

На правах рукописи

Обухов Юрий Николаевич

**Исследование фотохимических свойств
водорастворимых хлорофилл-связывающих
белков семейства WSCP-II**

1.5.4. Биохимия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2026

Работа выполнена в лаборатории экологической и эволюционной биохимии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель: Крицкий Михаил Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории экологической и эволюционной биохимии Института биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.

Официальные оппоненты:

Борисова Мария Мансуровна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией фотосинтетического электронного транспорта Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук».

Богачев Александр Валерьевич, доктор биологических наук, заведующий отделом молекулярной энергетики микроорганизмов Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая научная организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук».

Защита состоится «26» ноября 2026 г. в 14-00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе ФИЦ Биотехнологии РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

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

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Орловский А. Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Белки семейства WSCP (Water Soluble Chlorophyll-binding Proteins) представляют собой водорастворимые растительные белки, которые связывают хлорофилл (Хл), но не локализованы в хлоропластах и не участвуют в процессе фотосинтеза. Водорастворимость Хл-белковых комплексов WSCP отличает данные белки от большинства других Хл-связывающих белков, которые так или иначе ассоциированы с липидной мембраной. Функции белков семейства WSCP в организмах не вполне ясны. Существующие гипотезы связывают активность этих белков с развитием в растительном организме ответа на стресс и функционированием антистрессовых систем [Satoh et al., 2001; Takahashi et al., 2012].

Белки семейства WSCP подразделяют на два филогенетически неродственных и структурно различных класса – класс I и класс II. Белки WSCP класса I (WSCP-I) содержат домен DUF538 и отличаются способностью к фотоконверсии, т.е. изменению под воздействием света химической структуры связанного хромофора и, как следствие, его спектра поглощения.

Список используемых сокращений:

BoWSCP - водорастворимый хлорофилл-связывающий белок из *Brassica oleracea*

LvWSCP - водорастворимый хлорофилл-связывающий белок из *Lepidium virginicum*

WSCP - Water-Soluble Chlorophyll-binding Protein,

Водорастворимый хлорофилл-связывающий белок

WSCP-I - Water-Soluble Chlorophyll-binding Protein класса I

WSCP-II - Water-Soluble Chlorophyll-binding Protein класса II

АФК – активные формы кислорода

КД – круговой дихроизм

ПААГ – полиакриламидный гель

ПБК – пигмент-белковый комплекс

ФИЦ ХФ РАН - Федеральный исследовательский центр
химической физики имени Н. Н. Семёнова Российской
академии наук

Хл – хлорофилл

Функциональное значение данных свойств для белков WSCP-I, как и их трехмерная структура, неизвестны [Sato et al., 2001; Gholizadeh, 2017].

В отличие от белков WSCP-I, представители WSCP класса II (WSCP-II) содержат структурный мотив ингибиторов протеаз Кунитц-типа, а также у них отсутствует явление фотоконверсии [Sato et al., 2001; Bednarczyk et al., 2016].

Находящиеся в составе Хл-белковых комплексов WSCP-II молекулы Хл организованы в виде двух симметричных димеров внутри гидрофобной зоны белкового матрикса [Bednarczyk et al., 2016]. Такая организация молекул пигмента демонстрирует конвергентное сходство с димерной упаковкой Хл (бактериохлорофилла) в так называемой «специальной паре» реакционных центров фотосистем фототрофных организмов. Именно «специальная пара», т.е. молекулярный димер Хл, служит ключевым звеном первичного фотохимического разделения зарядов – процесса, при котором энергизованная молекула Хл передаёт электрон на молекулу первичного акцептора. Фотохимическая активность «специальной пары» этим не исчерпывается: в условиях светового стресса молекулы Хл в «специальной паре» P680 фотосистемы II могут переходить в триплетно-возбужденное состояние ($^3\text{Хл}$) и генерировать активные формы кислорода (АФК), вызывающие разнообразные редокс-реакции [Neverov, Krasnovsky et al., 2015; Zabelin, Neverov et al., 2016].

При планировании данного диссертационного исследования была поставлена задача ответить на вопрос: способен ли Хл в составе связанных с белком WSCP-II димеров, аналогично Хл «специальной пары» проявлять фотохимическую активность в окислительно-восстановительных реакциях? До проведения нашей работы чёткий ответ на этот вопрос отсутствовал. При этом в литературе присутствовали противоречивые сведения о свойствах триплетного состояния Хл в холобелках WSCP и генерации синглетного кислорода [Schmidt et al., 2003; Takahashi et al., 2012; Agostini et al., 2017].

Возникает вопрос, проявляют ли Хл-содержащие комплексы белков WSCP-II фотохимическую активность? Ответ на этот вопрос позволил бы пролить свет на функциональные роли данных белков в антистрессовых ответах растений, создать новые модели для

исследования проблем фотобиохимической эволюции, а также помочь в конструировании средств фотодинамической терапии.

Цель настоящей работы состояла в анализе способности димеров Хл в холобелках WSCP-II к проявлению фотохимической активности. Работа была сосредоточена в двух направлениях: (1) выявление наиболее ранней фотохимической активности после поглощения Хл в составе WSCP-II кванта света, а также (2) выяснение фотохимической редокс-активности в отношении экзогенных акцепторов и доноров электрона при облучении светом.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **экспериментальные задачи**:

1. Получить методом гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli* апобелки WSCP-II, осуществить их самосборку в Хл-белковые комплексы и охарактеризовать полученные холобелки электрофоретическими и спектроскопическими методами.
2. Проанализировать спектроскопические изменения в холобелках WSCP-II в фемто- и пикосекундном диапазонах времени после их возбуждения световым импульсом для выявления свидетельств их фотохимической активности.
3. Исследовать способность холобелков WSCP-II фотосенсибилизировать редокс-реакции с экзогенными донорами и акцепторами электрона. Провести экспериментальный анализ механизмов фотопроцессов.
4. Исследовать устойчивость Хл в холобелках WSCP-II к изменению таких факторов окружающей среды, как световое облучение, температура и изменение значения рН среды.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в экспериментальной демонстрации фотохимической активности пигмент-белковых комплексов (ПБК) WSCP-II в виде фотосенсибилизации ими окислительно-восстановительных реакций с участием АФК и других экзогенных молекул. Такая демонстрация вносит вклад в понимание физиологических антистрессовых функций данной группы белков. Практическая значимость работы заключается в создании предпосылок к использованию холобелков

WSCP-II для конструирования фотокатализаторов, биотехнологических препаратов, а также средств для фотодинамической терапии.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Получено свидетельство оттока энергии возбуждения в холобелках BoWSCP на протекание сверхбыстрой фотохимической реакции между связанным Хл и остатками триптофана в его аминокислотном окружении.
- 2) Выявлена способность холоформ белков семейства WSCP-II к фотоиндуцированному окислению экзогенных доноров электрона – NADH и аскорбата. Показано, что оно реализуется согласно механизму, опосредованному генерацией синглетного кислорода.
- 3) Выявлена способность холоформ белков семейства WSCP-II к фотоиндуцированному восстановлению экзогенного цитохрома с. Данное восстановление опосредовано участием супероксидных анион-радикалов.
- 4) Выявлена устойчивость холобелков WSCP-II к таким факторам среды, как световое облучение, температурное воздействие и изменение значения pH среды.

