекса, которое возможно благодаря специфическим белок-белковым взаимодействиям. Все существую-

Механизм фотозащиты цианобактерий



Рис. 2. Фотоциклические превращения ОСР.

Сверху слева направо – кристаллическая структура оранжевой формы ОСР (PDB 3MG1): N домен показан темно-серым, C домен – светло-серым, каротиноид показан оранжевым, NTE – красным, остаток W288 – фиолетовым цветом, остатки 155 и 244, образующие солевой мост – зеленым и синим цветом; фотография кювет с растворами ОСР до и после фотоактивации; спектры поглощения ОСР до и после фотоактивации, стрелкой показано направление изменений оптической плотности при 550 нм; кинетики изменения поглощения ОСР при адаптации к синему свету высокой интенсивности и после выключения света при различных температурах. В центре: схематичное представление четырех основных стадии фотоцикла ОСР (см. пояснение в тексте). Снизу приведена модель красной активной формы ОСР, полученная на основе структур RCP и ОСР (структуры 4XB4 и 3MG1, соответственно) и модели ОСР^R низкого разрешения, полученной на основе данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей [77].

щие модели комплекса ОСР–ФБС показывают, что минимальное расстояние между хромофорами не превышает 24 Å, что исключает возможность переноса энергии по механизму Декстера и делает малоэффективным захват возбуждения за счет диполь-дипольных взаимодействий [76].

В литературе известны мутанты ОСР, которые лишены способности к фотоконверсии, но, тем не менее, у ряда таких мутантов (Y44S, E34A, P126V/Y129F) наблюдается способность вызывать тушение флуоресценции ФБС [49, 65, 69]. С другой стороны, с помощью абсорбционной спектроскопии с наносекундным временным разрешением было показано, что красная форма образуется при возбуждении ОСР коротким (7 нс) лазерными импульсом в области S0-S2 за времена менее 100 нс [78], что на несколько порядков быстрее, чем возможные конформационные изменения в структуре белка [79-82]. Таким образом, данный интермедиат фотоцикла спектрально соответствует красной (и активной) форме ОСР, но по структуре белковой матрицы является аналогом оранжевой формы. Кинетика релаксации красной формы (в диапазоне времен от 100 мкс до 10 с) аппроксимируется суммой двух компонент с характерными временами ~200 мкс и ~3 с, с сопоставимыми активационными барьерами, что говорит о наличии двух спектрально идентичных красных форм ОСР, переход которых в оранжевую форму требует схожих изменений белок-хромофорных взаимодействий, но количество попыток, необходимых для осуществления перехода, отличается в ~10 000 раз [78]. Данная иерархия времен обусловлена двумя требованиями к фотоактивной конструкции: (1) необходимостью обеспечить стабильность неактивной формы ОСР, достаточную для того, чтобы белок не переходил в активную форму при нормальных (для фотосинтеза) уровнях инсоляции и (2) время жизни активной формы должно быть достаточным для того, чтобы найти и связаться с сайтом на ядре ФБС до того, как ОСР самопроизвольно перейдет в неактивную форму. По некоторым оценкам, квантовый выход образования активной формы не превышает ~0.2 % [51, 71, 78]. Очевидно, стабильность оранжевой формы и время жизни активной красной формы важны для поддержания правильного баланса между фотосинтетическими и фотозащитными процессами и, соответственно, энергетического состояния клетки. Именно этот баланс, по всей видимости, обеспечивает возможность цианобактерий адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды.

С помощью ряда методов было убедительно показано, что фотоактивация ОСР сопровождается декомпактизацией молекулы белка

[77, 83, 84] и перемещением молекулы каротиноида в N домен [85, 86] (рис. 2). Вероятно, именно такие структурные изменения необходимы для стабилизации активного сигнального состояния ОСР, в котором он способен связываться с ФБС и вызывать тушение флуоресценции. По имеющейся на данный момент информации из разных лабораторий, последовательность событий, приводящих к образованию активной формы ОСР, можно выстроить следующим образом.

При поглощении кванта света молекулой каротиноида происходит её переход в возбужденное состояние. Поглощённой энергии кванта достаточно для фотоизомеризации (поворот β-иононового кольца в С домене ОСР) и выпрямления полиеновой цели [71, 87, 88]. Оба эти события, в особенности, поворот кольцевой группы из положения цис в положение транс, приводят к увеличению длины сопряжения и изменению спектра поглощения каротиноида, т.е. к образованию спектрально красной формы. При повороте β-иононового кольца в С домене нарушаются водородные связи между кето-группой в кольце и остатками тирозина-201 и триптофана-288 [71, 88]. Данные остатки являются консервативными, а их замена на аланин приводит к потере фотоактивности ОСР, соответственно, наличие этих водородных связей является необходимым для стабилизации оранжевой формы ОСР [83, 84]. Нарушение водородных связей в С домене приводит к изменению гидрофобности локального окружения W288, который, находясь во внутренней полости С домена, фактически сопряжен с гидрофобными остатками, образующими интерфейс взаимодействия С домена с α-спиральным NTE, стабилизирующим взаимодействие N и С доменов, поэтому изменения в окружении W288, по всей видимости, передаются на внешнюю сторону С домена, где связан NTE [89, 90] (см. рис. 2 и следующие разделы). Это приводит к нарушению контакта NTE с C доменом и, вероятно, даже к (частичному) разворачиванию NTE [91, 92]. Сопоставление структур ОСР и RCP показывает, что основные различия в этих белках, соответствующих стабильной оранжевой форме и N домену красной активной формы ОСР, показывает, что наибольшие изменения структуры наблюдаются в области между NTE и близлежащими α-спиралями [77, 85, 88, 93]. Таким образом, нарушение структуры и подвижности не закрепленного на С домене сегмента NTE, вероятно, передает сигнал в N домен ОСР. Изменение расстояния между α-спиралями в N домене, вероятно, приводит к ослаблению стэкинг взаимодействий между консервативными остатками триптофана-101 и 41 и кольцом молекулы каротиноида. Если в оранжевой форме OCP W41 блокирует перемещение каротиноида, то в результате изменения конформации

Н.Н.Случанко и соавт.

N домена и поворота α-спирали, содержащей W41, образуется своего рода туннель, по которому каротиноид перемещается более чем на 10 Å вглубь N домена [85]. Вероятно, эти изменения дестабилизируют структуру белка, которая не может оставаться компактной за счет отсутствия ряда водородных связей в интерфейсе между доменами, и нарушение белок-хромофорных взаимодействий приводит к увеличению взаимной подвижности N и C доменов и их расхождению. Можно предположить, что такая форма OCP^R является физиологически активной, поскольку в этом состоянии поверхность N домена и находящийся в нем каротиноид наиболее доступны для взаимодействия с ФБС, а C домен доступен для взаимодействия с белком восстановления флуоресценции, или FRP (см. ниже).

Обратный переход из активной формы ОСР в неактивную оранжевую требует восстановления белок-хромофорных взаимодействий. Одновременные наблюдения за изменениями поглощения каротиноида и кинетики затухания флуоресценции триптофановых остатков ОСР показывают, что переход в неактивную форму также характеризуется асинхронностью изменений состояния каротиноида и белковой матрицы [78]. Первым событием на пути к темновой неактивной форме, вероятно, является восстановление стэкинг взаимодействий между β-кольцом молекулы каротиноида в N домене и остатками триптофана-41 и 101. Это событие сопровождается восстановлением статического тушения флуоресценции этих триптофановых остатков, что наблюдается экспериментально [78]. Затем происходит изменение поглощения каротиноида, которое требует образования водородных связей в С домене между каротиноидом и остатками триптофана-288 и тирозина-201. Однако процесс реассоциации N и C доменов не заканчивается на этом. Заключительные стадии перехода в неактивную форму, вероятно, связаны с компактизацией белка, и сопровождаются изменением эффективности переноса энергии возбуждения между W110, W277 и каротиноидом [78]. Обилие стадий, необходимых для восстановления неактивной формы ОСР, а также пространственная удаленность N и C доменов приводят к тому, что данный процесс идет крайне медленно, а его скорость сильно зависит от температуры. Именно фактор взаимного расположения доменов определяет вероятность перехода красной формы ОСР в оранжевую. Так, например, скорость перехода может быть увеличена на порядки при стабилизации структуры ОСР неспецифически – за счет высокой концентрации космотропных ионов и специфически – при воздействии белка FRP [78, 84, 90, 94-96].

Так или иначе, комплекс ОСР^R–ФБС в *in vitro* системе показал значительную устойчивость [68], и спонтанное восстановление флуоресценции ФБС в этих условиях происходит крайне медленно (~10⁴ с). Следует отметить, что безызлучательный перенос энергии на каротиноид ОСР является источником его возбуждения и, соответственно, стимулирует переход из оранжевой формы в активную красную [86]. Соответственно, перенос энергии возбуждения от ФБС способствует поддержанию стабильного комплекса, поскольку при переносе энергии происходит «подкачка» красной формы. Вероятно, это может негативно сказываться на эффективности фотосинтетических процессов, поэтому для ускорения восстановления исходных параметров ФБС и эффективности светосбора необходим еще один регуляторный компонент, который обеспечивал бы дестабилизацию комплекса ОСР^R–ФБС.

Стоит оговориться, что совсем недавно были обнаружены также особые варианты ОСР, для которых характерны более быстрые фотоактивация и спонтанная релаксация, а также отсутствие регуляции под действием FRP (т.н. подгруппа ОСР2, представители которой могут присутствовать в разных цианобактериях либо независимо, либо вместе с более изученными ОСР1) [70], однако в данном обзоре мы более подробно рассмотрим вариант, реализованный у *Synechocystis* (OCP1).

