

## Физиологические исследования

УДК 577/23^581/132 (045)

*О.В. Шлык-Кернер, Д. Кафтан, С.В. Овечкин*

### ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОГО ЭЛЕМЕНТА БЕЛКА D1-209, УЧАСТВУЮЩЕГО В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СБОРКЕ ПРОТЕИНОВОГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ 2\*

Структурные элементы (сайты) ключевого белка фотосистемы 2 (ФС2) D1-208, D1-209 и D1-212 вместе с еще тремя аминокислотными (АК) остатками составляют мотив, подобный Гли-xxx-Гли (D1-Гли208-xxx-Сер212), который расположен на спирали D на участке тесного контакта белковых субъединиц D1/D2 комплекса ФС2. Мы предположили, что один из АК-остатков этого мотива D1-209 может участвовать в функциональной сборке протеинового комплекса ФС2. Чтобы проверить эту гипотезу и выяснить молекулярные механизмы, лежащие в основе функции ФС2, был выполнен комбинаторный мутагенез на сайте D1-209 в цианобактериях *Synechocystis* PCC 6803. В результате мутагенеза и функциональных измерений мы выяснили, что в сайте 209 белка D1 вместо Сер (дикий тип) могут быть вставлены малые АК-остатки (Гли и Ала), которые функционируют подобно Сер. Однако средние по размеру АК-остатки (Цис, Тре, Про, Асн, Асп и Вал) значительно нарушают нормальные функции протеинового комплекса ФС2.

*Ключевые слова:* фотосинтез, реакционный центр, фотосистема 2, комбинаторный мутагенез, функциональная сборка белков.

Фотосинтетическое превращение энергии – жизненно важный процесс производства биомассы и кислорода, который протекает в тилакоидах фотосинтезирующих организмов, находящихся в разнообразных средах обитания [1]. Реакция фотосинтеза обеспечивается слаженной работой фотосистем (белково-пигментных комплексов) при постоянно меняющихся условиях окружающей среды [2]. Один из главных компонентов этой реакции – фотосистема 2 (ФС2) – катализирует светозависимое окисление воды и восстановление пластохинонов посредством переноса электронов через цепь пигментов-кофакторов. Эти переносчики удерживаются в пространстве реакционным центром (РЦ) – белковым комплексом, состоящим главным образом из двух гомологичных субъединиц D1 и D2 [3]. Реакция переноса электронов в ФС2 начинается с поглощения кванта света молекулой хлорофилла (P680) и заканчивается восстановлением первичного пластохинона  $Q_A$ , который передает электрон вторичному пластохинону  $Q_B$ . После двух таких циклов восстановления  $Q_B$  превращается в пласто-гидрохинон,  $PQH_2$ . Этот конечный продукт ФС2 диффундирует сквозь мембрану, восстанавливая фотосистему 1 (ФС1) через цитохром-*b6f*-комплекс и таким образом запуская синтез углеводов [4].

Знание структуры и функции ФС2 улучшились с открытием новых кристаллических структур этого сложного мембранного белкового комплекса из термофильных цианобактерий при разрешении 2.9 Å из *Thermosynechococcus elongatus* [5] и 1.9 Å из *Thermosynechococcus vulcanus* [3; 6]. Параллельно последовательности белков РЦ ФС2 из многих фотосинтезирующих организмов, живущих в разных средах обитания, были расшифрованы с помощью метода секвенирования [7; 8], который позволяет далее, с применением методов биоинформатики, сравнить эти белковые последовательности [9]. Таким образом, анализ *in silico* пространственной организации кофакторов и аминокислотных (АК) остатков в кристаллических структурах и точечных мутаций в белковых последовательностях фотосинтезирующих организмов позволяет искать структурные элементы, участвующих в функциональной сборке белков РЦ ФС2. Вследствие этого подхода задача данной работы заключалась в определении роли некоторых АК-остатков, формирующих белок-белковые взаимодействия между D1- и D2-субъединицами в регуляции скорости межбелкового переноса электронов (ПЭ), а значит, в функциональной сборке белкового комплекса ФС2. Нами был проведен анализ структуры белков и мутагенез *in silico* РЦ ФС2, которые показали сайты межбелковых водородных связей (Н-связь) и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, потенциально важных для сохранения структурной жесткости и в то же время функциональной гибкости РЦ ФС2.

Оптимальная функция белка требует надлежащего баланса между двумя основными факторами: структурной «жесткостью», поддерживающей определенную трехмерную структуру при нормальных условиях, и функциональной «гибкостью», позволяющей белку выполнять его каталитиче-

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №13-04-00198А.

скую функцию [10]. Это неустойчивое равновесие между стабильностью и функциональной гибкостью белков может регулироваться слабыми внутримолекулярными или межмолекулярными взаимодействиями, которые отвечают за функциональную сборку протеиновых комплексов [10]. Например, АК-остаток Гли, расположенный в центре внутренней спирали в области ТМ поры, управляет открытием/закрытием Kir3.4 калиевого канала [11]. Замена Гли в области взаимодействия между альфа-спиралями на АК-остатки, которые образуют Н-связи, или другие типы межспиральных взаимодействий может увеличить межспиральную димеризацию, но увеличенная структурная жесткость может повредить функциональную гибкость белка [12-14].

Компьютерный анализ белков ФС2, сделанный нами в ходе исследования с использованием инструментов визуализации структуры белка, поднял вопрос возможной причастности структурно близких белковых сайтов, а именно D1-208, D1-209 и D1-212, в упомянутых молекулярных взаимодействиях. Анализ множественного выравнивания аминокислотных последовательностей субъединицы D1 РЦ ФС2 разных фотосинтезирующих организмов показывает, что сайт D1-209 является одним из двух, где встречаются различные АК-остатки в мезофилах и термофилах [15]. Другим сайтом является D1-212, который изучался в предыдущих работах [15; 16]. Также в указанной работе [15] с использованием комбинации экспериментальных и компьютерных методов был предложен новый механизм функциональной адаптации мембранных белков к окружающим температурам.