Степень разработанности темы исследования

К началу выполнения данной работы отсутствовали свидетельства о проявлении холобелками WSCP-II фотохимических свойств в фемто- и пикосекундном диапазонах времени после возбуждения светом. Также отсутствовали данные о фотохимическом взаимодействии холобелков WSCP-II с экзогенными донорами и акцепторами электрона и о механизмах данного взаимодействия. Целенаправленное исследование устойчивости холобелков WSCP-II к изменениям факторов среды также ранее не проводилось.

Научная новизна

В настоящей работе в фемтосекундном временном интервале после возбуждения светом холобелков BoWSCP показан отток энергии возбуждения в них на протекание сверхбыстрой фотохимической реакции между связанным Хл и остатками триптофана в его аминокислотном окружении. Впервые экспериментально продемонстрировано наличие у холобелков

WSCP-II фотохимической активности, проявляющейся в индукции димерами Хл в составе холобелков WSCP фотопроцессов окисления доноров (NADH и аскорбата) и восстановления акцептора электрона (цитохром *c*). Изучение механизмов этих фотохимических реакций в данной работе показало, что фотоиндуцированное холобелками WSCP окисление NADH и аскорбата происходит через генерацию Хл синглетного кислорода, а восстановление цитохрома *c* – через образование супероксидного анион-радикала. Показана устойчивость структуры холобелка и хромофорной группы WSCP-II к процессам сенсibilизации ими фотохимических реакций, к действию светового излучения, а также к изменениям температуры и pH среды.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в работе результатов определяется следующими факторами:

- Качество и нативность получаемых в ходе работы препаратов апобелков и холобелков контролировали путём проверки структуры экспрессионного вектора (рестрикционный анализ ДНК плазмид и секвенирование целевых генов WSCP для подтверждения отсутствия делеций и мутаций), путём проверки качества очистки получаемых препаратов (методами денатурирующего и нативного электрофореза в ПААГ), а также проверки совпадения спектральных свойств препаратов с опубликованными в литературе данными (абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма (КД)).

- Фотохимические эксперименты выполняли не менее чем в трёх независимых повторностях, результаты обрабатывали с использованием стандартных приёмов математической статистики. Исследование холобелков WSCP-II методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» проводили на уникальном оборудовании ФИЦ химической физики имени Н. Н. Семёнова РАН (ФИЦ ХФ РАН).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus. Также результаты представлены в виде материалов 11 профильных научных конференций.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в выполнении всего объема экспериментальной работы. Исследование холобелков WSCP-II методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» проводили на оборудовании ФИЦ ХФ РАН совместно с Д.А. Черепановым, А.В. Айбушем, Г.Е. Милановским и В.А. Надточенко. Автором выполнен также весь объем работ по оформлению результатов и заключений, а также написанию текста диссертации и автореферата.

Методология и методы исследования

Гены целевых белков WSCP присутствовали в векторах для бактериальной экспрессии *pet24b+*, и их белковые продукты содержали на конце последовательности полигистидиновый участок. Векторы были получены от зарубежных коллег (Prof. Dr. Hiroyuki Satoh, Toho University, Япония, а также Dr. Mara Werwie и Prof. Dr. Harald Paulsen, Johannes Gutenberg University, Mainz, Германия). Белки WSCP, использованные в работе, экспрессировали в клетках штамма *Escherichia coli* BL21(DE3).

Экспрессию белков WSCP в клетках *Escherichia coli* индуцировали с помощью изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG), затем клетки лизировали ультразвуком, а целевые апобелки выделяли из лизата методом аффинной хроматографии на Ni-агарозе. Для получения препаратов холобелков использовали оптимизированную методику, при которой лизат клеток инкубировали в течение часа с предварительно свежеприготовленным из листьев шпината осадком тилакоидов и затем предварительно очищали от посторонних белков 10-минутным прогреванием до 100 °C. Денатурированные белки осаждали центрифугированием, а супернатант очищали методом аффинной хроматографии на Ni-агарозе.

Чистоту и нативность полученных препаратов холобелков WSCP оценивали с помощью методов нативного электрофореза в ПААГ и денатурирующего электрофореза в ПААГ по Лэммли, методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, а также спектроскопии КД.

Изучение процессов, происходящих в холобелках BoWSCP в фемто- и пикосекундном диапазоне времени после облучения светом, осуществляли на уникальном оборудовании ФИЦ ХФ РАН –

установке для широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» совместно с вышеперечисленными сотрудниками данного центра.

Для проведения экспериментов по исследованию редокс-реакций, индуцируемых возбужденным Хл в составе холобелков WSCP, экспериментальную смесь в кварцевой кювете облучали красным светом ($\lambda \geq 650$ нм), который поглощался только Хл в составе холобелка WSCP. Интенсивность облучения варьировали с помощью нейтральных светофильтров в диапазоне от 250 до $1800 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Изменение концентрации экзогенных участников редокс-реакций регистрировали по их спектрам поглощения с использованием коэффициентов молярной экстинкции, взятых из литературы.

Температуру препаратов холобелков WSCP в ходе измерений их спектров поглощения изменяли с помощью пропускания воды с заданной температурой через водяную рубашку кюветодержателя спектрофотометра. Значения pH растворов препаратов холобелков WSCP контролировали с помощью pH-метра и изменяли непосредственно перед измерением их спектров поглощения путём добавления растворов щелочей или кислот к препарату.

