

ISSN 0320-9725

Том 88, Номер 10

Октябрь 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 10, 2023

Специальный выпуск, посвящённый памяти Л.А. Драчёва

Приглашённый редактор А.Ю. Семёнов

Л.А. Драчев и прямой электрометрический метод (обзор) <i>В.В. Птушенко, А.Ю. Семенов</i>	1717
Генерация разности электрических потенциалов хроматофорами фотосинтезирующих бактерий в присутствии трегалозы в ответ на стационарное освещение <i>Л.А. Витухновская, А.А. Заспа, М.Д. Мамедов</i>	1731
Электронный транспорт в хлоропластах: регуляция и альтернативные пути переноса электронов (обзор) <i>А.Н. Тихонов</i>	1742
Электрические сигналы плазматической мембраны и их влияние на флуоресценцию хлорофилла в хлоропластах <i>Chara in vivo</i> <i>А.А. Булычев, С.Ю. Шанигузов, А.В. Алова</i>	1761
Ионные каналы в электрической сигнализации у высших растений (обзор) <i>М.А. Мудрилов, М.М. Ладейнова, Д.В. Кузнецова, В.А. Воденеев</i>	1775
Изменения активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны как связующее звено между формированием электрических сигналов и развитием фотосинтетических ответов у высших растений (обзор) <i>Е.М. Сухова, Л.М. Юдина, В.С. Сухов</i>	1800
Генерация мембранного потенциала цитохромом <i>bd</i> (обзор) <i>В.Б. Борисов</i>	1818
Исследование механизма генерации мембранного потенциала гем-медными дыхательными оксидазами в режиме реального времени (обзор) <i>С.А. Силецкий</i>	1829
Сходство и различие фотохимии родопсинов I и II типов (обзор) <i>М.А. Островский, О.А. Смитиенко, А.В. Боченкова, Т.Б. Фельдман</i>	1847
Особенности механизма транспорта протонов в ESR, ретинальном белке <i>Exiguobacterium sibiricum</i> (обзор) <i>Л.Е. Петровская, С.А. Силецкий, М.Д. Мамедов, Е.П. Лукашев, С.П. Балашов, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников</i>	1867
Канальные родопсины: от фототаксиса к оптогенетике (обзор) <i>Е.Г. Говорунова, О.А. Синещеков</i>	1880
Ретиналь-содержащая анионная помпа из цианобактерии <i>Tolypothrix campylonemoides</i> <i>Т.И. Рокицкая, А.А. Алексеев, Ф.М. Цыбров, С.М. Бухалович, Ю.Н. Антоненко, В.И. Горделий</i>	1898

Фемтосекундная динамика возбужденных состояний тетрамера хлорофилла
в водорастворимом хлорофилл-связывающем белке WoWSCP

*Д.А. Черепанов, К.В. Неверов, Ю.Н. Обухов, Ю.В. Малеева, Ф.Е. Гостев, И.В. Шелаев,
А.В. Айбуш, М.С. Крицкий, В.А. Надточенко*

1908

Митохондриальная сеть: электрический кабель и многое другое (обзор)

*П.А. Абрамичева, Н.В. Андрианова, В.А. Бабенко, Л.Д. Зорова, С.Д. Зоров,
И.Б. Певзнер, В.А. Попков, Д.С. Семенович, Э.И. Якупова, Д.Н. Силачев,
Е.Ю. Плотников, Г.Т. Сухих, Д.Б. Зоров*

1926

РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

Роль и молекулярные механизмы альтернативного сплайсинга
Th2-цитокинов IL-4 и IL-5 в аллергической бронхиальной астме (обзор)

И.П. Шиловский, В.И. Ковчина, Е.Д. Тимотиевич, А.А. Никольский, М.Р. Хаитов

1940

Маркеры терминальной стадии почечной недостаточности: не только СКФ (обзор)

Э.И. Якупова, П.А. Абрамичева, А.Д. Бочарников, Н.В. Андрианова, Е.Ю. Плотников

1957

Цитохромы P450: особенности механизмов катализа и электрокатализа
для создания биосенсоров и биореакторов (обзор)

П.И. Королева, Т.В. Булко, Л.Е. Агафонова, В.В. Шумянцева

1985

Новая двухдоменная лакказа со средним окислительно-восстановительным потенциалом:
физико-химические и структурные свойства

*Л.И. Трубицина, И.В. Трубицин, А.В. Лисов, А.Г. Габдулхаков, А.Г. Заварзина,
О.В. Белова, А.П. Ларионова, С.В. Тищенко, А.А. Леонтьевский*

2002

Протеомный подход для исследования экспрессии, локализации и функций
белкового продукта гена *SOWAHD* в процессе гранулоцитарной дифференцировки

*С.Е. Новикова, Т.В. Толстова, Н.А. Соловьева, Т.Е. Фарафонова, О.В. Тихонова,
Л.К. Курбатов, А.Л. Русанов, В.Г. Згода*

2014

CONTENTS

Vol. 88, Issue 10, 2023

In Memory of Lel A. Drachev (Special Issue)

Guest Editor Alexey Yu. Semenov

Lel A. Drachev and the Direct Electrometric Method (Review) <i>V. V. Ptushenko and A. Y. Semenov</i>	1717
Generation of Electric Potential Difference by Chromatophores from Photosynthetic Bacteria in the Presence of Trehalose under Continuous Illumination <i>L. A. Vitukhnovskaya, A. A. Zaspá, and M. D. Mamedov</i>	1731
Electron Transport in Chloroplasts: Regulation and Alternative Pathways of Electron Transfer (Review) <i>A. N. Tikhonov</i>	1742
Electrical Signals of the Plasma Membrane and Their Effect on Chlorophyll Fluorescence in <i>Chara</i> Chloroplasts <i>in vivo</i> <i>A. A. Bulychev, S. Yu. Shapiguzov, and A. V. Alova</i>	1761
Ion Channels in Electrical Signaling in Higher Plants (Review) <i>M. A. Mudrilov, M. M. Ladeynova, D. V. Kuznetsova, and V. A. Vodenev</i>	1775
Changes in Activity of H ⁺ -ATPase of Plasma Membrane as a Link Between Forming Electrical Signals and Induction of Photosynthetic Responses in Higher Plants (Review) <i>E. M. Sukhova, L. M. Yudina, and V. S. Sukhov</i>	1800
Membrane Potential Generation by Cytochrome <i>bd</i> (Review) <i>V. B. Borisov</i>	1818
Investigation of the Mechanism of Membrane Potential Generation by Heme-Copper Respiratory Oxidases in Real Time Mode (Review) <i>S. A. Siletsky</i>	1829
Similarity and Difference in the Photochemistry of Type I and II Rhodopsins (Review) <i>M. A. Ostrovsky, O. A. Smitienko, A. V. Bochenkova, and T. B. Feldman</i>	1847
Features of Proton Transport Mechanism in ESR, a Retinal Protein from <i>Exiguobacterium sibiricum</i> (Review) <i>L. E. Petrovskaya, S. A. Siletsky, M. D. Mamedov, E. P. Lukashev, S. P. Balashov, D. A. Dolgikh, and M. P. Kirpichnikov</i>	1867
Channelrhodopsins: From Phototaxis to Optogenetics (Review) <i>E. G. Govorunova and O. A. Sineshchekov</i>	1880
Retinal-Based Anion Pump from the Cyanobacterium <i>Tolypothrix campylonemoides</i> <i>T. I. Rokitskaya, A. A. Alekseev, F. M. Tsybrov, S. M. Bukhalovich, Y. N. Antonenko, and V. I. Gordeliy</i>	1898

Photochemical Reactions of Chlorophyll Tetramer in Water-Soluble
Chlorophyll-Binding Protein BoWSCP

*D. A. Cherepanov, K. V. Neverov, Yu. N. Obukhov, Yu. V. Maleeva, F. E. Gostev, I. V. Shelaev,
A. V. Aybush, M. S. Kritsky, and V. A. Nadtochenko*

1908

Mitochondrial Network: Electric Cable and More (Review)

*P. A. Abramicheva, N. V. Andrianova, V. A. Babenko, L. D. Zorova, S. D. Zorov, I. B. Pevzner,
V. A. Popkov, D. S. Semenovich, E. I. Yakupova, D. N. Silachev, E. Y. Plotnikov,
G. T. Sukhikh, and D. B. Zorov*

1926

REGULAR ARTICLES

The Role and Molecular Mechanisms of Alternative Splicing of Th2-Cytokines IL-4 and IL-5
in Atopic Bronchial Asthma (Review)

I. P. Shilovskiy, V. I. Kovchina, E. D. Timotievich, A. A. Nikolskii, and M. R. Khaitov

1940

Markers of End-Stage Renal Disease Progression: Beyond the GFR (Review)

E. I. Yakupova, P. A. Abramicheva, A. D. Bocharnikov, N. V. Andrianova, and E. Y. Plotnikov

1957

Catalytic and Electrocatalytic Mechanisms of Cytochromes P450 in the Development
of Biosensors and Bioreactors (Review)

P. I. Koroleva, T. V. Bulko, L. E. Agafonova, and V. V. Shumyantseva

1985

A Novel Two-Domain Laccase with a Middle Redox Potential: Physicochemical
and Structural Properties

*L. I. Trubitsina, I. V. Trubitsin, A. V. Lisov, A. G. Gabdulkhakov, A. G. Zavarzina, O. V. Belova,
A. P. Larionova, S. V. Tishchenko, and A. A. Leontievsky*

2002

Proteomic Approach to Investigate the Expression, Localization, and Functions
of the Protein Product of the *SOWAHD* Gene During Granulocytic Differentiation

*S. E. Novikova, T. V. Tolstova, N. A. Soloveva, T. E. Farafonova, O. V. Tikhonova, L. K. Kurbatov,
A. L. Rusanov, and V. G. Zgoda*

2014

Л.А. ДРАЧЕВ И ПРЯМОЙ ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Обзор

© 2023 В.В. Птушенко, А.Ю. Семенов*

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: semenov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 23.06.2023

После доработки 14.07.2023

Принята к публикации 17.07.2023

В работах в области биоэнергетики важное методическое место принадлежит прямому электрометрическому методу. Принцип этого метода заключается в измерении трансмембранной разности электрических потенциалов, создаваемой между двумя отсеками ячейки белками – генераторами электрического (электрохимического) потенциала, ассоциированными с разделяющей отсеки искусственной липидной мембраной. Само существование таких белков было одним из следствий хемиосмотической концепции Питера Митчелла; обнаружение белков – генераторов электрического тока – и исследование их работы послужило одним из аргументов для признания справедливости этой концепции и способствовало в итоге присуждению Митчеллу заслуженной Нобелевской премии. Одним из главных создателей прямого электрометрического метода был Л.А. Драчев (1926–2022). С его участием были выполнены ключевые работы по электрогенезу мембранных белков фотосинтетических и дыхательных электрон-транспортных цепей: бактериородопсина, зрительного родопсина, фотосинтетических бактериальных реакционных центров, цитохромоксидазы и др.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хемиосмотическая концепция Митчелла, трансмембранная разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$), методы измерения мембранного потенциала, белки-генераторы $\Delta\psi$, протеолипосомы, хроматофоры, бактериородопсин, фотосистема 1.

DOI: 10.31857/S0320972523100019, EDN: OSIXRA

ВВЕДЕНИЕ

Лель Александрович Драчев пришел на работу в Межфакультетскую научно-исследовательскую лабораторию молекулярной биологии и биоорганической химии (далее для краткости будем называть ее просто Межфакультетской лабораторией; сейчас – НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, НИИФХБ) МГУ в 1973 г. на должность заведующего вновь образованным отделом новых физических методов. Ставка была предоставлена ему незадолго до этого назначенным ректором МГУ и однокурсником Л.А. Драчева по физическому факультету МГУ Ремом Викторовичем Хохловым при посредничестве еще одного однокурсника и известного

биофизика Ефима Арсентьевича Либермана. Е.А. Либерман, за несколько лет до этого работавший методом синтетических проникающих ионов для измерения мембранного потенциала, в это время тесно сотрудничал с только что назначенным директором Межфакультетской лаборатории Владимиром Петровичем Скулачевым и его сотрудниками.

ГИПОТЕЗА МИТЧЕЛЛА И ПОИСК АДЕКВАТНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Возникновение и развитие прямого электрометрического метода связано с появлением представлений о трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$), возникающей

Принятые сокращения: БР – бактериородопсин; ИЛМ – искусственная липидная мембрана; РЦ – бактериальный реакционный центр; ФС 1 и ФС 2 – фотосистемы 1 и 2; $\Delta\psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов; $\Delta\mu_{H^+}$ – трансмембранная разность электрохимических потенциалов ионов водорода.

* Адресат для корреспонденции.

на внутриклеточных, так называемых сопрягающих, мембранах митохондрий и хлоропластов, а также на внутренних мембранах бактерий. Эти представления вытекали из выдвинутой будущим нобелевским лауреатом П. Митчеллом хемиосмотической концепции сопряжения дыхательного и фотосинтетического переноса электронов и фосфорилирования, рассматривавшей трансмембранную разность электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) в качестве промежуточной формы энергии при окислительном и фотосинтетическом фосфорилировании. Реальное существование $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ на сопрягающих мембранах оказалось одним из экспериментально проверяемых следствий концепции Митчелла, и на его доказательство были направлены усилия исследователей, которые одними из первых приняли хемиосмотическую гипотезу — групп В.П. Скулачева и Е.А. Либермана. Заметим, что, как стало ясно много позже, $\Delta\psi$ не всегда является основной составляющей $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$; так, в хлоропластах $F\Delta\psi$ (где F — число Фарадея) значительно ниже, чем концентрационное слагаемое $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, — $RT\Delta pH$ [1, 2]. В последующие годы также была открыта «натриевая энергетика», в которой роль мембранной формы энергии играет трансмембранный электрохимический потенциал ионов натрия, что позволило обобщить представления, сформулированные Митчеллом [3]. Здесь мы также опускаем обсуждение дискуссии между Митчеллом и Р. Вильямсом о роли протонов в энергизации мембран, которая подробно описана в литературе (см. например, статью Weber и Prebble [4]).

Ключевым для адекватного измерения $\Delta\psi$ был выбор метода. Характерно, что в это время почти одновременно начинается разработка самых разнообразных методов измерения трансмембранного потенциала — по-видимому, именно дискуссии вокруг гипотезы Митчелла породили всплеск активности исследователей именно в этом направлении. В 1968 г. Junge и Witt [5] используют электрохромный сдвиг в спектре поглощения хлорофилла b (хотя они его еще так не называют) для изучения фотоиндуцированной генерации трансмембранного потенциала и ионного транспорта при фотосинтезе в изолированных хлоропластах шпината. Чуть позже Булычев и соавт. [6–8] разработали микроэлектродный метод измерения $\Delta\psi$, который был применен при исследованиях гигантских хлоропластов (размером до 15–25 мкм) высшего растения *Peperomia metallica*, как изолированных, так и *in vivo*. Еще чуть позже был предложен метод

измерения электрического потенциала в световом градиенте [9, 10]. В этом методе использовались макроскопические изменения $\Delta\psi$ (и, следовательно, макроэлектродная техника) в оптически плотной суспензии тилакоидов хлоропластов, возникающие благодаря суммированию дипольных моментов отдельных везикул. Чтобы не возвращаться к обсуждению этих методов, которые впоследствии широко использовались и принесли много ценных данных о протекании световых реакций фотосинтеза, сразу скажем об их ограничениях, которые будут важны в контексте дальнейшего изложения. Метод регистрации трансмембранного потенциала, основанный на измерении электрохромного сдвига фотосинтетических пигментов (преимущественно, каротиноидов), широко применяется при изучении хлоропластов растений и хроматофоров пурпурных бактерий, но оказался неэффективным для цианобактерий и изолированных пигмент-белковых комплексов в модельных системах. Кроме того, этот метод обеспечивал относительно низкое отношение сигнала к шуму, что было в значительной мере преодолено лишь полтора десятилетия спустя в работах Joliot и Joliot [11].

Методы, основанные на микроэлектродной технике, позволили получить важную информацию о светозависимых токах, возникающих на мембранах хлоропластов, но их не удалось расширить на более мелкие объекты (к которым относились протеолипосомы и хроматофоры пурпурных бактерий). Неизбежно высокое активное сопротивление микроэлектродов также приводило к ограничениям временного разрешения метода (порядка 1 мс). С помощью метода светового градиента оказалось возможным регистрировать кинетику образования мембранного потенциала во временном диапазоне от 20 пс до 50 нс, однако регистрация более медленных процессов была ограничена диссипацией образующегося градиента электрического потенциала за счет ионной проводимости буферного раствора, в котором суспендированы мембранные везикулы.

Дальнейшее развитие метода измерения в световом градиенте, связанное с использованием многослойных электрически ориентированных фрагментов белково-липидных мембран последовало лишь полтора десятилетия спустя [12]. Переход к гелям и снижение ионной проводимости позволили поднять верхнюю границу временного окна измерений [13]. Заметим, что описанный ниже метод, разработанный Е.А. Либерманом и В.П. Скулачевым, равно как и выросший из него прямой

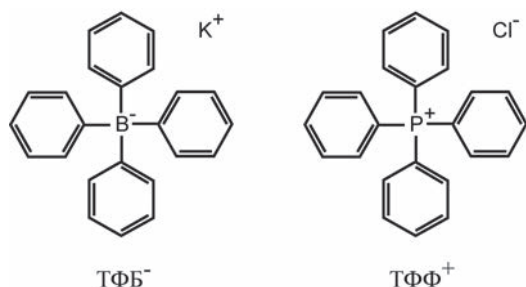


Рис. 1. Липофильные ионы тетрафенилбор (ТФБ⁻) и тетрафенилфосфоний (ТФФ⁺)

электрометрический метод, в своих первоначальных вариантах также были ограничены по многим из перечисленных параметров.

Е.А. Либерман и В.П. Скулачев для решения этой задачи применили остроумную идею, основанную на использовании синтетических проникающих ионов. «Проникающие (через мембрану) ионы» представлялись в то время как оксюморон, поскольку наличие у частицы заряда, очевидно, делало ее гидрофильной и создавало энергетический барьер для погружения в гидрофобную среду мембраны. Однако, по предположению Е.А. Либермана, этот барьер мог бы быть существенно снижен, если бы заряд был распределен по большому объему частицы или окружен относительно гидрофобными молекулярными группами. Поиск таких «липофильных ионов» среди запасов коллег-химиков увенчался успехом и подтвердил первоначальную идею: некоторые из найденных соединений, в частности, анионы фенилдикарбаундекаборана (ФКБ⁻) и тетрафенилбора (ТФБ⁻), а также катион тетрафенилфосфония (ТФФ⁺) оказались способны достаточно легко проникать через мембрану (рис. 1). При этом их распределение по разные стороны мембраны определялось, в соответствии с уравнением Нернста, электрохимическим градиентом $\Delta\tilde{\mu}_H^+$: положительно заряженные ионы накапливались внутри митохондрий, на внутренней мембране которых в ходе окислительного фосфорилирования образовывалась $\Delta\psi$ (со знаком минус внутри в случае митохондрий и знаком плюс — в случае субмитохондриальных частиц).

В результате концентрация этих ионов снаружи, в суспензии, убывала, что, в свою очередь, уже можно было зарегистрировать потенциометрически [14]. С помощью этого подхода впервые было показано, что в процессе дыхания на мембранах митохондрий и субмитохондриальных частиц происходит образование $\Delta\psi$, подавляемое в присутствии ингибиторов дыхания или разобщителей окисления и фосфорилирования [15].

СИНТЕЗ ДВУХ ПОДХОДОВ

В 1971 г. Oesterhelt и Stoeckenius [16] опубликовали в журнале *Nature New Biology* статью, описывающую родопсиноподобный белок из пурпурных мембран галобактерии *Halobacterium halobium*. По инициативе В.П. Скулачева штамм *H. halobium* был привезен в Москву, из его пурпурных мембран был выделен белок бактериородопсин (БР), способный к светозависимому трансмембранному переносу протонов. Исследование этого мембранного белка в отделе биоэнергетики, а затем в отделе новых физических методов Межфакультетской лаборатории МГУ стало первым этапом на пути разработки прямого электрометрического метода.

Летом 1973 г. в Межфакультетской лаборатории появился Л.А. Драчев, перешедший из Всесоюзного института научно-технической информации (ВИНИТИ). Вместе с пришедшим на диплом биохимиком А.Д. Кауленом он проводил непосредственные измерения электрического потенциала, генерируемого между двумя отсеками тефлоновой ячейки бактериородопсином, встроенным в разделяющую ячейки плоскую искусственную липидную мембрану (ИЛМ). БР встраивался в мембрану непосредственно из раствора фосфолипидов в н-декане, в который его добавляли в солиобилизованном виде в присутствии детергента [17]. В отличие от косвенного метода измерений с использованием проникающих ионов, этот подход позволял непосредственно измерять генерацию $\Delta\psi$ белком. Однако этот метод характеризовался значительным разбросом величин и даже направлений фотоиндуцированного сигнала от эксперимента к эксперименту. Позже стало ясно, что этот разброс связан со случайной ориентацией БР в мембране: примерно одинаковое количество белков встраивалось в мембрану с «плюс»- и «минус»-ориентацией, и даже небольшой разброс в их соотношении приводил к значительным изменениям разностного сигнала и вариациям знака $\Delta\psi$.

Осенью 1973 г. в эти работы включился один из авторов этой статьи (АЮС), только что окончивший кафедру молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Предметом изучения были протеолипосомы, содержащие БР, незадолго до того введенные в практику биоэнергетиками Kagawa и Racker [18]. Белок, встроенный в протеолипосомы, образовывал трансмембранный потенциал в ответ на освещение [19]. Измерительная система представляла собой ячейку, состоящую из двух отсеков, заполненных раствором электролита

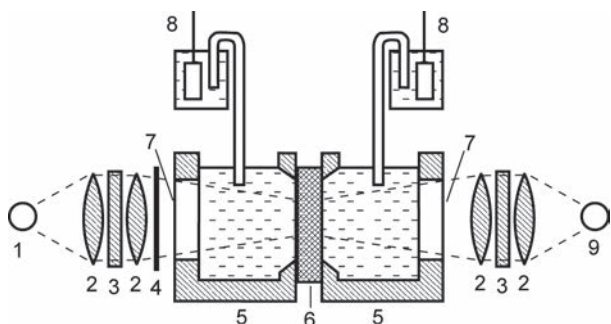


Рис. 2. Схема измерительной системы. 1 — Источник постоянного освещения (галогеновая лампа), 2 — линза, 3 — светофильтр, 4 — затвор, 5 — тefлоновая кювета, 6 — искусственная липидная мембрана на основе мембранного пористого фильтра, 7 — стеклянное окно, 8 — хлорсеребряный электрод, 9 — импульсный лазер

и разделенных плоской ИЛМ, нанесенной на отверстие в разделяющей их перегородке. В оба отсека ячейки были погружены хлорсеребряные электроды, соединенные с электрометрическим вольтметром, и в ходе экспериментов измерялось изменение разности потенциалов между отсеками ячейки (рис. 2). В обе ячейки добавляли проникающие анионы (ФКБ^-), а в одну из них — также БР-протеолипосомы. При освещении этой ячейки ионы ФКБ^- поглощались протеолипосомами вследствие генерации трансмембранного потенциала, и в результате возникала разность потенциалов между отсеками ячейки — небольшая по амплитуде ($\sim 0,01 \text{ В}$), но вполне достаточная для надежного измерения.

Как известно из истории науки, открытию каких-либо новых явлений часто помогает случайность. Беккерель хранил соли урана вместе с фотопластинками, Пастер слишком долго хранил кристаллы винной кислоты, Флеминг не уберег чашки Петри от грибного заражения. В данном случае в процессе длительного эксперимента ИЛМ оказалась недостаточно стабильной и в результате электрических или механических флуктуаций периодически теряла сопротивление. В результате фотоэлектрический сигнал исчезал, и приходилось впрыскивать каплю раствора фосфолипидов в отверстие в тefлоновой ячейке для повторного образования ИЛМ. Еще одним обстоятельством, способствовавшим обнаружению этого ключевого для последующего развития метода эффекта, была высокая концентрация ионов аммония в среде. Поскольку электрохимический потенциал на мембране липосом мог содержать как электрическую, так и концентрационную (рН-зависимую) компоненты, то чтобы максимально увеличить измеряемый электрический сигнал, было решено снизить

«конкурирующий» с ним трансмембранный градиент рН. Именно с этой целью соли аммония были добавлены в среду в значительной концентрации ($0,1 \text{ М}$) в качестве проникающего внутрь протеолипосом рН-буфера. В этих условиях при повторном образовании ИЛМ фотоэлектрический сигнал возрастал во времени, что трудно было объяснить в рамках представлений о механизме действия проникающих ионов. То, что эффект наблюдался при высокой концентрации соли, вызвало подозрение, что он может быть связан с изменением поверхностных зарядов. Замена однозарядных ионов в фоновом электролите на меньшую концентрацию ($10\text{--}20 \text{ мМ}$) двухзарядных (Ca^{2+} и Mg^{2+}) привела к тому, что возрастание сигнала стало происходить гораздо быстрее. Это указывало на вероятную роль экранирования фиксированных отрицательных зарядов фосфолипидов катионами фонового электролита, в котором двухзарядные катионы значительно эффективнее, чем однозарядные. Экранирование поверхностных зарядов мембран протеолипосом и ИЛМ должно было ускорить их агрегацию и адсорбцию на ИЛМ, разделявшей отсеки ячейки. Это означало, что возрастание фотоиндуцированной $\Delta\psi$ могло происходить за счет БР в мембранах протеолипосом, ассоциированных с ИЛМ, за счет слипания с нею протеолипосом. Чтобы убедиться в этом, Е.А. Либман предложил провести такой же эксперимент в отсутствие проникающих ионов. И действительно, даже без добавления в среду ФКБ^- , при инкубации суспензии протеолипосом в течение 30 минут в присутствии 20 мМ CaCl_2 наблюдалось постепенное увеличение амплитуды фотоиндуцированной $\Delta\psi$ вплоть до $\sim 250 \text{ мВ}$.

В отличие от метода смешивания суспензии БР в детергенте с раствором фосфолипидов в н-декане для образования ИЛМ, первоначально используемого Л.А. Драчевым и А.Д. Кауленом, при встраивании БР в мембраны липосом в этих экспериментах наблюдалась высокая степень асимметрии — более 95% молекул белка оказывались ориентированными «плюсом» внутрь (это было доказано позже с использованием ионов лантана, ингибирующих работу БР при связывании во «входном» протонном канале на его протон-донорной стороне). В результате светозависимое образование $\Delta\psi$ всегда имело один и тот же знак и относительно небольшой разброс величины, определяемый преимущественно точностью, с которой было возможно задавать суммарный внутренний объем протеолипосом. Очевидно, что такая асимметрия встраивания белка была

обусловлена, в частности, асимметрией мембраны, имеющей ненулевую кривизну в случае замкнутой сферической везикулы. В случае же плоской ИЛМ кривизна, которая могла бы обеспечить асимметрию встраивания, очевидно, отсутствовала.

Таким образом, как у метода синтетических проникающих ионов, так и у метода смешивания БР с раствором фосфолипидов имелись свои достоинства и недостатки. Обнаружение адсорбции протеолипосом на поверхности ИЛМ позволило «гибридизировать» эти два метода, объединив их достоинства: высокую степень асимметрии встраивания белка в мембраны протеолипосом (а, следовательно, и большую величину сигнала), характерную для косвенного метода синтетических проникающих ионов, и непосредственное измерение генерируемого белком потенциала, обеспечиваемое прямым электрометрическим методом. Дальнейшее развитие этого гибридного метода было связано с работами Л.А. Драчева и его сотрудников — А.Д. Каулена и А.Ю. Семенова. В литературе за ним закрепилось название «прямого электрометрического метода» или «метода Драчева».

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ЭКВИВАЛЕНТНОЙ СХЕМЫ И ПОДБОР ИСКУССТВЕННОЙ МЕМБРАНЫ

«Гибридизация» двух методических подходов обеспечивала новые экспериментальные возможности, однако одновременно ставила новые вопросы. Выше мы говорили об ассоциации протеолипосом с поверхностью плоской ИЛМ. Однако эквивалентна ли такая белково-липидная система той, которая образуется при непосредственном встраивании белков в присутствии детергента в ИЛМ (кроме различий в асимметрии встраивания)? От этого зависела правильная количественная интерпретация результатов измерений. Эквивалентность могла бы обеспечиваться, если бы мембрана протеолипосомы, адсорбирующейся на плоскую ИЛМ, претерпевала разрыв и фосфолипиды мембран протеолипосом «растекались» по ИЛМ, а белки оказывались бы встроены в ИЛМ. Однако возможен и альтернативный сценарий, при котором мембраны протеолипосом не претерпевают топологических изменений и остаются замкнутыми везикулами, ассоциированными с поверхностью ИЛМ. В этом случае внутри протеолипосом сохранялась бы водная фаза (рис. 3, а).

При этом гипотетически возможны разные варианты распределения белков: они могли бы переходить из мембран протеолипосом в ИЛМ либо же оставаться в пределах мембран протеолипосом. Подобный же вопрос впоследствии возник при работе с природными замкнутыми везикулами — хроматофорами фотосинтезирующих бактерий для распределенных в мембранах хроматофоров молекул пула убихинона-10. Однако если гидрофобный убихинон свободно перераспределялся между мембранами хроматофоров и ИЛМ, то для молекул белка такой обмен не происходил. Доказательство того, что внутри везикул сохраняется водная фаза (получившая в литературе жаргонное название «третья вода»), а все белки локализованы на внешних поверхностях пузырьков, было основано на измерениях потенциалов, генерируемых в присутствии разобщителей-протонофоров различного типа. Так, грамицидин А, образующий каналы в мембране, существенно снижал потенциал, генерируемый БР на свету, однако практически не влиял на общее электрическое сопротивление мембраны. В то же время протонофоры «челночного типа» (например, карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразон) снижали и светозависимый потенциал, и сопротивление мембраны [20]. Такое различие, очевидно, могло возникать только из-за наличия в системе двух типов мембран. Грамицидин создавал каналы в той же бислойной мембране, в которой были локализованы генераторы $\Delta\mu_{\text{H}}^+$ (БР). Однако в относительно толстой плоской ИЛМ, разделяющей ячейки и определяющей сопротивление измеряемой системы, грамицидин не мог образовать сквозные каналы, в то время как для «челночных» протонофоров она оставалась проницаемой (рис. 3, б).

Как в экспериментах Драчева и Каулена с непосредственным встраиванием молекул белка в плоскую мембрану, так и в опытах Семенова на протеолипосомах использовали толстые (толщиной порядка 100 мкм) фосфолипидные мембраны, разделяющие два отсека тefлоновой экспериментальной ячейки. Несмотря на то что белок не мог пронизать такую мембрану насквозь и перенести через нее протон, тем не менее при встраивании в нее он превращал ее в аналог H^+ -селективного электрода, что позволяло регистрировать электрический сигнал. Однако такая мембрана обладала одним существенным недостатком: при большом липидном объеме мембрана обладала низкой электрической емкостью, что приводило к значительному увеличению времени электрического отклика системы. В итоге

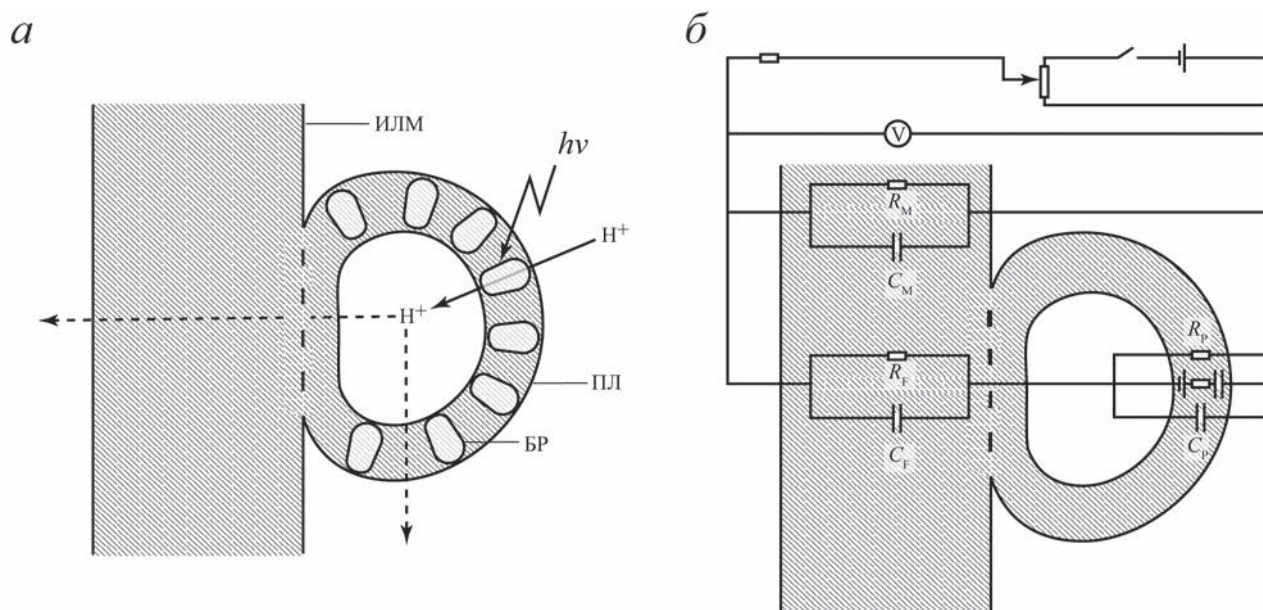


Рис. 3. Схема взаимодействия протеолипосомы, содержащей бактериородопсин, с плоской фосфолипидной ИЛМ (а) и эквивалентная электрическая схема (б). ПЛ — протеолипосома, БР — молекула бактериородопсина. Ориентация молекул БР в мембране ПЛ асимметрична (~95%-ное преобладание ориентации, при которой протоны закачиваются внутрь ПЛ). Экспериментальные данные показывают, что в области слияния мембран БР практически отсутствует. V — электрометрический вольтметр с высоким входным сопротивлением; C_P , R_P , C_M , R_M , C_F , R_F — значения электрической емкости (C) и сопротивления (R) мембраны ПЛ, ИЛМ и области слияния мембран соответственно. Изображение дано не в масштабе (толщина ИЛМ превосходит толщину мембраны ПЛ на несколько порядков)

минимальное характерное время процесса генерации $\Delta\psi$, которое могло быть получено в такой системе, составляло около 10 мс. Это было значительно больше, чем характерные времена основных процессов переноса заряда в БР, и для экспериментов по изучению кинетики этого переноса требовалась значительно более тонкая мембрана. Аналог природной — бислойной фосфолипидной — мембраны, к сожалению, использовать не удавалось: несмотря на многие попытки получить бислойную мембрану (такая мембрана получила название «черной мембраны» вследствие пониженного оптического пропускания, возникающего из-за интерференции отраженного от двух поверхностей света, хорошо заметного под биноклем), она оставалась очень нестабильной. В «черную мембрану» не удавалось встроить белки — при попытках добавить белок в детергенте в электролит, омывающий мембрану, мембрана неизменно лопалась. Пришлось отказаться от попытки использования плоских бислойных мембран в электрометрическом методе и искать другие варианты.

Поиск других вариантов плоской ИЛМ оказался весьма длительным и непростым. Было очевидно, что для повышения прочности мембраны необходимо как-то «армировать» ее. В качестве каркаса, составляющего жесткую основу такой армированной мем-

браны, пробовали различные мембранные пористые фильтры, которые пропитывали раствором фосфолипидов. Несмотря на то что толщина самих фильтров была достаточно большой (как и для толстой фосфолипидной мембраны, порядка 0,1 мм), была надежда, что фосфолипидные пленки, которые затянут поры в материале фильтра, окажутся тоньше. При работе с фильтрами стало ясно, что не только материал фильтра и размер пор существенны для измерительной системы, но и исследуемые объекты. Так, для исследования протеолипосом с БР практически все изученные виды фильтров обеспечивали эффективные измерения. В то же время при работе с хроматофорами свойства фильтров начинали сказываться на результатах. Использование фильтров из химически инертного материала (флуоропор, тефлон) позволяло получить самые большие электрические ответы, независимо от диаметра пор, сравнимые с величиной потенциала на фосфолипидной мембране (до 0,25 В; [21, 22]). При работе с хроматофорами (но не протеолипосомами) и фильтрами на основе целлюлозы электрический отклик системы оказывался меньшим, причем для смеси ацетата и нитрата целлюлозы ниже, чем для чистого нитрата. В случае присутствия в материале фильтра ацетата целлюлозы начал играть роль и размер пор — более крупные

поры обеспечивали более высокие значения измеряемых потенциалов [21]. Однако при использовании любых фильтров оставалась та же непреодолимая временная граница разрешающей способности — порядка 10 мс.

Кроме фильтров, имевшихся тогда в продаже, для получения подходящих «каркасов» попытались использовать даже существовавшие на тот момент «высокие технологии». Вспоминается визит Л.А. Драчева и его молодых коллег в Дубну в руководимую Г.Н. Флеровым Лабораторию ядерных реакций Объединенного института ядерных исследований. Для различных технических задач в лаборатории изготавливали собственные фильтры: пластинки из различных полимеров помещали под пучок ускорителя, который превращал их в «решето». Диаметр и плотность расположения дыр в этом решете можно было варьировать за счет тех или иных параметров пучка. Однако ни один из таких фильтров не подошел — фосфолипидная мембрана его не пропитывала, отказываясь садиться на длинные узкие цилиндрические поры.

Последний вариант, найденный Драчевым и его сотрудниками и оказавшийся наилучшим для их исследований — нитроцеллюлозные коллодиевые пленки. Такие пленки активно использовались в качестве подложек для электронной микроскопии и потому были достаточно доступны. Пленка, состоящая из длинных целлюлозных нитей, образующих небольшое число слоев, имела сравнительно небольшую толщину (~200–300 нм). При пропитке раствором фосфолипидов она обеспечивала достаточную устойчивость мембраны и одновременно малое время электрического отклика (порядка 200 нс). Большая часть последующих работ лаборатории была выполнена именно на коллодиевых ИЛМ. Поиск этого ключевого компонента измерительной системы занял почти пять лет.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ПРЯМОГО ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

С 1974 по 1980 г. в системах: толстая фосфолипидная мембрана — замкнутая везикула (протеолипосомы, содержащие различные мембранные белки или хромофоры) было продемонстрировано образование разности потенциалов БР, зрительным родопсином, митохондриальными цитохром *c* оксидазой, АТРазой и трансгидрогеназой, а также хромофорами фотосинтезирующих бактерий [23–27].

В 1979–1980 гг. аналогичные измерения были проведены на различных мембранных пористых фильтрах, пропитанных раствором фосфолипидов в *n*-декане. Типичный фотоэлектрический ответ на включение и выключение освещения в системе мембранный фильтр — БР протеолипосомы приведен на рис. 4. В этом случае при включении света наблюдалось быстрое образование $\Delta\psi$ со знаком плюс внутри протеолипосом, достигавшее амплитуды ~200 мВ. Фотоэлектрический сигнал оставался примерно на таком уровне по крайней мере 10 минут освещения и полностью спадал при выключении освещения. При хранении системы мембранный фильтр — БР протеолипосомы в темноте светозависимый потенциал с амплитудой > 150 мВ сохранялся в течение 72 часов, а затем спадал параллельно со спадом сопротивления ИЛМ.

В предыдущем разделе было указано, что при использовании «толстых» фосфолипидных ИЛМ и ИЛМ на основе мембранных фильтров наличие малой емкости C_M , сопоставимой с входной емкостью операционного усилителя (~5 пФ), приводило к искажению кинетики образования $\Delta\psi$ в ответ на лазерную вспышку. Поэтому для исследования быстрой кинетики была применена коллодиевая фосфолипидная ИЛМ толщиной ~200 нм, значение C_M которой составляло ~5000 пФ. Временное разрешение такой системы составляло 0,2 мкс. В этой системе была исследована индуцированная лазерными вспышками кинетика образования $\Delta\psi$ на протеолипосомах с БР и бактериальными реакционными центрами (РЦ), а также на хромофорах из различных фотосинтезирующих бактерий [28–30].

Как показано на рис. 4, *a*, лазерная вспышка в системе коллодиевая ИЛМ — протеолипосомы со встроенным фотосинтетическими РЦ из *Rhodobacter sphaeroides* в отсутствие донора

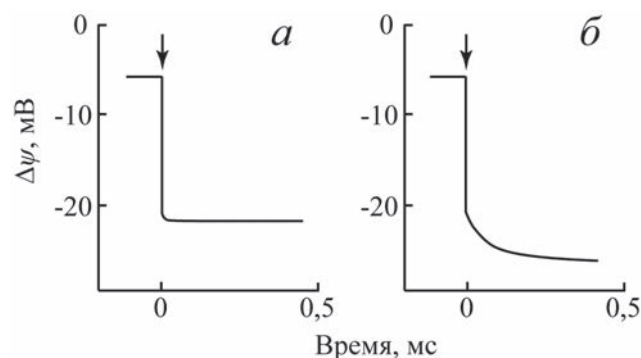


Рис. 4. Фотоэлектрический ответ протеолипосом, содержащих бактериальный фотосинтетический реакционный центр без добавок (*a*) и в присутствии 2 мМ аскорбата и 2 мкМ природного донора электрона цитохрома *c* (*б*)

электрона вызывает образование $\Delta\psi$ со знаком минус внутри амплитудой $\sim 15\text{--}20\text{ мВ}$. Этот потенциал обусловлен образованием ион-радикальной пары $P_{870}^+Q_A^-$, образующейся при переносе электрона от первичного донора РЦ *R. sphaeroides*, димера бактериохлорофилла P_{870} , к связанному в РЦ убихинону Q_A , выполняющему роль акцептора [31]. При добавлении 2 мМ аскорбата и 2 мкМ природного донора электрона цитохрома c_2 в кинетике нарастания фотоэлектрического ответа, помимо быстрой фазы, наблюдалась дополнительная более медленная компонента с характерным временем $\tau = 250\text{ мкс}$ (рис 4, б). Наблюдаемая фаза нарастания генерации $\Delta\psi$ была обусловлена электрогенным восстановлением P_{870}^+ от цитохрома c_2 . На препаратах хроматофоров из *R. sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum*, *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, *Chromatium minutissimum* и *Blastochloris viridis*, помимо электрогенных реакций, обусловленных восстановлением окисленного первичного донора P^+ от различных цитохромов типа c , в ответ на четные вспышки света была обнаружена еще одна электрогенная компонента, связанная с протонированием из внешней водной фазы вторичного хинонного акцептора Q_B [32]. Кроме того, на хроматофорах *R. sphaeroides* были исследованы индуцированные лазерными вспышками электрогенные реакции, обусловленные переносом электронов и протонов в цитохромном bc_1 -комплексе [33].

Аналогичный подход был применен к исследованию электрогенных реакций на протеолипосомах, содержащих комплексы фотосистем (ФС) 1 и 2 из цианобактерий и высших растений [34, 35]. На рис. 5 приведены типичные фотоэлектрические ответы протеолипосом, содержащих комплексы ФС 1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803.

В отсутствие добавок (кривая 1) на этих препаратах наблюдается фотоэлектрический ответ со знаком минус внутри амплитудой $\sim 50\text{ мВ}$ и кинетикой спада с $\tau = 100\text{ мс}$. При добавлении 100 мМ сильного восстановителя — дитионита натрия, амплитуда $\Delta\psi$ несколько снижается, а спад ускоряется до нескольких миллисекунд (кривая 2). Этот эффект обусловлен восстановлением дитионитом терминальных $4Fe4S$ кластеров F_A/F_B , в результате чего спад $\Delta\psi$ происходит с предыдущего $4Fe4S$ кластера F_X . В то же время добавление 0,4 М природного донора электрона для ФС 1 — пластоцианина, вызывает появление дополнительной электрогенной компоненты с $\tau = 3\text{ мс}$ (кривая 3). Эта компонента обусловлена электрогенным восстановлением фотоокисленного первичного донора электрона ФС 1 — димера хлорофилла P_{700}^+ — от пластоцианина.