Сайты D1-208, D1-209 и D1-212 вместе с еще тремя АК-остатками составляют мотив, подобный Гли-xxx-Гли (D1-Гли208-xxx-Сер212) [17], который расположен на спирали D на участке тесного контакта белковых субъединиц D1/D2 комплекса ФС2. Мы предположили, что один из ключевых АК-остатков этого мотива D1-209 может участвовать в функциональной сборке протеинового комплекса ФС2. Чтобы проверить эту гипотезу и выяснить молекулярные механизмы, лежащие в основе функционирования ФС2, был выполнен комбинаторный мутагенез на каждом ключевом АК-остатке в цианобактериях *Synechocystis* PCC 6803. С использованием биофизических, биохимических, физиологических измерений и вычислений термодинамических параметров для каждого из полученных мутантов предложенная гипотеза была проверена экспериментально. В этой статье представлены результаты для сайта D1-209.

## Материалы и методы исследования

**Анализ *in silico*.** Мутагенез *in silico* был проведен на структурной модели, полученной рентгено-структурным анализом, РЦ ФС2 при разрешении 1.9 Å (3wu2.pdb файл) из *T. vulcanus* с использованием программного обеспечения *Swiss-pdb viewer* [18], чтобы изменить (мутировать) остаток D1-Ала209 на выбранные мутантные АК-остатки (Сер – малый, Асн – средний и Лиз – большой).

**Подготовка мутантов.** Комбинаторный мутагенез гена *psbAII* *Synechocystis* PCC 6803 [19], кодирующего белок D1, был выполнен в соответствии с [20; 21]. Фрагмент гена 3' *psbAII*, несущий комбинаторную смесь нуклеотидов в позициях 625–627, соответствующий D1-Сер209, был создан с помощью праймера S209S и праймера A209 [22], кодирующего все АК, кроме Сер. Специальные олигонуклеотиды X209 [22] были созданы, чтобы ввести кодоны в участок D1-209, соответствующие АК, которые не были получены при комбинаторном мутагенезе.

**Условия культивирования и рост.** Дикий тип и мутантные линии *Synechocystis* PCC 6803 хранились на питательной среде BG 11 [23], содержащей 1,5 % агара, 2 ммоль глюкозы, 0,3 % тиосульфата натрия и 25 мкг/мл<sup>-1</sup> канамицина. Жидкие культуры выращивались при 30 °С в 50 и 100 мл среды в стеклянных колбах объемом 100 и 250 мл соответственно при 40 мкмоль м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup> белого света, в отсутствие глюкозы; насыщение кислородом обеспечивалось магнитным перемешивающим устройством на 200 оборотов в минуту. Клетки для измерений флуоресценции хлорофилла забирались в средней экспоненциальной фазе роста. Перед измерениями клетки были заново разбавлены свежей BG11 до концентрации пигмента, равной 4 мкмоль (хлорофилл *a*)<sup>-1</sup>.

**Определение хлорофилла.** Хлорофилл *a* был получен из взвеси отмытых клеток после экстракции в метаноле и подсчитан с помощью коэффициента Лихтеналлера [24].

**Скорости роста.** Капля 10 мкл жидкой культуры клеток (OD<sub>730</sub> = 0,1), выращенных при стандартных освещении и температуре, размещалась на агарозной пластине среды BG-11. Эти клетки выращивались в течение 3 дней при слабом освещении (10 мкмоль м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>).

**Анализ пигментов.** Распределение каротиноидов было определено путем экстракции этих пигментов в 90 % метаноле с последующим спектральным анализом. Спектры были записаны на спектрофотометре «Спектроник Дженесис 2» («Милтон Рой») с использованием кювет с длиной пути

1 см. Спектры были нормализованы к равному количеству хлорофилла. Содержание каротинов было определено ВЭЖХ «Филлипс PU 4100» с использованием колонки для обращенно-фазовой хроматографии «Сферисорб ОДС-1» («Уотерс», США) согласно описанной процедуре [25].

**ДСН-ПААГ и иммуноблоттинг.** Тилакоиды были получены как описано ранее [26]. Тилакоидные белки были растворены в буферном растворе (0,5 М Трис-соляная кислота pH 6,8, 1 % ДСН, 24 % глицерина и 4 % 2-меркаптоэтанола) додецилсульфата натрия (ДСН), оставленные при комнатной температуре на 1 час, и разделены при помощи 12,5 % ДСН-ПААГ (полиакриламидный гель). Эквивалент 2,5  $\mu\text{g}$  хлорофилла был помещен в лунку геля. Белки переносились на поливинилиден дифлуоридную (ПВДФ) мембрану («Хайбонд-Пи», Амершам). Был проведен блоттинг с первыми антителами против белка D1 и белка *psaC* («Агрисера», Швеция). Для детекции использовали вторые HPR-конъюгированные антисыворотки компаний «Промега» и «Сигма» соответственно и усиление хемилюминесцентной реакции («Пирс»).

