

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕФОТОХИМИЧЕСКОГО ТУШЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИКОБИЛИСОМ ОРАНЖЕВЫМ КАРОТИНОИД-ПРОТЕИНОМ

© 2015 г. П.М. Красильников, Д.В. Зленко, И.Н. Стадничук\*

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12;

\*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35

E-mail: krapam@mail.ru, pavel@erg.biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 20.07.15 г.

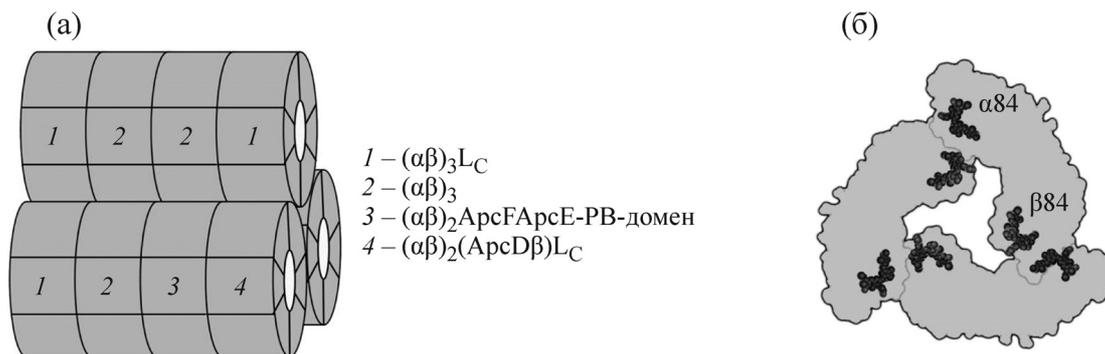
Проведен теоретический анализ эффективности тушения флуоресценции фикобилисом оранжевым каротиноид-протеином. Создана компьютерная 3D-модель ядра фикобилисомы, благодаря чему определены расстояния между центрами масс фикобилиновых хромофоров в составе трех аллофикоцианиновых цилиндров ядра и рассчитаны время и число актов миграции, необходимых для итогового безызлучательного переноса энергии от фикобилисом к фотосистеме II. Анализ кинетической модели процесса миграции энергии подтвердил возможность эффективного перехвата и тушения поглощенной фикобилисомами энергии с помощью оранжевого каротиноид-протеина, однако полного тушения флуоресценции фикобилисом при этом не происходит. Теоретические оценки эффективности тушения фикобилисом находятся в хорошем согласии с экспериментальными данными.

*Ключевые слова:* аллофикоцианин, нефотохимическое тушение, оранжевый каротиноид-протеин, перенос энергии, фикобилисома, флуоресценция.

Фотосинтетической антенной цианобактерий служат фикобилисомы (PBS) – гигантские, массой несколько миллионов дальтон, пигмент-белковые комплексы фикобилипротеинов. Полипептиды фикобилипротеинов образуют стереотипные дисковидные агрегаты-тримеры, которые стыкуются в цилиндры в составе PBS за счет минорных линкерных белков. Структура PBS подразделяется на две части: центральную (ядро), состоящую из трех цилиндров аллофикоцианина (APC), флуоресцирующего при 660 нм, и шесть боковых цилиндров, примыкающих веерообразно к ядру и образованных более коротковолновыми фикобилипротеинами [1,2]. Как и другие фикобилипротеины, APC состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -полипептидных субъединиц, находящихся в молярном соотношении 1:1. Каждая субъединица содержит по одному ковалентно связанному с апопротеином фикобилиновому хромофору. Кроме субъединиц APC в ядре PBS имеются три минорных полипептида с длинноволновыми хромофорами, а именно  $L_{CM}$  (ArcE),  $\beta^{18}$  (ArcF) и ArcD. Получая энер-

гию вследствие миграции от коротковолновых хромофоров APC, эти полипептиды флуоресцируют при 680 нм, почему и получили название терминальных эмиттеров. В цианобактериальной клетке энергия от PBS через терминальные эмиттеры передается к хлорофиллу почти со 100%-й эффективностью [3]. Согласно данным электронной микроскопии [4], ядро PBS имеет, в отличие от боковых цилиндров, фиксированное число дисков-тримеров (по четыре диска в каждом из расположенных параллельно трех цилиндров) и, соответственно, определенное число хромофоров (72), в том числе 66 хромофорных молекул APC и 6 терминальных эмиттеров. Будучи посредниками в передаче энергии от PBS к хлорофиллу фотосистемы II (ФС II), терминальные эмиттеры располагаются в нижних цилиндрах ядра PBS. Благодаря биохимическим процедурам контролируемой диссоциации, иммунопреципитации и ограниченного протеолиза белков PBS (см. обзоры [1,2]) выяснено, что ArcD находится в составе крайнего тримера, а  $L_{CM}$  и  $\beta^{18}$  – в составе второго, соседнего. Третий и четвертый тримеры нижних цилиндров, как и весь верхний цилиндр ядра PBS, свободны от терминальных эмиттеров. Кроме того, два нижних цилиндра лежат ан-

Сокращения: PBS – фикобилисома, APC – аллофикоцианин, TE – терминальные эмиттеры, OCP – оранжевый каротиноид-протеин, ФС II – фотосистема II.