Одной из важных особенностей прямого электрометрического метода оказалась возможность оценивать с его помощью распределение диэлектрической проницаемости (ϵ) в мембранных гидрофобных белках, содержащих редокс-кофакторы. Перемещение заряда (электрона или протона) внутри белка от одной группы к другой вызывает изменение разности потенциалов между двумя сторонами мембраны. Это изменение зависит как от расстояния, на которое перемещается заряд в мембране (точнее, от нормальной по отношению к поверхности мембраны компоненты его перемещения), так и от значения ϵ той области белка, в которой это перемещение происходит. В области, где содержится больше полярных аминокислотных остатков, и, следовательно, выше ϵ , индуцируемая перемещением заряда разность потенциалов оказывается ниже, а в областях с гидрофобными остатками (низкое значение ϵ) — выше. С появлением

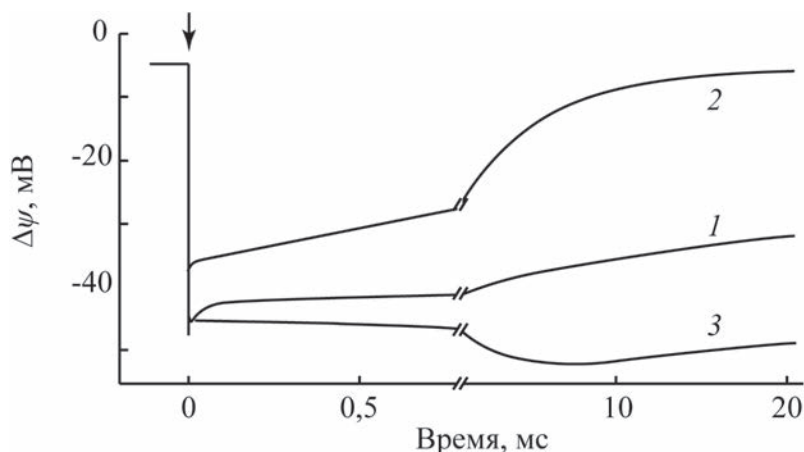


Рис. 5. Фотоэлектрический ответ протеолипосом, содержащих ФС 1: 1 — без добавок, 2 — в присутствии дитионита натрия, 3 — в присутствии 10 мМ аскорбата и 0,4 мМ природного восстановителя ФС 1 пластоцианина

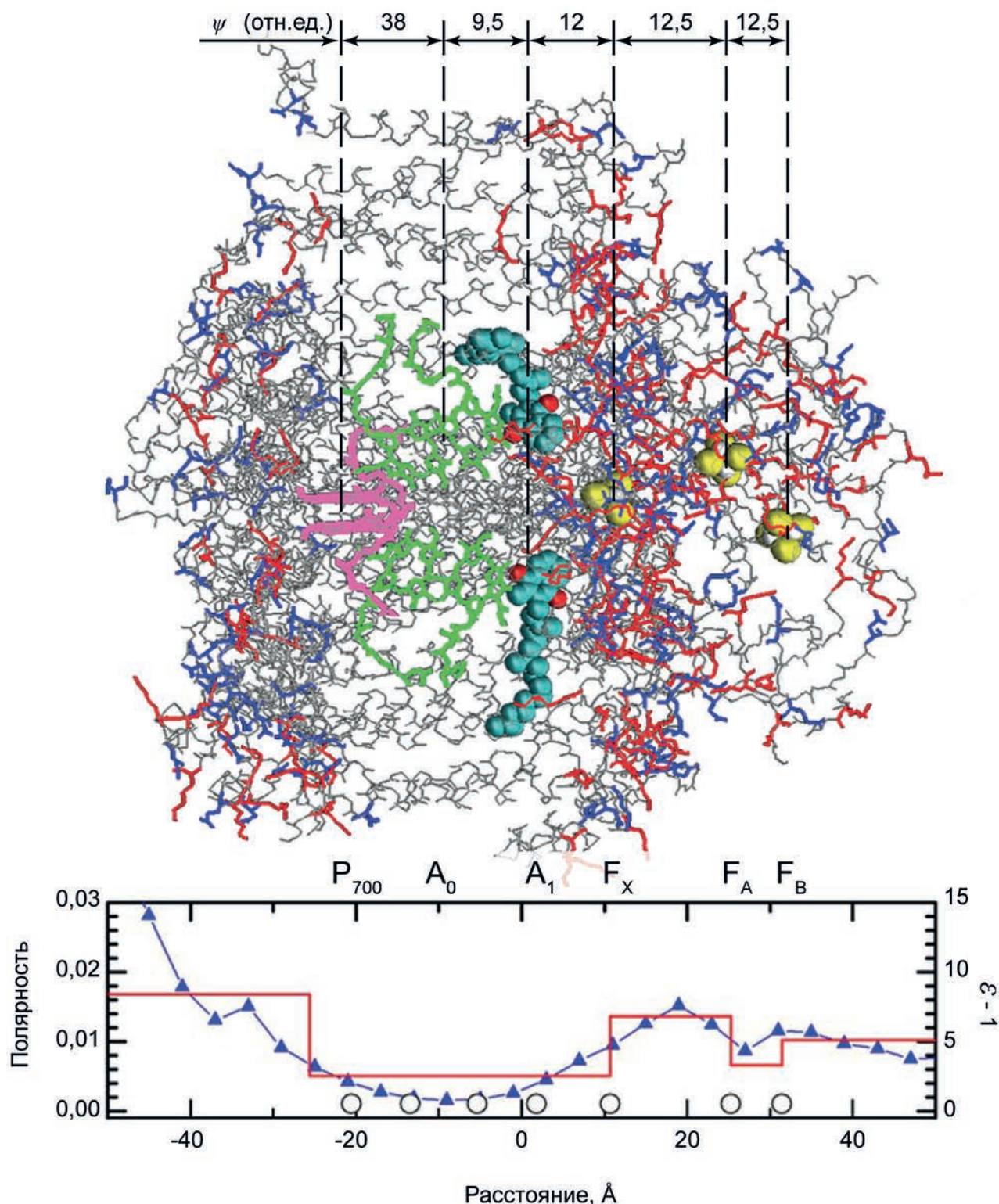


Рис. 6. Трехмерная структура ФС I (донорная сторона (экспонированная в люмен) — слева, акцепторная (экспонированная в строму) — справа) и график распределения полярности и диэлектрической проницаемости белкового комплекса вдоль нормали к плоскости мембраны. Полярность рассчитана как доля атомов, несущих заметный частичный заряд (N, O, S боковых цепей аминокислотных остатков). Кругами у оси абсцисс обозначены координаты расположения редокс-кофакторов. Перенос электрона между первичным донором P_{700} (показан в структуре розовым цветом) и хинонными акцепторами A_1 (показаны бирюзовыми и красными сферами, обозначающими атомы углерода и кислорода соответственно, входящими в состав хинона) может происходить по двум различным ветвям A и B (на рисунке — верхняя и нижняя). В каждой из ветвей между P_{700} и A_1 расположена пара молекул хлорофилла (показаны зеленым), функционирующая как единый кофактор A_0 в силу электронного сопряжения между двумя параллельными друг другу порфириновыми кольцами. В структуре белков ФС I показаны только пептидные цепи (серым цветом) и боковые цепи анионо- и катионогенных аминокислотных остатков (синий и красный цвета соответственно)

независимых данных о расстояниях между кофакторами (на основе рентгеноструктурного анализа) стало возможным извлечь из данных, предоставляемых прямым электрометрическим методом, среднее значение ϵ в области белка между двумя кофакторами. Таким образом, группе Драчева удалось оценить распределение ϵ в бактериальном фотосинтетическом РЦ из *R. sphaeroides*, в ФС 1 из цианобактерий и ФС 2 из высших растений [36, 37]. Разумеется, подобные данные имеют лишь оценочный характер, поскольку полярность соседних областей белка также сказывается на величине генерируемого потенциала. Однако сопоставление полученных таким образом данных с распределением полярных и неполярных остатков в белке показывает хорошее соответствие между этими характеристиками белка. На рис. 6 приведен график распределения вдоль нормали к поверхности мембраны диэлектрической проницаемости ФС 1, оцененной с помощью прямого электрометрического метода [38]. Видно, что характер этого распределения хорошо соответствует распределению полярных групп в структуре белкового комплекса. Доля атомов, несущих заметный парциальный заряд и обуславливающих диэлектрический ответ атомной подсистемы белка, определенная на основе данных рентгеноструктурного анализа о трехмерной структуре ФС 1, приведена на том же графике. Сами полярные группы показаны в структуре ФС 1 синим (остатки Asp и Glu) и красным цветом (Lys, Arg, His). В структуре также отмечены редокс-кофакторы (первичный донор электрона, P_{700} , первичные и вторичные акцепторы в обеих ветвях редокс-кофакторов A и B, A_0 и A_1 , и $4Fe_4S$ акцепторы F_X , F_A , F_B), а также показаны значения генерируемого потенциала, измеряемого электрометрическим методом, при переносе электрона на соответствующем участке.

Данные о распределении ϵ в ФС 1 послужили одной из основ для построения алгоритма расчета электростатических взаимодействий в белковом комплексе и в конечном счете определения окислительно-восстановительных характеристик кофакторов переносчиков электрона. Второй основой предложенного алгоритма стали идеи Л.И. Кришталлика о преодолении конфликта между парадигмой макроскопической электростатики и использованием в расчетах рентгеноструктурных данных о трехмерной структуре белка и, в частности, парциальных зарядов его атомов. Л.И. Кришталлик показал, что эти данные несут разный объем информации о различных компонентах

изменения свободной энергии кофактора при переносе его внутрь белка, которые, следовательно, должны быть рассчитаны с использованием разных подходов и учетом свойств белка через различные диэлектрические константы [39, 40]. В итоге впервые в рамках одного подхода удалось рассчитать редокс-потенциалы всех кофакторов ФС 1, начиная с первичного донора P_{700}/P_{700}^+ и заканчивая железосерными кластерами F_X , F_A , F_B [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из следствий хемиосмотической концепции Питера Митчелла являлось существование класса мембранных белков — генераторов $\Delta\psi$. С помощью прямого электрометрического метода было продемонстрировано существование таких белков, что послужило одним из доказательств справедливости этой концепции и способствовало в итоге присуждению Митчеллу заслуженной Нобелевской премии по химии.

Прямой электрометрический метод и его варианты применялись (и применяются) не только в отделе Драчева, а позже в отделах А.Д. Каулена (АДК) и А.Ю. Семенова (АЮС), но и в некоторых зарубежных лабораториях. В частности, этот метод был использован в лаборатории Дж. Фейера (Ла Хойя, США) для изучения электрогенных реакций в бактериальных РЦ [41], в лаборатории П. Бжезинского в Гетеборге (Швеция) для исследования электрогенных реакций в ФС 1 [42], в лаборатории В. Юнге в Оснабрюке (Германия) для исследования кинетики генерации $\Delta\psi$ при переходах между S-состояниями в комплексах ФС 2 [43], в лаборатории М. Викстрема в Хельсинки (Финляндия) для исследования электрогенных реакций при функционировании терминальных оксидаз митохондрий и бактерий (см. обзор Wikström и Verkhovsky [44]).

Разработка прямого электрометрического метода была оценена как одно из главных (среди примерно 40) экспериментальных исследований XX века в областях окислительного и фотосинтетического фосфорилирования, наряду с работами Г. Эмбдена и О. Мейергофа, В.А. Энгельгардта, О. Варбурга, В.А. Белицера и Е.Т. Цыбаковой, А. Ленинджера, Д. Арнона, Б. Чанса, П. Бойера и других [45].

Хотелось бы остановиться на роли самого Л.А. Драчева в разработке и модификации прямого электрометрического метода. Л.А. был радиофизиком, специалистом по электронике и лазерной технике высочайшего

уровня. Когда он пришел на работу в Межфакультетскую лабораторию МГУ, то имел довольно поверхностное представление о белках и в целом биохимии и молекулярной биологии. Большую роль в привлечении его интереса к мембранным белкам сыграли Е.А. Либерман и В.П. Скулачев.

С 1973 по 1993 г. он постоянно работал с молодыми в то время биохимиками АДК и одним из авторов настоящей статьи АЮС. АДК и АЮС выполняли биохимическую работу, выделяя белки, получая различные протеолипосомы или хроматофоры, варьируя состав фосфолипидов протеолипосом и ИЛМ, а также подбирая различные мембранные фильтры в качестве каркаса для ИЛМ. Кроме того, они непосредственно занимались измерениями $\Delta\psi$, продуцируемой различными мембранными белками в ответ на включение освещения или добавку соответствующего субстрата; проводили рН- и редокс-титрование фотоэлектрических сигналов, исследовали кинетику образования $\Delta\psi$ в ответ на лазерные вспышки. Однако детальная разработка метода, включая систему регистрации образования мембранного потенциала, и доказательства эквивалентной электрической схемы были бы невозможны без кропотливой и высокопрофессиональной работы Л.А. Драчева. Кроме всего прочего, Л.А. был высококласс-

ным инженером, и любые проблемы с приборами он выявлял и устранял чрезвычайно эффективно.

Однажды сотрудники в каком-то контексте сказали ему: «...ведь Вы — наш научный руководитель!» На что Драчев в полушутку ответил: «Я не научный руководитель, а технический директор». Однако Л.А., конечно, существенно преуменьшил свою роль. В действительности, полученные результаты постоянно обсуждались Л.А. Драчевым и его сотрудниками, а при их интерпретации и планировании будущих экспериментов его мнение играло чрезвычайно важную роль.

Вклад авторов. В.В. Птушенко — написание части разделов рукописи, обсуждение текста, редактирование; А.Ю. Семенов — формулирование концепции статьи, написание части разделов рукописи, обсуждение текста, редактирование.

Финансирование. Настоящая работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00025).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тихонов А. Н. (2012) Энергетическая и регуляторная роль протонного потенциала в хлоропластах, *Биохимия*, **77**, 1155-1176, doi: 10.1134/S0006297912090027.
2. Johnson, M. P., and Ruban, A. V. (2014) Rethinking the existence of a steady-state $\Delta\psi$ component of the proton motive force across plant thylakoid membranes, *Photosynth. Res.*, **119**, 233-242, doi: 10.1007/s11120-013-9817-2.
3. Skulachev, V. P. (1984) Sodium bioenergetics, *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 483-485, doi: 10.1016/0968-0004(84)90317-7.
4. Weber, B. H., and Prebble, J. N. (2006) An issue of originality and priority: the correspondence and theories of oxidative phosphorylation of Peter Mitchell and Robert JP Williams, 1961-1980, *J. History Biol.*, **39**, 125-163, doi: 10.1007/s10739-005-3052-4.
5. Junge, W., and Witt, H. T. (1968) On the ion transport system of photosynthesis — Investigations on a molecular level, *Zeitschrift Für Naturforschung B*, **23**, 244-254, doi: 10.1515/znb-1968-0222.
6. Булычев А., Андрианов В., Курелла Г., Литвин Ф. (1971) Трансмембранный потенциал клетки и хлоропласта высшего наземного растения, *Физиол. Раст.*, **18**, 248-256.
7. Булычев А., Андрианов В., Курелла Г., Литвин Ф. (1971) Трансмембранный потенциал хлоропласта и его фотоиндуцированные изменения, *Доклады АН СССР*, **197**, 473-477.
8. Bulychev, A. A., Andrianov, V. K., Kurella, G. A., and Litvin, F. F. (1972) Micro-electrode measurements of the transmembrane potential of chloroplasts and its photoinduced changes, *Nature*, **236**, 175-177, doi: 10.1038/236175a0.
9. Witt, H. T., and Zickler, A. (1974) Vectorial electron flow across the thylakoid membrane. Further evidence by kinetic measurements with an electrochromic and electrical method, *FEBS Lett.*, **39**, 205-208, doi: 10.1016/0014-5793(74)80051-7.
10. Fowler, C. F., and Kok, B. (1974) Direct observation of a light-induced electric field in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **357**, 308-318, doi: 10.1016/0005-2728(74)90069-3.
11. Joliot, P., and Joliot, A. (1984) Electron transfer between the two photosystems. I. Flash excitation

- under oxidizing conditions, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **765**, 210-218, doi: 10.1016/0005-2728(84)90015-X.
12. Deprez, J., Trissl, H. W., and Breton, J. (1986) Excitation trapping and primary charge stabilization in *Rhodospseudomonas viridis* cells, measured electrically with picosecond resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1699-1703, doi: 10.1073/pnas.83.6.1699.
 13. Trissl, H.-W., Leibl, W., Deprez, J., Dobek, A., and Breton, J. (1987) Trapping and annihilation in the antenna system of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **893**, 320-332, doi: 10.1016/0005-2728(87)90053-3.
 14. Либерман Е., Мохова Е., Скулачев В., Топалы В. (1968) Действие разобщителей окислительного фосфорилирования на бимолекулярные фосфолипидные мембраны. *Биофизика*, **13**, 188-193.
 15. Liberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, **222**, 1076-1078, doi: 10.1038/2221076a0.
 16. Oesterhelt, D., and Stoekenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nat. New Biol.*, **233**, 149-152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
 17. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Ostroumov, S. A., and Skulachev, V. P. (1974) Electrogenesis by bacteriorhodopsin incorporated in a planar phospholipid membrane, *FEBS Lett.*, **39**, 43-45, doi: 10.1016/0014-5793(74)80012-8.
 18. Kagawa, Y., and Racker, E. (1971) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: XXV. Reconstitution of vesicles catalyzing 32Pi-adenosine triphosphate exchange, *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477-5487, doi: 10.1016/S0021-9258(18)61930-1.
 19. Kayushin, L. P., and Skulachev, V. P. (1974) Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: Reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating $\Delta\psi$ and ΔpH , *FEBS Lett.*, **39**, 39-42, doi: 10.1016/0014-5793(74)80011-6.
 20. Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Liberman, E. A., Ostroumov, S. A., Plakunova, V. G., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1976) Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059-7065, doi: 10.1016/S0021-9258(17)32940-X.
 21. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Самуилов В. Д., Северина И. И., Семенов А. Ю., Скулачев В. П., Чекулаева Л. Н. (1979) Встраивание протеолипосом и хроматофоров в мембраны на основе фильтров, *Биофизика*, **24**, 1035-1042.
 22. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Semenov, A. Y., Severina, I. I., and Skulachev, V. P. (1979) Lipid-impregnated filters as a tool for studying the electric current-generating proteins, *Anal. Biochem.*, **96**, 250-262, doi: 10.1016/0003-2697(79)90580-3.
 23. Большаков В. И., Драчев А. Л., Каламкаров Г. Р., Каулен А. Д., Островский М. А., Скулачев В. П. (1979) Общность свойств бактериального и зрительного родопсинов: превращение энергии света в разность электрических потенциалов, *Доклады Академии Наук СССР*, **249**, 1462-1466.
 24. Drachev, L. A., Kalamkarov, G. R., Kaulen, A. D., Ostrovsky, M. A., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes: II. Visual rhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 471-481, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06362.x
 25. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324, doi: 10.1038/249321a0.
 26. Drachev, L. A., Kondrashin, A. A., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1980) Reconstitution of biological molecular generators of electric current: transhydrogenase, *Eur. J. Biochem.*, **113**, 213-217, doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb06158.x.
 27. Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Samuilov, V. D., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1976) Generation of electric current by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* and reconstitution of electrogenic function in subchromatophore pigment-protein complexes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **440**, 637-660, doi: 10.1016/0005-2728(76)90048-7.
 28. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Khitrina, L., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes: I. Bacteriorhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 461-470, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06361.x.
 29. Drachev, L. A., Semenov, A. Y., Skulachev, V. P., Smirnova, I. A., Chamorovsky, S. K., Kononenko, A. A., Rubin, A. B., and Uspenskaya, N. Ya. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes: III. Bacterial photosynthetic redox system, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 483-489, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06363.x.
 30. Chamorovsky, S. K., Drachev, A. L., Drachev, L. A., Karagul'yan, A. K., Kononenko, A. A., Rubin, A. B., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1985) Fast phases of the generation of the transmembrane electric potential in chromatophores of the photosynthetic bacterium *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **808**, 201-208, doi: 10.1016/0005-2728(85)90044-1.
 31. Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Kotova, E. A., Mamedov, M. D., Samuilov, V. D., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1986) The effect of cytochrome *c*, hexammineruthenium and ubiquinone-10 on the kinetics of photoelectric responses of *Rhodospirillum rubrum* reaction centres,

- Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **848**, 137-146, doi: 10.1016/0005-2728(86)90169-6.
32. Kaminskaya, O. P., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1986) Electrogenic reduction of the secondary quinone acceptor in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*: rapid kinetics measurements, *FEBS Lett.*, **202**, 224-228, doi: 10.1016/0014-5793(86)80691-3.
 33. Drachev, L. A., Kaurov, B. S., Mamedov, M. D., Mulkidjanian, A. Y., Semenov, A. Y., Shinkarev, V. P., Skulachev, V. P., and Verkhovsky, M. I. (1989) Flash-induced electrogenic events in the photosynthetic reaction center and *bc1* complexes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **973**, 189-197, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80421-9.
 34. Mamedov, M. D., Mamedova, A. A., Chamorovsky, S. K., and Semenov, A. Y. (2001) Electrogenic reduction of the primary electron donor P700 by plastocyanin in photosystem I complexes, *FEBS Lett.*, **500**, 172-176, doi: 10.1016/S0014-5793(01)02615-1.
 35. Mamedov, M. D., Gourovskaya, K. N., Vassiliev, I. R., Golbeck, J. H., and Semenov, A. Y. (1998) Electrogenicity accompanies photoreduction of the iron-sulfur clusters FA and FB in photosystem I, *FEBS Lett.*, **431**, 219-223, doi: 10.1016/S0014-5793(98)00759-5.
 36. Чаморовский К., Чаморовский С., Семенов А. (2005) Диэлектрические и фотоэлектрические свойства фотосинтетических реакционных центров, *Биохимия*, **70**, 315-322.
 37. Semenov, A. Y., Mamedov, M. D., and Chamorovsky, S. K. (2006) Electrogenic reactions associated with electron transfer in photosystem I, *Photosystem I: The Light-driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*, Springer, p. 319-338, doi: 10.1007/978-1-4020-4256-0_21.
 38. Ptushenko, V. V., Cherepanov, D. A., Krishtalik, L. I., and Semenov, A. Y. (2008) Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I, *Photosynth. Res.*, **97**, 55-74, doi: 10.1007/s11120-008-9309-y.
 39. Krishtalik, L. I. (1989) Dielectric constant in calculations of the electrostatics of biopolymers, *J. Theor. Biol.*, **139**, 143-154, doi: 10.1016/S0022-5193(89)80097-9.
 40. Krishtalik, L. I., Kuznetsov, A. M., and Mertz, E. L. (1997) Electrostatics of proteins: description in terms of two dielectric constants simultaneously, *Proteins Struct. Funct. Bioinformatics*, **28**, 174-182, doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(199706)28:2<174::AID-PROT6>3.0.CO;2-F.
 41. Brzezinski, P., Okamura, M. Y., and Feher, G. (1992) Structural changes following the formation of D⁺ Q_A⁻ in bacterial reaction centers: measurement of light-induced electrogenic events in RCs incorporated in a phospholipid monolayer, *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II: Structure, Spectroscopy and Dynamics*, pp. 321-330, doi: 10.1007/978-1-4615-3050-3_36.
 42. Sigfridsson, K., Hansson, O., and Brzezinski, P. (1995) Electrogenic light reactions in photosystem I: resolution of electron-transfer rates between the iron-sulfur centers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3458-3462, doi: 10.1073/pnas.92.8.3458.
 43. Haumann, M., Mulkidjanian, A., and Junge, W. (1997) Electrogenicity of electron and proton transfer at the oxidizing side of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 9304-9315, doi: 10.1021/bi963114p.
 44. Wikström, M., and Verkhovsky, M. I. (2007) Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1767**, 1200-1214, doi: 10.1016/j.bbabo.2007.06.008.
 45. Beinert, H. (1992) Trails of inquiry and thought leading toward today's bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1101**, 125-133, doi: 10.1016/S0005-2728(05)80002-7.

LEL A. DRACHEV AND THE DIRECT ELECTROMETRIC METHOD

Review

V. V. Ptushenko and A. Y. Semenov*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: semenov@belozersky.msu.ru*

In the bioenergetics studies, the direct electrometric method played an important role. This method is based on measuring the electrical potential difference ($\Delta\psi$) between two compartments of the experimental cell generated by some membrane proteins. These proteins are incorporated into closed lipid-protein membrane vesicles associated with an artificial lipid membrane that separates the compartments. The very existence of such proteins able to generate $\Delta\psi$ was one of the consequences of Peter Mitchell's chemiosmotic concept. The discovery and investigation of their functioning contributed to the recognition of this concept

and, eventually the well-deserved awarding of the Nobel Prize to P. Mitchell. Leif A. Drachev (1926-2022) was one of the main authors of the direct electrometrical method. With his participation, key studies were carried out on the electrogenesis of photosynthetic and respiratory membrane proteins, including bacteriorhodopsin, visual rhodopsin, photosynthetic bacterial reaction centers, cytochrome oxidase and others.

Keywords: Mitchell's chemiosmotic hypothesis, transmembrane electric potential difference ($\Delta\psi$), methods of membrane potential measurement, molecular electric generators, proteoliposomes, chromatophores, bacteriorhodopsin, photosystem I

ГЕНЕРАЦИЯ РАЗНОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ ХРОМАТОФОРАМИ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПРИСУТСТВИИ ТРЕГАЛОЗЫ В ОТВЕТ НА СТАЦИОНАРНОЕ ОСВЕЩЕНИЕ

© 2023 Л.А. Витухновская^{1,2}, А.А. Заспа¹, М.Д. Мамедов^{1*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: mahirmamedov@yandex.ru

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.06.2023

После доработки 20.07.2023

Принята к публикации 26.08.2023

Измерение разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в мембранных везикулах (хроматофорах) из пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, ассоциированных с поверхностью нитроцеллюлозного мембранного фильтра (МФ), пропитанного раствором фосфолипидов в декане, а также погруженных внутрь него, в присутствии экзогенных медиаторов и дисахарида трегалозы продемонстрировало увеличение амплитуды и стабилизацию сигнала при стационарном освещении. В качестве медиаторов (донора и акцептора электронов) были использованы пара аскорбат/ N,N,N',N' -тетраметил- p -фенилендиамин и убихинон-0 соответственно. Хотя стабилизация фотоэлектрических ответов при длительном стационарном освещении наблюдалась в обоих случаях иммобилизации хроматофоров, только при погружении образцов внутрь МФ сохранялась функциональная активность работы реакционного центра в течение месяца при их хранении в темноте при комнатной температуре. Стабильные фотоответы, вероятно, связаны с сохранением интактности белков хроматофоров внутри пор МФ. Стабилизирующее действие биопротектора трегалозы может быть обусловлено как его влиянием на белки РЦ, так и на фосфолипидную бислойную мембрану. Полученные результаты позволят расширить современные представления об использовании полусинтетических структур на основе различных интактных фотосинтетических систем, способных преобразовывать солнечную энергию в электрохимическую форму.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроматофоры, реакционный центр, цитохромный bc_1 -комплекс, мембранный фильтр, полупроводник, постоянное освещение, электрический потенциал.

DOI: 10.31857/S0320972523100020, EDN: OSMUJE

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий усилия многих исследователей были сосредоточены на разработке высокоэффективных искусственных систем на основе различных красителей и полупроводников, способных преобразовывать энергию света в электричество (см. обзоры Bella et al. и Calió et al. [1, 2]). Однако использование этих конструкций связано с некоторыми недостатками, такими как

высокая стоимость, применение дорогостоящих компонентов, необходимость их технического обслуживания и утилизации через определённое время. В связи с этим одним из перспективных подходов к созданию фотоэлектрохимических преобразователей энергии является использование природных фотосинтетических систем (см. обзоры Najafpour et al. и Teodor et al. [3, 4]).

Везикулы, образующиеся при выпячивании внутрицитоплазматической мембраны

Принятые сокращения: Аск – аскорбат; БХл – бактериохлорофилл; МФ – мембранный фильтр; РЦ – реакционный центр; ТМФД – N,N,N',N' -тетраметил- p -фенилендиамин; Хром – хроматофоры; цит – цитохром; bc_1 – цитохромный bc_1 -комплекс; ИТО – полупроводник на основе оксида индия-олова; P_{870} – димер хлорофилла; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хинонные акцепторы; УQ – убихинон; UQ_0 – 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон; $\Delta\psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов.

* Адресат для корреспонденции.

(хроматофоры, Хром) в клетках несерных пурпурных бактерий, содержат фотосинтетический аппарат, идеально подходящий для таких исследований. В отличие от тилакоидных мембран цианобактерий и хлоропластов, Хром фотосинтезирующих бактерий представляют собой минимальную структурно-функциональную единицу, способную преобразовывать энергию поглощённых фотонов для синтеза АТФ [5]. Светозависимый циклический перенос электронов в них, например, в *Rhodospira rubra*, осуществляется между реакционным центром (РЦ) и цитохромным bc_1 -комплексом (bc_1) с участием мобильного мембранного пула убихинонов (UQ) и эндогенного растворимого цитохрома (цит) c_2 .

После возбуждения РЦ квантом света фотоактивированный электрон переносится от димера бактериохлорофилла P_{870} (P) к первичному (Q_A), а затем ко вторичному хинонному акцептору (Q_B). Восстановление фотоокисленного P_{870} происходит в результате переноса электрона от периферического белка — донора электронов для РЦ — цит c_2 . Согласно модифицированной концепции Q-цикла (см. обзор Crofts et al. [6]), окисление молекулы убихинола, образовавшейся в РЦ и перенесённой в убихинол-оксидазный центр « Q_o » bc_1 , организовано таким образом, что один электрон возвращается через железо-серный белок Риска (Fe_2S_2) и цит c_1 и c_2 (высокопотенциальная цепь) к фотоокисленному P_{870} , а другой передаётся через двухгемовый цитохром b (низкопотенциальная цепь) в убихинон-редуктазный центр « Q_i » для восстановления молекулы UQ из пула убихинонов. Повторный запуск вышеописанных реакций приводит к образованию «дополнительного» убигидрохинона в сайте « Q_i » и к увеличению выхода протонов в люмен Хром на каждый поглощённый фотон. Здесь же следует отметить, что светоиндуцированное векторное перемещение зарядов в РЦ и bc_1 в мембранных везикулах сопряжено с генерацией трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) [7–11], являющейся первичной формой запасаения энергии.

Таким образом, относительно простое preparativное получение Хром из бактериальных клеток, расположение энергопреобразующих ферментов в интактном липидном окружении, способность РЦ преобразовывать энергию света с высокой квантовой эффективностью и детально исследованный механизм генерации $\Delta\psi$ на отдельных участках электрон-транспортной цепи делают Хром привлекательными объектами для фотоэлектрохимических исследований. При использовании Хром в гибридных

системах *in vitro* одним из важных этапов является их эффективная иммобилизация на носителях (проводники, полупроводники, полимеры, фосфолипидные мембраны) и измерение стационарного электрического потенциала [12–14] и/или тока [12, 15–19]. Однако в приведённых выше работах [12–14] не изучалась генерация $\Delta\psi$ при длительном стационарном освещении. Что касается измерений стационарного тока в Хром [15–19], то они проводились в основном с помощью трёхэлектродной системы при подаче внешнего электрического поля, где амплитуда фототока зависела от величины этого поля.

В настоящей работе мы изучали генерацию разности электрических потенциалов в ответ на стационарное освещение в Хром *Rba. sphaeroides*, иммобилизованных на поверхности нитроцеллюлозного мембранного фильтра (МФ), пропитанного раствором фосфолипидов, с помощью прямого электрометрического метода [13]. Суть этого метода заключается в регистрации $\Delta\psi$ с помощью пары хлорсеребряных (Ag/AgCl) макроэлектродов, погружённых в раствор электролита и соединённых с операционным усилителем. В представленной нами работе полученные результаты сопоставлялись с электрометрическими данными для Хром, погружённых внутрь МФ, зажатого с двух сторон полупроводниковыми стеклянными пластинами на основе оксида индия-олова (англ. indium tin oxide или сокращённо ИТО) [20]. Полученные данные наглядно демонстрируют долговременную и стабильную фотоэлектрическую активность Хром в этих системах в присутствии дисахарида трегалозы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание клеток и получение Хром.

Клетки дикого типа *Rba. sphaeroides* выращивали при 30 °C в анаэробных условиях на среде Ормерода [21] при интенсивности света 800 Вт м⁻². Для получения мембранных везикул с высоким содержанием эндогенного растворимого цит c_2 мы использовали процедуру экстракции, описанную в работе Woronowicz et al. [22], с небольшими модификациями. Клетки, суспендированные в 25 мМ буфере HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащем несколько кристаллов ДНКазы и ингибиторов протеазы, разрушали с помощью Френч-пресса («Aminco», США). После удаления осадка супернатант наносили на градиент плотности сахарозы (5–35%, *m/m*) и центрифугировали

на вертикальном роторе VTi-50, приобретённом в рамках программы развития МГУ, в течение 2 ч при 27 000 об./мин. Нижнюю полосу Хром собирали, дважды диализовали против 25 мМ буфера HEPES-NaOH (pH 7,5) в течение 2 ч и концентрировали. Суспензию Хром (~2 мг бактериохлорофилла (БХл)/мл) замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Концентрацию БХл в Хром определяли, как описано ранее [23]. Спектры поглощения Хром регистрировали на спектрофотометре Hitachi 3400 («Hitachi», Япония).

Измерение разности электрических потенциалов в Хром, иммобилизованных на поверхности МФ. $\Delta\psi$ измеряли с помощью прямого электрометрического метода, разработанного в нашей лаборатории [13]. В качестве матрикса для иммобилизации Хром были использованы МФ (Millipore GSTF, «Millipore», США) с диаметром пор 0,22 мкм и толщиной 150 мкм. Круг из МФ диаметром 2,0 см, пропитанный декановым раствором азолектина (80 мг/мл) (L- α -lecithin, type II-S, «Sigma»), зажимали между двумя частями разборной тefлоновой кюветы так, чтобы фильтр перекрывал отверстие диаметром 0,4 см в перегородке, разделяющей два отсека. Затем оба отсека заполняли буфером 25 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащим 20 мМ MgCl_2 . Хром добавляли только в один отсек ячейки. После перемешивания в течение 1 ч оба отсека ячейки промывались десятикратным объёмом буфера без MgCl_2 с помощью перистальтического насоса для удаления магния и не связавшихся с фильтром Хром.

Используемые экзогенные медиаторы добавлялись в отсек ячейки с иммобилизованными на поверхности МФ Хром перед измерением.

Фотоэлектрические ответы регистрировались при помощи пары хлорсеребряных ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{ M KCl}$) макроэлектродов, погружённых по обе стороны от МФ в раствор электролита. Электроды были подключены к операционному усилителю («Burr Brown», 3554BM, США), а последний, в свою очередь, к аналого-цифровому преобразователю (АЦП, Gage CS8012) и компьютеру. В качестве источника постоянного света использовалась лампа накаливания с мощностью 90 Вт (12 В).

Измерение разности электрических потенциалов в Хром, погружённых внутрь МФ. Для этого реконструировалась система ИТО|Хром—МФ|ИТО. МФ (Millipore GSTF, диаметр пор 0,22 мкм, толщина 150 мкм) размером $2,5 \times 5$ см помещали на поверхность предметного стекла, покрытого полупроводником ИТО. Затем

на поверхность МФ ($\sim 1,0\text{ см}^2$) каплями наносили 30–40 мкл суспензии Хром с концентрацией БХл ~ 2 мг/мл. После 10-минутной темновой адсорбции поверхность МФ промывалась (2×250 мкл) 25 мМ буфером HEPES-NaOH (pH 7,5), и после этого второй электрод ИТО устанавливался сверху.

Следует отметить, что в системе ИТО|Хром—МФ|ИТО медиаторы добавлялись в суспензию Хром до их иммобилизации внутри МФ.

Регистрация электрических потенциалов в системе ИТО|Хром—МФ|ИТО проводилась с помощью медных проводов, соединённых, с одной стороны, с предметными стёклами, покрытыми ИТО, а другой стороны—с операционным усилителем («Burr Brown», 3554BM). Сигнал от усилителя подавался на АЦП (Gage CS8012), подключённый к компьютеру. Насыщающее непрерывное освещение обеспечивалось лампой накаливания (12 В, 90 Вт).

Каждое фотоэлектрическое измерение повторялось не менее 3 раз. Диапазон погрешности для фотоответов составлял $\sim 5\%$. Все измерения проводились при $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Рисунки подготовлены с помощью пакета программ Origin 7.5 («OriginLab Corporation»).

Оптическая спектроскопия. Фотоиндуцированные изменения поглощения при 603 нм, отражающие редокс-свойства первичного донора электронов P_{870} , регистрировали с помощью однолучевого дифференциального спектрофотометра, сконструированного в нашей лаборатории. Измеряющий свет от лампы КГМ-98, питаемой от источника постоянного тока ТЕС-15, проходил через монохроматор HL-1 («Jobin Ivon», Франция), кювету с образцом, стеклянный светофильтр, второй монохроматор УМ-2, а затем попадал на фотоэлектронный умножитель (ФЭУ). Сигнал с ФЭУ через операционный усилитель («Burr Brown», 3554BM) подавался на АЦП (Gage CS8012), подключённый к компьютеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Целью данной работы было исследование генерации $\Delta\psi$ в интактных бактериальных мембранных везикулах при непрерывном освещении. Ранее было показано [24], что Хром, выделенные из несерной пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* в определённых условиях (разрушение клеток с помощью Френч-пресса при низкой ионной силе), содержат $\sim 70\%$ цит c_2 внутри везикул (см. Материалы и методы). В таких Хром восстановление фотоокисленного P_{870} в РЦ может происходить в результате

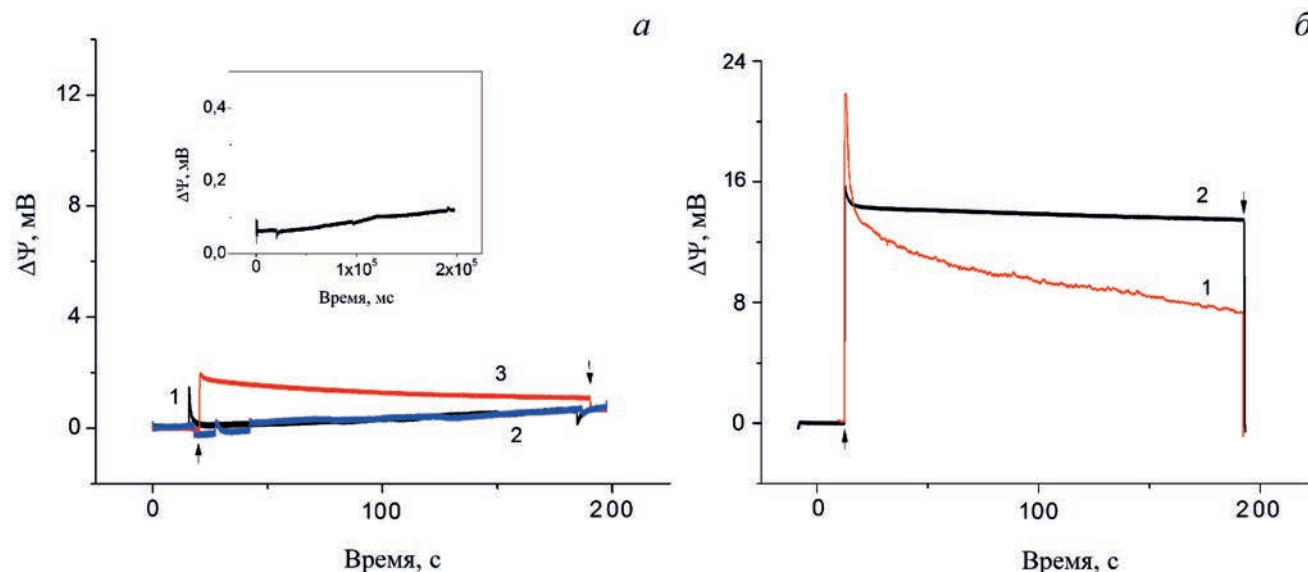


Рис. 1. Генерация электрических потенциалов в Хром. *а* – Генерация разности электрических потенциалов в Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, пропитанного раствором фосфолипидов при стационарном освещении. Размеры пор 0,22 мкм, толщина фильтра 150 мкм. Фильтр пропитывался декановым раствором азолектина (80 мг/мл). Хром без добавок (кривая 1), в присутствии пары 2,5 мМ Аск/150 мкМ ТМФД (кривая 2) и в присутствии только 150 мкМ UQ₀ (кривая 3). Среда инкубации: 25 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5). *б* – Генерация разности электрических потенциалов в среде измерения, содержащей 2,5 мМ Аск/150 мкМ ТМФД и 150 мкМ UQ₀ в отсутствии (кривая 1) и в присутствии (кривая 2) 0,75 М трегалозы. Вставка к рис. 1, *а* – фотоответ в присутствии 5 мМ Аск/150 мкМ ТМФД и 150 мкМ UQ₀, но без Хром. (↑) и (↓) указывают включение и выключение света

прямого переноса электрона от эндогенного цит c_2 [24, 25]. Другими словами, функционально активные Хром должны содержать цит c_2 , который наряду с пулом убихинонов выступает в качестве окислительно-восстановительного переносчика между комплексами РЦ и bc_1 . Содержание цит c_2 было определено нами путём регистрации абсорбционных изменений при 603 нм, отражающих редокс-свойства R_{870} в ответ на одиночные вспышки света в суспензии Хром в отсутствии и в присутствии 2% детергента Triton X-100 (не показано) (см. работу Altamura et al. [26]).

На рис. 1 продемонстрирована генерация $\Delta\psi$ при постоянном освещении Хром *Rba. sphaeroides*, ассоциированных с поверхностью МФ, пропитанного раствором фосфолипида. Видно, что в отсутствии каких-либо добавок (медиаторов) фотоэлектрический ответ не наблюдается (рис. 1, *а*, кривая 1). Следует отметить, что при ассоциации Хром с МФ, пропитанным раствором фосфолипидов в декане, как и в случае с коллоидной плёнкой [9, 10], происходит экстракция UQ как из сайта вторичного хинонного акцептора Q_B в белке РЦ, так и из мембранного пула. Кроме того, происходит окисление цит c_2 и первичного донора электронов – димера БХл R_{870} в РЦ. В этих условиях светоиндуцированный перенос электронов в Хром ограничивается образованием

ион-радикальной пары $R_{870}^+Q_A^-$ внутри белка РЦ. Однако перенос заряда за пределы РЦ в описанной системе может быть реконструирован путём насыщения иммобилизованных Хром экзогенным хиноном и восстановления эндогенного цит c_2 (см. работу Drachev et al. [14]).

В Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, в присутствии только аскорбата (Аск) и N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД) в среде измерения фотоэлектрический ответ также не наблюдался (рис. 1, *а*, кривая 2). Использование пары Аск и ТМФД в концентрациях 2,5 мМ и 150 мкМ соответственно в качестве донора электронов обусловлено необходимостью восстановления растворимого цит c_2 , поскольку он локализован внутри Хром и не взаимодействует с плохо проникающим через мембрану Аск [9].

На рис. 1, *а*, кривая 3 показана генерация $\Delta\psi$ при стационарном освещении в присутствии только акцептора электронов 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинона (UQ₀) в концентрации 150 мкМ. Амплитуда фотоответа в этих условиях составляла ~1,8 мВ. UQ₀ является эффективным экзогенным акцептором электрона от хинонов в РЦ [27, 28] и широко используется в фотоэлектрохимических системах [28].

В качестве контроля на вставке к рис. 1, *а* показана генерация трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в присут-

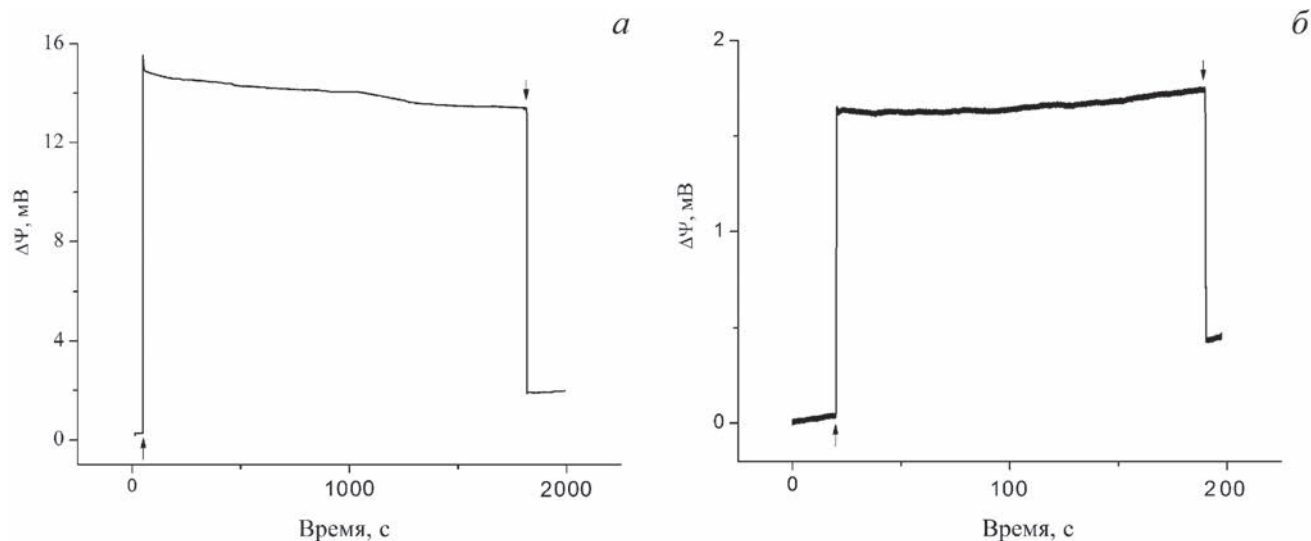


Рис. 2. Генерация электрических потенциалов в Хром в присутствии трегалозы. *а* – Генерация разности электрических потенциалов стандартно выделенными Хром, ассоциированными с поверхностью МФ, при стационарном освещении в присутствии 0,75 М трегалозы. *б* – То же в случае Хром, дефицитных по цит c_2 . Условия эксперимента как на рис. 1, *б*, кривая 2

ствии Аск/ТМФД и UQ_0 , но без Хром. Видно, что в этих условиях ответ не наблюдается.

На рис. 1, *б*, кривая 1 приведён фотоэлектрический ответ Хром при стационарном освещении в присутствии как донора (Аск/ТМФД), так и акцептора (UQ_0) электронов. Видно, что только в присутствии обоих медиаторов наблюдается значительный рост фотоэлектрического ответа с последующим двухкомпонентным спадом $\Delta\psi$ – в быстрой (~ 3 с) и медленной (~ 180 с) шкалах времени.

Следующие эксперименты были проведены для изучения влияния биопротектора дисахарида трегалозы на светозависимое образование $\Delta\psi$ иммобилизованными на поверхности МФ хроматофорами. В присутствии пары Аск/ТМФД и UQ_0 добавление 0,75 М трегалозы приводило к стабилизации сигнала $\Delta\psi$ при стационарном освещении в течение ~ 190 с (рис. 1, *б*, кривая 2). В этих условиях также удалось наблюдать стабилизацию сигнала $\Delta\psi$ при значительно более длительном освещении (~ 1800 с) (рис. 2, *а*).

На рис. 2, *б* показана генерация $\Delta\psi$ дефицитными по цит c_2 Хром из *Rba. sphaeroides* в присутствии пары Аск/ТМФД, UQ_0 и трегалозы. Освещение таких Хром приводит к генерации разности электрических потенциалов амплитудой $\sim 1,8$ мВ. Этот результат свидетельствует о том, что проникающая через мембрану восстановленная форма ТМФД в концентрации 150 мкМ недостаточно эффективно восстанавливает фотоокисленный P_{870} в стационарных условиях [11].