**Анализ фотосинтетической деятельности в целых клетках.** Затухание флуоресценции хлорофилла, следующее за насыщающей вспышкой и серией коротких, дозированных вспышек (продолжительность импульса 4  $\mu\text{s}$ ), было измерено в пределах  $0-50 \pm 0,1$  °C при помощи стандартной версии флуориметра двойной модуляции F1-100, оборудованного терморегулятором TR 2000 (P.S. «Инструменты», Брно, Чехия). Стандартная флуоресценция была измерена в различное время после каждого импульсного инициирования и подогнана к трехэкспоненциальной функции  $F = a_1 \exp(-k_1 x) + a_2 \exp(-k_2 x) + a_3 \exp(-k_3 x)$  при помощи подходящего нелинейного алгоритма наименьших квадратов. Самая высокая константа скорости была установлена при переносе электронов из  $Q_A$  до  $Q_B$  и при рекомбинации  $S_2 Q_A$  в отсутствие и в наличие ингибитора DCMU, соответственно [27].

## Результаты и их обсуждение

Сайт D1-209 расположен на трансмембранной альфа-спирали *D* на участке тесного контакта белковых субъединиц D1/D2, как показано при помощи кристаллической структуры ФС2 при разрешении 1,9 Å в *T. vulcanus* (рис. 1). В сайте D1-209 термофильного организма *T. vulcanus* находится АК-остаток Ала, тогда как Сер находится в сайте D1-209 мезофильного организма *Synechocystis* 6803. В кристаллической структуре *T. vulcanus* расстояние между атомом С в метильной группе D1-Ала209 и карбонильной группой в D2-Вал204 равно 3,76 Å, что делает возможной межбелковую Н-связь. Более слабые, но все же значимые ван-дер-ваальсовы взаимодействия возможны между атомом  $S\alpha$  D1-Ала209 и атомом  $S\alpha$  D2-Ала208. Таким образом, несмотря на небольшое отклонение от области прямого контакта D1/D2, сайт D1-209 может участвовать в межбелковых ван-дер-ваальсовых взаимодействиях между двумя главными субъединицами РЦ ФС2, влияя на их стабильность и, следовательно, на функцию белка. Более того, необходима функциональная гибкость в этом участке для запуска реакции ПЭ от  $Q_A$  к  $Q_B$ , как мы недавно продемонстрировали [28].

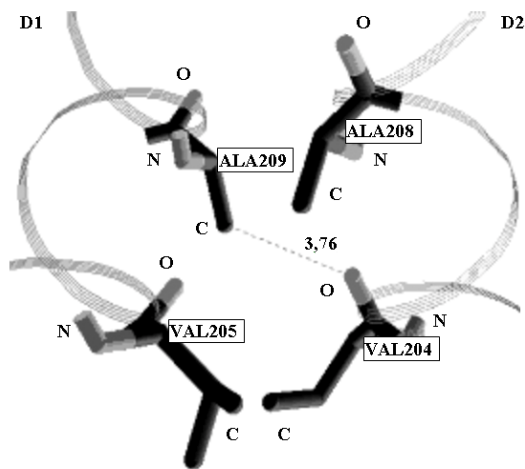


Рис. 1. Участок контакта белковых субъединиц D1 и D2

Трансмембранные *D*-спирали основных субъединиц ФС2 организма (pdb *Thermosynechococcus vulcanus* код 3wu2) представлены в виде лент. Остатки D1-Ала209 (ALA209) и соответствующий D2-Ала208 (ALA208), расположенные в точке пересечения *D*-спиралей, представлены в виде «палочек» на фоне белкового матрикса. Также указаны смежные остатки D1-Вал205 (VAL205) и D2-Вал204 (VAL204). Расстояние между атомами указано пунктиром с цифрой над ним.

**Мутагенез *in silico*.** Замещение *in silico* D1-Ала209 на гидроксил-содержащий серин D1-Сер209 (размер Сер сходен с Ала) (рис. 2) ведет к межбелковой Н-связи между гидроксильной группой остатка и карбонильным кислородом D2-Вал204 (2.44 Å) без пространственного столкновения атомов, так же как и к внутриспиральной Н-связи между кислородом боковой цепи Сер и карбонилем D1-Вал205 (3.09 Å) (рис. 2). Примечательно, что в термофильном *T. vulcanus* участок D1-209 занят Ала, в то время как в мезофильном организме *Synechocystis* 6803 он занят Сер. Как показано на рис. 2, аминокислота серин в сайте D1-209, найденная в мезофильном организме *Synechocystis* 6803 может образовывать интра- и интербелковую Н-связи между белками D1 и D2 в комплексе ФС2. Эти связи могут быть необходимы для функциональной сборки белка.

Напротив, замещение *in silico* D1-Ала209 на очень маленький и гибкий остаток Гли обеспечивает большую дистанцию (4.48 Å) между атомом С $\alpha$  D1-Гли209 и карбонилем D2-Вал204 (данные не показаны). Аминокислота Гли является уникальной по своим физико-химическим свойствам и придает особые свойства белку в точке ее нахождения. Эта мутация обеспечивает большую функциональную гибкость в данном участке белка, что может приводить к высокой скорости межбелкового ПЭ в РЦ ФС2.

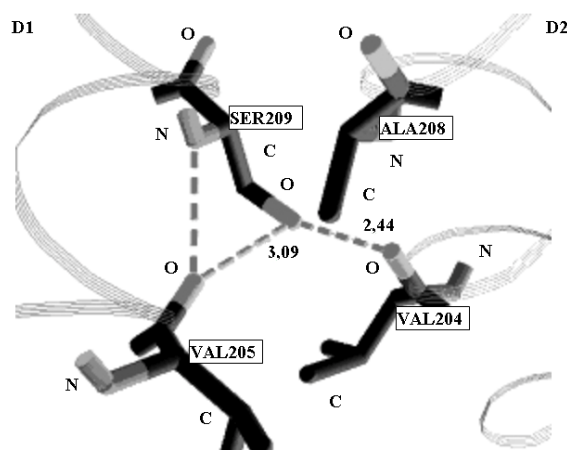


Рис. 2. Мутация Ала на Сер в сайте D1-209 – точке контакта *D*-спиралей

Боковая цепь Сер209 несет гидрофильную *OH*-группу, которая может образовывать внутри- и межбелковые Н-связи в РЦ ФС2. Водородные связи между участвующими атомами указаны пунктиром, с цифрами над ним, указывающими длину водородной связи.

