

УДК 577.355.2

ЗЕЛЕНАЯ ВОДОРΟΣЛЬ *Chlamydomonas reinhardtii* КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОРГАНИЗМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ МУТАЦИЙ В БЕЛКЕ PsbO ФОТОСИСТЕМЫ II *in vivo*

Обзор

© 2015 А.В. Пиголев*, В.В. Климов

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино Московской обл.; факс: +7(496)733-0532,
электронная почта: alexey-pigolev@rambler.ru

Поступила в редакцию 12.01.15
После доработки 25.02.15

Окисление воды в фотосистеме 2 (ФС-2) происходит в специальном водоокисляющем комплексе (ВОК). В его состав входит каталитический центр — Mn_4CaO_5 -кластер, важное значение в стабилизации которого принадлежит внешним белкам ВОК. Главным среди этих белков является белок PsbO, который связывается с ФС-2 вблизи Mn-кластера и напрямую участвует в регуляции его стабильности и активности. Однако молекулярный механизм, с помощью которого PsbO вовлечен в процесс фотосинтетического окисления воды, до сих пор остается невыясненным. Один из подходов в решении данной проблемы — применение сайт-направленного мутагенеза. Для изучения эффекта направленных мутаций в PsbO *in vivo* вплоть до недавнего времени были использованы только цианобактерии (прокариотические организмы). На эукариотических организмах такие исследования (сайт-направленный мутагенез PsbO) не проводили, в то же время известно, что у растений и цианобактерий роль белка PsbO может отличаться. В обзоре рассмотрена возможность использования для этой цели одноклеточную зеленую водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* — эукариота, со сходным с высшими растениями составом белков ВОК. Однако, в отличие от высших растений, штамм *ΔpsbO C. reinhardtii* жизнеспособен, а при выращивании в темноте (гетеротрофно) в нем собирается базовый комплекс ФС-2, обладающий фотохимической активностью, что позволяет исследовать роль отдельных аминокислотных остатков в PsbO *in vivo* без повреждений ФС-2 вследствие фотоинактивации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема 2, водоокисляющий комплекс, белок PsbO, *Chlamydomonas reinhardtii*, сайт-направленный мутагенез.

Фотосистема 2 (ФС-2) — единственный в природе фермент, способный окислять воду за счет энергии поглощенного света, что позволяет растениям и цианобактериям использовать ее в качестве донора электронов при фотосинтезе. Чтобы отнять электроны у молекулы воды ($E0' = 0,81$ В), ФС-2 генерирует самый сильный биологический окислитель — катион-радикал хлорофилла $P680^{+\bullet}$ с редокс-потенциалом, равным 1,12–1,26 В

[1–4]. Однако сам хлорофилл $P680^{+\bullet}$ воду не окисляет. Окисление происходит в расположенном рядом с $P680^{+\bullet}$ водоокисляющем комплексе (ВОК) ФС-2, в каталитический центр которого входит четыре атома марганца и один атом кальция (Mn_4CaO_5 -кластер).

Лигандами атомов марганца и кальция являются белки D1 и CP43 [5], которые вместе с белками D2, CP47, цитохромом *b559* и PsbI формируют минимальный комплекс ФС-2, способный окислять воду в условиях *in vitro*. Однако подобный комплекс не стабилен и быстро инактивируется. Для его устойчивой работы необходимо присутствие еще нескольких внешних белков ВОК, связанных с донорной стороной ФС-2 [6–7]. У высших растений и зеленых водорослей такими белками являются PsbO, PsbP, PsbQ и PsbR (у цианобактерий — PsbO, PsbU и PsbV), основная функция которых вероятно заключается в регуляции и стабилизации работы водо-

Принятые сокращения: ФС-2 — фотосистема 2; МСБ — марганец-стабилизирующий белок (PsbO); *ΔpsbO* — мутант с инактивированным геном, кодирующим белок PsbO; ВОК — водоокисляющий комплекс; РЦ — фотохимический реакционный центр; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; F_v/F_m — отношение переменной флуоресценции хлорофилла (F_v) к максимальному уровню флуоресценции F_m ; F'_v и F'_m — изменения выхода флуоресценции на фоне действия постоянного света; ТМФД — тетраметил-р-фенилендиамин.

* Адресат для корреспонденции.

окисляющего комплекса. Центральную роль в этом играет белок PsbO, который непосредственно влияет на стабильность Mn-кластера [7–8]. Так, удаление белка PsbO из препаратов фотосистемы 2 приводит к 80%-ному снижению скорости фотосинтетического выделения кислорода и к постепенному выходу в среду двух из четырех атомов марганца, входящих в состав ВОК [9].

Для объяснения функции PsbO было предложено несколько гипотез. Наиболее распространенная гипотеза состоит в том, что белок PsbO необходим для защиты Mn-кластера. Согласно этим представлениям, PsbO связывается с ВОК ФС-2 со стороны люмена и закрывает (защищает) каталитический центр от активных химических соединений (восстановителей, металлов, ионов OH⁻ и пр.) [8, 10]. Предполагается также, что PsbO может участвовать в организации протонно-водного транспорта между ВОК и люменом [6–8]. Тем не менее, несмотря на длительный срок исследований (с 1979 г.), действительная функциональная роль белка PsbO в процессе фотосинтетического окисления воды остается невыясненной. Особенно, если нужно указать конкретные аминокислоты в последовательности белка, ответственные за предполагаемую функцию [8, 10–11].

Один из возможных путей решения обозначенной проблемы – это применение сайт-направленного мутагенеза. Важным этапом в этой работе является выбор объекта для исследования. Поскольку PsbO является одним из немногих гидрофильных белков в составе ФС-2, то для его изучения чаще всего используют метод мутаций *in vitro* (препараты ФС-2) [10, 12]. Однако в этих условиях невозможно изучить влияние мутации на биогенез ФС-2, что является одним из самых интересных направлений исследований процесса фотосинтеза в последнее время. Ответить на эти вопросы можно только на живых организмах, изучая эффект аминокислотных замен *in vivo*.

До последнего времени единственным объектом таких манипуляций были цианобактерии (прокариоты) [13–14]. Однако, из-за значительных отличий в составе внешних белков ВОК между растениями и цианобактериями, а также вследствие того, что функции PsbO у этих организмов могут незначительно, но отличаться, переносить получаемые результаты на растения не совсем корректно. Поэтому особый интерес представляет работа с эукариотическими организмами со сходным белковым составом.

Работать непосредственно с высшими растениями сложно по многим причинам. Главная проблема заключается в том, что $\Delta psbO$ -мутант

(с инактивированным геном, кодирующим белок PsbO) у них не жизнеспособен [15]. Кроме того, использованию высших растений препятствует то, что мутации в PsbO делают ФС-2 неустойчивой к фотоинактивации. Поэтому более подходящим для исследования организмом может стать одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii*, поскольку этот эукариотический организм имеет состав белков ВОК, сходный с таковым у высших растений. Помимо этого, *C. reinhardtii* обладает уникальным метаболизмом для зеленых растений. В отличие от высших растений, которым для роста нужен свет (облигатные фототрофы), *C. reinhardtii* может расти в темноте (гетеротрофно) на ацетате и в то же время формировать зеленый активный хлоропласт [16–17]. Эта особенность *C. reinhardtii* позволяет изучать функциональное состояние и биогенез комплекса ФС-2 *in vivo*, исключая повреждение ВОК в результате фотоинактивации.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФОТОСИСТЕМЫ 2

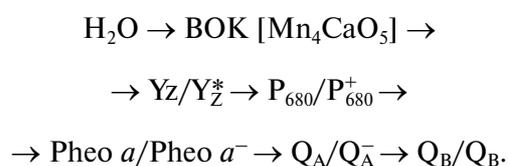
В настоящее время детали строения ФС-2 хорошо известны благодаря данным рентгеноструктурного анализа ФС-2 цианобактерий с разрешением до 1,9 Å в последней работе Умены и соавт. в 2011 г. [5]. Согласно данным этой работы, ФС-2 в клетках цианобактерий (и эукариот) представлена в основном в виде димерного комплекса с мол. массой ~700 кДа, каждый мономер которого состоит из 20 белков и связанных с ними молекул пигментов, липидов и кофакторов переноса электронов (рис. 1, см. цветную вклейку). Большая часть этих белков (17) встроена в мембрану и содержит от одной до шести трансмембранных спиралей и лишь три белка являются периферийными (PsbO, PsbV, PsbU) [5, 18].