Перенос зарядов внутри белковых комплексов РЦ и bc_1 в Хром сопряжён с генерацией $\Delta\psi$, измеренной как с помощью электрохромного сдвига полос поглощения каротиноидов, так и прямого электрометрического метода [10]. На рис. 3, *а*, кривая 1 продемонстрирована генерация $\Delta\psi$ при добавлении Аск/ТМФД, UQ_0 и трегалозы при стационарном освещении. Для определения вклада bc_1 в общий фотоответ в среду измерения добавляли антимицин А, ингибитор убухинон-редуктазного сайта (« Q_i ») bc_1 . Видно (рис. 3, *а*, кривая 2), что добавление антимицина уменьшает амплитуду фотоответа на $\sim 12\%$. Наблюдаемый эффект, вероятно, связан с тем, что используемый нами UQ_0 связывается в сайте Q_B в РЦ [28], получает электрон от Q_A^- , а его восстановленная форма (UQ_0H_2) выступает в качестве «субстрата» лишь для небольшой фракции bc_1 .

Для доказательства того, что наблюдаемая фотоэлектрическая активность Хром обусловлена функционированием РЦ, эффективный ингибитор переноса электронов между хинонными акцепторами Q_A^- и Q_B^- атразин был добавлен в среду измерения. Действительно, добавление 10 мкМ атразина практически полностью ингибировало генерацию фотоэлектрического ответа (рис. 3, *а*, кривая 3). Этот результат показывает, что в исследуемой системе перенос электрона на акцепторном участке происходит от первичного хинона Q_A на экзогенный акцептор Q_0 .

Для изучения стабильности фотоответов Хром, ассоциированные с поверхностью МФ,

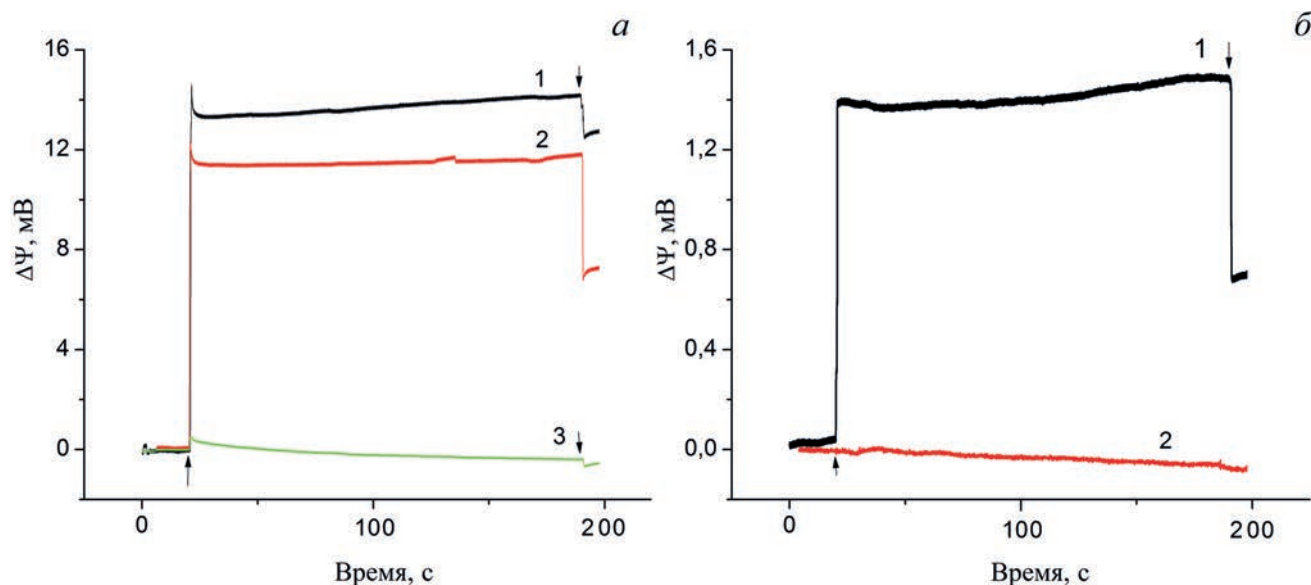


Рис. 3. Генерация электричества в Хром, ассоциированных с поверхностью МФ. *а* – Генерация разности электрических потенциалов в Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, пропитанного раствором фосфолипидов. Условия как на рис. 1, *б*, кривая 2 в отсутствии (кривая 1) и в присутствии 5 мкМ антимицина А (кривая 2); кривая 3 – условия как на рис. 3, *а* (кривая 1), но в присутствии 10 мкМ атразина. *б* – Генерация разности электрических потенциалов хроматофорами после 18 ч (кривая 1) и 40 ч (кривая 2) хранения при комнатной температуре. Условия эксперимента как на рис. 3, *а*, кривая 1

хранились в темноте при комнатной температуре и освещались через определённые промежутки времени. Видно, что амплитуда $\Delta\psi$, изначально составлявшая ~14 мВ (рис. 3, *а*, кривая 1), через 18 ч хранения уменьшилась до ~1,4 мВ (рис. 3, *б*, кривая 1), а через 40 ч фотоответ не наблюдался (рис. 3, *б*, кривая 2).

На рис. 4 показана генерация $\Delta\psi$ в Хром, погруженных внутрь МФ и зажатых с двух сторон полупроводниковыми стеклянными пластинами на основе оксида индия-олова (ITO|Хром–МФ|ITO) с добавленными медиаторами (Аск/ТМФД, UQ_0), антимицином А, а также трегалозой. Предполагалось, что используемые редокс-медиаторы свободно перемещаются внутри МФ и могут взаимодействовать как с РЦ, так и электродами ITO. Видно, что при освещении системы в течение ~4000 с генерируется стабильный неспадающий фотоэлектрический ответ амплитудой ~30 мВ [20].

Следует отметить, что 18-часовая темновая адаптация при комнатной температуре системы ITO|Хром–МФ|ITO приводила к значительному уменьшению сигнала $\Delta\psi$ при освещении в течение 180 с (не показано). На вставке к рис. 4 показана генерация $\Delta\psi$ при внесении свежего буфера, 25 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5, ~40 мкл), с медиаторами (Аск/ТМФД и UQ_0) непосредственно в систему ITO|Хром–МФ|ITO после хранения её в течение 30 дней в темноте при комнатной температуре. В этих

условиях амплитуда фотоответа составляла ~70% от амплитуды ответа контрольного образца.

На рис. 5 показаны пути переноса электронов в Хром, иммобилизованные двумя разными способами.

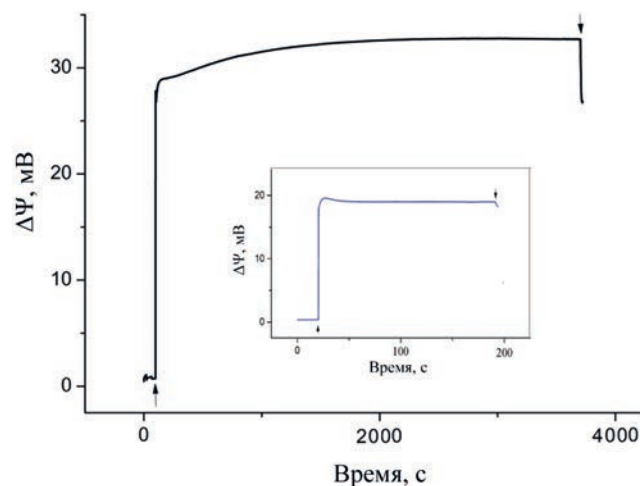


Рис. 4. Генерация электричества в Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, в присутствии трегалозы. Генерация $\Delta\psi$ в Хром, погруженных внутрь МФ (система ITO|Хром–МФ|ITO), в присутствии 2,5 мМ Аск, 150 мкМ ТМФД, 150 мкМ UQ_0 , 0,75 М трегалозы и 5 мкМ антимицина А при освещении в течение 4000 с (контроль). Вставка: генерация $\Delta\psi$ после внесения свежего буфера 25 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащего Аск/ТМФД и UQ_0 , непосредственно в систему ITO|Хром–МФ|ITO на 30-й день её хранения при комнатной температуре

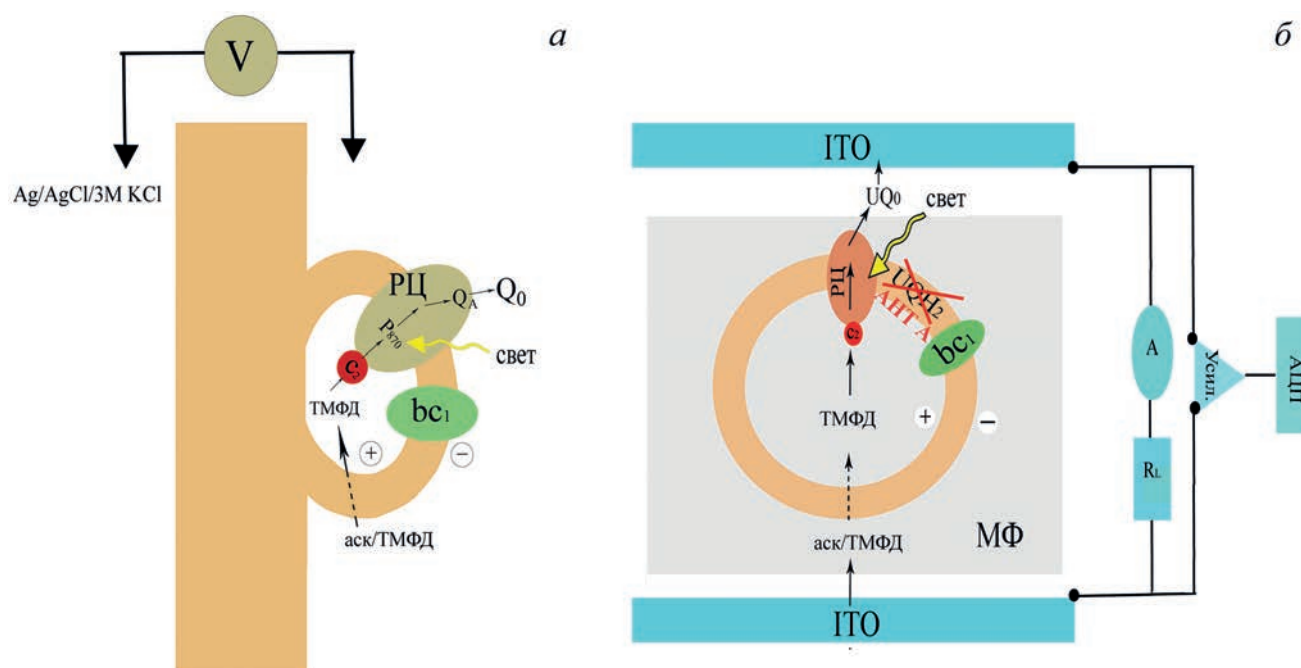


Рис. 5. Предполагаемые пути переноса электронов, индуцированные стационарным освещением в Хром *Rba. sphaeroides*, ассоциированных с поверхностью МФ (а) и погруженных в МФ (б)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования механизма генерации $\Delta\psi$ в Хром, ассоциированных с поверхностью коллоидной плѣнки, пропитанной раствором липидов, в ответ на одиночные вспышки света с помощью прямого электрометрического метода продемонстрировали наличие следующих электрогенных реакций: 1) разделение зарядов между P_{870} и Q_A , 2) ре-восстановление фотоокисленного P_{870} эндогенным цит c_2 , 3) протонирование дважды восстановленной формы вторичного хинонного акцептора Q_B (см. обзор Kaminskaya et al. [11]) и 4) перенос электронов и протонов в bc_1 [10].

Целью данной работы была демонстрация и изучение механизма генерации $\Delta\psi$ в Хром, иммобилизованных как на поверхности МФ, так и погруженных в него при стационарном освещении.

Следует отметить, что адсорбция биоматериалов на твѣрдой поверхности (электроды Au, TiO_2 , ITO) может приводить как к структурным изменениям, так и к возникновению электростатического отталкивания между исследуемыми образцами и поверхностью носителя (работа Yaghoubi et al. [29] и ссылки в ней). Принимая во внимание биосовместимость, биоразлагаемость, нетоксичность и низкую стоимость производного природного полимера — пористого нитроцеллюлозного МФ [30, 31], мы использовали его в качестве

матрицы для иммобилизации Хром. Ассоциация образцов с поверхностью МФ достигалась путѣм нейтрализации отрицательных зарядов полярных «головок» фосфолипидов мембран Хром и МФ в присутствии катионов Mg^{2+} или Ca^{2+} [13] (см. «Материалы и методы»).

Для генерации стабильных электрических сигналов использовались функционально-активные Хром, которые характеризуются высоким содержанием эндогенного цит c_2 . Так как редокс-кофакторы в трансмембранных комплексах РЦ и bc_1 погружены глубоко в белковый матрикс, при стационарном освещении *in vitro* (в полусинтетической системе) $\Delta\psi$ регистрировалась в присутствии экзогенных медиаторов. Использование пары Аск/ТМФД было обусловлено проницаемостью мембраны Хром для восстановленной формы ТМФД и её способностью восстанавливать эндогенный цит c_2 [9]. Наличие растворимого UQ_0 , в свою очередь, поддерживало функциональную активность РЦ, акцептируя электроны от первичного хинона Q_A^- в Хром, ассоциированных с поверхностью, и от вторичного хинона Q_B^- в случае Хром, погруженных внутрь МФ [20, 28]. UQ_0 являлся эффективным медиатором между хинон-акцепторным участком РЦ и электродами [28, 32].

В Хром *Rba. sphaeroides*, ассоциированных с поверхностью МФ, происходит вымывание непрочно связанного Q_B и пула UQ н-деканом, используемым в качестве гидрофобного

растворителя фосфолипидов при пропитывании МФ; следствием этого является блокирование циклического переноса зарядов [13]. В этих условиях убигидрохинон (UQ_0H_2), генерируемый при стационарном освещении, вероятно, из-за высокой гидрофильности не может выступать в качестве субстрата для bc_1 (рис. 5, а).

С другой стороны, при погружении Хром внутрь МФ сохраняется функционирование циклической электрон-транспортной цепи с участием комплексов РЦ и bc_1 , а также пула UQ и цит c_2 . Этот факт подтверждается тем, что добавление ингибитора bc_1 — антимицина А — приводит к значительному (почти в 2 раза) увеличению амплитуды стационарной $\Delta\psi$ [20]. Увеличение амплитуды фотоэлектрического ответа в условиях ингибирования bc_1 обусловлено перенаправлением циклического потока электронов, не вносящего вклад в регистрируемый в такой системе мембранный потенциал, в пользу линейного переноса электронов между электродами ИТО и РЦ (рис. 5, б). Такой тип иммобилизации позволяет регистрировать стабильный неспадающий сигнал $\Delta\psi$ при длительном освещении (~ 4000 с) [20].

Таким образом, регистрируемый максимальный фотоэлектрический ответ, вероятно, обусловлен светоиндуцированным прямым переносом электронов по пути цит $c_2 \rightarrow$ РЦ $\rightarrow Q_A \rightarrow Q_0 \rightarrow O_2$ в случае Хром, ассоциированных с поверхностью МФ (рис. 5, а), или ИТО $\rightarrow$ цит $c_2 \rightarrow$ РЦ $\rightarrow Q_A \rightarrow Q_B \rightarrow UQ_0 \rightarrow$ ИТО для Хром, погружённых внутрь МФ (рис. 5, б). Другими словами, в обеих системах генерация стационарной $\Delta\psi$ обусловлена работой самого РЦ. Об этом свидетельствует подавление генерации электрических ответов в присутствии атразина — ингибитора переноса электронов между хинонными акцепторами в РЦ (рис. 3, а, кривая 3).

В работах по исследованию преобразования энергии света важно не только получение значительной амплитуды тока или электричества при стационарном освещении, но и выявление условий сохранения функциональной активности образцов при их длительном хранении при комнатной температуре. В Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, через 40 ч наблюдалось практически полное падение амплитуды $\Delta\psi$ (рис. 3, б, кривая 2). Падение амплитуды фотоответа может быть связано или с уменьшением сопротивления МФ, пропитанного раствором липидов [13], или же со временем «деградации» добавленных медиаторов, в частности Аск. Однако, ре-восстановление сопротивления МФ (2×10^8 Ом)

и добавление в среду измерения свежей порции буфера с медиаторами (Аск/ТМФД, UQ_0) не приводило к ре-восстановлению $\Delta\psi$ (не показано). Следовательно, уменьшение амплитуды $\Delta\psi$ с течением времени, скорее всего, связано с конформационно-структурными изменениями РЦ в случае Хром, ассоциированных с поверхностью МФ.

Что касается стабильности фотоэлектрических ответов при погружении Хром внутрь МФ, то следует отметить, что после хранения системы ИТО|Хром — МФ|ИТО при комнатной температуре в аэробных условиях в течение 30 дней при внесении в систему свежего буфера, содержащего донор и акцептор электронов, наблюдалось восстановление амплитуды $\Delta\psi$ до $\sim 70\%$ (вставка к рис. 4) относительно контрольного образца (рис. 4). Последнее свидетельствует о том, что большинство Хром, иммобилизованных на МФ, остаются функционально активными, по крайней мере, в течение 30 дней.

Становится очевидным, что стабильные максимальные фотоотчеты в обеих системах наблюдались только в присутствии уникального по своим физико-химическим свойствам дисахарида трегалозы. Ранее такие же стабильные фотоэлектрические ответы были выявлены в присутствии этого осмолита в изолированных пигмент-белковых комплексах ФС1 и ФС2, погруженных внутрь МФ [33, 34]. Отметим, что трегалоза также влияет на характер электрического ответа (рис. 1, б, кривая 2), а именно — подавляет быстрый «всплеск» и спад сигнала $\Delta\psi$ в начале освещения (рис. 1, б, кривая 1). Это может быть связано с уменьшением ионной проницаемости мембраны Хром [35, 36]. Аналогичное влияние трегалозы на быстрый «всплеск» и спад фотоответа в отсутствии осмолита также наблюдалось при погружении Хром в МФ [20]. Стабилизация фотоответов может быть связана с улучшением эффективности взаимодействия медиатора(ов) с белками фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Сохранение тонкой гидратной оболочки трансмембранных белков в присутствии этого дисахарида может менять их конформацию в пользу более оптимальной для эффективного функционирования [37–39]. Трегалоза, вероятно, также стабилизирует липидные бислои, замещая воду при образовании водородных связей между её собственными ОН-группами и полярными «головками» липидов [40]. При этом взаимодействие осмолита с трансмембранными белками и с фосфолипидами в Хром может осуществляться только вблизи внешней стороны мембраны.

Последнее обстоятельство обусловлено непроницаемостью мембраны Хром для трегалозы.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что трегалоза стабилизирует фотоэлектрические сигналы, генерируемые Хром, в обоих случаях, но наиболее стабильные фотоотчеты наблюдаются при погружении Хром внутрь МФ. Этот крайне простой способ иммобилизации образцов, вероятно, позволяет сохранить интактность фотосинтетических белков Хром внутри пор МФ при комнатной температуре в течение длительного периода времени.

Полученные результаты позволяют расширить современные представления об использовании полусинтетических структур на основе различных интактных фотосинтетических систем (клетки цианобактерий и пурпурных бактерий [41], тилакоидные мембраны растений),

способных преобразовывать солнечную энергию в электрохимическую форму.

Вклад авторов. М.Д. Мамедов — концепция и руководство работой, анализ электрических измерений, написание и редактирование текста статьи; Л.А. Витухновская, А.А. Заспа — выделение бактериальных мембранных везикул (хроматофоров) и проведение электрических измерений.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ), грант № 23-74-00025.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bella, F., Gerbaldi, C., Barolo, C., and Grätzel, M. (2015) Aqueous dye-sensitized solar cells, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 3431-3473, doi: 10.1039/c4cs00456f.
2. Calió, L., Kazim, S., Grätzel, M., and Ahmad, S. (2016) Hole-transport materials for perovskite solar cells, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **55**, 14522-14545, doi: 10.1002/anie.201601757.
3. Najafpour, M. M., Renger, G., Hołyńska, M., Moghaddam, A. N., Aro, E. M., et al. (2016) Manganese compounds as water-oxidizing catalysts: from the natural water-oxidizing complex to nanosized manganese oxide structures, *Chem. Rev.*, **116**, 2886-2936, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00340.
4. Teodor, A. N., and Bruce, B. D. (2020) Putting photosystem I to work: truly green energy, *Trends Biotechnol.*, **38**, 1329-1342, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.04.004.
5. Singharoy, A., Maffeo, C., Delgado-Magnero, K. H., Swainsbury, D. J. K., Sener, M., et al. (2019) Atoms to phenotypes: molecular design principles of cellular energy metabolism, *Cell*, **179**, 1098-1111, doi: 10.1016/j.cell.2019.10.021.
6. Crofts, A. R. (2021) The modified Q-cycle: a look back at its development and forward to a functional model, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1862**, 148417, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148417.
7. Crofts, A. R., Meinhardt, S. W., Jones, K. R., and Snozzi, M. (1983) The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: a modified Q-cycle mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 202-218, doi: 10.1016/0005-2728(83)90120-2.
8. Glaser, E. C., and Crofts, A. R. (1984) A new electrogenic step in the ubiquinol: cytochrome c_2 oxidoreductase complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **766**, 322-333, doi: 10.1016/0005-2728(84)90248-2.
9. Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Mamedov, M. D., Samuilov, A. Y., et al. (1986) Effects of electron donors and acceptors on the kinetics of the photoelectric responses in *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodospseudomonas sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 1-9, doi: 10.1016/0005-2728(86)90002-2.
10. Drachev, L. A., Kaurov, B. S., Mamedov, M. D., Mulkidjanian, A. Y., Semenov, A. Y., et al. (1989) Flash-induced electrogenic events in the photosynthetic reaction center and bc_1 complexes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 189-197, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80421-9.
11. Kaminskaya, O. P., and Semenov, A. Yu. (2021) The mechanisms of electrogenic reactions in bacterial photosynthetic reaction centers: Studies in collaboration with Alexander Konstantinov, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1-7, doi: 10.1134/S0006297921010016.
12. Ajiki, S., Toyotama, H., Hara, M., and Miyake, J. (1997) Light-induced electrical response of chromatophore film in semi-wet photocell with an agar layer containing an electron mediator, *Bioelectrochem. Bioenergetics*, **43**, 71-75, doi: 10.1016/S0302-4598(96)05177-X.
13. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Semenov, A. Yu., Severina, I. I., and Skulachev, V. P. (1979) Lipid-impregnated filters as a tool for studying the electric current-generating proteins, *Anal. Biochem.*, **96**, 250-262, doi: 10.1016/0003-2697(79)90580-3.

14. Drachev, L. A., Mamedov, M. D., and Semenov, A. Y. (1987) The antimycin-sensitive electrogenesis in *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores, *FEBS Lett.*, **213**, 128-132, doi: 10.1016/0014-5793(87)81477-1.
15. Seibert, M., and Kendall-Tobias, M. W. (1982) Photoelectrochemical properties of electrodes coated with photoactive-membrane vesicles isolated from photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **681**, 504-511, doi: 10.1016/0005-2728(82)90193-1.
16. Hara, M., Ajiki, S., and Miyake, J. (1998) Topological characterization and immobilization of a chromatophore membrane from *Rhodospseudomonas viridis* for application as a photoelectrical device, *Science*, **5**, 717-721, doi: 10.1016/S0968-5677(98)00111-4.
17. Magis, G. J., Hollander, M.-J., Onderwaater, W. G., Olsen, J. D., Hunter, C. N., et al. (2010) Light harvesting, energy transfer and electron cycling of a native photosynthetic membrane adsorbed onto a gold surface, *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**, 637-645, doi: 10.1016/j.bbame.2009.12.018.
18. Woronowicz, K., Ahmed, S., Biradar, A. A., Biradar, A. V., Birnie, D. P., et al. (2012) Near-IR absorbing solar cell sensitized with bacterial photosynthetic membranes, *Photochem. Photobiol.*, **88**, 1467-1472, doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01190.x.
19. Harrold, J. W., Woronowicz, K., Lamptey, J., Baird, J., Moshar, A., et al. (2013) Functional interfacing of *Rhodospirillum rubrum* chromatophores to a conducting support for capture and conversion of solar energy, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 11249-11259, doi: 10.1021/jp402108s.
20. Vitukhnovskaya, L. A., Zaspas, A. A., Semenov, A. Yu., and Mamedov, M. D. (2023) Conversion of light into electricity in a semi-synthetic system based on photosynthetic bacterial chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1864**, 148975, doi: 10.1016/j.bbabi.2023.148975.
21. Ormerod, J. G., Ormerod, K. S., and Gest, H. (1961) Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; Relationships with nitrogen metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 449-463, doi: 10.1016/0003-9861(61)90073-x.
22. Woronowicz, K., Sha, D., Frese, R. N., and Niederman, R. A. (2011) The accumulation of the light-harvesting 2 complex during remodeling of the *Rhodobacter sphaeroides* intracytoplasmic membrane results in a slowing of the electron transfer turnover rate of photochemical reaction centers, *Biochemistry*, **50**, 4819-4829, doi: 10.1021/bi101667e.
23. Clayton, R. K. (1966) Spectroscopic analysis of bacteriochlorophylls *in vitro* and *in vivo*, *Photochem. Photobiol.*, **5**, 669-677, doi: 10.1111/j.1751-1097.1966.tb05813.x.
24. Garcia, A. F., Venturoli, G., Gad'on, N., Fernandez-Velasco, J. G., Melandri, B. A., and Drews, G. (1987) The adaptation of the electron transfer of *Rhodospseudomonas capsulata* to different light intensities, *Biochim. Biophys. Acta*, **890**, 335-345, doi: 10.1016/0005-2728(87)90161-7.
25. Dutton, P. L., Petty, K. M., Bonner, H. S., and Morse, S. D. (1975) Cytochrome c_2 and reaction center of *Rhodospseudomonas sphaeroides* Ga. membranes. Extinction coefficients, content, half-reduction potentials, kinetics and electric field alterations, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 536-556, doi: 10.1016/0005-2728(75)90092-4.
26. Altamura, E., Albanese, P., Marotta, R., Milano, F., Fiore, M., et al. (2021) Chromatophores efficiently promote light-driven ATP synthesis and DNA transcription inside hybrid multicompartiment artificial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2012170118, doi: 10.1073/pnas.2012170118.
27. Palazzo, G., Mallardi, A., Giustini, M., Monica, M. D., and Venturoli, G. (2000) Interactions of photosynthetic reaction center with 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone in reverse micelles, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 4624-4629, doi: 10.1039/b003905p.
28. Friebe, V. M., Swainsbury, D. J. K., Fyfe, P. K., Heijden, W. V. D., Jones, M. R., and Frese, R. N. (2016) On the mechanism of ubiquinone mediated photocurrent generation by a reaction center based photocathode, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 1925-1934, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.09.011.
29. Yaghoubi, H., Li, Z., Jun, D., Saer, R., and Slota, J. E. (2012) The role of gold-adsorbed photosynthetic reaction centers and redox mediators in the charge transfer and photocurrent generation in a bio-photoelectrochemical cell, *J. Phys. Chem. C*, **116**, 24868-24877, doi: 10.1021/jp306798p.
30. Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., and Pinelo, M. (2018) A general overview of support materials for enzyme immobilization. Characteristics, properties, practical utility, *Catalysts*, **8**, 92, doi: 10.3390/catal8020092.
31. Imam, H. T., Marr, P. C., and Marr, A. C. (2021) Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment, *Green Chem.*, **23**, 4980-5005, doi: 10.1039/D1GC01852C.
32. Grattieri, M., Rhodes, Z., Hickey, D. P., Beaver, K., and Minter, S. D. (2019) Understanding bio-photocurrent generation in photosynthetic purple bacteria, *ACS Catal.*, **9**, 867-873, doi: 10.1021/acscatal.8b04464.
33. Zaspas, A. A., Vitukhnovskaya, L. A., Mamedova, A. M., Semenov, A. Y., and Mamedov, M. D. (2020) Photovoltage generation by photosystem II core complexes immobilized onto a Millipore filter on an indium tin oxide electrode, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **52**, 495-504, doi: 10.1007/s10863-020-09857-1.
34. Zaspas, A., Vitukhnovskaya, L., Mamedova, A., Allakhverdiev, S. I., Semenov, A., and Mamedov, M. D. (2022) Voltage generation by photosystem I

- complexes immobilized onto a millipore filter under continuous illumination, *Int. J. Hydrogen Energy*, **47**, 11528–11538, doi: 10.1016/j.ijhydene.2022.01.175.
35. Jackson, J. B., and Crofts, A. R. (1971) The kinetics of light induced carotenoid changes in rhodopseudomonas spheroides and their relation to electrical field generation across the chromatophore membrane, *Eur. J. Biochem.*, **18**, 120–130, doi: 10.1111/j.1432-1033.1971.tb01222.x.
 36. Michels, P., Hellingwerf, K. J., Lolkema, J. S., Friedberg, I., Konings, W. N. (1981) Effects of the medium composition on the components of the electrochemical proton gradient in *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Arch. Microbiol.*, **130**, 357–361, doi: 10.1007/BF00414600.
 37. Mamedov, M. D., Nosikova, E. S., Vitukhnovskaya, L. A., Zaspas, A. A., and Semenov, A. Yu. (2018) Influence of the disaccharide trehalose on the oxidizing side of photosystem II, *Photosynthetica*, **56**, 236–243, doi: 10.1007/s11099-017-0750-z.
 38. Mobius, K., Savitsky, A., Malferrari, M., Francia, F., Mamedov, M., et al. (2020) Soft dynamic confinement of membrane proteins by dehydrated trehalose matrices: high-field EPR and fast-laser studies, *Appl. Magn. Reson.*, **50**, 773–850, doi: 10.1007/s00723-020-01240-y.
 39. Simongini, M., Puglisi, A., Genovese, F., and Hochkoeppler, H. (2023) Trehalose counteracts the dissociation of tetrameric rabbit lactate dehydrogenase induced by acidic pH conditions, *Arch. Biochem. Biophys.*, **740**, 109584, doi: 10.1016/j.abb.2023.109584.
 40. Tang, M., Waring, A. J., and Hong, M. (2007) Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion, *J. Magn. Reson.*, **184**, 222–227, doi: 10.1016/j.jmr.2006.10.006.
 41. De Moura Torquato, L. D., and Grattieri, M. (2022) Photobioelectrochemistry of intact photosynthetic bacteria: advances and future outlook, *Curr. Opin. Electrochem.*, **34**, 101018, doi: 10.1016/j.coelec.2022.101018.

GENERATION OF ELECTRIC POTENTIAL DIFFERENCE BY CHROMATOPHORES FROM PHOTOSYNTHETIC BACTERIA IN THE PRESENCE OF TREHALOSE UNDER CONTINUOUS ILLUMINATION

L. A. Vitukhnovskaya^{1,2}, A. A. Zaspas¹, and M. D. Mamedov^{1*}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: mahirmamedov@yandex.ru

² Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia

Measurement of the electrical potential difference ($\Delta\psi$) in membrane vesicles (chromatophores) from the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, associated with the surface of a nitrocellulose membrane filter (MF), impregnated with phospholipid solution in decane, as well as immersed inside it, in the presence of exogenous mediators and disaccharide trehalose, demonstrated an increase in the amplitude and stabilization of the signal under continuous illumination. The ascorbate/N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine pair and ubiquinone-0 were used as mediators (electron donor and acceptor), respectively. Although the stabilization of photoelectric responses under long-term continuous illumination was observed in both cases of immobilization of chromatophores, only when the samples were immersed inside the MF, the functional activity of the reaction centers was maintained for a month when they were stored in the dark at room temperature. Stable photoresponses are probably associated with the preservation of the integrity of chromatophore proteins inside MF pores. The stabilizing effect of the bioprotector trehalose may be due to both its effect on RC proteins and on the phospholipid bilayer membrane. The results obtained will expand modern ideas about the use of semi-synthetic structures based on various intact photosynthetic systems capable of converting solar energy into an electrochemical form.

Keywords: chromatophores, reaction center, cytochrome *bc_L* complex, membrane filter, semiconductor, continuous illumination, electrical potential

ЭЛЕКТРОННЫЙ ТРАНСПОРТ В ХЛОРОПЛАСТАХ: РЕГУЛЯЦИЯ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Обзор

© 2023 А.Н. Тихонов

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
физический факультет, кафедра биофизики,
119991 Москва, Россия; электронная почта: an_tikhonov@mail.ru

Поступила в редакцию 21.06.2023

После доработки 09.07.2023

Принята к публикации 10.07.2023

Работа посвящена обзору механизмов регуляции электронного транспорта в хлоропластах в контексте структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата растений. Основное внимание уделено окислению пластохинола цитохромным b_6f -комплексом – лимитирующей стадии переноса электронов между фотосистемами 2 и 1. Кратко описаны процессы электронного транспорта по цепям нециклического, циклического и псевдоциклического транспорта электронов, их связь с созданием *транс*-тилакоидной разности электрохимических потенциалов ионов водорода в хлоропластах, обсуждаются механизмы pH-зависимой регуляции функционирования цитохромного b_6f -комплекса. Рассмотрены процессы электронного переноса, связанные с участием альтернативных редокс-медиаторов – молекулярного кислорода (O_2) и аскорбата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосинтез, хлоропласты, электронный транспорт, регуляция.

DOI: 10.31857/S0320972523100032, **EDN:** OSOXVT

ВВЕДЕНИЕ

Оксигенный фотосинтез – важнейший процесс в биосфере Земли, который обеспечивает выделение молекулярного кислорода (O_2) и фиксацию CO_2 за счет энергии солнечного света, поглощаемого светособирающими пигментами растений, водорослей и цианобактерий. Фотосинтетический аппарат этих организмов содержит две фотосистемы (ФС) – пигмент-белковые комплексы ФС1 и ФС2, цитохромный комплекс b_6f и АТФ-синтазный комплекс CF_0 – CF_1 , катализирующий образование АТФ из АДФ и ортофосфата P_i . Перенос двух электронов от водоокисляющего комплекса ФС2 к $NADP^+$ (терминальный акцептор электронов в ФС1) обеспечивает восстановление $NADP^+$ до $NADPH$. АТФ и $NADPH$ –

макроэргические продукты «световых стадий» фотосинтеза – используются в реакциях цикла Кальвина–Бенсона (ЦКБ) для фиксации CO_2 [1, 2].

Структурно-функциональная организация фотосинтетического аппарата растений хорошо изучена [3–21]. В то же время остаются нерешенными некоторые проблемы, связанные с регуляцией фотосинтетических процессов и акклимацией фотосинтетического аппарата к изменяющимся условиям среды. В настоящем обзоре кратко рассмотрены структурная организация фотосинтетического аппарата окислительных организмов и основные механизмы регуляции электронного и протонного транспорта, обеспечивающие высокую эффективность преобразования световой энергии в хлоропластах. В первой части статьи описаны

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ФС1 и ФС2 – фотосистема 1 и фотосистема 2; ЦКБ – цикл Кальвина–Бенсона; ЦЭТ – циклический электронный транспорт; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; Asc, MDHA, DHA – три редокс-формы аскорбата (полностью восстановленная, семихинонная и полностью окисленная); ISP – железосерный белок, входящий в ФС1; Fd – ферредоксин; FNR – ферредоксин-NADP-редуктаза; NDH-1 – NAD(P)H-дегидрогеназа хлоропластов типа 1; P_{700} и P_{680} – первичные доноры электрона в ФС1 и ФС2; Pс – пластоцианин; PGR5 и PGRL1 – белки, участвующие в циклическом переносе электронов вокруг ФС1; PQ – пластохинон; QH_2 – пластохинол; PTOX – терминальная оксидаза хлоропластов.

процессы нециклического, циклического и псевдоциклического переноса электронов, их роль в создании *транс*-тилакоидной разности электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$), а также обсуждаются механизмы рН-зависимой регуляции функционирования цитохромного комплекса b_6f хлоропластов. Во второй части рассмотрены процессы, связанные с участием молекулярного кислорода (O_2) и аскорбата (Asc) в качестве медиаторов переноса электронов в хлоропластах.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ. ЦЕПЬ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА

У растений процессы светоиндуцированного транспорта электронов и трансмембранного переноса протонов протекают в хлоропластах — энергопреобразующих органеллах растительной клетки [18–21]. Хлоропласт отделен от цитоплазмы оболочкой, которая состоит из двух близлежащих мембран — наружной и внутренней. Под оболочкой, в строме, находятся мембраны ламелл. В нормальных физиологических условиях из ламелл формируются граны, представляющие собой стопки уплощенных и тесно прижатых друг к другу замкнутых везикул (тилакоидов), имеющих форму сплюснутых дисков диаметром ~350–600 нм. Продолжением отдельных тилакоидов гран являются обращенные в строму межгранные тилакоиды. Тилакоидные мембраны плотно заполнены белковыми комплексами, которые составляют ~70–80% от общей массы мембран. В тилакоидные мембраны встроены пигмент-белковые электрон-транспортные комплексы. В строме содержатся молекулы РНК, ДНК, рибосомы, крахмальные зерна, а также ферменты, которые обеспечивают усвоение CO_2 растениями в ЦКБ.

Схема, иллюстрирующая взаимодействие электрон-транспортных комплексов, показана на рис. 1. Энергия квантов света, поглощаемых пигментами светособирающих антенн ФС1 и ФС2, мигрирует к реакционным центрам, в которых происходит разделение зарядов и инициируется перенос электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) [6–17]. Согласованное функционирование ФС1 и ФС2 обеспечивает окисление воды в водоокисляющем комплексе ФС2 ($2H_2O \rightarrow O_2 + 4e^- + 4H^+$) и восстановление $NADP^+$ до NADPH за счет работы ФС1 ($NADP^+ + 2e^- + H^+ \rightarrow NADPH$). Цитохром-

ный b_6f -комплекс и мобильные переносчики электрона — пластохинол (PQH_2) и пластоцианин (Pc) — обеспечивают связь между встроенными в мембрану малоподвижными белковыми комплексами ФС2 и ФС1.

Перенос электронов сопряжен с генерацией *транс*-тилакоидной разности электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$). В результате разложения воды водоокисляющим комплексом ФС2 и за счет работы b_6f -комплекса происходит защелачивание стромы и накопление ионов водорода в люмене. Тилакоидные мембраны имеют сравнительно низкую проницаемость для ионов водорода и заряженных молекул. Они способны поддерживать $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, благодаря чему встроенные в них АТР-синтазные комплексы (CF_0 — CF_1) обеспечивают образование АТР из АДФ и ортофосфата P_i [3–5]. В хлоропластах основной вклад в генерацию $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ вносит разность рН, $\Delta pH = pH_{out} - pH_{in}$, где pH_{out} и pH_{in} — значения рН стромы и люмена [22, 23].

Фотосистема 2 (ФС2) функционирует как оксидоредуктаза, окисляющая воду и восстанавливающая пластохинон (PQ) до пластохинола (PQH_2) [6, 7, 9–11]. В фотореакционных центрах ФС2 энергия от возбужденных светособирающих пигментов мигрирует к первичному донору электронов, который представляет собой ансамбль из четырех молекул хлорофилла *a* ($Chl_{D1}/P_{D1}/P_{D2}/Chl_{D2}$). Первичный донор электрона, известный как P_{680} , передает электрон феофитину (Phe) через хлорофилл Chl_{D1} , от которого он поступает к пластохинону PQ_A , прочно связанному с ФС2 ($P_{680}^* \rightarrow Chl_{D1} \rightarrow Phe_A \rightarrow PQ_A$). PQ_A^- восстанавливает вторую молекулу пластохинона PQ_B ($PQ_A PQ_B \rightarrow PQ_A PQ_B^-$). После присоединения к PQ_B^- второго электрона и протонирования PQ_B^{2-} за счет ионов водорода стромы ($PQ_B^{2-} + 2H_{out}^+ \rightarrow PQ_B H_2$) молекула PQH_2 диссоциирует в липидную фазу мембраны, а ее место занимает другая окисленная молекула PQ ($PQ_B H_2 + PQ \rightarrow PQ_B + PQH_2$). Дальнейший перенос электронов по ЭТЦ включает диффузию PQH_2 к цитохромному b_6f -комплексу (пластохинол-пластоцианин оксидоредуктаза). В этом комплексе происходит двухэлектронное (бифуркационное) окисление PQH_2 до PQ, приводящее к восстановлению Cyt *f*, восстанавливающего затем Pc, который служит донором электрона для ФС1. Два иона водорода, поглощенные из стромы при образовании PQH_2 ($PQ + 2e^- + 2H_{out}^+ \rightarrow PQH_2$), выделяются в люмен при окислении PQH_2 цитохромным комплексом b_6f .

Фотосистема 1 (ФС1). У растений ФС1 — это мономерный комплекс, включающий в себя

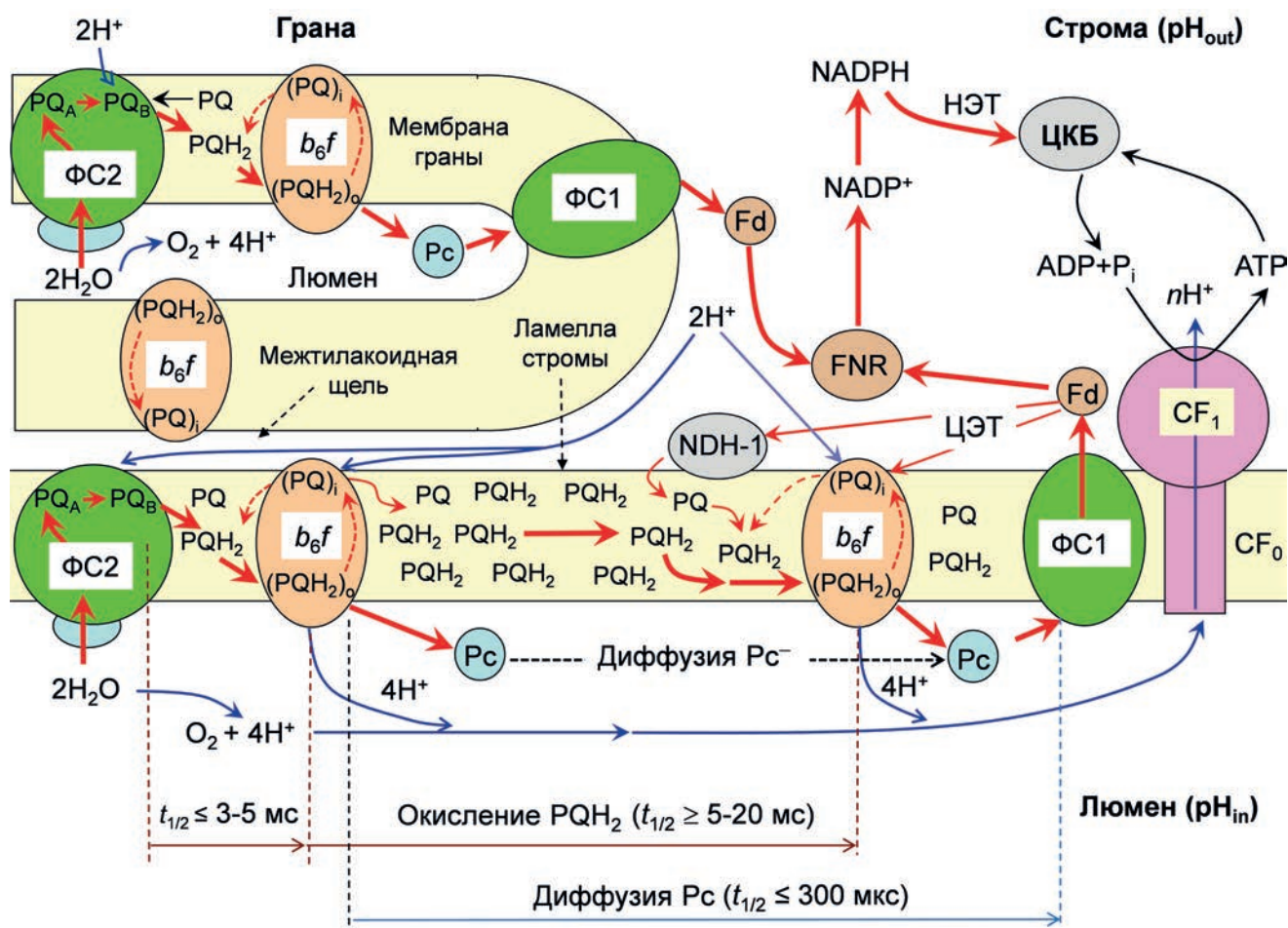


Рис. 2. Схема расположения электрон-транспортных комплексов в мембранах тилакоидов гран и межграных тилакоидов, экспонированных в строму. Стрелками, обозначенными символами НЭТ, ЦЭТ-1 и ЦЭТ-2, показаны разные участки переноса электронов на акцепторной стороне ФЦ1. НЭТ означает нециклический перенос электронов, связанный с восстановлением NADP^+ . ЦЭТ-1 — путь циклического переноса электронов вокруг ФЦ1, предполагающий участие в этом процессе белков PGR5 и PGRL1, ассоциированных с цитохромным b_6f -комплексом. ЦЭТ-2 — циклический перенос электронов с помощью NADP-дегидрогеназного комплекса типа 1 (NDH-1)

тронный транспорт, ЦЭТ), когда электрон от Fd возвращается в пластохиноновый пул хлоропластов [24–31]. На рис. 2 показаны возможные пути ЦЭТ, по которым электроны с акцепторной стороны ФЦ1 возвращаются в пул молекул пластохинона. Один из них предполагает участие в ЦЭТ гипотетического белка FQR (ферредоксин-хинон редуктаза), существование которого было постулировано ранее [24]. В настоящее время имеются веские основания считать, что роль FQR выполняют белки PGR5 и PGRL1, ассоциированные с цитохромным b_6f -комплексом [28–30]. Кроме этого, возможен перенос электрона от восстановленного Fd к пластохиноновому пулу с участием минорного NADPH-дегидрогеназного комплекса типа 1 (NDH-1), образующего суперкомплекс с ФЦ1 [31–35].