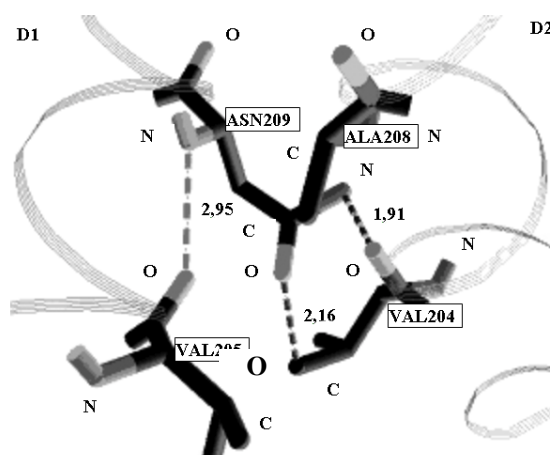


Рис. 3. Мутация D1-Ала209 на Асн в точке пересечения *D*-спиралей

Боковая цепь остатка Асн может одновременно образовывать внутри- и межбелковые Н-связи (указаны светлым пунктиром), а также вызывать пространственное столкновение с атомами D2-Вал204 (указано темным пунктиром)

*In silico* замещение D1-Ала209 средним по размеру АК-остатком Асн (рис. 3) вводит внутриспиральную Н-связь между остатком карбонила D1-Вал205 и азотом остова белковой цепи D1-Асн209 на расстоянии в 2.95 Å. Такое взаимодействие может значительно повысить жесткость комплекса РЦ ФС2. В то же самое время боковая цепь Асн может сталкиваться с карбонильной группой D2-Вал204 из-за очень маленького расстояния в 1.91 Å (рис. 3) и метиловой группой D2-Вал204 из-за расстояния в 2.16 Å (рис. 3).

*In silico* замещение D1-Ала209 большим по размеру АК-остатком Лиз (рис. 4) ведет к нарушению организации межбелкового пространства в РЦ ФС2 и пространственному столкновению атомов, в основном между D1-Лиз209 и D2-Вал204. Такой эффект мутации может вести к нарушению функциональной сборки белка, а значит, к полному отсутствию функционального мутанта D1-Лиз209 *Synechocystis* 6803 на чашках с питательной средой, на которых проводилась селекция по типу гетеротрофного питания, то есть шел отбор только функционально способных мутантов.

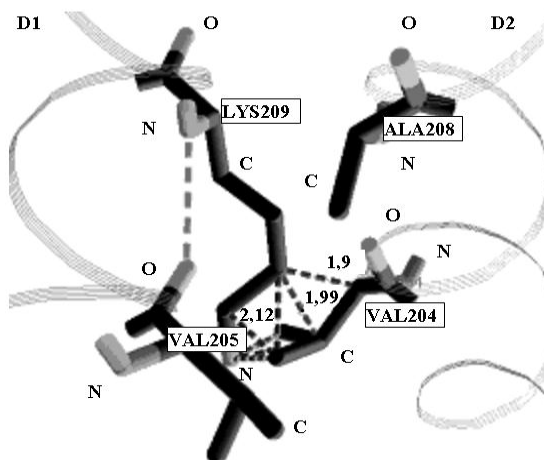


Рис. 4. Мутация D1-Ала209 на Лиз в точке пересечения D-цепей

Боковая цепь Лиз заполняет пространство между цепями и может формировать взаимодействие с D2-Вал204 и также создавать пространственное столкновение атомов боковой цепи с атомами D2-Вал204, таким образом изменяя положение цепей и кофакторов.

**Мутагенез D1-S209 *in vitro* в организме *Synechocystis* 6803.** Остаток D1-Сер209 был замещен в *psbA2*-гене, кодирующем белок D1 *Synechocystis* 6803 комбинаторным мутагенезом на 19 других АК, чтобы идентифицировать все возможные функциональные мутанты. Эффект замещения АК-остатка дикого типа на фотосинтетические параметры *Synechocystis* 6803 был изучен в целых клетках мутантных линий и сравнивался с таковыми у линии дикого типа. После нескольких экспериментов трансформации с использованием гена, содержащего комбинации нуклеотидов, в участке D1-Сер209 и отбором функциональных мутантов было получено 8 фотоавтотрофных мутантов (Гли, Ала, Цис, Тре, Асн, Асп, Про и Вал). Вероятно, сайт D1-209 позволяет замещение Сер малыми остатками класса I (Гли, Ала, Тре и Цис) и средними остатками класса II (Асн, Асп, Про и Вал). Все крупные и заряженные остатки класса III (например, Лиз, Арг, Гис, Трп, Иле, Лей, Фен, Глн, Глу и Мет), возможно, привели к нарушению функциональной сборки белка, не смогли поддержать фотоавтотрофный рост и, таким образом, не могли быть отобраны для дальнейшего анализа.

**Модификации параметров, связанных с фотосинтезом в мутантах D1-209.** Фотосинтетическая деятельность влияет до определенной степени на скорости роста (количество биомассы, здесь измерено на твердой среде), состав пигментов, концентрацию белка D1 и кинетику флуоресценции хлорофилла.

**Скорости роста.** Скорости фотоавтотрофного роста были изучены на твердой среде при слабом освещении и стандартной температуре. Скорости роста мутантов D1-209 Асп, Асн и Про (рис. 5), являющихся по размеру средними АК и, возможно, вводящих межмолекулярные и внутримолекулярные взаимодействия, нарушающие нормальную функцию белка (рис. 1), оказались значительно медленнее, чем у дикого типа ( $\Delta KS$ ). Скорости роста других пяти жизнеспособных мутантов были схожи с ростом дикого типа (рис. 5).