FRP – БЕЛОК ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИКОБИЛИСОМ

В 2010-м году был обнаружен новый фактор, определяющий восстановление флуоресценции ФБС при снижении инсоляции [94]. При исследовании Synechocystis 6803 оказалось, что существует ген slr1964, расположенный в непосредственной близости от гена ОСР (slr1963) и ответственный за эту функцию – при инактивации slr1964 восстановление флуоресценция ФБС было чрезвычайно долгим. Продукт гена slr1964 был назван белком восстановления флуоресценции (Fluorescence Recovery Protein, FRP). Оказалось, что FRP также непосредственно действует на ОСР и ускоряет его переход из фотоактивированной красной в оранжевую форму [94], о чем более подробно речь пойдет в последующих разделах. Примечательно, что некоторое время назад стоял вопрос о длине открытой рамки считывания этого гена. У генов FRP родов Synechocystis и Microcystis методами биоинформатики была найдена дополнительная N-концевая последовательность, отсутствующая в FRP из других родов цианобактерий [94]. Такой удлинённый ген был экспрессирован, а его продукт охарактеризован, что привело к ряду артефактных заклю-

H.H.	Случанко	и	соавт.
------	----------	---	--------

чений. В частности, было постулировано, что FRP прочно ассоциирован с мембранами. Позднее было экспериментально показано, что настоящий FRP из Synechocystis начинается с остатка Met26 (по нумерации продукта удлиненной рамки считывания), то есть экспрессируется и функционирует короткая форма белка. Именно эта форма имеется у прочих цианобактерий и является водорастворимым белком [95]. Оверэкспрессия такой формы FRP в Synechocystis (109 аминокислотных остатков) приводила к тому, что клетки не могли запустить фотозащитный механизм [95], что указывает на дезактивирующее действие FRP по отношению к ОСР и на необходимость тщательного контроля уровня экспрессии обоих белков для поддержания работоспособности фотозащитного механизма. Действительно, исследование данных реакций in vitro и определение соответствующих констант скоростей позволяет создать модель нефотохимического тушения флуоресценции ФБС, которая показывает, что концентрация FRP в клетке низка по сравнению с концентрацией ОСР [97].

Кристаллическая структура FRP из Synechocystis была установлена в 2013 году с разрешением 2,5 Å [96]. Оказалось, что FRP является α-спиральным белком вытянутой формы (рис. 3А), однако в кристалле присутствуют две сильно отличающихся конформации – димерная и тетрамерная, причем субъединицы в составе тетрамера уложены совсем не так, как в составе димерной конформации. Было предположено, что активной формой FRP является димер, а тетрамеры неактивны и являются формой хранения белка. Обнаружение димеров и тетрамеров FRP противоречило ранее опубликованным данным тех же авторов о том, что FRP является тримером [94]. Более поздние биохимические исследования убедительно продемонстрировали, что, по крайней мере *in vitro*, FRP представлен стабильными димерами [84, 98] с незначительной способностью к спонтанной мономеризации при снижении концентрации белка, при этом тетрамерные частицы удавалось обнаружить только при крайне высоких концентрациях белка [84, 98]. Можно предположить, что наличие N-концевого Hisтага, несмотря на сохранение полной функциональности белка [84], делает димеры FRP несколько более стабильными и препятствует образованию тетрамеров, однако кристаллы FRP из Synechocystis были также получены с использованием белка, несущего N-концевой His-таг (хотя он и не разрешен в структуре) [94]. Более того, совсем недавно была получена новая кристаллическая структура FRP из *Tolypothrix* sp. PCC 7601 (*=Fremyella diplosiphon*) (PDB 5TZ0, [70]), которая оказалась полностью эквивалентна димерной структуре

Механизм фотозащиты цианобактерий



Рис. 3. Структурная организация димера FRP по данным рентгеноструктурного анализа.

А – Общий вид на модель димера FRP из *Synechocystis* (PDB 4JDX) в двух ортогональных проекциях. Мономеры обозначены разными цветами.

Б – Наложение структур димеров FRP из *Tolypothrix* (синий, PDB 5TZ0) и *Synechocystis* (димеры, образованные разными цепями, присутствующими в кристаллической структуре, обозначены разным цветом). Отмечен угол, иллюстрирующий разницу в положении второго мономера относительно первого.

В – Область димеризации FRP. Ключевые полярные контакты отмечены пунктирными линиями, остатки, образующие гидрофобное ядро – серым цветом.

FRP из Synechocystis (PDB 4JDX, цепи В и D), и тетрамерной организации в этом случае обнаружить также не удалось. Несмотря на то, что FRP из Synechocystis и Tolypothrix идентичны лишь на 51%, структуры их димеров были практически эквивалентны, немного отличался лишь угол между мономерами (рис. 3Б). Такое же наблюдение можно сделать при аккуратном выравнивании димеров FRP, построенных разными цепями даже в пределах одной кристаллической структуры (PDB 4JDX, цепи АС и цепи BD): в этом случае угол, образуемый мономерами FRP в составе димера, отличается еще сильнее. Это обстоятельство служит указанием на то, что контакт субъединиц в димере FRP не является жестким, а допускает некоторую конформационную гибкость и скольжение мономеров друг относительно друга.

Н.Н.Случанко и соавт	чанко и соаві	n.
----------------------	---------------	----

Интерфейс димеров FRP из Synechocystis построен за счет антипараллельного контакта альфа-спиралей α1 и α2, составляет около 900-1000 Å² (~10% от общей поверхности димера) и стабилизируется за счет ярко выраженного гидрофобного ядра (остатки L29, L32, L33, V36, A40, I43, I46, L49, W50, L52, L56), а также за счет консервативных полярных контактов D54-R60, H53-S57 и катион-π взаимодействия R60-W50 с вогнутой стороны димера, причем, с учетом его антипараллельности, каждый из контактов представлен в димере дважды (рис. 3В). Такой же принцип димеризации сохраняется у FRP из Tolypothrix. Предполагали, что область димеризации непосредственно вовлечена во взаимодействие FRP с ОСР, что согласуется с консервативностью целого ряда остатков из этого региона и влиянием соответствующих мутаций на способность FRP ускорять релаксацию ОСР [96]. Это предположение не является единственно возможным, потому что можно также предположить, что исследованные мутации влияют на стабильность интерфейса FRP, и лишь поэтому – на функционирование FRP. Такая возможность требует более детального рассмотрения, особенно, с учетом недавно продемонстрированной способности FRP мономеризоваться при связывании с ОСР [84, 90, 99] (см. ниже). Наиболее загадочными на данный момент являются данные, полученные с помощью мутанта R60K, поскольку такая синонимичная замена не повлияла на фолдинг FRP (структуры для FRP дикого типа (PDB 4JDX) и R60K мутанта (PDB 4JDQ) практически совпадают), однако сделала FRP практически неспособным ускорять релаксацию ОСР [96].

Принципиально важно, что обратимую систему фотозащиты, состоящую из ФБС (объект тушения), ОСР (индуктор тушения) и FRP (ингибитор, или выключатель тушения), удалось воссоздать *in vitro* [68]. Так, несмотря на некоторые существенные допущения и различия в процессах, протекающих *in vivo* и *in vitro*, было убедительно продемонстрировано, что наличие этих трех компонентов необходимо и достаточно для работоспособности минимального регулируемого механизма тушения ФБС. Совсем недавно обнаруженные варианты ОСР2 способны быстро спонтанно релаксировать без участия FRP (гены которого могут вообще отсутствовать у некоторых цианобактерий, содержащих ОСР2), и можно предположить, что они представляют собой более примитивные формы ОСР по сравнению с ОСР1 [70], однако требуются более систематические исследования данного вопроса.

V. КЛЮЧЕВЫЕ БЕЛОК–БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОСР С КОМПОНЕНТАМИ ФИКОБИЛИСОМ

Как было сказано ранее, фотоактивация ОСР в конечном счете приводит к драматическим изменениям его конформации – разделению доменов белка и значительному смещению каротиноида вглубь N домена. Считается, что такие изменения в ОСР, вызываемые также под действием некоторых мутаций (W288A и Y201A/W288A) или хаотропных агентов [83, 84, 100], обусловливают способность ОСР взаимодействовать с белками в составе ФБС и обеспечивать диссипацию избыточной энергии, что экспериментально наблюдается как тушение флуоресценции ФБС. Важно, что для связывания активированной формы ОСР с ФБС не требуется освещение, интенсивность сине-зеленого света определяет лишь количество образовавшейся активной формы [84, 85, 97], при этом исходный оранжевый ОСР не способен связываться с ФБС и тушить их флуоресценцию. Ввиду сложного строения ФБС и отсутствия прямых структурных данных о комплексах ФБС и ОСР, точный участок взаимодействия неизвестен, а многочисленные косвенные данные достаточно противоречивы. Ситуация осложняется колоссальной разницей в размерах взаимодействующих ОСР (~35 кДа) и ФБС (несколько МДа [29, 101]) и необходимостью использовать in vitro достаточно высокие концентрации фосфата для поддержания целостности ФБС [102], и оттого набор перспективных подходов к решению вопроса о механизме взаимодействия ОСР–ФБС весьма ограничен. Каким образом целостность ФБС обеспечивается *in vivo*, не совсем понятно.

Было показано, что физическое взаимодействие фотоактивированной красной формы ОСР с ФБС является довольно прочным, поскольку их комплекс соосаждается в градиенте сахарозы [68]. Как уже упоминалось, ОСР практически не способен тушить флуоресценцию ФЦ входящих в состав стержней ФБС (рис. 1) и, наоборот, может тушить флуоресценцию мутантных ФБС, лишенных стержней [46, 68], поэтому участок взаимодействия ОСР, по всей видимости, удален от стержней и расположен в ядре ФБС. Вероятно, реальная картина еще более сложна, поскольку мутантные ФБС, лишенные стержней, значительно слабее связывали ОСР и самопроизвольно восстанавливали свою флуоресценцию по сравнению с интактными ФБС [68]. Результаты масс-спектрометрии с использованием специфических бифункциональных агентов, ковалентно модифицирующих остатки лизина, расположенные на определенном расстоянии друг о друга, подтверждают гипотезу об образовании белок-белковых комплексов ОСР с компонентами ядра ФБС [92].

Н.Н.Случанко и соавт.

Основным объектом тушения флуоресценции согласно модели, полученной в работе Жанг с соавт., являлись коровые тримеры АРС660, а участок связывания ОСР, по мнению авторов, должен располагаться между полипептидами АрсВ и АрсЕ [64]. Тушение АРС660 было предположено в работах Кириловски и соавт. [68, 89]. В других работах [103-105] тушения флуоресценции изолированных из ФБС тримеров АФЦ под действием красной формы ОСР выявить не удалось, в отличие от флуоресценции большого линкерного полипептида АрсЕ, или L_{см} (см. выше), который, так же как и АФЦ, несет фикоцианобилиновый хромофор и является одним из основных ТЭ [103–108]. Такая гипотеза о роли L_{см} косвенно подтверждается информацией с использованием мутантов по другим компонентам ядра – по генам *apcD* и *apcF*, и говорит в пользу того, что участок связывания ОСР находится вблизи или даже на белке L_{CM} [109], что было также подтверждено методами молекулярного докинга in silico [61, 110]. К сожалению, напрямую проверить такое предположение, создав мутант, полностью лишенный гена *арсE*, не удалось, поскольку продукт этого гена, L_{CM}, играет важнейшую структурную роль и необходим для сборки и целостности ФБС [108]. Тем не менее, удаление домена L_{CM}, содержащего хромофор (остатки 13–246), привело к потере OCP-зависимого тушения флуоресценции ФБС, что является существенным аргументом в пользу гипотезы о роли L_{см} в связывании с ОСР [111]. Другие же данные, полученные на белке L изолированном из состава ФБС в довольно жестких условиях [109, 112], нужно интерпретировать с осторожностью, поскольку сохранение полностью интактной структуры компонентов мультибелковых комплексов при их выделении вызывает некоторые сомнения. С другой стороны, попытки получения отдельных компонентов ФБС, например, белка L_{см}, в гетерологической системе экспрессии в штаммах Escherichia coli, продуцирующих фикоцианобилины [107, 113-115] для исследования взаимодействия с ОСР представляются перспективными и осуществимыми.