Окисление пластохинола в цитохромном b_6f -комплексе. Q-цикл. Цитохромный ком-

плекс b_6f — связующее звено в цепи электронного транспорта, обеспечивающее взаимодействие между ФЦ2 и ФЦ1. Окисление PQH_2 комплексом b_6f — самая медленная стадия в цепи переноса электронов от ФЦ2 к ФЦ1 [36–41]. Лимитирующим звеном на этом участке ЭТЦ является оборот пластохинона ($\text{PQ} \rightarrow \text{PQH}_2 \rightarrow \text{PQ}$), включающий в себя образование PQH_2 в ФЦ2 и взаимодействие PQH_2 с b_6f -комплексом. Экспериментально доказано, что в широком диапазоне условий (pH, температура) восстановление PQ до PQH_2 в ФЦ2 и его диффузия в мембране к b_6f -комплексу происходят быстрее, чем непосредственное окисление PQH_2 внутри цитохромного комплекса [37, 38, 40, 41].

Цитохромный b_6f -комплекс организован как димерный комплекс, состоящий из двух одинаковых белковых фрагментов [12–17, 42]. Окисление PQH_2 происходит в хинол-свя-

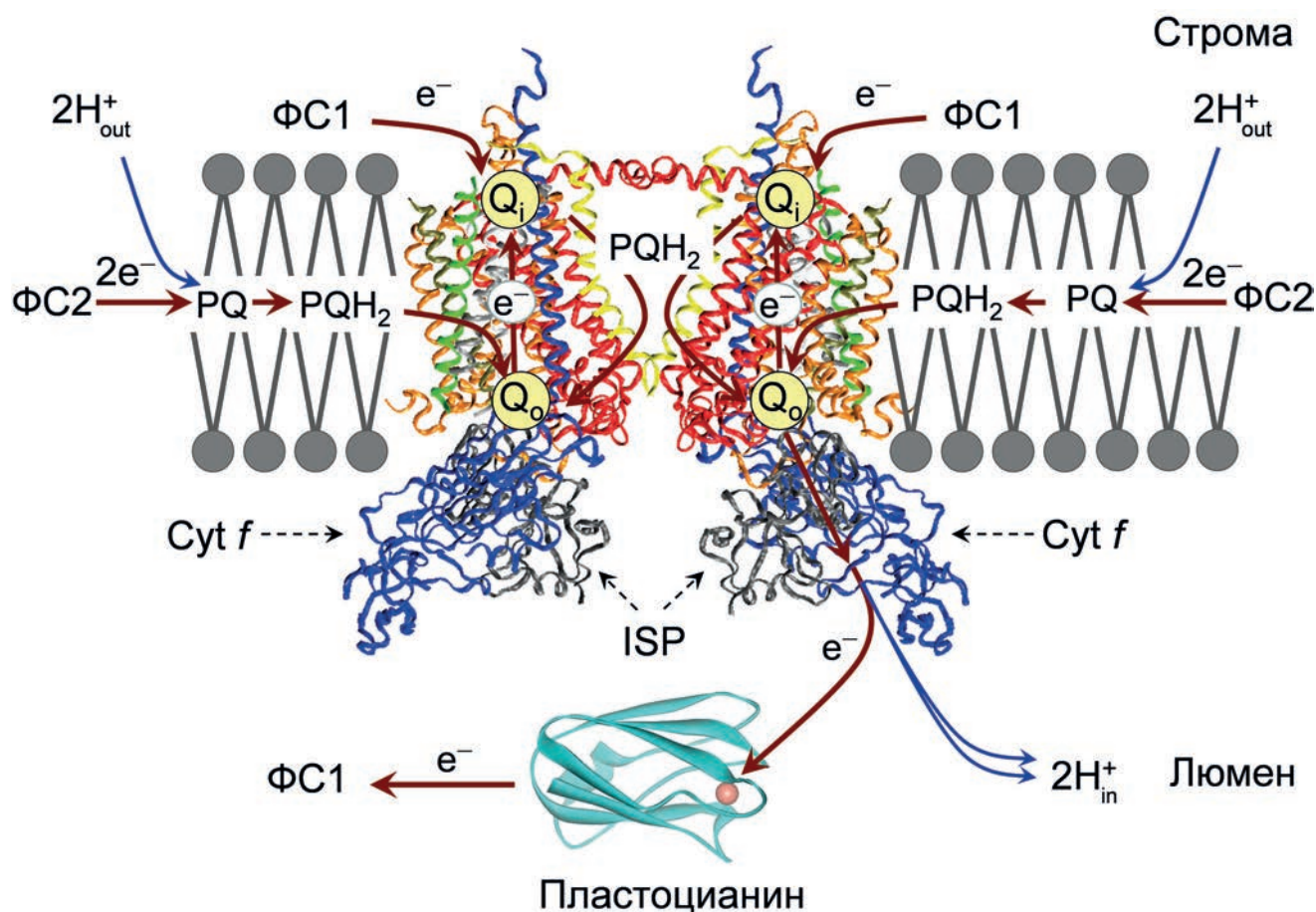


Рис. 3. Димерный цитохромный комплекс b_6f . Изображение построено с помощью программы Accelrys DV visualizer software package (<http://www.accelrys.com>) по данным PDB (код 1Q90)

зывающих центрах димерного комплекса (рис. 3, каталитические сайты Q_0). Каждый из Q_0 -центров расположен около люменальной стороны тилакоидной мембраны, между низкопотенциальным гемом b_L и кластером Fe_2S_2 высокопотенциального белка (ISP), называемого часто белком Риск. Каталитические функции мономеров осуществляются за счет четырех окислительно-восстановительных центров: Fe_2S_2 -кластер ISP, двух гемов цитохрома b_6 (b_L и b_H) и цитохрома f . Согласно механизму Q-цикла Митчелла [42–46], окисление PQH_2 имеет бифуркационный характер; два электрона, донируемых молекулой PQH_2 , переносятся по разным цепям: один электрон поступает к окисленному Fe_2S_2 -кластеру ISP, второй электрон переносится на низкопотенциальный гем b_L . При этом два протона, переносимые молекулой PQH_2 , диссоциируют в люмен. В высокопотенциальной цепи переноса электрона ISP окисляется гемом f , от которого электрон поступает к пластоцианину и далее к окисленному центру P_{700}^+ ($ISP \rightarrow f \rightarrow Pc \rightarrow P_{700}^+$). Второй электрон, дони-

руемый PQH_2 , переносится по *низкопотенциальной* цепи b_6f -комплекса, включающей в себя два гема цитохрома b_6 и гем c_n . Этот электрон поступает к молекуле PQ, находящейся в центре Q_i ($b_L \rightarrow b_H \rightarrow PQ$). Согласно модели модифицированного Q-цикла, второй электрон поступает в центр Q_i от акцепторного участка ФС1. После 2-кратного восстановления PQ и присоединения двух протонов из стромы ($PQ + 2e^- + 2H_{out}^+ \rightarrow PQH_2$) восстановленная молекула PQH_2 диссоциирует из центра Q_i и возвращается в каталитический центр Q_0 (см. подробнее [12–17, 42–45]). В итоге получается, что в расчете на один электрон, переносимый в ЦКБ от ФС1 ($ФС1 \rightarrow NADP^+$), внутрь тилакоида переносятся два протона ($H^+/e^- = 2$) [46].

Диффузия пластоцианина в люмене. Цитохромный комплекс восстанавливает молекулу Рс. Диффундируя внутри люмена, Pc^- переносит электрон к ФС1. Диффузия Pc^- и его окисление за счет ФС1 происходят быстрее (при комнатных температурах $\tau_{1/2} < 300$ мкс), чем диффузия PQH_2 от ФС2 к b_6f -комплексу и взаимодействие PQH_2 с b_6f -комплексом

($\tau_{1/2} \geq 4-20$ мс) [36–41]. При определенных условиях (например, в хлоропластах, адаптированных к темноте) стерические ограничения могут препятствовать перемещению молекул Pc^- внутри узкого ($\sim 4-5$ нм) просвета люмена [47]. Ширина просвета люмена может увеличиваться при освещении хлоропластов, поэтому латеральная диффузия Pc^- в люмене перестает лимитировать перенос электронов от b_6f -комплексов к ФС1 [47].

Наряду с описанными выше процессами в хлоропластах могут происходить альтернативные реакции электронного переноса, среди которых особая роль принадлежит так называемому псевдоциклическому переносу электронов, когда конечным акцептором электронов, донируемых ФС1, служит молекулярный кислород (реакция Мелера [48–51]). Восстановление O_2 до воды может также катализироваться терминальной оксидазой хлоропластов (РТОХ), окисляющей RQH_2 [52–56]. Следует отметить, что содержание РТОХ в зрелых тилакоидах очень низкое — всего лишь один комплекс на 100 ФС2 [57]. Содержание NDH-1 примерно в 3 раза меньше, чем содержание РТОХ [57, 58].

В метаболизме растительной клетки также особую роль играют редокс-реакции с участием аскорбата, которые обеспечивают детоксикацию активных форм кислорода (АФК) [59]. Альтернативные пути переноса электронов подробнее рассмотрены ниже.

ЛАТЕРАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ТИЛАКОИДНЫХ МЕМБРАН И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Фотосинтетические белковые комплексы неравномерно распределены между тилакоидами гран и межгранными тилакоидами [18–21, 60–63]. Тилакоиды гран обогащены комплексами ФС2; большинство ФС1 и АТР-синтазных комплексов сосредоточено в межгранных тилакоидах, на краях и торцах гран, экспонированных в строму. Цитохромные комплексы распределены приблизительно равномерно вдоль ламеллярных мембран, из которых формируются тилакоиды гран и стромы [60–63]. Неоднородное распределение комплексов обусловлено стерическими ограничениями — АТР-синтазы и комплексы ФС1 имеют белковые фрагменты, значительно выступающие за пределы мембраны, что препятствует компактному расположению этих комплексов в тес-

но прижатых друг к другу тилакоидах гран. С латеральной гетерогенностью тилакоидных мембран можно связать структурно-функциональные свойства тилакоидов. Цитохромные комплексы, локализованные в гранальных и стромальных областях, могут участвовать в переносе электронов по разным путям: «гранальные» b_6f -комплексы функционируют в цепи нециклического («линейного») переноса электронов от ФС2 к ФС1 и далее к $NADP^+$ ($ФС2 \rightarrow PQ \rightarrow b_6f \rightarrow Pc \rightarrow ФС1 \rightarrow NADP^+$), «стромальные» комплексы могут быть включены в цепь циклического переноса электронов вокруг ФС1 ($ФС1 \rightarrow Fd \rightarrow PQ \rightarrow b_6f \rightarrow Pc \rightarrow ФС1$).

Взаимодействие между малоподвижными удаленными белковыми комплексами обеспечивается за счет диффузии подвижных электронных переносчиков — пластохинона и пластоцианина. Высокая плотность белковых комплексов в тилакоидной мембране ограничивает подвижность пластохинона, а также стерические ограничения, затрудняющие движение пластоцианина в узкой щели люмена, могут ограничивать скорости диффузионно-контролируемых стадий электронного переноса [64]. Отметим, что, несмотря на стерические ограничения, диффузия RQH_2 в тилакоидной мембране не лимитирует скорость переноса электронов между фотосистемами. Как уже было сказано выше, в широком диапазоне экспериментальных условий (рН, температура) образование RQH_2 в ФС2 и его диффузия происходят быстрее, чем непосредственное окисление RQH_2 после его проникновения в каталитический центр Q_o цитохромного b_6f -комплекса [37, 38]. Несмотря на то что многие комплексы ФС2 и ФС1 удалены друг от друга, значительная часть b_6f -комплексов, расположенных в гранах, находится вблизи от ФС2. Близкое расположение этих комплексов минимизирует среднее расстояние, которое проходят молекулы пула пластохинона, обеспечивая быстрый обмен между молекулами RQH_2 и PQ , образующимися в результате работы ФС2 (восстановленные молекулы RQH_2) и b_6f -комплекса (окисленные молекулы PQ). Таким образом, за счет высокой подвижности пластохинола в мембране и быстрой диффузии Pc в люмене [38, 40] обеспечивается эффективный перенос электронов от ФС2 к ФС1 и далее к $NADP^+$ (нециклический электронный транспорт).

Цитохромные b_6f -комплексы, находящиеся в межгранных тилакоидах рядом с комплексами ФС1, могут быть непосредственно включены в цепь циклического электронного транспорта вокруг ФС1. Эффективному функцио-

нированию ЦЭТ может способствовать образование суперкомплекса из электрон-транспортных комплексов b_6f и ФС1 [27]. Возможны различные пути ЦЭТ. В качестве медиаторов электронного переноса, участвующих в работе ЦЭТ, служат белки PGR5 и PGRL1, функционирующие совместно с b_6f -комплексом [28–30].

Другой путь ЦЭТ вокруг ФС1 реализуется с помощью минорного NAD(P)H-дегидрогеназного комплекса типа 1, являющегося аналогом подобного комплекса в митохондриях [31–33]. NDH-1 выполняет роль оксидоредуктазы, окисляющей ферредоксин и восстанавливающей пластохинон [34, 35]. Электронный транспорт по ЦЭТ вокруг ФС1 сопряжен с созданием $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ и, соответственно, может обеспечивать синтез АТФ. При этом, однако, не происходит восстановления $NADP^+$. Сосуществование линейного и циклического потоков электронов позволяет поддерживать стехиометрию между молекулами АТФ и NADPH, необходимую для оптимального функционирования ЦКБ (АТФ/NADPH = 3/2) [1, 2].

Распределение b_6f -комплексов между тилакоидами гран и межгранными тилакоидами зависит от функционального состояния фотосинтетического аппарата. Изменения архитектуры хлоропластов может приводить к перераспределению электронных потоков между нециклическим и циклическим потоками. Латеральное перемещение части b_6f -комплексов из гран в стромальные области тилакоидных мембран должно способствовать увеличению относительного вклада ЦЭТ в работу хлоропластов. Предполагается, что такое перераспределение b_6f -комплексов может происходить, например, за счет светоиндуцированных изменений расстояния между прилегающими друг к другу соседними тилакоидами гран [65].

Две изоформы ферредоксина и альтернативные потоки электронов. С учетом локализации b_6f -комплексов в разных областях хлоропластов представляют интерес данные о существовании нескольких изоформ ферредоксина (как минимум двух фракций — минорной (Fd1) и основной (Fd2)), которые незначительно различаются по физико-химическим (например, по значениям стандартных редокс-потенциалов) и некоторым функциональным свойствам [66–70]. Белки Fd1 и Fd2 имеют близкие аминокислотные последовательности, но в хлоропластах СЗ-растений они присутствуют в разных количествах. Например, у арабидопсиса и гороха фракции Fd1 и Fd2 составляют соответственно 10% и 90% от общего пула молекул ферредоксина [66]. Соотношение между

фракциями зависит от условий акклимации растений: у растений, выращиваемых на слабом свете, практически не наблюдается экспрессии Fd1; в условиях, стимулирующих ЦЭТ (высокая интенсивность света, засуха), экспрессия Fd1 значительно возрастает [68, 69].

В качестве примера, иллюстрирующего различие в функционировании Fd1 и Fd2, рассмотрим результаты опытов с хлоропластами бобов класса Б (хлоропласты с нарушенной внешней мембраной, лишенные ферредоксина), воспроизведенные на рис. 4 с использованием кинетических данных работы Гинс и соавт. [70]. В этих хлоропластах сохранялась связанная с мембраной ферредоксин-NADP-редуктаза, но терялись находившиеся в строме молекулы ферредоксина. Добавление $NADP^+$ — физиологического акцептора электронов — не сказывалось на кинетике электронного переноса, оцениваемой по светоиндуцированным изменениям сигнала электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) от окисленных центров P_{700}^+ [70]. Обе формы ферредоксина, Fd1 и Fd2, проявляли активность в качестве медиаторов переноса электронов. В обоих случаях дальний красный свет ($\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм), возбуждающий преимущественно ФС1, вызывал заметное окисление P_{700} . Однако при действии белого света (БС), возбуждающего обе фотосистемы, добавление Fd1 или Fd2, взаимодействующих с FNR, влияло на кинетику редокс-превращений P_{700} разным образом. Fd2 более эффективно катализировал «линейный» перенос электрона от ФС1 к FNR и далее к $NADP^+$. Об этом свидетельствует тот факт, что в присутствии Fd2 белый свет вызывал более сильный рост сигнала ЭПР от P_{700}^+ (рис. 4, параметр В), чем в случае добавления Fd1. Fd1 проявлял заметную активность в качестве электронного переносчика в цепи ЦЭТ вокруг ФС1. В присутствии Fd1 интенсивность сигнала от P_{700}^+ при действии белого света была меньше, чем в случае Fd2. Такое различие могло быть обусловлено ускорением оттока электронов от ФС1 к $NADP^+$ за счет Fd2, а также тем, что Fd1 катализирует циклический перенос электронов вокруг ФС1, возвращая электроны к ФС1, тем самым уменьшая концентрацию P_{700}^+ . Было также показано, что добавление антимицина — ингибитора ЦЭТ — ускоряло фотоокисление P_{700} . Эффект антимицина заметнее проявлялся в случае Fd1, чем Fd2. Это указывает на более высокую активность Fd1 в качестве медиатора ЦЭТ вокруг ФС1. В литературе высказывалось предположение, что варьирование экспрессии разных изоформ Fd

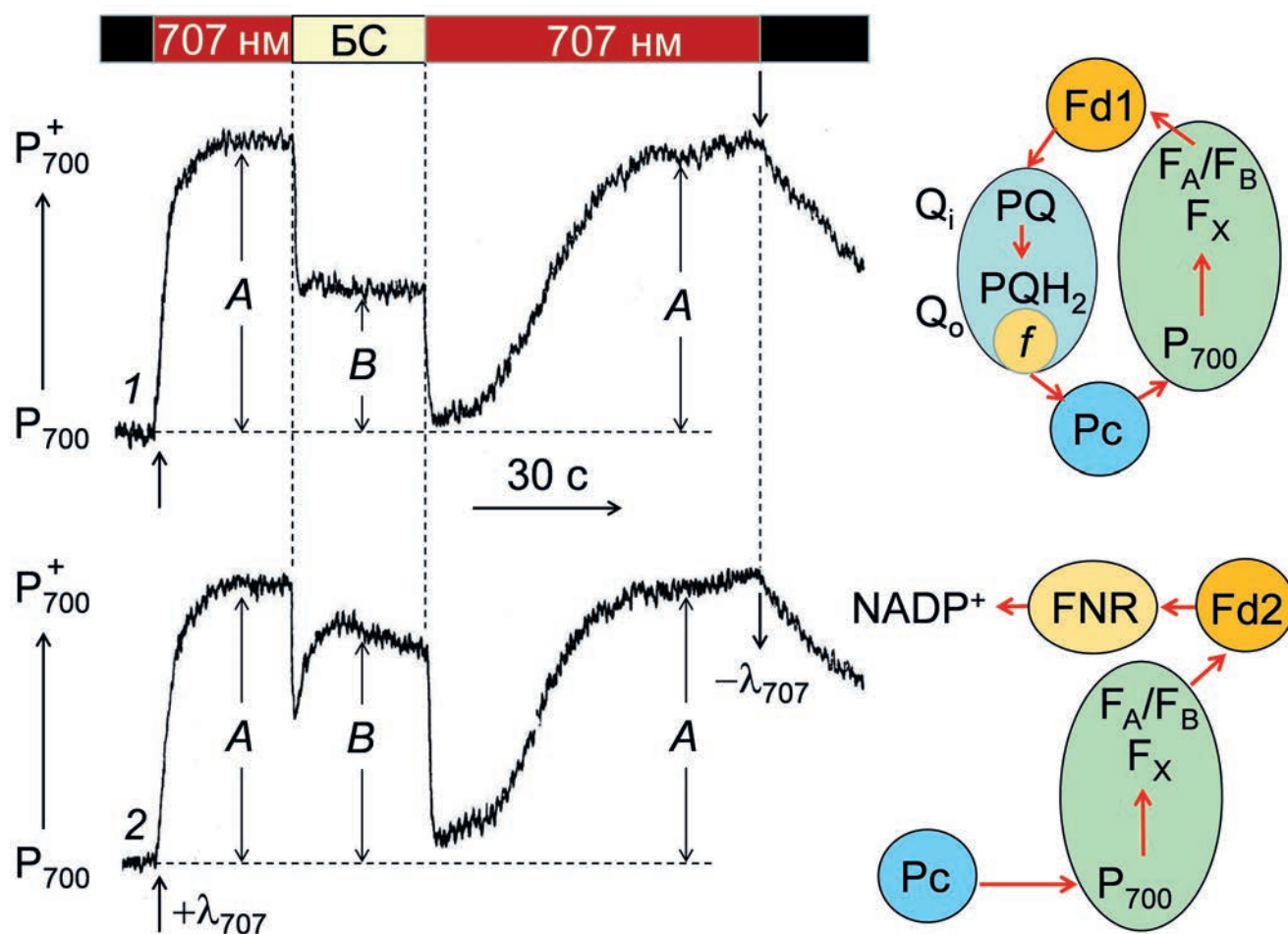


Рис. 4. Влияние двух изоформ ферредоксина гороха, Fd1 и Fd2, на кинетику изменений величины сигнала ЭПР от P_{700}^+ в изолированных хлоропластах бобов (*Vicia faba*) класса Б, индуцированных действием дальнего красного ($\lambda_{\text{макс}} = 707 \text{ нм}$) и белого света (БС) в присутствии 2 мМ NADP^+ . Добавки ферредоксина: 1 – 60 мкМ Fd1, 2 – 60 мкМ Fd2. Рисунок построен с использованием кинетических кривых, приведенных в работе [70]

позволяет растениям оптимизировать использование солнечной энергии и избегать избыточного восстановления переносчиков цепи электронного транспорта при неблагоприятных условиях внешней среды [68, 69].

РЕГУЛЯЦИЯ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА НА УРОВНЕ b_6f -КОМПЛЕКСА

Стадия окисления PQH_2 , лимитирующая перенос электронов между ФС2 и ФС1. Имеются доказательства, что в широком диапазоне экспериментальных условий (рН, температура) лимитирующей стадией переноса электронов между ФС2 и ФС1 является не диффузия PQH_2 от ФС2 к b_6f -комплексу, а перенос электрона от PQH_2 к Fe_2S_2 -кластеру белка Риске, происходящий после образования комплекса между PQH_2 и ISP. Этот вывод, сделанный ранее на основании исследования кинетики редокс-

превращений P_{700} в хлоропластах шпината и бобов [37, 38], недавно получил дополнительное подтверждение в опытах на мутантах арабидопсиса, у которых диаметр гран варьировал в широких пределах (от 370 до 1600 нм). В работе Hühner et al. [40] было показано, что во всех случаях характерное время образования PQH_2 в ФС2 и его диффузии к b_6f -комплексу составляло $\sim 3,2 \div 3,6 \text{ мс}$. Это время существенно меньше общего времени окисления PQH_2 , независимо от диаметра гран. Данные результаты убедительно доказывают, что именно окисление PQH_2 в каталитическом центре Q_o , а не диффузия PQH_2 в тилакоидной мембране, является стадией, лимитирующей перенос электронов от ФС2 к b_6f -комплексу [37, 38].

После восстановления ISP его подвижный домен, содержащий Fe_2S_2 -кластер, смещается к цитохрому f и передает электрон гему f . От цитохрома f электрон переносится к Рс. После окисления ISP его мобильный домен

возвращается в исходное положение. Движение мобильного домена не лимитирует общую скорость переноса электрона: значительные смещения редокс-центра ISP происходят быстро по сравнению со скоростью окисления PQH_2 кластером Fe_2S_2 . При комнатных температурах перенос электронов от ISP_{red} к $\text{Cyt } f$ протекает с характерным временем $\approx 2\text{--}4$ мс [71, 72], которое меньше времени полуокисления PQH_2 и восстановления цитохрома f ($\tau_{1/2} \geq 5\text{--}20$ мс [36–41]). Это означает, что скорость окисления PQH_2 определяется в основном стадией переноса электрона от PQH_2 к окисленному Fe_2S_2 -кластеру после образования субстрат-ферментного комплекса $\text{PQH}_2\text{--ISP}_{\text{ox}}$.

pH-Зависимая регуляция электронного переноса в хлоропластах. Известны два основных механизма pH-зависимого торможения электронного переноса между ФС2 и ФС1, обусловленные уменьшением pH люмена (pH_{in}): 1) замедление окисления PQH_2 цитохромным b_6f -комплексом [12–15, 73–76] и 2) ослабление фотохимической активности ФС2 за счет явления, известного как нефотохимическое тушение (НФТ) возбуждения хлорофилла [77–79]. Влияние pH_{in} на скорость окисления PQH_2 происходит по механизму отрицательной обратной связи: окисление PQH_2 сопровождается выделением протонов в люмен, закисление люмена ($\text{pH}_{\text{in}} \downarrow$) тормозит окисление PQH_2 . Согласно модели «proton-gated» [80, 81], депротонирование PQH_2 стимулирует перенос электрона на окисленный белок Риске (ISP_{ox}); замедление депротонирования PQH_2 при понижении pH_{in} должно тормозить окисление PQH_2 . Имеются все основания считать, что от PQH_2 протон переносится к гистидиновому остатку ISP, являющегося лигандом для одного из ионов Fe кластера Fe_2S_2 , и это происходит одновременно с переносом электрона к Fe_2S_2 -кластеру ISP (см. подробнее [12–16, 42, 44]). Величина pK_a протонируемой группы ISP зависит от редокс-состояния Fe_2S_2 -кластера [82]. Два процесса — депротонирование PQH_2 (перенос протона к гистидиновому остатку ISP) и перенос электрона к Fe_2S_2 -кластеру ISP можно рассматривать как сопряженные процессы, которые взаимосвязаны и происходят практически одновременно [83–87]. Депротонированное состояние ISP — необходимое условие для того, чтобы перенос протона от PQH_2 к ISP мог осуществиться. Депротонирование ISP связано с выходом протона в люмен; вероятность этого процесса зависит от pH_{in} . Протонирование/депротонирование ISP зависит от эффективного значения pK_a

протонируемой группы ISP и контролируется величиной pH_{in} [12, 14]. Окисление ISP после переноса электрона к гему f сопровождается уменьшением pK_a , что должно стимулировать депротонирование ISP [82] и, соответственно, способствовать окислению PQH_2 . Однако при достаточно сильном закислении люмена ($\text{pH}_{\text{in}} \leq \text{pK}_a$) депротонирование ISP будет затрудняться, а потому поток электронов через цитохромный b_6f -комплекс будет ослабевать. Простая математическая модель, основанная на том, что перенос электронов через цитохромный комплекс контролируется процессами протонирования/депротонирования ISP, хорошо описывает pH-зависимость электронного переноса через b_6f -комплекс [12, 14]. Альтернативная гипотеза об участии молекулы воды в качестве первичного акцептора протона при окислении убихинола в цитохромном комплексе bc_1 была выдвинута в работе Postila et al. [88].

Явление фотосинтетического контроля. pH-зависимая регуляция электронного транспорта лежит в основе явления, называемого «фотосинтетическим контролем» [89–92]. Суть этого явления заключается в том, что поток электронов между ФС2 и ФС1 коррелирует с величиной «фосфатного потенциала», $P = [\text{ATP}] / ([\text{ADP}] \times [\text{P}_i])$, где $[\text{ATP}]$, $[\text{ADP}]$ и $[\text{P}_i]$ — концентрации АТФ, АДП и P_i . Отношение АТФ/АДП может изменяться в зависимости от физиологического состояния растительной клетки и взаимодействия фотосинтетического аппарата с митохондриями и другими метаболическими системами [93–96]. В состоянии «фотосинтетического контроля» («состояние 4» по терминологии Chance и Williams [89]), когда пулы молекул АДП и/или P_i исчерпаны, синтез АТФ и трансмембранный поток протонов через АТФ-синтазу (комплекс $\text{CF}_0\text{--CF}_1$) ослабевают, при этом pH люмена снижается достаточно сильно ($\text{pH}_{\text{in}} < 6$), что замедляет работу цитохромного комплекса. В «состоянии 3», когда происходит интенсивный синтез АТФ, выход протонов из люмена в строму ускоряется и потому не происходит столь сильного закисления люмена ($\text{pH}_{\text{in}} \geq 6\text{--}6,5$), которое могло бы существенно замедлить перенос электронов. При этом обеспечивается эффективный синтез АТФ и одновременно поддерживается высокая скорость электронного транспорта [74–76, 90–92].

Увеличение pH стромы (pH_{out}), обусловленное переносом протонов из стромы в люмен, также может влиять на скорость работы фотосинтетической ЭТЦ. Повышение pH_{out} до уровня $\text{pH}_{\text{out}} \approx 7,8\text{--}8,0$ способствует активации

реакций ЦКБ [1]. Это должно приводить к ускорению потребления NADPH и, соответственно, к более быстрому оттоку электронов от ФС1. Опыты с инфильтрацией в листья протонофоров (разобшителей), выравнивающих pH внутри (люмен, pH_{in}) и снаружи (строма, pH_{out}) тилакоидов, подтверждают сказанное выше о pH-зависимой регуляции электронного транспорта в хлоропластах [97, 98].

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ

Наряду с рассмотренными выше электрон-транспортными процессами, связанными с восстановлением NADP⁺ и ЦЭТ вокруг ФС1, в хлоропластах протекают другие редокс-реакции, среди которых важнейшую роль в функционировании фотосинтетического аппарата играют молекулярный кислород и аскорбат.

Взаимодействие O₂ с хлоропластами. Молекулярный кислород (O₂) — активный участник метаболических процессов в растительной клетке. Молекулы O₂ служат акцепторами электрона, взаимодействующими с ЭТЦ хлоропластов. При этом могут возникать активные формы кислорода: супероксидные радикалы (O₂^{•−}), пероксид водорода (H₂O₂) и очень токсичный радикал OH[•] [51]. У растений образование O₂^{•−} происходит в результате одно-электронного восстановления O₂ за счет его взаимодействия с фотосинтетической ЭТЦ. Основным источником электронов для образования АФК служит акцепторный участок ФС1, которой содержит входящие в ФС1 низкопотенциальные медиаторы электронного переноса. Такими донорами электронов могут быть филлохинон PhQ и низкопотенциальные железосерные центры F_A, F_B, F_X, а также ферредоксин [99–102]. От ФС1 электрон переносится на молекулу O₂, которая восстанавливается до супероксидного радикала (O₂ + e[−] → O₂^{•−}, реакция Мелера [48–49]). Супероксидный радикал (O₂^{•−}) превращается затем в пероксид водорода и O₂ за счет супероксид-дисмутазной реакции (2O₂^{•−} + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂) [51]. Численные оценки вклада реакции Мелера в образование АФК неоднозначны. Большинство авторов считает, что вклад реакции Мелера невелик, он составляет не более ~10%; по другим сообщениям поток электронов к O₂ достигает 40% от суммарного потока электронов, донируемый ФС2 (см. обзоры [49–51] и цитированную в них литературу). Тем не менее даже сравнительно слабый поток электронов от ФС1 к O₂ может оказаться суще-

ственным для поддержания оптимального энергетического баланса в хлоропластах и защите фотосинтетического аппарата растений от окислительного стресса. В качестве примеров, иллюстрирующих влияние оттока электронов от ФС1 к O₂, служат результаты опытов с инфильтрацией в лист метилвиологена — искусственного медиатора электронного транспорта, который заметно ускоряет фото-окисление P₇₀₀, увеличивая стационарный уровень P₇₀₀⁺, а также опыты по варьированию содержания O₂ в среде, окружающей лист, или в суспензии клеток цианобактерий [103–106].

Наряду с потоком электронов к O₂ от низкопотенциальных акцепторов, входящих в состав ФС1 [99–101], определенный вклад в образование АФК вносят восстановленный ферредоксин [51, 102], цитохромный b₆f-комплекс и редокс-активные молекулы пластосемихинона и пластохинона внутри тилакоидной мембраны [51, 107–109]. Вклад ФС2 в восстановление O₂ невелик. Сравнивая цитохромные комплексы b₆f и bc₁, следует отметить, что b₆f-комплекс проявляет заметно более высокую (на порядок) скорость восстановления O₂, чем bc₁-комплекс [107]. Предполагается, что это может быть объяснено присутствием молекулы хлорофилла *a* вблизи от места локализации PQH₂ в каталитическом центре Q_o. Фитильный хвост хлорофилла может создавать стерические затруднения, препятствующие смещению в сторону гема b_L молекулы пластосемихинона, образующейся после реакции переноса электрона от PQH₂ к белку Риске. Тем самым увеличивается время жизни редокс-активного радикала (пластосемихинон) и возрастает эффективность восстановления O₂.

Восстановление O₂ в аэробных условиях за счет электронов, донируемых переносчиками ЭТЦ на участке между ФС2 и ФС1, получившее название «хлорореспирации» (*chlororespiration*), хорошо известно [52–56]. При этом происходит окисление пула PQH₂, о чем можно судить, например, по измерениям индукции флуоресценции хлорофилла *a* в ходе адаптации листьев растений к темноте [103, 104]. Этот процесс происходит с участием терминальной оксидазы хлоропластов, которая окисляет PQH₂ и обеспечивает перенос электрона к молекуле O₂. Относительный вклад этого пути восстановления O₂ мал по сравнению с вкладом светоиндуцируемой реакции Мелера [51, 57, 58]. Однако хлорореспирация проявляется, например, когда мы оцениваем изменение редокс-статуса ЭТЦ хлоропластов при адаптации растений к темноте. Этим каналом оттока электронов к O₂ объясняется

сравнительно медленное (минуты-десятки минут) окисление пула пластохинона в темноте. Наконец, хорошо известно, что в интактных хлоропластах может происходить поглощение кислорода на уровне Рубиско за счет явления, называемого *фотодыханием* (см. [1, 51] и цитируемую в них литературу).

Другой механизм восстановления O_2 за счет пластохинола был предложен в работах Бориса Николаевича Иванова и соавт. (см. обзор этих работ в статье Иванова и соавт. [51]). Результаты их исследований позволяют предположить, что донорами электрона для восстановления O_2 являются редокс-активные молекулы пластосемихинона (предпочтительно, депротонированная форма $PQ^{\cdot-}$), которые могут образовываться в результате реакции «компропорционирования» ($PQH_2 + PQ \leftrightarrow 2PQH^{\cdot} \leftrightarrow 2PQ^{\cdot-} + 2H^+$). Реакционноспособные радикалы $PQ^{\cdot-}$ окисляются за счет их взаимодействия с O_2 . Этим также можно объяснить тот факт, что в темноте в аэробных условиях содержание PQH_2 в хлоропластах постепенно уменьшается [103, 104]. В работах Иванова и соавт. [51, 108, 109] также развивается и обосновывается идея о том, что, помимо восстановления молекул O_2 в пуле пластохинона молекулами пластосемихинона, может быть, более важную роль играет восстановление молекулами пластогидрохинона супероксидных анион-радикалов, образующихся как в этом пуле, так и в ФС1. По мнению авторов, этот процесс участвует как в детоксикации $O_2^{\cdot-}$, так, и что важнее, в продукции сигнальных молекул пероксида водорода, которые, образовавшись именно таким путем, являются мессенджерами, передающими информацию другим системам хлоропласта и клетки о состоянии ЭТЦ — чувствительном датчике состояния окружающей среды.

Проницаемость тилакоидных мембран для O_2 .

Не останавливаясь на том, как изменение концентрации O_2 внутри растительной клетки может влиять на функционирование других метаболических систем [94–96], отметим некоторые свойства мембран хлоропластов, важные для понимания особенностей их взаимодействия с O_2 . Установлено, что у растений происходит сравнительно быстрое выравнивание концентраций кислорода внутри листа и в окружающей атмосфере. Это было показано методом ЭПР с использованием твердых кислород-чувствительных парамагнитных частиц, которые вводили внутрь листа с помощью микрошприца [110]. Такие образцы листьев сохраняют способность выделять O_2 на свету за счет работы ФС2 и поглощать O_2 в темно-

те за счет дыхания. При этом концентрация O_2 внутри листьев, находящихся в контакте с воздухом, практически не меняется в ответ на включение и выключение света [110].

Отметим также, что скорость диффузии O_2 через тилакоидные мембраны, определенная путем зондирования мембран с помощью липидо-растворимых спиновых зондов, является высокой [111]. Проницаемость липидного бислоя тилакоидных мембран хлоропластов шпината для O_2 , измеренная при 20 °C, составляет $39,5 \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$, что на 20% выше коэффициента проницаемости слоя воды той же толщины, что у липидной мембраны. Высокая проницаемость мембран для O_2 может способствовать выравниванию концентраций O_2 в разных компартментах растительной клетки. Согласно оценкам, приведенным в работе Ligeza et al. [110], *транс*-тилакоидная разность концентраций O_2 невелика, она не превышает 1 мкМ. Хорошая «вентиляция» внутреннего интерьера листьев растений указывает на то, что значительного накопления O_2 внутри растительных клеток, которое могло бы возникать за счет окисления воды в ФС2, не происходит, что должно ограничивать генерацию АФК.

Хорошая аэрация растительной клетки должна способствовать тому, что фотосинтетический аппарат хлоропластов будет эффективно взаимодействовать с другими метаболическими системами растительной клетки. Показательным является тот факт, что при удалении O_2 путем обдувания листьев инертным газом (N_2 или Ar) резко падает концентрация окисленных центров P_{700}^+ при освещении листьев светом, возбуждающим обе фотосистемы [103–105]. Одно из объяснений этого явления — ограничение оттока электронов от ФС1 к O_2 , препятствующее окислению P_{700} . Избыточное восстановление переносчиков на акцепторной стороне ФС1, не способных принимать электроны от P_{700} , будет ускорять рекомбинацию зарядов в ФС1, препятствуя фотоокислению P_{700} . При этом может образоваться синглетный кислород, весьма опасная форма АФК [112]. Можно также предположить, что при дефиците O_2 замедляется работа дыхательной цепи митохондрий растительной клетки и/или нарушается функционирование других метаболических систем, что могло бы ослаблять потребление NADPH — конечного акцептора электронов в ФС1, и тем самым препятствовать окислению P_{700} .

Взаимодействие аскорбата с хлоропластами.

В метаболизме растений особую роль играют окислительно-восстановительные процессы

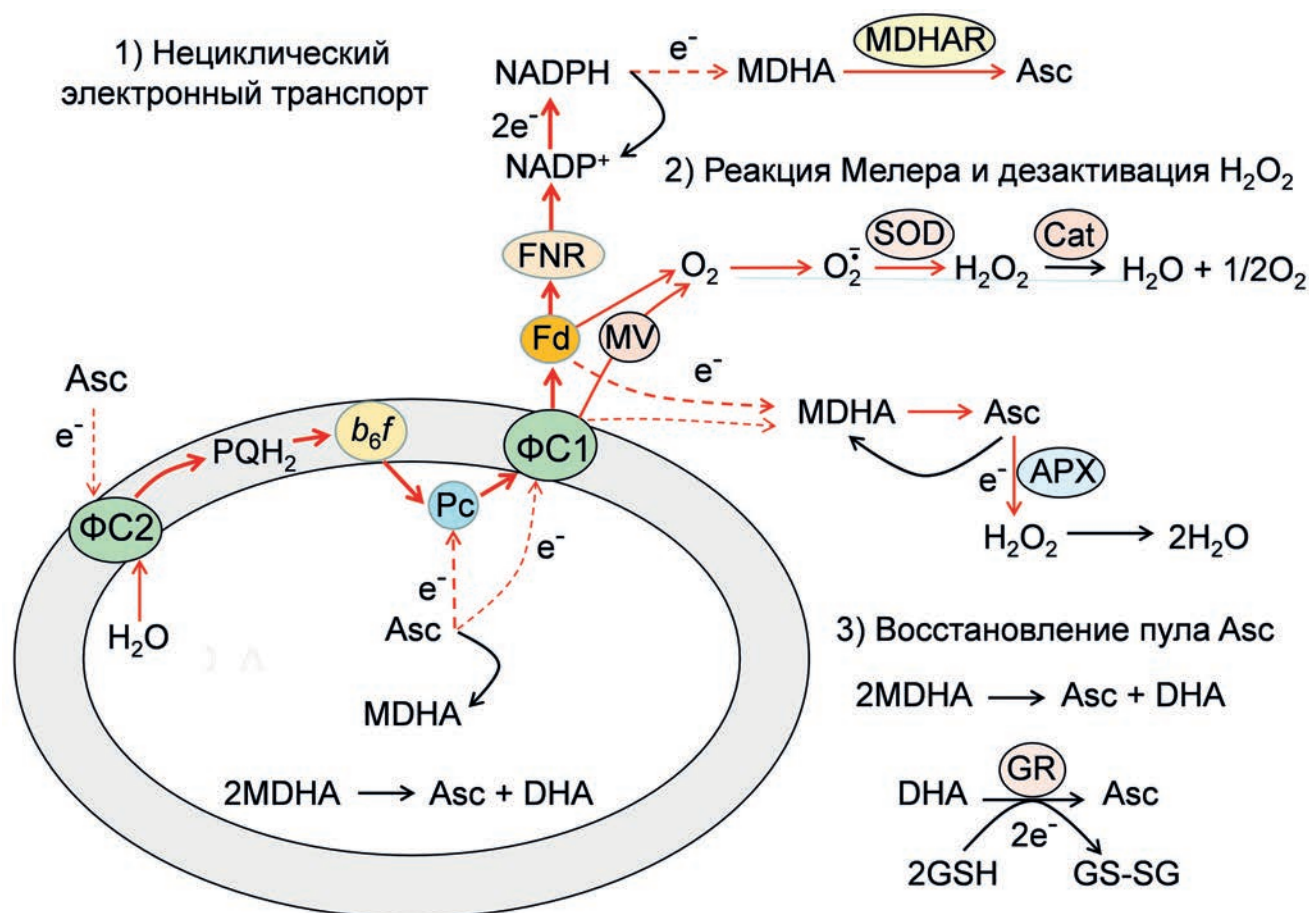


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая взаимодействие различных форм аскорбата (Asc, MDHA, DHA) с хлоропластами. Сокращения: APX – аскорбат пероксидаза; GR – глутатион-редуктаза; GSH и GS-SG – восстановленная и окисленная формы глутатиона; Cat – каталаза; MV – метилвиологен; MDHAR – MDHA-редуктаза; SOD – супероксиддисмутаза

с участием аскорбата, способного взаимодействовать с ЭТЦ хлоропластов и нейтрализовать АФК [59]. Содержание аскорбата в тканях растений бывает высоким, у некоторых видов растений его концентрация составляет 20–50 мМ, в зависимости от вида и условий культивирования растений [113–116]. Физиологическая роль реакций с участием аскорбата связана с установлением окислительно-восстановительного гомеостаза в растительной клетке и с защитой фотосинтетического аппарата от повреждений, вызываемых АФК. Аскорбат вместе с глутатионом выполняют роль редокс-буферов, когда изменения внешних условий (например, флуктуации интенсивности и спектрального состава света) могут нарушать редокс-состояние растительной клетки [59]. Аскорбат препятствует ингибированию фотосинтетических процессов в условиях стресса (избыток света, недостаток влаги и др.). В хлоропластах имеется сложная многоступенчатая система биохимических реакций, препятствующих накоплению H_2O_2 [51, 59].

Аскорбат является эффективным антиоксидантом, он служит ловушкой АФК, участвуя в ферментативном восстановлении H_2O_2 и супероксидных радикалов. Например, ферментативное окисление Asc до MDHA в результате аскорбат-пероксидазной реакции, катализирующей превращение H_2O_2 в H_2O . Аскорбат является донором электронов для виолаксантин-деэпоксидазной реакции (виолаксантин $\rightarrow$ зеаксантин), в результате которой в светособирающей антенне ФЦ2 усиливается тепловая диссипация энергии (нефотохимическое тушение возбуждения хлорофилла) [117–119].

Аскорбат и его окисленные формы (мондегидроаскорбат, MDHA, и дегидроаскорбат, DHA) взаимодействуют с хлоропластами на различных участках ЭТЦ. Средноточечный редокс-потенциал (E_m') пары Asc/DHA равен ~ 60 – 90 мВ [120]. Это означает, что аскорбат (полностью восстановленная форма) может взаимодействовать с ЭТЦ хлоропластов в качестве донора электронов на участке между

ФС2 и ФС1; в то время как окисленные формы аскорбата служат акцепторами электронов, донируемыми ФС1. Благодаря этому аскорбат способствует поддержанию оптимального редокс-статуса растительной клетки. На рис. 5 приведена схема, показывающая, как восстановленные и окисленные формы взаимодействуют с ЭТЦ хлоропластов. Полностью восстановленная форма аскорбата (Asc) может служить донором электронов на донорной стороне ФС2 и на пластоцианиновом участке ЭТЦ между ФС2 и ФС1 [121, 122]. Аскорбат, проникающий внутрь тилакоидов, способен восстанавливать Рс, который, в свою очередь, служит эффективным донором электронов для ФС1. Поток электронов от Asc к ФС1 может достигать ~50–70% от нециклического электронного транспорта [121]. При одноэлектронном окислении Asc он превращается в радикал MDHA, который дает характерный дублетный сигнал ЭПР. Отметим, что Asc может непосредственно восстанавливать окисленные центры P_{700}^+ , что наглядно доказывается опытами с изолированными комплексами ФС1 [122]. Однако в этом случае скорость восстановления P_{700}^+ низкая; характерное время восстановления P_{700}^+ составляет ~20–30 с, что существенно медленнее по сравнению с восстановлением P_{700}^+ за счет Рс[–].

Окисление Asc — обратимый процесс. Восстановление семихиноновой формы MDHA до полностью восстановленной формы Asc происходит разными путями. MDHA может получать электрон непосредственно от ФС1 [51, 123]. Характерная скорость переноса электрона от ФС1 к MDHA, приводящая к образованию полностью восстановленной формы Asc, сопоставима со скоростью переноса электронов между фотосистемами. Молекулы MDHA могут также принимать электроны от Fd[–] и NADPH [51, 124]. Скорость восстановления MDHA зависит от концентрации Fd[–] и в определенных условиях может многократно превышать скорость светоиндуцированного восстановления NADP⁺ от FNR.