Финансовая поддержка

Выполнение работы частично финансировалось грантом РФФИ №21-74-20155 (2021–2024 гг.). Грант был посвящен «проведению исследований на базе существующей научной инфраструктуры мирового уровня» с использованием уникального оборудования ЦКП ФИЦ ХФ РАН. Руководитель гранта – М.С. Крицкий.

Структура и объем работы

Научно-квалификационная работа включает 126 страниц машинописного текста, 1 таблицу, 36 рисунков и содержит разделы «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заклучение», «Выводы», «Список литературы» и «Благодарности». Список цитированной литературы включает 161 источник.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы в диссертационной работе посвящен описанию свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков семейства WSCP. В нём описаны в том числе исторические, филогенетические и структурные различия между белками WSCP-I и WSCP-II, приведены опубликованные на момент начала диссертационной работы сообщения о фотохимической активности данных групп белков, а также изложены современные представления о возможных физиологических функциях данных белков в растениях.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Получение и характеристика белковых препаратов

Анализ полученных препаратов апобелков WSCP-II методами денатурирующего и нативного электрофореза белков в ПААГ показал, что апобелки имели ожидаемую молекулярную массу около 20 кДа, а препараты не содержали примеси посторонних белков. Спектры поглощения препаратов холобелков LvWSCP и BoWSCP совпадали со спектрами нативных холобелков, опубликованными в литературе. Анализ опубликованных в литературе спектров поглощения WSCP-II-Хл *a* и WSCP-II-Хл *b* в диапазонах 460-480 нм и 660-680 нм показал, что препараты холобелков BoWSCP содержали 7-10% Хл *b* и 90-93% Хл *a*, а препараты холобелков LvWSCP – до 43% Хл *b* и не менее 57% Хл *a*. Эти значения, как и спектры флуоресценции препаратов, также соответствовали данным литературы.

Для правильного понимания фотохимических свойств холобелков WSCP-II важно знать, как организована в них хромофорная группа, т.е. представлена ли она мономерами или димерами Хл. Присутствие димера Хл в составе холобелков BoWSCP и LvWSCP, согласно данным литературы, проявляется на спектре кругового дихроизма в виде двух симметричных, но разнонаправленных пиков [Клейтон и др., 1984; Фрайфелдер, 1980]. На измеренных спектрах кругового дихроизма ПБК BoWSCP и LvWSCP в области 600-700 нм (соответствует поглощению Хл в Q_y-переходе) присутствуют два симметричных и разнонаправленных пика, что свидетельствует о наличии димеров Хл в составе

холобелков WSCP и о нативности пигментной структуры комплексов.

Приведенная выше разносторонняя характеристика полученных препаратов холобелков BoWSCP и LvWSCP важна для корректного понимания результатов, полученных при исследовании фотохимических свойств Хл в составе данных холобелков.

2. Спектроскопический анализ процессов, происходящих в холобелках BoWSCP в фемтосекундном диапазоне времени после облучения светом

С целью изучения процессов, происходящих в холобелках BoWSCP сразу после облучения светом, совместно с упомянутыми ранее сотрудниками ФИЦ ХФ РАН на уникальном оборудовании данного центра было проведено измерение абсорбционной динамики молекул Хл в холобелках BoWSCP методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование». Возбуждение образцов проводили импульсами в областях длин волн 430 нм (длительность – 40 фс, энергия – 20 нДж) и 670 нм (длительность – 16 фс, энергия – 15 нДж) [Черепанов и др., 2023]. В результате измерений получали переходные спектры поглощения, которые фиксировали разницу между спектрами поглощения препарата до и спустя время после возбуждающего импульса.

Спустя 50 фс после возбуждения светом наибольшее фотовыцветание в переходных спектрах поглощения наблюдали в полосе поглощения Q_y , причём амплитуда этого выцветания в случае возбуждения светом в 670 нм была выше, чем при возбуждении светом в 430 нм (рисунок 1А). Данное различие можно объяснить отрицательным вкладом в переходный спектр поглощения при возбуждении светом 670 нм стимулированного излучения перехода $S_1 \rightarrow S_0$ в Хл, которое отсутствовало при возбуждении светом 430 нм. Через 200 пс после возбуждения светом процессы внутримолекулярной конверсии $S_3 \rightarrow S_1$ в Хл уже завершаются, устанавливается тепловое равновесие в распределении экситонных состояний, и, как следствие, измеренные после возбуждения светом 430 нм и 670 нм переходные спектры должны совпасть. Было зафиксировано, однако, что разница в выцветании полосы Q_y между переходными спектрами с разным возбуждающим светом сохраняется даже спустя 200 пс (рисунок 1В).