**Рис. 1.** (а) – Схема строения ядра PBS, состоящего из трех лежащих параллельно цилиндров. В качестве базовых элементов каждый цилиндр содержит по четыре тримера APC, обозначенных как  $(\alpha\beta)_3$ . Крайние тримеры имеют в центральной полости добавочный малый бесхромовый полипептид  $L_C$ , завершающий рост цилиндров. Третий и четвертый тримеры нижнего цилиндра содержат терминальные эмиттеры, обозначенные как ArcD, ArcE и ArcF. Нумерация тримеров в цилиндре на заднем плане противоположна переднему цилиндру. (б) – Торцевое изображение тримера APC. Обозначены хромофоры, которые, как хорошо видно, собраны попарно.

типараллельно, так что терминальные эмиттеры располагаются в них начиная с противоположных торцовых поверхностей. В гибридных тримерах (APC + терминальный эмиттер) каждый терминальный эмиттер замещает одну из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц APC. Надмолекулярная структура ядра фикобилисомы представлена на рис. 1.

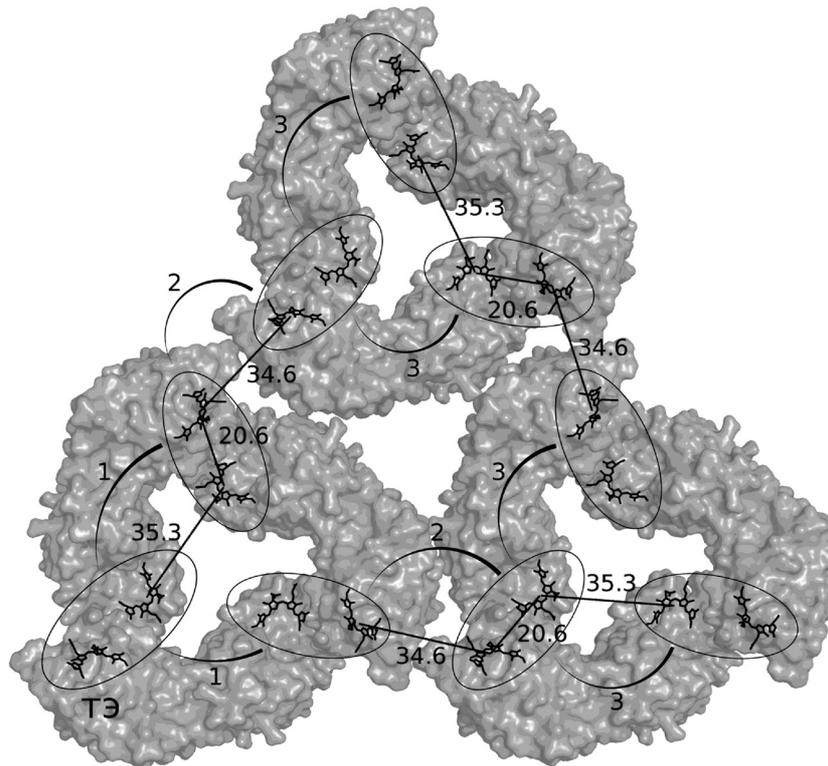
На интенсивном свете для перехвата в PBS избыточной поглощенной энергии с ее возможным фотоповреждающим действием в клетках цианобактерий включается молекулярный защитный механизм, называемый нефотохимическим тушением флуоресценции. Он относится к быстрым световым адаптивным реакциям уменьшения передачи энергии от антенны к реакционным центрам фотосинтеза. Тушение реализуется благодаря присоединению оранжевого каротиноид-протеина (OCP) к  $L_{CM}$ -полипептиду в ядре PBS [5,6]. Каротиноидный хромофор OCP, гидроксизехиненон, перехватывая на себя поглощенную фикобилисомой энергию, быстро переводит ее в тепло, конкурентно уменьшая флуоресценцию PBS. Падение флуоресценции легко наблюдать, откуда и возникло название нефотохимическое тушение PBS. Согласно экспериментальным данным [7,8], OCP позволяет в среднем вдвое уменьшать перенос энергии от PBS к хлорофиллу.

Целью данной работы является теоретический анализ изменения интенсивности флуоресценции PBS при нефотохимическом тушении, вызываемом оранжевым каротиноид-протеином.

### ПОСТРОЕНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ МОДЕЛИ ЯДРА ФИКОБИЛИСОМЫ

Структура кристаллов, образуемых тримерами аллофикоцианина и имеющих разрешение около 2 Å, позволяет различать размеры и расположение хромофоров (см., например, [9]). В отличие от отдельных фикобилипротеинов, кристаллизация фикобилисомы или даже только ее ядра сегодня невозможны из-за огромной молекулярной массы и входящих в структуру PBS аморфных линкерных белков. В то же время размеры и форма тримеров APC в ядре PBS, различимые на электронных микрофотографиях [4], совпадают с известными из кристаллографических структур параметрами. Поэтому мы использовали информацию, содержащуюся в кристаллах APC, для реконструкции ядра PBS. Полученная структура представляет собой составную модель, в основе которой лежат структуры APC из *Porphyra yezoensis* (1NK1), *Arthrospira platensis* (1ALL) и *Thermosynechococcus vulcanus* (3DBJ). Совмещая в пространстве известные трехмерные структуры, нам удалось определить взаиморасположение всех 12-ти тримеров аллофикоцианина, составляющих ядро, и рассчитать для ядра расстояния между хромофорами и наиболее вероятные пути миграции поглощенной энергии к терминальным эмиттерам.