Условно все белки ФС-2 можно разделить на три группы: 1) белки т.н. ядра ФС-2 и группы примыкающих к ним низкомолекулярных белков; 2) водорастворимые белки водоокисляющего комплекса и 3) белки внешней антенны комплекса.

Ключевыми для работы ФС-2 являются два белка ядра ФС-2 – D1 и D2, с которыми связаны все основные кофакторы переноса электронов, среди которых: 1) шесть молекул хлорофилла *a*, две из которых входят в состав реакционного центра (РЦ), образуя димер с максимумом поглощения 680 нм (P680), который является первичным донором электрона и передает свой электрон при возбуждении на молекулу

феофитина; 2) две молекулы феофитина (без-магниевого производного хлорофилла), только одна из которых (связанная с белком D1) служит промежуточным акцептором электрона; 3) два хинона – пластохинон Q_A (связанный с белком D2) и пластохинон Q_B (связанный с белком D1), вторичный и конечный акцепторы электрона в ФС-2, расположенные на стромальной стороне ФС-2; 4) Tyr_Z (остаток тирозина 161 белка D1) и Mn₄CaO₅-кластер, образующие редокс-систему окисления воды (у одного из марганцев лигандом также является белок CP43) [4–5, 19].

Все вместе они формируют цепь переносчиков электронов, которая располагается в следующем порядке в направлении от люмена к строме:



В основе механизма функционирования ФС-2 лежат окислительно-восстановительные реакции: ФС-2 с помощью света окисляет воду и переносит электроны на пул пластохинонов. В центре этого процесса находится индуцируемое светом разделение зарядов в РЦ, в результате которого на донорной стороне ФС-2 возникает самый сильный биологический окислитель P680⁺ с редокс-потенциалом до +1,26 В [1–2]. Дефицит электрона в нем восполняется за счет электронов, полученных при окислении воды. Для этого в составе ФС-2 есть специальный водоокисляющий комплекс, каталитический центр которого содержит ионы марганца (Mn-кластер). Mn-кластер представляет собой редокс-систему, способную последовательно отдавать четыре электрона акцептору (Tyr_Z) и затем забирать их у донора (2H₂O) [20].

Mn-кластер последовательно, после каждой вспышки света, окисляется, проходя через пять промежуточных состояний, известных как S_n-состояния (*n* = 0–4). В результате в нем накапливаются четыре положительных заряда, необходимых для отрыва 4-х электронов у двух молекул H₂O (2H₂O → 4H⁺ + O₂↑ + 4e⁻) [21]. Побочным продуктом этой реакции является молекулярный кислород, поэтому такой тип фотосинтеза получил название оксигенного.

Следует отметить, что редокс-система атомов марганца по своей природе нестабильна [22], и поэтому важную роль в оптимизации работы водоокисляющего комплекса играют внешние белки ВОК, которые есть у всех оксигенных организмов.

ВНЕШНИЕ БЕЛКИ ВОДООКИСЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ 2

У всех известных оксигенных организмов водоокисляющий комплекс построен по одному типу: в состав каталитического центра входит Mn₄CaO₅-кластер, важная роль в стабилизации которого принадлежит внешним белкам ВОК. В ФС-2 эти белки связываются с люменальной стороной мембраны и располагаются вблизи каталитического центра ВОК (рис. 1). Роль, которую они играют в активности ВОК, вероятно заключается в стабилизации каталитического центра при физиологическом содержании ионов Ca²⁺ и Cl⁻ в среде [7]. Кроме того, белки ВОК могут защищать Mn-кластер от атаки внешними восстановителями, которые присутствуют в люмене [8].

У разных организмов в состав водоокисляющего комплекса может входить от 1 до 5 белков [7]. Единственным белком ВОК, который присутствует у всех оксигенных организмов, является белок PsbO. Анализ геномов фотосинтезирующих организмов показывает, что PsbO мог появиться одновременно с появлением способности у ФС-2 к окислению воды. Как полагают, у первых протоцианобактерий он был единственным белком ВОК, связанным с Mn-кластером [6, 23]. В подтверждение этой гипотезы можно привести в пример представителей двух штаммов зеленых оксифотобактерий *Prochlorococcus marinus*, у которых PsbO до сих пор является единственным кодируемым в геноме белком ВОК [23–24]. Затем в ходе эволюции в состав ВОК были включены другие белки – PsbU и PsbV, а также – цианоQ и цианоP у цианобактерий. В свою очередь, появление эукариотических фотосинтетиков (зеленых растений) привело к потере белков PsbU и PsbV, место которых в ФС-2 заняли PsbP и PsbQ [23–25].

Таким образом, в ходе эволюции состав белков ВОК несколько раз существенно менялся, что, возможно, связано с адаптацией к новым экологическим условиям [23, 25]. Единственным постоянным белком ВОК оставался белок PsbO, что указывает на его важность во взаимодействии с системой окисления воды. Это подтверждается и биохимическими исследованиями. Обработывая препараты ФС-2 солевыми растворами, можно последовательно удалить внешние белки ВОК [9, 26–27]. Удаление из препаратов ФС-2 белков PsbP и PsbQ незначительно уменьшает кислород-выделяющую активность и может быть компенсировано увеличением содержания в среде ионов Ca²⁺ и Cl⁻, в то время как удаление PsbO необратимо снижа-

ет скорость выделения кислорода (остается ~20% от исходной скорости) и дестабилизирует структуру марганцевого кластера [9, 26–29].

БЕЛОК PsbO

PsbO является уникальным белком ФС-2 и встречается только у окисленных фотосинтезирующих организмов: высших растений, водорослей и цианобактерий. Поиск гомологов в других организмах не дал положительного результата, в том числе не было найдено похожего белка и у аноксигенных пурпурных бактерий, РЦ которых относится к фотосистеме типа II [6, 10, 23]. Среди же водорослей, растений и цианобактерий консервативность PsbO очень высока и составляет ~60–80% среди эукариот (высших растений и водорослей), и ~40% между цианобактериями и растениями [10, 23].

Историю изучения белка PsbO можно начать с работы японских исследователей в 1979 г., когда белок с мол. массой 33 кДа был впервые выделен из препаратов ФС-2 и охарактеризован [30]. Связь PsbO с функцией окисления воды в ФС-2 была показана двумя годами позже (1981–1982 гг.). Сразу несколько групп исследователей сообщили, что обработка препаратов ФС-2 Tris-HCl (pH ≥ 8,0), которая ведет к ингибированию выделения O₂ (ингибирование ВОК 0,8 М Tris-буфером было показано ранее в 1968 г.) [31], также приводит к высвобождению из комплекса ФС-2 трех белков с мол. массами 33 кДа, 23 кДа и 17 кДа (PsbO, PsbP и PsbQ) [32–34]. Белок с наибольшей молекулярной массой, условно названный белком – 33 кДа и есть PsbO. Это название белка часто встречается в литературе, однако оно не отражает истинный молекулярный вес белка, который меньше и равняется 26,5 кДа [6]. Неточность в определении молекулярной массы связана с тем, что PsbO не принадлежит к типичным глобулярным белкам, а имеет вытянутую пространственную структуру. Позднее (в 1984 г.) было установлено, что PsbO необходим для стабильности Mn-кластера: два из четырех ионов марганца высвобождаются из каталитического центра при удалении PsbO из препаратов ФС-2 [9]. В связи с этим PsbO получил свое второе название – марганец-стабилизирующий белок, или МСБ.

В составе ФС-2 PsbO является самым крупным среди внешних белков ВОК, со средней мол. массой 26,5 кДа и состоит из 231–257 аминокислотных остатков. В клетках высших растений и водорослей (эукариот) PsbO, как и другие внешние белки ВОК, кодируется в ядре и синтезируется в виде белка предшественника с двумя

сигнальными последовательностями. Одна из них отвечает за доставку белка внутрь хлоропласта, вторая – за попадание в люмен (*Arabidopsis thaliana* – UniProt ID P23321) [6, 35].

После попадания в люмен сигнальные последовательности в PsbO вырезаются, и белок принимает характерную третичную структуру и связывается с ФС-2. Согласно данным рентгеноструктурного анализа в своей конечной нативной конформации PsbO имеет вытянутую структуру и состоит из двух доменов (β-цилиндр и головной домен). Во взаимодействии с ФС-2 участвуют оба домена, и белок связывается с ФС-2 под углом 40° к плоскости мембраны (рис. 1) [5–6]. Интересно, что в люмене существует пул белков PsbO, которые не связаны с ФС-2 [36–38]. Биологический смысл этого явления не ясен, и вполне вероятно, что свободные белки выполняют еще какую-то функцию, помимо типичной для них в составе ВОК.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ PsbO

Функционирование ФС-2 в отсутствие PsbO.

