

УДК 581.1

АССОЦИАЦИЯ СВЕТОИНДУЦИРУЕМЫХ СТРЕССОВЫХ БЕЛКОВ HliA/HliB С ТРИМЕРАМИ И МОНОМЕРАМИ ФОТОСИСТЕМЫ 1 В КЛЕТКАХ ЦИАНОБАКТЕРИИ *Synechocystis* PCC 6803*

© 2015 Д.В. Акуликина¹, Ю.В. Большевцева¹,
И.В. Еланская², Н.В. Карапетян¹, Н.П. Юрина^{1**}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский пр., 33;
факс: +7(495)954-2732, электронная почта: nyurina@inbi.ras.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-4309,
электронная почта: ivelanskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.15
После доработки 14.04.15

Белки HliP (high-light inducible proteins) важны для защиты фотосинтетического аппарата цианобактерий от светового стресса, однако взаимодействие этих белков с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидов остается неясным. Для понимания механизма функционирования стрессовых белков HliA/HliB изучали их ассоциацию с комплексами фотосистемы 1 (ФС1) клеток дикого типа и мутантов цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803. Методом вестерн-блоттинга обнаружено, что стресс-индуцируемые белки HliA/HliB связываются с тримерами ФС1 клеток дикого типа, выращенных на свету умеренной интенсивности (40 мкмоль фотонов/м²·с). Освещение этих клеток интенсивным светом (150 мкмоль фотонов/м²·с) в течение 1 ч вызывает увеличение содержания стрессовых белков в 1,7 раза. У мутанта *DpsA*, лишённого тримеров ФС1, белки HliA/HliB ассоциированы с мономерами ФС1 и комплексом ФС2. Ассоциация белков HliA/HliB с мономерами, а не с тримерами ФС1 обнаружена также в клетках мутанта *Synechocystis*, лишённого ФС2, выращенных при 5 мкмоль фотонов/м²·с. При освещении интенсивным светом в клетках этого мутанта содержание белков Hli, связанных с мономерами ФС1, увеличивалось в 1,2 раза. В клетках дикого типа цианобактерий, выращенных при 5 мкмоль фотонов/м²·с в присутствии 5 мМ глюкозы, стресс-белки HliA/HliB не обнаруживаются, но освещение интенсивным светом вызывает индукцию синтеза белков, которые ассоциированы с тримерами ФС1. Таким образом, выявлена ассоциация белков HliA/HliB не только с тримерами, но и с мономерами ФС1, что предполагает универсальную роль этих белков в защите фотосинтетического аппарата от избыточного света.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: светоиндуцируемые белки HliA/HliB, световой стресс, фотосистема 1, цианобактерии.

При высокой интенсивности света нефотохимическое тушение избыточно поглощенной энергии защищает фотосинтетический аппарат растений и цианобактерий от деструкции [1–4]. Важную роль в защите фотосинтетического аппарата цианобактерий от деструкции играют светоиндуцируемые стрессовые белки HliP (high-light inducible proteins) или SCPs (small chlorophyll *a/b* Cab-like proteins) [5, 6]. Эти белки, необходимые для выживания организмов в условиях высокой интенсивности света, обнару-

живают сходство с хлорофилл *a/b*-связывающими белками светособирающих комплексов (Cab) растений и, по-видимому, являются их эволюционными предшественниками [7, 8]. Белки Hli локализованы в тилакоидной мембране, содержат одну трансмембранную спираль, хлорофиллсвязывающий домен и характеризуются низкой молекулярной массой 6–10 кДа [5–7, 9]. Эти белки у цианобактерий кодируются светоиндуцируемыми генами *hli*, которые обнаружены во всех секвенированных к настоящему времени геномах цианобактерий; число копий генов *hli* зависит от вида и экотипа цианобактерий [9, 10].

У цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803 (далее *Synechocystis*) идентифицировано пять белков Hli, четыре из которых представляют собой низкомолекулярные белки HliA/HliB, HliC/HliD;

Принятые сокращения: ФС1 (ФС2) – фотосистема 1 (фотосистема 2); HliA/HliB – белки, индуцируемые светом высокой интенсивности; β -DM – *n*-додецил- β -D-мальтозид.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM15-054, 30.08.2015.

** Адресат для корреспонденции.

пятый белок является С-концевым фрагментом феррохелатазы [11, 12]. Гены, кодирующие HliA–HliD, индуцируются различными стрессовыми условиями, включающими не только свет высокой интенсивности, но и низкую температуру, а также голодание по источникам азота и серы [11, 13], что затрудняет выяснение механизма индукции синтеза этих белков.

Показано, что мутанты цианобактерий с инактивированными генами *hliA–hliD* чувствительны к свету высокой интенсивности, отличаются от клеток дикого типа по содержанию пигментов и неспособны к нефотохимической диссипации абсорбированной световой энергии [14]. Белки Hli могут предотвращать образование активных форм кислорода, связывая образующиеся при стрессе свободные молекулы хлорофилла, генерирующие синглетный кислород [15]. Кроме того, белки Hli участвуют, по-видимому, в регуляции биосинтеза тетрапирролов и, таким образом, регулируют синтез хлорофилла [15]. Обнаружено, что HliD связывает молекулы хлорофилла *a* и β -каротина и осуществляет диссипацию абсорбированной энергии путем переноса энергии от хлорофилла *a* (состояние G_y) к β -каротину (состояние S_1) [16].

Особый интерес представляют два белка этого семейства – HliA и HliB, т.к. именно они являются критичными для выживания клеток *Synechocystis* в условиях светового стресса [17]. Обнаружено, что *hliA* и *hliB* функционально комплементарны [15] и характеризуются высокой степенью сходства нуклеотидных последовательностей (87%) [11], что указывает на сравнительно недавнюю дубликацию этого гена [12, 18]. Экспрессия генов *hliA* и *hliB* и высокая степень сходства их последовательностей предполагает, что они играют сходную роль в клетке, обнаруживая тесную корегуляцию [12].