Другой канал образования восстановленной формы Asc — это реакция диспропорционирования радикалов MDHA ($2MDHA \leftrightarrow Asc + DHA$) [122]. Образующаяся при этом полностью окисленная форма DHA может затем восстанавливаться до Asc. Важную роль в этом играет глутатион-оксидазная реакция, в которой донором электронов служит восстановленный глутатион [59].

Таким образом, подобно тому, как псевдоциклический транспорт электронов (цикл «вода–вода») и циклический перенос элек-

тронов вокруг ФС1 предохраняют фотосинтетический аппарат от избыточной энергии света, реакции с участием аскорбата обеспечивают защиту фотосинтетического аппарата от повреждений при избыточном освещении, способствуя диссипации энергии в тепло и антиоксидантной защите растительной клетки. Аскорбат может служить альтернативным медиатором электронного переноса в хлоропластах: стимулируя отток электронов от ФС1 и Fd[–], MDHA предотвращает избыточное восстановление переносчиков на акцепторном участке ФС1. С другой стороны, восстановленные молекулы аскорбата могут компенсировать ослабление фотохимической активности ФС2, вызванное неблагоприятными факторами среды и служить донорами электронов на участке цепи между ФС2 и ФС1 [125–127].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимальное функционирование фотосинтетического транспорта электронов в хлоропластах достигается в первую очередь за счет регуляции электронного переноса на двух участках цепи электронного переноса: от ФС2 к цитохромному b_6f -комплексу и на стадии оттока электронов от ФС1 в ЦКБ. Важную роль в этих процессах играют структурно-функциональные перестройки фотосинтетического аппарата, которые определяют лабильность хлоропластов и их способность быстро реагировать на изменения внешних условий, а также альтернативные редокс-медиаторы (O_2 и аскорбат), обеспечивающие редокс-гомеостаз растительной клетки и стабильность работы ЭТЦ.

Благодарности. Данная статья посвящена памяти Л.А. Драчева — одного из крупнейших отечественных биофизиков-экспериментаторов, чьи научно-технические разработки и пионерские исследования в области фотосинтеза способствовали глубокому пониманию процессов разделения и переноса зарядов в реакционных центрах фотосинтезирующих систем.

Автор признателен Э.К. Рууге, Г.Б. Хомутову и Л.Ю. Устынюк, совместно с которыми ранее были получены основные результаты по экспериментальному и теоретическому изучению регуляции электронного транспорта в хлоропластах, на которые автор ссылается в настоящем обзоре. Автор благодарит анонимных рецензентов за полезные замечания и рекомендации.

Финансирование. Работа проводилась в рамках темы научно-исследовательских работ физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова «Физические основы строения, функционирования и регуляции биологических систем» (Госрегистрация № 012004 085 35) и при частичной финансовой поддержке Российского

фонда фундаментальных исследований (грант № 21-04-20047).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Edwards, G., and Walker, D. (1983) *C₃, C₄: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis*, Univ. of California Press, Berkeley.
2. Gurrieri, L., Fermani, S., Zaffagnini, M., Sparla, F., and Trost, P. (2021) Calvin–Benson cycle regulation is getting complex, *Trends Plant Sci.*, **26**, 898–912, doi: 10.1016/j.tplants.2021.03.008
3. Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717–749, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717.
4. Junge, W., and Nelson, N. (2015) ATP synthase, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 631–657, doi: 10.1146/annurev-biochem.060614-034124.
5. Romanovsky, Y. M., and Tikhonov, A. N. (2010) Molecular energy transducers of the living cell. Proton ATP synthase: a rotating molecular motor, *Physics Usp.*, **53**, 893–914, doi: 10.3367/UFNe.0180.201009b.0931.
6. Nelson, N., and Yocum, C. F. (2006) Structure and function of photosystems I and II, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 521–565, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350.
7. Mamedov, M., Govindjee, Nadtochenko, V., and Semenov, A. Yu. (2015) Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms, *Photosynth. Res.*, **125**, 51–63, doi: 10.1007/s11120-015-0088-y.
8. Brettel, K. (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 322–373, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00112-0.
9. Allakhverdiev, S. I. (2011) Recent progress in the studies of structure and function of photosystem II, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 1–8, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.03.010.
10. Müh, F., Glöckner, C., Hellmich, J., and Zouni, A. (2012) Light-induced quinone reduction in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 44–65, doi: 10.1016/j.bbabo.2011.05.021.
11. Shevela, D., Kern, J. F., Govindjee, G., and Messinger, J. (2023) Solar energy conversion by photosystem II: principles and structures, *Photosynth. Res.*, **156**, 279–307, doi: 10.1007/s11120-022-00991-y.
12. Tikhonov, A. N. (2014) The cytochrome *b₆f* complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways, *Plant Physiol. Biochem.*, **81**, 163–183, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.12.011.
13. Cramer, W. A., and Hasan, S. S. (2016) Structure-function of the cytochrome *b₆f* lipoprotein complex, in *Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling* (Cramer, W. A., and Kallas, T., eds) Springer, Dordrecht, pp. 177–207, doi: 10.1007/978-94-017-7481-9_9.
14. Tikhonov, A. N. (2018) The cytochrome *b₆f* complex: biophysical aspects of its functioning in chloroplasts, in *Membrane Protein Complexes: Structure and Function, Subcellular Biochemistry* (Harris, J. R., Boekema, E. J., eds), **87**, Springer Nature, Singapore Pte Ltd., pp. 287–328, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_10.
15. Malone, L. A., Proctor, M. S., Hitchcock, A., Hunter, C. N., and Johnson, M. P. (2021) Cytochrome *b₆f* – Orchestrator of photosynthetic electron transfer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 148380, doi: 10.1016/j.bbabo.2021.148380.
16. Sarewicz, M., Pintscher, S., Pietras, R., Borek, A., Bujnowicz, Ł., Hanke, G., Cramer, W. A., Finazzi, G., and Osyczka, A. (2021) Catalytic reactions and energy conservation in the cytochrome *bc₁* and *b₆f* complexes of energy-transducing membranes, *Chem. Rev.*, **121**, 2020–2108, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00712.
17. Sarewicz, M., Szwałec, M., Pintscher, S., Indyka, P., Rawski, M., Pietras, R., Mielecki, B., Koziej, Ł., Jaciuk, M., Glatt, S., and Osyczka, A. (2023) High-resolution cryo-EM structures of plant cytochrome *b₆f* at work, *Sci. Adv.*, **9**, 1–12, doi: 10.1126/sciadv.add9688.
18. Staehelin, L. A. (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supramolecular architecture of thylakoid membranes, *Photosynth. Res.*, **76**, 185–196, doi: 10.1023/A:1024994525586.
19. Albertsson, P.-Å. (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane, *Trends Plant Sci.*, **6**, 349–354, doi: 10.1016/S1360-1385(01)00201-0.
20. Dekker, J. P., and Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1706**, 12–39, doi: 10.1016/j.bbabo.2004.09.009.

21. Pribil, M., Labs, M., and Leister, D. (2014) Structure and dynamics of thylakoids in land plants, *Environ. Bot.*, **65**, 1955-1972, doi: 10.1093/jxb/eru090.
22. Kramer, D. M., Avenson, T. J., and Edwards, G. E. (2004) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions, *Trends Plant. Sci.*, **9**, 349-357, doi: 10.1016/j.tplants.2004.05.001.
23. Johnson, M. P., and Ruban, A. V. (2014) Rethinking the existence of a steady-state $\Delta\psi$ component of the proton motive force across plant thylakoid membranes, *Photosynth. Res.*, **119**, 233-242, doi: 10.1007/s11120-013-9817-2.
24. Bendall, D. S., and Manasse, R. S. (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 23-38, doi: 10.1016/0005-2728(94)00195-B.
25. Joliot, P., and Joliot, A. (2006) Cyclic electron flow in C3 plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 362-368, doi: 10.1016/j.bbabo.2006.02.018.
26. Joliot, P., Sellés, J., Wollman, F.-A., and Verméglio, A. (2022) High efficient cyclic electron flow and functional supercomplexes in *Chlamydomonas* cells, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1863**, 148909, doi: 10.1016/j.bbabo.2022.148909.
27. Iwai, M., Takizawa, K., Tokutsu, R., Okamuro, A., Takahashi, Y., and Minagawa, J. (2010) Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis, *Nature*, **464**, 1210-1213, doi: 10.1038/nature08885.
28. Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*, *Cell*, **110**, 361-371, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00867-X.
29. DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schünemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., and Leister, D. (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*, *Cell*, **132**, 273-285, doi: 10.1016/j.cell.2007.12.028.
30. Buchert, F., Mosebach, L., Gäbelein, P., and Hippler, M. (2020) PGR5 is required for efficient Q cycle in the cytochrome *b₆f* complex during cyclic electron flow, *Biochem. J.*, **477**, 1631-1650, doi: 10.1042/BCJ20190914.
31. Strand, D. D., Fisher, N., and Kramer, D. M. (2016) Distinct energetics and regulatory functions of the two major cyclic electron flow pathways in chloroplasts, in *Chloroplasts: Current Research and Future Trends* (Kirchhoff Helmut, ed.) Norfolk: UK, Caister Academic Press, pp. 89-100.
32. Shikanai, T. (2016) Chloroplast NDH: A different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1015-1022, doi: 10.1016/j.bbabo.2015.10.013.
33. Laughlin, T. G., Bayne, A. N., Trempe, J. F., Savage, D. F., and Davies, K. M. (2019) Structure of the complex I-like molecule NDH of oxygenic photosynthesis, *Nature*, **566**, 411-414, doi: 10.1038/s41586-019-0921-0.
34. Schuller, J. M., Birrell, J. A., Tanaka, H., Konuma, T., Wulforth, H., Cox, N., Schuller, S. K., Thiemann, J., Lubitz, W., Sétif, P., Ikegami, T., Engel, B. D., Kurisu, G., and Nowaczyk, M. M. (2019) Structural adaptations of photosynthetic complex I enable ferredoxin-dependent electron transfer, *Science*, **363**, 257-260, doi: 10.1126/science.aau3613.
35. Zhang, C., Shuai, J., Ran, Z., Zhao, J., Wu, Z., Liao, R., Wu, J., Ma, W., and Lei, M. (2020) Structural insights into NDH-1 mediated cyclic electron transfer, *Nat. Commun.*, **11**, 888, doi: 10.1038/s41467-020-14732-z.
36. Stiehl, H. H., and Witt, H. T. (1969) Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis, *Z. Naturforsch. B*, **24**, 1588-1598, doi: 10.1515/znb-1969-1219.
37. Haehnel, W. (1976) The reduction kinetics chlorophyll *a₁* as indicator for proton uptake between the light reactions in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 506-521, doi: 10.1016/0005-2728(76)90038-4.
38. Tikhonov, A. N., Khomutov, G. B., and Ruuge, E. K. (1984) Electron transport control in chloroplasts. Effects of magnesium ions on the electron flow between two photosystems, *Photobiophys. Photobiophys.*, **8**, 261-269.
39. Haehnel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 659-693, doi: 10.1146/annurev.pp.35.060184.003303.
40. Höhner, R., Pribil, M., Herbstová, M., Lopez, L. S., Kunz, H.-H., Li, M., Wood, M., Svoboda, M., Puthiyaveetil, S., Leister, L., and Kirchhoff, H. (2020) Plastocyanin is the long-range electron carrier between photosystem II and photosystem I in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 15354-15362, doi: 10.1073/pnas.2005832117.
41. Tikhonov, A. N. (2013) pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **116**, 511-534, doi: 10.1007/s11120-013-9845-y.
42. Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S., and Crofts, A. R. (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 1005-1075, doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.1005.
43. Mitchell, P. (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems, *J. Theor. Biol.*, **62**, 327-367, doi: 10.1016/0022-5193(76)90124-7.
44. Cramer, W. A., Hasan, S. S., and Yamashita, E. (2011) The Q cycle of cytochrome *bc* complexes: a structure perspective, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 788-802, doi: 10.1016/j.bbabo.2011.02.006.

45. Chow, W. S., and Hope, A. B. (2004) Kinetics of reactions around the cytochrome *bf* complex studied in intact leaf disks, *Photosynth. Res.*, **81**, 153-163, doi: 10.1023/B:PRES.0000035027.02655.8c.
46. Ivanov, B. (1993) Stoichiometry of proton uptake by thylakoids during electron transport in chloroplasts, in *Photosynthesis: Photoreactions to Plant Productivity*, Springer, Dordrecht, (Abrol, Y. P., Mohanty, P., and Govindjee, G., eds) pp. 108-128, doi: 10.1007/978-94-011-2708-0_4.
47. Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstová, M., Tsabari, O., Nevo, R., Charuvi, D., Shimoni, E., and Reich, Z. (2011) Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20248-20253, doi: 10.1073/pnas.1104141109.
48. Mehler, A. H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents, *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 65-77, doi: 10.1016/0003-9861(51)90082-3.
49. Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 601-639, doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.601.
50. Heber, U. (2002) Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants, *Photosynth. Res.*, **73**, 223-231.
51. Иванов Б., Хоробрых С., Козулева М., Борисова-Мубаракшина М. (2014) Роль кислорода и его активных форм в фотосинтезе, *Современные Проблемы Фотосинтеза* (под ред. Аллахвердиева С.И., Рубина А.Б., Шувалова В.А.), Ижевский Институт Компьютерных Исследований, Ижевск-Москва, **1**, 407-460.
52. Nixon, P. J. (2000) Chlororespiration. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, **355**, 1541-1547, doi: 10.1098/rstb.2000.0714.
53. Peltier, G., and Cournac, L. (2002) Chlororespiration, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 523-550, doi: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.13524.
54. Joët, T., Genty, B., Josse, E.-M., Kuntz, M., Cournac, L., and Peltier, G. (2002) Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco, *J. Biol. Chem.*, **277**, 31623-31630, doi: 10.1074/jbc.M203538200.
55. McDonald, A. E., Ivanov, A. G., Bode, R., Maxwell, D. P., Rodermeier, S. R., and Huner, N. P. A. (2011) Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX), *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 954-967, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.10.024.
56. Nawrocki, W. J., Tourasse, N. J., Taly, A., Rappaport, F., and Wollman, F.-A. (2015) The plastid terminal oxidase: its elusive function points to multiple contributions to plastid physiology, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 49-74, doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114744.
57. Lennon, A. M., Prommeenate, P., and Nixon, P. J. (2003) Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, Ndh and IMMUTANS, in higher-plant plastids, *Planta*, **218**, 254-260, doi: 10.1007/s00425-003-1111-7.
58. Ifuku, K., Endo, T., Shikanai, T., and Aro, E.-M. (2011) Structure of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: nomenclature for nuclear-encoded subunits, *Plant Cell Physiol.*, **52**, 1560-1568, doi: 10.1093/pcp/pcr098.
59. Foyer, C. H., and Noctor, G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub, *Plant Physiol.*, **155**, 2-18, doi: 10.1104/pp.110.167569.
60. Anderson, J. M. (1982) Distribution of the cytochromes of spinach chloroplasts between the appressed membranes of grana stacks and stroma-exposed thylakoid regions, *FEBS Lett.*, **138**, 62-66, doi: 10.1016/0014-5793(82)80395-5.
61. Vallon, O., Bulte, L., Dainese, P., Olive, J., Bassi, R., and Wollman, F.-A. (1991) Lateral redistribution of cytochrome *b₆/f* complexes along thylakoid membranes upon state transitions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8262-8266, doi: 10.1073/pnas.88.18.8262.
62. Dumas, L., Chazaux, M., Peltier, G., Johnson, X., and Alric, J. (2016) Cytochrome *b₆f* function and localization, phosphorylation state of thylakoid membrane proteins and consequences on cyclic electron flow, *Photosynth. Res.*, **129**, 307-320, doi: 10.1007/s1120-016-0298-y.
63. Kirchhoff, H., Li, M., and Puthiyaveetil, S. (2017) Sublocalization of cytochrome *b₆f* complexes in photosynthetic membranes, *Trends Plant. Sci.*, **22**, 574-582, doi: 10.1016/j.tplants.2017.04.004.
64. Kirchhoff, H., Horstmann, S., and Weis, E. (2000) Control of the photosynthetic electron transport by PQ diffusion in microdomains in thylakoids of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 148-168, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00143-2.
65. Wood, W. H. J., MacGregor-Chatwin, C., Barnett, S. F. H., Mayneord, G. E., Huang, X., Hobbs, J. K., Hunter, C. N., and Johnson, M. P. (2018) Dynamic thylakoid stacking regulates the balance between linear and cyclic photosynthetic electron transfer, *Nat. Plants*, **4**, 116-127, doi: 10.1038/s41477-017-0092-7.
66. Hanke, G. T., Kimata-Arigo, Y., Taniguchi, I., and Hase, T. (2004) A post genomic characterization of *Arabidopsis* ferredoxins, *Plant Physiol.*, **134**, 255-264, doi: 10.1104/pp.103.032755.
67. Hanke, G. T., and Hase, T. (2008) Variable photosynthetic roles of two leaf-type ferredoxins in *Arabidopsis*, as revealed by RNA interference, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1302-1309, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00411.x.
68. Blanco, N., Ceccoli, R., Dalla Via, M. V., Voss, I., Segretin, M. E., Bravo-Almonacid, F. F., Melzer, M., Hajirezaei, M.-R., Scheibe, R., and Hanke, G. T.

- (2013) Expression of the minor isoform pea ferredoxin in tobacco alters photosynthetic electron partitioning and enhances cyclic electron flow, *Plant Physiol.*, **161**, 866-879, doi: 10.1104/pp.112.211078.
69. Lehtimäki, N., Lintala, M., Allahverdiyeva, Y., Aro, E. M., and Mulo, P. (2010) Drought stress-induced upregulation of components involved in ferredoxin-dependent cyclic electron transfer, *J. Plant Physiol.*, **167**, 1018-1022, doi: 10.1016/j.jplph.2010.02.006.
 70. Гинс В. К., Тихонов А. Н., Мухин Е. Н., Рууге Э. К. (1982) Особенности функционирования двух молекулярных форм ферредоксина гороха в цепи электронного транспорта хлоропластов, *Биохимия*, **47**, 1859-1866.
 71. Gong, X.-S., Chung, S., and Fernandez-Velasco, J. G. (2001) Electron transfer and stability of the cytochrome *b₆f* complex in a small domain deletion mutant of cytochrome *f*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 24365-24371, doi: 10.1074/jbc.M010721200.
 72. Yan, J., and Cramer, W. A. (2003) Functional insensitivity of the cytochrome *b₆f* complex to structure changes in the hinge region of the Rieske iron-sulfur protein, *J. Biol. Chem.*, **278**, 20925-20933, doi: 10.1074/jbc.M212616200.
 73. Rumberg, B., and Siggel, U. (1969) pH changes in the inner phase of the thylakoids during photosynthesis, *Naturwissenschaften*, **56**, 130-132, doi: 10.1007/BF00601025.
 74. Tikhonov, A. N., Khomutov, G. B., Ruuge, E. K., and Blumenfeld, L. A. (1981) Electron transport control in chloroplasts. Effects of photosynthetic control monitored by the intrathylakoid pH, *Biochim. Biophys. Acta*, **637**, 321-333, doi: 10.1016/0005-2728(81)90171-7.
 75. Kramer, D. M., Sacksteder, C. A., and Cruz, J. A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.*, **60**, 151-163, doi: 10.1023/A:1006212014787.
 76. Тихонов А. Н. (2012) Энергетическая и регуляторная роль протонного потенциала в хлоропластах, *Биохимия*, **77**, 1155-1176.
 77. Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B., and Niyogi, K. K. (2009) Sensing and responding to excess light, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 239-260, doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103844.
 78. Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Muller, O., and Adams, W. W. (2012) Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons, *Photosynth. Res.*, **113**, 75-88, doi: 10.1007/s11120-012-9761-6.
 79. Horton, P. (2012) Optimization of light harvesting and photoprotection: molecular mechanisms and physiological consequences, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **367**, 3455-3465, doi: 10.1098/rstb.2012.0069.
 80. Brandt, U. (1996) Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome *bc₁* complex by proton-gated charge transfer, *FEBS Lett.*, **387**, 1-6, doi: 10.1016/S0014-5793(96)00436-X.
 81. Link, T. A. (1997) The role of the "Rieske" iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (*Q_p*) site of the cytochrome *bc₁* complex: the "proton-gated affinity change" mechanism, *FEBS Lett.*, **412**, 257-264, doi: 10.1016/S0014-5793(97)00772-2.
 82. Zu, Y., Manon, M.-J., Couture, M. M.-J., Kolling, D. R. J., Crofts, A. R., Eltis, L. D., Fee, J. A., and Hirst, J. (2003) The reduction potentials of Rieske clusters: the importance of the coupling between coupling between oxidation state and histidine protonation state, *Biochemistry*, **42**, 12400-12408, doi: 10.1021/bi0350957.
 83. Crofts, A. R., Guergova-Kuras, M., Kuras, R., Ugulava, N., Li, J., and Hong, S. (2000) Proton-coupled electron transfer at the *Q_o* site: What type of mechanism can account for the high activation barrier? *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 456-466, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00184-5.
 84. Zhu, J., Egawa, T., Yeh, S.-R., Yu, L., and Yu, C.-A. (2007) Simultaneous reduction of iron-sulfur protein and cytochrome *b_L* during ubiquinol oxidation in cytochrome *bc₁* complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4864-4869, doi: 10.1073/pnas.0607812104.
 85. Osyczka, A., Moser, C. C., and Dutton P. L. (2005) Fixing the Q cycle, *Trends. Biochem. Sci.*, **30**, 176-182, doi: 10.1016/j.tibs.2005.02.001.
 86. Ustynyuk, L. Yu., and Tikhonov, A. N. (2018) The cytochrome *b₆f* complex: DFT modeling of the first step of plastoquinol oxidation by the iron-sulfur protein, *J. Organomet. Chem.*, **867**, 290-299, doi: 10.1016/j.jorgchem.2018.01.023.
 87. Ustynyuk, L. Yu., and Tikhonov, A. N. (2022) Plastoquinol oxidation: rate-limiting stage in the electron transport chain of chloroplasts, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1084-1097, doi: 10.1134/S0006297922100029.
 88. Postila, P.A., Kaszuba, K., Sarewicz, M., Osyczka, A., Vattulainen, I., and Róg, T. (2013) Key role of water in proton transfer at the *Q_o*-site of the cytochrome *bc₁* complex predicted by atomistic molecular dynamics simulations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 761-768, doi: 10.1016/j.bbabbio.2013.02.005.
 89. Chance, B., and Williams, G. R. (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation, *Adv. Enzymol.*, **17**, 65-134, doi: 10.1002/9780470122624.ch2.
 90. Foyer, C. H., Neukermans, J., Queval, G., Noctor, G., and Harbinson, J. (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression, *J. Exp. Bot.*, **63**, 1637-1661, doi: 10.1093/jxb/ers013.
 91. Tikhonov, A. N., Agafonov, R. V., Grigor'ev, I. A., Kirilyuk, I. A., Ptushenko, V. V., and Trubitsin, B. V. (2008) Spin-probes designed for measuring the intrathylakoid pH in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 285-294, doi: 10.1016/j.bbabbio.2007.12.002.
 92. Vershubskii, A. V., Trubitsin, B. V., Priklonskii, V. I., and Tikhonov, A. N. (2017) Lateral heterogeneity of the proton potential along the thylakoid membranes

- of chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 388-401, doi: 10.1016/j.bbamem.2016.11.016.
93. Buchanan, B. B. (1984) The ferredoxin/thioredoxin system: a key element in the regulatory function of light in photosynthesis, *Bioscience*, **34**, 378-383, doi: 10.2307/1309730.
 94. Dietz, K. J. (2003) Redox control, redox signaling and redox homeostasis in plant cells, *Int. Rev. Cytol.*, **228**, 141-193, doi: 10.1016/S0074-7696(03)28004-9.
 95. Selinski, J., and Scheibe, R. (2019) Malate valves: old shuttles with new perspectives, *Plant Biol.*, **21** (Suppl. 1), 21-30, doi: 10.1111/plb12869.
 96. Scheibe, R. (2019) Maintaining homeostasis by controlled alternatives for energy distribution in plant cells under changing conditions of supply and demand, *Photosynth. Res.*, **139**, 81-91, doi: 10.1007/s11120-018-0583-z.
 97. Tikhonov, A. N. (2015) Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts: An overview, *Photosynth. Res.*, **125**, 65-94, doi: 10.1007/s11120-015-0094-0.
 98. Trubitsin, B. V., Vershubskii, A. V., Priklonskii, V. I., and Tikhonov, A. N. (2015) Short-term regulation and alternative pathways of photosynthetic electron transport in *Hibiscus rosa-sinensis* leaves, *J. Photochem. Photobiol. B*, **152**, 400-415, doi: 10.1016/j.jphotochem.2015.07.015.
 99. Kozuleva, M. A., Petrova, A. A., Mamedov, M. D., Semenov, A. Y., and Ivanov, B. N. (2014) O₂ reduction by photosystem I involves phyloquinone under steady-state illumination, *FEBS Lett.*, **588**, 4364-4368, doi: 10.1016/j.febslet.2014.10.003.
 100. Kozuleva, M. A., and Ivanov, B. N. (2016) The mechanisms of oxygen reduction in the terminal reducing segment of the chloroplast photosynthetic electron transport chain, *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1397-1404, doi: 10.1093/pcp/pcw035.
 101. Cherepanov, D. A., Milanovsky, G. E., Petrova, A. A., Tikhonov, A. N., Semenov, A. Yu. (2017) Electron transfer through the acceptor side of Photosystem I: Interaction with exogenous acceptors and molecular oxygen, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1249-1268, doi: 10.1134/S0006297917110037.
 102. Kozuleva, M. A., and Ivanov, B. N. (2010) Evaluation of the participation of ferredoxin in oxygen reduction in the photosynthetic electron transport chain of isolated pea thylakoids, *Photosynth. Res.*, **105**, 51-61, doi: 10.1007/s11120-010-9565-5.
 103. Кувыкин И. В., Вершубский А. В., Птушенко В. В., Тихонов А. Н. (2008) Кислород как альтернативный акцептор в фотосинтетической цепи электронного транспорта C₃-растений, *Биохимия*, **73**, 1329-1343.
 104. Kuvykin, I. V., Ptushenko, V. V., Vershubskii, A. V., and Tikhonov, A. N. (2011) Regulation of electron transport in C₃ plant chloroplasts *in situ* and *in silico*. Short-term effects of atmospheric CO₂ and O₂, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 336-347, doi: 10.1016/j.bbambio.2010.12.012.
 105. Tikhonov, A. N., and Subczynski, W. K. (2019) Oxygenic photosynthesis: EPR study of photosynthetic electron transport and oxygen-exchange, an overview, *Cell Biochem. Biophys.*, **77**, 47-59, doi: 10.1007/s12013-018-0861-6.
 106. Trubitsin, B. V., Ptushenko, V. V., Koksharova, O. A., Mamedov, M. D., Vitukhnovskaya, L. A., Grigor'ev, I. A., Semenov, A. Yu., and Tikhonov, A. N. (2005) EPR study of electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Oxygen-dependent interrelations between photosynthetic and respiratory electron transport chains, *Biochim. Biophys. Acta*, **1708**, 238-249, doi: 10.1016/j.bbambio.2005.03.004.
 107. Baniulis, D., Hasan, S. S., Stofleth, J. T., and Cramer, W. A. (2013) Mechanism of enhanced superoxide production in the cytochrome *b₆f* complex of oxygenic photosynthesis, *Biochemistry*, **52**, 8975-8983, doi: 10.1021/bi4013534.
 108. Иванов Б. Н. (2008) Кооперация Фотосистемы I и пула пластохинона в восстановлении кислорода в хлоропластах высших растений, *Биохимия*, **73**, 137-144.
 109. Ivanov, B., Borisova-Mubarakshina, M., Vilyanen, D., Vetoshkina, D., Kozuleva, M. (2022) Cooperative pathway of O₂ reduction to H₂O₂ in chloroplast thylakoid membrane: new insight into the Mehler reaction, *Biophys. Rev.*, **14**, 857-869, doi: 10.1007/s12551-022-00980-4.
 110. Ligeza, A., Tikhonov, A. N., Hyde, J. S., and Subczynski, W. K. (1998) Oxygen permeability of thylakoid membranes: electron paramagnetic resonance spin labeling study, *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 453-463, doi: 10.1016/S0005-2728(98)00098-X.
 111. Ligeza, A., Tikhonov, A. N., and Subczynski, W. K. (1997) *In situ* measurements of oxygen production and consumption using paramagnetic fusinite particles injected into a bean leaf, *Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 133-137, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00122-3.
 112. Rutherford, A. W., Osyczka, A., and Rappaport, F. (2012) Back-reactions, short-circuits, leaks and other energy wasteful reactions in biological electron transfer: Redox tuning to survive life in O₂, *FEBS Lett.*, **586**, 603-616, doi: 10.1016/j.febslet.2011.12.039.
 113. Foyer, C., Rowell, J., and Walker, D. (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaves protoplasts and chloroplasts during illumination, *Planta*, **157**, 239-244, doi: 10.1007/BF00405188.
 114. Law, M. Y., Charles, S. A., and Halliwell, B. (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat, *Biochem. J.*, **210**, 899-903, doi: 10.1042/bj2100899.
 115. Smirnoff, N. (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants, *Ann. Bot.*, **78**, 661-669, doi: 10.1006/anbo.1996.0175.

116. Gest, N., Gautier, H., and Stevens, R. (2013) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.*, **64**, 33-53, doi: 10.1093/jxb/ers297.
117. Eskling, M., Arvidsson, P.-O., and Akerlund, H.-E. (1997) The xanthophylls cycle, its regulation and components, *Physiol. Plant.*, **100**, 806-816, doi: 10.1034/j.1399-3054.1997.1000407.x.
118. Eskling, M., and Akerlund, H.-E. (1998) Changes in the quantities of violaxanthin deepoxidase, xanthophylls and ascorbate in spinach upon shift from low to high light, *Photosynth. Res.*, **57**, 41-50, doi: 10.1023/A:1006015630167.
119. Müller-Moulé, P., Conclin, P. L., and Niyogy, K. K. (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo*, *Plant Physiol.*, **128**, 970-977, doi: 10.1104/pp.010924.
120. Iyanagi, T., Yamazaki, I., and Anan, K. (1985) One-electron oxidation-reduction properties of ascorbic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, **806**, 255-261, doi: 10.1016/0005-2728(85)90103-3.
121. Mano, J., Hideg, E., and Asada, K. (2004) Ascorbate in thylakoid lumen functions as an alternative electron donor to photosystem II and photosystem I, *Arch. Biochim. Biophys.*, **429**, 71-80, doi: 10.1016/j.abb.2004.05.022.
122. Trubitsin, B. V., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., and Tikhonov, A. N. (2014) Interaction of ascorbate with photosystem I, *Photosynth. Res.*, **122**, 215-231, doi: 10.1007/s11120-014-0023-7.
123. Forti, G., and Ehrenheim, A. M. (1993) The role of ascorbic acid in photosynthetic electron transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**, 408-412, doi: 10.1016/0005-2728(93)90246-C.
124. Miyake, C., and Asada, K. (1994) Ferredoxin-dependent photoreduction of monodehydroascorbate radicals in spinach thylakoids, *Plant Cell Physiol.*, **35**, 539-549, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078628.
125. Mano, J., Ushimaru, T., and Asada, K. (1997) Ascorbate in thylakoids lumen as an endogenous electron donor to photosystem II: protection of thylakoids from photoinhibition and regeneration of ascorbate in stroma by dehydroascorbate reductase, *Photosynth. Res.*, **53**, 197-204.
126. Tóth, S. Z., Puthur, J. T., Nagi, V., and Garab, G. (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen evolving complexes, *Plant Physiol.*, **149**, 1568-1578, doi: 10.1104/pp.108.132621.
127. Tóth, S. Z., Nagi, V., Puthur, J. T., Kovács, L., and Garab, G. (2011) The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves, *Plant Physiol.*, **156**, 382-392, doi: 10.1104/pp.110.171918.

ELECTRON TRANSPORT IN CHLOROPLASTS: REGULATION AND ALTERNATIVE PATHWAYS OF ELECTRON TRANSFER

Review

A. N. Tikhonov

*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: an_tikhonov@mail.ru*

This work represents an overview of electron transport regulation in chloroplasts as considered in the context of structure-function organization of photosynthetic apparatus in plants. A basic focus of the article is concentrated on a bifurcated oxidation of plastoquinol by the cytochrome *b₆f* complex, which represents the rate-limiting step of electron transfer between photosystems 2 and 1. Electron transport along the chains of the noncyclic, cyclic and pseudocyclic electron flow, their relationships to generation of the trans-thylakoid difference in electrochemical potentials of protons in chloroplasts, and the pH-dependent mechanisms of regulation of the cytochrome *b₆f* complex, are considered. Redox reactions with the participation of molecular oxygen and ascorbate, the alternative mediators of electron transport in chloroplasts, have also been discussed.

Keywords: photosynthesis, chloroplasts, electron transport, regulation

УДК 577.352.4

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ХЛОРОФИЛЛА В ХЛОРОПЛАСТАХ *Chara in vivo*

© 2023 А.А. Булычев*, С.Ю. Шапигузов, А.В. Алова

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: bulychev@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 31.05.2023

После доработки 30.06.2023

Принята к публикации 02.07.2023

Потенциалы действия растительных клеток участвуют в регуляции многих клеточных процессов, включая фотосинтез и течение цитоплазмы. Возбудимые клетки харовых водорослей, находясь в средах с повышенным содержанием K^+ , способны генерировать гиперполяризационные электрические сигналы. Активный ответ плазмалеммы возникает при пропускании входящего электрического тока, сравнимого по величине с природными токами, циркулирующими в освещенных междоузлиях *Chara*. В литературе отсутствуют сведения о влиянии гиперполяризационных ответов *Chara* на активность фотосинтеза. В данной работе показано, что гиперполяризационный сдвиг мембранного потенциала клетки, вызывающий поток K^+ в цитоплазму, сопровождается задержанным снижением выхода фактической флуоресценции хлорофилла (F') и максимального выхода (F_m') на фоновом свете с интенсивностью $12,5 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$. Переходные изменения F' и F_m' проявлялись только в освещенных клетках, что свидетельствует об их тесной связи с фотосинтетическим преобразованием энергии в хлоропластах. Пропускание входящего тока вызывало также возрастание рН у поверхности клетки (pH_0), что служит показателем высокой H^+/OH^- -проводимости плазмалеммы и указывает на снижение рН цитоплазмы при поступлении в клетку протонов. Сдвиги pH_0 проявлялись лишь в ответ на первый гиперполяризующий импульс, но исчезали при повторной стимуляции, что свидетельствует о длительной инактивации H^+/OH^- -проводимости плазмалеммы. Подавление потоков H^+ через плазмалемму не устраняло гиперполяризационные ответы и анализируемые изменения флуоресценции хлорофилла. Результаты указывают на участие потоков K^+ между средой, цитоплазмой и стромой в изменениях состояния хлоропластов, выявляемых по динамике выхода флуоресценции F' и F_m' .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Chara*, электрические сигналы, гиперполяризация, K^+ -проводимость плазмалеммы, изменения флуоресценции хлорофилла, транспорт H^+ , взаимодействия плазмалеммы и хлоропластов.

DOI: 10.31857/S0320972523100044, EDN: OSQNJB

ВВЕДЕНИЕ

Многие процессы растительной клетки, такие как фотосинтез, передача сигналов и внутриклеточная регуляция, связаны с изменением электрических потенциалов на плазмалемме и мембранах органелл. Возбудимые мембраны генерируют потенциалы действия в ответ на механическую, химическую и электрическую стимуляцию. Мембраны тилакоидов осуществляют фотосинтетический

транспорт электронов (ФТЭ), сопряженный с переносом H^+ и генерацией фотопотенциала. В лаборатории Л.А. Драчева был предложен эффективный способ изучения электрогенеза фототрофных бактерий с использованием полимерных пленок и адсорбированных пигмент-белковых комплексов и хроматофоров [1]. Действие коротких вспышек позволяло устранить ряд кинетических ограничений, таких как темновая инактивация акцепторного участка фотосистемы I (ФСІ) и

Принятые сокращения: ГО – гиперполяризационный ответ; ИПВ – искусственная прудовая вода; КВ – квантовый выход переноса электронов; ПД – потенциал действия; ФТЭ – фотосинтетический транспорт электронов; Фл – флуоресценция; ФС – фотосистема; ФСА – фотосинтетический аппарат; Хл – хлорофилл; NPQ – нефотохимическое тушение; pH_0 – рН в примембранных слоях среды.

* Адресат для корреспонденции.

замедление ФТЭ при повышении ΔpH в тилакоидах. Вместе с тем лимитирующие факторы существенно влияют на ФТЭ в изолированных пластидах и хлоропластах целых клеток, модулируя индукционные кривые мембранного потенциала и флуоресценции (Фл) хлорофилла (Хл) [2, 3]. В связи с этим понятен интерес к изучению путей регуляции ФТЭ *in vivo*, которые намного разнообразнее, чем в препаратах тилакоидов и интактных пластид. Влияние электрических сигналов плазмалеммы на фотосинтез представляет один из аспектов этой проблемы.

Метод импульсно модулированной микрофлуориметрии позволяет судить о квантовом выходе фотореакции ФСII (КВ ФСII) и скорости линейного ФТЭ на микроучастках клетки, а также следить за быстрыми изменениями нефотохимического тушения (NPQ), которые отражают величину ΔpH в тилакоидах. Исследования возбудимых клеток водоросли *Chara* выявили участие электрогенеза плазмалеммы в регуляции потока электронов при фотосинтезе. Генерация потенциала действия (ПД) в освещенных клетках вызывала быстрое (~30 с) снижение КВ ФСII с амплитудой до 50% от исходного уровня, а также возрастание NPQ на период до 15 мин [4, 5]. Очевидно, что состав компонентов цитоплазмы (ионов и метаболитов) весьма лабилен и зависит от состояния ионных каналов плазмалеммы. Опыты с чередованием локального и общего освещения клетки говорят о том, что пространственная неоднородность цитоплазмы, обусловленная наличием фотосинтетически активных и неактивных зон, остается скрытой в стационарных условиях при регистрации Фл на заданном участке клетки, но проявляется после обратной остановки цикла при возбуждении [6].

Изменения состава цитоплазмы представляют лишь одно звено в цепи трансформации сигнала плазмалеммы до функциональных проявлений на уровне хлоропластов. Важной стадией в каскаде событий является перенос в строму из цитоплазмы агентов-посредников, к которым относятся прежде всего H^+ и Ca^{2+} [7, 8]. Влияние Ca^{2+} на Фл Хл опосредовано его действием на активность ферментов и сопутствующими сдвигами pH в строуме и люмене. При генерации ПД в клетках растений уровень $[Ca^{2+}]_{цит}$ повышается от 0,1 до 10–40 мкМ [9]. Это способствует поступлению Ca^{2+} в освещенные пластиды под влиянием отрицательного потенциала стромы [10]. Известно, что повышение $[Ca^{2+}]$ в строуме подавляет реакции цикла Кальвина и потребление в этих реакциях АТФ и NADPH [11].

При этом возрастает ΔpH в тилакоидах, что усиливает NPQ и замедляет линейный поток электронов [12].

Внутренняя мембрана оболочки хлоропластов содержит ионные каналы, проницаемые для одно- и двухвалентных катионов, а также системы обменного транспорта K^+/H^+ (KEA1/2) [13–15]. Важная роль ионного обмена, опосредованного транспортерами KEA1/2, выявляется по нарушениям фотосинтеза при выращивании мутантных растений на средах с разным солевым составом. В опытах с выделенными хлоропластами показано, что удаление K^+ из наружной среды понижает pH стромы и замедляет фотосинтетическое выделение O_2 в связи с K^+/H^+ -обменом [16]. Вместе с тем остается неясным, сказываются ли воздействия, повышающие уровень K^+ в цитоплазме и строуме пластид, на функциональных параметрах хлоропластов в краткосрочных опытах *in vivo*.

Электрическая активность клеток харовых водорослей не ограничена генерацией ПД. Стимуляция клеток входящим электрическим током в средах с повышенным содержанием K^+ вызывает активный гиперполяризационный ответ (ГО), представленный немонокотонными изменениями мембранного потенциала [17, 18]. Важно отметить, что индуцирующие гиперполяризацию токи сравнимы по величине с природными круговыми электрическими токами освещенных клеток. Наблюдаемый в ходе ГО сдвиг мембранного потенциала обусловлен частичной инактивацией K^+ -проводимости, а также параллельным включением других мало изученных электрогенных механизмов. Сведения о возможном влиянии ГО у харовых водорослей на Фл Хл в настоящее время отсутствуют. Однако они представляют интерес, поскольку потоки ионов, связанные с этим сигналом плазмалеммы, кардинально отличаются от потоков, запускаемых при ПД. В ходе измерений ГО исследуемая часть клетки находится в среде с концентрацией $K^+ \sim 100$ мМ и полностью деполяризована. Отрицательный сдвиг потенциала цитоплазмы при пропуске входящего тока заставляет K^+ поступать внутрь в количествах, превышающих потоки других ионов. Это связано с высокой проницаемостью мембраны для K^+ и высокой концентрацией K^+ в среде. Благодаря транспортерам мембран оболочки накопление K^+ в цитоплазме должно индуцировать поступление K^+ в строму хлоропласта в обмен на удаление H^+ из стромы. В таком случае ГО может модулировать Фл хлоропластов при участии K^+/H^+ -обмена через оболочку пластид.

В данной работе изучено влияние электрических сигналов плазмалеммы *Chara* и *Nitella* на Фл Хл как показатель состояния фотосинтетического аппарата (ФСА). Показано действие гиперполяризации на выход фактической флуоресценции (F') и максимальный выход (F_m') на фоновом свете. Результаты выявляют связи между ГО плазмалеммы, потоками H^+ из среды в цитоплазму и параметрами Фл хлоропластов, что расширяет сведения о путях регуляции фотосинтеза при участии электрической активности плазмалеммы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на клетках междоузлий харовых водорослей *Chara australis* R. Br. и *Nitella translucens* (Pers.) C. Agardh. Культуры были получены из лаборатории профессора Ilse Foissner (University of Salzburg). Водоросли выращивали в стеклянных сосудах при комнатном освещении. Интернодальные клетки длиной 40–50 мм и диаметром 0,9 мм и 0,3 мм (для *Chara* и *Nitella* соответственно) вырезали из побега и помещали в искусственную прудовую воду (ИПВ), содержащую 0,1 мМ KCl, 1 мМ NaCl и 0,1 мМ CaCl₂. В подготовленный раствор вносили NaHCO₃ для доведения pH до 7,0. Изолированные клетки выдерживали в ИПВ не менее суток после их отделения от примыкающих междоузлий.

Закончившие рост междоузлия *Chara* структурно неоднородны. В цитоплазме по длине междоузлия чередуются области с высоким и низким содержанием хлоропластов — особых оргanelл с высоким содержанием H^+ -АТФазы, способствующих поступлению в клетки субстрата фотосинтеза (CO₂) [19]. Неоднородные свойства проявляются также в чередовании вдоль оси кальцинированных и свободных от кристаллов областей на поверхности клетки. Кальцинированные области, как правило, располагаются в участках с низкой активностью фотосинтеза и высоким pH в примембранных слоях среды. Измерения Фл хлоропластов и мембранного потенциала плазмалеммы проводили в некальцинированных или слабо кальцинированных участках клеток.

Интернодальную клетку укрепляли в трехсекционной прозрачной камере (рис. 1), которую помещали на столик инвертированного микроскопа Axiovert 25-CFL («Zeiss», Германия), оснащенного микрофлуориметром Microscopy-PAM («Walz», Германия). Между секциями камеры имелись воздушные полости диаметром 4 мм, служившие для электриче-

ской изоляции отсеков. Площадь поверхности клетки *Chara* в центральной секции составляла примерно 0,1 см². Раствор в центральной отсеке контактировал с электродом сравнения Ag/AgCl (площадь поверхности ~15 см²) через гибкий солевой мостик, заполненный раствором 1 М KCl с добавлением 2% агара. Разность потенциалов на плазмалемме измеряли с помощью капиллярных микропипеток из стекла пирекс. Измерения проводили в средней части клетки, расположенной в центральном отсеке. Разность потенциалов регистрировали электрометрическим усилителем У5-9 («НПО им. В.И. Ленина», Минск, СССР); напряжение с выхода усилителя поступало на аналого-цифровой преобразователь (PCI-6024E, «National Instruments», США) и монитор компьютера.

В боковых отсеках камеры находились соединенные между собой электроды Ag/AgCl, к которым через нагрузочное сопротивление 1,2 МОм прикладывали командное напряжение от АЦП (PCI-6024E) для пропуска ступени тока. Сила тока варьировала от 3 до 8 мкА, что соответствовало плотности тока от 30 до 80 мкА/см² в центральной части клетки *Chara*.

Флуоресценцию Хл измеряли на участках клеток диаметром ~100 мкм. Выход фактической флуоресценции F' при фоновом освещении клетки измеряли с помощью модулированного синего света, излучаемого светодиодом устройства Microscopy-PAM («Walz», Германия).