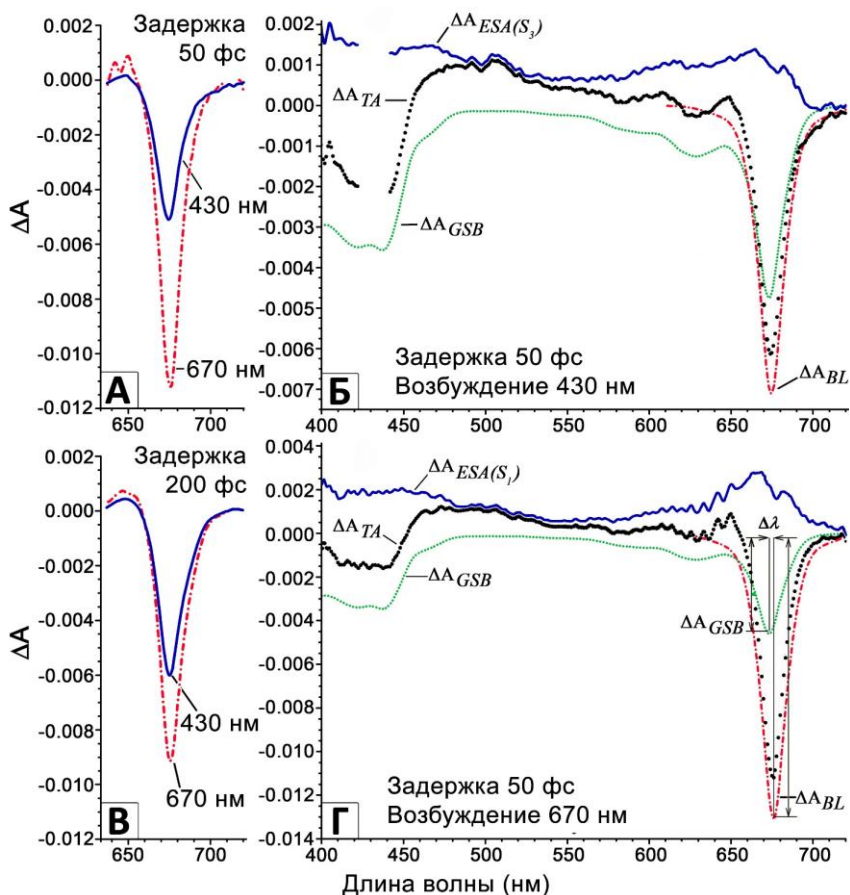


Рисунок 1. А и В – переходные спектры поглощения VoWSCP в области полосы Q_y с временной задержкой до момента измерения 50 фс и 200 пс, инициированные возбуждением на длинах волн 430 нм и 670 нм. Спектры нормированы на выцветание в области полосы Core 400–500 нм при задержке 200 пс; угол поляризации – $54,7^\circ$. Б и Г – Разложение переходных спектров поглощения VoWSCP (ΔA_{TA}) на компоненты: спектр выцветания основного состояния (ΔA_{GSB}), спектр поглощения возбужденного состояния (ΔA_{ESA}) и спектр выцветания в области стимулированного излучения (ΔA_{BL}). $\Delta\lambda$ – сдвиг Стокса. Спектры инициированы возбуждением на длинах волн 430 нм и 670 нм с временной задержкой до момента измерения 50 фс.

Для объяснения этого факта переходные спектры поглощения, полученные при задержке 50 фс после возбуждения светом 430 нм и 670 нм, разложили на такие три отдельные компоненты, как спектр выцветания основного состояния (ΔA_{GSB} , отрицательный вклад), спектр поглощения возбужденного состояния (ΔA_{ESA} , положительный вклад) и спектр выцветания в области стимулированного излучения (ΔA_{BL} , отрицательный вклад). Данное разложение (рисунок 1БГ) показало, что стимулированное излучение в состоянии S_1 , которое было получено путём внутримолекулярной конверсии из состояния S_3 (возбуждение при 430 нм в пик B_x), характеризуется примерно вдвое меньшей амплитудой в сравнении со стимулированным излучением в состоянии S_1 , образующимся после прямого возбуждения состояния S_1 на 670 нм (пик Q_y). Эта разница указывает на частичную потерю энергии возбуждения, проявляющуюся в том, что не все возбужденные в S_3 молекулы Хл претерпевают процесс релаксации $S_3 \rightarrow S_1$.

Ранее было показано, что в холобелках LvWSCP происходит реакция фотовосстановления триптофана $Chl^* \rightarrow Chl^{+}Trp^{-}$. Эта реакция была зарегистрирована с малым квантовым выходом в часовом временном интервале методом спектроскопии «выжигание провалов» при температуре 4 °K [Kell et al., 2016]. На основании этих данных можно предположить, что обнаруженная в ходе исследований в BoWSCP потеря энергии возбуждения возникала в результате сверхбыстрой фотохимической реакции окисления Хл и восстановления одного из остатков триптофана, которая, предположительно, конкурирует с реакцией внутримолекулярной конверсии [Черепанов и др., 2023]. Таким образом, был обнаружен признак проявления холобелками BoWSCP фотохимической активности, регистрируемой в фемтосекундных диапазонах времени после возбуждения светом.

Заслуживает внимания тот факт, что признак процесса фотовосстановления триптофана наблюдался при облучении светом 430 нм, а зафиксировать данный процесс при облучении светом 670 нм с помощью использованного метода было технически невозможно. В контексте данной работы первостепенную ценность имеет сам факт возможности Хл в составе холобелка BoWSCP участвовать в фотохимической реакции со своим аминокислотным окружением.

3. Исследование фотосенсибилизированного холобелками WSCP-II окисления экзогенных доноров электрона

Для проверки возможности взаимодействия ПБК WSCP-II с экзогенным донором электрона подвергали облучению красным светом с $\lambda \geq 650$ нм растворы холобелков BoWSCP и LvWSCP в присутствии донора электрона – NADH либо аскорбата. Было зафиксировано снижение интенсивности пиков поглощения NADH и аскорбата при облучении светом как холобелков BoWSCP, так и LvWSCP. В темноте спектр поглощения не изменялся. Значительных различий в кинетике фотоокисления доноров холобелками BoWSCP и LvWSCP не было выявлено. После вытеснения кислорода аргоном окисление NADH и аскорбата наблюдалось лишь в первые минуты, а затем прекращалось, предположительно, из-за окончательного израсходования остатков кислорода в смеси (рисунок 2).

Также наблюдали снижение скорости окисления NADH и аскорбата в присутствии азидата натрия – известного тушителя синглетного кислорода (рисунок 3). При одинаковых условиях эксперимента (освещение и концентрация компонентов) окисление аскорбата происходило в 2,4 раза быстрее, чем окисление NADH, что близко к соотношению значений констант тушения молекул синглетного кислорода аскорбатом ($4 \pm 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$) и NADH ($2,1 \pm 0,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$). Таким образом можно заключить, что холобелки WSCP-II в присутствии кислорода фотосенсибилизируют окисление NADH и аскорбата согласно механизму второго типа [Foote, 1976], связанному с генерацией АФК.

4. Исследование фотосенсибилизированного холобелками WSCP-II восстановления экзогенного акцептора электрона – цитохрома c

Для проверки возможности взаимодействия ПБК WSCP с внешним акцептором электрона инкубировали на свету холобелки BoWSCP и LvWSCP в присутствии окисленной формы цитохрома c. В ходе данных опытов наблюдали восстановление цитохрома c, причём восстановление происходило значительно активнее при облучении красным светом, чем в темноте. При этом в отсутствие холобелков WSCP восстановление цитохрома c не происходило как при облучении светом, так и без него. Можно заключить, что исследованные холобелки BoWSCP и LvWSCP способны к фотохимическому восстановлению цитохрома c.