Данные о связывании этих важных белков с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран цианобактерий разноречивы. Было показано, что HliA и HliB у *Synechocystis* ассоциированы с тримерами, но не с мономерами ФС1, и необходимы для их стабилизации [17]. С другой стороны, было обнаружено, что белки HliA и HliB *Synechocystis* связаны с белком CP47 ФС2, но не с ФС1 [19]. Для лучшего понимания функций HliA/HliB необходимо выяснить, с какими хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидов в клетке цианобактерий они ассоциированы. Данная работа посвящена изучению ассоциации светоиндуцируемых стрессовых белков HliA и HliB с тримерами и мономерами ФС1 клеток дикого типа *Synechocystis*, мутанта, лишённого ФС2, и мутанта, неспособного к образованию тримеров ФС1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы цианобактерий и условия выращивания. Объектом исследования служили клетки дикого типа цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803, а также мутанта, лишённого ФС2 ($\Delta psbDI$, $\Delta psbDII$, $\Delta psbC$) [20], и мутанта $\Delta psal$, неспособного к образованию тримеров ФС1 вследствие нарушения гена *psaL* [21]. Цианобактерии выращивали в жидкой среде BG-11 [22] при 30° в условиях постоянного освещения флуоресцентными лампами дневного света и аэрацией окружающим воздухом с помощью магнитной мешалки до середины логарифмической фазы роста. Клетки дикого типа и мутанта, неспособного к образованию тримеров ФС1, выращивали при умеренной интенсивности света 40 мкмоль фотонов/м²·с. Клетки мутанта без ФС2 выращивали при низкой интенсивности света (5 мкмоль фотонов/м²·с) с добавлением 5 мМ глюкозы и антибиотиков (хлорамфеникол 20 мкг/мл, спектиномицин 20 мкг/мл). Мутант $\Delta psal$ выращивали в присутствии канамицина (80 мкг/мл). Для создания условий светового стресса клетки дикого типа и мутантов без ФС2, выращенных в указанных выше условиях, освещали в течение 1 ч светом высокой интенсивности (150 мкмоль фотонов/м²·с). Использование не очень высокой интенсивности светового стресса имело целью предотвращение фотодеструкции и гибели клеток, особенно в случае мутанта без ФС2. При сравнительных исследованиях клеток дикого типа и мутанта без ФС2 клетки дикого типа были предварительно адаптированы к условиям выращивания мутанта.

Выделение тилакоидных мембран и фракционирование хлорофилл-белковых комплексов. Тилакоидные мембраны выделены по методу Шубина с соавт. [23, 24]. Для экстракции нативных комплексов фотосистем из тилакоидной мембраны использовали мягкий неионный детергент *n*-додецил- β -D-мальтозид (β -DM), который добавляли в соотношении детергент : хлорофилл 15 : 1. После инкубации при 4° в течение 30 мин лизат центрифугировали при 18 000 g в течение 10 мин. Хлорофилл-белковые комплексы выделяли с помощью анионообменной хроматографии на колонке DEAE-Toyopearl-650 [23, 24].

Определение содержания хлорофилла и активности комплексов ФС1. Содержание хлорофилла *a* в образцах определяли в этаноловом экстракте [25].

Активность фракции тримеров ФС1 определяли по способности к фотоокислению P700 (первичного донора электрона реакционного центра ФС1) как фотоиндуцированное изменение поглощения при 810 нм (против 870 нм) при

освещении действующим светом 730 нм. Измерения проводили с помощью флуориметра DUAL-PAM-101 с приставкой ED-P700 DW-101 («Walz, Effelrich», Германия). Об активности ФС2 судили по переменной флуоресценции, которую измеряли при помощи флуориметра PAM-101 с действующим светом 680 нм.

Выделение белков, Ds-Na-ПААГ-электрофорез и вестерн-блоттинг. Белки фракционировали в ПААГ в присутствии Ds-Na [26]. Содержание белка определяли по методу Бредфорд [27]. На дорожку наносили по 20 мкг белка. Перед нанесением образцы прогревали при 95° в течение 10 мин, затем центрифугировали при 18 000 g в течение 10 мин.

Электрофорез белков проводился в Tris-глициновом буфере (25 mM Tris, 250 mM глицин, 0,1%-ный Ds-Na, pH 7,5). Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили в камере для блоттинга в Tris-глициновом буфере для переноса (25 mM Tris, 250 mM глицин, 20%-ный этанол, 0,02%-ный Ds-Na, pH 7,5) в течение часа при 200 мА. Затем мембрану с перенесенными белками помещали на 1 ч при 4° в блокирующий буфер TBST (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0,1%-ный Tween 20, pH 7,5) с добавлением 5%-ного сухого обезжиренного молока и затем добавляли первичные антитела. Были использованы поликлональные антитела кролика к HliA/HliB (1 : 4000) («Abcam», США). Мембрану инкубировали с антителами в течение ночи при 4° и постоянном помешивании. В качестве вторичных антител использовали антикроличьи IgG козла, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 10 000) («AgriSera», Швеция). Каждый этап сопровождали многократным промыванием мембран буфером TBST. Иммунные комплексы на мембране выявляли с помощью флуоресцентной системы детекции ECL («GE Healthcare», Великобритания), сигналы регистрировали на рентгеновскую пленку («Retina», Германия). Пленку сканировали, данные обрабатывали с помощью программы Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Солюбилизация тилакоидных мембран и выделение хлорофилл-белковых комплексов. Тилакоидные мембраны лизировали мягким неионным детергентом β -DM, используя соотношение хлорофилл : детергент 1 : 15. В предварительных экспериментах для солюбилизации тилакоидных мембран использовались различные концентрации β -DM (соотношение хлорофилл : детергент – 1 : 15; 1 : 18; 1 : 20). Для дальнейшей работы было выбрано соотношение хлорофилл :

детергент 1 : 15, т.к. при этой концентрации достаточный выход хлорофилл-белковых комплексов сопровождался наименьшим образованием свободных пигментов. Такая же концентрация β -DM была использована в работе Ванг с соавт. [17].

При фракционировании хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран цианобактерии *Synechocystis* с помощью анионообменной хроматографии были получены три отдельных пика, охарактеризованных как с помощью абсорбционной спектроскопии, так и по составу белков и активности ФС1. Были выделены фракция тримеров ФС1, фракция, содержащая мономеры ФС1 вместе с комплексом ФС2, и фракция свободных хлорофиллов и каротиноидов (рис. 1, а). Содержание хлорофилла в тримерах ФС1 клеток дикого типа составляло в среднем $68 \pm 4\%$ от суммарного хлорофилла, т.е. большая часть хлорофилла тилакоидных мембран этой цианобактерии локализована в тримерах ФС1, как и у изученной ранее *Arthrospira platensis* [28].