Согласно другой гипотезе, взаимодействие ОСР происходит в ядре ФБС на месте другого линкерного белка, Lc, с малой молекулярной массой («с» обозначает регион в глубине ядра, «соге»), который является продуктом гена *арсС* и лишен хромофоров. Такая гипотеза основывается на сходстве пространственной структуры Lc и C домена ОСР и подразумевает, что происходит вытеснение/ отгибание Lc под действием ОСР при его связывании с ФБС, и Lc участвует в стабилизации связывающегося ОСР [47]. Мутантные ФБС по белку Lc (ΔАрсС) демонстрировали сниженное ОСР-зависимое

тушение флуоресценции по сравнению с контрольными ФБС с интактным геном *арсС*, однако увеличение концентрации фосфата существенно нивелировало разницу между мутантом и контролем [63]. На наш взгляд, однозначная интерпретация этих результатов затруднительна, поскольку удаление важного компонента ФБС может иметь смешанное и плохо предсказуемое действие на их свойства.

Представления о том, какой участок ОСР отвечает за его взаимодействие с ФБС, менялись со временем. По одной из ранних версий, именно С домен ОСР считался ответственным за это взаимодействие [47, 94]. Взаимодействие ОСР за счет N домена также было постулировано [64], и эта гипотеза подкрепляется данными о роли остатка R155 во взаимодействии с ФБС [69] и тем фактом, что изолированный RCP, являющийся фрагментом ОСР, соответствующим его протеолизованному N домену [116], является эффективным тушителем ФБС [67]. Совсем недавно с помощью химического сшивания глутаровым альдегидом комплексов ФБС-ОСР с последующей масс-спектрометрией продуктов протеолиза было обнаружено, что не домены, а междоменный линкер в ОСР дает наибольшее количество контактов с белками ядра ФБС. Этот факт частично согласуется с данными Zhang с соавт. [64], при этом наиболее глубоко расположенным в ФБС согласно такой модели является N домен, a C домен ОСР оказывается более доступным [63]. К сожалению, даже такая модель основывается на множестве допущений и оставляет некоторую свободу интерпретаций. Более того, полное отсутствие в данном исследовании «сшитых» пептидов, принадлежащих N домену ОСР и белковым компонентам ядра, находится в некотором противоречии с общеизвестным фактом, что RCP способен тушить ФБС, даже не имея С домена и линкерного участка. Также остается непонятным, почему при постулированной доступности С концевого домена ОСР в комплексе с ФБС Гвиздала с соавт. не могли добиться соочищения на металлоаффинной колонке ФБС и ОСР при иммобилизации ОСР за С-концевой полигистидиновый таг [68].

Несмотря на определенные успехи при анализе взаимодействия ОСР и ФБС *in silico*, достигнутые с помощью методов молекулярной динамики и моделирования [61, 63, 64, 110], точный механизм этого взаимодействия остается далеким от понимания и нуждается в прямых экспериментальных данных с использованием структурных методов, например, рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии. С обнаружением стабильных мутантных форм ОСР, имитирующих его активированное состояние (например, ОСР-W288A [84]), такая задача кажется выполнимой.

H.H.	Случанко	и	соавт.
------	----------	---	--------

Однако даже в случае немутантного ОСР фотоактивация приводит к чрезвычайно прочному взаимодействию ОСР с ФБС *in vitro*, особенно, при высокой концентрации фосфата, и такое связывание значительно стабилизирует красную форму ОСР [68, 78]. Фосфат может значительно стабилизировать комплексы и, вероятно, *in vivo* взаимодействие несколько слабее, чем *in vitro*, однако очевидно, что в условиях *in vivo* необходим фактор (или факторы), которые при снижении уровня освещенности позволяли бы сделать взаимодействие ОСР с ФБС обратимым и эффективно восстанавливали бы флуоресценцию ФБС и поток энергии на фотосистемы. Как было отмечено, одним из таких факторов, существенно ускоряющим восстановление флуоресценции ФБС *in vitro* и *in vivo*, оказался белок FRP [94].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОСР С FRP

Оказалось, что инкубация комплексов ОСР–ФБС в присутствии FRP приводит к значительному снижению содержания ОСР во фракции ФБС, полученной при центрифугировании в градиенте сахарозы, что коррелирует с восстановлением флуоресценции ФБС, потушенной при добавлении ОСР [68]. Таким образом, было предположено, что FRP способствует диссоциации ОСР от ФБС и, тем самым, создает предпосылки для его релаксации из фотоактивированной красной в оранжевую форму. Вопрос о том, за счет чего FRP способствует восстановлению фБС, является крайне сложным и фактически сводится к выяснению того, происходит ли конкуренция FRP и ОСР за связывание на ФБС, или же FRP связывается с доступными участками на ОСР, связанном на ФБС и активно «вытаскивает» его из ФБС.

Механизм, основанный на простой конкуренции FRP и ОСР за некий участок на ФБС, диктует более высокое сродство FRP к ФБС по сравнению с таковым у ОСР^R. Иначе, потребовалась бы значительная концентрация FRP, чтобы вытеснить ОСР, тогда как известно, что FRP эффективно работает даже при низких молярных соотношениях FRP/OCP, однако без дополнительных исследований взаимодействия FRP и ФБС это остается лишь предметом дискуссий. Нельзя полностью исключить, что существуют еще не обнаруженные факторы, участвующие в регуляции фотозащиты наряду с ОСР и FRP. Гипотетически возможен сценарий, когда FRP вообще взаимодействует только со свободным ОСР, ведь скорость превращения красной в оранжевую форму [46], что указывает на то, что скорость-лимитирующей является стадия именно отсоединения

ОСР от ФБС. В пользу такой точки зрения косвенно говорит также отсутствие необходимости в FRP для релаксации ОСР2 и спонтанного восстановления флуоресценции ФБС при снижении инсоляции [70]. Однако совсем недавно были получены данные о том, что FRP обладает двумя независимыми активностями, и механизмы взаимодействия FRP со свободным ОСР и ОСР, связанным с ФБС, могут отличаться. В пользу такой гипотезы свидетельствует то, что мутации как в ОСР (в первую очередь, остатков F299 и D220), так и в FRP (мутация R60L), которые сильно снижали способность FRP ускорять переход красной в оранжевую форму, практически не влияли на способность FRP отделять ОСР от ФБС [117].

В отличие от совершенно не охарактеризованных на данный момент комплексов FRP с ОСР, связанным с ФБС, взаимодействие FRP со свободным ОСР исследовано более подробно. Гены, кодирующие ОСР и FRP, часто расположены недалеко друг от друга, однако находятся под контролем разных промоторов [94], что, вероятно, указывает на разные, независимо меняющиеся концентрации этих белков в условиях изменяющейся освещенности, что необходимо для подстройки фотозащитного механизма. Изначально предполагалось, что FRP может взаимодействовать только с фотоактивированной красной формой ОСР, и что это взаимодействие происходит через N домен ОСР, при этом связывание FRP дестабилизирует красную форму ОСР [94]. Недавние биохимические исследования показали, что FRP способен взаимодействовать и с оранжевой формой ОСР [84, 98, 118], однако с гораздо меньшим сродством по сравнению с фотоактивированной формой ОСР, при этом кажущиеся константы диссоциации составляли около 35 и 2,3 мкМ, соответственно [84]. Оценка параметров взаимодействия FRP оказалась возможной с использованием пурпурной мутантной формы OCP-W288A, которая является структурным и функциональным аналогом красной формы ОСР и также характеризуется бо́льшим гидродинамическим радиусом и, по всей видимости, разделёнными и отдаленными друг от друга N и C доменами [83, 84]. С помощью комбинации биохимических методов было установлено, что при взаимодействии ОСР и FRP получаются стабильные комплексы с кажущейся стехиометрией 1:1, то есть в исследованных условиях димеры FRP диссоциировали при взаимодействии с ОСР [84]. При этом сродство и стехиометрия взаимодействия FRP с ОСР-W288A и апоформой ОСР (в которой отсутствует молекула каротиноида, стабилизирующая компактную конформацию белка) практически совпадали [99]. Учитывая эти данные, а также сходство в гидродинамическом поведении ОСР-

H.H.	Случанко	и	соавт.
------	----------	---	--------

W288A и апоформы ОСР (увеличенный радиус Стокса и выраженная склонность к димеризации), можно предположить, что FRP способен узнавать и специфически связывается с такими формами ОСР, в которых N- и C-концевой домены отдалены друг от друга, вне зависимости от наличия каротиноида. Более того, систематически наблюдалось увеличение компактности комплексов ОСР и FRP, что позволило сделать предположение об адаптерной или шапероноподобной функции FRP по отношению к ОСР, благодаря чему FRP может «сводить» разведенные домены ОСР, способствуя его обратной конверсии из красной в оранжевую форму [84, 99]. Можно предположить, что помимо своей важной установленной роли в фотозащитном механизме FRP выполняет определенную роль в процессе сворачивания и созревания ОСР. В недавней работе Бланкеншип с соавт. были получены подтверждения предположения о том, что FRP может служить мостиком, сближающим домены ОСР в процессе функционирования [118]. Было также постулировано, что в процессе функционирования происходят значительные конформационные перестройки FRP, включающие мономеризацию и частичное разворачивание С-концевой области этого белка (см. рис. ЗА), что, предположительно, является необходимым условием перевода ОСР из красной в оранжевую форму [118].