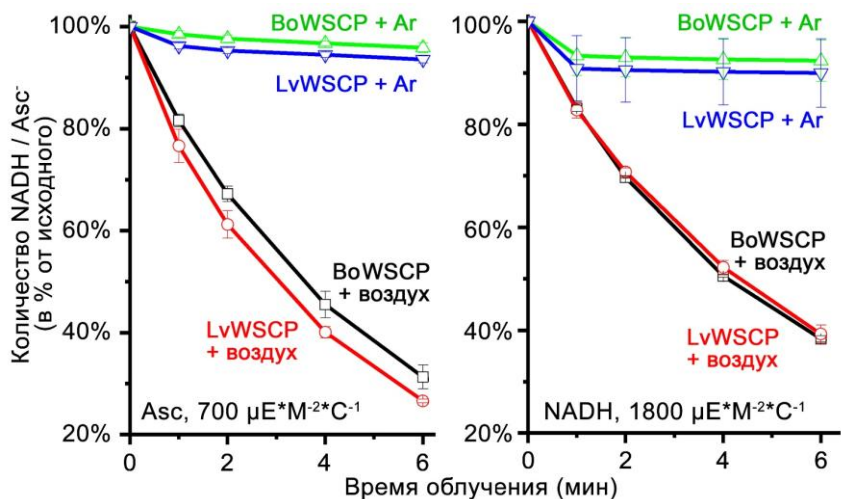


Рисунок 2. Изменение концентрации аскорбата и NADH при различном времени их инкубации на свету в смеси либо с холобелками BoWSCP в атмосфере воздуха (чёрный, ■) и при продувке аргоном (зеленый, ▲), либо с холобелками LvWSCP в атмосфере воздуха (красный, ●) и при продувке аргоном (синий, ▼). Концентрация BoWSCP/LvWSCP – $OD_{673/663} = 0,1$; аскорбат или NADH – 100 мкМ. Интенсивность облучения – 700 (аскорбат) или 1800 (NADH) $\mu E \times M^{-2} \times c^{-1}$. Буфер – Трис-HCl 10 mM (pH 8,0). Опыты проводили либо в атмосфере воздуха, либо после 10-минутной продувки проб аргоном.

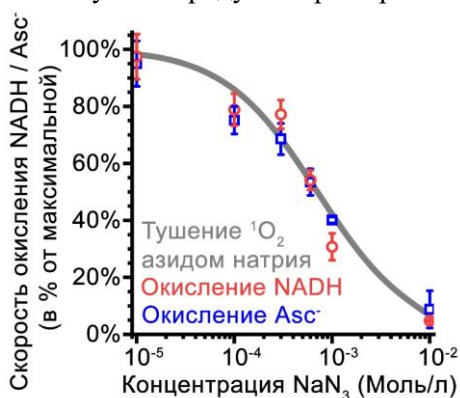


Рисунок 3. Процент ингибирования скорости фотосенсибилизированного холобелками BoWSCP окисления NADH (красный, ●) и аскорбата (синий, ■) при различной концентрации азид натрия.

Предварительная продувка проб аргоном, вытесняющим кислород из раствора, полностью предотвращала восстановление цитохрома с, что говорит об участии кислорода в фотохимическом процессе. Было известно, что цитохром с способен восстанавливаться при взаимодействии с супероксидным анион-радикалом [Korpenol et al., 1976], и данное восстановление ингибируется в присутствии ионов меди или супероксиддисмутазы, каждый из которых устраняет анион-радикалы супероксида из среды. Согласно полученным результатам, и хлорид меди (в концентрации выше 100 мкМ), и супероксиддисмутаза ($136 \text{ U} \cdot \text{мг}^{-1}$) в смеси с каталазой предотвращали фотовосстановление цитохрома с холобелком BoWSCP, что говорит об участии супероксидного анион-радикала в данной реакции (рисунок 4).

Таким образом было установлено, что холобелки WSCP-II способны фотосенсибилизировать восстановление цитохрома с, опосредованное участием в реакции супероксидного анион-радикала.

5. Исследование устойчивости холобелков BoWSCP в процессе фотохимических реакций и при варьировании значений pH и температуры

С учётом перспектив использования холобелков WSCP-II в биотехнологии, важно было оценить устойчивость этих холобелков к проявляемой ими фотокаталитической активности и к воздействию факторов окружающей среды.

С этой целью во время проведения фотохимических опытов, параллельно с мониторингом пиков поглощения таких участников реакции, как NADH, аскорбат и цитохром с, также проводили мониторинг интенсивности пика поглощения Хл в составе холобелков BoWSCP при 673 нм. По изменению величины данного пика поглощения можно было оценить степень деградации Хл в ходе фотохимических реакций. Кроме того, в ходе некоторых опытов проводили измерения спектров КД в области Q_y -перехода молекул Хл, ориентируясь на которые можно было оценить целостность димерной структуры Хл в составе BoWSCP.