Сравнение фотоиндуцированного изменения поглощения P700 в тримерах ФС1 и фотосинтетических мембранах клеток дикого типа указывало на активность выделенных тримеров ФС1. С помощью электрофореза в ПААГ установлено, что по составу белков фракция тримеров ФС1 из клеток дикого типа интактна, т.к. содержит все характерные для ФС1 белковые компоненты (рис. 1, б): высокомолекулярные PsaA и PsaB и низкомолекулярные белки (PsaD, F; PsaL; PsaE, C, K и PsaJ, X, I, M). Фракции, содержащие мономеры ФС1 и комплекс ФС2, представлены белками обеих фотосистем. Мономеры ФС1, полностью свободные от примеси ФС2, были выделены из клеток *Synechocystis*, лишенных ФС2.

Ассоциация белков HliA/HliB с тримерами ФС1 клеток дикого типа *Synechocystis*. С помощью вестерн-блоттинга изучали ассоциацию белков HliA/HliB с тримерами ФС1 из клеток дикого типа, выросших в условиях умеренного освещения (40 мкмоль фотонов/м²·с). Установлено, что белки HliA/HliB ассоциированы как с фракцией тримеров ФС1, так и с фракцией, содержащей мономеры ФС1 и комплекс ФС2 (рис. 1, в). Клетки цианобактерий дикого типа подвергали действию умеренного светового стресса. Для этого клетки, выращенные в условиях нормального света (40 мкмоль фотонов/м²·с), освещали светом высокой интенсивности (150 мкмоль фотонов/м²·с, 1 ч). Белки HliA/HliB обнаружены во фракции, содержащей мономеры ФС1 и комплекс ФС2 (фракции 17–20 и 23–26), и во фракции, содержащей тримеры ФС1 (рис. 1, г).

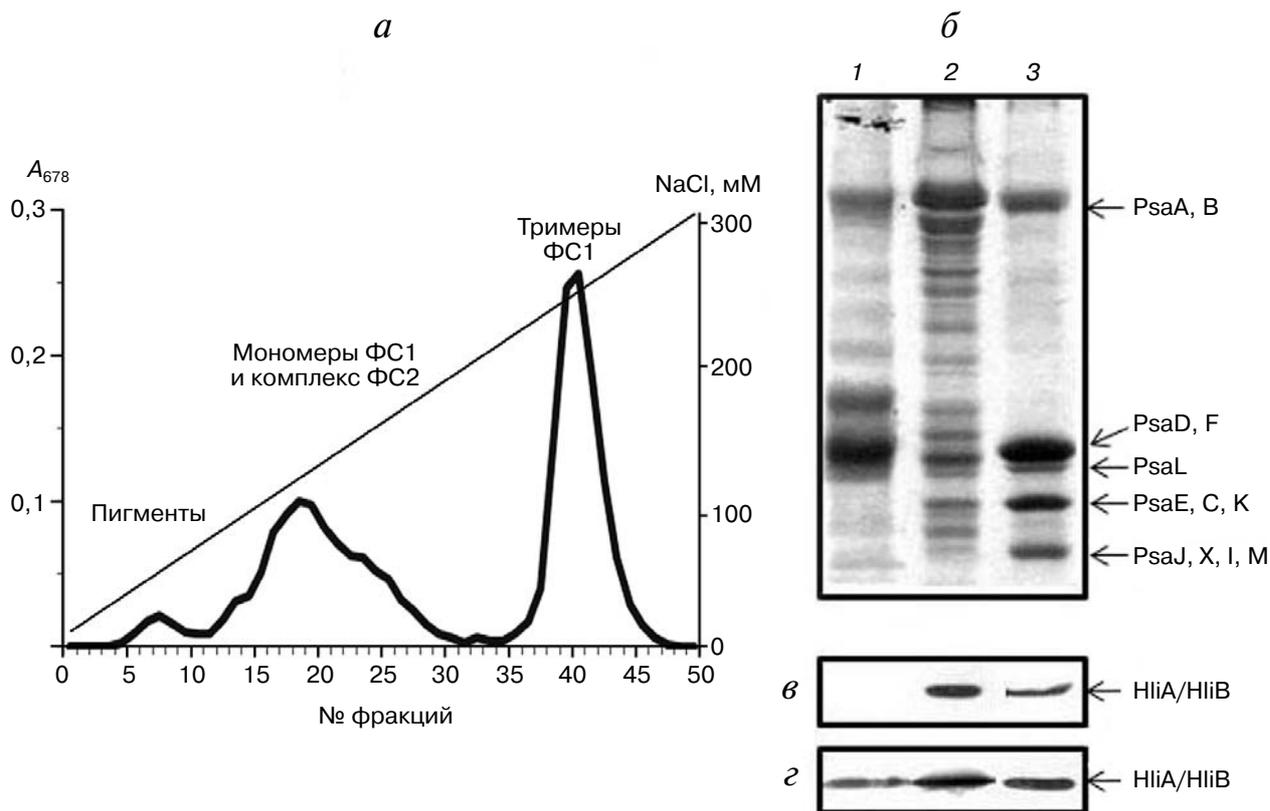


Рис. 1. Ассоциация стресс-индуцируемых белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран клеток дикого типа *Synechocystis*: *a* – хроматографический профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов на анионообменной колонке с DEAE-Toyopearl 650M; *б* – электрофореграмма белков фотосистем после анионообменной хроматографии во фракциях 17–20 (1), 23–26 (2) и 40–43 (3). Белки HliA/HliB во фракциях детектировали с помощью вестерн-блоттинга в клетках, выращенных в нормальных условиях (*б*), или в клетках, подвергнутых действию светового стресса (*з*)

Установлено, что содержание HliA/HliB в тримерах ФС1 (фракции 40–43) после действия светового стресса увеличивается в 1,7 раза по сравнению с неосвещенными клетками.