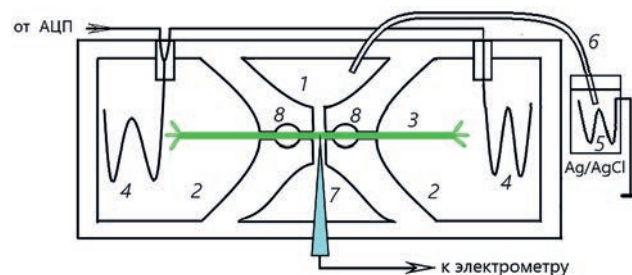


Рис. 1. Схема расположения интернодальной клетки и электродов в трехсекционной экспериментальной камере. 1 — Центральный отсек, заполненный средой с повышенной концентрацией KCl; 2 — боковые отсеки, заполненные искусственной прудовой водой; 3 — интернодальная клетка водоросли *Chara* (*Nitella*); 4 — электроды Ag/AgCl, используемые для пропуска электрического тока; 5 — электрод сравнения Ag/AgCl, общий для измерительной цепи и пути пропуска тока; 6 — гибкий солевой мостик; 7 — электродный микродатчик (капиллярный внутриклеточный электрод для измерения мембранного потенциала плазмалеммы или pH-чувствительный внеклеточный микроэлектрод для измерения локальных сдвигов pH на поверхности клетки); 8 — воздушные полости, обеспечивающие электрическую изоляцию между центральным и боковыми отсеками

Вспышки измерительного света длительностью 5 мкс следовали с частотой 24 Гц. Длительность насыщающих вспышек, создаваемых тем же светодиодом, составляла 800 мс. Перед входным окном фотоумножителя был расположен красный светофильтр RG645 толщиной 2 мм («Schott», Германия). Подробное описание устройства Microscopy-PAM можно найти на сайте компании «Walz» (<https://www.walz.com/downloads.html>); особенности измерения выхода флуоресценции хлорофилла на одиночных клетках описаны в работе Goh et al. [20]. Общее фоновое освещение клетки создавали верхним осветителем микроскопа, свет от которого проходил через сине-зеленый (СЗС-22, $\lambda < 580$ нм) и нейтральный (НС-3) светофильтры. Интенсивность фоновой подсветки составляла 12,5 мкмоль квантов/м²·с. Эффективный КВ переноса электронов в ФСII находили с помощью насыщающих световых импульсов и программы WinControl-3 («Walz», Германия). Значения КВ ФСII (YII) на фоновом свете в контрольных условиях составляли 0,7–0,745. Выходной сигнал ФЭУ обрабатывали в программах WinControl-3 и WinWCP («Strathclyde Electrophysiology», Великобритания) и выводили на монитор компьютера.

Влияние гиперполяризационного ответа на максимальный выход флуоресценции F_m' изучали с применением насыщающих световых импульсов, разделенных интервалами 10 с. Включение серии насыщающих импульсов обычно сопровождалось заметным снижением амплитуды F_m' . В связи с этим клетку стимулировали ступенчатым импульсом тока после замедления вызванного вспышками падения F_m' .

Величину рН у поверхности клетки (рН_o) измеряли с помощью Н⁺-специфичных сурьмяных микроэлектродов в стеклянной изоляции и электрометрического усилителя У5-9 [4]. При обработке исходных показаний микродатчика рН вычитали постоянное падение напряжения, создаваемое током на последовательном сопротивлении среды, солевого мостика и электрода сравнения.

В работе использовали раствор цитохалазина D («Sigma», США) в диметилсульфоксиде (ДМСО), который разводили до конечной концентрации 10–20 мкМ. Конечная концентрация ДМСО не превышала 0,2%. В данной концентрации ДМСО не оказывает влияния на параметры Фл Хл, мембранный потенциал и скорость движения цитоплазмы.

На рисунках приведены результаты типичных опытов, выполненных не менее чем на четырех клетках. Усредненные кинетические

кривые сдвигов F' со стандартными ошибками представлены с указанием общего числа измерений (n) на разных клетках (N). Для усреднения значений F' , полученных на разных клетках, кинетические кривые нормировали на средние уровни флуоресценции в интервале времени 0–25 с, регистрируемые до приложения импульса тока. Усредненная кинетика F_m' для разных клеток получена после нормирования значений F_m' в ответ на первый насыщающий импульс в серии из 30 вспышек.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мембранный потенциал освещенных клеток *Chara* в стандартных условиях (клетки, омываемые ИПВ) составлял от –170 до –210 мВ. Стимуляция клетки деполяризующим импульсом тока (2 мкА, 150 мс) вызывала генерацию потенциала действия с амплитудой до 200 мВ, которая сопровождалась кратковременной остановкой течения цитоплазмы и его возобновлением за время ~5 мин при температуре 25 °С.

Влияние света и течения цитоплазмы на гиперполяризационный ответ плазмалеммы. Измерения характерных значений мембранного потенциала в покое и при возбуждении в начале каждого опыта, а также регистрация эффективного квантового выхода переноса электронов в реакции ФСII на уровне 0,7–0,745 служили показателем адекватного физиологического состояния клетки. После замены ИПВ в центральном отсеке камеры на аналогичный раствор с высоким содержанием KCl (0,1 М) пропускание стандартного надпорогового импульса тока вызывало скачкообразную деполяризацию клетки до уровня мембранного потенциала ~0 мВ. Это состояние характеризуется высокой K⁺-проводимостью плазмалеммы [21] и мембранным потенциалом, соответствующим нулевому равновесному нернстовскому потенциалу.

Последующее пропускание прямоугольного импульса входящего тока (плотность тока 30–80 мкА/см², длительность импульса 50–75 с) сопровождалось генерацией активного гиперполяризационного ответа (рис. 2). Развитие ГО характеризуется ускоряющимся нарастанием отрицательного потенциала цитоплазмы, которое завершается острым спайком и последующей небольшой деполяризацией мембраны [22]. При равных концентрациях K⁺ в среде и цитоплазме (~100 мМ) отрицательный сдвиг мембранного потенциала заставляет ионы K⁺ поступать в клетку в связи с высокой K⁺-проводимостью мембраны.

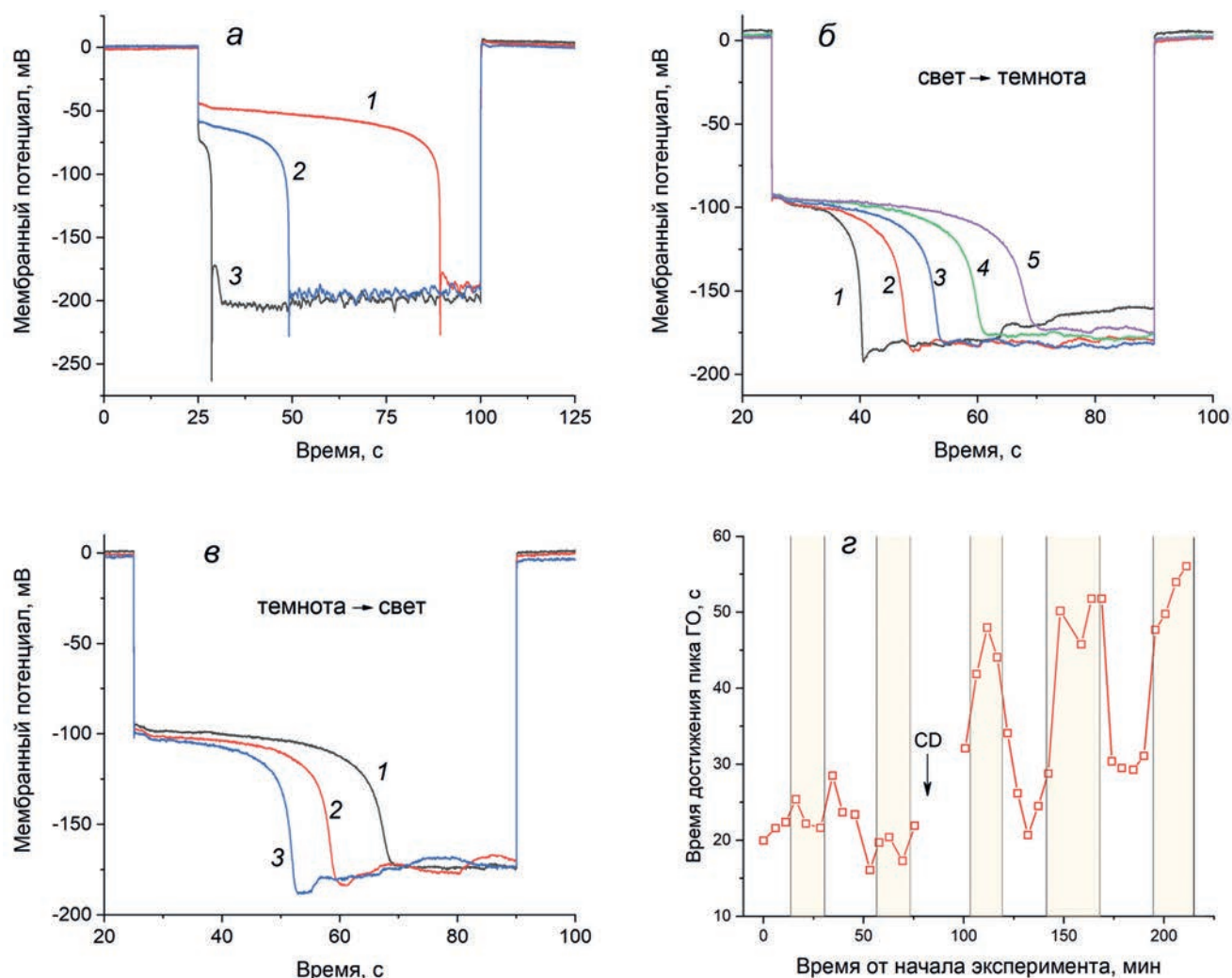


Рис. 2. Гиперполяризационные ответы (ГО) клеток *Chara*, вызываемые пропусканием входящего электрического тока в присутствии 0,1 М КСl в среде. *a* – Кинетические кривые ГО при разной плотности электрического тока: 33 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (1); 45 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (2); 50 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (3). *б* – Кинетические кривые ГО, наблюдаемые в присутствии 20 μM цитохалазина D после переноса клетки в темноту: на фоновом свете (плотность потока квантов – 12,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) (1); через 0,5, 5, 10 и 15 мин после выключения фонового освещения (2–5 соответственно). *в* – Кинетические кривые ГО той же клетки в присутствии цитохалазина D после перехода от темноты к освещению через 0,5, 5 и 10 мин после включения света (1–3 соответственно). Плотность электрического тока в период импульса на панелях (*б*) и (*в*) составила 33 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. *з* – Влияние смены световых условий на время достижения пика ГО от момента включения входящего тока в отсутствие ингибиторов и после подавления циклоза 20 μM цитохалазином D (CD). Момент внесения CD отмечен стрелкой. Вертикальные светлые и затененные полосы отмечают периоды освещения и затемнения клетки соответственно; плотность тока в период импульсов – 58 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

Время достижения пиковой гиперполяризации сокращалось с повышением плотности входящего тока (рис. 2, *a*). При этом стационарный потенциал, наблюдаемый после спайка, слабо зависел от плотности тока. Стадии пиковой гиперполяризации и последующей быстрой деполяризации заметно сглаживались при обработке клеток цитохалазином D, ингибитором полимеризации актина (рис. 2, *б* и *в*). Сходное подавление этих стадий ранее наблюдали при действии цитохалазина B на поверхностную мембрану изолированной капли цитоплазмы, не содержащей хлоропластов ([22]

и ссылки в ней). В наших опытах внесение в среду 20 μM цитохалазина D вызывало остановку течения цитоплазмы. В присутствии ингибитора кинетические кривые ГО при постоянной плотности тока существенно зависели от освещения клетки (рис. 2, *б* и *в*).

При затемнении клетки время достижения спайка возрастало в течение ~20 мин (рис. 2, *б*), а при возобновлении освещения – сокращалось (рис. 2, *в*). Интересно, что влияние смены световых условий на ГО, наблюдаемое в присутствии цитохалазина D, не проявлялось в контрольных условиях без до-

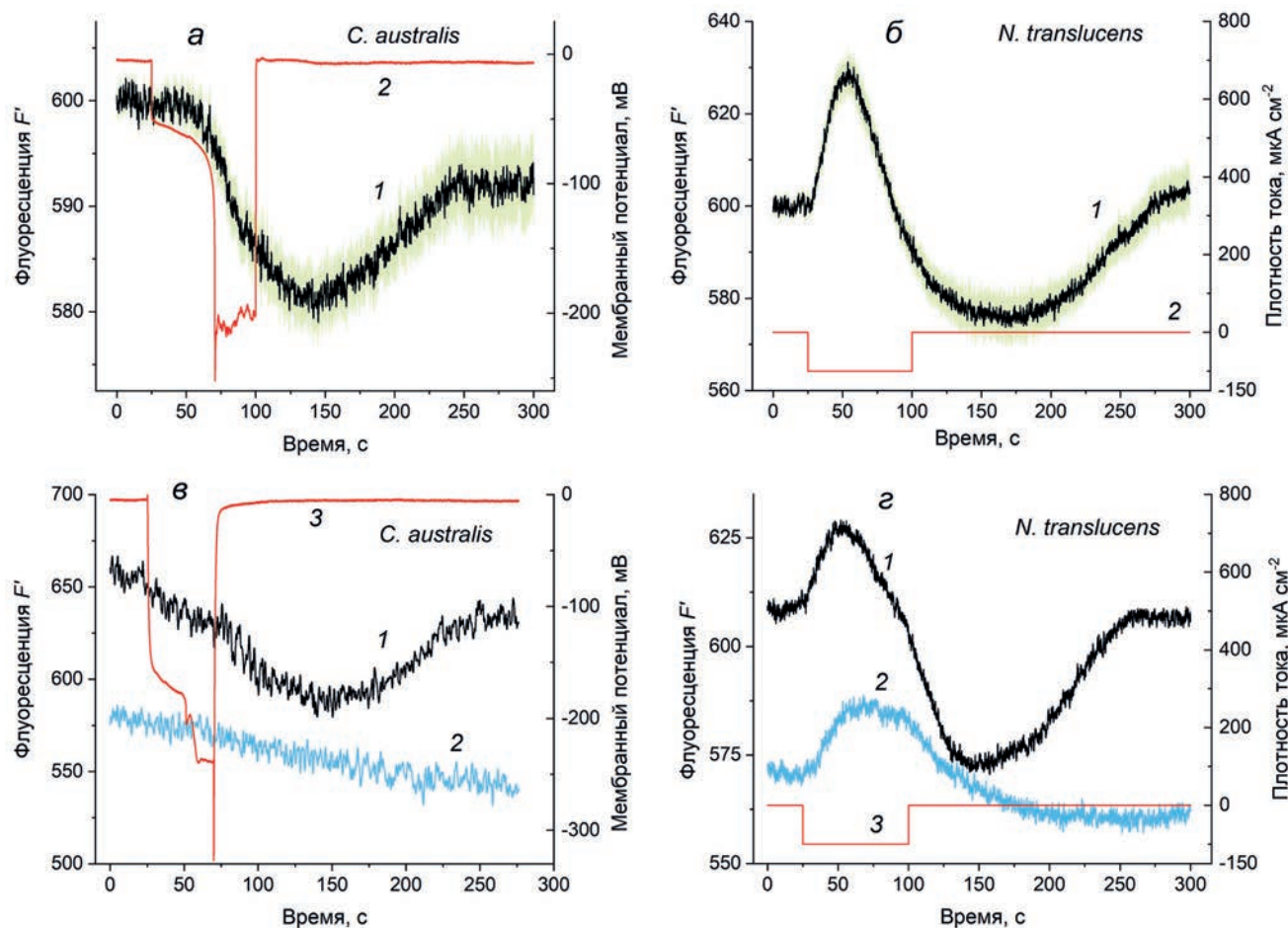


Рис. 3. Изменения флуоресценции хлорофилла F' , вызванные ступенью входящего электрического тока в клетках водорослей *Chara australis* (а, в) и *Nitella translucens* (б, г). а – Динамика изменений F' (1) и мембранного потенциала (2), вызванных пропусканием входящего тока. Изменения F' (1, черная линия) представляют усредненную запись ($n = 45$, $N = 9$) на фоне стандартной ошибки среднего. Кривая 2 отражает изменения мембранного потенциала, вызванные импульсом тока с плотностью 35 мкА/см^2 . б – Изменения Фл Хл в клетках *N. translucens* (кривая 1), вызванные импульсом входящего тока плотностью 100 мкА/см^2 (кривая 2). Усредненная динамика значений F' представлена на фоне стандартной ошибки ($n = 11$, $N = 4$). в и г – Зависимость индуцируемого гиперполяризацией снижения F' от световых условий в опытах с клетками *C. australis* и *N. translucens* ($n = 9–11$). 1 – Изменения F' на свету; 2 – изменения F' в темноте. Кривая 3 на панели (в) показывает изменения напряжения в период ГО, а на панели (г) – плотность тока на центральном участке клетки

бавления этого ингибитора. Как видно из рис. 2, г, времена достижения пика ГО на свету и в темноте примерно совпадали при нормальном течении цитоплазмы, но существенно различались при подавлении циклоза цитохалазином D.

Таким образом, хлоропласты оказывают влияние на ионные каналы плазмалеммы при нарушениях актинового цитоскелета. Переходы «свет–темнота», вероятно, модифицируют состав цитоплазмы, что сказывается на состоянии каналов плазмалеммы, участвующих в генерации ГО. Однако это влияние нивелируется при активном течении цитоплазмы, которое сглаживает состав цитоплазмы между частями клетки с разной активностью фотосинтеза.

Влияние гиперполяризационного ответа на выход флуоресценции F' . Наибольший интерес представляло возможное влияние ГО на параметры Фл Хл, которые отражают редокс-состояние фотосинтетической электрон-транспортной цепи и энергозависимую диссипацию возбужденных состояний (NPQ). Создание движущей силы для потока K^+ из среды в цитоплазму при отрицательном смещении мембранного потенциала плазмалеммы должно сопровождаться накоплением K^+ в цитоплазме, что, в свою очередь, может индуцировать K^+/H^+ -обмен через оболочку хлоропластов и оказывать влияние на флуоресценцию хлоропластов.

На рис. 3, а и б показаны изменения выхода флуоресценции F' , индуцируемые импуль-

сом входящего тока в клетках водорослей *Chara australis* и *Nitella translucens*, помещенных на фоновый свет низкой интенсивности ($12,5 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$). У обоих видов изменения F' включали задержанную стадию снижения выхода Фл, которая начиналась примерно через 25 с от момента приложения импульса тока и продолжалась в течение ~ 50 с после завершения ГО.

В клетках *N. translucens* снижению F' предшествовала стадия возрастания Фл, которая начиналась с первых секунд после приложения импульса тока. У клеток *C. australis* иногда наблюдали возрастание F' , предшествующее снижению F' , однако эта стадия не проявлялась на усредненных записях. Появление противоположно направленных изменений F' , связанных с ГО, указывает на протекание нескольких процессов различной природы. Среди них только медленные изменения F' могут быть следствием K^+/H^+ -обмена через мембранную оболочку хлоропластов, поскольку высокая концентрация K^+ в цитоплазме ($\sim 100 \text{ мМ}$) исключает ее быстрые изменения. Причины быстрого возрастания Фл в клетках *N. translucens* на данный момент не ясны. Не исключено, что протекание входящего тока связано с электроосмотическим поступлением воды в цитоплазму и внешне неразличимым набуханием пластид. Об этом косвенно говорит тот факт, что возрастание F' проявлялось наиболее отчетливо в клетках малого диаметра с повышенным отношением площади поверхности к объему (*N. translucens*).

Стадию задержанного снижения флуоресценции при генерации ГО наблюдали только на освещенных клетках *C. australis* и *N. translucens*; при помещении клеток в темноту развитие ГО не вызывало таких изменений F' (рис. 3, в и г). При этом стадия возрастания F' , отчетливо заметная у клеток *N. translucens*, не зависела от условий освещения. Это подтверждает предположение о разной природе изменений Фл различной полярности.

Влияние гиперполяризационного ответа на выход флуоресценции F_m' . В междуузлиях *Chara*, помещенных в стандартную ИПВ с концентрацией $\text{K}^+ 0,1 \text{ мМ}$, значения F_m' на слабом свете приближались к наибольшему уровню, что означает отсутствие нефотохимического тушения. Вместе с тем замена ИПВ на среду с добавлением $0,1 \text{ М КСл}$ приводила к заметному снижению F_m' , т.е. к появлению NPQ. В связи с этим мы изучили влияние гиперполяризации плазмалеммы на уровень F_m' как индикатор NPQ. На рис. 4 показаны результаты типичного опыта, в котором насыщающие све-

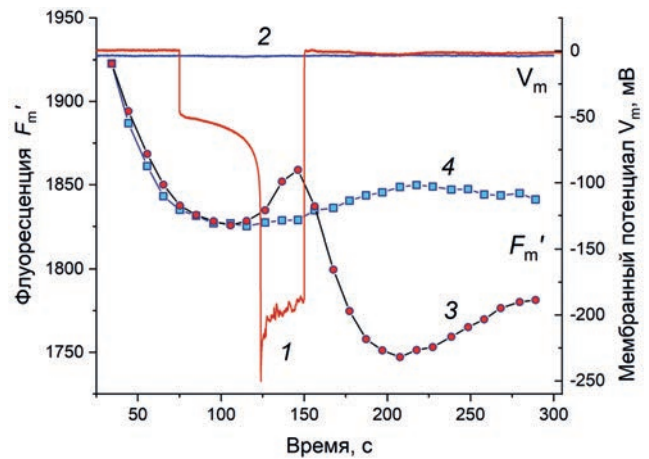


Рис. 4. Гиперполяризационный ответ плазматической мембраны в K^+ -проводящем состоянии и его влияние на флуоресценцию F_m' . Гиперполяризацию плазмалеммы (кривая 1) индуцировали пропусканием импульса входящего тока (42 мкА/см^2 , длительность 75 с) при слабом фоновом освещении ($12,5 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$); в отсутствие электрической стимуляции мембранный потенциал оставался стабильно деполаризованным (кривая 2). Кривые с символами представляют изменения F_m' , наблюдаемые при генерации ГО (кривая 3), а также без индукции ГО (кривая 4). Монотонное снижение F_m' на отрезке времени $t \leq 75-100$ с вызвано включением серии насыщающих световых импульсов. Кривые (3) и (4) получены в типичном опыте при усреднении результатов по пяти измерениям для каждого варианта

товые импульсы, тестирующие F_m' , применяли либо в сочетании с электрической стимуляцией, либо без электростимуляции. Клетку поочередно подвергали нескольким циклам таких воздействий: записи с индукцией ГО чередовали с записями при стационарной деполаризации. Запуск насыщающих вспышек с интервалами в 10 с часто сопровождался начальным снижением F_m' (рис. 4, кривые 3 и 4; участки при $t \leq 75$ с). После замедления спада F_m' (через 75 с после начала записи) подавали ступень тока для индукции ГО плазмалеммы на исследуемом участке клетки (рис. 4, кривая 1). В тех же условиях без пропуска тока плазмалемма оставалась в деполаризованном состоянии (рис. 4, кривая 2).

Как видно из рис. 4, кривые изменений F_m' (3) и (4) практически совпадали на начальном участке (при $t \leq 75$ с) — до индукции ГО. Вместе с тем выявлено существенное расхождение записей при $t > 100$ с в зависимости от генерации или отсутствия ГО (рис. 4, кривые 3 и 4). В варианте опыта, когда плазмалемма оставалась в деполаризованном состоянии, значения F_m' выходили к постоянному уровню после сглаженного максимума (рис. 4, кривая 4). В случае индуцированной гиперполяризации плазмалеммы наблюдали небольшое

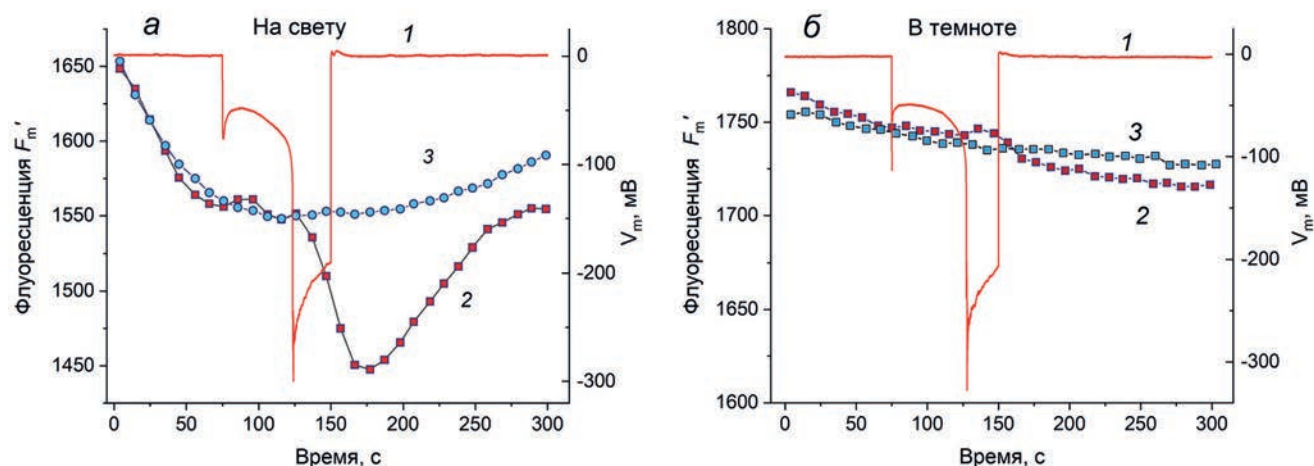


Рис. 5. Зависимость вызываемых гиперполяризацией изменений F_m' от световых условий. *а* – Гиперполяризация плазмалеммы освещенных клеток вызывает задержанное снижение F_m' . *б* – Влияние гиперполяризации на F_m' исчезает после переноса клетки в темноту. 1 – Изменения мембранного потенциала, вызванные прямоугольным импульсом тока (83 мкА/см²); 2 – изменения F_m' , вызываемые насыщающими световыми импульсами и генерацией ГО: на свету (*а*) и в темноте (*б*). 3 – Изменения F_m' , вызываемые насыщающими световыми импульсами в покое (без электро-стимуляции и индукции ГО). Записи кривых (2) и (3) отражают средние значения, полученные по двум измерениям для каждого варианта опыта

возрастание (или плечо) F_m' , которое сменялось сильным снижением F_m' (рис. 4, кривая 3). Последующее восстановление флуоресценции F_m' занимало ~10 мин. Кинетические кривые изменений F_m' проявляли некоторое сходство с изменениями F' при ГО. Квантовая эффективность переноса электронов в ФСII (параметр YII) претерпевала сравнительно небольшое понижение ($\leq 0,03$) при низкой интенсивности фонового освещения. Вместе с тем при интенсивности света 25 мкмоль/м²·с вызванное гиперполяризацией снижение КВ ФСII достигало существенных величин (~0,15 ед.). При помещении клеток в темноту развитие ГО не оказывало влияния на КВ ФСII.

Как показано на рис. 5, влияние ГО на F_m' проявлялось только на свету, но исчезало после затемнения клетки. В освещенной клетке кинетические кривые изменений F_m' при действии гиперполяризующего стимула и в его отсутствие резко различались (рис. 5, *а*). Однако после помещения клетки в темноту изменения F_m' при пропускании тока и без стимуляции практически совпадали (рис. 5, *б*). Таким образом, фотосинтетический перенос электронов, сопряженный с мембранным транспортом H^+ , является необходимым условием для передачи сигнала от плазматической мембраны к хлоропластам.

Трансмембранные потоки H^+ при гиперполяризации и их инактивация. При высокой K^+ -проводимости плазмалеммы трансмембранные потоки K^+ являются преобладаю-

щими. Вместе с тем отрицательный сдвиг потенциала цитоплазмы при ГО предположительно может вызвать перераспределение H^+ между цитоплазмой и средой, поскольку плазмалемма освещенных клеток *Chara* обладает проводимостью для ионов H^+ или OH^- [4, 5]. В связи с этим были проведены измерения рН в примембранных слоях среды (рН₀) при индуцированной током гиперполяризации плазмалеммы *Chara*.

Кривая 1 на рис. 6, *а* показывает сдвиги рН₀, вызываемые пропусканием ступени входящего тока через плазмалемму клеток *Chara*. Видно, что гиперполяризующий импульс вызывает повышение рН₀ примерно на 0,5 ед., которое в ряде случаев, но не всегда, продолжается некоторое время после завершения импульса тока. Скорость изменений рН₀ возрастала в период действия стимула, что предположительно связано с нарастающей гиперполяризацией и увеличением движущей силы для поступления H^+ из среды в цитоплазму. По завершении импульса тока значения рН₀ опускались, как правило, ниже исходного уровня (рис. 6, *а*; кривая 1), однако понижение рН₀ со временем ослаблялось (рис. 6, *а*; кривая 2).

В отличие от действия первого электро-стимула на рН₀, приложение второго или, реже, третьего импульса тока не вызывало существенных сдвигов рН₀ (рис. 6, *а*; кривая 2). Это говорит о почти полной инактивации пассивной H^+ -проводимости плазмалеммы в результате действия первого гиперполяризующего стимула. На отдельных клетках H^+ -про-

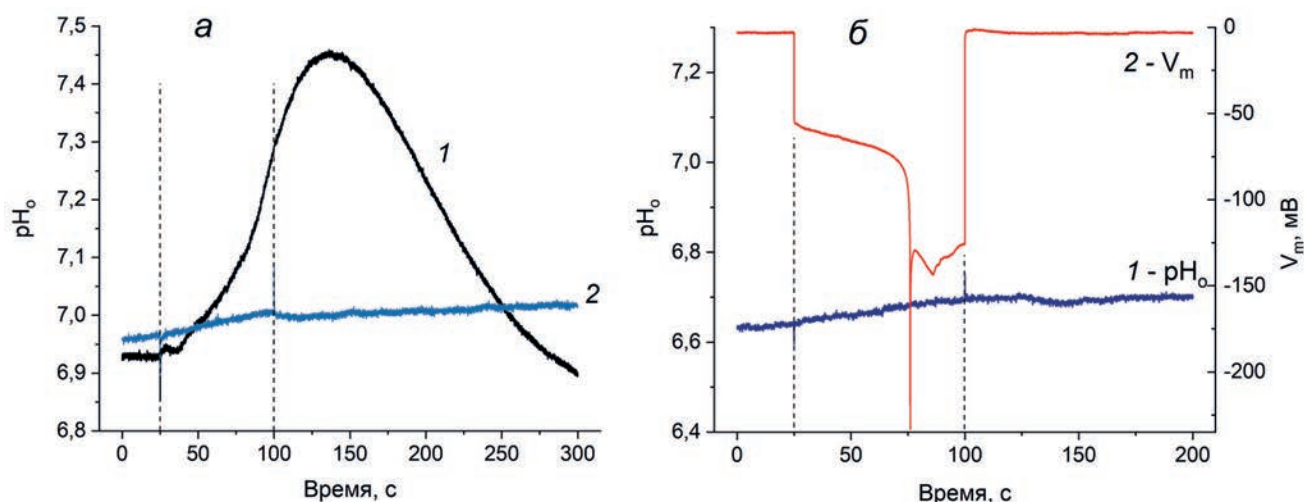


Рис. 6. Изменения рН в примембранных слоях среды при индуцированной током гиперполяризации. *а* – Изменения рН у поверхности клетки *Chara* (pH_o) при пропускании через плазмалемму гиперполяризующего импульса тока (плотность тока 58 мкА/см^2): 1 – повышение pH_o в ответ на первый импульс тока указанной силы; 2 – исчезновение сдвигов pH_o при последующем приложении импульса тока той же силы. *б* – Подавление изменений pH_o в ответ на повторные пропускания тока через плазмалемму (кривая 1, pH_o) не устраняло гиперполяризационные изменения мембранного потенциала (кривая 2, V_m). Результаты, представленные на панелях (*а*) и (*б*), получены на разных клетках. Штриховые вертикальные прямые отмечают время включения и отключения входящего в клетку электрического тока

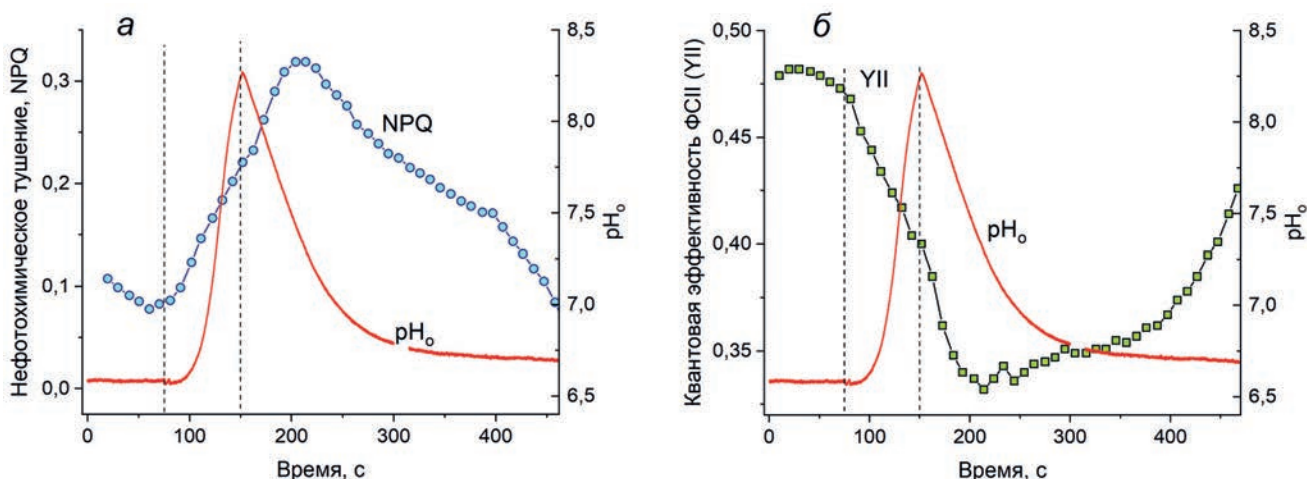


Рис. 7. Изменения нефотохимического тушения (NPQ), эффективного квантового выхода фотореакции ФСII (YII) и pH_o на поверхности клетки *Chara* (pH_o), вызванные пропусканием гиперполяризующего импульса тока с плотностью 33 мкА/см^2 . Центральный отсек камеры заполнен средой (ИПВ) с добавлением 30 мМ KCl ; интенсивность фонового освещения – $25 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$. Вертикальные штриховые линии отмечают моменты включения и выключения электрического тока

водимость восстанавливалась после периода покоя $\sim 1 \text{ ч}$. Однако во многих случаях восстановления H^+ -проводимости в непрерывном эксперименте заметить не удалось. Тем не менее сдвиги pH_o в ответ на импульс тока восстанавливались на следующие после опыта сутки при нахождении клеток в стандартной ИПВ. Данные, представленные на рис. 6, *б*, показывают, что подавление H^+ -проводимости плазмалеммы (кривая 1) не оказывало ингибирующего действия на развитие ГО (кривая 2).

Как видно из рис. 7, сдвиги pH_o , связанные с пропусканием гиперполяризующего импульса тока, достигают 1,5 ед. и сопровождаются значительным возрастанием нефотохимического тушения (рис. 7, *а*), а также переходным снижением эффективного квантового выхода фотореакции ФСII (рис. 7, *б*). В параллельных опытах было проверено возникновение ГО в данных условиях проведения эксперимента. Уменьшение квантового выхода YII говорит о переходном торможении линейного фотосинтетического потока электронов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клетки многих растений отвечают на физиологические и повреждающие стимулы генерацией электрических сигналов (потенциал действия, переменный потенциал), которые вызывают изменения фотосинтеза и Фл Хл [4, 5, 23]. Пути трансформации сигнала плазмалеммы до уровня мембран хлоропластов прослежены лишь частично. Зависимость состояния ФСА от электрической активности плазмалеммы удобно изучать на одиночных клетках *Characeae*, поскольку они сочетают возбудимость, течение цитоплазмы и пространственно неоднородное распределение потоков H^+ и фотосинтеза.

Способность плазмалеммы генерировать активные гиперполяризационные ответы известна уже давно [17, 24], однако связь ГО с другими клеточными процессами и его влияние на ФСА оставались неизученными. Мы обнаружили, что время достижения пика ГО меняется при переходах свет–темнота у клеток, в которых течение цитоплазмы остановлено вследствие нарушения актинового цитоскелета цитохалазином D. Влияние освещения и затемнения на скорость развития ГО (рис. 2), вероятно, обусловлено сдвигами состава цитоплазмы при запуске и отключении светозависимого транспорта через мембранную оболочку хлоропластов. Профиль продольного распределения компонентов цитоплазмы, обмениваемых через оболочку пластид, по-видимому, становится более неравномерным в отсутствие циклоза, поскольку интенсивное течение цитоплазмы сглаживает перепады концентрации этих компонентов. Это представление объясняет отсутствие заметного влияния освещения на развитие ГО при активном течении цитоплазмы, а также выраженную зависимость ГО от действия света после остановки циклоза.

На изолированной капле цитоплазмы ранее отмечали, что нарушение актинового цитоскелета под действием цитохалазина В устраняет острый пик ГО, предположительно вызванный активностью электрогенного насоса ([22] и ссылки в ней). Действие цитохалазина D на целые клетки (рис. 2) также сглаживало пик гиперполяризации и стадию деполяризации. Эти наблюдения говорят о том, что состояние актинового цитоскелета регулирует проводимость каналов, участвующих в формировании ГО. В литературе обсуждают разные варианты взаимодействия ионных каналов с актиновым цитоскелетом [25], которые, вероятно, применимы и к влиянию

кортикального актина на каналы плазмалеммы *Chara*. В основе чувствительности ГО к освещению клетки могут лежать изменения содержания Ca^{2+} и H^+ в цитоплазме, которые вызваны фотоиндуцированными потоками этих ионов через оболочку пластид и оказывают прямое или косвенное влияние на активность каналов. Пути воздействия Ca^{2+} и H^+ на цитоскелет растительной клетки рассмотрены в обзоре Nepler [26].

Основное внимание в работе уделено влиянию ГО на состояние ФСА, выявляемое по изменениям F' и F_m' . Здесь важно отметить возможные связи ГО с физиологическими процессами клетки. Известно, что в освещенных клетках *Chara* и *Nitella* циркулируют круговые электрические токи между частями клетки, образующими наружные кислые и щелочные зоны [27]. Плотность светозависимого входящего тока в «щелочных зонах» клеток *Chara* составляет 20–60 мкА/см² [28]. В нашей работе ГО плазмалеммы вызывали пропусканием электрического тока с плотностью 30–80 мкА/см². Таким образом, плотности индуцирующих ГО токов лежат в физиологическом диапазоне, а описанные взаимодействия между поверхностной мембраной и хлоропластами могут, в принципе, проявляться при повышении уровня K^+ в среде. При попадании освещенной клетки в среду с повышенным содержанием K^+ (10–100 мМ) входящий ток, возможно, вызывает защитное снижение K^+ -проводимости благодаря генерации ГО, а также блокирует проводимость для H^+ (рис. 6), чтобы исключить работу H^+ -насоса в режиме короткого замыкания.

Гиперполяризационные сигналы харовых водорослей имеют некоторые черты сходства с гиперполяризационными сигналами у высших растений, которые возникают при нагреве листа или его повреждении открытым пламенем. В частности, умеренный нагрев листьев пшеницы вызывал градуальную гиперполяризацию клеток на 10–20 мВ в течение 20 мин, которая сопровождалась возрастанием нефотохимического тушения [29]. Результаты, полученные на клетках *Chara*, показывают, что активные гиперполяризационные ответы большой амплитуды (~250 мВ), развивающиеся за сравнительно короткое время (10–75 с), вызывают заметное возрастание регулируемой диссипации энергии в ФСII (рис. 7, а), а также снижение квантового выхода реакции ФСII и торможение линейного потока электронов (рис. 7, б).

Особый интерес к изучению влияния ГО на клеточные процессы связан с тем, что отри-

цательный сдвиг мембранного потенциала в период развития ГО создает движущую силу для поступления K^+ в цитоплазму через мембрану, обладающую высокой K^+ -проводимостью. Поэтому ГО можно использовать в качестве инструмента для повышения уровня K^+ в цитоплазме и изучения последствий возрастания $[K^+]_{цит}$ на состояние ФСА.

В данной работе использовали сравнительно долгие интервалы между токовыми импульсами (600 с), чтобы не препятствовать восстановлению $[K^+]_{цит}$ при переходах от ГО к состоянию покоя. Клетки, подвергнутые неоднократной генерации ГО в ходе опыта, сохраняли жизнеспособность на следующий день, а измеряемые параметры – скорость течения цитоплазмы, эффективный КВ ФСII и потенциал покоя – оставались в пределах нормы. Как правило, перераспределение ионов в связи с генерацией ГО не вызывало необратимого повреждения клетки. Вместе с тем генерация ГО приводила к длительной инактивации потоков H^+/OH^- . В физиологических условиях проводимость для H^+/OH^- зависит от освещения. Потоки H^+/OH^- , вызванные генерацией ГО, проявлялись и на свету, и, изредка, в темноте. Вместе с тем остается неясным, зависят ли потенциал-чувствительные потоки H^+/OH^- от локализации анализируемого участка в фотосинтетически активных или неактивных областях.

Повышение $[K^+]_{цит}$ само по себе является недостаточным для воздействия на ФСА, но оно может влиять на ионный состав стромы при участии переносчиков, локализованных в оболочке пластид. Внутренняя мембрана оболочки содержит K^+/H^+ -антипортеры [13, 14, 30]. При повышении уровня $[K^+]_{цит}$ эти транспортеры должны переносить K^+ в строму в обмен на удаление H^+ из стромы пластид, причем активность KEA1/2 сохраняется и в темноте [31]. Повышение pH стромы, как известно, стимулирует реакции фиксации углекислоты, что может сместить редокс-состояние пластохинона и акцептора Q_A в сторону окисления и понизить фактический выход Фл F' (рис. 3). Согласно предполагаемой схеме, задержанные изменения F' и F_m' в ответ на гиперполяризацию плазматической мембраны обусловлены индукцией K^+/H^+ -обмена через оболочку хлоропластов.

Вместе с тем гиперполяризующие импульсы электрического тока потенциально могут влиять на водный баланс клетки и хлоропластов. Если просвет K^+ -каналов плазмалеммы несет фиксированные отрицательные заряды, нельзя исключать электроосмотиче-

ского поступления воды в цитоплазму клетки и сопутствующего набухания хлоропластов. Распределение гранальной системы в большем объеме, возможно, лежит в основе быстрого возрастания F' в клетках *N. translucens*, отличающихся повышенным отношением площади поверхности к объему (S/V). Кроме того, поступление K^+ в строму пластид в обмен на выход H^+ может также сопровождаться осмотической регуляцией объема хлоропластов. Учет всех сопутствующих факторов будет способствовать более глубокому пониманию механизмов влияния электрических процессов плазмалеммы на состояние и активность хлоропластов.

Гиперполяризация создает движущую силу не только для входа K^+ , но и для поступления H^+ в цитоплазму. Влияние сдвигов мембранного потенциала на pH цитозоля представлялось вероятным, поскольку плазмалемма *Chara* содержит пассивные пути, проводящие H^+ или OH^- [5, 27]. Ранее критерием существования H^+/OH^- -проводимости плазмалеммы служило образование узких щелочных зон на поверхности клеток при низком содержании K^+ в наружной среде и ярком освещении, т.е. в условиях циркуляции круговых электрических токов и низкой K^+ -проводимости. В данной работе показаны потоки H^+ , вызываемые гиперполяризацией при высокой K^+ -проводимости плазмалеммы (рис. 6 и 7).

Результаты, представленные на рис. 6 и 7, выявляют два принципиально различных типа изменений pH_0 после выключения входящего тока. Мгновенная смена знака изменений на пике pH на рис. 7 и продолжающееся нарастание pH после завершения импульса тока на рис. 6 говорят о том, что вызванные гиперполяризацией изменения pH включают стадии, имеющие разное происхождение. Сдвиги pH, меняющие направление после смещения мембранного потенциала к нулевым значениям, по-видимому, отражают потенциал-зависимый перенос H^+ (или OH^-) по проводящим путям плазмалеммы. В отличие от этого, изменения pH, продолжающиеся с почти прежней скоростью после устранения движущей силы (рис. 6), говорят об иной природе пост-гиперполяризационного сдвига pH. Такое нарастание pH имеет черты сходства с образованием локальной щелочной зоны в области микроукола клетки *Chara* после латентного периода ~ 30 с [32]. Параллельные измерения локальных сдвигов pH и концентрации O_2 в области микроповреждения клетки в контроле и при действии ингиби-

торов указывали на то, что возрастание рН, сопровождаемое резким падением уровня O_2 , обусловлено переносом электронов через плазмалемму от NADPH на O_2 и последующим потреблением H^+ в реакции восстановления O_2 до H_2O_2 [33]. С учетом этих сведений можно сделать вывод, что в защелачивании среды при гиперполяризации плазмалеммы могут участвовать разные механизмы: трансмембранный перенос H^+ под влиянием электрохимического градиента протонов, а также комбинированный механизм, включающий биохимические стадии, нечувствительные к трансмембранному градиенту H^+ .

Интересно отметить, что сдвиги pH_0 возникали лишь в ответ на первый (реже, и на второй) импульс тока, тогда как последующие стимулы практически не оказывали влияния на pH_0 . Поскольку влияние ГО на параметры флуоресценции F' и F_m' проявлялось в ответ на приложение не только первого, но и последующих электростимулов, можно предполагать, что потоки H^+ , вызываемые гиперполяризацией, не играли критической роли в передаче сигнала от плазмалеммы к хлоропластам в условиях неоднократного приложения стимула. Вместе с тем, учитывая возможные сдвиги рН цитоплазмы при развитии ГО, представляется важным в дальнейшем внимательно исследовать их роль в перестройках ФСА.

Переходные смещения F_m' , вызываемые ГО, сходны в некоторых чертах с изменениями F_m' , возникающими после генерации ПД при умеренной интенсивности освещения. Известно, что гиперполяризация может активировать Ca^{2+} -проводящие каналы [34], открывая путь для поступления Ca^{2+} в цитоплазму. Согласно одной из гипотез, стадия деполяризации после пика ГО в капле цитоплазмы харовых водорослей аналогична фронту потенциала действия интактных клеток и связана с повышением концентрации цитоплазматического Ca^{2+} [22]. В применении к интактным клеткам эта гипотеза не вполне убедительна, поскольку течение цитоплазмы не прекращается на пике ГО, хотя скорость циклоза крайне чувствительна к повышению $[Ca^{2+}]$ в цитоплазме [35]. О регуляции F' и F_m' при участии ΔpH тилакоидов говорит тот факт, что влияние ГО на эти параметры проявлялось только в освещенных клетках и исчезало в темноте вместе с прекращением фотосинтетического транспорта электронов (рис. 3 и 5).