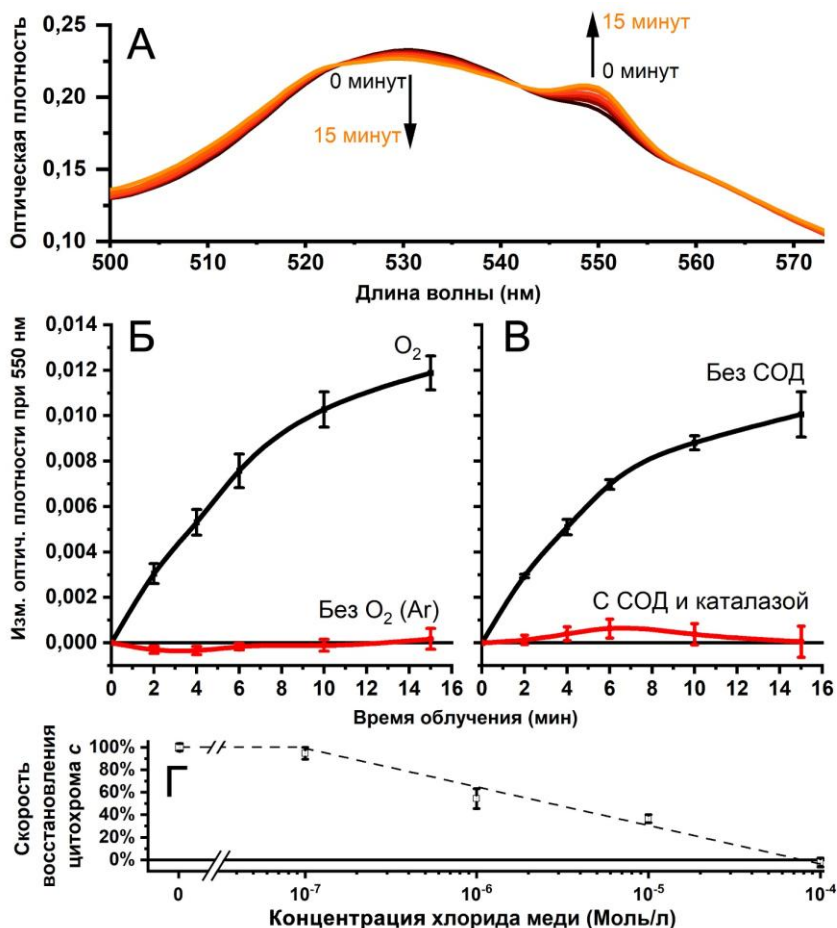


Рисунок 4. А – Изменение спектров поглощения в области пика поглощения цитохрома с при 550 нм по мере инкубации на свету в присутствии холоформы BoWSCP. Б – Кинетика изменения поглощения цитохрома с при 550 нм в присутствии холоформы BoWSCP и облучения светом с доступом кислорода воздуха (черный) и при продувке аргоном (красный). В – Кинетика изменения поглощения цитохрома с при 550 нм в присутствии холоформы BoWSCP и облучения светом без добавления (черный) и с добавлением (красный) супероксиддисмутазы и каталазы. Г – Зависимость скорости фотовосстановления холобелками BoWSCP и цитохрома с от концентрации хлорида меди (II) в пробе.

Было обнаружено, что холобелки BoWSCP проявляют устойчивость к свету и теряют лишь до 10% оптической плотности в пике Q_y после 10 минут облучения светом интенсивностью $700 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Амплитуда пиков КД в области Q_y -перехода падала соразмерно падению оптической плотности, т.е. не наблюдалось деградации димерной структуры Хл в холобелках BoWSCP (рисунок 5Б). Добавление NADH, аскорбата, цитохрома с и азида натрия не ускоряло и не замедляло скорость деградации Хл в холобелках WSCP. Можно предположить, что процессы, приводящие к деградации пигментов в холобелках BoWSCP, протекают внутри белковой глобулы и не доступны для воздействия молекул из внешней среды. Замещение кислородсодержащей атмосферы аргоном замедляло процесс фотодеградации Хл в холобелках BoWSCP, что позволяет предположить участие в этом процессе кислорода (рисунок 5А).

Исследованные нами спектры поглощения холобелков BoWSCP и LvWSCP оказались устойчивы к варьированию значений pH раствора в пределах от 3,0 до 11,0, а также к изменению температуры в диапазоне от 15° до 70 °C (рисунок 5ВГ).

Таким образом, мы зафиксировали, что холобелки WSCP устойчивы в ходе фотосенсибилизации фотохимических реакций. Это обстоятельство, наряду с устойчивостью оптических свойств данных холобелков к широкому диапазону температур и значений pH раствора, важно для оценки перспективности их использования в биотехнологии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обсуждении результатов диссертации рассматривается связь описанных спектральных характеристик холобелков BoWSCP с их фотохимическими свойствами, анализ имеющихся гипотез о функциях холобелков WSCP-II в растениях в свете полученных научных данных об их фотохимической активности, а также отмечаются работы, посвященные возможному практическому использованию холобелков WSCP-II в биотехнологии и медицине.

Изложение материала экспериментальной части свидетельствует о том, что главная задача работы выполнена. Анализ спектроскопических изменений в холобелках WSCP-II в фемто- и пикосекундном диапазонах времени после их возбуждения световым

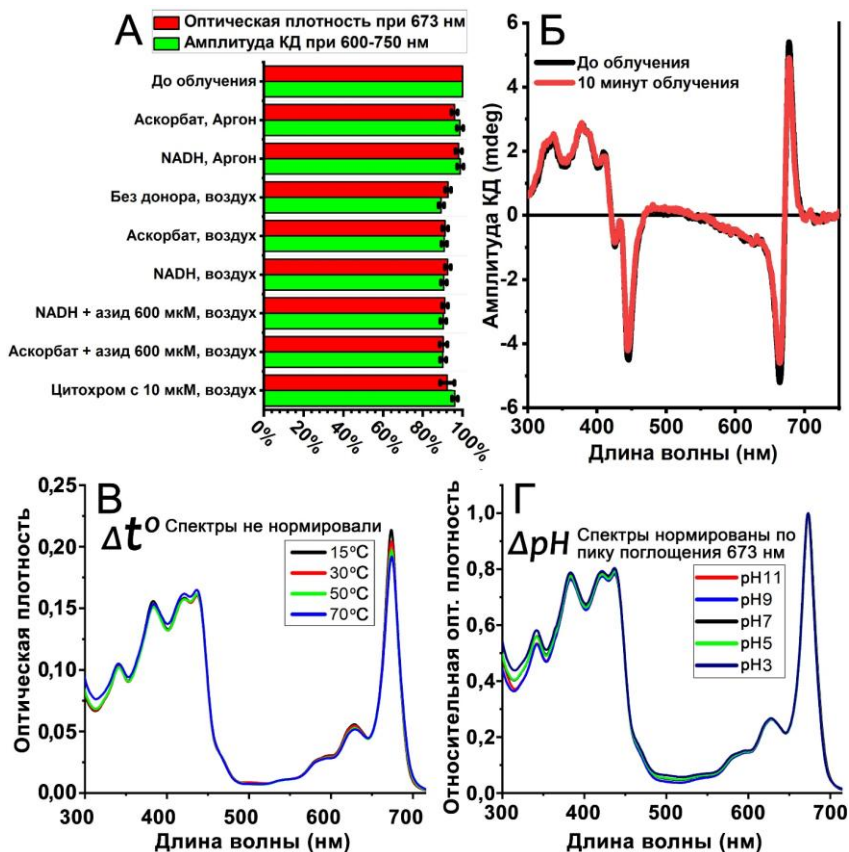


Рисунок 5. А – Изменение оптической плотности BoWSCP при 673 нм и амплитуды пиков КД в полосе Q_y в ходе проведения фотохимических опытов. Б – спектры кругового дихроизма холобелков BoWSCP до облучения и после облучения красным светом интенсивностью $700 \mu\text{E} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ 10 минут. В – спектры поглощения холобелков BoWSCP варьировании температуры от 15 до 70 °С. Г – спектры поглощения холобелков BoWSCP при комнатной температуре и варьировании pH буферного раствора от 3,0 до 11,0. Спектры нормированы по величине пика поглощения Q_y .