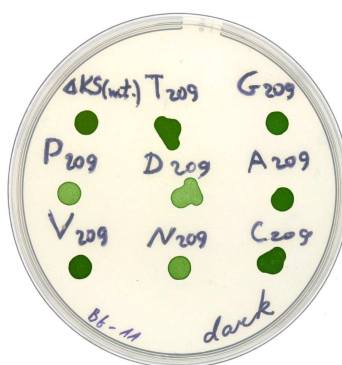


Рис. 5. Фотоавтотрофный тест компетентности (ФС +/-) мутантов D1-209 сравнивался с диким типом ( $\Delta KS$ ). Фенотип фотоавтотрофного роста был оценен после 5 дней освещения под слабым светом ( $\sim 5 \mu\text{mol}$  (фотоны)  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  белого света) при  $30^\circ\text{C}$

**Концентрация и состав каротиноидов.** Экстракты пигментов из тилакоидов мутантных линий и линии дикого типа, выращенные в стандартных условиях, показали значительное варьирование, в частности, в составе каротиноидов (максимум поглощения 450–510 нм) по сравнению с диким типом (на основании эквивалентной концентрации Хл, рис. 6). В то время как Асн- и Про-мутанты показали значительное повышенное содержания эхиненона и миксоксантофила соответственно по сравнению с диким типом, все мутантные линии показали пониженное содержание бета-каротена и зеаксантина. Настоящие данные показывают на состояние стресса в системе (большое содержание активных форм кислорода или фотоингибирование) у всех мутантов в той или иной степени по сравнению с диким типом. Причем мутанты II класса АК Асн и Про показали наибольшее нарушение в содержании каротиноидов в клетках [29].

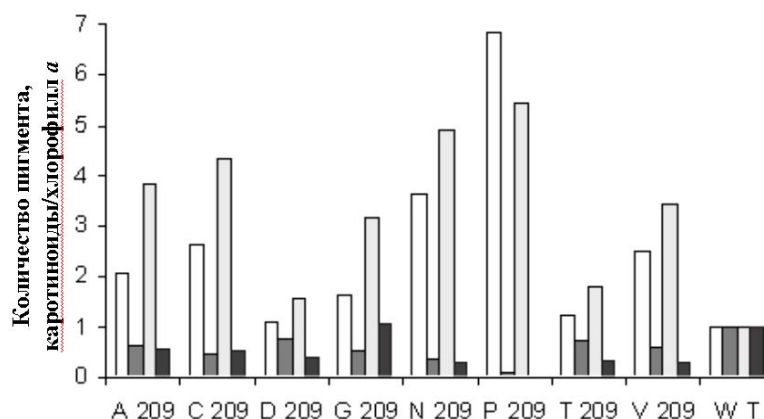


Рис. 6. Содержание и состав каротиноидов, выделенных из тилакоидной мембраны функциональных мутантов D1-209 (□ – миксоксантин, ■ – зеаксантин, □ – эхиненон, ■ – бета-каротен).

**Содержание общего белка D1.** Были проведены измерения концентрации общего белка D1 (включает деградацию и восстановление белка во время полного жизненного цикла) тилакоидной фракции всех полученных мутантов D1-209, выращенных при стандартном освещении и температуре, при помощи иммуноблоттинга (рис. 7), с использованием поликлональных антител против D1. Концентрация D1 была значительно увеличена (30 %) в мутанте Гли и сильно снижена (60 %) в мутанте Вал по сравнению с диким типом. Подвижность мутанта Тре была быстрее, а подвижность мутанта Ала – медленнее, чем у дикого типа (рис. 7). Изменение в электрофоретической подвижности D1 в мутантах Тре и Ала, вероятно, отражает изменения в общем заряде и конформации молекулы. По результатам иммуноблоттинга мы можем пронаблюдать корреляцию между содержанием белка D1 в клетках мутантов и изменением количества каротиноидов [29], а также ростом мутантных клеток. Корреляция наблюдается в отношении размера АК-остатка, чем больше остаток, такие как Вал, Асн и Про (относятся к средней группе), тем сильнее нарушена функция белкового комплекса ФС2.