Ассоциация белков HliA/HliB с мономерами ФС1 у мутанта, дефицитного по ФС2. Для того чтобы показать ассоциацию HliA/HliB с мономером ФС1, был использован мутант *Synechocystis*, лишенный ФС2 и содержащий в тилакоидных мембранах только ФС1. При фракционировании на анионообменной колонке хлорофилл-белковых комплексов мутанта выявлены три пика: тримеры ФС1, мономеры ФС1 и свободные пигменты. Как следует из рис. 2, *a*, содержание тримеров ФС1 снижено относительно содержания мономеров ФС1 у мутанта по сравнению с клетками дикого типа, выращенными в нормальных условиях (рис. 1, *a*). С помощью вестерн-блоттинга показано, что белки HliA/HliB ассоциированы только с фракцией мономеров ФС1 и не обнаружены во фракции тримеров

ФС1 (рис. 2, *б, в*). Клетки мутанта без ФС2 были подвергнуты световому стрессу (150 мкмоль фотонов/м²·с, 1 ч). После действия светового стресса белки HliA/HliB идентифицированы также во фракции, содержащей мономеры ФС1 (фракции 10–14), причем содержание HliA/HliB увеличилось в 1,2 раза (рис. 2, *з*) по сравнению с клетками, выращенными при умеренном освещении (40 мкмоль фотонов/м²·с). Белки HliA/HliB не обнаружены во фракции тримеров ФС1 мутанта после действия светового стресса (рис. 2, *з*). Таким образом, исследование, проведенное на клетках мутантов *Synechocystis*, дефицитных по ФС2, показало, что белки HliA/HliB могут быть ассоциированы и с мономерами ФС1, и что синтез этих белков индуцируется умеренным световым стрессом.

Ассоциация белков HliA/HliB с пигмент-белковыми комплексами у мутанта ΔpsaL (без тримеров ФС1). Для того чтобы выяснить, способны ли белки HliA/HliB ассоциироваться с мономе-

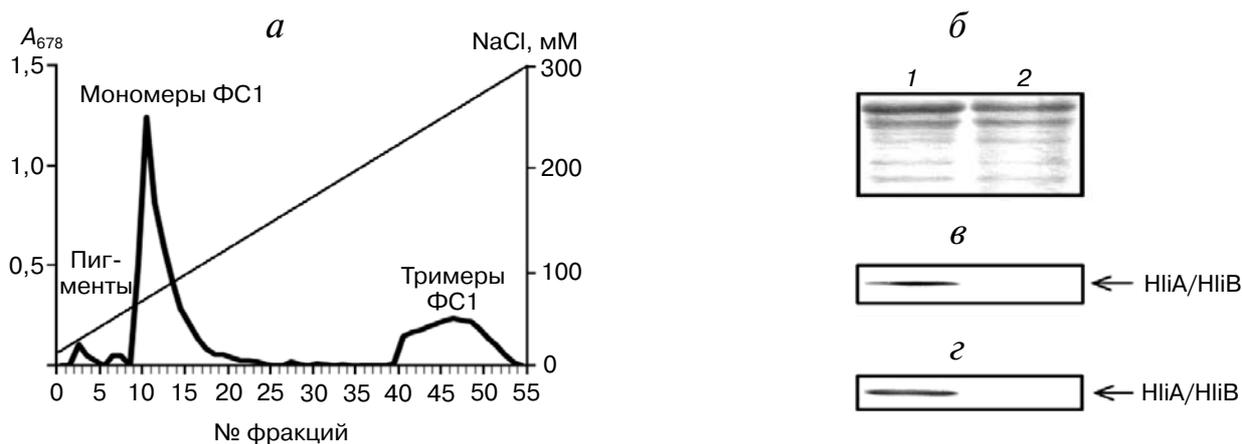


Рис. 2. Ассоциация белков HliA/HliB с мономерами ФС1 в клетках мутантов *Synechocystis*, дефицитных по ФС2: *a* – профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов клеток мутантов; *б* – электрофореграмма белков фотосистем, полученных с помощью анионообменной хроматографии, после окрашивания Кумасси R-250, которое использовали для определения равного нанесения белка: 1 – фракции 10–14, 2 – фракции 45–49. Белки HliA/HliB во фракциях детектировали с помощью вестерн-блоттинга в клетках, выращенных в нормальных условиях (*б*), или в клетках, подвергнутых действию светового стресса (*z*)

рами ФС1 и комплексом ФС2 в отсутствие тримеров ФС1, изучали мутант без тримеров ФС1. При исследовании клеток мутанта, выращенных в нормальных условиях, белки HliA/HliB обнаружены во фракциях, содержащих мономеры ФС1 и ФС2 (рис. 3). После действия светового стресса содержание белков HliA/HliB, связанных с мономерами ФС1 и комплексом ФС2,

возрастало в 2 раза. Таким образом, в отсутствие тримеров ФС1 белки HliA/HliB ассоциируются с мономерами ФС1 и комплексом ФС2.

Влияют ли условия выращивания клеток на ассоциацию белков HliA/HliB с тримерами ФС1? Условия выращивания мутанта, дефицитного по ФС2, отличаются от условий выращивания клеток дикого типа. Т.к. у мутантов, не содержащих