До недавнего времени оставался неясным вопрос о том, как устроена область контакта FRP и ОСР, и какие области задействованы во взаимодействии этих белков. В первую очередь, предстояло выяснить, какой из доменов ОСР несет участок(ки) связывания FRP, и на этот вопрос удалось ответить с помощью подхода «разделяй и властвуй». Оказалось, что in vitro FRP практически не взаимодействует ни с RCP (эквивалент N домена ОСР), ни с его апоформой, полученными в бактериальной системе экспрессии, однако с хорошим сродством связывается с полипептидом, соответствующим С домену ОСР, давая, однако, комплексы с различной стехиометрией [119]. К большому удивлению оказалось, что при экспрессии в клетках E. coli, способных продуцировать сложные каротиноиды [83, 120], последний образует чрезвычайно стабильные димеры, способные связывать каротиноид, что наделяет белок уникальным фиолетовым цветом [119]. Такой белок был назван СОСР (от C-terminal OCP-related carotenoid protein), и в случае Synechocystis соответствует С домену ОСР (остатки 165-317), однако, как показывает филогенетический анализ, СОСР может иметь гомологов, экспрессирующихся независимо от ОСР или RCP и обладающих не вполне понятными функциями [121, 122]. Выяснилось, что молекула каротиноида стабилизирует димеры СОСР

за счет образования водородных связей с остатками тирозина-201 и триптофана-288. В отсутствие каротиноида или под действием замены W288A димеры COCP приобретают заметную склонность к диссоциации. Моделирование структуры таких димеров на основе симметрии, продиктованной природой связанного с одинаковыми субъединицами симметричного каротиноида кантаксантина, а также данных спектроскопии комбинационного рассеяния, кругового дихроизма и анализа вторичной структуры дает основание полагать, что субъединицы такого димера структурно полностью соответствуют С домену OCP [119]. Несмотря на то, что рассмотренные данные не исключают возможность FRP взаимодействовать с N доменом OCP или междоменным линкером, особенно в условиях уже образованного комплекса OCP–FRP, они указывают на то, что основной специфичный участок связывания с FRP находится именно на C домене OCP.

При систематическом сравнении способности FRP взаимодействовать с разными формами и фрагментами ОСР была сформулирована гипотеза о том, что участок связывания FRP на С конце ОСР существует всегда, но в некоторых состояниях ОСР может быть закрыт неким структурным элементом ОСР, предотвращающим прочное связывание FRP, свойственное фотоактивированной форме ОСР [90]. Примечательной особенностью структуры ОСР в оранжевой форме является наличие N-концевого сегмента (N-terminal extension, NTE), который содержит короткую α1-спираль, налипающую снаружи на β-слой С домена ОСР (см. рис. 2). Этот сегмент, судя по всему, выполняет роль своего рода защелки или предохранителя в ОСРо, но отсоединяется и, по-видимому, расплетается при фотоактивации ОСР [62, 91] (см. соответствующий раздел выше). Также этот элемент вовсе отсутствует у некоторых исследованных форм ОСР, что может объяснить их способность прочно связывать FRP и без разделения доменов. Действительно, ОСР^R, ОСР-W288A, Аро-ОСР, СОСР и Аро-СОСР проявляют способность взаимодействовать с FRP, а ОСРо, RCP, Аро-RCP – если и способны связывать FRP, то делают это с гораздо меньшим сродством [90, 119]. Эти данные подводят нас к предположению о том, что участок связывания FRP пересекается или совпадает с участком связывания NTE в области β-слоя C домена ОСР, а сам сегмент NTE предохраняет ОСР от преждевременного связывания FRP в отсутствие фотоактивации и «сталкивает» FRP в самом конце фотоцикла, при переходе ОСР из красной в оранжевую форму. В полном соответствии с таким предположением, оказалось, что удаление альфа-спирали в составе NTE в белке Δ NTE приводит к тому, что он начинает связывать FRP с наивысшим сродством из

Н.Н.Случанко и соавт.

всех исследованных на настоящий момент форм ОСР, не требуя фотоактивации и расхождения доменов [90]. Определенная с помощью комбинации методов (аналитическая гель-фильтрация, нативный электрофорез и химическое «сшивание» глутаровым альдегидом) кажущаяся стехиометрия комплексов ΔNTE-FRP была близка к 1:1, подтверждая выводы, сделанные для ОСР-W288A и Аро-ОСР, и указывая на мономеризацию FRP при взаимодействии с ОСР [84, 99]. Субмикромолярная кажущаяся константа диссоциации комплекса ΔNTE/FRP, по всей видимости, обусловлена тем, что в ОСР-ΔNTE отсутствует элемент (NTE), в норме конкурирующий с FRP за один участок связывания, и/или поскольку в таком варианте домены оказываются неразведенными, и легко доступны другие гипотетические участки связывания FRP, работающего по принципу адаптера, или мостика, сближающего домены ОСР [84, 90, 98, 118]. Было предположено, что конкуренция между FRP и NTE может быть обусловлена некоторым сходством как в первичной структуре, так и в пространственной укладке N-концевых участков в FRP (пептид ¹²AETQSAHALFR²² в последовательности FRP из Synechocystis 6803) и ОСР (пептид ³FTIDSARGIFP¹³ в последовательности ОСР из той же цианобактерии) [90]. Действительно, как и указанные пептиды, поверхность С домена ОСР в области связывания NTE (и FRP) богата гидрофобными аминокислотными остатками (A222, F264, L291, F299, F300, A302), что может указывать на природу белок-белковых взаимодействий. Неудивительно, что мутации в этом месте ОСР приводят к нарушению связывания и функционирования FRP [96, 117]. Более того, при анализе этой зоны становится понятно, почему фотоактивация ОСР и нарушение водородных связей кетогруппы каротиноида с W288/Y201 приводит к отсоединению NTE и дальнейшим конформационным перестройкам в ОСР [62, 71, 91]. Следует отметить, что остаток W288 расположен с внутренней стороны того же β-слоя, что и гидрофобный участок связывания NTE, а потому легко предположить изменения в его гидрофобности/полярности, а следовательно, прочности связывания NTE, при нарушении водородной связи с W288. В то же время, не совсем понятно, почему последовательности ОСР, в частности, С доменов гораздо более консервативны, чем последовательности FRP. Это может отражать процесс эволюции белок-белковых взаимодействий и указывать на некоторые различия в механизме связывания FRP у разных видов цианобактерий, либо может быть связано с менее высокой специфичностью участка связывания FRP на ОСР. В любом случае, в дальнейших исследованиях интересно будет понять, способны

ли FRP из одних организмов ускорять переход красной формы в оранжевую форму OCP, полученного из других источников. Это должно пролить свет на ключевые участки в структуре FRP, которые важны для функционирования FRP, и те, которые определяют видоспецифичность.

Несмотря на привлекательность гипотезы о существовании более чем одного участка контакта FRP с ОСР и данные нативной масс-спектрометрии, показывающие возможность образования транзиентных комплексов N домен-FRP-С домен [98, 118, 123], несомненно, потребуются новые исследования для точного выяснения механизма связывания FRP на молекуле ОСР и его функционирования. Экспериментальные данные, свидетельствующие о мономеризации FRP, представляются крайне интересными и могут объяснить многие наблюдения, а также согласуются с результатами кинетического моделирования процессов, происходящих при функционировании системы фотозащиты in vitro и in vivo [97], однако потребует более детальной проверки в дальнейшем, в том числе, с помощью методов структурной биологии. К сожалению, многочисленные попытки закристаллизовать комплекс FRP с разными формами ОСР на данный момент привели к росту красивых цветных, но не дифрагирующих кристаллов (Случанко с соавт., неопубликованные данные).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ДОМЕНОВ ОСР И УНИКАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА КАРОТИНОИДА

Как было сказано ранее, примечательной особенностью ОСР является модульный принцип его структурной и функциональной организации – белок состоит из двух относительно жестких доменов, соединенных длинным линкером, и удерживающих молекулу каротиноида [67] (рис. 4). Успех в секвенировании многочисленных геномов цианобактерий в последние годы предопределил прогресс в понимании разнообразия устройства многих важных механизмов на молекулярном уровне. Применительно к ОСР, оказалось, что многие цианобактериальные геномы содержат помимо полноразмерных генов ОСР также и гены, соответствующие отдельно N и C доменам белка, причем в некоторых представителях оказалось по несколько вариантов таких гомологов. В 2016 году было показано, что гомологи N-концевого домена ОСР являются каротиноид-связывающими белками, получившими название HCP (helical carotenoid proteins) [121]. По своей пространственной структуре НСР оказались сходными с RCP (продукт протеолиза ОСР [116]). Несмотря на сходную структуру и общую способность связывать каротиноиды различной

H.H.	Случанко	и	соавт.
------	----------	---	--------

природы, что обусловливает их красновато-пурпурную окраску (рис. 4), до конца не понятно физиологическое предназначение НСР – их способность тушить флуоресценцию ФБС и АФК сильно различались у исследованных НСР и были плохо предсказуемыми [121, 124]. Например, несмотря на гомологию с RCP и наличие связанного каротиноида у всех HCP1-4 из Anabaena, вариант HCP1 (all1123) оказался неэффективным тушителем ни АФК, ни ФБС, в то время как HCP2 (all3221) и HCP3 (alr4783) демонстрировали способность к тушению только АФК, а HCP4 (all4941) - тушению ФБС [124, 125]. Можно предположить, что различие в свойствах разных гомологов N-концевого домена связано с типом связанных каротиноидов, их разной экспонированностью в растворитель, а также олигомерным состоянием НСР. Так, типичным для RCP и для НСР, по-видимому, является мономерное состояние [67, 119], даже в условиях повышенной концентрации белка при кристаллизации (PDB 4XB4), однако HCP1 был закристаллизован в виде димера с довольно большой площадью контакта мономеров, каждый из которых связывает молекулу каротиноида (PDB 5FCX) (см. рис. 4). Возможно, широкий арсенал разных каротиноид-связывающих гомологов ОСР необходим для распределения обязанностей (т.н. субфункционализация) и помогает цианобактериям дополнительно адаптироваться.

В 2017 году было показано, что и гомологи С-концевого домена ОСР могут существовать независимо и при этом связывают каротиноид [119, 122]. Впервые это было показано на примере искусственно полученного С-концевого домена ОСР из Synechocystis (у которого нет независимых генов, кодирующих гомологи С концевого домена) [93, 119], и лишь потом было показано для других гомологов С домена ОСР [122]. Оказалось, что такие белки также являются каротиноидсвязывающими и способны тушить активные формы кислорода, однако не умеют тушить флуоресценцию ФБС [119], что дополнительно подтверждает гипотезу о расположении участка связывания с ФБС не на С домене ОСР, а на N домене и/или линкерной области, а также полностью согласуется с модульным принципом строения ОСР [67]. Специализация гомологов доменов ОСР, хотя и до сих пор не до конца понятная, наводит на мысль об эволюционном происхождении такого двухдоменного белка как ОСР. Возникнув однажды независимо, домены могли претерпеть слияние после того, как природа перестала использовать для фотозащиты их нековалентно связанные гетеродимеры как менее эффективные ансамбли [119, 121, 122]. Однако такую гипотезу нужно рассматривать с осторожностью,



Рис. 4. Строение и свойства ОСР из *Synechocystis* 6803 и гомологов его N и C доменов.