Согласно рентгеноструктурным данным, тримеры APC характеризуются фиксированным положением хромофоров в трехмерной структуре [9]. Шесть хромофоров в тримере разбиваются на три пары, каждая из которых состоит из двух хромофоров, находящихся на соседних  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицах на расстоянии 20,6 Å. При

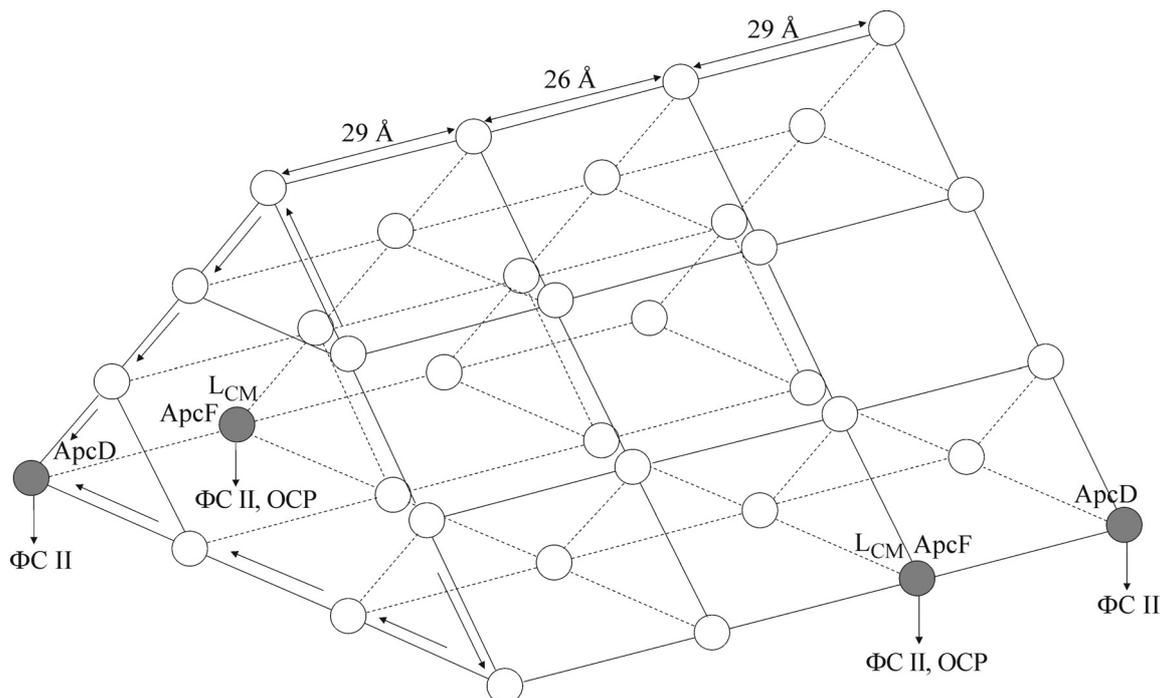


**Рис. 2.** Построенная в программе РuMOL модель ядра PBS. Модель собрана на основе кристаллографических данных для тримеров АРС, взятых из базы данных PDB (код 1ALL). Показаны торцовые поверхности трех соприкасающихся цилиндров ядра и обозначены измеренные нами расстояния между центрами масс соседних хромофоров. Все хромофоры, составляющие пары с межхромофорным расстоянием 20,6 Å, обведены овалами. Хорошо видно, что расстояния между парными хромофорами в составе каждого тримера АРС (35,3 Å) практически полностью совпадают с аналогичными расстояниями между соседними тримерами (34,6 Å).

этом расстояние между хромофорами соседних пар составляет 34,5 Å (рис. 2). Благодаря 3D-модели нам также удалось выяснить, что минимальное расстояние между хромофорами, располагающимися в контактирующих друг с другом дисках соседних цилиндров ядра PBS также близко к 35 Å (рис. 2).

Анализ структуры 3D-модели (рис. 2) привел к предположению, что хромофоры в апопротеиновом каркасе фикобилисомы структурированы таким образом, что образует функциональную систему, которая оптимальна для протекания энергообменных процессов. Модель этой функциональной структуры представлена на рис. 3, где каждый кружок, названный узлом PBS, обозначает упомянутую выше пару  $\alpha/\beta$ -хромофоров. Объединение таких  $\alpha/\beta$ -хромофоров (или узлов) в единую систему обусловлено тем, что энергообмен между хромофорами внутри узла происходит очень быстро, за 1–2 пс [10–12], что по крайней мере на порядок превышает скорость передачи энергии между другими хромофорами PBS (см. ниже).