Существование длительного лаг-периода, предшествующего ГО-индуцированным изменениям F' и F_m' , отражает многостадийное преобразование электрического сигнала плазмалеммы до отклика флуоресценции в мембранах тилакоидов. Предполагаемые промежуточные стадии включают сдвиг $[K^+]_{цит}$, обмен K^+/H^+ через оболочку хлоропласта, модуляцию активности стромальных ферментов и влияние рН на транспорт электронов и тушение флуоресценции в антенне.

Таким образом, в работе выявлены новые взаимодействия между плазматической мембраной и хлоропластами, которые опосредованы потоками ионов в ответ на электрические сигналы клетки. Результаты показывают, что гиперполяризация плазмалеммы в состоянии с высокой K^+ -проводимостью приводит к заметным изменениям флуоресценции хлорофилла F' и F_m' . Эти изменения указывают на существование регуляторных связей, которые отличаются от ранее обнаруженного пути, связанного с генерацией потенциала действия. Экспериментальные наблюдения согласуются с представлением о том, что K^+/H^+ -обмен на внутренней мембране оболочки оказывает регуляторное действие не только в долговременных опытах (например, при выращивании растений в условиях засоления), но и при относительно коротких воздействиях. Для более глубокого понимания выявленных внутриклеточных взаимодействий и механизмов влияния электрических процессов плазмалеммы на состояние и активность хлоропластов необходимы дальнейшие исследования.

Вклад авторов. А.А. Булычев — общий план работ, проведение опытов и написание статьи; С.Ю. Шапигузов — выполнение экспериментов и обработка результатов; А.В. Алова — обсуждение результатов и руководство работой по проекту РФФИ.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-54-12015), а также в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Drachev, L. A., Mamedov, M. D., and Semenov, A. Yu. (1987) The antimycin-sensitive electrogenesis in *Rhodospseudomonas sphaeroides* chromatophores, *FEBS Lett.*, **213**, 128-132, doi: 10.1016/0014-5793(87)81477-1.
- Bulychev, A. A., Dassen, J. H. A., Vredenberg, W. J., Opanasenko, V. K., and Semenova, G. A. (1998) Stimulation of photocurrent in chloroplasts related to light-induced swelling of thylakoid system, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **46**, 71-78, doi: 10.1016/S0302-4598(98)00129-9.
- Bulychev, A. A., and Vredenberg, W. J. (1999) Light-triggered electrical events in the thylakoid membrane of plant chloroplasts, *Physiol. Plant.*, **105**, 577-584, doi: 10.1034/j.1399-3054.1999.105325.x.
- Bulychev, A. A., and Kamzolkina, N. A. (2006) Differential effects of plasma membrane electric excitation on H⁺ fluxes and photosynthesis in characean cells, *Bioelectrochemistry*, **69**, 209-215, doi: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.001.
- Bulychev, A. A., and Kamzolkina, N. A. (2006) Effect of action potential on photosynthesis and spatially distributed H⁺ fluxes in cells and chloroplasts of *Chara corallina*, *Russ. J. Plant Physiol.*, **53**, 1-9, doi: 10.1134/S1021443706010018.
- Bulychev, A. A., and Alova, A. V. (2022) Microfluidic interactions involved in chloroplast responses to plasma membrane excitation in *Chara*, *Plant Physiol. Biochem.*, **183**, 111-119, doi: 10.1016/j.plaphy.2022.05.005.
- Johnson, C. H., Shingles, R., and Ettinger, W. F. (2007) Regulation and role of calcium fluxes in the chloroplast, in *Structure and Function of Plastids* (Wise, R. R. and Hooper, J. K., eds.) Springer, Dordrecht, pp. 403-416, doi: 10.1007/978-1-4020-4061-0_20.
- Hochmal, A. K., Schulze, S., Trompelt, K., and Hippler, M. (2015) Calcium-dependent regulation of photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1847**, 993-1003, doi: 10.1016/j.bbabbio.2015.02.010.
- Williamson, R. E., and Ashley, C. C. (1982) Free Ca²⁺ and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*, *Nature*, **296**, 647-651, doi: 10.1038/296647a0.
- Kreimer, G., Melkonian, M., and Latzko, E. (1985) An electrogenic uniport mediates light-dependent Ca²⁺ influx into intact spinach chloroplasts, *FEBS Lett.*, **180**, 253-258, doi: 10.1016/0014-5793(85)81081-4.
- Stael, S., Wurzing, B., Mair, A. N., Mehlmer, N., Vothknecht, U. C., and Teige, M. (2012) Plant organellar calcium signalling: an emerging field, *J. Exp. Bot.*, **63**, 1525-1542, doi: 10.1093/jxb/err394.
- Krupeninina, N. A., and Bulychev, A. A. (2007) Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1767**, 781-788, doi: 10.1016/j.bbabbio.2007.01.004.
- Pottosin, I., and Shabala, S. (2016) Transport across chloroplast membranes: optimizing photosynthesis for adverse environmental conditions, *Mol. Plant*, **9**, 356-370, doi: 10.1016/j.molp.2015.10.006.
- Szabò, I., and Spetea, C. (2017) Impact of the ion transportome of chloroplasts on the optimization of photosynthesis, *J. Exp. Bot.*, **68**, 3115-3128, doi: 10.1093/jxb/erx063.
- Höhner, R., Aboukila, A., Kunz, H. H., and Venema, K. (2016) Proton gradients and proton-dependent transport processes in the chloroplast, *Front. Plant Sci.*, **7**, 1-7, doi: 10.3389/fpls.2016.00218.
- Wu, W., and Berkowitz, G. A. (1992) Stromal pH and photosynthesis are affected by electroneutral K⁺ and H⁺ exchange through chloroplast envelope ion channels, *Plant Physiol.*, **98**, 666-672, doi: 10.1104/pp.98.2.666.
- Kishimoto, U. (1966) Hyperpolarizing response in *Nitella* internodes, *Plant Cell Physiol.*, **7**, 429-439, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a079194.
- Homblé, F. (1987) A tight-seal whole cell study of the voltage-dependent gating mechanism of K⁺-channels of protoplasmic droplets of *Chara corallina*, *Plant Physiol.*, **84**, 433-437, doi: 10.1104/pp.84.2.433.
- Schmölzer, P. M., Höftberger, M., and Foissner, I. (2011) Plasma membrane domains participate in pH banding of *Chara* internodal cells, *Plant Cell Physiol.*, **52**, 1274-1288, doi: 10.1093/pcp/pcr074.
- Goh, C. H., Schreiber, U., and Hedrich, R. (1999) New approach of monitoring changes in chlorophyll *a* fluorescence of single guard cells and protoplasts in response to physiological stimuli, *Plant Cell Environ.*, **22**, 1057-1070, doi: 10.1046/j.1365-3040.1999.00475.x.
- Beilby, M. J. (2015) Salt tolerance at single cell level in giant-celled characeae, *Front. Plant Sci.*, **6**, 1-16, doi: 10.3389/fpls.2015.00226.
- Прищепов Е. Д., Андрианов В. К., Курелла Г. А., Рубин А. Б. (1984) Структурно-функциональные характеристики поверхностной мембраны каплей протоплазмы, полученных из клеток харовых водорослей. IV. Исследование электрических свойств мембраны капли методами фиксации тока и потенциала, *Физиология растений*, **31**, 59-72.
- Sukhov, V. (2016) Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants, *Photosynth. Res.*, **130**, 373-387, doi: 10.1007/s11120-016-0270-x.
- Blinks, L. R. (1936) The effects of current flow on bioelectric potential: III. *Nitella*, *J. Gen. Physiol.*, **20**, 229-265, doi: 10.1085/jgp.20.2.229.
- Shaw, J. E., and Koleske, A. J. (2021) Functional interactions of ion channels with the actin cytoskeleton:

- does coupling to dynamic actin regulate NMDA receptors? *J. Physiol.*, **599**, 431-441, doi: 10.1113/JP278702.
26. Hepler, P. K. (2016) The cytoskeleton and its regulation by calcium and protons, *Plant Physiol.*, **170**, 3-22, doi: 10.1104/pp.15.01506.
 27. Beilby, M. J., and Bisson, M. A. (2012) PH banding in charophyte algae, in *Plant Electrophysiol.* (Volkov, A. G., ed) Springer, Berlin-Heidelberg, pp. 247-271, doi: 10.1007/978-3-642-29119-7_11.
 28. Lucas, W. J., and Nuccitelli, R. (1980) HCO_3^- and OH^- transport across the plasmalemma of *Chara*, *Planta*, **150**, 120-131, doi: 10.1007/BF00582354.
 29. Yudina, L., Sukhova, E., Popova, A., Zolin, Y., Abasheva, K., Grebneva, K., and Sukhov, V. (2023) Local action of moderate heating and illumination induces propagation of hyperpolarization electrical signals in wheat plants, *Front. Sustain. Food Syst.*, **6**, 1-20, doi: 10.3389/fsufs.2022.1062449.
 30. Spetea, C., Herdean, A., Allorent, G., Carraretto, L., Finazzi, G., and Szabo, I. (2017) An update on the regulation of photosynthesis by thylakoid ion channels and transporters in *Arabidopsis*, *Physiol. Plant.*, **161**, 16-27, doi: 10.1111/ppl.12568.
 31. Aranda Sicilia, M. N., Sánchez Romero, M. E., Rodríguez Rosales, M. P., and Venema, K. (2021) Plastidial transporters KEA1 and KEA2 at the inner envelope membrane adjust stromal pH in the dark, *New Phytol.*, **229**, 2080-2090, doi: 10.1111/nph.17042.
 32. Bulychiev, A. A., Alova, A. V., and Bibikova, T. N. (2013) Strong alkalization of *Chara* cell surface in the area of cell wall incision as an early event in mechanoperception, *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**, 2359-2369, doi: 10.1016/j.bbamem.2013.07.002.
 33. Alova, A., Erofeev, A., Gorelkin, P., Bibikova, T., Korchev, Y., Majouga, A., and Bulychiev, A. (2020) Prolonged oxygen depletion in microwounded cells of *Chara corallina* detected with novel oxygen nanosensors, *J. Exp. Bot.*, **71**, 386-398, doi: 10.1093/jxb/erz433.
 34. Hedrich, R. (2012) Ion channels in plants, *Physiol. Rev.*, **92**, 1777-1811, doi: 10.1152/physrev.00038.2011.
 35. Shimmen, T. (2007) The sliding theory of cytoplasmic streaming: fifty years of progress, *J. Plant Res.*, **120**, 31-43, doi: 10.1007/s10265-006-0061-0.

ELECTRICAL SIGNALS OF THE PLASMA MEMBRANE AND THEIR EFFECT ON CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IN *Chara* CHLOROPLASTS *in vivo*

A. A. Bulychiev*, S. Yu. Shapiguzov, and A. V. Alova

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: bulychiev@biophys.msu.ru*

Action potentials of plant cells are involved in regulation of many cell processes, such as photosynthesis and cytoplasmic streaming. Excitable cells of characean algae submerged in media with elevated K^+ content are able to generate hyperpolarizing electrical responses. This active response of plasma membrane arises upon the passage of inward electric current comparable in extent to natural currents circulating in illuminated *Chara* internodes. It remains currently unknown whether the hyperpolarizing electrical signals in *Chara* affect the photosynthetic activity. Here we show that the negative shift of cell membrane potential, which causes the K^+ influx into the cytoplasm, is accompanied by a delayed decrease in the effective chlorophyll fluorescence yield (F') and maximal yield (F_m') under low background light ($12.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The transient changes in F' and F_m' were evident under illumination only, which indicates their close relation to photosynthetic energy conversion in chloroplasts. The passage of inward current caused an increase in pH at the cell surface (pH_o), which reflects a high H^+/OH^- conductance of the plasmalemma and points to the decrease in cytoplasmic pH due to H^+ entry into the cell. The shifts in pH_o arising in response to the first hyperpolarizing pulse disappeared upon repeated stimulations, thus indicating the long-term inactivation of plasmalemmal H^+/OH^- conductance. Despite the suppression of plasmalemmal H^+ fluxes, the hyperpolarizing responses and the analyzed chlorophyll fluorescence changes did not disappear. The results indicate the participation of K^+ flows between the outer medium, cytoplasm, and stroma in chloroplast functional changes that are reflected by the dynamics of F' and F_m' .

Keywords: *Chara*, electrical signals, hyperpolarization, plasma membrane K^+ -conductance, chlorophyll fluorescence changes, H^+ transport, plasmalemma—chloroplast interactions

ИОННЫЕ КАНАЛЫ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Обзор

© 2023 М.А. Мудрилов, М.М. Ладейнова, Д.В. Кузнецова, В.А. Воденев*

*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Институт биологии и биомедицины, кафедра биофизики, 603022 Нижний Новгород, Россия;
электронная почта: v.vodenev@mail.ru*

Поступила в редакцию 21.06.2023

После доработки 16.09.2023

Принята к публикации 18.09.2023

Электрические сигналы (ЭС) растений, возникающие при действии различных внешних факторов, играют важную роль в адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Генерация ЭС в клетках высших растений связана с активацией потоков Ca^{2+} , K^+ , анионов, а также изменением активности H^+ -АТФазы плазмалеммы. В настоящем обзоре на основе сопоставления данных молекулярно-генетических и электрофизиологических исследований выполнен анализ молекулярной природы ионных каналов, вносящих вклад в передачу ЭС у высших растений. На основе таких характеристик ионных каналов, как селективность, механизм активации, а также внутриклеточная и тканевая локализация, из широкого разнообразия ионных каналов высших растений выделены те, которые отвечают требованиям к потенциальным участникам генерации ЭС. Анализ данных экспериментальных исследований, выполненных на мутантах с подавленной или усиленной экспрессией гена определённого канала, выявил те каналы, активация которых вносит вклад в формирование ЭС. К числу каналов, ответственных за возникновение потока Ca^{2+} при генерации ЭС, относятся каналы семейства GLR, потока K^+ – GORK, анионов – MSL. Рассмотрение перспектив дальнейших исследований говорит о необходимости объединения в рамках единого исследования электрофизиологических и генетических подходов наряду с анализом ионных концентраций в интактных растениях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: электрические сигналы у растений, дистанционные сигналы, ионные каналы, потенциал действия, переменный потенциал.

DOI: 10.31857/S0320972523100056, EDN: OTUVVP

ВВЕДЕНИЕ

Растения в естественной среде обитания подвергаются действию различных неблагоприятных факторов окружающей среды. Для развития скоординированного системного ответа на действие внешних факторов необходима передача дистанционных сигналов. У растений выделяют три типа дистанционных сигналов – химические, гидравлические и электрические, различающиеся как по природе, так и по скорости распространения. Электрические сигналы (ЭС), скорость

распространения которых у растений может достигать десятков сантиметров в секунду, наряду с гидравлическими относятся к быстрым дистанционным сигналам [1–4].

Распространение ЭС вызывает широкий спектр функциональных изменений в нераздражённых частях растения. Индуцированные ЭС ответы включают изменение активности фотосинтеза и транспирации, усиление дыхания, изменение содержания АТФ, экспрессию защитных генов и др. [1, 3, 5]. Такие изменения играют важную роль в адаптации растений к изменяющимся условиям окружающей среды.

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ВП – переменный потенциал; ПД – потенциал действия; СП – системный потенциал; ЭС – электрический сигнал; CNGC – cyclic nucleotide-gated channels, каналы, управляемые циклическими нуклеотидами; DAMP – damage-associated molecular pattern, молекулярный паттерн, связанный с повреждением; GLR – glutamate-like receptor, ионотропные глутаматные рецепторы; MSL – mechanosensitive-like channels, механочувствительно-подобные каналы.

* Адресат для корреспонденции.

Известно, что механизмы индукции ЭС системного ответа у растений основаны на изменениях ионных концентраций во время генерации ЭС, среди которых особо важную роль играют сдвиги концентраций Ca^{2+} и H^+ [5, 6]. Приводящие к изменениям концентраций ионные потоки возникают вследствие изменения активности ион-транспортующих систем, в первую очередь ионных каналов [2, 3, 7]. Однако вопрос о молекулярной природе таких каналов остаётся открытым.

Идентификация молекулярной природы ионных каналов, участвующих в генерации ЭС у высших растений, сопряжена с рядом трудностей. В первую очередь необходимо отметить, что исследование параметров ЭС и механизмов их генерации проводилось на растениях различных видов. В частности, традиционным объектом исследования в электрофизиологии растений являются локомоторные растения. Другим модельным объектом, на котором был получен значительный объём данных о механизмах генерации ЭС и впервые была экспериментально показана роль ионных каналов, служили гигантские клетки харовых водорослей, удобные для исследований с методической точки зрения [8–11]. В то же время модельным объектом в молекулярно-генетических исследованиях растений является арабидопсис (*Arabidopsis thaliana* L.), на котором выполнено относительно небольшое количество работ по изучению ЭС. Вышесказанное не позволяет прямо сопоставить электрофизиологические и молекулярно-генетические данные, представленные в литературе. В настоящем обзоре предпринята попытка такого сопоставления: рассматриваются сведения о природе ионных потоков, лежащих в основе механизмов генерации ЭС, приводятся данные об ионных каналах, генетическая принадлежность которых идентифицирована на сегодняшний день, а также выполняется анализ наиболее вероятных участников процесса генерации ЭС у высших растений.

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

В состоянии покоя величина электрического мембранного потенциала клеток растений находится в значительно более отрицательной области по сравнению с клетками животных и составляет ниже -100 мВ, а для некоторых растений и отдельных тканей ниже -200 мВ. Столь большие значения обусловлены значительным вкладом создаваемой за счёт

работы H^+ -АТФазы плазмалеммы метаболической компоненты в общую величину электрического потенциала [6, 8]. Электрический трансмембранный потенциал как составляющая электрохимического градиента является движущей силой мембранного транспорта, в том числе для потока ионов при генерации ЭС. В настоящее время у растений выделяют три типа ЭС: потенциал действия (ПД), переменный потенциал (ВП) и системный потенциал (СП) [1, 3, 7, 12]. Последний в силу недостаточной изученности лежащих в его основе механизмов не рассматривается в настоящем обзоре. Разделение сигналов на различные типы основано на нескольких характеристиках, включая направленность изменения потенциала (де-/гиперполяризация), длительность электрической реакции, характер распространения, а также типичные раздражители, которые индуцируют сигнал определённого типа.

ПД представляет собой переходную деполяризацию амплитудой несколько десятков мВ, имеющую характерную импульсную форму, возникающую по пороговому принципу и подчиняющуюся закону «всё или ничего» [1, 6, 12, 13]. Отмеченные свойства ПД растений сходны с таковыми для классического нервного импульса. Основные же различия связаны с временными характеристиками реакции: длительность ПД у растений в тысячи раз больше длительности нервного импульса — от нескольких секунд у локомоторных, таких как мимоза и венерина мухоловка, до нескольких десятков секунд у обычных, нелокомоторных растений [1, 13].

Механизм генерации ПД в клетках растений (рис. 1) также отличается от классической Na^+/K^+ -схемы нервного импульса. У растений формирование фазы деполяризации ПД связано с входящим потоком Ca^{2+} и выходящим потоком анионов, прежде всего Cl^- , а также, вероятно, со временным снижением активности H^+ -АТФазы. При этом ионы Ca^{2+} играют преимущественно сигнальную роль, вызывая активацию потока анионов и инактивацию H^+ -АТФазы [1, 12, 13]. В то же время для отдельных видов растений продемонстрирована определяющая роль Ca^{2+} в изменении величины электрического потенциала при формировании фазы деполяризации [14, 15], что показывает вариативность механизма генерации ПД среди различных растений. Формирование фазы реполяризации связано с выходящим потоком K^+ , значительная движущая сила для которого возникает при деполяризации, а также с реактивацией H^+ -АТФазы вследствие удаления из клетки избытка ионов Ca^{2+} [3, 8, 13].

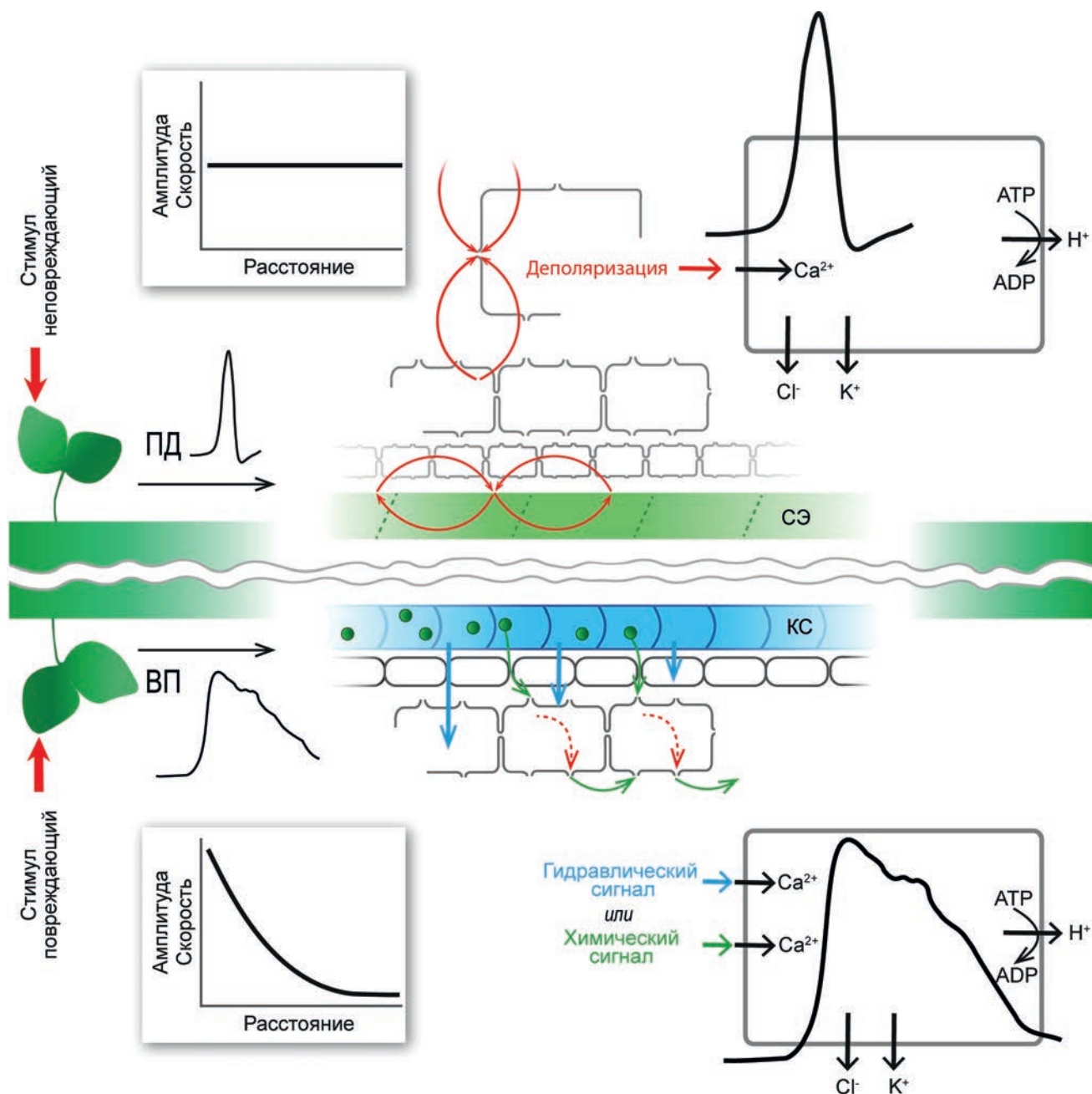


Рис. 1. Схема генерации и распространения потенциала действия (ПД) и варибельного потенциала (ВП) по проводящим тканям высших растений. Неповреждающий стимул вызывает генерацию ПД, который распространяется преимущественно по флоэме вследствие возникновения локальных токов (обозначены красными стрелками). Повреждающий стимул вызывает ВП, который распространяется вследствие передачи по ксилеме химического (обозначено зелёными точками) или гидравлического сигнала (обозначено голубыми стрелками). На схеме справа представлены механизмы генерации ПД и ВП (пояснения в тексте). КС — ксилема, СЭ — ситовидные элементы

Распространение ПД по растению (рис. 1) происходит без значительного снижения амплитуды и скорости, которая составляет обычно от долей до нескольких см/с, достигая 8–10 см/с у локомоторных растений [1, 7, 16]. Бездекрементное распространение ПД указывает на то, что этот процесс является активным: генерация ПД вызывает деполяризацию клеток в соседних участках до порогового уровня вследствие возникновения локальных

токов и последующую активную генерацию ПД в этих участках [8, 12, 13]. В целом, можно говорить о принципиальном сходстве механизма распространения нервного импульса и ПД у растений, несмотря на меньшую на 2–3 порядка скорость последнего. Однако открытым остаётся вопрос об основных путях передачи ПД у высших растений. Проводящие пучки высших растений являются общепризнанным путём системной передачи сигналов

всех типов, включая электрические [1, 5, 7]. Предположительно, клетки флоэмы — как ситовидные элементы, так и флоэмная паренхима — ответственны за незатухающую передачу ПД [1, 3]. Также имеет место радиальное распространение ПД от проводящих пучков к соседним клеткам благодаря связям через плазмодесмы, вероятно, уже в виде затухающего сигнала [1, 12, 13].

Генерацию ПД вызывают различные повреждающие стимулы, включая изменение температуры, освещённости, прикосновение и др. Механизмы преобразования энергии действующего стимула в изменения потенциала и роль определённых ионных каналов в этом процессе рассмотрены в соответствующих обзорах [3, 7, 17]. Отдельно необходимо подчеркнуть, что генерацию ПД у растений, как и в нервном волокне, можно индуцировать путём прямой электрической стимуляции [15], что свидетельствует об определяющей роли потенциал-зависимых ионных каналов в индукции ПД.

ВП (рис. 1), как и ПД, представляет собой переходную деполяризацию амплитудой несколько десятков мВ, однако имеет гораздо большую длительность, до нескольких десятков минут, и нерегулярную форму [1, 3, 7, 13, 16]. Отмечая большую продолжительность ВП, в силу чего его часто обозначают как «медленная волна потенциала» (SWP, slow wave potential), нужно подчеркнуть, что причиной этого является медленная фаза реполяризации ВП, в то время как продолжительность деполяризации обычно не превышает нескольких секунд, как и в случае ПД. ВП, в отличие от ПД, не подчиняется правилу «всё или ничего», его амплитуда и длительность зависят от типа стимула [18, 19] и площади повреждения [16]. Скорость распространения ВП составляет 0,1–10 мм/с. По мере удаления от места стимуляции наблюдается декремент амплитуды и скорости его распространения [1, 3, 6, 13]. Генерацию ВП вызывают повреждающие стимулы [1, 3], такие как ожог [18, 19], механическое повреждение [18, 20, 21] и нагрев [18, 19, 22].

В качестве основного механизма формирования ВП (рис. 1) длительное время рассматривалось исключительно переходное угнетение активности H^+ -АТФазы плазмалеммы [13, 16]. Впоследствии было показано, что, наряду с переходной инактивацией протонного насоса, вклад в генерацию ВП вносят пассивные потоки ионов Ca^{2+} , Cl^- и K^+ , которые, вероятно, возникают при активации соответствующих ионных каналов [7, 23, 24]. Как и в случае ПД, на начальном этапе генерации ВП происходит

вход Ca^{2+} в клетку, что вызывает снижение активности H^+ -АТФазы, значительно более продолжительное, чем при ПД. В формировании фазы деполяризации также вносит вклад поток анионов, в частности Cl^- [5, 12, 25, 26]. Формирование фазы реполяризации происходит благодаря восстановлению активности H^+ -АТФазы, а также, вероятно, выходу из клетки K^+ [1, 26]. Несмотря на то что в генерации как ПД, так и ВП участвует общий набор ионов (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , H^+), ион-транспортующие системы клеточных мембран, ответственные за их перенос, вероятно, различаются для двух типов ЭС. Косвенным доказательством этого является такая особенность ВП, как его способность возникать в период абсолютной рефрактерности для ПД [8, 16].

В отличие от ПД, ВП не является самораспространяющимся ЭС (рис. 1), представляя собой локальную электрическую реакцию, индуцированную гидравлическим или химическим сигналом [1, 5, 7, 26]. Возможность вызвать ВП путём искусственного повышения давления [27] подтверждает роль гидравлической волны в его индукции, предполагая активацию механочувствительных ионных каналов [1, 16, 26]. В роли химического сигнала, предположительно, выступает распространение из зоны повреждения по проводящим пучкам «раневого вещества», вызывающего вход Ca^{2+} в клетку. Согласно современным представлениям, такими сигнальными молекулами могут быть активные формы кислорода (АФК), продуцируемые NADPH-оксидазами, вероятно, RBOHD (respiratory burst oxidase homolog D) [28]. Системное распространение H_2O_2 показано при действии типичных для ВП стимулов — при механическом повреждении, нагреве и сильном свете [28–30]. В свою очередь, Ca^{2+} способен активировать RBOHD, вызывая увеличение производства H_2O_2 [7, 31], что может обеспечивать самоподдержание распространяющегося сигнала.

Изложенные выше сведения о механизмах генерации и распространения ЭС у высших растений были получены с применением комплекса электрофизиологических методов, включающих анализ градиентов электрохимического потенциала различных ионов, регистрацию сдвигов ионных концентраций при возбуждении, варьирование ионного состава среды, ингибиторный анализ с применением блокаторов ионных каналов и др.

Прежде всего стоит отметить, что в основе генерации ЭС лежат пассивные потоки ионов по градиенту концентрации [6, 32]. Для Ca^{2+} присутствует значительный электрохимический

градиент ввиду низких концентраций Ca^{2+} в цитозоле и высоких — в апопласте и внутриклеточных компартментах, таких как вакуоль и ЭПР [33]. Содержание анионов в цитозоле превышает их содержание в апопласте [34], что в совокупности с отрицательным внутриклеточным электрическим потенциалом создаёт значительный направленный наружу градиент [6]. Для K^+ , находящегося близко к равновесному состоянию в покое, направленный наружу градиент возникает при деполяризации [6, 32, 35].

Вклад определённых ионов в генерацию ЭС исходно был исследован путём варьирования ионного состава среды с оценкой его влияния на параметры ЭС. Таким образом было выявлено участие Ca^{2+} , Cl^- и K^+ в генерации ПД у высших растений [8, 13]. Также благодаря этому был установлен источник повышения концентрации Ca^{2+} в цитозоле, которым является внеклеточное депо, поскольку хелатирование Ca^{2+} во внеклеточной среде ведёт к практически полному подавлению ПД и значительному, но не полному угнетению ВП [14, 25, 26].

В силу большой длительности генерация даже одиночного ЭС у растений, в отличие от животных, вызывает заметные сдвиги ионных концентраций. Относительные изменения сильнее выражены в тех компартментах, где концентрация соответствующего иона в покое низка — Ca^{2+} в цитозоле, K^+ и Cl^- в апопласте [36, 37]. Изменения концентраций ионов были зарегистрированы с помощью ряда методов, таких как ион-селективные электроды [24, 38], измерение ионного потока вибрирующими микроэлектродами (MIFE) [39], метод пламенной фотометрии и радиоактивных индикаторов [8], а также ион-чувствительные химические или генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры [40]. Результаты свидетельствуют о входе в клетку Ca^{2+} и выходе из клетки K^+ и Cl^- при генерации как ПД, так и ВП [24, 26, 38]. Вышеуказанное в совокупности с данными о направленности движущей силы подтверждает, что потоки указанных ионов являются пассивными, движущимися через ионные каналы по градиенту электрохимического потенциала.

Классическим способом оценки активации ионных каналов является измерение электрического сопротивления мембраны при возбуждении. Генерация ПД у растений, как и в случае нервного импульса, сопровождается снижением сопротивления мембраны, что служит доказательством активации ионных каналов [26]. В отношении ВП длительное время

доминировала точка зрения об отсутствии падения сопротивления, что являлось одним из основных аргументов о ключевой роли электрогенного H^+ -насоса, а не ионных каналов, в формировании ВП [13, 16, 26]. Однако впоследствии было зафиксировано падение сопротивления во время генерации ВП, что указывает на активацию ионных каналов [25, 26].

Типы ионных каналов, активация которых обуславливает выявленные ионные потоки, формирующие ЭС, были исследованы с помощью блокаторов. Так, участие Ca^{2+} -каналов в генерации ЭС было показано путём подавления ЭС La^{3+} , блокатором Ca^{2+} -каналов всех типов, в случае как ПД [15, 41], так и ВП [22, 25]. Применение более специфичных блокаторов, а именно верапамила, блокирующего потенциал-зависимые каналы, а также неомицина и рутения красного, блокирующего выход Ca^{2+} из внутриклеточных источников, показало участие соответствующих Ca^{2+} -каналов в генерации ПД [15, 42, 43]. Gd^{3+} , ингибитор механочувствительных Ca^{2+} -каналов, подавлял распространение ВП в нераздражённые ткани, но не подавлял генерацию ВП в зоне стимуляции [24]. Блокаторы анионных каналов, такие как этакриновая кислота, 5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)-бензойная кислота (NPPB, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid) и антрацен-9-карбоновая кислота (A-9-C, anthracene-9-carboxylic acid), снижают амплитуду и скорость деполяризации ПД [15, 41, 43] и ВП [24, 25, 38]. Блокатор K^+ -каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) замедляет фазу реполяризации ПД, а также увеличивает амплитуду импульса и снижает продолжительность деполяризации [15, 41, 43]. Последнее указывает на то, что выход K^+ начинается на фазе деполяризации ПД, т.е. имеет место перекрытие деполяризующих и реполяризующих ионных потоков. В отношении ВП показано увеличение длительности фазы реполяризации под влиянием ТЭА [24, 25, 38].

Таким образом, исходя из результатов электрофизиологического анализа, можно заключить, что генерация ПД связана с активацией потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, тогда как генерация ВП связана, прежде всего, с активацией лиганд-зависимых и механочувствительных Ca^{2+} -каналов. Анионные и K^+ -каналы принимают участие в процессе генерации как ПД, так и ВП. Также в генерацию ЭС важный вклад вносит H^+ -АТРаза плазмалеммы.

Анализируя роль ионных каналов в генерации ЭС у высших растений, рассматривают в первую очередь каналы плазмалеммы.

В то же время изменения ионных концентраций могут быть обусловлены активацией каналов, локализованных на мембранах внутриклеточных компартментов, в первую очередь самого крупного из них – вакуоли [33]. У харовых водорослей обнаружена электровозбудимость тонопласта и продемонстрирована роль вакуоли в качестве источника Ca^{2+} и Cl^- при генерации ЭС [10, 44]. Отдельные работы свидетельствуют о сходной роли вакуоли у других растений [10, 15], в том числе продемонстрирована электровозбудимость тонопласта и выход Ca^{2+} из вакуоли на растениях арабидопсиса [44]. Это говорит о необходимости принимать во внимание при анализе ионные каналы тонопласта, несмотря на отсутствие однозначных данных о его роли в генерации ЭС у высших растений.

Необходимо отметить, что на данный момент ни для одного из типов ЭС не идентифицирован полный набор генов ионных каналов, с работой которых связано формирование фаз деполяризации и реполяризации ЭС. Исходя из анализа данных электрофизиологических исследований, при отборе каналов, потенциально участвующих в генерации ЭС, следует руководствоваться следующими критериями: 1) селективность: прежде всего интересны каналы с Ca^{2+} -, K^+ - и Cl^- -проводимостью; 2) механизм активации, возможность активации при деполяризации, механическом или химическом стимуле; 3) локализация преимущественно на плазмалемме (и, возможно, на тонопласте) клеток проводящих тканей.

ИОННЫЕ КАНАЛЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

К настоящему времени охарактеризованы с применением электрофизиологических методов различные группы ионных каналов растений, однако, как подчёркнуто в обзоре Demidchik et al. [45], во многом остаётся неизвестно, какие гены кодируют эти каналы. За последние два десятилетия соотношение молекулярно-генетических и электрофизиологических данных было в значительной степени выполнено для некоторых групп ионных каналов, таких как K^+ -каналы [46, 47]. В то же время для Ca^{2+} -каналов, в частности для Ca^{2+} -каналов плазмалеммы, активируемых деполяризацией, кодирующие гены выявлены не были [45]. В данном разделе систематизированы данные по известным группам ионных каналов, которые потенциально могут принимать участие в формировании ЭС растений (таблица).

Кальций-проницаемые каналы. Несмотря на широко известную важность кальция для жизнедеятельности растений, в том числе как вторичного мессенджера, у растений отсутствуют каноничные ионные каналы с Ca^{2+} -селективными фильтрами. Вместо них у растений имеются Ca^{2+} -проницаемые катионные каналы, способные пропускать также другие двух- и одновалентные катионы [45, 55], однако для удобства в большинстве работ это уточнение опускают, именуя их просто « Ca^{2+} -каналами», что сделано и в настоящем обзоре. По электрофизиологическим характеристикам Ca^{2+} -каналы растений делят на три группы: активируемые деполяризацией Ca^{2+} -каналы (DACC, depolarization-activated Ca^{2+} channels), активируемые гиперполяризацией Ca^{2+} -каналы (HACC, hyperpolarization-activated Ca^{2+} channels) и потенциал-независимые Ca^{2+} -каналы (VICC, voltage-independent Ca^{2+} channels), иногда отдельно выделяя из последней группы механочувствительные каналы (MSCC, mechanosensitive Ca^{2+} channels). Ещё раз отметим, что гены, кодирующие DACC плазмалеммы, до сих пор не выявлены. Ca^{2+} -Каналы также классифицируют по кинетике активации, по которой их делят на быстро активирующиеся (за миллисекунды), медленно активирующиеся (за секунды) и каналы импульсной проводимости (1–3 мс) [45, 55].

С помощью молекулярно-генетических подходов у высших растений на данный момент выявлены следующие семейства Ca^{2+} -каналов: ионотропные глутаматные рецепторы (GLR, glutamate-like receptor); каналы, управляемые циклическими нуклеотидами (CNGC, cyclic nucleotide-gated channels); аннексины (ANN, annexins); двухпоровые каналы (TPC, two-pore channels); каналы MID-1-комплементарной активности (MCA, Mid1-complementing activity channels); индуцирующиеся гиперосмольностью Ca^{2+} -каналы (OSCA1, hyperosmolality-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase 1) и пьезоканалы (Piezo) [45, 55], а также недавно выявленные быстро активируемые механочувствительные Ca^{2+} -каналы (RMA, rapidly activated calcium mechanosensitive channel) [95].

GLR представляют собой интегральные мембранные белки, локализованные преимущественно на плазмалемме и проявляющие активность неселективного лиганд-зависимого ионного канала, электрофизиологически относящегося к VICC. Их лигандами могут выступать различные аминокислоты и их производные, причём ряд активаторов является специфичным для отдельных каналов семейства [45, 48, 55]. Экспрессия генов GLR

Ca²⁺-, K⁺- и анионные каналы высших растений и их характеристика

Канал	Селективность	Клеточная локализация	Тканевая локализация	Стимул	Регуляция	Ссылка
GLR1.1			лист, корень, ~~цветок, стручки~~	↓Ψ _w		[48]
GLR1.2	Ca ²⁺	ПМ	лист, корень, пыльца	холод	Ser, ~~Glu~~	[45, 48–51]
GLR1.3		ПМ	лист, стебель, корень	холод		[48, 49]
GLR1.4	Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺ , Cl ⁻	ПМ	лист, корень, стебель		Trp, Met, Phe, Leu, Tyr, Asn, Thr, ~~Glu~~ , Gly, Arg	[45, 48, 52]
GLR2.1			лист, стебель, корень, ~~цветок, стручки~~		Glu	[48]
GLR3.1	Ca ²⁺	ПМ	лист, корень, ЗК, стебель	↓Ψ _w , МП	Met	[20, 48, 51, 53]
GLR3.2			лист, стебель, корень, ПТ	NaCl, МП	Ser, Met, Gly	[20, 48, 53]
GLR3.3	Ca ²⁺ > Na ⁺ = K ⁺		лист, корень, ПТ	БС, МП, Грв	Glu, Ala, Asn, Gln, Cys, Gly, Ser, GSH	[23, 48, 51]
GLR3.4	Ca ²⁺ > Na ⁺	ПМ, Ф, ЭМ	лист, стебель, корень, ЗК, ПТ	холод, NaCl, Прик	Asn, Ser, Gly, Ala, Glu, ~~Glu~~ , Cys, Asp	[48, 54, 55]
GLR3.5		ПМ, ЭМ		↓Ψ _w , МП	Met	[48, 51, 56]
GLR3.6	Ca ²⁺ > Na ⁺ = K ⁺	ПМ	лист, стебель, корень, ПТ	БС, МП	Glu	[23, 48, 51, 57]
GLR3.7	Ca ²⁺	ПМ	лист, стебель, корень	NaCl		[48]
CNGC1	Ca ²⁺ , K ⁺ , Pb ²⁺ , Na ⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Cd ²⁺		корень, ~~лист~~	М		[58]
CNGC2	Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	ПМ	лист, ПТ, цветок, корень	БС, нагрев	cAMP, ATP	[58, 59]
CNGC3	K ⁺ , Na ⁺	ПМ, Ф	корень, ПТ, лист, стебель	NaCl	Na ⁺	[58, 60]
CNGC4	Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺			БС		[58]
CNGC5	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺	ПМ	лист, корень, ЗК		Гип, cGMP	[61]
CNGC6	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺	ПМ	цветок > листья > > стручки > корень > > стебель, ЗК	БС, нагрев	Гип, cAMP, cGMP	[58, 61, 62]
CNGC7 CNGC8		ПМ	пыльца			[63]
CNGC10	K ⁺ , Na ⁺	ПМ, ЭМ	корень > лист, мезофилл, эпидермис	Грв, NaCl		[58, 64]
CNGC11 CNGC12	Ca ²⁺ , K ⁺	ПМ		БС	cAMP, ~~cGMP~~	[65]
CNGC14	Ca ²⁺	ПМ	корень	Грв	Ауксины, ATP	[66, 67]
CNGC15	Ca ²⁺	ПМ, ядро			NO ₃ ⁻	[67, 68]
CNGC16	Ca ²⁺		пыльца	нагрев	cGMP	[69]

Таблица (продолжение)

Канал	Селективность	Клеточная локализация	Тканевая локализация	Стимул	Регуляция	Ссылка
CNGC17		ПМ			cGMP	[70]
CNGC18	Ca ²⁺	ПМ	пыльца		cAMP, cGMP	[58]
CNGC19	Ca ²⁺	Т, ПМ, ЭМ	лист, корень, ПТ	БС, МП	Гип, cAMP, DAMP	[55, 58, 71]
CNGC20		Т, ЭМ	корень, ЗК, цветок, мезофилл	NaCl		[58]
ANN1	Ca ²⁺ = K ⁺ > Na ⁺	ПМ, Т, ЭМ, Цит	корень, эпидермис	NaCl, МП, холод, нагрев, ↓Ψ _w	ОН ⁻ , H ₂ O ₂ , НМ	[72–77]
ANN2	Ca ²⁺	ПМ, Цит	лист, корень, цветок, гипокотиль, стручки	↓Ψ _w , нагрев	CRY2	[72, 74]
ANN3	Ca ²⁺	ПМ, Цит	корень, гипокотиль, семядоли	↓Ψ _w , нагрев	CRY2	[74]
ANN4	Ca ²⁺ , K ⁺	ПМ, ЭМ	лист, корень, цветок, стебель	↓Ψ _w , NaCl, холод		[73, 76]
ANN5	Ca ²⁺ ?	ЭМ, ядро, Цит	цветок, стручки, пыльца, корень		[Ca ²⁺] _{cyt}	[78, 79]
ANN8		ПМ, ядро		↓Ψ _w , NaCl		[80]
TPC1	Ca ²⁺ ≈ K ⁺ ≈ Na ⁺	Т	лист, ПТ, корень, цветок, эпидермис, мезофилл	БС, NaCl	Деп, [Ca ²⁺] _{cyt} , [Ca ²⁺] _{vac} , ↓pH	[32, 45, 55, 81]
MCA1	Ca ²⁺	ПМ, Т, ЭМ	лист, ПТ, стебель, корень, цветок, стручки, эпидермис	холод, ↓Ψ _w , Грв	НМ	[82, 83]
MCA2	Ca ²⁺	ПМ, Т, ЭМ	лист, ПТ, стебель, корень, цветок, стручки	холод, Грв		[82, 83]
OSCA1.1	K ⁺ > Ba ²⁺ ≈ Ca ²⁺ > Na ⁺ = Mg ²⁺ = Cs ⁺	ПМ	лист, корень, цветок, ЗК	↓Ψ _w	НМ	[84]
OSCA1.3	Ca ²⁺	ПМ	ЗК	БС	DAMP	[85]
OSCA1.7	Ca ²⁺ ?			БС	DAMP	[85]
Piezo1	Ca ²⁺ ?	Т	лист, гипокотиль, корень, ПТ	БС, Прик	НМ	[86, 87]
DEK1	Ca ²⁺	ПМ	эпидермис		НМ	[88]
MSL1	Cl ⁻ ≈ K ⁺	ЭМ, НМ		нагрев, М, ↓Ψ _w , NaCl	НМ	[55, 89]
MSL2, MSL3		ЭМ, НМ		↓Ψ _w		[90]
MSL4, MSL5, MSL6		ПМ	корень		НМ	[90]
MSL8	Cl ⁻ > Na ⁺	ПМ, ЭНР, Т	пыльца		НМ	[45, 91]

Таблица (окончание)

Канал	Селективность	Клеточная локализация	Тканевая локализация	Стимул	Регуляция	Ссылка
MSL9	$\text{Cl}^- > \text{Ca}^{2+}$	ПМ, ЭМ		$\downarrow \Psi_w$	НМ	[90, 92]
MSL10	$\text{Cl}^- > \text{Ca}^{2+} \approx \text{Na}^+$	ПМ, ЭМ	ПТ	$\downarrow \Psi_w$	НМ	[90, 92–96]
SLAC1	Cl^- , NO_3^-		ЗК, гипокотиль	БС, $\downarrow \Psi_w$, Темн	АБК, Ca^{2+}	[32, 97, 98]
SLAH1	Cl^- , NO_3^-		корень			[32, 97, 98]
SLAH2	NO_3^-		корень			[32, 34, 97, 98]
SLAH3	NO_3^-		корень, лист, ЗК		Деп, pH, АБК, NO_3^-	[32, 34, 97–99]
ALMT6	малат, фумарат $>$ цитрат, Cl^- , NO_3^-	Т	лист, ЗК, цветок, ~~корень~~		Ca^{2+} , pH, малат	[100, 101]
ALMT12/ QUAC1	малат и сульфат		ЗК		Деп, малат	[32, 98]
TMEM16A		ЭМ			Ca^{2+}	[32, 102]
DTX33 DTX35		Т	корень, лист, ЗК, цветок, стебель		pH	[103]
VCCN1	$\text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$	ЭМ	лист, цветок	свет	Деп, Ca^{2+}	[104]
GORK1	K^+ , NH_4^+		корень, ЗК, лист	БС, NaCl, АФК	Деп, H_2O_2 , ~~рН~~ , Гип	[47, 105, 106]
SKOR	$\text{K}^+ > \text{Na}^+$		корень, ПТ, ~~стебель, лист~~		Деп, H_2O_2 , $[\text{K}^+]_{\text{in}}$, ~~рН~~	[47, 107]
KAT1	K^+	ПМ, ЭМ	ЗК	свет	Гип, АБК	[47, 108–110]
KAT2	K^+	ПМ	ЗК		Гип, ~~рН~~	[47, 108, 109]
KC1	K^+	ПМ	корень, ЗК, лист		~~рН~~	[47, 109]
AKT1	$\text{K}^+ > \text{Na}^+$	ПМ	Корень		Гип, ~~рН~~	[47, 108, 109]
AKT2	K^+	ПМ	ПТ		Гип, Ca^{2+} , cAMP, ~~рН~~	[47, 105, 109, 111]
TPK1	$\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ \gg \text{Na}^+$	Т	ЗК, корень, мезофилл, ПТ, пыльца	NaCl	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, АБК, CO_2 , ~~рН~~ , ~~рН~~	[47, 112]
TPK4	$\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ \gg \text{Na}^+$	ПМ	корень, пыльца		НМ, ~~рН~~ , $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$, ~~рН~~	[47, 113]
KCO3	K^+	Т	лист, стебель, корень, цветок, ПТ	$\downarrow \Psi_w$		[47, 114]
SPIK	K^+	ПМ	пыльца		Гип, pH	[47, 115]

Примечание. Зачёркнутым отображено показанное отсутствие указанной селективности, локализации и т.д. Сокращения: ПМ – плазматическая мембрана, Т – тонопласт, ЭМ – эндомембраны, Цит – цитозоль, ЗК – замыкающие клетки, ПТ – проводящие ткани, $\downarrow \Psi_w$ – осмотический стресс, БС – биотический стресс, М – тяжёлые металлы, МП – механическое повреждение, АБК – абсцизовая кислота, Грв – гравитация, Прик – прикосновение, Темн – темнота, НМ – натяжение мембраны, Деп – деполяризация, Гип – гиперполяризация, DAMP – молекулярный паттерн, связанный с повреждением (damage-associated molecular pattern).