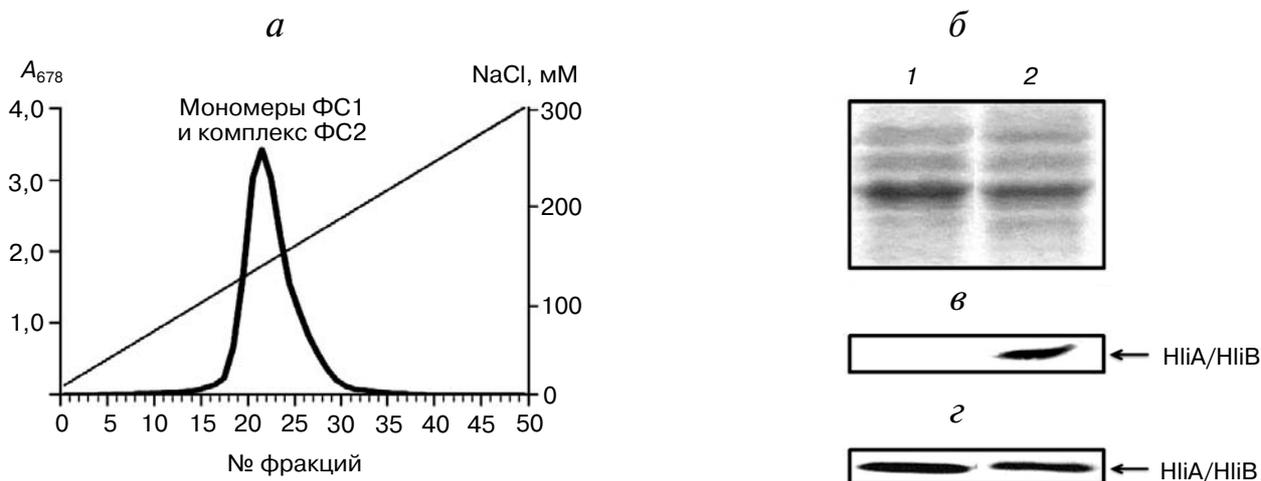


Рис. 3. Ассоциация белков HliA/HliB с мономерами ФС1 в клетках мутанта $\Delta psal$ *Synechocystis*, не содержащего тримеров ФС1: *a* – профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов клеток мутанта; *б* – электрофореграмма белков фотосистем после анионообменной хроматографии после окрашивания Кумасси R-250, которое использовали для определения равного нанесения белка: 1 – фракции 22–24, 2 – фракции 26–30. Белки HliA/HliB во фракциях детектировали с помощью вестерн-блоттинга в клетках, выращенных в нормальных условиях (*б*), или в клетках, подвергнутых действию светового стресса (*z*)

ФС2, нарушен фотосинтез, их культивировали в среде, содержащей глюкозу в качестве источника энергии, при низкой интенсивности света (5 мкмоль фотонов/м²·с). Для того чтобы выяснить, влияют ли условия выращивания мутанта на ассоциацию HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами, клетки дикого типа выращивали в тех же условиях, что и клетки мутанта без ФС2 (рис. 4), и затем подвергали действию светового стресса. Белки HliA/HliB идентифицированы в составе фракций, содержащих мономеры ФС1 и ФС2, а также во фракции, содержащей тримеры ФС1 (рис. 4, в). Показано, что выращивание в среде с глюкозой при низкой освещенности не приводит к отсутствию HliA/HliB в тримерах ФС1 дикого типа. Таким образом, отсутствие HliA/HliB в тримерах ФС1 мутанта без ФС2 не обусловлено условиями выращивания.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отличие от высших растений у цианобактерий до 80% хлорофиллов клеток локализовано в комплексе ФС1 [28], который существует в тилакоидах преимущественно в виде тримеров [20, 29–31]. Предполагают, что наличие тримеров ФС1 необходимо для большей стабильности

комплекса и защиты от фотодеструкции [17–30]. В состав хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран кроме коровых белков, таких как PsaA, PsaB, и низкомолекулярных белков входят дополнительные белки, такие как IsiA и Hli. В работе мы изучали локализацию HliA/HliB в хлорофилл-белковых комплексах тримеров и мономеров ФС1 тилакоидных мембран цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803. Большинство статей, посвященных изучению локализации белков Hli в хлорофилл-белковых комплексах, связано с исследованием их локализации в ФС2. Показано, что светоиндуцируемые белки HliA/HliB локализованы в ФС2 цианобактерий [19, 32–35]. Предполагают, что белки HliA/HliB участвуют в стабилизации хлорофилла для его повторного использования при репарации поврежденного комплекса ФС2 и биогенезе вновь синтезированных комплексов ФС2 [16, 33, 34]. Противоречивые данные были получены о локализации HliA/HliB в ФС1. Так, было обнаружено, что белки HliA/HliB не связаны с ФС1 *Synechocystis* [33]. С другой стороны, показано, что белки HliA/HliB содержатся в тримерах ФС1 и не обнаруживаются в мономерах ФС1 цианобактерии [17]. Нами установлено, что белки HliA/HliB ассоциированы с тримерами ФС1 из клеток, выращенных при нормальных условиях, и их содержание увеличивается

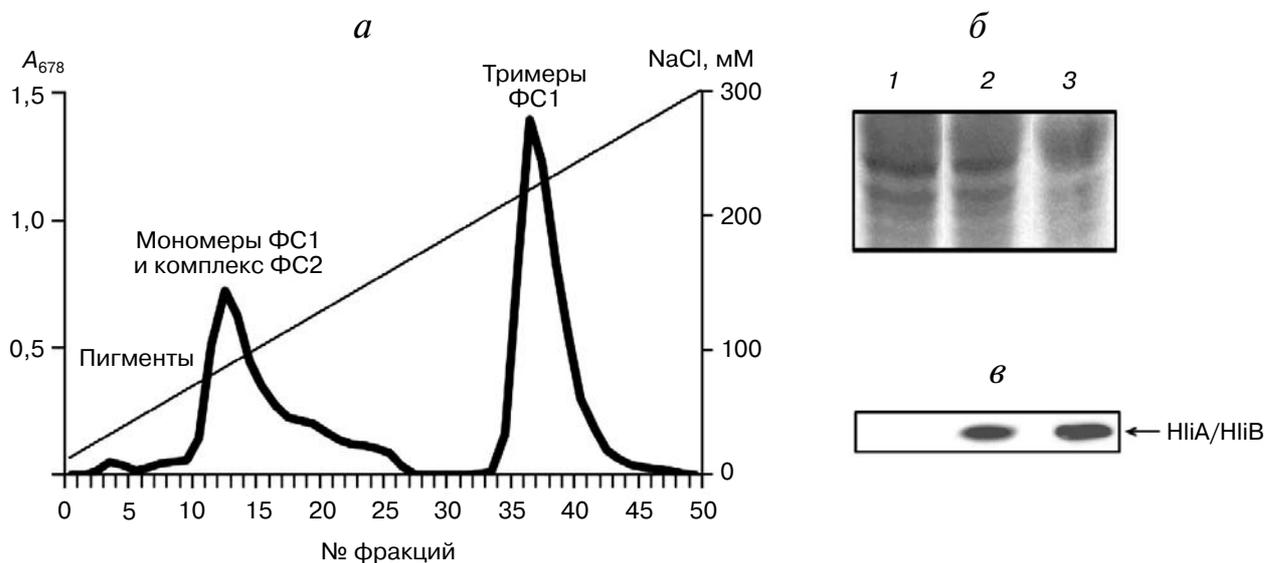


Рис. 4. Ассоциация белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами из клеток *Synechocystis* дикого типа, выращенных на среде с глюкозой при низкой освещенности (5 мкмоль фотонов/м²·с): *a* – профиль фракционирования хлорофилл-белковых комплексов клеток, подвергнутых световому стрессу; *б* – электрофореграмма белков, окрашенных Ку-масси R-250, которое использовали для определения равного нанесения белка: 1 – фракции 10–14, 2 – фракции 17–22, 3 – фракции 36–40. Белки HliA/HliB во фракциях детектировали с помощью вестерн-блоттинга в клетках, подвергнутых действию светового стресса (в)