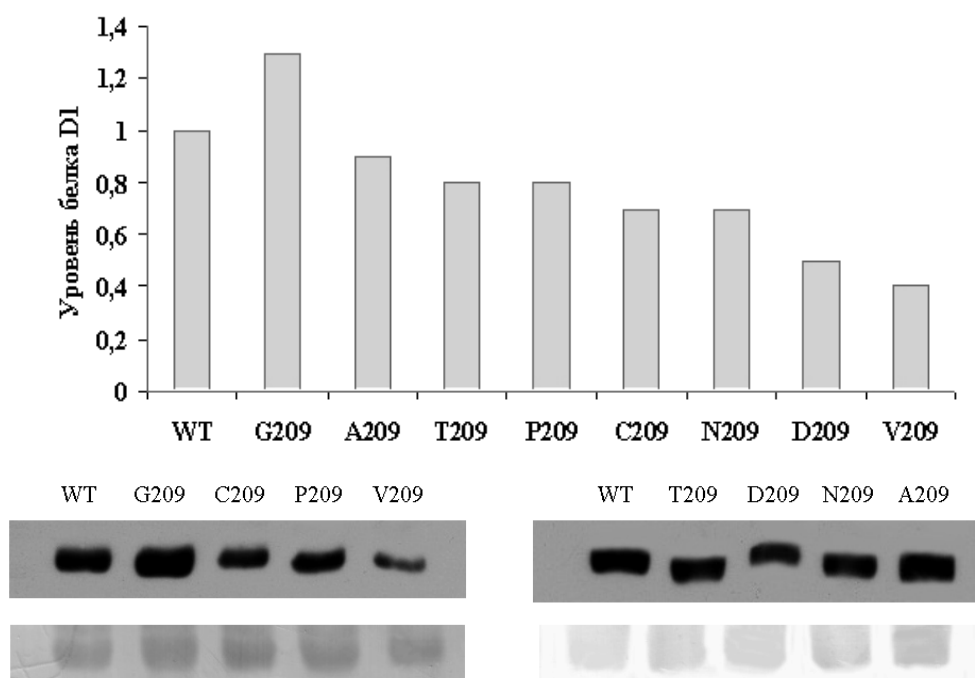


Рис. 7. Диаграмма и иммуноблоттинг, демонстрирующие содержание белка D1 в разных мутантах сайта D1-209 и изменения подвижности белка в мутанте и диком типе (содержит Сер в сайте D1-209). Различные линии содержали сопоставимое количество белков, как изображено в нижних панелях (окрашенные мембраны после вестерн-блоттинга)

**Фотосинтетический перенос электронов.** Мы изучили кинетику переноса электронов от первичного хинона  $Q_A^-$  (связан с белком D2) к вторичному  $Q_B$  (связан с белком D1) в 7 из 8 полученных мутантах D1-209 (примечательно, что Цис-мутант был заражен Вал и показал низкие константы скорости, подобные Вал, затем мутант Цис был получен снова, но мы не смогли измерить его в настоящее время). Константа скорости  $k$  переноса электронов от  $Q_A^-$  к  $Q_B$  была получена из измерений флуоресценции хлорофилла, зависящей от температуры, как описывалось ранее [16]. Мы обнаружили, что дикий тип (Сер) и 7 мутантов показали сходную активность. Однако дикий тип (Сер) и мутанты, имеющие малые остатки (Гли и Ала), продемонстрировали более быстрые скорости переноса электронов от  $Q_A^-$  к  $Q_B$ , а мутанты, имеющие более крупные остатки (Тре, Асн, Про, Асп и Вал), на участке D1-209 показали более низкие значения  $k$  (рис. 8). Если провести корреляцию между размером (объемом) аминокислотного остатка и значением константы скорости ПЭ, то можно увидеть высокое значение корреляции ( $R^2 = 0,94$ ) между объемом остатка [30] и понижением скоростей ПЭ от  $Q_A^-$  к  $Q_B$  при комнатной температуре (рис. 8). Основываясь на этой взаимосвязи, мы поделили замещенные остатки в сайте D1-209 на две группы (класс I и II, как объяснялось выше). Дикий тип (Сер) и мутанты с малыми остатками (такие как Гли и Ала) показали высокую скорость ПЭ от  $Q_A^-$  к  $Q_B$ . Остатки мутантов с крупными боковыми цепями (такие как Про и Вал) или способные формировать сильные внутриспиральные взаимодействия (такие как Асн, Асп и Тр) сильно замедляли скорости ПЭ от  $Q_A^-$  к  $Q_B$ .

Нами было показано ранее, что боковая цепь аминокислоты в сайте D1-212 образует D1/D2 межбелковую водородную связь, обеспечивающую адаптацию ФС2 к окружающим температурам [15]. Более того, уникальный АК-остаток Гли, найденный в сайте D1-208, играет ключевую роль в функциональной гибкости белка, необходимой для эффективного переноса электронов в белковом комплексе ФС2 [28].

В этой работе мы исследовали роль сайта D1-209 в функциональной сборке протеинового комплекса ФС2. Комбинаторный мутагенез был выбран нами в качестве метода исследования предполагаемых интра- и интерспиральных взаимодействий между остатком D1-209 и теми, что находятся в окружении белкового матрикса. Мы предполагали, что большие по объему и сильно полярные АК-остатки внесут стерически неподходящие межбелковые взаимодействия, результатом чего станут дисфункция белков и в некоторых случаях модифицированная стабильность.

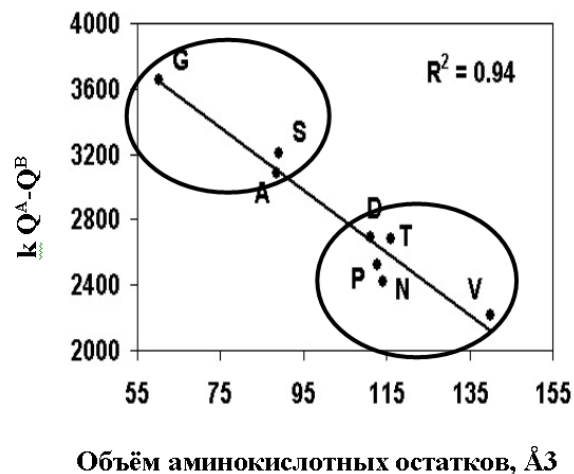


Рис. 8. Корреляция между константами скорости ЭП  $Q_A^-$  к  $Q_B$  и объемом Ван-дер-Ваальсовых поверхностей АК остатков на месте D1-209.

Показано ясное разделение остатков мутанта на два класса (малые АК класс I и средние класс II).