Приведены модели кристаллических структур ОСР, RCP и HCP1 (идентификаторы в базе данных PDB указаны), а также гибридная модель димера СОСР, построенная на основе биохимических и биофизических данных и оптимизированная при помощи методов молекулярной динамики [119]. Перечислены основные свойства белков и показаны типичные цвета препаратов, получаемых в бактериальной системе экспрессии [83, 120]. Звездочка (*) означает, что мономерное состояние может не быть типичным для всех HCP, поскольку как минимум один из представителей (HCP1) закристаллизован в димерной форме (PDB:5FCX). В модели СОСР пунктиром отмечена условная плоскость симметрии димера и зеленым – положение остатков F278 (нумерация эквивалентна ОСР из *Synechocystis*), в котором у гомологов С домена может находиться цистеин (см. также рис. 5).

поскольку у наиболее примитивной ныне живущей цианобактерии *Gloeobacter*, не имеющей тилакоидов [126], имеется полноразмерный OCP (Uniprot Q7NPK5) и соответствующий механизм тушения флуоресценции ФБС [127].

При попытке воссоздать эту ситуацию *in vitro* для доменов ОСР из *Synechocystis*, синтезированных по-отдельности в каротиноид-продуцирующих клетках *E.coli*, оказалось, что взаимодействие доменов приводит к образованию неустойчивых ОСР-подобных комплексов,

H.H.	Случанко	и	соавт.
------	----------	---	--------

которые даже демонстрируют фотоактивацию и способны тушить ФБС, но после фотоактивации практически не способны релаксировать в ОСР^о-подобное состояние [119]. Эти данные, во-первых, экспериментально продемонстрировали возможный эволюционный сценарий возникновения ОСР [121], а, во-вторых, свидетельствовали в пользу перемещения каротиноида из одного белка в другой при рекомбинации апоформы N домена и каротиноид-связанного СОСР. При этом фиолетовый раствор СОСР (каротиноид расположен между С доменами в димере СОСР) (см. рис. 4) постепенно приобретал оранжевую окраску, характерную для ОСРо, в котором каротиноид расположен между N и C доменами. Оказалось, что еще более эффективно данный процесс протекает, если апоформу N домена заменить на апоформу полноразмерного ОСР [93, 119]. В результате прямой передачи каротиноида от СОСР к Аро-ОСР образовывалась значительно более стабильная форма ОСР^о, которая была способна к многократной фотоактивации и тушению ФБС [93]. Это открытие позволяет предположить, что помимо антиоксидантной функции в клетке гомологи СОСР осуществляют функцию хранения и транспорта каротиноидов и способствуют «созреванию» белков ОСР и НСР, передавая каротиноиды их апоформам.

Любопытно отметить, что при таком уникальном механизме передачи каротиноида от белка к белку происходила разборка достаточно стабильных димеров СОСР, координирующих каротиноид, а мутация W288A в СОСР, дестабилизирующая связь с каротиноидом и димеры белка, значительно увеличивала скорость передачи каротиноида [93]. Обнаруженная склонность Аро-СОСР к самоассоциации в димеры даже в отсутствие каротиноида и соответствующие концентрационные зависимости олигомерного состояния, оказавшиеся сходными у Аро-СОСР и полноразмерного Аро-ОСР или ОСР^R и ОСР-W288A, позволили предположить, что именно С домены ОСР ответственны за обнаруженную ранее склонность фотоактивированной формы ОСР (и других форм с разделенными доменами) к образованию димеров [83, 84]. ОСР^о, имеющий компактную форму, демонстрировал значительно менее выраженную склонность к димеризации, судя по всему, происходящую по иному механизму, с образованием другого межсубъединичного интерфейса [93]. На основе этих наблюдений, а также данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, были получены модели низкого разрешения для димеров и мономеров ОСР и Аро-ОСР (ОСР^R) в растворе [93]. Важно отметить, что в этих работах, а также в работах [98, 118] димеры ОСР^о эффективно обра-

зовывались лишь при весьма высоких концентрациях белка. Эти данные находятся в некотором противоречии с постулированным ранее механизмом, согласно которому ОСР существуют в виде димеров [70, 72], а фотоактивация приводит к их мономеризации [64]. Судя по всему, напротив, фотоактивация ОСР, приводящая в конце концов к расхождению его доменов, усиливает склонность белка к димеризации, преимущественно за счет образования интерфейса между С доменами [93]. Стоит отметить, что такой интерфейс между С доменами, имеющийся также в модели димера СОСР, связывающего каротиноид, означает сближение петель, содержащих примечательный остаток фенилаланина в положении 278 (нумерация ОСР из Synechocystis), в котором у многих гомологов С домена стоит остаток цистеина (например, у гомолога all4940 из Anabaena) (рис. 5). В дальнейшем будет интересно понять, способны ли димеры таких гомологов образовывать ковалентные дисульфидные сшивки при окислении, и как такая модификация влияет на перенос каротиноида от COCP.

Таким образом, димер-мономерные переходы оказываются крайне важными для понимания механизма функционирования OCP и FRP *in vitro*, однако их роль в процессах, происходящих *in vivo*, еще предстоит выяснить.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на относительно простое устройство фотосинтетического аппарата у цианобактерий по сравнению, например, с высшими растениями, потребовались десятилетия исследований и поисков для того, чтобы обнаружить механизм их фотозащиты и понять, что он связан с уникальным оранжевым каротиноид-связывающим белком и его способностью к фотоактивации и взаимодействию со светособирающими антеннами. Функция ОСР была впервые показана всего около 10 лет назад. На данный момент, сложно предполагать, как развивалась бы область исследований фотосинтеза и фотозащиты, произойди это событие значительно раньше (ведь ОСР был впервые выделен и описан 36 лет назад!). Совершенствование и оттачивание многочисленных методических подходов в области биохимии, биофизики и структурной биологии, которое произошло за последнее десятилетие, значительно облегчает понимание деталей обнаруженного механизма фотозащиты, связанного с функционированием ОСР. В связи с этим, за последние годы были достигнуты колоссальные

Н.Н.Случанко и соавт.



Рис. 5. Филогенетическое древо, построенное на основе выравнивания 38 последовательностей различных гомологов С домена ОСР из разных цианобактерий (указаны идентификаторы из базы данных Unirpot) и демонстрирующее наличие двух альтернативных групп, содержащих либо остаток фенилаланина, либо остаток цистеина в положении, эквивалентном F278 в последовательности полноразмерного ОСР из *Synechocystis*. Предположительно, димеры, образованные Cys-содержащими вариантами последовательности, способны при окислении образовывать дисульфидные мостики, поскольку остатки цистеина из двух мономеров находятся на оптимальном для этого расстоянии (<10 Å, см. рис. 4). Филогенетический анализ проведен с помощью метода наибольшего правдоподобия (maximum likelihood) в программе MEGA7 [128].

успехи в характеристике фотоцикла ОСР (по шкале от пикосекунд до секунд и минут), в исследовании его способности тушить флуоресценцию ФБС и взаимодействовать с FRP. Тем не менее, несмотря на титанические усилия нескольких лабораторий по всему миру, ряд принципиальных вопросов остаются предметом горячих споров и все еще далеки от понимания.

Так, участок взаимодействия ОСР в составе ФБС, строго говоря, до сих пор неизвестен. Стоит ли напоминать, что некоторые косвенные данные на этот счет находятся в определенном противоречии друг с другом. Также совершенно непонятно, каким образом относительно консервативный белок ОСР, последовательность которого крайне сходна у разных представителей цианобактерий, способен взаимодействовать с фикобилисомами, различными по архитектуре и белковому составу, разных цианобактерий [129])? В литературе есть определенные разногласия по поводу комплекса ОСР–ФБС: является ли он специфичным и прочным или же наоборот – менее специфичным и более динамичным? Значительный прогресс в области структурных методов, в первую очередь, криоэлектронной микроскопии, может оказаться очень своевременным и способствовать выяснению структуры гипотетических комплексов ОСР–ФБС.

На данный момент нет четкого понимания, почему последовательность ОСР значительно более консервативна, чем последовательность FRP, если постулировать, что эти два компонента системы фотозащиты взаимодействуют по универсальному для цианобактерий принципу. Участок и механизм взаимодействия ОСР и FRP известен лишь приблизительно – даже олигомерное состояние белков ОСР и FRP *in vitro* и *in vivo* горячо обсуждается в литературе и далеко от консенсуса. Основные результаты, связанные с исследованиями взаимодействия ОСР и FRP, были получены за последние 2–3 года. Стоит ли удивляться, с учетом того, что FRP был открыт семь, а структурно исследован – всего лишь четыре года назад. Структурно-биологические подходы являются здесь также многообещающими.

ОСР является удивительным примером того, как свет может регулировать драматические, но обратимые изменения белковой конформации. При фотоактивации ОСР не просто меняется локальная структура активного участка или отдельно взятого домена – по современным представлениям, белок полностью преобразуется, что сопровождается изменением его поверхности и экспонированием прежде маскированных зон (интерфейс N и C доменов, сегмента NTE и участка его связывания на C домене, разупорядочивание линкера

и т.д.). Перспективными представляются сценарии использования таких свето-контролируемых конформационных изменений в ОСР в прикладных исследованиях или при конструировании различных сенсоров, или для нужд оптогенетики. Например, через взаимодействие ОСР с некоторым (искусственным или модифицированным природным) партнером, который помогал бы в проведении такого запускаемого светом сигнала. Как бы то ни было, мы не сомневаемся в бурном развитии данной области исследований и ожидаем множество новых интересных открытий, поясняющих особенности механизма фотозащиты цианобактерий и ключевых белок-белковых взаимодействий, лежащих в его основе.

Авторы выражают благодарность Н.Б. Гусеву, И.Н. Стадничуку, Д.А. Лосю, П.М. Красильникову и Н.П. Юриной за ценные консультации.

ЛИТЕРАТУРА

- Guerrero, F., Zurita, J.L., Roncel, M., Kirilovsky, D., Ortega, J.M. (2014) The role of the high potential form of the cytochrome b559: Study of Thermosynechococcus elongatus mutants, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 908–919.
- Herbert, S.K., Martin, R.E., Fork, D.C. (1995) Light adaptation of cyclic electron transport through Photosystem I in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7942, *Photosynthesis Research.*, 46, 277–285.
- Mullineaux, C.W. (2014) Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 503–511.
- 4. Mullineaux, C.W. (2014) Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria, *Front. Plant Sci.*, **5**, 7.
- Trubitsin, B.V., Ptushenko, V.V., Koksharova, O.A., Mamedov, M.D., Vitukhnovskaya, L.A., Grigor'ev, I.A., Semenov, A.Y., Tikhonov, A.N.