импульсом выявил свидетельства протекания сверхбыстрой фотохимической реакции между Хл и остатком триптофана в его аминокислотном окружении. Продемонстрирована способность молекулярных димеров Хл в составе холобелков WSCP-II фотосенсибилизировать окисление доноров электрона и восстановление акцептора электрона – цитохрома *c*. Оказалось, что Хл в составе данного димера может вступать в фотохимические реакции через генерацию двух разных АФК, осуществляющих функцию редокс-агента: синглетного кислорода и супероксидного анион-радикала (рисунок 6). Синглетный кислород в случае взаимодействия с донорами электрона типа NADH и аскорбата превращается в другие формы АФК, и данная реакция требует постоянного восполнения концентрации кислорода в смеси. В то же время, супероксидный анион-радикал при восстановлении цитохрома *c* превращается обратно в кислород, способный повторно участвовать в фотохимических реакциях.

Обнаружение данной фотоактивности важно для понимания физиологических функций белков семейства WSCP в организме, а также для оценки перспектив их практического использования.

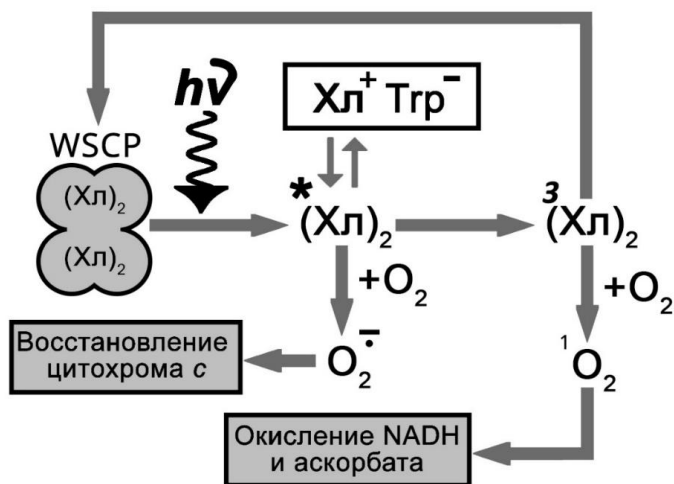


Рисунок 6. Схема, описывающая возможные проявления фотохимической активности димеров Хл в холобелках WSCP-II после возбуждения светом.

ВЫВОДЫ

- 1) С использованием оптимизированного протокола получены и охарактеризованы очищенные холобелки WSCP-II. Характеристики полученных холобелков соответствовали показателям нативных холобелков, приведенным в научной литературе.
- 2) Анализ переходных спектров поглощения, полученных методом фемтосекундной спектроскопии, выявил свидетельство протекания обратимой фотохимической реакции между Хл и остатком триптофана холобелка WSCP-II.
- 3) Установлена фотохимическая активность холобелков WSCP-II, проявляющаяся в окислении экзогенных молекул – NADH и аскорбата. Показано, что процесс фотоокисления опосредован участием синглетного кислорода, генерируемого триплетно-возбужденными молекулами Хл в составе холобелков WSCP-II.
- 4) Обнаружена фотохимическая активность холобелков WSCP-II, заключающаяся в восстановлении цитохрома *c*. Анализ механизмов процесса показал участие супероксидного анион-радикала.
- 5) Показана устойчивость структуры холобелка и хромофорной группы WSCP-II в процессе сенсibilизации ими фотохимических реакций, устойчивость к действию светового излучения, а также изменениям температуры и pH среды. Данный факт важен в плане оценки перспектив использования холобелков WSCP для биотехнологических разработок.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

- 1) Малеева Ю.В., Неверов К.В., **Обухов Ю.Н.**, Крицкий М.С. Водорастворимые хлорофиллсвязывающие белки растений: структура, свойства и функции // Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53. – №. 6. – С. 998-1011. DOI:10.1134/S0026898419060120
 - 2) **Обухов Ю.Н.**, Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий, М.С. Димеры хлорофилла *a* в составе водорастворимого белка BoWSCP фотосенсибилизируют восстановление цитохрома *c* // Доклады Академии наук. – 2023. – Т. 509. – №. 1. – С. 191-195. DOI:10.31857/S2686738922600790
 - 3) Черепанов Д.А., Неверов К.В., **Обухов Ю.Н.**, Малеева Ю.В., Гостев Ф.Е., Шелаев И.В., Айбуш А.В., Крицкий М.С., Надточенко В.А. Фемтосекундная динамика возбужденных состояний тетрамера хлорофилла в водорастворимом хлорофиллсвязывающем белке BoWSCP // Биохимия. – 2023. – Т. 88. – №. 10. – С. 1908-1925. DOI:10.31857/S0320972523100135
 - 4) Cherepanov D.A., Milanovsky G.E., Neverov K.V., **Obukhov Yu.N.**, Maleeva Yu.V., Aybush A.V., Kritsky M.S., Nadtochenko V.A. Exciton interactions of chlorophyll tetramer in water-soluble chlorophyll-binding protein BoWSCP // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2024. – V. 309. – Article 123847. – P. 1-18. DOI:10.1016/j.saa.2024.123847
 - 5) Neverov K. V. *, **Obukhov Yu. N. ***, Kritsky M. S. Photooxidative Activity of Stress-Induced Plant Proteins of WSCP Family // Russian Journal of Plant Physiology – 2025. – V. 72. – №. 7. – P. 252-265. DOI:10.1134/S1021443725603477
- (* Авторы внесли одинаковый вклад в работу)

Материалы конференций:

- 1) Обухов Ю.Н. Исследование свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков растений // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019» /

Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс]. – М: МАКС Пресс, 2019. – ISBN 978-5-317-06100-5

2) Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Получение и свойства водорастворимых хлорофилл-связывающих белков (WSCP) из *Brassica oleracea* и *Lepidium virginicum* // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений - основа создания растений будущего»: тезисы докладов, Казань, 18-24 сентября 2019 года. – Казань: Казанский университет, 2019. – С. 319. DOI:10.26907/978-5-00130-204-9-2019-319

3) Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Исследование свойств водорастворимых хлорофилл-связывающих белков высших растений // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019: материалы XIV международной научной конференции, г. Москва, 21-24 ноября 2019 г. – Москва-Севастополь, 2019. – С. 123-124

4) Обухов Ю.Н., Малеева Ю.В., Неверов К.В., Крицкий М.С. Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки WSCP класса II: анализ разнообразия и филогенетического родства // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Тезисы докладов международной научной конференции, Четырнадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 17–19 июня 2020 года. – Минск: Белорусский государственный университет, 2020. – С. 184.

5) Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки (WSCP) высших растений: получение и фотохимические свойства // Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». Годичное собрание общества физиологов растений России. Материалы докладов. (Москва, 27 сентября – 1 октября 2021г.) – Москва, 2021г. - С. 98.

6) Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Димер хлорофилла в белках семейства WSCP - фотосенсибилизатор окисления доноров электрона // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. К 100-летию белорусской академической науки: Тезисы докладов международной научной конференции, Пятнадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 15–17

июня 2022 года / Редколлегия: И.Д. Волотовский (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Белорусский государственный университет, 2022. – С. 36.

7) Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. Димеры хлорофилла в белках семейства WSCP - фотосенсибилизаторы редокс-реакций // Сборник научных трудов VII Съезда биофизиков России: Сборник материалов съезда. В 2-х томах, Краснодар, 17–23 апреля 2023 года. – Краснодар: Кубанский государственный технологический университет, 2023. – С. 380.

8) Черепанов Д.А., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Гостев Ф.Е., Шелаев И.В., Айбуш А.В., Крицкий М.С. Изучение динамики возбужденных состояний хлорофилла в водорастворимом хлорофилл-связывающем белке BoWSCP методом фемтосекундной pump-probe спектроскопии // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Тезисы докладов 16-й Международной научной конференции, Минск, 25–27 июня 2024 года. – Минск: Белорусский государственный университет, 2024. – С. 351.

9) Черепанов Д.А., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Гостев Ф.Е., Шелаев И.В., Айбуш А.В., Крицкий М.С. Фемтосекундная динамика возбужденных состояний хлорофилла в водорастворимом хлорофилл-связывающем белке BoWSCP // I региональное собрание РФО и Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники» Сборник тезисов. Нижний Новгород: ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2024. – С. 101-102.

10) Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Крицкий М.С. Фотовосстановление цитохрома c, сенсибилизированное димерами хлорофилла в составе белков семейства WSCP // «Фотосинтез: современное понимание ключевого процесса биосферы». Сборник тезисов. – Пущино, 2025. – С 22.

11) Черепанов Д.А., Милановский Г.Е., Неверов К.В., Обухов Ю.Н., Гостев Ф.Е., Шелаев И.В., Айбуш А.В., Крицкий М.С., Надточенко В.А. Исследование динамики возбужденных состояний хлорофилла в водорастворимом белке BoWSCP методом фемтосекундной спектроскопии // «Фотосинтез: современное понимание ключевого процесса биосферы». Сборник тезисов. – Пущино, 2025. – С 87.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agostini A., Palm D. M., Schmitt F.-J., Albertini M., Valentin M. D., Paulsen H., Carbonera D. An unusual role for the phytol chains in the photoprotection of the chlorophylls bound to Water Soluble Chlorophyll-binding Proteins // Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-13.
2. Bednarczyk D., Dym O., Prabakar V., Peleg Y., Pike D. H., Noy D. Fine Tuning of Chlorophyll Spectra by Protein-Induced Ring Deformation // Angewandte Chemie International Edition. – 2016. – Т. 55. – №. 24. – С. 6901-6905.
3. Foote C.S. Photosensitized Oxidation and Singlet Oxygen: Consequences in Biological Systems // Free radicals in biology / ed. by W.A. Pryor. — Vol. II. — New York: Academic Press, 1976. – С. 83–133.
4. Gholizadeh A. Plants Water Soluble Chlorophyll Binding Proteins Act as Enzyme-Inhibitor Pair // Russian Journal of Plant Physiology. – 2017. – Т. 64. – №. 1. – С. 91-99.
5. Kell A., Bednarczyk D., Acharya K., Chen J., Noy D., Jankowiak R. New insight into the water-soluble chlorophyll-binding protein from *Lepidium virginicum* // Photochemistry and Photobiology. – 2016. – Т. 92. – №. 3. – С. 428-435.
6. Koppenol W.H., Van Buuren K.J.H., Butler J., Braams R. The kinetics of the reduction of cytochrome *c* by the superoxide anion radical // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 1976. – Т. 449. – №. 2. – С. 157-168.
7. Neverov K.V., Krasnovsky Jr A.A., Zabelin A.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y. Low-temperature (77 K) phosphorescence of triplet chlorophyll in isolated reaction centers of photosystem II // Photosynthesis research. – 2015. – Т. 125. – №. 1. – С. 43-49.
8. Satoh H., Uchida A., Nakayama K., Okada M. Water-Soluble Chlorophyll Protein in *Brassicaceae* Plants is a Stress-Induced Chlorophyll-Binding Protein // Plant and Cell Physiology. – 2001. – Т. 42. – №. 9. – С. 906-911.
9. Schmidt K., Fufezan C., Krieger-Liszkay A., Satoh H., Paulsen H. Recombinant Water-Soluble Chlorophyll Protein from *Brassica oleracea* var. *Botrys* Binds Various Chlorophyll Derivatives // Biochemistry. – 2003. – Т. 42. – №. 24. – С. 7427-7433.

10. Takahashi S., Yanai H., Nakamaru Y., Uchida A., Nakayama K., Satoh H. Molecular Cloning, Characterization and Analysis of the Intracellular Localization of a Water-Soluble Chl-Binding Protein from Brussels Sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) // Plant and Cell Physiology. – 2012. – Т. 53. – №. 5. – С. 879-891
11. Zabelin A.A., Neverov K.V., Krasnovsky Jr A.A., Shkuropatova V.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y. Characterization of the low-temperature triplet state of chlorophyll in photosystem II core complexes: Application of phosphorescence measurements and Fourier transform infrared spectroscopy // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2016. – Т. 1857. – №. 6. – С. 782-788.
12. Клейтон, Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели / Р. Клейтон; пер. с англ. А.А. Косова, В.И. Крутова, А.А. Красновского; под ред. и с предисл. А.А. Красновского. – Москва: Мир, 1984. – 350 с.
13. Фрайфелдер, Д. Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии / Д. Фрайфелдер; пер. с англ. под ред. Э.Г. Ларского. – Москва: Мир, 1980. — 581 с.