Мотив Гли-xxx-Гли на стыке белковых субъединиц D1/D2 в РЦ ФС2 играет и структурную и функциональную роль. Вероятно, замещение сайта разными по свойствам АК-остатками становится значительно более сложным, когда идет от остатка со стороны акцептора (D1-212) до точки пересечения субъединиц D1/D2 (D1-208). Если D1-212 мог быть замещен тринадцатью остатками, только 8 и 3 мутантных остатка могли получиться в сайтах D1-209 и D1-208, соответственно. Очевидно, что мутагенез сайта D1-212 влияет в основном на функциональность РЦ ФС2 (это точка повышенной подвижности белка), сайта D1-208 – на стабильность свернутого белка (это точка повышенной жесткости белка), а D1-209 в основном ответственен за правильное свертывание и стабильность. Эффект мутагенеза на D1-209 и на скорость ПЭ оказался похож в некоторых аспектах на тот, что наблюдался в остатках D1-212. Таким образом, дикий тип (Сер) и мутанты, имеющие малые остатки (такие как Гли и Ала), показали быстрые скорости ПЭ от  $Q_A^-$  к  $Q_B$ . Однако здесь мы показали замедление ПЭ не только в мутантных остатках, имеющих среднекрупные боковые цепи (такие как Про и Вал), но также и в тех, что способны формировать сильные внутриспиральные взаимодействия (такие как Тре, Асн, Асп).

## Выводы

Наши результаты исследования продемонстрировали, что структурный элемент белка D1-209 участвует в функциональной сборке комплекса ФС2:

1. Результаты мутагенеза в сайте D1-209 показали, что крупные по размеру гидрофобные (Лей, Иле, Мет), отрицательно заряженные (Глу и Гли), ароматические (Гис, Трп, Тир, Фен) и положительно заряженные (Лиз и Арг) остатки не поддержали функцию ФС2 в условиях фотоавтотрофного питания и не могли быть отобраны для последующих измерений.

2. Более того, мутанты, содержащие средние по размеру АК-остатки (такие как Асн, Про и Вал) в структурном элементе D1-209, показали нарушение распределения каротиноидов в мембранах тилакоидов, особенно увеличение количества миксоксантина и эхиненона, которое происходит параллельно с уменьшением зеаксантина и бета-каротена.

3. Положительная корреляция наблюдалась между количеством белка D1 и изменением каротиноидов в клетках, то есть чем стабильнее белок D1, тем меньше каротиноидов накапливается в системе. Наоборот, чем меньше белка D1 в составе РЦ, тем больше вероятность, что электрон, находящийся в триплетном состоянии, не сможет перенестись с белка D2 на белок D1, тогда он рекомбинирует на хлорофилл РЦ, и если не будет каротиноидов, которые поглотят эту энергию возбуждения, то РЦ разрушится.

4. Также в соответствии с результатами измерений температурно зависимой флуоресценции наблюдается корреляция между размером АК-остатка и полученными константами скоростей ПЭ между двумя кофакторами  $Q_A^-$  и  $Q_B$ . Поэтому мы смогли разделить полученные в сайте D1-209 мутант-



ные АК остатки на 2 группы: малые АК-остатки, показавшие высокие значения  $k Q_A^-$  к  $Q_B$  (Гли, Ала, и Сер-дикий тип), и средние АК-остатки, показавшие значения  $k Q_A^-$  к  $Q_B$  на 30 % меньше, чем 1 группа. Следовательно, мутантные АК остатки в сайте D1-209 с более крупной боковой цепью и содержащие полярную гидроксильную группу, вероятно, стабилизируют белок в неблагоприятной конформации, поэтому функция белка сильно нарушается.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plants in Alpine regions: cell physiology of adaption and survival strategies / ed. by Lütz C. - Wien; New York: Springer, 2012. 202 p.
2. Ferroni L. Photosynthetic acclimation to the light environment: molecular mechanisms to understand plant consortia // J Ecosys. Ecograph. 2012. N 2(1). P. 1-2.
3. Umena Y., Kawakami K., Shen J.R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å // Nature. 2011. N 473. P. 55-60.
4. Cardona T., Sedoud A., Cox N., Rutherford A.W. Charge separation in photosystem II: a comparative and evolutionary overview // Biochim. Biophys. Acta. 2012. N 1817(1). P. 26-43.
5. Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A., Saenger W. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. N 16(3). P. 334-342.
6. Koua F.H., Umena Y., Kawakami K., Shen J.R. Structure of Sr-substituted photosystem II at 2.1 Å resolution and its implications in the mechanism of water oxidation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. N 110 (10). P. 3889-3894.
7. Maxam A.M., Gilbert W. A new method of sequencing DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. N 74. P. 560-564.
8. Rosenblum B.B., Lee L.G., Spurgeon S.L., Khan S.H., Menchen S.M., Heiner C.R., Chen S.M. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns // Nucleic Acids Res. 1997. N 25 (22). P. 4500-4504.
9. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. N 22. P. 4673-4680.
10. Curran A.R., Engelman D.M. Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins // Curr. Opin. Struct. Biol. 2003. N 1. P. 412-417.
11. Logothetis D.E., Lupyan D., Rosenhouse-Dantsker A. Diverse Kir modulators act in close proximity to residues implicated in phosphoinositide binding // J Physiol. 2007. N 582. P. 953-965.
12. Choi M.Y., Cardarelli L., Therien A.G., Deber C.M. Non-native interhelical hydrogen bonds in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator domain modulated by polar mutations // Biochemistry. 2004. N 43. P. 8077-8083.
13. Choma C., Gratkowski H., Lear J.D., DeGrado W.F. Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix // Nat. Struct. Biol. 2000. N 7. P. 161-166.
14. Therien A.G., Grant F.E., Deber C.M. Interhelical hydrogen bonds in the CFTR membrane domain // Nat. Struct. Biol. 2001. N 8 (7). P. 597-601.
15. Shlyk-Kerner O., Samish I., Kaftan D., Holland N., Sai M., Kless H., Scherz A. Modulation of protein flexibility acclimatizes photosynthetic energy conversion to the ambient temperature // Nature. 2006. N 442. P. 827-830.
16. Dinamarca J., Shlyk-Kerner O., Kaftan D., Goldberg E., Dulebo A., Gidekel M., Gutierrez A., Scherz A. Double mutation in photosystem II reaction centers and elevated CO<sub>2</sub> grant thermotolerance to mesophilic cyanobacterium // PLoS One. 2011. N 6 (12). P. 1-13.
17. Senes A., Engel D.E., DeGrado W.F. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. N 14. P. 465-479.
18. Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // Electrophoresis. 1997. N 18. P. 2714-2723.
19. Kaneko T. et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions // DNA Res. 1996. N 3. P.109-136.
20. Kless H., Vermaas W. Combinatorial mutagenesis and structural simulations in the environment of the redox-active tyrosine YZ of photosystem II // Biochem. 1996. Vol. 35. P. 16458-16464.
21. Williams J.G.K. Construction of specific mutations in Photosystem II Photosynthetic Reaction Center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803 // Methods in enzymology. 1988. N 167. P. 766-778.
22. Kerner O. The contribution of small amino acids at the D1/D2 interface to the functional flexibility and temperature adaptation of photosystem II reaction center: PhD dissertation. Rehovot, Israel: Weizmann Institute of Science, 2006. 106 p.
23. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J., Herdman M., Stanier R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. 1979. N 111. P. 1-61.

24. Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // *Biochem. Soc. Transactions*. 1983. N 11. P. 591-592.
25. Gilmore A.M., Hazlett T.L., Debrunner P.G., Govindjee. Photosystem II chlorophyll *a* fluorescence lifetimes and intensity are independent of the antenna size differences between barley wild-type and chlorina mutants: Photochemical quenching and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching of fluorescence // *Photosynth. Res.* 1996. N 48. P. 171-187.
26. Callahan F.E., Ghirardi M.L., Sopory S.K., Mehta A.M., Edelman M., Mattoo A.K. A novel metabolic form of the 32 kDa-D1 protein in the grana-localized reaction center of photosystem II // *J Biol. Chem.* 1990. N 265. P. 15357-15360.
27. Sicora C., Wiklund R., Jansson C., Vass I. Charge stabilization and recombination in Photosystem II containing the D1 protein product of the *psbA1* gene in *Synechocystis* 6803 // *Phys. Chem. Chemical Phys.* 2004. N 6. P. 4832-4837.
28. Шлык О.В., Кафтан Д., Шерц А. О роли глицина в регуляции скорости переноса электронов в реакционном центре фотосистемы II // *Вестн. Удм. ун-та. Сер. Биология. Науки о Земле*. 2013. № 1. С. 52-59.
29. Mohamed H.E., van de Meene A.M., Roberson R.W., Vermaas, W.F. Myxoxanthophyll is required for normal cell wall structure and thylakoid organization in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 2005. N 187. P. 6883-6892.
30. Zamyatnin A.A. Protein volume in solution // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1972. N 24. P. 107-123.

Поступила в редакцию 09.12.14

***O.V. Shlyk-Kerner, D. Kaftan, S.V. Ovechkin***

**STUDY OF PROTEIN STRUCTURAL ELEMENT D1-209 WHICH IS INVOLVED IN THE FUNCTIONAL ASSEMBLY OF PHOTOSYSTEM II PROTEIN COMPLEX**

Structural elements (sites) of the key protein of photosystem 2 (PS2) D1-208, D1-209 and D1-212, together with three other amino acid (AA) residues constitute a motif similar to Gly-xxx-Gly (D1-Gly208-xxx-Ser212) which is located on helix *D* in the area of the closest contact of D1/D2 protein subunits in PS2. We hypothesized that one AA residue of this motif D1-209 can participate in the assembly of PSII functional protein complex. To test this hypothesis and elucidate the molecular mechanisms underlying the function of PS2 we performed combinatorial mutagenesis on site D1-209 in cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. As a result of mutagenesis and functional measurements, we found that small residues (Gly, and Ala) instead of Ser (wild type) at the site 209 of D1 protein, can be inserted and function similar to Ser. However, the average sized AA residues (Cys, Thr, Pro, Asn, Asp and Val) significantly disrupts the normal function of the PS2 protein complex.

*Keywords:* photosynthesis, reaction center of photosystem 2, combinatorial mutagenesis, functional assembly of proteins.

Шлык-Кернер Оксана Владимировна,  
кандидат биологических наук,  
доцент кафедры биохимии и биотехнологии  
ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»  
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1 (корп. 1)  
E-mail: oshlyk@yahoo.com

Кафтан Давид, Ph.D, доцент  
Университет Южной Богемии в Ческе-Будеевице  
370 05, Чехия, Ческе-Будеевице, Бранишовска, 1645/31a  
E-mail: david.kaftan@prf.jcu.cz

Овечкин Сергей Владимирович,  
технолог учебно-научной лаборатории  
молекулярной биологии  
ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»  
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1 (корп. 1)  
E-mail: svovich@mail.ru

Shlyk-Kerner O.V.,  
Candidate of Biology, Associate Professor,  
at Department of biochemistry and biotechnology  
Udmurt State University  
Universitetskaya st., 1/1, Izhevsk, Russia, 462034  
E-mail: oshlyk@yahoo.com

Kaftan D, Ph.D, associate professor  
University of South Bohemia in České Budějovice,  
Braníšovská 1645/31a, České Budějovice,  
Czech Republic, 370 05  
E-mail: david.kaftan@prf.jcu.cz

Ovechkin S.V.,  
Process Engineer at laboratory of molecular biology  
Udmurt State University  
Universitetskaya st., 1/1, Izhevsk, Russia, 462034  
E-mail: svovich@mail.ru