Экспериментально определить роль PsbO можно по тем изменениям, которые вызовет удаление белка из ФС-2. Биохимическими методами (инкубация в 2 М NaCl, 1 М CaCl₂ или 0,2 М NaCl в присутствии 2,6 М мочевины) можно достаточно мягко удалить белок PsbO из субхлоропластных препаратов ФС-2, оставив интактным Mn-кластер [9, 39]. В этом случае удаление PsbO приводит к резкому снижению скорости выделения кислорода и постепенной диссоциации из Mn-кластера двух из четырех атомов марганца. Однако кислород-выделяющая активность ФС-2 может быть сохранена (~25%), если повысить в среде концентрацию ионов Cl⁻ и Ca²⁺, необходимых для сохранения целостности Mn-кластера в отсутствие внешних белков [9]. Какие же изменения в работе ВОК наблюдаются в этих условиях?

Как показывает анализ кинетики выделения кислорода в ФС-2 в ответ на серию микросекундных вспышек, более всего изменения затрагивают высшие состояния S-цикла. Так, при удалении PsbO увеличивалось время жизни S₂- и S₃-состояний [40], а также ингибировался S₂→S₃ переход [40] и S₃→[S₄]→S₀ переходы [40–41]. Кроме того, в отсутствие PsbO замедляется обмен субстратной воды, которая связана с активным центром в S₃-состоянии [42].

ΔpsbO-Мутации. Намного более серьезные повреждения ФС-2 вызывает потеря PsbO *in vivo*. В этом случае нарушается не только функционирование ВОК, но и страдает структура всей

ФС-2 в целом, вплоть до полного исчезновения комплекса ФС-2 в клетках мутантов и гибели организма. Следует заметить, что степень нарушений в ФС-2 в отсутствие PsbO будет разной для растений и цианобактерий. Так, у растений (*Arabidopsis thaliana*) инактивация PsbO с помощью РНК-интерференции (RNAi) приводит к замедлению роста и гибели растений [15]. В этом случае отсутствие PsbO сопровождается потерей пигмент-белкового комплекса ФС-2 и неспособностью растения к фотоавтотрофному росту. У *ΔpsbO*-мутанта другого модельного организма – зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (штамм FUD44) мутация приводила к потере кислородвыделяющей активности и отсутствию роста в фотоавтотрофных условиях [43]. В случае инкубации культуры мутанта в миксотрофных условиях (на свету в присутствии ацетата) в клетках *C. reinhardtii* не наблюдалось образования стабильного комплекса ФС-2, несмотря на то, что синтез других белков, входящих в состав ФС-2, не нарушался [36, 43]. Однако, как было показано в наших исследованиях, при гетеротрофном выращивании *C. reinhardtii* в темноте (без повреждающего действия света), ФС-2 в клетках *ΔpsbO*-мутанта все-таки собирается, хотя и без способности к выделению кислорода [44].

В отличие от эукариот прокариоты (цианобактерии) способны формировать ФС-2 и даже окислять воду и в отсутствие PsbO. Так, например, *ΔpsbO*-мутант *Synechocystis* sp. PCC 6803 способен расти фотоавтотрофно, хотя выделение кислорода в нем не стабильно и снижено на 60% по сравнению с диким типом [45–46]. Следует, однако, отметить, что для выделения кислорода в этом случае требовалось присутствие в ФС-2 другого внешнего белка ВОК – PsbV (цитохрома *c550*), которого нет у высших растений и зеленых водорослей [11, 45]. Помимо этого, *ΔpsbO*-мутант цианобактерий не способен расти в среде с физиологическим содержанием ионов Cl^- и Ca^{2+} . Для сохранения активности водоокисляющего центра мутантов требовалось поддерживать в среде выращивания высокое (нефизиологическое) содержание Cl^- (≥ 100 мМ), Ca^{2+} или высокие значения pH среды (10,0) [45, 47–48]. Данные наблюдения позволяют предположить, что состояние Mn-кластера в отсутствие PsbO будет зависеть от состава окружающей его среды.

Можно предположить, и это хорошо согласуется с экспериментальными данными, что функция белка PsbO может заключаться в регуляции взаимодействия ВОК со средой люменального пространства хлоропластов. Каким же образом можно объяснить тогда влияние PsbO на активность водоокисляющего комплекса

ФС-2? Предполагается, что это может быть связано с положением белка вблизи сайта окисления воды. Согласно кристаллографическим данным, PsbO связывается с донорной стороны ФС-2, вблизи от атомов марганца, и может брать на себя несколько основных функций.

Во-первых, обеспечивать структурную стабилизацию всех функциональных атомов марганца, а также хлора и кальция в каталитическом центре ВОК ФС-2. Это может происходить за счет взаимодействия PsbO с белками ядерного комплекса ФС-2. Известно, что сам PsbO не является лигандом атомов марганца и кальция в составе Mn_4CaO_5 -кластера. К примеру, минимальное расстояние, на которое PsbO удается приблизиться к атомам марганца в ВОК, составляет 15–20 Å, а это слишком большое расстояние для прямого взаимодействия [5]. Тем не менее PsbO может оказывать влияние на структуру и стабильность Mn-кластера, поскольку отдельные участки белка PsbO контактируют с теми участками белков D1, D2 и CP43, которые являются прямыми лигандами Mn-кластера [5], или необходимы для его стабильности [6].

Во-вторых, при связывании PsbO с ФС-2 достигается защита ВОК от инактивации различными соединениями, за счет изоляции Mn-кластера от люмена. Как полагают, основная причина выхода ионов Mn из состава Mn-кластера, вероятно, связана с их восстановлением редуцентами [8, 49]. Следовательно, роль белка PsbO может состоять в создании барьера на пути этих молекул к каталитическому центру окисления воды. Подтверждением идеи о защитной функции PsbO могут служить результаты исследования по иммобилизации внешних белков на ФС-2 при помощи химической модификации. Закрепление внешних белков на ФС-2 приводит к стабилизации Mn-кластера в условиях термической, кислотной и солевой обработок препаратов ФС-2 [50].

Как продолжение этой функции, роль PsbO может заключаться в организации транспорта необходимых молекул между центром окисления воды и люменом. Так, PsbO вероятно может регулировать доступ к Mn-кластеру ионов хлора, кальция, бикарбоната и обеспечивать удержание этих молекул рядом с Mn-кластером. Кроме того, поскольку марганцевый кластер, в котором происходит окисление воды, закрыт от окружающей его водной среды белковым окружением, доступ к нему воды, а также отведение протонов, может регулироваться [6, 51–54]. В организации таких специальных транспортных каналов важная роль может отводиться белку PsbO.

Следующей предполагаемой функцией PsbO может быть участие белка в регуляции перехо-

дов димер/мономер комплексов ФС-2. Белок, таким образом, может быть вовлечен в биогенез ФС-2. Это предположение основывается на анализе кристаллической структуры ФС-2, где PsbO каждого из мономеров ФС-2 взаимодействует с белком CP47 другого мономера и может таким образом связывать два пигмент-белковых комплекса ФС-2 [5–6]. Кроме того, изучение $\Delta psbO$ -мутации у цианобактерий показало, что комплекс ФС-2 у таких мутантов накапливался в мембранах только в виде мономеров ФС-2 [55].

В заключение следует отметить, что PsbO может обладать ферментативной активностью – функционировать в клетках как ГТФаза или карбоангидраза. Так, в работе Спетеа с соавт. были представлены экспериментальные данные о том, что PsbO (на свету) обладает способностью связывать и гидролизовать молекулы ГТФ [56]. А в опубликованных ранее работах нашей лаборатории и лаборатории Стемлера было высказано предположение, что PsbO может выполнять роль карбоангидразы, участвуя в удалении протонов от ВОК [57–58].

Приведенный здесь список возможных функций белка PsbO не полон. Во-многом, такое их разнообразие может быть связано с тем, что они описывают разные стороны одного явления. Связываясь с ФС-2 белок PsbO одновременно стабилизирует те участки белков D1, D2 и CP43 которые служат лигандами Mn-кластера, так и защищает Mn-кластер от люмена. Однако, с другой стороны, такое количество предположений о функции белка указывает на то, что точный молекулярный механизм функционирования PsbO в ФС-2 до сих пор не установлен.