(2005) EPR study of electron transport in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803: oxygen-dependent interrelations between photosynthetic and respiratory electron transport chains, *Biochim. Biophys. Acta*, **1708**, 238–249.

- Peschek, G.A., Obinger, C., Renger, G. (eds.) (2011) *Bioenergetic processes* of cyanobacteria, Springer. 720 p.
- Allakhverdiev, S.I., Kinoshita, M., Inaba, M., Suzuki, I., Murata, N. (2001) Unsaturated Fatty Acids in Membrane Lipids Protect the Photosynthetic Machinery against Salt-Induced Damage inSynechococcus, *Plant Phy*siology, **125**, 1842–1853.
- Mironov, K.S., Sidorov, R.A., Trofimova, M.S., Bedbenov, V.S., Tsydendambaev, V.D., Allakhverdiev, S.I., Los, D.A. (2012) Light-dependent cold-induced fatty acid unsaturation, changes in membrane fluidity, and alterations in gene expression in Synechocystis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1817, 1352–1359.

- Maksimov, E.G., Mironov, K.S., Trofimova, M.S., Nechaeva, N.L., Todorenko, D.A., Klementiev, K.E., Tsoraev, G.V., Tyutyaev, E.V., Zorina, A.A., Feduraev, P.V., Allakhverdiev, S.I., Paschenko, V.Z., Los, D.A. (2017) Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria, *Photosynth. Res.*, 133, 215–223.
- He, J.-A., Hu, Y.-Z., Jiang, L.-J. (1997) Photodynamic action of phycobiliproteins: in situ generation of reactive oxygen species, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1320, 165–174.
- Pascal, A. A., Liu, Z., Broess, K., van Oort, B., van Amerongen, H., Wang, C., Horton, P., Robert, B., Chang, W., Ruban, A. (2005) Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting, *Nature*, 436, 134–137.
- Stirbet, A., Govindjee (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient, J. Photochem. Photobiol. B, 104, 236–257.
- Conrad W. Mullineaux, J.F.A. (1988) Fluorescence induction transients indicate dissociation of Photosystem II from the phycobilisome during the State-2 transition in the cyanobacterium Synechococcus 6301, *Biochimica et Biophysica Acta*, 934, 96–107.
- Mullineaux, C.W., Emlyn-Jones, D. (2005) State transitions: an example of acclimation to low-light stress, *J. Exp. Bot.*, 56, 389–393.
- Kirilovsky, D. (2015) Modulating energy arriving at photochemical reaction centers: orange carotenoid protein-related photoprotection and state transitions, *Photosynth Res.* 126, 3–17.

- Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D.M., Prado, M., He, G., Gross, M.L., Blankenship, R.E. (2013) Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria, *Science*, 342, 1104–1107.
- de Marsac, N.T., Cohen-bazire, G. (1977) Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1635–1639.
- Gantt, E. (1981) Phycobilisomes, Annual Review of Plant Physiology, 32, 327–347.
- Glazer, A.N. (1985) Light Harvesting by Phycobilisomes, *Annual Review* of Biophysics and Biophysical Chemistry, 14, 47–77.
- Samsonoff, W.A., MacColl, R. (2001) Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat, *Archives of Microbiology*, **176**, 400–405.
- Liu, L.-N., Chen, X.-L., Zhang, Y.-Z., Zhou, B.-C. (2005) Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: An overview, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, **1708**, 133–142.
- Liu, L.N., Chen, X.L., Zhang, Y.Z., Zhou, B.C. (2005) Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: an overview, *Biochim Biophys Acta*, **1708**, 133–142.
- Bryant, D.A., Guglielmi, G., de Marsac, N.T., Castets, A.-M., Cohen-Bazire, G. (1979) The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model, *Archives of Microbiology*, 123, 113–127.
- 24. Mimuro, M., Gantt, E. (1986) A high molecular weight terminal pigment («anchor polypeptide») and a

minor blue polypeptide from phycobilisomes of the cyanobacterium Nostoc sp. (MAC): Isolation and characterization, *Photosynth. Res.*, **10**, 201–208.

- Maksimov, E.G., Kuzminov, F.I., Konyuhov, I.V., Elanskaya, I.V., Paschenko, V.Z. (2011) Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803 and its mutants, *J. Photochem. Photobiol. B*, 104, 285–291.
- Adir, N. (2005) Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant, *Photosynth. Res.*, 85, 15–32.
- Betz, M. (1997) One century of protein crystallography: the phycobiliproteins, *Biol. Chem.*, 378, 167–176.
- McGregor, A., Klartag, M., David, L., Adir, N. (2008) Allophycocyanin trimer stability and functionality are primarily due to polar enhanced hydrophobicity of the phycocyanobilin binding pocket, *J. Mol. Biol.*, 384, 406–421.
- Sonani, R.R., Gupta, G.D., Madamwar, D., Kumar, V. (2015) Crystal Structure of Allophycocyanin from Marine Cyanobacterium Phormidium sp. A09DM, *PLOS One*, 10, e0124580.
- Zuber, H. (1986) Structure of lightharvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae, *Trends in Biochemical Sciences*, 11, 414–419.
- MacColl, R. (1998) Cyanobacterial Phycobilisomes, *Journal of Structural Biology*, **124**, 311–334.
- 32. Maksimov, E.G., Gostev, T.S., Kuz'minov, F.I., Sluchanko, N.N., Stadnichuk, I.N., Pashchenko, V.Z., Rubin, A.B. (2010) Hybrid systems of quantum dots mixed with the photosensitive protein phyco-

erythrin, *Nanotechnologies in Russia*, **5**, 531–537.

- Karpulevich, A.A., Maksimov, E.G., Sluchanko, N.N., Vasiliev, A.N., Paschenko, V.Z. (2016) Highly efficient energy transfer from quantum dot to allophycocyanin in hybrid structures, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 160, 96–101.
- Holzwarth, A.R. (1991) Structurefunction relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae, *Physiologia Plantarum*, 83, 518–528.
- Zlenko, D.V., Krasilnikov, P.M., Stadnichuk, I.N. (2016) Structural modeling of the phycobilisome core and its association with the photosystems, *Photosynth. Res.*, 130, 347–356.
- 36. MacColl, R. (2004) Allophycocyanin and energy transfer, *Biochim Biophys Acta*. **1657**, 73–81.
- 37. Schmitt, F.J., Maksimov, E.G., Suedmeyer, H., Jeyasangar, V., Theiss, C., Paschenko, V.Z., Eichler, H.J., Renger, G. (2011) Time resolved temperature switchable excitation energy transfer processes between CdSe/ZnS nanocrystals and phycobiliprotein antenna from Acaryochloris marina, *Photonics and Nanostructures – Fundamentals and Applications*, 9, 190–195.
- Максимов Е.Г., Цораев Г.В., Пащенко В.З., Рубин А.Б. (2012) Природа аномальной температурной зависимости времени жизни флуоресценции аллофикоцианина, Доклады Академии наук, 443, 377.
- Maksimov, E.G., Schmitt, F.J., Hätti, P., Klementiev, K.E., Paschenko, V.Z., Renger, G., Rubin, A.B. (2013) Anomalous temperature dependence of the fluorescence lifetime of phycobiliproteins, *Laser Physics Letters*, 10, 055602.

- Mao, H.-B., Li, G.-F., Li, D.-H., Wu, Q.-Y., Gong, Y.-D., Zhang, X.-F., Zhao, N.-M. (2003) Effects of glycerol and high temperatures on structure and function of phycobilisomes in Synechocystissp. PCC 6803, FEBS Lett., 553, 68–72.
- Ajlani, G., Vernotte, C. (1998) Construction and characterization of a phycobiliprotein-less mutant of Synechocystis sp. PCC 6803, *Plant Molecular Biology*, 37, 577–580.
- Manodori, A., Melis, A. (1986) Cyanobacterial Acclimation to Photosystem I or Photosystem II Light, *Plant Physiology.* 82, 185–189.
- El Bissati, K., Delphin, E., Murata, N., Etienne, A. L., Kirilovsky, D. (2000) Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803: involvement of two different mechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1457, 229–242.
- 44. Rakhimberdieva, M.G., Stadnichuk, I.N., Elanskaya, I.V., Karapetyan, N.V. (2004) Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem II-deficient mutant of Synechocystis sp, *FEBS Lett.*, 574, 85–88.
- Rakhimberdieva, M. G., Bolychevtseva, Y. V., Elanskaya, I. V., Karapetyan, N. V. (2007) Protein-protein interactions in carotenoid triggered quenching of phycobilisome fluorescence in Synechocystis sp. PCC 6803, FEBS Lett., 581, 2429–2433.
- Wilson, A., Ajlani, G., Verbavatz, J.-M., Vass, I., Kerfeld, C. A., Kirilovsky, D. (2006) A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related Energy Dissipation in Cyanobacteria, *The Plant Cell*, 18, 992–1007.
- 47. Wilson, A., Punginelli, C., Gall, A., Bonetti, C., Alexandre, M., Rou-

taboul, J.-M., Kerfeld, C.A., van Grondelle, R., Robert, B., Kennis, J.T.M., Kirilovsky, D. (2008) A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 12075–12080.

- Punginelli, C., Wilson, A., Routaboul, J.M., Kirilovsky, D. (2009) Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the orange carotenoid protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 280–288.
- 49. Wilson, A., Kinney, J.N., Zwart, P.H., Punginelli, C., D'Haene, S., Perreau, F., Klein, M.G., Kirilovsky, D., Kerfeld, C.A. (2010) Structural determinants underlying photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria, *J. Biol. Chem.*, 285, 18364–18375.
- Rakhimberdieva, M.G., Vavilin, D.V., Vermaas, W.F., Elanskaya, I.V., Karapetyan, N.V. (2007) Phycobilin/ chlorophyll excitation equilibration upon carotenoid-induced non-photochemical fluorescence quenching in phycobilisomes of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803, *Biochim Biophys Acta*, 1767, 757–765.
- Gorbunov, M.Y., Kuzminov, F.I., Fadeev, V.V., Kim, J.D., Falkowski, P.G. (2011) A kinetic model of nonphotochemical quenching in cyanobacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 1591–1599.
- Berera, R., van Stokkum, I.H., Gwizdala, M., Wilson, A., Kirilovsky, D., van Grondelle, R. (2012) The photophysics of the orange carotenoid protein, a light-powered molecular switch, *J. Phys. Chem. B*, 116, 2568–2574.
- Tian, L., Gwizdala, M., van Stokkum, I.H., Koehorst, R.B., Kirilovsky, D., van Amerongen, H. (2012) Picosecond kinetics of light harvesting and photoprotective quenching in wild-type and mutant

phycobilisomes isolated from the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803, *Biophys. J.*, **102**, 1692–1700.