ется в 1,7 раза в условиях светового стресса. Наши результаты согласуются с данными Ванг с соавт. [17] относительно наличия белков Hli в тримерах ФС1 клеток дикого типа в стрессовых условиях. В работе Ванг с соавт. [17] белки Hli не обнаружены во фракции, содержащей мономеры ФС1 и комплекс ФС2, что, возможно, обусловлено фотодеструкцией при использовании сильного светового стресса (200–400 мкмоль фотонов/м²·с в течение 12 ч). Сходные с нашими результатами данные о присутствии белков HliA/HliB в клетках, выращенных при низкой интенсивности света, были получены в ранее опубликованной работе Яо с соавт. [19].

При исследовании мутантов *Synechocystis* без ФС2 нами впервые показано, что в клетках цианобактерий, выращенных в нормальных условиях, белки HliA/HliB ассоциированы с мономерами ФС1 цианобактерии, и их содержание увеличивается в условиях светового стресса. Эти данные согласуются с работой, проведенной на клетках высших растений. Было показано, что эволюционный гомолог Hlip – односпиральный белок Ohp *Arabidopsis thaliana* – связан с мономером ФС1 [10].

Разноречивость полученных данных может быть обусловлена тем, что время обновления белков ФС1 существенно превышает таковое в ФС2 [36]. Из-за этого содержание дополнительных белков HliA/HliB, участвующих в реутилизации хлорофилла и ассоциированных с ФС1, ниже, чем в ФС2. Возможно, их содержание ниже уровня обнаружения методов, используемых в работах. Кроме того, отличия могут быть вызваны различными условиями культивирования клеток [36]. Связь белков Hli с мономерами и тримерами ФС1 не кажется удивительной, т.к. они, по-видимому, могут выполнять функции запаса и сохранения хлорофилла и являться белками-переносчиками хлорофилла при нарушениях ФС1 и синтезе насцентных комплексов ФС1, как это предполагается для ФС2. Считается, что белки Hli участвуют в системе координированной доставки пигментов и вновь синтезированных апобелков при биогенезе фотосинтетических комплексов ФС1 и ФС2, уменьшая риск накопления фототоксичных несвязанных хлорофиллов [37].

Как следует из наших данных, белки HliA/HliB могут быть ассоциированы как с мономерами, так и с тримерами ФС1, что предполагает локализацию сайта связывания этих белков на поверхности мономера ФС1, не экранируемой при олигомеризации. Сходная локализация на поверхности ФС1 характерна и для дополнительного белка IsiA [38]. При исследовании мутантов без ФС2 нами установлено, что белки

HliA/HliB не ассоциированы с тримерами ФС1. Тот факт, что относительное содержание тримеров ФС1 в клетках мутанта без ФС2 по сравнению с клетками дикого типа снижено (рис. 1, а и 2, а), свидетельствует в пользу предположения о важности присутствия белков Hli для стабилизации тримеров ФС1 [17]. Тримеры ФС1, выделенные из клеток дикого типа и мутанта без ФС2, были фотохимически активны.

Не исключено, что существенные изменения структуры хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран у мутантов без ФС2 [39] препятствуют связыванию HliA/HliB с тримерами ФС1. По-видимому, делеция ФС2 вызывает нарушение структуры хлорофилл-белковых комплексов тилакоидной мембраны и/или изменение структуры тримера ФС1, и это приводит к тому, что HliA/HliB не могут ассоциироваться с тримерами ФС1 у мутанта без ФС2. На изменения в структуре функционального мегакомплекса, состоящего из антенного комплекса фикобилисом, ФС1 и ФС2 [40], указывают данные по содержанию фикобилисом (максимум поглощения 625 нм). Судя по спектрам поглощения клеток цианобактерии дикого типа и мутанта без ФС2, нормированных в максимуме поглощения хлорофилла, содержание фикобилисом у мутанта без ФС2 вдвое выше, чем в клетках дикого типа цианобактерий (рис. 5). По-видимому, при делеции ФС2 структура мегакомплекса тилакоидной мембраны существенно нарушена, что также может приводить к изменениям в структуре тримеров ФС1, препятствующим ассоциации белков HliA/HliB.

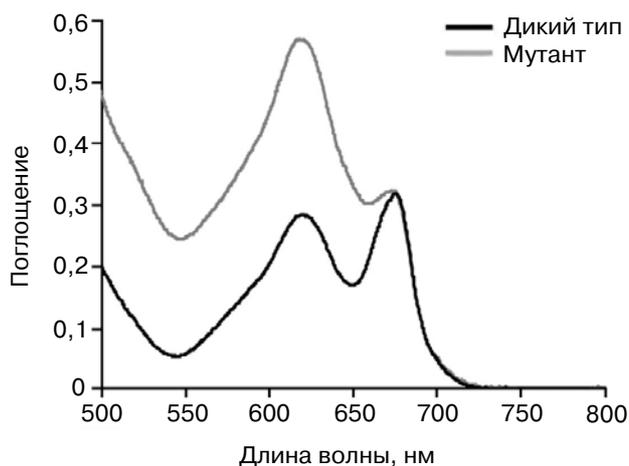


Рис. 5. Спектры поглощения клеток *Synechocystis* дикого типа и мутанта, дефицитного по ФС2. Спектры нормированы при максимуме поглощения хлорофилла (680 нм)