Сайт-направленный мутагенез PsbO. Одним из основных способов определить на молекулярном уровне, как именно белок PsbO участвует в фотосинтетическом окислении воды, является метод сайт-направленного мутагенеза, при помощи которого можно изменить аминокислотную последовательность белка, и, следовательно, его структуру и функцию. Важным фактором на этом этапе становится выбор модельной системы для исследования.

Для изучения PsbO, как правило, используют метод мутаций в условиях *in vitro* (на препаратах ФС-2), путем замены исходного белка PsbO в ФС-2 на модифицированный белок, что приводит к реконструкции ВОК [10, 12]. В клетках бактерий *E. coli* синтезируют модифицированный белок PsbO, после чего очищенный белок добавляют к препаратам ФС-2, у которых предварительно был удален собственный (нативный) PsbO, что приводит к частичному восстановлению функции выделения кислорода. Благодаря высокой гомологии PsbO у разных

видов организмов можно добавлять белок, взятый у одного вида, к препаратам ФС-2 из других организмов и наблюдать восстановление скорости выделения кислорода. Скорость выделения кислорода после реконструкции увеличивалась, в среднем, до 40–50% от скорости исходных препаратов ФС-2, тогда как без добавления белка она составляла только 15–20% от контроля [59–60].

Основными параметрами, которые изучают *in vitro*, является кинетика связывания белка с мембраной и эффект частичного восстановления скорости выделения O_2 [12, 61–63]. В большинстве случаев данная система является быстрой и удобной, однако у такого подхода имеется ряд ограничений. Во-первых, чтобы удалить исходный (нативный) белок PsbO из ФС-2 приходится использовать обработку, при которой будут удалены и другие внешние белки. Во-вторых, выделение кислорода в препаратах ФС-2 необратимо снижается при любом методе удаления белков. И, в-третьих, исследователям приходится проводить эксперименты с Mn-кластером и в целом с ФС-2, которые были сформированы в клетках дикого типа. Часто же ученых интересует вопрос о том, оказывает ли мутация эффект именно на сборку компонентов ВОК и ФС-2. Чтобы ответить на эти вопросы, приходится исследовать влияние мутации на функционирование ФС-2 в условиях *in vivo*.

До недавнего времени единственным объектом таких исследований с сайт-направленным мутагенезом PsbO были цианобактерии *Synechocystis* sp. [13]. Цианобактерии относятся к прокариотам и являются простым модельным организмом для изучения PsbO, поскольку у них всего один геном и активный комплекс ФС-2 может собираться и без белка PsbO. Как правило, при использовании цианобактерий исследовали влияние полной инактивации гена *psbO* или же в комбинации с выключением синтеза других внешних белков ФС-2 ($\Delta psbO:\Delta psbV$, $\Delta psbO:\Delta psbU$ и др.) [14, 45, 47–48, 64–65]. Замен отдельных аминокислот в самом белке PsbO было сделано немного [10, 13]. В качестве примера можно привести работу по получению мутантных штаммов *Synechocystis* по цистеину. Для изучения роли дисульфидной связи в белке PsbO *in vivo* был создан мутант *Synechocystis* sp. PCC6803, в котором один из остатков цистеина белка был заменен на серин – C20S [13]. Исследование этого мутанта показало, что белок PsbO у него практически не накапливался, и, как следствие, он характеризовался низкой скоростью выделения кислорода (сопоставимой с $\Delta psbO$ штаммом *Synechocystis*). Отсутствие белка в клетке, однако, не было связано со снижением уровня

мРНК, который соответствовал дикому типу [13]. Авторы предположили, что при этой замене у PsbO нарушалась нативная конформация и связывание белка с ФС-2, поэтому синтезированный белок подвергался деградации и протеолизу.

Рассматривая цианобактерии как потенциальный объект для изучения, следует учитывать, что субъединичный состав белков ВОК сильно варьирует между цианобактериями и растениями: белки PsbO, PsbP и PsbQ присутствуют у зеленых водорослей и высших растений, а белки PsbO, PsbU и PsbV у цианобактерий. У прокариот для активности ВОК важное значение имеет белок PsbV, которого нет у высших растений, вследствие чего у цианобактерий (в отличие от высших растений и водорослей) инактивация PsbO не приводит к прекращению выделения кислорода и следовательно трудно оценивать роль отдельных мутаций в PsbO. При определенных условиях в клетках *ΔpsbO* штамма цианобактерий скорость выделения O₂ может составлять ≥50% от клеток дикого типа и полностью подавить выделение кислорода можно только в случае двойной мутации: *ΔpsbO:ΔpsbV* [45, 48].

В связи с этим особый интерес представляет работа с использованием эукариотических организмов со сходным белковым составом. Исследования на высших растениях осложняются тем фактом, что *ΔpsbO*-мутант у них нежизнеспособен. Кроме того, мутации в белке делают ФС-2 очень чувствительной к фотоинактивации [15]. Проблему также представляло и отсутствие до последнего времени метода, позволяющего направлять инактивировать гены в ядерном геноме растений вставкой гомологичной ДНК, как это возможно у дрожжей, бактерий и с геномом хлоропластов. Сейчас, однако, для этой цели возможно использовать систему для редактирования генома *in vivo* – CRISPR-Cas9 system и др. [66]. Кроме того, в настоящее время могут быть получены Т-ДНК инсерционные мутанты арабидопсиса практически по любому гену [67–68]. Также, подавить экспрессию генов сейчас возможно используя методику RNAi-сайленсинга [69]. Применение двух последних подходов позволило изучить роль двух изоформ белка PsbO у арабидопсиса.

В клетках растения *Arabidopsis thaliana* сразу два гена кодируют белок PsbO. Новая форма белка PsbO-2 возникла сравнительно недавно (25–50 млн лет назад) в ходе эволюции, появившись в результате дупликации гена. Аминокислотная последовательность двух белков отличается только по 11 аминокислотным остаткам, однако у каждой из этих изоформ, как полагают,

есть собственная уникальная функция, и они не могут полностью заменить друг друга [70–72]. С помощью RNAi интерференции подавление экспрессии сразу двух белков (PsbO-1 и PsbO-2) приводило к значительным нарушениям в ФС-2 и растения не могли расти в фотоавтотрофных условиях [15]. Выключение одного из двух генов (преждевременный стоп-кодон в PsbO-1 [70] или вставка Т-ДНК [72]) также приводило к развитию определенного фенотипа, со сниженной активностью ФС-2, что поддерживает идею о специализации каждого варианта белка. Основной изоформой белка является PsbO-1 [70–73]. Именно она имеет отношение к функционированию ФС-2, тогда как PsbO-2 служит, по-видимому, для других функций. В частности, одно из предположений связано с тем, что PsbO-2 участвует в дефосфорилировании белка D1 и функционирует как ГТФаза [72].

Исследователями также было продемонстрировано, что уровень экспрессии белков PsbO-1 и PsbO-2 по-разному изменяется при холодной акклиматизации растений. В ходе обработки растений холодом содержание основной формы PsbO-1 снижалось, а уровень PsbO-2 возрастал [74]. Тем не менее вплоть до самого последнего времени производить аминокислотные замены в белке PsbO в высших растениях с использованием методов антисенс-РНК, систем редактирования генома *in vivo* (TALEN, Zinc Finger nucleases, CRISPR-Cas9) и сайт-направленного мутагенеза представлялось затруднительным. Хотя, вероятно, уже в ближайшем будущем технологии, основанные на методе CRISPR-Cas9, станут главным подходом для получения таких (сайт-направленных) мутантов *in vivo* [66]. Кроме того, как уже говорилось, мутации в PsbO делают ФС-2 неустойчивой к фотоинактивации, что приводит к последующей ее деградации. Решить описанные выше проблемы можно при использовании в качестве объекта исследования зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*.

Как и высшие растения, хламидомонада является эукариотическим организмом со сходным белковым составом ВОК, и, кроме того, эта водоросль обладает уникальным метаболизмом [16–17]. В отличие от высших растений, которые для роста нуждаются в свете (облигатные фототрофы), хламидомонада способна расти в темноте (гетеротрофно) на ацетате и, в то же время, формировать зеленый активный хлоропласт. Подобная особенность позволяет изучать функциональное состояние РЦ и биогенез комплекса ФС-2 *in vivo* на выращенных в темноте водорослях, что исключает повреждение ВОК вследствие фотоинактивации. Другими слова-

ми, предоставляется возможность изучать не последствия фотоинактивации, а непосредственно влияние аминокислотных замен на эффективность процесса фотосинтетического окисления воды. Из этого также следует, что у исследователя будут в распоряжении сразу две модельные системы, которые можно сравнивать: темновая и световая культуры *C. reinhardtii*. Другим преимуществом *C. reinhardtii* (как модельного объекта) является простота работы с ними, относительно короткий клеточный цикл развития (6–8 ч), генетическая изученность и наличие разнообразных мутантов по ядерным, хлоропластным и митохондриальным генам [16–17, 75].