- 54. Maksimov, E.G., Schmitt, F.J., Shirshin, E.A., Svirin, M.D., Elanskaya, I.V., Friedrich, T., Fadeev, V.V., Paschenko, V.Z., Rubin, A.B. (2014) The time course of nonphotochemical quenching in phycobilisomes of Synechocystis sp. PCC6803 as revealed by picosecond time-resolved fluorimetry, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 1540–1547.
- 55. Красильников, П. М., Зленко, Д. В., Стадничук, И. Н. (2015). Эффективность нефотохимического тушения флуоресценции фикобилисом оранжевым каротиноидпротеином, *Биофизика*, **60**, 914–921.
- Maksimov, E.G., Klementiev, K.E., Shirshin, E.A., Tsoraev, G.V., Elanskaya, I.V., Paschenko, V.Z. (2015) Features of temporal behavior of fluorescence recovery in Synechocystis sp. PCC6803, *Photosynth*, *Res.*, 125, 167–178.
- Polívka, T., Kerfeld, C.A., Pascher, T., Sundström, V. (2005) Spectroscopic Properties of the Carotenoid 3'-Hydroxyechinenone in the Orange Carotenoid Protein from the Cyanobacterium Arthrospira maxima, *Biochemistry*, 44, 3994–4003.
- Chabera, P., Durchan, M., Shih, P.M., Kerfeld, C.A., Polivka, T. (2011) Excited-state properties of the 16kDa red carotenoid protein from Arthrospira maxima, *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 30–35.
- Slouf, V., Kuznetsova, V., Fuciman, M., de Carbon, C.B., Wilson, A., Kirilovsky, D., Polivka, T. (2017) Ultrafast spectroscopy tracks carotenoid configurations in the orange and red carotenoid proteins from cyanobacteria, *Photosynth. Res.*, 131, 105–117.

- Polívka, T., Chábera, P., Kerfeld, C.A. (2013) Carotenoid-protein interaction alters the S1 energy of hydroxyechinenone in the Orange Carotenoid Protein, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioener*getics, 1827, 248–254.
- Zlenko, D.V., Krasilnikov, P.M., Stadnichuk, I.N. (2016) Role of inter-domain cavity in the attachment of the orange carotenoid protein to the phycobilisome core and to the fluorescence recovery protein, J. Biomol. Struct. Dyn., 34, 486–496.
- 62. Liu, H., Zhang, H., King J, D., Wolf, N.R., Prado, M., Gross, M.L., Blankenship, R.E. (2014) Mass spectrometry footprinting reveals the structural rearrangements of cyanobacterial orange carotenoid protein upon light activation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1955–1963.
- Harris, D., Tal, O., Jallet, D., Wilson, A., Kirilovsky, D., Adir, N. (2016) Orange carotenoid protein burrows into the phycobilisome to provide photoprotection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E1655–E1662.
- 64. Zhang, H., Liu, H., Niedzwiedzki, D.M., Prado, M., Jiang, J., Gross, M.L., Blankenship, R.E. (2014) Molecular mechanism of photoactivation and structural location of the cyanobacterial orange carotenoid protein, *Biochemistry*, 53, 13–19.
- 65. Wilson, A., Punginelli, C., Couturier, M., Perreau, F., Kirilovsky, D. (2011) Essential role of two tyrosines and two tryptophans on the photoprotection activity of the Orange Carotenoid Protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 293–301.
- Kay Holt, T., Krogmann, D.W. (1981) A carotenoid-protein from cyanobacteria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 637, 408–414.

- 67. Leverenz, R.L., Jallet, D., Li, M.D., Mathies, R.A., Kirilovsky, D., Kerfeld, C.A. (2014) Structural and functional modularity of the orange carotenoid protein: distinct roles for the N- and C-terminal domains in cyanobacterial photoprotection, *Plant Cell*, **26**, 426–437.
- Gwizdala, M., Wilson, A., Kirilovsky, D. (2011) In vitro reconstitution of the cyanobacterial photoprotective mechanism mediated by the Orange Carotenoid Protein in Synechocystis PCC 6803, *Plant Cell*, 23, 2631–2643.
- Wilson, A., Gwizdala, M., Mezzetti, A., Alexandre, M., Kerfeld, C.A., Kirilovsky, D. (2012) 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*, 24, 1972–1983.
- Bao, H., Melnicki, M.R., Pawlowski, E.G., Sutter, M., Agostoni, M., Lechno-Yossef, S., Cai, F., Montgomery, B.L., Kerfeld, C.A. (2017) Additional families of orange carotenoid proteins in the photoprotective system of cyanobacteria, *Nat. Plants*, **3**, 17089.
- Maksimov, E.G., Shirshin, E.A., Sluchanko, N.N., Zlenko, D.V., Parshina, E.Y., Tsoraev, G.V., Klementiev, K.E., Budylin, G.S., Schmitt, F.J., Friedrich, T., Fadeev, V.V., Paschenko, V.Z., Rubin, A.B. (2015) The Signaling State of Orange Carotenoid Protein, *Biophys. J.*, 109, 595–607.
- Kerfeld, C.A., Sawaya, M.R., Brahmandam, V., Cascio, D., Ho, K.K., Trevithick-Sutton, C.C., Krogmann, D.W., Yeates, T.O. (2003) The Crystal Structure of a Cyanobacterial Water-Soluble Carotenoid Binding Protein, *Structure*, 11, 55–65.

- 73. Kerfeld, C.A. (2004) Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins of cyanobacteria, *Photosynth. Res.*, **81**, 215–225.
- Kirilovsky, D. (2010) The photoactive orange carotenoid protein and photoprotection in cyanobacteria, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 675, 139–159.
- 75. Kirilovsky, D., Kerfeld, C.A. (2012) The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 158–66.
- Stadnichuk, I.N., Krasilnikov, P.M., Zlenko, D.V., Freidzon, A.Y., Yanyushin, M.F., Rubin, A.B. (2015) Electronic coupling of the phycobilisome with the orange carotenoid protein and fluorescence quenching, *Photosynth. Res.*, **124**, 315–335.
- 77. Gupta, S., Guttman, M., Leverenz, R.L., Zhumadilova, K., Pawlowski, E.G., Petzold, C.J., Lee, K.K., Ralston, C.Y., Kerfeld, C.A. (2015) Local and global structural drivers for the photoactivation of the orange carotenoid protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E5567–E5574.
- 78. Maksimov, E.G., Sluchanko, N.N., Slonimskiy, Y.B., Stepanov, A.V., Shirshin, E.A., Tsoraev, G.V., Klementiev, K.E., Slatinskaya, O.V., Lukashev, E.P., Friedrich, T., Paschenko, V.Z., Rubin, A.B. (2017) The photocycle of orange carotenoid protein conceals distinct intermediates and asynchronous changes in the carotenoid and protein components, *bioRxiv*, https://doi. org/10.1101/167478.
- Shakhnovich, E.I., Finkelstein, A.V. (1989) Theory of cooperative transitions in protein molecules. I. Why denaturation of globular protein is a first-order phase transition, *Biopolymers*, 28, 1667–1680.

- Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas', A.F., Gilmanshin, R.I. (1991) Study of the «Molten Globule» Intermediate State in Protein Folding by a Hydrophobic Fluorescent Probe, *Biopolymers*, 31, 119–128.
- Frauenfelder, H., Fenimore, P.W., Chen, G., McMahon, B.H. (2006) Protein folding is slaved to solvent motions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 15469–15472.
- Hagen, S.J. (2010) Solvent Viscosity and Friction in Protein Folding Dynamics, *Current Protein and Peptide Science*, 11, 385–395.
- 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. (2016) A comparative study of three signaling forms of the orange carotenoid protein, *Photosynthesis Research*, **130**, 389–401.
- 84. Sluchanko, N.N., Klementiev, K.E., Shirshin, E.A., Tsoraev, G.V., Friedrich, T., Maksimov, E.G. (2017) The purple Trp288Ala mutant of Synechocystis OCP persistently quenches phycobilisome fluorescence and tightly interacts with FRP, *Biochim. Biophys. Acta*, 1858, 1–11.
- Leverenz, R.L., Sutter, M., Wilson, A., Gupta, S., Thurotte, A., de Carbon, C.B., Petzold, C.J., Ralston, C., Perreau, F., Kirilovsky, D. (2015) A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection, *Science*, 348, 1463–1466.
- Maksimov, E.G., Sluchanko, N.N., Mironov, K.S., Shirshin, E.A., Klementiev, K.E., Tsoraev, G.V., Moldenhauer, M., Friedrich, T., Los, D.A., Allakhverdiev, S.I., Pa-

schenko, V.Z., Rubin, A. B. (2017) Fluorescent Labeling Preserving OCP Photoactivity Reveals Its Reorganization during the Photocycle, *Biophysical Journal*, **112**, 46–56.

- Kish, E., Pinto, M.M., Kirilovsky, D., Spezia, R., Robert, B. (2015) Echinenone vibrational properties: From solvents to the orange carotenoid protein, *Biochim. Biophys. Acta*,1847, 1044–1054.
- Bandara, S., Ren, Z., Lu, L., Zeng, X., Shin, H., Zhao, K.-H., Yang, X. (2017) Photoactivation mechanism of a carotenoid-based photoreceptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 6286–6291.
- Thurotte, A., Lopez-Igual, R., Wilson, A., Comolet, L., Bourcier de Carbon, C., Xiao, F., Kirilovsky, D. (2015) Regulation of Orange Carotenoid Protein Activity in Cyanobacterial Photoprotection, *Plant Physiol.*, **169**, 737–747.
- Sluchanko, N.N., Slonimskiy, Y.B., Moldenhauer, M., Friedrich, T., Maksimov, E.G. (2017) Deletion of the short N-terminal extension in OCP reveals the main site for FRP binding, *FEBS Lett.*, **591**, 1667–1676.
- 91. Liu, H., Zhang, H., Orf, G.S., Lu, Y., Jiang, J., King, J.D., Wolf, N.R., Gross, M.L., Blankenship, R.E. (2016) Dramatic Domain Rearrangements of the Cyanobacterial Orange Carotenoid Protein upon Photoactivation, *Biochemistry*, 55, 1003–1009.
- 92. Zhang, H., Liu, H., Lu, Y., Wolf, N.R., Gross, M.L., Blankenship, R.E. (2016) Native Mass Spectrometry and Ion Mobility Characterize the Orange Carotenoid Protein Functional Domains, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1857, 734–739.
- 93. Maksimov, E.G., Sluchanko, N.N., Slonimskiy, Y.B., Mironov, K.S.,

Klementiev, K.E., Moldenhauer, M., Friedrich, T., Los, D.A., Paschenko, V.Z., Rubin, A.B. (2017) The unique protein-to-protein carotenoid transfer mechanism, *Biophysical Journal*, **113**, 402–413.