Для проверки предположения о том, что условия выращивания клеток не приводят к делеции белков HliA/HliB в тримерах ФС1, клетки дикого типа были выращены в тех же условиях, что и мутант без ФС2. Белки HliA/HliB удалось идентифицировать в тримерах ФС1 клеток дикого типа после воздействия светового стресса. Таким образом, выращивание клеток в среде с глюкозой при низкой освещенности не влияет на ассоциацию белков HliA/HliB с хлорофилл-белковыми комплексами. Только нарушения, связанные с мутацией – отсутствием ФС2, вызывают изменения в ассоциации Hli с тримерами ФС1. Как следует из рис. 2, в, у мутанта без ФС2 HliA/HliB экспрессируются даже при низком освещении (5 мкмоль фотонов/м²·с), в отличие от клеток дикого типа, у которых в этих условиях не обнаруживаются белки HliA/HliB (данные не приведены). Это свидетельствует о том, что мутант более подвержен световому стрессу, и экспрессия стрессовых белков HliA/HliB у мутанта индуцируется даже в условиях низкой освещенности. Сходная экспрессия HliA/HliB при низкой освещенности показана для мутантов, лишенных ФС1 [17, 33].

Для выявления возможной взаимозависимости ассоциации HliA/HliB с мономерами и тримерами ФС1 был изучен мутант $\Delta psal$, не со-

державший тримеров ФС1. Обнаружено, что отсутствие тримеров ФС1 не влияет на связывание белков HliA/HliB с мономерами ФС1 и комплексами ФС2. По-видимому, изменения в тилакоидной мембране из-за отсутствия тримеров ФС1 не являются столь значительными и не приводят к изменениям в связывании белков HliA/HliB с другими хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидов.

Таким образом, на основании наших результатов можно заключить, что белки HliA/HliB могут связываться с основными хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидных мембран цианобактерий: мономерами ФС1, комплексом ФС2 [19] и тримерами ФС1. Ассоциация HliA/HliB как с ФС1, так и с ФС2 указывает на их универсальные функции в защите фотосистем цианобактерий.

Авторы выражают благодарность проф. В.Ф.Д. Вермаасу (Университет Аризоны, США) за предоставление мутантов цианобактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы 1.7П Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (гранты 13-04-00533а и 12-04-00603а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horton, P., Ruban, A., and Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 655–684.
- Niyogi, K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 333–359.
- Карапетын Н.В. (2007) Нефотохимическое тушение флуоресценции у цианобактерий, *Биохимия*, **72**, 1385–1395.
- Карапетын, N.V. (2008) Protective dissipation of excess absorbed energy by photosynthetic apparatus of cyanobacteria: role of antenna terminal emitters, *Photosynth. Res.*, **7**, 195–204.
- Dolganov, N.A., Bhaya, D., and Grossman, A.R. (1995) Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a/b*-binding proteins of higher plants: evolution and regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 636–640.
- Funk, C., and Vermaas, W. (1999) A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants, *Biochemistry*, **38**, 9397–9404.
- Kilian, O., Steunou, A.S., Grossman, A.R., and Bhaya, D.A. (2008) A novel two domain-fusion protein in *Cyanobacteria* with similarity to the CAB/ELIP/HLIP superfamily: evolutionary implications and regulation, *Mol. Plant*, **1**, 155–166.
- Юрина Н.П., Мокерова Д.В., Одинцова М.С. (2013) Светоиндуцируемые стрессовые белки пластид фототрофов, *Физиология растений*, **60**, 611–624.
- Muramatsu, M., and Hihara, Y. (2012) Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses, *J. Plant Res.*, **125**, 11–39.
- Jansson, S., Andersson, J., Kim, S.J., and Jackowski, G.O. (2000) An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins, *Plant Mol. Biol.*, **42**, 345–351.
- He, Q., Dolganov, N., Bjorkman, O., and Grossman, A.R. (2001) The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC6803: expression and function in high light, *J. Biol. Chem.*, **276**, 306–314.
- Kufryk, G., Hernandez-Prieto, M.A., Kieselbach, T., Miranda, H., Vermaas, W., and Funk, C. (2008) Association of small CAB-like proteins (SCPs) of *Synechocystis* sp. PCC 6803 with photosystem II, *Photosynth. Res.*, **95**, 135–145.
- Mikami, R., Kanasaki, Y., Suzuki, I., and Murata, N. (2002) The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Mol. Microbiol.*, **46**, 905–915.
- Havaux, M., Guedeney, G., He, Q., and Grossman, A.R. (2003) Elimination of high-light-inducible polypeptides related to eukaryotic chlorophyll *a/b*-binding proteins results in aberrant photoacclimation in *Synechocystis* PCC 6803, *Biochim. Biophys. Acta*, **1557**, 21–33.
- Xu, H., Vavilin, D., Funk, C., and Vermaas, W. (2004) Multiple deletions of small Cab-like proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: consequences for pigment biosynthesis and accumulation, *J. Biol. Chem.*, **279**, 27971–27979.