Благодаря своему метаболизму *C. reinhardtii* являются очень полезными в изучении мутаций в ФС-2. На среде с источником углерода (ацета-

том) мутанты способны расти с любыми повреждениями ФС-2, вплоть до полного ее отсутствия. Однако $\Delta psbO$ -штамм *C. reinhardtii* для сайт-направленного мутагенеза белка PsbO до последнего времени не использовался. Отчасти это связано с представлениями о том, что у эукариот белок PsbO обязателен для сборки стабильного комплекса ФС-2 и что его инактивация ведет к полной деградации ФС-2 в клетке [43]. Например, критически важны для сборки ФС-2 белки ядерного комплекса ФС-2, потеря которых у *C. reinhardtii* приводит к деградации неправильно сформированного комплекса ФС-2 протеазами даже в темноте [76]. Однако, как показано в наших исследованиях, деградация комплекса ФС-2 у $\Delta psbO$ -мутанта *C. reinhardtii* была во многом связана с повреждающим действием света [44]. При выращивании $\Delta psbO$ -штамма в темноте в клетках происходила сборка, по меньшей мере, стабильного «ядра» комплекса ФС-2, способного к фоторазделению зарядов в РЦ. Особенностью собираемого комплекса ФС-2 было отсутствие способности к выделению кислорода, однако с помощью метода «переменной флуоресценции» был зарегистрирован значительный уровень фотохимической активности ФС-2: отношение F_v/F_m , характеризующее эффективность преобразования энергии в ФС-2, было равно 0,37 (рис. 2 и 3). Кинетика переменной флуоресценции также была чувствительна к диурону (ингибитору транспорта электронов в ФС-2), что свидетельствовало о сборке функционально-активных РЦ ФС-2 у этого мутанта.

Chlamydomonas reinhardtii КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОРГАНИЗМ ДЛЯ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА БЕЛКА PsbO

Как пример использования *C. reinhardtii* для изучения аминокислотных замен в белке PsbO можно привести недавно опубликованное исследование нашей лаборатории [77]. С использованием $\Delta psbO$ -штамма *C. reinhardtii* были получены два мутанта по белку PsbO: в последовательности PsbO были заменены два лизина — в положении 223 и 226 (K223E и K226E, гомологичные His228 и His231 у цианобактерий). Эти положительно заряженные аминокислоты расположены с люменальной стороны белка PsbO и являются высококонсервативными у высших растений и зеленых водорослей. Согласно ряду предположений (рис. 4, см. цветную вклейку) [6, 78], они могут участвовать в формировании гидрофильного канала, соединяющего люмен и ВОК.

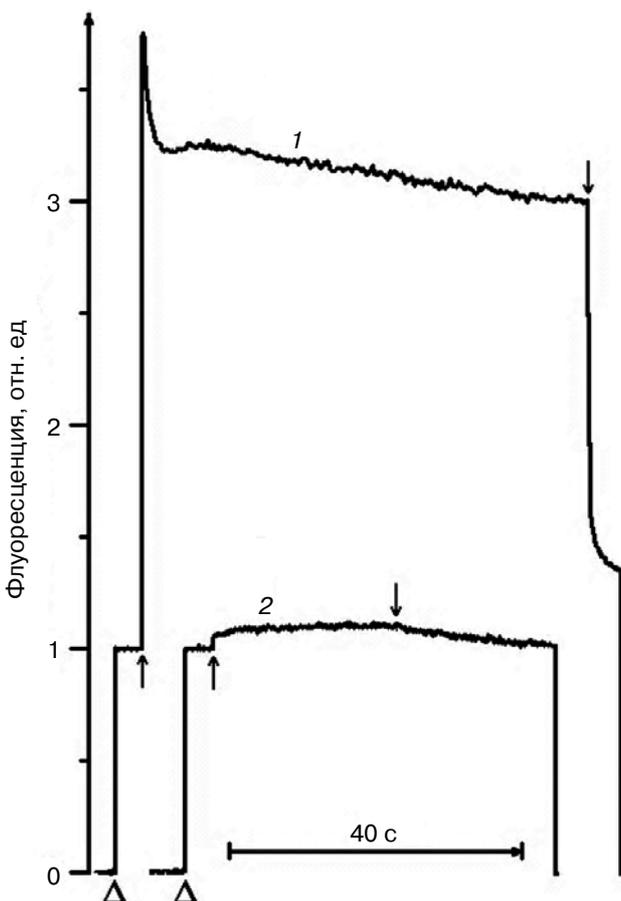


Рис. 2. Кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла (ΔF), измеренная на клетках световых культур дикого типа (1) и штамма $\Delta psbO$ (2) *C. reinhardtii*. Треугольниками указаны моменты включения измерительного света; стрелками вверх и вниз указаны моменты, соответственно, включения и выключения действующего света ($1500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$)

Изучение свойств этих мутантов показало, что остаток лизина в положении 226 был важен для стабильности белка. Его замена на противоположно заряженный остаток глутаминовой аминокислоты приводил к резкому снижению уровня белка в клетке и развитию $\Delta psbO$ -фенотипа (отсутствие фотоавтотрофного роста и фотосинтетической активности ФС-2) [77]. Анализ структуры белка позволил нам предположить, чем вызваны такие нарушения. Это может быть связано с тем, что лизин в позиции 226 – Lys226 (His231 у цианобактерий) располагается непосредственно перед началом С-концевого β -тяжа (K*DIKVTGLWYAQLK), который, как было установлено ранее, необходим для связывания PsbO с комплексом ФС-2 [79]. Кроме того, этот С-концевой участок является важным структурным элементом основного домена PsbO – β -цилиндра, отвечающего за стабильность белка. Поэтому замена в этом участке белка может пре-

пятствовать нормальному фолдингу белка, что приводит к нарушению связывания белка с ФС-2 и последующей его деградации.

Изучение свойств другого мутанта (K223E) показало, что содержание PsbO в клетках этого мутанта сохранялось в пределах нормы, и он был способен к фотоавтотрофному росту и фотосинтетическому выделению кислорода. Однако, по сравнению с контролем (pWT – псевдодиким типом) скорость выделения кислорода и отношение Fv/Fm были снижены на 15–20%. У мутанта K223E отмечалось также увеличение времени темновой релаксации Fv в присутствии диурона, что может свидетельствовать о нарушении функционирования водоокисляющего комплекса.

С чем могли быть связаны наблюдаемые изменения? Согласно одной из гипотез Lys223 может быть важен для удаления протонов от Mn-кластера в люмен, формируя часть канала для их перемещения от ВОК к люмену. Одним из способов проверки этой гипотезы является оценка чувствительности ФС-2 к фотоинактивации. Сильный свет должен вызывать увеличение активности РЦ и ВОК и приводить к закислению люмена и повреждениям в ВОК. Поэтому, если удаление протонов затруднено, к примеру, вследствие мутации, это может усиливать фотоповреждение ФС-2 и снизить ее активность. Однако проверка чувствительности клеток K223E штамма к фотоинактивации не выявила различий между мутантным штаммом и контролем – pWT (рис. 5).

Другая причина нарушений в активности ФС-2 может заключаться в том, что изменение в структуре белка могло сказаться на его защитной функции. Известно, что многие вещества – доноры электронов, обладают способностью ингибировать работу ВОК фотосистемы 2 [49, 80]. При взаимодействии с Mn-кластером редуцтанты способны восстановить марганец до степени окисления Mn^{2+} , что может приводить к диссоциации Mn из ВОК и ингибированию выделения кислорода. Скорость инактивации будет во многом зависеть от доступности Mn-кластера для этих доноров электрона, что определяется как размерами самой молекулы – донора электронов, так и от структуры белкового окружения ВОК. Частичное удаление внешних белков ВОК или их модификация открывают Mn-кластер для редуцтантов и делают его более доступным для ингибирования [49, 80–82].