Вся функциональная схема (рис. 3) складывается из четырех равносторонних треугольников (энергообменный слой PBS), расположенных в параллельных плоскостях и содержащих таким образом по девять узлов. Расстояния между любыми соседними узлами в слое одинаковы и составляют около 35 Å (рис. 2). Три латеральных расстояния между ближайшими хромофорами соседних плоскостей (слоев), согласно построенной 3D-модели, составили последовательно 29, 26 и вновь 29 Å (рис. 3). Серым цветом выделены узлы двух нижних цилиндров, содержащие терминальные эмиттеры: АрсD для внешних слоев (первого и четвертого) и  $L_{CM}$  и АрсF для внутренних слоев (второго и третьего). Таким образом, каждый из четырех слоев ядра фикобилисомы содержит один узел с терминальным эмиттером, куда стекает энергия, поглощенная хромофорами каждого слоя с последующей передачей на ФС II. В случае интенсивного светового потока к  $L_{CM}$ -полипептиду происходит присоединение ОСР, что приводит к перераспределению стока энергии и эффективному тушению флуоресценции фикобилисомы.



**Рис. 3.** Редуцированная за счет объединения близко расположенных парных  $\alpha/\beta$ -хромофоров схема ядра PBS. Объединяемые хромофоры, названные узлами, обозначены кружками. Насчитывается 36 узлов, разделяемых на четыре 9-узловых слоя, которые соответствуют контактирующим тримерам APC (см. рис. 2) трех цилиндров ядра. Четыре узла, выделенных серым цветом, принадлежат терминальным эмиттерам (обозначены как ArcD и  $L_{CM}$ ). От каждого из четырех терминальных эмиттеров энергия в цианобактериальной клетке передается на ФС II и от  $L_{CM}$  – одновременно с ФС II – на ОСР при развитии нефотохимического тушения на интенсивном свете. Видно, что каждый из четырех слоев обязательно содержит один из терминальных эмиттеров, к которому в PBS в конечном итоге направлены стоки энергии, показанные стрелками на торцовом 9-узловом слое. Расстояния между хромофорами в каждом узле и между узлами слоя соответствуют обозначенным на рис. 2. Латеральные промежутки между 1-м и 2-м и 3-м и 4-м слоями, согласно РuMOL-модели, равны 29 Å и между 2-м и 3-м слоями составляют 26 Å.

### КИНЕТИЧЕСКАЯ СХЕМА МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ В ЯДРЕ ФИКОБИЛИСОМЫ

Кинетический анализ процесса миграции энергии проведен на основе модели функциональной структуры фикобилисомы, представленной на рис. 3, для чего сначала были определены основные временные параметры этой модели. Энергообмен между  $\alpha$ - и  $\beta$ -хромофорами каждого узла осуществляется, как уже отмечалось, весьма быстро, за время порядка 2 пс [10] (есть также данные о временах 0,4 пс [11] и 1,3 пс [12]). Этот энергообмен может происходить как по экситонному, так и по индуктивно-резонансному (ферстеровскому) механизму (см. обзор [13]). Перенос энергии на расстояние между узлами ядра PBS и далее от PBS к ФС II осуществляется по ферстеровскому механизму [11], а от PBS к ОСР – по экситонному механизму [5]. Для дальнейшего кинетического анализа конкретный механизм отдельных актов миграции не является, однако, су-

щественным, важным параметром является только скорость энергообменных процессов.

Для PBS в растворе наблюдаемое время затухания флуоресценции составляет  $\tau_F \approx 1750$  пс, а квантовый выход  $\phi_{ex} \approx 0,6$  [14]. Время миграции энергии от терминального эмиттера к ФС II  $\tau_{ФС II} \approx 200$  пс [10], а при тушении время миграции энергии от PBS к ОСР  $\tau_{ОСР} \approx 36$  пс [5] (есть также оценка 16 пс [15]). Для PBS в растворе при присоединении ОСР наблюдаемое время затухания флуоресценции  $\tau_F^{ex}(ОСР) \approx 1300$  пс [16]. Для ферстеровского радиуса  $R_0$  хромофоров ядра PBS имеются оценки в 50 Å [9] и 68 Å [11].

Введем обозначения величин, необходимых для дальнейшего анализа: собственное (радиационное) время жизни возбужденного состояния хромофоров PBS  $\tau_R$  (константа скорости  $k_R = \tau_R^{-1}$ ), характерное время безызлучательной релаксации возбуждения  $\tau_Q$  (константа скорости  $k_Q = \tau_Q^{-1}$ ). Согласно определению [17], величина

квантового выхода флуоресценции PBS в растворе имеет вид  $\varphi_{\text{ex}} = k_R(k_R + k_Q)^{-1} = k_R\tau_F$ , где  $\tau_F = (k_R + k_Q)^{-1}$ . Выразив отсюда  $\tau_R = \varphi_{\text{ex}}^{-1}\tau_F$  и подставив числовые значения, получим оценку  $\tau_R \approx 2900$  пс ( $k_R \approx 3,5 \cdot 10^8$  с<sup>-1</sup>). Выразив затем  $\tau_Q = \tau_R\tau_F(\tau_R - \tau_F)^{-1}$  и подставив числовые значения, получим оценку  $\tau_Q \approx 4400$  пс ( $k_Q \approx 2,3 \cdot 10^8$  с<sup>-1</sup>). Таким образом, радиационное время и время безызлучательной дезактивации возбуждения хромофоров лежат в наносекундном диапазоне временной шкалы.