16. Staleva, H., Komenda, J., Shukla, M.K., Slouf, V., Kana, R., Polivka, T., and Sobotka, R. (2015) Mechanism of photoprotection in the cyanobacterial ancestor of plant antenna proteins, *Nature Chem. Biol.*, **11**, 287–291.
17. Wang, Q., Jantaro, S., Lu, B., Majeed, W., Bailey, M., and He, Q. (2008) The high light-inducible polypeptides stabilize trimeric photosystem I complex under high light conditions in *Synechocystis* PCC 6803, *Plant Physiol.*, **147**, 1239–1250.
18. Bhaya, D., Dufresne, A., Vaulot, D., and Grossman, A. (2002) Analysis of the *hli* gene family in marine and freshwater cyanobacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, **215**, 209–219.
19. Yao, D., Kieselbach, T., Komenda, J., Promnares, K., Hernandez-Prieto, M., Tichy, M., Vermaas, W., and Funk, C. (2007) Localization of the small CAB-like proteins in photosystem II, *J. Biol. Chem.*, **282**, 267–276.
20. Shen, G., Boussiba, S., and Vermaas, W.F.J. (1993) *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains lacking photosystem I and phycobilisome function, *Plant Cell*, **12**, 1853–1863.
21. Chitnis, V.P., and Chitnis, P.R. (1993) PsaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *FEBS Lett.*, **336**, 330–334.
22. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdmann, M., and Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 1–61.
23. Shubin, V.V., Tsuprun, V.L., Bezsmertnaya, I.N., and Karapetyan, N.V. (1993) Trimeric forms of the photosystem I reaction center complex pre-exist in the membranes of the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *FEBS Lett.*, **334**, 79–82.
24. Shubin, V.V., Bezsmertnaya, I.N., and Karapetyan, N.V. (1992) Isolation from *Spirulina* membranes of two photosystem I-type complexes one of which contains chlorophyll responsible for the 77 K fluorescence band at 760 nm, *FEBS Lett.*, **309**, 340–342.
25. Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods Enzymol.*, **148**, 350–382.
26. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
27. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
28. Rakhimberdieva, M.G., Boichenko, V.A., Karapetyan, N.V., and Stadnichuk, I.N. (2001) Interaction of phycobilisomes with photosystem 2 dimers and photosystem 1 monomers and trimers of the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biochemistry*, **40**, 15780–15788.
29. Kruij, J., Karapetyan, N.V., Terekhova, I.V., and Rogner, M. (1999) *In vitro* oligomerisation of a membrane protein complexes: liposome based reconstitution of trimeric photosystem I from isolated monomers, *J. Biol. Chem.*, **274**, 18181–18188.
30. Karapetyan, N.V., Holzwarth, A.R., and Rogner, M. (1999) The photosystem I of cyanobacteria: molecular organization, excitation dynamics and physiological significance, *FEBS Lett.*, **460**, 395–400.
31. Карапетян Н.В., Большечужева Ю.В., Юрина Н.П., Терехова И.В., Шубин В.В., Брехт М. (2014) Длинноволновые хлорофиллы фотосистемы I цианобактерий: происхождение, локализация и функции, *Биохимия*, **79**, 283–292.
32. Promnares, K., Komenda, J., Bumba, L., Nebesarova, J., Vacha, F., and Tichy, M. (2006) Cyanobacterial small chlorophyll-binding protein ScpD (HliB) is located on the periphery of photosystem II in the vicinity of PsbH and CP47 subunits, *J. Biol. Chem.*, **281**, 32705–32713.
33. Hernandez-Prieto, M., Tibiletti, T., Abasova, L., Kirilovsky, D., Vass, I., and Funk, C. (2011) The small CAB-like proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: their involvement in chlorophyll biogenesis for photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1143–1151.
34. Yao, D.C., Brune, D.C., Vavilin, D., and Vermaas, W.F.J. (2012) Photosystem II component lifetimes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: small Cab-like proteins stabilize biosynthesis intermediates and affect early steps in chlorophyll synthesis, *J. Biol. Chem.*, **287**, 682–692.
35. Sinha, R.K., Komeda, J., Knoppova, J., Sedlarova, M., and Pospisil, P. (2012) Small CAB-like proteins prevent formation of singlet oxygen in the damaged photosystem II complex of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Environ.*, **35**, 806–818.
36. Yao, D.C., Brune, D.C., and Vermaas, W.F.J. (2012) Lifetimes of photosystem I and II proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *FEBS Lett.*, **586**, 169–173.
37. Chidgrey, J.W., Linhartova, M., Komenda, J., Jackson, P.J., Dickman, M.J., Canniffe, D.P., Konik, P., Pilny, J., Hunter, C.N., and Sobotka, R. (2014) A cyanobacterial chlorophyll synthase-HliD complex associates with the Ycf39 protein and the YidC/Alb3 insertase, *Plant Cell*, **26**, 1267–1279.
38. Boekema, E.J., Hifney, A., Yakushevskaya, A.E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K.-P., Pistorius, E.K., and Kruij, J. (2001) A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria, *Nature*, **412**, 745–748.
39. Van de Meene, A.M.L., Sharp, W.P., McDaniel, J.H., Friedrich, H., Vermaas, W.F.J., and Roberson, R.W. (2012) Gross morphological changes in thylakoid membrane structure are associated with photosystem I deletion in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 1427–1434.
40. Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D.M., Prado, M., He, G., Gross, M.L., and Blankenship, R.E. (2013) Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria, *Science*, **342**, 1104–1107.

**ASSOCIATION OF HIGH-LIGHT-INDUCIBLE
HliA/HliB STRESS PROTEINS WITH PHOTOSYSTEM 1
TRIMERS AND MONOMERS OF THE CYANOBACTERIUM
Synechocystis PCC 6803**

**D. V. Akulinkina¹, Yu. V. Bolychevseva¹, I. V. Elanskaya²,
N. V. Karapetyan¹, N. P. Yurina^{1*}**

¹ *A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninsky pr. 33, Moscow 119071, Russia; fax: +7(495)954-2732,
E-mail: nyurina@inbi.ras.ru*

² *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-4309,
E-mail: ivelanskaya@mail.ru*

Received February 19, 2015
Revision received April 14, 2015

HliP (high-light-inducible proteins) are important in protection of the photosynthetic apparatus of cyanobacteria from light stress. However, the interaction of these proteins with chlorophyll–protein complexes of thylakoids remains unclear. The association of HliA/HliB stress proteins with photosystem 1 (PS1) complexes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 has been studied for understanding of their function. Western blotting has shown that stress-induced HliA/HliB proteins are associated with PS1 trimers in wild-type cells grown under moderate light condition (40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$). The content of these proteins increased 1.7-fold after light stress (150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) for 1 h. In the absence of PS1 trimers (*ΔpsaL* mutant), the HliA/B proteins are associated with PS1 monomers and PS2 complex. HliA/HliB proteins are associated with PS1 monomers but not with PS1 trimers in *Synechocystis* PS2-less mutant grown at 5 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$; the Hli protein content associated with PS1 monomers increased 1.2-fold after light stress. The HliA/HliB proteins have not detected in wild-type cells of the cyanobacterium grown in glucose-supplemented medium at 5 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, but light stress induces the synthesis of stress proteins associated with PS1 trimers. Thus, for the first time the association of HliA/HliB proteins not only with PS1 trimers, but also with PS1 monomers is shown, which suggests the universal role of these proteins in protecting the photosynthetic apparatus from excess light.

Key words: high-light-inducible proteins HliA/HliB, light stress, photosystem 1, cyanobacteria