При исследовании на субхлоропластных препаратах ФС-2 было установлено, что нарушения в работе ВОК у K223E мутанта *C. reinhardtii* могут быть связаны с изменением структуры белка, приводящим к увеличению доступ-

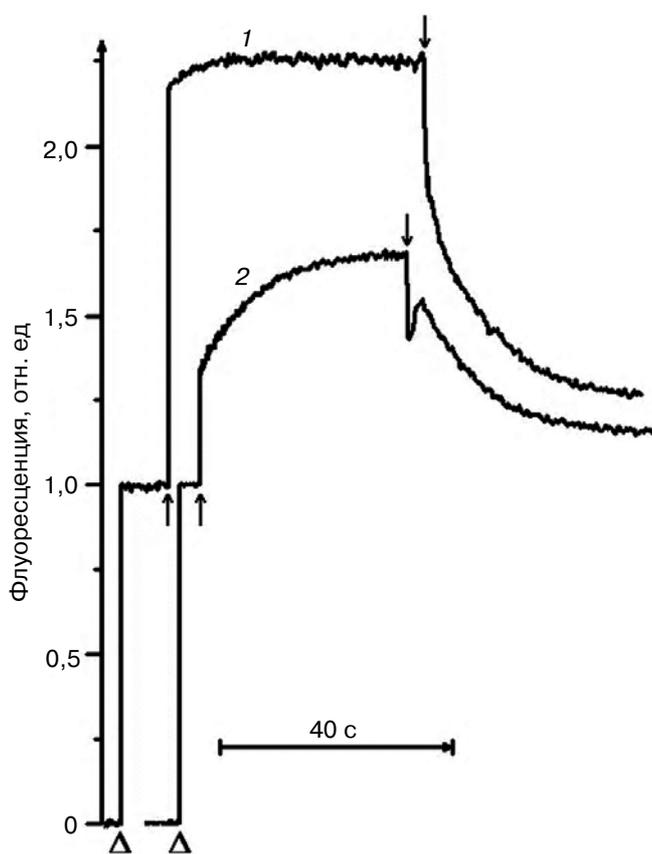


Рис. 3. Кинетика фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла (ΔF), измеренная на клетках темновых культур дикого типа (1) и штамма $\Delta psbO$ (2) *C. reinhardtii*. Треугольниками указаны моменты включения измерительного света; стрелками вверх и вниз указаны моменты, соответственно, включения и выключения действующего света ($1500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$)

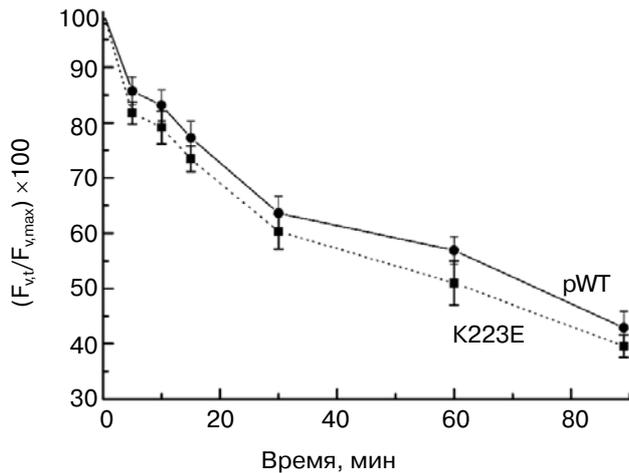


Рис. 5. Чувствительность к фотоинактивации клеток световой культуры рWT-типа и K223E мутанта в течение 90 мин освещения с интенсивностью света в $2500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, измеренная по снижению уровня $F'_v = (F'_m - F_0)/F'_m$

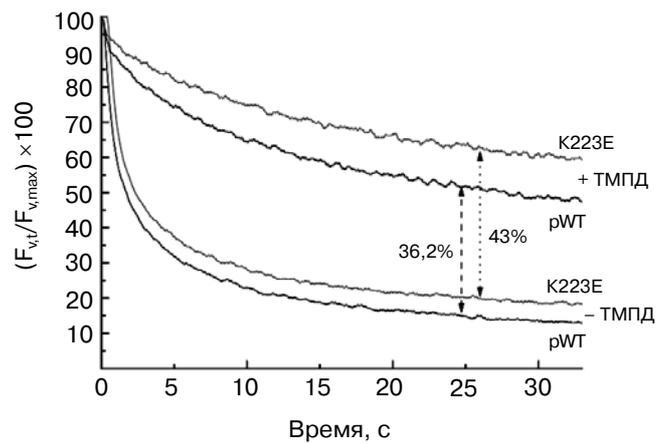


Рис. 6. Кинетика темновой релаксации переменной флуоресценции (F_v) в препаратах ФС-2 клеток рWT и K223E штаммов *C. reinhardtii* после 1-секундной вспышки действующего света интенсивностью $4500 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$. Измерения проводили в отсутствие (а) и в присутствии (б) ТМФД (500 мкм)

ности Мп-кластера для инактивации донорами электронов. На это может указывать повышенная чувствительность препаратов ФС-2, выделенных из K223E-мутанта, к инактивации с помощью ТМФД (тетраметил-п-фенилендиамин), искусственного донора электронов для ФС-2, по сравнению с контролем (рис. 6). По-видимому, этот остаток может быть важен для регуляции взаимодействия между ВОК и люменом.

Из представленных выше данных можно сделать вывод о том, что *C. reinhardtii* является удобной моделью для изучения мутаций в белке PsbO *in vivo* (особенно в связи с тем, что именно *in vivo* предоставляется возможность исследования влияния мутаций в PsbO на биогеenez ФС-2, в частности, исследования роли PsbO в форми-

ровании димера ФС-2). Согласно структурным данным, несколько участков белка PsbO (E55–R60; V66–K69; M110–G113) находятся в близком контакте с белком CP47 другого мономера ФС-2 [6]. В связи с этим представляет интерес, какой эффект мутации в этой части белка окажут на формирование димерного комплекса ФС-2 в клетках. Кроме того, в последовательности PsbO можно выделить участки, которые контактируют с другими внешними белками ВОК (у хламидомонады это белки PsbP и PsbQ), замены в которых помогут раскрыть закономерности в формировании белкового комплекса ВОК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 14-14-00535).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rappaport, F., Guergova-Kuras, M., Nixon, P.J., Diner, B.A., and Lavergne, J. (2002) Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II, *Biochemistry*, **41**, 8518–8527.
- Климов В.В., Аллахвердиев С.И., Деметер Ш., Красновский А.А. (1979) Фотовосстановление феофитина в фотосистеме 2 хлоропластов в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала среды, *Докл. АН СССР*, **249**, 227–230.
- Allakhverdiev, S.I., Tomo, T., Shimada, Y., Kindo, H., Nagao, R., Klimov, V.V., and Mimuro, M. (2010) Redox potential of pheophytin a in photosystem II of two cyanobacteria having the different special pair chlorophylls, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3924–3929.
- Renger, G. (2011) Light induced oxidative water splitting in photosynthesis: energetics, kinetics and mechanism, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 35–43.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R., and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, **473**, 55–60.
- De Las Rivas, J., and Barber, J. (2004) Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications, *Photosynth. Res.*, **81**, 329–343.
- Bricker, T.M., Roose, J.L., Fagerlund, R.D., Frankel, L.K., and Eaton-Rye, J.J. (2012) The extrinsic proteins of Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 121–142.
- Popelkova, H., and Yocum, C.F. (2011) PsbO, the manganese-stabilizing protein: analysis of the structure-function