Оценим величину времени миграции энергии между узлами функциональной решетки, которое обозначим  $\tau_{\text{in}}$  ( $k_{\text{in}} = \tau_{\text{in}}^{-1}$  – константа скорости). Для этого сначала оценим величину ферсторовского радиуса  $R_0$  хромофоров фикобилисом по известной формуле  $R_0 = R_{\alpha\beta}(\tau_R/\tau_{\alpha\beta})^{1/6}$ , где  $R_{\alpha\beta}$  – расстояние между хромофорами,  $\tau_{\alpha\beta}$  – характерно время миграции энергии между ними. Используя данные для  $\alpha/\beta$ -пары хромофоров узла  $R_{\alpha\beta} = 20,6$  Å и  $\tau_{\alpha\beta} \approx 2$  пс, получим оценку  $R_0 \approx 69,3$  Å, что согласуется с данными [11] (при  $\tau_{\alpha\beta} \approx 1,3$  пс получим  $R_0 \approx 74,5$  Å, а при  $\tau_{\alpha\beta} \approx 0,4$  пс соответственно  $R_0 \approx 90,6$  Å). Принимая расстояние между узлами решетки  $R \approx 35$  Å и используя формулу  $\tau_m = \tau_R(R/R_0)^6$ , получим оценку для времени миграции энергии между узлами при  $R_0 \approx 69,3$  Å  $\tau_m \approx 48$  пс. Это значение используем в дальнейших вычислениях (при  $R_0 \approx 74,5$  Å для этого времени получим 31 пс, а при  $R_0 \approx 90,6$  Å – всего 10 пс, что, по нашему мнению, маловероятно). Из этих оценок следует, что величина  $\tau_{\text{in}}$ , так же как  $\tau_{\text{ФС II}}$  и  $\tau_{\text{ОСР}}$ , лежит в пикосекундном диапазоне временной шкалы, причем  $\tau_{\text{in}}$  примерно в четыре раза меньше времени  $\tau_{\text{ФС II}}$  и примерно в 1,3 раза больше времени  $\tau_{\text{ОСР}}$ .

**Кинетический анализ миграции энергии в одном узловом слое фикобилисом.** Из проведенных оценок следует важный вывод – скорость энергообменных процессов между хромофорами внутри PBS существенно (на 1–2 порядка) превышает скорость процессов собственной дезактивации возбужденного состояния хромофоров. Это означает, что при отсутствии эффективного стока энергия возбуждения длительное время будет блуждать между хромофорами внутри PBS. Основываясь на этих данных, можно предложить упрощенную кинетическую схему процесса миграции энергии в узловом слое. Действительно, в силу того, что сброс энергии на ФС II происходит в одной точке каждого узлового слоя (см. рис. 3), к ней будет направлен

среднестатистический поток энергии (дрейф) на фоне случайных блужданий энергии между узлами, которые считаются одинаковыми. Благодаря пространственному распределению узлов в слое фикобилисом можно выделить два эквивалентных энергетических канала, соединяющих точку сброса с периферией (указаны стрелками на рис. 3). Дрейфовая скорость переноса энергии в этих потоках, каждый из которых содержит по пять узлов, будет определяться некоторым эффективным временем переноса между узлами, которое можно принять равным  $\tau_{\text{eff}} = \tau_M + \tau_m$ , где  $\tau_M = \tau_{\text{ФС II}}$  или  $\tau_M = \tau_{\text{ОСР}}$ . Это время одинаково для всех соседних узлов слоя и определяет среднюю скорость потока. Таким образом, получается система из двух эквивалентных параллельных каналов, по которым энергия течет к одной и той же точке сброса. Поэтому можно объединить два потока в один общий со скоростью течения вдвое меньшей, чем в каждом из отдельных потоков. Тогда эффективное время миграции энергии между узлами в объединенном потоке будет равным  $2\tau_{\text{eff}}$ , а эффективная скорость передачи энергии составит  $\beta = (2\tau_{\text{eff}})^{-1}$ . Таким образом, формируется цепочка из пяти эффективных узлов (резервуаров), по которым течет энергия, последовательно переходя от наиболее удаленного узла к узлу стока. Введя параметр заполнения  $n_j(t)$  энергией (ресурсом) каждого эффективного узла, получим систему уравнений, описывающую выход энергии из узлового слоя (общего резервуара):

$$\begin{aligned} \dot{n}_1 &= -\beta(n_1 - n_2), \quad \dot{n}_2 = -\beta(n_2 - n_3), \\ \dot{n}_3 &= -\beta(n_3 - n_4), \quad \dot{n}_4 = -\beta(n_4 - n_5), \quad \dot{n}_5 = -\beta n_5. \end{aligned} \quad (1)$$

Здесь первый узел – это точка стока, а пятый узел наиболее удален от первого. Начальное условие:  $n_1(0) = n_2(0) = n_3(0) = n_4(0) = n_5(0) = 1$ , т.е. в начальный момент времени все узлы заполнены, т.е. все хромофоры находятся в возбужденном состоянии. Решение системы (1) имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} n_5(t) &= e^{-\beta t}, \quad n_4(t) = (1 + \beta t)e^{-\beta t}, \\ n_3(t) &= \left(1 + \beta t + \frac{1}{2}(\beta t)^2\right)e^{-\beta t}, \\ n_2(t) &= \left(1 + \beta t + \frac{1}{2}(\beta t)^2 + \frac{1}{6}(\beta t)^3\right)e^{-\beta t}, \\ n_1(t) &= \left(1 + \beta t + \frac{1}{2}(\beta t)^2 + \frac{1}{6}(\beta t)^3 + \frac{1}{24}(\beta t)^4\right)e^{-\beta t}. \end{aligned} \quad (2)$$