- 94. Boulay, C., Wilson, A., D'Haene, S., Kirilovsky, D. (2010) Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCPrelated photoprotective mechanism in cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 11620–11625.
- 95. Gwizdala, M., Wilson, A., Omairi-Nasser, A., Kirilovsky, D. (2013) Characterization of the Synechocystis PCC 6803 Fluorescence Recovery Protein involved in photoprotection, *Biochim Biophys Acta*, 1827, 348–354.
- 96. Sutter, M., Wilson, A., Leverenz, R.L., Lopez-Igual, R., Thurotte, A., Salmeen, A.E., Kirilovsky, D., Kerfeld, C.A. (2013) Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **110**, 10022–10027.
- 97. 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. (2017) Biophysical modeling of in vitro and in vivo processes underlying regulated photoprotective mechanism in cyanobacteria, *Photosynthesis Research*, 133(1-3), 261–271.
- 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. (2017) Native Mass Spectrometry Analysis of Oligomerization States of Fluorescence Recovery Protein and Orange Carotenoid Protein: Two Proteins Involved in the Cyanobacterial Photoprotection Cycle, *Biochemistry*, 56, 160–166.

- 99. Moldenhauer, M., Sluchanko, N.N., Tavraz, N.N., Junghans, C., Buhrke, D., Willoweit, M., Chiappisi, L., Schmitt, F.-J., Vukojević, V., Shirshin, E.A., Ponomarev, V.Y., Paschenko, V.Z., Gradzielski, M., Maksimov, E.G., Friedrich, T. (2017) Interaction of the signaling state analog and the apoprotein form of the orange carotenoid protein with the fluorescence recovery protein, *Photosynthesis Research*, 10.1007/s11120-017-0346-2.
- King, J.D., Liu, H., He, G., Orf, G.S., Blankenship, R.E. (2014) Chemical activation of the cyanobacterial orange carotenoid protein, *FEBS Lett.*, 588, 4561–5465.
- 101. Dagnino-Leone, J., Figueroa, M., Mella, C., Vorphal, M. A., Kerff, F., Vásquez, A. J., Bunster, M., Martínez-Oyanedel, J. (2017) Structural models of the different trimers present in the core of phycobilisomes from Gracilaria chilensis based on crystal structures and sequences, *PLOS ONE*. 12, e0177540.
- Gantt, E., Lipschultz, C.A. (1972) Phycobilisomes of Porphyridium cruentum, 1. Isolation, *Journal of cell biology*, 54, 313–324.
- 103. Стадничук, И. Н., Янюшин, М. Ф., Жармухамедов, С. К., Максимов, Е. Г., Муронец, Е. М., Пащенко, В. З. (2011). Тушение флуоресценции фикобилисом оранжевым каротиноид-протеином, Доклады Академии наук, 439, 270–273.
- 104. Stadnichuk, I.N., Yanyushin, M.F., Maksimov, E.G., Lukashev, E.P., Zharmukhamedov, S.K., Elanskaya, I.V., Paschenko, V.Z. (2012) Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803, *Biochimica et Biophy*-

sica Acta – Bioenergetics, **1817**, 1436–1445.

- 105. Stadnichuk, I.N., Yanyushin, M.F., Bernát, G., Zlenko, D.V., Krasilnikov, P.M., Lukashev, E.P., Maksimov, E.G., Paschenko, V.Z. (2013) Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 detected in vivo and in vitro, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **125**, 137–145.
- 106. Gao, X., Wei, T.-D., Zhang, N., Xie, B.-B., Su, H.-N., Zhang, X.-Y., Chen, X.-L., Zhou, B.-C., Wang, Z.-X., Wu, J.-W., Zhang, Y.-Z. (2012) Molecular insights into the terminal energy acceptor in cyanobacterial phycobilisome, *Molecular Microbiology*, 85, 907–915.
- 107. Tang, K., Ding, W.-L., Höppner, A., Zhao, C., Zhang, L., Hontani, Y., Kennis, J.T.M., Gärtner, W., Scheer, H., Zhou, M., Zhao, K.-H. (2015) The terminal phycobilisome emitter, LCM: A light-harvesting pigment with a phytochrome chromophore, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **112**, 15880–15885.
- 108. Houmard, J., Capuano, V., Colombano, M. V., Coursin, T., Tandeau de Marsac, N. (1990) Molecular characterization of the terminal energy acceptor of cyanobacterial phycobilisomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2152–2156.
- 109. Stadnichuk, I.N., Yanyushin, M.F., Maksimov, E.G., Lukashev, E.P., Zharmukhamedov, S.K., Elanskaya, I.V., Paschenko, V.Z. (2012) Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1436–1445.

- 110. Stadnichuk, I.N., Yanyushin, M.F., Bernat, G., Zlenko, D.V., Krasilnikov, P.M., Lukashev, E.P., Maksimov, E.G., Paschenko, V.Z. (2013) Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 detected in vivo and in vitro, J. Photochem. Photobiol. B., **125**, 137–145.
- 111. Elanskaya, I.V., Kononova, I.A., Lukashev, E.P., Bolychevtseva, Y.V., Yanushin, M.F., Stadnichuk, I.N. (2016) Functions of chromophore-containing domain in the large linker LCM- polypeptide of phycobilisome, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **471**, 403–406.
- 112. Mimuro, M., Gantt, E. (1986) A high molecular weight terminal pigment («anchor polypeptide») and a minor blue polypeptide from phycobilisomes of the cyanobacterium Nostoc sp. (MAC): Isolation and characterization, *Photosynthesis Research*, **10**, 201–208.
- Gambetta, G.A., Lagarias, J.C. (2001) Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 10566–10571.
- 114. Miao, D., Ding, W.L., Zhao, B.Q., Lu, L., Xu, Q.Z., Scheer, H., Zhao, K.H. (2016) Adapting photosynthesis to the near-infrared: non-covalent binding of phycocyanobilin provides an extreme spectral red-shift to phycobilisome core-membrane linker from Synechococcus sp. PCC7335, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857, 688–694.
- 115. Ma, Q., Zhou, N., Zhou, M. (2016) Energy transfer between fusion biliproteins co-expressed with phycobiliprotein in Escherichia coli, *Protein expression and purification*, **126**, 84–88.

- Wu, Y.P., Krogmann, D.W. (1997) The orange carotenoid protein of Synechocystis PCC 6803, *Biochim. Biophys. Acta*, 1322, 1–7.
- 117. Thurotte, A., Bourcier de Carbon, C., Wilson, A., Talbot, L., Cot, S., Lopez-Igual, R., Kirilovsky, D. (2017) The cyanobacterial Fluorescence Recovery Protein has two distinct activities: Orange Carotenoid Protein amino acids involved in FRP interaction, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 308–317.
- 118. Lu, Y., Liu, H., Saer, R., Li, V. L., Zhang, H., Shi, L., Goodson, C., Gross, M. L., Blankenship, R. E. (2017) A Molecular Mechanism for Nonphotochemical Quenching in Cyanobacteria, *Biochemistry*. 56(22), 2812–2823.
- Moldenhauer, M., Sluchanko, N.N., Buhrke, D., Zlenko, D.V., Tavraz, N.N., Schmitt, F.-J., Hildebrandt, P., Maksimov, E.G., Friedrich, T. (2017) Assembly of photoactive orange carotenoid protein from its domains unravels a carotenoid shuttle mechanism, *Photosynthesis Research*, 133, 327–341.
- de Carbon, C.B., Thurotte, A., Wilson, A., Perreau, F., Kirilovsky, D. (2015) Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in Escherichia coli, *Sci. Rep.*, 5, 9085.
- 121. Melnicki, M.R., Leverenz, R.L., Sutter, M., López-Igual, R., Wilson, A., Pawlowski, E.G., Perreau, F., Kirilovsky, D., Kerfeld, C.A. (2016) Structure, Diversity, and Evolution of a New Family of Soluble Carotenoid Binding Proteins in Cyanobacteria, *Molecular Plant*, 9, 1379–1394.
- Lechno-Yossef, S., Melnicki, M.R., Bao, H., Montgomery, B.L., Kerfeld, C.A. (2017) Synthetic OCP heterodimers are photoactive and

recapitulate the fusion of two primitive carotenoproteins in the evolution of cyanobacterial photoprotection, *The Plant journal for cell and molecular biology*, **91**, 646–656.

- 123. Liu, H., Lu, Y., Wolf, B., Saer, R., King, J. D., Blankenship, R. E. (2017) Photoactivation and relaxation studies on the cyanobacterial orange carotenoid protein in the presence of copper ion, *Photosynth. Res.* 10.1007/s11120-017-0363-1.
- 124. Kerfeld, C.A., Melnicki, M.R., Sutter, M., Dominguez-Martin, M.A. (2017) Structure, function and evolution of the cyanobacterial orange carotenoid protein and its homologs, *New Phytol.*, 215, 937–951.
- 125. Lopez-Igual, R., Wilson, A., Leverenz, R.L., Melnicki, M.R., Bourcier de Carbon, C., Sutter, M., Turmo, A., Perreau, F., Kerfeld, C.A., Kirilovsky, D. (2016) Different Functions of the Paralogs to the N-Terminal Domain of the Orange Carotenoid Protein in the Cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120, *Plant Physiol.*, **171**, 1852–1866.
- 126. Mares, J., Hrouzek, P., Kana, R., Ventura, S., Strunecky, O., Komarek, J. (2013) The Primitive Thylakoid-Less Cyanobacterium Gloeobacter Is a Common Rock-Dwelling Organism, *PLoS One*, 8, e66323.
- 127. Bernat, G., Schreiber, U., Sendtko, E., Stadnichuk, I.N., Rexroth, S., Rogner, M., Koenig, F. (2012) Unique properties vs. common themes: the atypical cyanobacterium Gloeobacter violaceus PCC 7421 is capable of state transitions and blue-light-induced fluorescence quenching, *Plant Cell Physiol.*, 53, 528–542.

Н.Н.Случанко и соавт.

- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular biology and evolution*, 33, 1870–1874.
- 129. Watanabe, M., Ikeuchi, M. (2013) Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex, *Photosynth Res.*, **116**, 265–276.