- relations that provide insights into its role in photosystem II, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 179–190.
9. Miyao, M., and Murata, N. (1984) Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolution system and its replacement by chloride ions, *FEBS Lett.*, **170**, 350–354.
 10. Williamson, A.K. (2008) Structural and functional aspects of the MSP (PsbO) and study of its differences in thermophilic versus mesophilic organisms, *Photosynth. Res.*, **98**, 365–389.
 11. Bricker, T.M., and Frankel, L.K. (2011) Auxiliary functions of the PsbO, PsbP and PsbQ proteins of higher plant Photosystem II: a critical analysis, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 165–178.
 12. Motoki, A., Usui, M., Shimazu, T., Hirano, M., and Katoh, S. (2002) A domain of the manganese-stabilizing protein from *Synechococcus elongatus* involved in functional binding to photosystem II, *J. Biol. Chem.*, **17**, 14747–14756.
 13. Burnap, R.L., Qian, M., Shen, J.R., Inoue, Y., and Sherman, L.A. (1994) Role of disulfide linkage and putative intermolecular binding residues in the stability and binding of the extrinsic manganese-stabilizing protein to the Photosystem-II reaction-center, *Biochemistry*, **33**, 13712–13718.
 14. Eaton-Rye, J.J. (2005) Requirements for different combinations of the extrinsic proteins in specific cyanobacterial Photosystem II mutants, *Photosynth. Res.*, **84**, 275–281.
 15. Yi, X., McChargue, M., Laborde, S., Frankel, L.K., and Bricker, T.M. (2005) The manganese-stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16170–16174.
 16. Harris, E.H. (2001) *Chlamydomonas* as a model organism, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 363–406.
 17. Grossman, A.R., Lohr, M., and Im, C.S. (2004) *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments, *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 119–173.
 18. Pagliano, C., Saracco, G., and Barber, J. (2013) Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II, *Photosynth. Res.*, **116**, 167–188.
 19. Cardona, T., Sedoud, A., Cox, N., and Rutherford, A.W. (2012) Charge separation in photosystem II: a comparative and evolutionary overview, *BBA*, **1817**, 26–43.
 20. Debus, R.J. (2006) in *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone oxidoreductase* (Wydrzynski, T., and Satoh, K., eds.), Springer, Netherlands, pp. 261–284.
 21. Joliot, P., Joliot, A., Boughes, B., and Barbieri, G. (1971) Studies of system II photocenters by comparative measurements of luminescence, fluorescence and oxygen emission, *Photochem. Photobiol.*, **14**, 287–305.
 22. Tuystjarvi, E. (2013) Photoinhibition of Photosystem II, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **300**, 243–303.
 23. De Las Rivas, J., Balsera, M., and Barber, J. (2004) Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins, *Trends Plant Sci.*, **9**, 18–25.
 24. Partensky, F., Hess, W.R., and Vaulot, D. (1999) *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 106–127.
 25. Thornton, L., Ohkawa, H., Roose, J., Kashino, Y., Keren, N., and Pakrasi, H. (2004) Homologs of plant PsbP and PsbQ proteins are necessary for regulation of Photosystem II activity in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803, *Plant Cell*, **16**, 2164–2175.
 26. Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T., and Yocum, C.F. (1984) Calcium reconstitutes high-rates of oxygen evolution in polypeptide depleted Photosystem II preparations, *FEBS Lett.*, **167**, 127–130.
 27. Ono, T., and Inoue, Y. (1983) Mn-preserving extraction of 33-, 24- and 16-kDa proteins from O₂-evolving PS II particles by divalent salt-washing, *FEBS Lett.*, **164**, 255–260.
 28. Bricker, T.M. (1992) Oxygen evolution in the absence of the 33-kilodalton manganese-stabilizing protein, *Biochemistry*, **31**, 4623–4628.
 29. Семин Б.К., Давлетшина Л.Н., Иванов И.И., Сэйберт Т.М., Рубин А.Б. (2012) Быстрое разрушение тетрамерного марганцевого кластера при освещении препаратов фотосистемы 2, не содержащих периферического белка PsbO, *Биохимия*, **2**, 190–195.
 30. Kuwabara, T., and Murata, N. (1979) Purification and characterization of 33 kilodalton protein of spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **581**, 228–236.
 31. Yamashita, T., and Butler, W.L. (1968) Photoreduction and photophosphorylation with Tris-washed chloroplasts, *Plant Physiol.*, **43**, 1978–1986.
 32. Akerlund, H.-E., and Jansson, C. (1981) Localization of a 34.000 and 23.000 MW polypeptide to the lumenal side of the thylakoid membrane, *FEBS Lett.*, **124**, 229–232.
 33. Yamamoto, Y., Doi, M., Tamura, N., and Nishimura, M. (1981) Release of polypeptides from highly active O₂-evolving photosystem-2 preparation by Tris-treatment, *FEBS Lett.*, **133**, 265–268.
 34. Kuwabara, T., and Murata, N. (1982) Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the Photosystem II particles of spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, **23**, 533–539.
 35. Hashimoto, A., Ettinger, W.F., Yamamoto, Y., and Theg, S.M. (1997) Assembly of newly imported oxygen-evolving complex subunits in isolated chloroplasts: sites of assembly and mechanism binding, *Plant Cell*, **9**, 441–452.
 36. de Vitry, C., Olive, J., Drapier, D., Recouvreur, M., and Wollman, F.A. (1989) Posttranslational events leading to the assembly of photosystem II protein complex: a study using photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Cell Biol.*, **109**, 991–1006.
 37. Mayfield, S.P., Schirmer-Rahire, M., Frank, G., Zuber, H., and Rochaix, J.-D. (1989) Analysis of the genes of the OEE1 and OEE3 proteins of the Photosystem II complex from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Mol. Biol.*, **12**, 683–693.
 38. Ettinger, W.F., and Theg, S.M. (1991) Physiologically active chloroplasts contain pools of unassembled extrinsic proteins of the photosynthetic oxygen-evolving enzyme complex in the thylakoid lumen, *J. Cell Biol.*, **115**, 321–328.
 39. Mavankal, G., McCain, D.C., and Bricker, T.M. (1986) Effects of chloride on paramagnetic coupling of manganese in calcium chloride-washed photosystem II preparations, *FEBS Lett.*, **202**, 235–239.
 40. Miyao, M., Murata, M., Lavorel, J., Maison-Petri, B., Boussac, A., and Etienne, A.L. (1987) Effects of the 33 kDa protein on the S-state transition in photosynthetic oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta*, **890**, 151–159.
 41. Ono, N., and Inoue, Y. (1985) S-state turnover in the O₂-evolving system of the CaCl₂-washed photosystem II particles depleted of three peripheral proteins as measured by thermoluminescence. Removal of 33 kDa protein inhibits S₃ to S₄ transition, *Biochim. Biophys. Acta*, **806**, 331–340.
 42. Hillier, W., Hendry, R.L., Burnap, T., and Wydrzynski, T. (2001) Substrate water exchange in photosystem II depends on the peripheral proteins, *J. Biol. Chem.*, **276**, 46917–46924.
 43. Mayfield, S.P., Bennoun, P., and Rochaix, J.D. (1987) Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in *Chlamydomonas reinhardtii*, *EMBO J.*, **6**, 313–318.