Интегральный показатель  $N(t)$ , характеризующий долю заполнения энергией узлового слоя по истечении времени  $t$  от начала процесса,

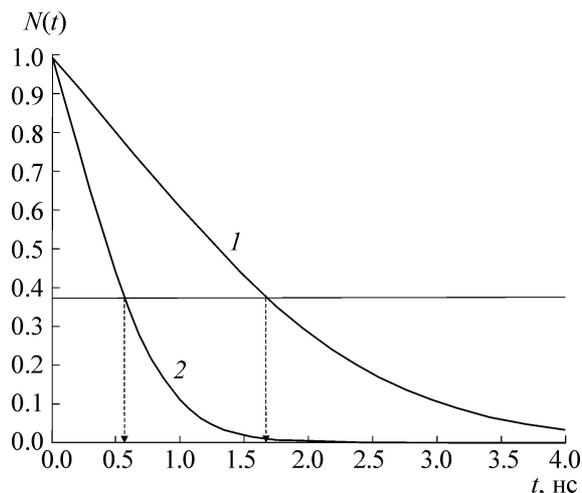
определяется нормированной на единицу суммой  $n_j(t)$ , представленной системой уравнений в (2):

$$N(t) = \frac{1}{5} \sum_{j=1}^5 n_j(t) = \frac{1}{5} \left( 5 + 4\beta t + \frac{3}{2}(\beta t)^2 + \frac{1}{3}(\beta t)^3 + \frac{1}{24}(\beta t)^4 \right) e^{-\beta t}. \quad (3)$$

На рис. 4. представлены две кривые  $N(t)$ : 1 – характеризует сброс энергии на ФС II ( $2\tau_{\text{eff}} = 500$  пс,  $\beta = 2 \cdot 10^9$  с<sup>-1</sup>); 2 – характеризует сброс энергии на ОСР ( $2\tau_{\text{eff}} = 170$  пс,  $\beta = 5,9 \cdot 10^9$  с<sup>-1</sup>). Из этих графиков, используя стандартный подход уменьшения амплитуды в  $e \approx 2,7$  раз (этот уровень обозначен горизонтальной чертой на рис. 4), можно определить характерное время тушения флуоресценции за счет сброса энергии на ФС II при  $\tau_p(\text{ФС II}) \approx 1700$  пс или на ОСР при  $\tau_p(\text{ОСР}) \approx 600$  пс; соответствующие константы скоростей составляют  $k_p(\text{ФС II}) \approx 6 \cdot 10^8$  с<sup>-1</sup> и  $k_p(\text{ОСР}) \approx 17 \cdot 10^8$  с<sup>-1</sup>.

По определению [17], наблюдаемое время затухания флуоресценции вычисляется по формуле  $\tau_F = (k_R + k_Q + k_P)^{-1}$ . Следовательно, для одного слоя хромофоров ФС II, когда энергия сбрасывается на ФС II  $\tau_F(\text{ФС II}) \approx 850$  пс, а когда сброс идет на ОСР, то  $\tau_F(\text{ОСР}) \approx 440$  пс, и соответствующие значения квантового выхода флуоресценции PBS составят  $\phi(\text{ФС II}) \approx 0,3$  и  $\phi(\text{ОСР}) \approx 0,15$ .

Мы получили оценки для параметров флуоресценции и ее тушения в одном слое ядра фикобилисомы. Если пренебречь миграцией энергии между слоями (т.е. считать их изолированными друг от друга), то характеристики флуоресценции PBS в целом можно оценить по среднему квантовому выходу. В случае присоединения одной молекулы ОСР к PBS, выделенным в раствор, т.е. изолированных от ФС II, величина среднего квантового выхода составит 0,49, а наблюдаемое время затухания флуоресценции  $\tau_F^{(1)} \approx 1420$  пс. Если же к PBS присоединятся две молекулы ОСР, то средний квантовый выход составит примерно 0,38, а время  $\tau_F^{(2)} \approx 1100$  пс. В реальном эксперименте, очевидно, реализуются и те и другие случаи, поэтому их также можно усреднить. Тогда общий средний квантовый выход составит примерно 0,44, а среднее наблюдаемое время затухания флуоресценции ядра фикобилисомы составит  $\tau_F \approx 1280$  пс, что практически идеально совпадает с экспериментальным значением  $\tau_F^{\text{ex}}(\text{ОСР})$ ,



**Рис. 4.** Эффективная заселенность возбужденного состояния хромофоров PBS (узлов), рассчитанная по формуле (3) для  $\beta = 2 \cdot 10^9$  с<sup>-1</sup> (кривая 1) и  $\beta = 5,9 \cdot 10^9$  с<sup>-1</sup> (кривая 2) в зависимости от времени начала возбуждения. Горизонтальная черта выделяет уровень уменьшения заселенности в 2,7 раза. Пунктирные стрелки указывают на значения  $t = \tau_p(\text{ФС II}) \approx 1700$  пс (кривая 1) и  $t = \tau_p(\text{ОСР}) \approx 600$  пс (кривая 2) (см. текст).

которое равно 1300 пс [16]. Этот результат можно интерпретировать как косвенное указание на то, что латеральная миграция энергии, в сравнении с миграцией внутри каждого слоя, не имеет большого значения для функционирования ядра фикобилисомы.

**Кинетический анализ при учете латеральной миграции энергии в фикобилисомах.** Расстояния между ближайшими хромофорами соседних слоев ядра PBS составляют последовательно 29, 26 и 29 Å (рис. 3), а характерное время переноса энергии между ближайшими узлами соседних слоев соответственно 15,6 и 8,1 пс. Эти значения существенно меньше не только радиационного времени жизни хромофоров (2900 пс) и времени миграции энергии между узлами внутри слоя (48 пс), но и времени сброса энергии с фикобилисомы на ОСР (36 пс). Отсюда, казалось бы, можно сделать вывод, что хромофоры ядра PBS составляют единую систему, в которой поддерживается равновесие в заполнении энергией узловых слоев в процессе функционирования PBS. Однако следует учесть, что ближайшие узлы соседних слоев могут находиться в четырех состояниях: 0–0, 0–1, 1–0, 1–1, где 0 – это «пустой» узел (невозбужденный), а 1 – «полный» узел (возбужденный). Малые времена переноса относятся к ситуации, когда два ближайших узла соседних слоев находятся в состоянии 0–1 или 1–0, причем благоприятной ситуацией является, когда энергия переходит на

узел слоя, к которому присоединилась молекула ОСР. Считая эти состояния узлов равновероятными, получаем четырехкратное увеличение времени для реализации благоприятного переноса энергии между слоями – это соответственно 62,4 и 32,4 пс. Таким образом, время переноса энергии с внешнего слоя (1-го и 4-го) на внутренний слой (соответственно 2-й и 3-й) примерно в 1,3 раза превышает таковое для узлов внутри слоя. Тогда, в первом приближении, можно пренебречь латеральным переносом энергии между этими слоями и считать внешние слои относительно изолированными. Два внутренних слоя, которые содержат  $L_{CM}$  и к которым благодаря этому могут присоединяться молекулы ОСР, образуют более тесный контакт, ибо средняя скорость переноса энергии между ними примерно в 1,5 раза выше скорости энергообмена между узлами внутри слоя. В первом приближении можно объединить два внутренних слоя в единую систему, полагая, что в процессе функционирования ядра PBS происходит быстрое выравнивание заселенностей узлов этих слоев. Другими словами, можно представить эти два слоя в виде двух сообщающихся сосудов, где роль жидкости играет энергия возбуждения.

Очевидно, если мощность стоков всех слоев одинакова, то наблюдаемое время затухания и квантовый выход флуоресценции PBS в целом будут такими же, как и определенные выше параметры флуоресценции одного слоя. Некоторое отличие должно, по-видимому, наблюдаться только в случае присоединения молекулы ОСР, когда мощность стока одного из внутренних слоев увеличится. Основываясь на аналогии жидкости, вытекающей из сосуда, и принимая, что мощность одного из двух стоков этого сосуда увеличивается в три раза (это следует из отношения  $\tau_F/\tau_P(ОСР) \approx 3$ ), получим, что время опорожнения сосуда составит  $0,5 \cdot \tau_F \approx 875$  пс. Это время имеет такой же смысл, что и введенное выше время  $\tau_P(ОСР)$ . Квантовый выход флуоресценции от двух внутренних слоев PBS составит 0,2, а наблюдаемое время затухания флуоресценции PBS в целом – 1160 пс, которое, как и следовало ожидать, близко к значению  $\tau_F^{(2)}$  и несколько меньше экспериментального значения 1300 пс. Если к PBS присоединятся две молекулы ОСР, то ситуация будет практически такой же, что и в случае пренебрежения энергообмена между слоями (см. выше). Таким образом, интенсивный энергообмен между внутренними слоями PBS приводит к тому, что эффект тушения флуоресценции мало зависит от того, что одна или две молекулы ОСР присоединяются к PBS.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе нам впервые удалось показать, что рассмотрение передачи энергии в сложной системе из 72 хромофоров, какой является ядро PBS, удается значительно упростить за счет регулярно повторяющихся элементов структуры. Во-первых, это попарное объединение хромофоров в тримерах АРС, что ведет к очень быстрому энергообмену внутри пары и позволяет рассматривать ее как единый «хромофорный узел». Во-вторых, определение на базе выстроенной трехмерной модели PBS (рис. 2 и 3) межхромофорных расстояний для соседних узлов в тримерах АРС и между ближайшими тримерами соприкасающихся цилиндров как практически одинаковых и равных 35 Å. В-третьих, разделение трехцилиндрового ядра PBS на четыре равноценных по строению слоя, содержащих каждый по 18 хромофоров. В-четвертых, наличие в каждом подобном слое одного терминального эмиттера, куда происходит конечная миграция энергии от хромофоров АРС. Последнее позволило резко сократить расчеты, составить систему кинетических уравнений и получить данные о времени и других спектральных параметрах, связанных с конечной передачей энергии в энергообменном слое к терминальным эмиттерам. В частности, благодаря ферстеровскому механизму было обосновано положение, по которому межхромофорная миграция в PBS фактически происходит только между ближайшими хромофорными узлами. Остальные варианты миграции также возможны, но тогда из-за увеличения расстояния между хромофорами время миграционных актов становится столь большим, что им можно обоснованно пренебречь.