44. Пиголев А.В., Жармухамедов С.К., Климов В.В. (2009) Мутант *DpsbO Chlamydomonas reinhardtii* способен к формированию фотохимически активного реакционного центра фотосистемы 2, *Биол. мембраны*, **1**, 31–40.
45. Burnap, R.L., and Sherman, L.A. (1991) Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 indicates that the Mn-stabilizing protein of photosystem II is not essential for O₂ evolution, *Biochemistry*, **30**, 440–446.
46. Komenda, J., and Barber, J. (1995) Comparison of *psbO* and *psbH* deletion mutants of *Synechocystis* PCC 6803 indicates that degradation of D1 protein is regulated by the QB site and dependent on protein synthesis, *Biochemistry*, **34**, 9625–9631.
47. Philbrick, J.B., Diner, B.A., and Zilinskas, B.A. (1991) Construction and characterization of cyanobacterial mutants lacking the manganese-stabilizing protein of Photosystem II, *J. Biol. Chem.*, **266**, 13370–13376.
48. Eaton-Rye, J.J., Shand, J.A., and Nicoll, W.S. (2003) pH-dependent photoautotrophic growth of specific photosystem II mutants lacking luminal extrinsic polypeptides in *Synechocystis* PCC 6803, *FEBS Lett.*, **543**, 148–153.
49. Kuntzleman, T., and Yocum, C.F. (2005) Reduction-induced inhibition and Mn (II) release from photosystem II oxygen-evolving complex by hydroquinone or NH₂OH are consistent with a Mn (III)/Mn (III)/Mn (IV)/Mn (IV) oxidation state for darkadapted enzyme, *Biochemistry*, **44**, 2129–2142.
50. Enami, I., Kamo, M., Ohta, H., Takahashi, S., Miura, T., Kusayanagi, M., Tanabe, S., Kamei, A., Motoki, A., Hirano, M., Tomo, T., and Satoh, K. (1998) Intramolecular cross-linking of the extrinsic 33-kDa protein leads to loss of oxygen evolution but not its ability of binding to photosystem II and stabilization of the manganese cluster, *J. Biol. Chem.*, **273**, 4629–4634.
51. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **3**, 334–342.
52. Ho, F.M., and Styring, S. (2008) Access channels and methanol binding site to the CaMn₄ cluster in photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 140–153.
53. Shutova, T., Irrgang, K.D., Shubin, V., Klimov, V.V., and Renger, G. (1997) Analysis of pH-induced structural changes of the isolated extrinsic 33 kilodalton protein of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 6350–6358.
54. Shutova, T., Klimov, V.V., Andersson, B., and Samuelson, G. (2007) A cluster of carboxylic groups in PsbO protein is involved in proton transfer from the water oxidizing complex of Photosystem II, *BBA Bioenergetics*, **1767**, 434–440.
55. Bentley, F.K., and Eaton-Rye, J. (2008) in *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis* (Allen, J.F., Gantt, E., Golbeck, J.H., and Osmond, B., eds) Dordrecht, pp. 715–717.
56. Spetea, C., Hundal, T., Lundin, B., Heddad, M., Adamska, I., and Andersson, B. (2004) Multiple evidence for nucleotide metabolism in the chloroplast thylakoid lumen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1409–1414.
57. Lu, Y.K., Theg, S.M., and Stemler, A.J. (2005) Carbonic anhydrase activity of the photosystem II OEC33 protein from pea, *Plant Cell Physiol.*, **46**, 1944–1953.
58. Шитов А.В., Побегуц А.В., Смолова Т.Н., Аллахвердиев С.И., Климов В.В. (2009) Марганецзависимая карбоангидразная активность белков фотосистемы 2, *Биохимия*, **74**, 629–639.
59. Betts, S.D., Hachigian, T.M., Pichersky, E., and Yocum, C.F. (1994) Reconstitution of the spinach oxygen-evolving complex with recombinant *Arabidopsis* manganese-stabilizing protein, *Plant Mol. Biol.*, **26**, 117–130.
60. Enami, I., Yoshihara, S., Tohri, A., Okumura, A., Ohta, H., and Shen, J.R. (2000) Cross-reconstitution of various extrinsic proteins and Photosystem II complexes from cyanobacteria, red algae and higher plants, *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1354–1364.
61. Seidler, A. (1996) Intermolecular and intramolecular interactions of the 33-kDa protein in Photosystem II, *Eur. J. Biochem.*, **242**, 485–490.
62. Popelkova, H., Im, M.M., D'Auria, J., Betts, S.D., Lydakakis-Simantiris, N., and Yocum, C.F. (2002) N-terminus of the Photosystem II manganese stabilizing protein: Effects of sequence elongation and truncation, *Biochemistry*, **41**, 2702–2711.
63. Popelkova, H., Im, M.M., and Yocum, C.F. (2003) Binding of manganese stabilizing protein to Photosystem II: Identification of essential n-terminal threonine residues and domains that prevent nonspecific binding, *Biochemistry*, **42**, 6193–6200.
64. Burnap, R.L., Shen, J.R., Jursinic, P.A., Inoue, Y., and Sherman, L.A. (1992) Oxygen yield and thermoluminescence characteristics of a cyanobacterium lacking the manganese-stabilizing protein of Photosystem-II, *Biochemistry*, **31**, 7404–7410.
65. Summerfield, T.C., Crawford, T.S., Young, R.D., Chua, J.P., Macdonald, R.L., Sherman, L.A., and Eaton-Rye, J.J. (2013) Environmental pH affects photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains carrying mutations in the luminal proteins of PSII, *Plant Cell Physiol.*, **54**, 859–874.
66. Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., and Nekrasov, V. (2013) Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system, *Plant Methods*, **9**, 39.
67. O'Malley, R.C., and Ecker, J.R. (2010) Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection, *Plant J.*, **61**, 928–940.
68. Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*, *Science*, **301**, 653–657.
69. Cerutti, H., Ma, X., Msanne, J., and Repas, T. (2011) RNA-mediated silencing in Algae: biological roles and tools for analysis of gene function, *Eukaryot. Cell*, **10**, 1164–1172.
70. Murakami, R., Ifuku, K., Takabayashi, A., Shikanai, T., Endo, T., and Sato, F. (2002) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant with impaired *psbO*, one of two genes encoding extrinsic 33-kDa proteins in photosystem II, *FEBS Lett.*, **523**, 138–142.
71. Murakami, R., Ifuku, K., Takabayashi, A., Shikanai, T., Endo, T., and Sato, F. (2005) Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO proteins: PsbO1 and PsbO2, *FEBS J.*, **272**, 2165–2175.
72. Lundin, B., Hansson, M., Schoefs, B., Vener, A.V., and Spetea, C. (2007) The *Arabidopsis* PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein, *Plant J.*, **49**, 528–539.
73. Bricker, T.M., and Frankel, L.K. (2008) The *psbO1* mutant of *Arabidopsis* cannot efficiently use calcium in support of oxygen evolution by photosystem II, *J. Biol. Chem.*, **283**, 29022–29027.

74. Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, L.A., Gardstrom, P., Schroder, W.P., and Hurry, V. (2006) The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature, *Plant J.*, **47**, 720–734.
75. Rochaix, J.D. (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast, *Annu. Rev. Genet.*, **29**, 209–230.
76. Morais, F., Barber, J., and Nixon, P. (1998) The chloroplast-encoded alpha subunit of cytochrome *b-559* is required for assembly of the photosystem two complex in both the light and the dark in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.*, **273**, 29315–29320.
77. Пиголев А.В., Тимошевский Д.С., Климов В.В. (2012) Влияние аминокислотных замен K223E и K226E в белке PsbO фотосистемы 2 на стабильность и функциональную активность водоокисляющего комплекса в клетках *Chlamydomonas reinhardtii*, *Биохимия*, **77**, 90–98.
78. Murray, J.W., and Barber, J. (2006) Identification of a calcium-binding site in the PsbO Protein of Photosystem II, *Biochemistry*, **45**, 4128–4141.
79. Betts, S.D., Lydakis-Simantiris, N., Ross, J.R., and Yocum, C.F. (1998) The carboxyl-terminal tripeptide of the manganese-stabilizing protein is required for quantitative assembly into photosystem II and for high rates of oxygen evolution activity, *Biochemistry*, **40**, 14230–14236.
80. Mei, R., and Yocum, C. (1993) Characterization of inhibitory effects of NH₂OH and its n-methyl derivatives on the O₂-evolving complex of Photosystem II, *Photosynth. Res.*, **38**, 449–453.
81. Ghanotakis, D.F., Topper, J.N., and Yocum, C.F. (1984) Structural organization of the oxidizing side of photosystem II. Exogenous reductants reduce and destroy the Mn-complex in photosystem II membranes depleted of the 17 and 23 kDa polypeptides, *BBA Bioenergetics*, **767**, 524–531.
82. Kuntzleman, T., McCarrick, R., Penner-Hahn, J.E., and Yocum, C.F. (2004) Probing reactive sites within the photosystem II manganese cluster: Evidence for separate populations of manganese that differ in redox potential, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 4897–4904.

GREEN ALGA *Chlamydomonas reinhardtii* AS A TOOL FOR *in vivo* STUDY OF SITE-DIRECTED MUTATIONS IN PsbO PROTEIN OF PHOTOSYSTEM II

A. V. Pigolev*, V. V. Klimov

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy
of Sciences, Pushchino, Moscow region 142290, Russia;
fax: +7(496)733-0532, E-mail: alexey-pigolev@rambler.ru*

Received January 12, 2015

Revision received February 25, 2015

Photosynthetic water oxidation in Photosystem II takes place in a special water-oxidizing complex (WOC) that consists of a catalytic center, the Mn₄CaO₅-cluster, and includes a group of extrinsic proteins needed for its stability. The most important is PsbO, which binds to the donor side of Photosystem II near the Mn-cluster, and it is directly involved in the regulation of its stability and activity. However, the molecular mechanism by which PsbO is involved in the process of the photosynthetic water oxidation remains unclear. One of the main approaches to solve this problem is the use of site-directed mutagenesis. Until recently, the effect of mutations in PsbO *in vivo* was studied only in cyanobacteria (prokaryotes). In eukaryotic organisms, such studies (site-directed mutagenesis PsbO) have not been carried out, although it is known that in plants and cyanobacteria the role of PsbO protein may differ. In this review, we consider how to use for this aim the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, a eukaryotic organism having the set of extrinsic proteins of the WOC similar to that of higher plants. However, in contrast to higher plants, $\Delta psbO$ mutant of *C. reinhardtii* is viable. Another reason to use it is that when grown in the dark (heterotrophically) $\Delta psbO$ strain of *C. reinhardtii* is able to build the minimal photochemically active complex of photosystem II, which allows exploring the role of individual amino acid substitution in PsbO *in vivo* without damage to the PS-2 due to photoinactivation.

Key words: photosystem 2, water-oxidizing complex, PsbO protein, *Chlamydomonas reinhardtii*, site-directed mutagenesis