Действительно, рассмотрим минимальную теоретически возможную схему, в которой может быть отражен перехват энергии, поступающей от PBS к ФС II. Так как сайтом связывания ОСР с ядром PBS служит  $L_{CM}$  [5,6], то очевидно, для такой схемы достаточно всего три компонента: ОСР, ФС II и вместо PBS только один белок,  $L_{CM}$ , так как от него как от терминального эмиттера энергия стекает одновременно и на ФС II и на ОСР. Для анализа воспользуемся известными экспериментальными данными: время жизни флуоресценции  $L_{CM}$  в растворе (около 1600 пс) очень близко к таковому для PBS (1750 пс), что лишний раз подтверждает, что флуоресценция PBS осуществляется в основном  $L_{CM}$ . Время миграции энергии от  $L_{CM}$  к ФС II в цианобактериальной клетке не превышает, как упомянуто, 200 пс, к ОСР – менее 40 пс. Из этих данных легко оценить долю энергии, которая может посту-

пять к ОСР при тушении: она составляет 5/6 всего потока, т.е. более 80%. В то же время, согласно многочисленным экспериментам, тушение PBS с помощью ОСР составляет в клетках цианобактерий 50%. Нам удалось в связи с этим теоретически обосновать меньшую степень тушающего действия ОСР на PBS, которое никогда не бывает полным. Меньшая степень тушения связана с тем, что присоединение ОСР к ядру PBS сохраняет еще один канал стока энергии к ФС II через второй терминальный эмиттер – ArcD (рис. 3). Поэтому в результате присоединения ОСР поток энергии от PBS к ФС II не прерывается, а только перераспределяется за счет большей скорости переноса к ОСР и за счет очень быстрой последующей тепловой релаксации возбужденных состояний, характерной для молекул каротиноидов. Это позволяет более тонко регулировать количество энергии, передаваемой к ФС II, поскольку регуляция заключается не в том, чтобы прервать фотосинтез, а в том, чтобы предотвратить возможное повреждающее действие избыточного света.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-14-00589.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Watanabe and M. Ikeuchi, *Photosynth. Res.* **116**, 265 (2013).
2. И. Н. Стадничук, П. М. Красильников и Д. В. Зленко, *Микробиология* **84**, 131 (2015).
3. A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* **261**, 1 (1989).
4. A. A. Arteni, G. Ajlani, and T. J. Boekema, *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 272 (2009).
5. I. N. Stadnichuk, P. M. Krasilnikov, D. V. Zlenko, et al., *Photosynth Res.* **124**, (3) 315 (2015).
6. D. V. Zlenko, P. M. Krasilnikov, and I. N. Stadnichuk, *J. Comput. Chem.* (2015), doi: 10.1080/07391102.2015.1042913.
7. M. G. Rakhimberdieva, I. N. Stadnichuk, I. V. Elanskaya, et al., *FEBS Lett.* **574**, 85 (2004).
8. A. Wilson, G. Ajlani, J.-M. Verbavatz, et al., *Plant Cell* **18**, 992 (2006).
9. R. Brejc, R. Ficner, R. Huber, and S. Steinbacher, *J. Mol. Biol.* **249**, 424 (1995).
10. W. F. Beck and K. Sauer, *J. Phys. Chem.* **96**, 4568 (1992).
11. A. V. Sharkov, I. V. Krutyukov, E. V. Khoroshilov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1188**, 349 (1994).
12. D. Loos, M. Cotlet, F. De Schryver, et al., *Biophys. J.* **87**, 2598 (2004).
13. R. MacColl, *Biochim. Biophys. Acta* **1667**, 73 (2004).
14. A. R. Holzwarth, E. Bittersma, W. Reuter, et al., *Biophys. J.* **57**, 133 (1990).
15. L. Tian, J. H. M. van Stokkum, R. B. M. Koehorst, et al., *Chem. Soc.* **133**, 18304 (2011).
16. I. N. Stadnichuk, M. F. Yanyushin, E. G. Maksimov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 1436 (2012).
17. Ч. Кантор и П. Шиммель, *Биофизическая химия* (Мир, М., 1984), т. 2.

## Efficiency of non-Photochemical Fluorescence Quenching of Phycobilisomes by the Orange Carotenoid Protein

P.M. Krasilnikov\*, D.V. Zlenko\*, and I.N. Stadnichuk\*\*

\*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

\*\*Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276 Russia

We report on theoretical efficiency of non-photochemical fluorescence quenching of phycobilisomes by the orange carotenoid protein. The created 3D computer model of the three-cylindrical phycobilisomes core allowed us to determine the distances between centers of mass of all phycobilin chromophores of the core and calculate the time and an average number of energy migration steps for the resulting non-radiative excitation transfer from the phycobilisomes to photosystem II. The obtained kinetic scheme equations for a way of energy transfer confirm the incomplete interception of energy flow in the phycobilisomes core by the orange carotenoid protein. Theoretical estimation of the rate of phycobilisomes quenching is in good agreement with experimental data.

*Key words: allophycocyanin, non-photochemical quenching, orange carotenoid protein, energy migration, phycobilisome, fluorescence*