наблюдается во всём растении, хотя некоторые из них являются в той или иной степени органо- и тканеспецифичными (таблица). Ряд GLR имеет локализацию преимущественно в проводящих тканях, по которым у растений происходит распространение ЭС [48, 55, 116]. Стимулы, индуцирующие активацию GLR, весьма разнообразны и включают засуху, холод, биотические стрессоры и механические повреждения [48, 51, 55, 116]. Хорошо известно, что данный набор стимулов вызывает также изменения как мембранного потенциала, так и внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [3], что в совокупности с локализацией делает каналы этой группы весьма вероятными кандидатами на участие в генерации ЭС в высших растениях.

CNGC являются низкоселективными катионными каналами, структурно близкими к рассматриваемым далее K^+ -каналам шейкер-типа. Для ряда CNGC показана активация как циклическими нуклеотидами, такими как cAMP и cGMP, так и гиперполяризацией, что позволяет одновременно отнести их к электрофизиологическим группам HACC и VICC [45, 55, 58]. CNGC преимущественно локализованы на плазмалемме, а также присутствуют на ядерной мембране и тонопласте. Многие CNGC тканеспецифичны и в основном представлены в проводящих тканях, эпидермисе и замыкающих клетках [55, 58, 116]. Для каналов этой группы показано участие в восприятии различных стимулов и/или защитном ответе на стрессоры, в том числе те, которые вызывают изменение электрической активности [3], включая засоление, засуху, изменение температуры, патогены, тяжёлые металлы и др. (таблица) [55, 58, 67, 116]. Локализация CNGC на плазматической мембране клеток проводящих тканей, а также их электрофизиологические свойства позволяют предположить участие отдельных кандидатов этого семейства каналов в генерации ЭС высших растений.

Аннексины представляют собой группу цитоплазматических белков, способных связываться с фосфолипидами плазмалеммы, тонопласта и мембраны ЭПР и выполнять функции низкоселективных катионных каналов, вероятно, относящихся к группе VICC [45, 55]. Стимулы, индуцирующие активацию ряда каналов данного семейства, включают засуху, засоление, изменение температуры. В качестве регулятора активности аннексинов могут выступать АФК (таблица), которые, как отмечено выше, могут служить индукторами ВП [45, 55, 72–74].

TPC представлены в арабидопсисе единственным геном *TPC1*, повсеместно экспрессирующимся в тканях растения на вакуолярной мембране. Белок TPC1 является слабоселективным катионным каналом с медленной кинетикой активации, с небольшим преимуществом для Ca^{2+} [55, 116]. Известно, что TPC1 активируется деполяризацией и цитозольным Ca^{2+} [45, 55]. TPC1 участвует в защитном ответе на разнообразные стрессоры, такие как засоление, наводнение, атаки вредителей и т.д., участвует в закрытии устьиц, гормональной регуляции и продукции АФК NADPH-оксидазами [45, 55, 116], т.е. физиологических процессах, регуляция которых связана с передачей ЭС [1, 2, 4, 5, 7]. По таким критериям, как селективность, локализация на тонопласте и механизм активации, канал TPC1 является перспективным кандидатом на роль участника в электрической сигнализации.

Рассмотрение механочувствительных Ca^{2+} -каналов следует начать с каналов семейства MCA [45, 55], которые локализованы на плазмалемме и особенно интенсивно экспрессируются в проводящих тканях [55, 82, 90]. MCA активируются изменением натяжения мембраны, вызванным осмотическим стрессом, механическим воздействием, холодом и другими стимулами [82, 90, 116–118]. Проницаемость для Ca^{2+} и локализация в проводящих пучках выделяют данное семейство каналов как наиболее вероятных участников в генерации ЭС среди механочувствительных Ca^{2+} -каналов.

Каналы OSCA1 представляют собой слабоселективные катионные каналы плазмалеммы, локализованные преимущественно в замыкающих клетках устьиц [45, 55]. Их активация происходит при изменении натяжения мембраны, сами они при этом выступают осмосенсорами и регулируют закрытие устьиц, хотя некоторые члены семейства, возможно, активируются молекулярными паттернами, связанными с повреждением (DAMP, damage-associated molecular pattern), опосредованно через другие рецепторы и участвуют в защитном ответе на патогены [55, 85]. Достаточно специфичная локализация и функциональная роль каналов OSCA1 делают их маловероятными участниками ЭС.

Другими механочувствительными каналами, выявленными у растений, являются пьезоканал растений Piezo1 и не родственный ему, но также сходный по электрофизиологическим характеристикам с пьезоканалом мыши канал RMA, кодируемый геном *DEK1* (*DEFECTIVE KERNEL1*) из семейства фитокальпаинов. Оба канала представляют собой быстро активиру-

ющиеся и инактивирующиеся катионные каналы низкой проводимости [45, 55]. RMA расположен преимущественно на плазмалемме эпидермальных клеток и, судя по всему, отвечает за правильное формирование эпидермиса и нижележащих тканей [95]. Piezo1 располагается главным образом в корневом чехлике, в проводящих тканях, в пыльце и пыльцевой трубке, причём в последней локализуется преимущественно на тонопласте. Основные его функции связаны с механочувствительностью корней в твёрдом субстрате и противовирусным иммунитетом [86, 87, 119]. Ограниченное количество сведений о каналах Piezo1 и RMA на данный момент не позволяет сделать однозначного заключения об их возможной роли в генерации ЭС растений.

Можно заключить, что представители ряда семейств Ca^{2+} -каналов потенциально способны участвовать в формировании ЭС в растениях. По таким критериям, как локализация, механизм активации, индуцирующие стимулы и функциональная роль, наиболее вероятными кандидатами являются отдельные члены семейств каналов GLR, CNGC, TPC1, MCA и ANN.

Анионные каналы. Многие анионные каналы растений проводят не только ионы хлора, но и другие анионы, в число которых входят нитраты, сульфаты и некоторые органические анионы. Важным отличием анионных каналов растений также является тот факт, что в норме у растений анионы находятся в большей концентрации внутри клетки, чем снаружи, поэтому их градиент направлен наружу. По электрофизиологическим характеристикам анионные каналы традиционно подразделяют на два типа: быстрые (R-тип) и медленные (S-тип). Первые, R-типа, являются потенциал-зависимыми, характеризуются быстрой активацией/деактивацией (в течение миллисекунд) и преимущественно проводят хлориды, нитраты и сульфаты, тогда как каналы S-типа, потенциал-независимые, со временем активации/деактивации около 10 с, имеют высокую проницаемость для нитратов и более низкую — для остальных анионов [32, 34, 97, 98]. Стоит отметить, что данная классификация появилась при исследовании анионных каналов в замыкающих клетках, впоследствии также были выявлены анионные каналы иных типов, например, выделяемые отдельно алюминий-чувствительные каналы, механочувствительные анионные каналы и анионные каналы эндо-мембран [32, 34].

Механочувствительно-подобные каналы (MSL, mechanosensitive-like channels) имеют

преимущественно анионную проводимость у высших растений, несмотря на традиционное для многих обзоров причисление MSL к Ca^{2+} -каналам [45, 55]. Представители данного семейства преимущественно локализованы на плазмалемме и мембране ЭПР (таблица). Многие MSL-каналы плазмалеммы имеют высокую ткане- и органоспецифичность и в основном представлены в корне, за исключением MSL8, экспрессирующегося в пыльце, и MSL10, имеющего выраженную экспрессию в проводящих тканях наряду с корнем [45, 90, 94, 96]. Каналы MSL активируются изменением натяжения мембраны, в том числе при осмотическом стрессе, и отличаются относительно высокой проводимостью по сравнению с другими механочувствительными каналами [45, 55, 90, 94]. Большинство членов семейства MSL, вероятно, нельзя отнести к числу участников генерации ЭС ввиду их специфичной роли и преимущественной локализации в корне. Однако один из членов семейства, MSL10, требует более детального рассмотрения в качестве потенциального участника механизма генерации ЭС, так как он отвечает большинству критериев: помимо механочувствительности, селективности в отношении Cl^- и локализации на плазматической мембране клеток проводящих пучков, он также обладает способностью к активации продукции АФК при участии NADPH-оксидазы, работа которой, как отмечалось выше, может вносить вклад в распространение ВП [55, 90, 94, 96, 116, 117].

Члены семейства медленных анионных каналов (SLAC/SLAH, slow anion channel associated) относятся к каналам S-типа, локализованным на плазмалемме. Между членами семейства существуют различия по селективности: SLAH2 и SLAH3 преимущественно проводят нитраты и не проводят значимых хлоридных токов, тогда как остальные каналы семейства проводят как хлориды, так и нитраты [32, 34, 98]. Имеются различия и в локализации: SLAH1 и SLAH2 преимущественно экспрессируются в корне, тогда как SLAC1 и SLAH3 имеют более широкую экспрессию, в том числе в замыкающих клетках. Активация SLAC1 может быть вызвана различными стимулами, ряд из которых вызывает изменение электрической активности, а именно: атакой патогенов, повышением концентрации CO_2 , засухой, темнотой и т.д., вероятно, по Ca^{2+} -зависимому пути. SLAH3, помимо Ca^{2+} -зависимой регуляции, может активироваться деполаризацией и закислением цитозоля [32, 34, 97–99]. Среди членов данного семейства SLAC1

и SLAH3 можно отнести к потенциальным кандидатам на роль участников генерации ЭС ввиду соответствия критериям селективности и регуляции.

В качестве канала R-типа был выявлен представитель семейства активированных алюминием транспортеров малата (ALMT, aluminum activated malate transporter), кодируемый геном *ALMT12*. Другое название *ALMT12* — быстро активирующийся анионный канал (QUAC1, quickly activating anion channel 1) — присвоено вследствие нетипичного для данного семейства отсутствия активации данного канала алюминием [32, 34]. Канал QUAC1 локализован на плазмалемме замыкающих клеток и участвует в закрытии устьиц, активируется деполяризацией, имеет характерные для каналов R-типа времена активации/деактивации и проводит малат и сульфат. Другой член семейства, локализованный на тонопласте *ALMT6*, обладает преимущественно малатной и фумаратной проводимостью, но также проводит хлориды, активируется Ca^{2+} и кислым вакуолярным pH [100, 101]. Другие хорошо исследованные на сегодняшний день представители ALMT в основном локализуются в корнях и, судя по всему, проявляют специфическую алюминий-зависимую активацию [32, 34, 98]. Среди членов семейства ALMT по электрофизиологическим характеристикам QUAC1 может выступать в роли участника механизма генерации ЭС, однако сведения о его локализации, имеющиеся на сегодня, скорее противоречат такой возможности.

Среди других анионных каналов можно отметить представителей семейства переносчиков оттока детоксификации (DTX, detoxification efflux carrier), DTX33 и DTX35, локализованных на тонопласте во многих тканях растения. Эти каналы отвечают за потенциал-зависимый входящий ток хлоридов и других анионов в вакуоль, механизмом их регуляции служит изменение pH [103]. Локализованный на мембране ЭПР белок, кодируемый геном *TMEM16*, потенциально может функционировать как Ca^{2+} -активируемый анионный канал [32, 102]. Также имеются сведения о потенциал-зависимом Cl^- -канале тилакоидов VCCN1 (voltage-dependent Cl^- channel 1), который активируется деполяризацией и светом, но не Ca^{2+} , и участвует в регуляции фотосинтеза [104].

Таким образом, с точки зрения потенциального участия в генерации ЭС среди выявленных на данный момент анионных каналов особое внимание следует обратить на MSL10, QUAC1, SLAC1 и SLAH3.

Калиевые каналы. Сопоставление электрофизиологических характеристик каналов и кодирующих их генов наиболее полно на сегодняшний день выполнено для K^+ -каналов. Основным вариантом классификации K^+ -каналов является деление в зависимости от механизма активации и от типа наблюдаемой проводимости [35, 46, 47]. По механизму активации их делят на потенциал-зависимые и потенциал-независимые каналы. Потенциал-зависимые K^+ -каналы локализуются на плазмалемме, тогда как потенциал-независимые, за некоторым исключением, являются K^+ -каналами эндоплазматической мембраны [46, 47]. Потенциал-зависимые K^+ -каналы подразделяют на каналы внешнего (K_{out}^+) и внутреннего (K_{in}^+) выпрямления, иногда выделяя из последних каналы слабой проводимости (K_{weak}^+) [35, 46, 120].

На настоящий момент определены два семейства генов K^+ -каналов: K^+ -каналы шейкер-типа (Shaker) и двухпоровые K^+ -каналы (TPK, two-pore K^+ channels). Все члены семейства каналов шейкер-типа относятся к потенциал-зависимым каналам и, в свою очередь, делятся на каналы внешнего (GORK, SKOR) и внутреннего выпрямления (AKT, KAT) [46]. Иногда среди генов K_{in}^+ -каналов отдельно выделяют ген *KC1* (*KAT3*), кодирующий регуляторную субъединицу, не способную самостоятельно образовывать канал, но влияющую на характеристики K_{in}^+ -каналов при присоединении к ним [46, 109]. Все остальные гены подгруппы K_{in}^+ -каналов шейкер-типа, *KAT1*, *KAT2*, *AKT1*, *AKT2*, *AKT5* и *SPIK* (*AKT6*), кодируют субъединицы, формирующие каналы, причём эти каналы могут формироваться как гомомерами, так и гетеромерами, имеющими несколько различающиеся электрофизиологические характеристики [47, 108]. Все каналы этой подгруппы активируются гиперполяризацией и формируют входящие токи K^+ , за исключением AKT2, способного выполнять также роль канала утечки [109, 111], и который часто относят к выделяемой подгруппе K_{weak}^+ [46, 47, 120].

K_{out}^+ -Каналы шейкер-типа в растениях выделено всего два, GORK (guard cell K^+ outward rectifying channel) и SKOR (Shaker-type K^+ outward rectifying channel), они активируются деполяризацией. Кроме того, их активация может происходить с участием Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ, а также АФК, что говорит о возможной роли этих каналов в формировании ЭС. Однако стоит отметить, что SKOR практически не экспрессируется за пределами корня (таблица), поэтому вероятность его участия в формировании ЭС в побегах довольно

регистрация изменений ионных концентраций, опосредуемых изучаемыми каналами, и сравнение характера этих изменений как между различными линиями, так и с параметрами ЭС [23, 53, 122]. Кроме того, в качестве доказательства участия конкретных каналов в генерации ЭС может использоваться их искусственная активация или деактивация специфическими для них лигандами, вызывающая типичные изменения мембранного потенциала, однако такой подход ограничен лиганд-активируемыми каналами [23, 123]. Вышеописанные методы имеют также свои недостатки, одним из которых является возможное взаимодействие кодируемых разными генами субъединиц для формирования полноценного гетеромерного канала при возможности сборки гомомерного канала. Характеристики и возможная функциональная роль гомо- и гетеромерных комплексов могут различаться [47, 109, 124]. При этом исследования с двойными и более мутантами также не могут однозначно показать, связано ли изменение параметров ЭС с тем, что не формируются определённые гетеромерные каналы, или же подавлен ряд гомомерных каналов, принимающих участие в генерации ЭС [20, 53, 122].

Интерпретацию результатов затрудняет и наличие компенсаторного механизма в случае участия в генерации ЭС нескольких каналов, когда дисфункция подавляемого гена компенсируется повышенной экспрессией другого, выполняющего ту же или близкую роль [77]. И наконец, для некоторых каналов показано, что они способны выполнять некоторые свои функции, например, регуляцию клеточной смерти, за счёт неканальных субъединиц [125]. Таким образом, хотя использование мутантов не даёт однозначного ответа, на сегодня нет иного подхода для сопоставления электрофизиологических и молекулярно-генетических данных на уровне организма.

Наиболее исследованными участниками генерации ЭС в растениях являются Ca^{2+} -каналы, прежде всего из семейства GLR (рис. 2) [51]. В двойных мутантах арабидопсиса по *GLR3.3* и *GLR3.6* (*glr3.3glr3.6*) наблюдается полное подавление распространения ВП за пределы раздражаемого листа в ответ на механическое повреждение [20, 21, 53, 56, 122], нападение грызущих насекомых [20], сильный свет [122] и повреждение лазером [53]. При этом в раздражаемом листе амплитуда электрической реакции снижается, но не подавляется полностью [20, 21, 56]. При механическом повреждении корней также происходит уменьшение амплитуды и длительности ЭС

в листьях растений *glr3.3glr3.6* по сравнению с диким типом [23]. В случае одиночных мутантов *glr3.3* и *glr3.6* наблюдается лишь снижение амплитуды и длительности распространяющегося ВП [20, 53, 122]. Отметим, что если в составе ВП, индуцированного рассечением листа, имеется быстрая импульсная ПД-образная компонента, а также медленная волна деполяризации, то в мутантах *glr3.6* подавляется только последняя [56]. Что касается *GLR3.3*, то он в сравнении с *GLR3.6*, возможно, вносит больший вклад в формирование ответа на термические воздействия, поскольку двойная мутация *glr3.1glr3.3* также полностью подавляла реакцию на ожог лазером, но не на механическое повреждение [53]. Важно отметить, что при сопоставлении мутантов *glr* с диким типом в случае одновременной регистрации динамики концентрации Ca^{2+} и динамики электрического потенциала, индуцированных локальным воздействием, были выявлены их согласованные изменения: в мутантных растениях с дефицитом GLR были подавлены как Ca^{2+} -волна, так и ВП [23, 53, 122]. Это свидетельствует о непосредственной связи изменений концентрации Ca^{2+} , опосредованных каналами GLR, и генерации ВП.

В ряде работ была проведена искусственная активация каналов GLR путём добавления глутамата, что вызвало как рост концентрации Ca^{2+} в цитозоле [57], так и генерацию ЭС [23]. Причём в мутантных растениях *glr3.3* и *glr3.6* добавление глутамата практически не вызывало ни роста концентрации Ca^{2+} , ни ЭС [23, 57]. В свете этого, с учётом данных о пространственно-временной динамике Ca^{2+} , стоит отметить потенциальную возможность участия *GLR3.3* и *GLR3.6* в дистанционном сигнале в ответ на прикосновение [126] и нападение тлей [121], а для *GLR3.3* — и на солевой стресс [127].

О роли GLR в формировании ЭС свидетельствуют также данные, полученные на растениях томата (*Solanum lycopersicum* L.): у двойных мутантов по *SIGLR3.3* и *SIGLR3.5* (гомологи *GLR3.3* и *GLR3.6* арабидопсиса) происходило полное подавление распространения ВП в соседние листочки при механическом повреждении, тогда как в самом раздражаемом листе имело место лишь снижение амплитуды [128].

Преимущественная экспрессия *GLR3.3* и *GLR3.6* в проводящих пучках является дополнительным свидетельством участия соответствующих каналов в системном распространении ЭС. Так, в листьях арабидопсиса показана их выраженная экспрессия как в первичных,

так и во вторичных и в третичных пучках. Стоит отметить, что в первичных проводящих пучках *GLR3.3* экспрессируется прежде всего во флоэме, тогда как *GLR3.6* – в ксилеме [53, 57].

Для других потенциальных кандидатов из данного семейства показано, что у мутантов по *GLR3.1* и *GLR3.2* происходит снижение амплитуды и длительности ЭС в ответ на механическое повреждение и повреждение лазером [20, 53], однако даже в двойных мутантах, за исключением ранее упомянутого *glr3.1glr3.3*, реакция не подавлялась полностью ни системно, ни локально [53]. Для *GLR3.1* при этом предполагается участие в распространении ЭС за пределами проводящих пучков вследствие нарушения ассоциированного с ЭС радиального распространения Ca^{2+} -сигнала [53]. Каналы, кодируемые *GLR3.5*, могут отвечать за формирование ПД-образной фазы ЭС в ответ на механическое повреждение, однако, возможно, картина несколько сложнее. Так, в мутантных растениях ПД-образная фаза отсутствовала в нераздражённых листьях, имеющих прямые сосудистые связи с раздражаемым листом (в отличие от дикого типа), но присутствовала в нераздражённых листьях, имеющих не прямые сосудистые связи с раздражаемым листом (в которых у растений дикого типа ПД-образная фаза отсутствовала) [56]. Это служит ещё одним свидетельством сложности и многогранности процессов генерации и распространения ЭС в растениях, особенности которых ещё предстоит выяснить.

Канал *DmGLR3.6* венериной мухоловки, гомолог *GLR3.1/3.3* арабидопсиса, потенциально может участвовать в распространении ПД, индуцированного прикосновением, из сенсорного волоска в лист ловушки, о чём свидетельствует специфичная картина экспрессии данного гена и возможность индукции ПД глутаматом в листе-ловушке [129, 130]. Для однодольных на примере риса (*Oryza sativa* L.) среди *GLR* можно выделить ген *OsGLR3.4*, кодирующий Ca^{2+} -канал, сходный по функциональной роли с *GLR3.3* и *GLR3.6* арабидопсиса: в дефицитных по этому каналу мутантах риса частично подавляется системное распространение ВП при механическом повреждении, локальная электрическая реакция при этом не подавляется [123]. Также стоит отметить, что канал *OsGLR3.4* может активироваться сразу несколькими аминокислотами [123], в отличие от глутамат-специфичных *GLR3.3* и *GLR3.6* арабидопсиса [23], что может быть обусловлено тем, что *OsGLR3.4* находится относительно далеко от *GLR3.3* и *GLR3.6* с филогенетической точки зрения [131].

Другим типом каналов, для которых участие в формировании ЭС было определено с помощью молекулярно-генетического подхода, являются анионные каналы, относящиеся к семейству механочувствительных каналов *MSL* (рис. 2). В мутантах *msl10* наблюдается уменьшение длительности системно распространяющегося ВП, индуцированного механическим повреждением, за счёт исчезновения выделенной авторами в составе ВП фазы «медленной деполяризации». ВП в растениях *msl10* проявлял сходство по своим характеристикам с ВП в одиночных мутантах *glr3.3* и *glr3.6*. При этом для других мутантов семейства *MSL*, а именно *msl4*, *msl5*, *msl6* и *msl9*, никаких изменений в параметрах ВП не было выявлено [93]. Как отмечено выше, экспрессия *MSL10* наблюдается в проводящих пучках, включая как флоэму, так и ксилему. Канал *MSL10* показывает анионную, однако не кальциевую проводимость [93, 132]. Тем не менее работа *MSL10*, судя по всему, активирует приток Ca^{2+} в клетку при механическом повреждении через *GLR3.3* и *GLR3.6*. При этом было продемонстрировано, что начальная стадия деполяризации опережает по времени начало изменений концентрации Ca^{2+} [93], что подвергает сомнению общепринятый механизм генерации ВП.

И наконец, был выявлен канал, обеспечивающий поток K^{+} в ходе фазы реполяризации ПД – *GORK1*. В мутантах *gork1* амплитуда и скорость деполяризации индуцированного электрическим током ПД была выше по сравнению с диким типом, тогда как реполяризация была значительно медленнее (рис. 2). Последующее математическое моделирование подтвердило участие этого канала в генерации ПД. Кроме того, было показано, что *GORK1* активируется ещё на фазе деполяризации, в норме уменьшая её скорость и амплитуду [105]. Также в этой работе было обнаружено, что другой K^{+} -канал, *AKT2*, может влиять на генерацию ПД, однако не напрямую, а через регуляцию возбудимости плазмалеммы [105].

В недавних исследованиях на венериной мухоловке было выявлено участие двух K^{+} -каналов: *DmSKOR*, относящегося к той же группе, что и ранее рассмотренный *GORK1*, и *KDM1* – гомолога *KAT1* арабидопсиса [37, 129]. Подавление экспрессии *DmSKOR* коронатинном, угнетающим в венериной мухоловке экспрессию генов, связанных с возбудимостью, приводило к увеличению времени реполяризации при генерации механически индуцированного ПД в листе-ловушке, что мо-

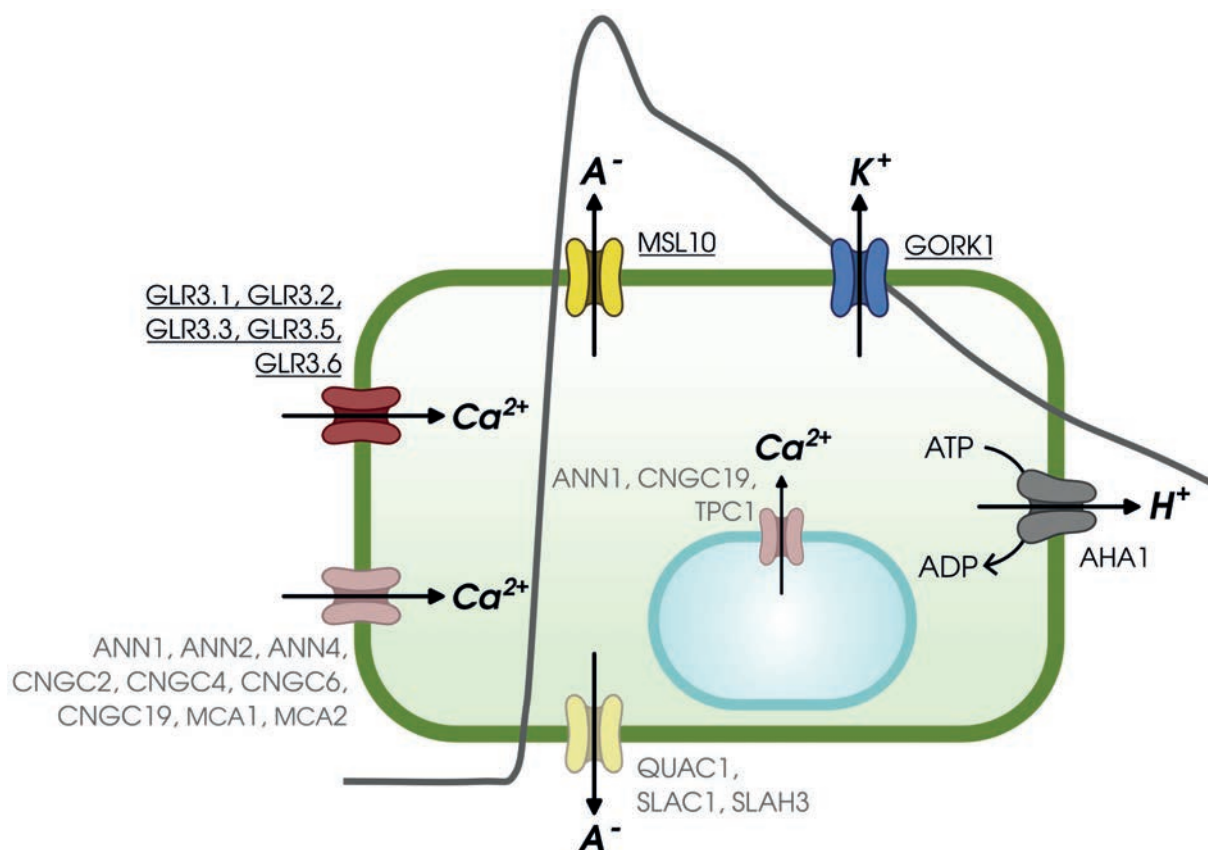


Рис. 3. Ионные каналы, принимающие участие в генерации и распространении ЭС в клетке высших растений. Расположение ионных каналов соответствует определённой фазе процесса генерации ЭС, в формирование которой они вносят вклад, за исключением Ca^{2+} -каналов, которые могут активироваться на разных стадиях процесса формирования ЭС. Ионные каналы, для которых экспериментально подтверждено участие в генерации ЭС, обозначены подчёркнутым шрифтом. Ионные каналы, для которых потенциально возможно участие в генерации ЭС, обозначены обычным шрифтом. A^- – анионы. На схеме также обозначена H^+ -АТРаза АНА1, которая вносит вклад в генерацию ЭС [2, 7]

жет говорить об участии DmSKOR в формировании фазы реполяризации ПД [129, 130]. KDM1 представляет собой активируемый гиперполяризацией и кислым pH апопласта канал, локализованный исключительно в механически чувствительных волосках и отвечающий за вход K^+ в клетку. Математическое моделирование и сопоставление с экспериментальными данными показало, что роль данного канала состоит в восстановлении концентрации K^+ в ходе генерации серий ПД, приводящих к захлопыванию ловушки венериной мухоловки и инициирующих выработку пищеварительных ферментов [37].

На потенциальный вклад определённых каналов в генерацию ЭС могут указывать воздействия мутаций не только на параметры собственно ЭС, но также и на параметры Ca^{2+} -сигнала вследствие высокого сходства в динамике концентрации Ca^{2+} и изменений электрического потенциала при возбуждении [53, 129]. Так, у мутантов по вакуолярному кана-

лу TPC1 наблюдалось снижение амплитуды и скорости волны Ca^{2+} в ответ на засоление [81, 133] и механическое повреждение [134]. В случае атаки тлей сверхэкспрессия TPC1 приводит к развитию системного повышения концентрации Ca^{2+} , которое не наблюдается в диком типе [121]. Тем не менее для засоления и механического повреждения авторы предположили лишь вспомогательную роль TPC1, заключающуюся в усилении сдвига концентрации Ca^{2+} , инициируемого другими каналами [133, 134]. Продемонстрированная роль TPC1 в формировании Ca^{2+} -волны при различных стимулах, предположения о роли тонопласта в генерации ЭС [44], а также данные ингибиторного анализа [15, 42] в совокупности указывают на непосредственное участие TPC1 в генерации ЭС. Вклад в формирование Ca^{2+} -сигнала был показан и для канала из другого семейства, CNGC19, локализованного на плазмалемме клеток флоэмы: было выявлено его участие в повышении концентрации

Ca^{2+} в ответ на нападение грызущих насекомых, причём активация *CNGC19* может быть опосредована как *Pep1* (Protein elicitor peptide 1) — одним из DAMP, выделяющимся при повреждении клеток — так и непосредственно cAMP, содержание которого также повышается при повреждении [71].

Помимо результатов исследований распространяющегося Ca^{2+} -сигнала, можно привлечь данные по изменениям концентрации Ca^{2+} в зоне действия стимула, в частности, на примере таких хорошо изученных стимулов, как охлаждение и нагрев. Работы на мутантах по *MCA1* и *MCA2* [118], *ANN1* и *ANN4* [73], *OsCNGC14* и *OsCNGC16* (гомологи *CNGC2* и *CNGC4* арабидопсиса) [135] показали снижение амплитуды роста концентрации Ca^{2+} в цитозоле, индуцированного холодом, по сравнению с диким типом. При этом амплитуда снижается и под действием ингибиторов, подавляющих ПД, что вместе с характерной формой Ca^{2+} -сигнала позволяет предположить участие этих каналов в генерации электрической реакции в зоне охлаждения [73, 118, 135]. Отметим, что ни в одном из мутантов, в том числе двойных [118], рост концентрации Ca^{2+} не был подавлен полностью. К тому же при условном суммировании доли его снижения от разных мутаций получается значительно более 100%, что явно свидетельствует либо о компенсаторной экспрессии иных генов, либо о разных участниках изменения уровня Ca^{2+} в разных видах растений [73, 118, 135]. Для другого хорошо изученного стимула — нагрева — показано подавление волны Ca^{2+} в цитозоле у мутантов по генам *CNGC2*, *CNGC6*, *OsCNGC14*, *OsCNGC16*, *ANN1* и *ANN2* в ответ на стимул, причём в диком типе индуцированный нагревом рост уровня Ca^{2+} по форме и длительности напоминает ВП [62, 72, 135, 136]. Изложенное указывает, что перечисленные каналы могут вносить вклад в генерацию электрической реакции в зоне раздражения при действии соответствующего стимула.

В целом, на данный момент можно достаточно уверенно говорить, что в генерации распространяющихся ЭС у высших растений участвуют такие Ca^{2+} -каналы, как *GLR3.1*, *GLR3.2*, *GLR3.3*, *GLR3.5* и *GLR3.6*, анионный канал *MSL10* и K^+ -канал *GORK1* (рис. 3). Потенциальными участниками генерации ЭС также являются Ca^{2+} -каналы *ANN1*, *ANN2*, *ANN4*, *CNGC2*, *CNGC4*, *CNGC6*, *CNGC19*, а также вакуолярный *TPC1* и механочувствительные *MCA1* и *MCA2*. Экспериментальные доказательства участия анионных каналов

QUAC1, *SLAC1* и *SLAH3* отсутствуют, однако их свойства свидетельствуют о потенциальном вкладе в генерацию ЭС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В завершение анализа молекулярных механизмов электрической сигнализации у высших растений констатируем необходимость большого объёма дальнейших исследований. Наибольший результат может принести сосредоточение усилий на решении следующих вопросов: идентификация молекулярной природы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов плазмалеммы, ответственных за инициацию ПД, возникновение которого у растений имеет место при достижении пороговой деполяризации [8], и поиск генов, кодирующих ионные каналы, в растениях различных видов, включая традиционные для электрофизиологических исследований локомоторные и насекомоядные растения. Наряду с этим необходимо изучение многообразия электрической сигнализации у растений как в отношении различных типов ЭС, так и в отношении особенностей ЭС у растений различных видов. Наилучший результат может дать объединение в рамках единого исследования электрофизиологических и генетических подходов в сочетании с методами анализа ионных концентраций в интактных растениях, в частности, на основе генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров.

Идентификация и характеристика участвующих в генерации ЭС ионных каналов внесёт значительный вклад не только в расшифровку механизмов возбуждения у растений, но также и в формирование целостной картины функциональной роли ЭС, поскольку индукция распространяющимся ЭС функционального ответа базируется на изменениях концентрации ионов в клетках и тканях, вызванных распространением ЭС [5, 6]. Впоследствии это будет способствовать решению таких важных вопросов, как возможность передачи информации при участии ЭС у растений [3] и взаимодействие электрической сигнальной системы с другими типами сигнальных систем, таких как гормональная, кальциевая и АФК [1, 2, 4, 7].

Вклад авторов. В.А. Воденеев — концепция и руководство работой; М.А. Мудрилов, М.М. Ладейнова, Д.В. Кузнецова и В.А. Воденеев — поиск материала; М.А. Мудрилов и М.М. Ладейнова — написание текста;

М.М. Ладейнова и Д.В. Кузнецова — оформление рисунков; М.А. Мудрилов, М.М. Ладейнова и В.А. Воденеев — редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00388).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huber, A. E., and Bauerle, T. L. (2016) Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge, *J. Exp. Bot.*, **67**, 2063-2079, doi: 10.1093/jxb/erw099.
- Johns, S., Hagihara, T., Toyota, M., and Gilroy, S. (2021) The fast and the furious: rapid long-range signaling in plants, *Plant Physiol.*, **185**, 694-706, doi: 10.1093/plphys/kiaa098.
- Mudrilov, M., Ladeynova, M., Grinberg, M., Balalaeva, I., and Vodeneev, V. (2021) Electrical signaling of plants under abiotic stressors: transmission of stimulus-specific information, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10715, doi: 10.3390/ijms221910715.
- Ladeynova, M., Kuznetsova, D., Mudrilov, M., and Vodeneev, V. (2023) Integration of electrical signals and phytohormones in the control of systemic response, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 847, doi: 10.3390/ijms24010847.
- Sukhov, V., Sukhova, E., and Vodeneev, V. (2019) Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **146**, 63-84, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.11.009.
- Klejchova, M., Silva-Alvim, F. A. L., Blatt, M. R., and Alvim, J. C. (2021) Membrane voltage as a dynamic platform for spatiotemporal signaling, physiological, and developmental regulation, *Plant Physiol.*, **185**, 1523-1541, doi: 10.1093/plphys/kiab032.
- Farmer, E. E., Gao, Y., Lenzoni, G., Wolfender, J., and Wu, Q. (2020) Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses, *New Phytol.*, **227**, 1037-1050, doi: 10.1111/nph.16646.
- Оприлов В. А., Пятинин С. С., Ретивин В. Г. (1991) *Биоэлектрогенез у высших растений*, Наука, Москва.
- Bulychev, A. A., and Komarova, A. V. (2014) Long-distance signal transmission and regulation of photosynthesis in characean cells, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 273-281, doi: 10.1134/S0006297914030134.
- Kisnieriene, V., Trębacz, K., Pupkis, V., Koselski, M., and Lapeikaite, I. (2022) Evolution of long-distance signalling upon plant terrestrialization: comparison of action potentials in Characean algae and liverworts, *Ann. Bot.*, **130**, 457-475, doi: 10.1093/aob/mcac098.
- Lunevsky, V. Z., Zherelova, O. M., Vostrikov, I. Y., and Berestovsky, G. N. (1983) Excitation of *Characeae* cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels, *J. Membr. Biol.*, **72**, 43-58, doi: 10.1007/BF01870313.
- Воденеев В. А., Катичева Л. А., and Сухов В. С. (2016) Электрические сигналы у высших растений: механизмы генерации и распространения, *Биофизика*, **61**, 598-606.
- Fromm, J., and Lautner, S. (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants: electrical signals in plants, *Plant Cell Environ.*, **30**, 249-257, doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01614.x.
- Hodick, D., and Sievers, A. (1988) The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis, *Planta*, **174**, 8-18, doi: 10.1007/BF00394867.
- Krol, E., Dziubinska, H., Stolarz, M., and Trebacz, K. (2006) Effects of ion channel inhibitors on cold- and electrically-induced action potentials in *Dionaea muscipula*, *Biol. Plant.*, **50**, 411-416, doi: 10.1007/s10535-006-0058-5.
- Stahlberg, R., Cleland, R. E., and Van Volkenburgh, E. (2006) Slow wave potentials — a propagating electrical signal unique to higher plants, in *Communication in Plants* (Baluska, F., Mancuso, S., and Volkmann, D., eds), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 291-308, doi: 10.1007/978-3-540-28516-8_20.
- Li, Q., Wang, C., and Mou, Z. (2020) Perception of damaged self in plants, *Plant Physiol.*, **182**, 1545-1565, doi: 10.1104/pp.19.01242.
- Vodeneev, V., Mudrilov, M., Akinchits, E., Balalaeva, I., and Sukhov, V. (2018) Parameters of electrical signals and photosynthetic responses induced by them in pea seedlings depend on the nature of stimulus, *Funct. Plant Biol.*, **45**, 160, doi: 10.1071/FP16342.
- Mudrilov, M., Ladeynova, M., Berezina, E., Grinberg, M., Brilkina, A., Sukhov, V., and Vodeneev, V. (2021) Mechanisms of specific systemic response in wheat plants under different locally acting heat stimuli, *J. Plant Physiol.*, **258-259**, 153377, doi: 10.1016/j.jplph.2021.153377.
- Mousavi, S. A. R., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., and Farmer, E. E. (2013) Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound

- signalling, *Nature*, **500**, 422-426, doi: 10.1038/nature12478.
21. Salvador-Recatalà, V., Tjallingii, W. F., and Farmer, E. E. (2014) Real-time, *in vivo* intracellular recordings of caterpillar-induced depolarization waves in sieve elements using aphid electrodes, *New Phytol.*, **203**, 674-684, doi: 10.1111/nph.12807.
 22. Julien, J. L., Desbiez, M. O., De Jaegher, G., and Frachisse, J. M. (1991) Characteristics of the wave of depolarization induced by wounding in *Bidens Pilosa* L., *J. Exp. Bot.*, **42**, 131-137, doi: 10.1093/jxb/42.1.131.
 23. Shao, Q., Gao, Q., Lhamo, D., Zhang, H., and Luan, S. (2020) Two glutamate- and pH-regulated Ca^{2+} channels are required for systemic wound signaling in *Arabidopsis*, *Sci. Signal.*, **13**, eaba1453, doi: 10.1126/scisignal.aba1453.
 24. Zimmermann, M. R., and Felle, H. H. (2009) Dissection of heat-induced systemic signals: superiority of ion fluxes to voltage changes in substomatal cavities, *Planta*, **229**, 539-547, doi: 10.1007/s00425-008-0850-x.
 25. Katicheva, L., Sukhov, V., Akinchits, E., and Vodeneev, V. (2014) Ionic nature of burn-induced variation potential in wheat leaves, *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1511-1519, doi: 10.1093/pcp/pcu082.
 26. Vodeneev, V., Akinchits, E., and Sukhov, V. (2015) Variation potential in higher plants: Mechanisms of generation and propagation, *Plant Signal. Behav.*, **10**, e1057365, doi: 10.1080/15592324.2015.1057365.
 27. Stahlberg, R., and Cosgrove, D. J. (1997) The propagation of slow wave potentials in pea epicotyls, *Plant Physiol.*, **113**, 209-217, doi: 10.1104/pp.113.1.209.
 28. Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., Dangl, J. L., and Mittler, R. (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli, *Sci. Signal.*, **2**, ra45, doi: 10.1126/scisignal.2000448.
 29. Devireddy, A. R., Zandalinas, S. I., Gómez-Cadenas, A., Blumwald, E., and Mittler, R. (2018) Coordinating the overall stomatal response of plants: rapid leaf-to-leaf communication during light stress, *Sci. Signal.*, **11**, eaam9514, doi: 10.1126/scisignal.aam9514.
 30. Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Mullineaux, P. M., and Schöffl, F. (2006) Heat stress-induced H_2O_2 is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*, *Plant Mol. Biol.*, **61**, 733-746, doi: 10.1007/s11103-006-0045-4.
 31. Kawarazaki, T., Kimura, S., Iizuka, A., Hanamata, S., Nibori, H., Michikawa, M., Imai, A., Abe, M., Kaya, H., and Kuchitsu, K. (2013) A low temperature-inducible protein AtSRC2 enhances the ROS-producing activity of NADPH oxidase AtRbohF, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 2775-2780, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.024.
 32. Hedrich, R. (2012) Ion channels in plants, *Physiol. Rev.*, **92**, 1777-1811, doi: 10.1152/physrev.00038.2011.
 33. Costa, A., Navazio, L., and Szabo, I. (2018) The contribution of organelles to plant intracellular calcium signalling, *J. Exp. Bot.*, **69**, 4175-4193, doi: 10.1093/jxb/ery185.
 34. Kollist, H., Jossier, M., Laanemets, K., and Thomine, S. (2011) Anion channels in plant cells: plant anion channels, *FEBS J.*, **278**, 4277-4292, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08370.x.
 35. Véry, A.-A., and Sentenac, H. (2002) Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane, *Trends Plant Sci.*, **7**, 168-175, doi: 10.1016/S1360-1385(02)02262-8.
 36. Fromm, J., and Spanswick, R. (1993) Characteristics of action potentials in willow (*Salix viminalis* L.), *J. Exp. Bot.*, **44**, 1119-1125, doi: 10.1093/jxb/44.7.1119.
 37. Iosip, A. L., Böhm, J., Scherzer, S., Al-Rasheid, K. A. S., Dreyer, I., Schultz, J., Becker, D., Kreuzer, I., and Hedrich, R. (2020) The Venus flytrap trigger hair-specific potassium channel KDM1 can reestablish the K^+ gradient required for hapto-electric signaling, *PLoS Biol.*, **18**, e3000964, doi: 10.1371/journal.pbio.3000964.
 38. Vodeneev, V. A., Akinchits, E. K., Orlova, L. A., and Sukhov, V. S. (2011) The role of Ca^{2+} , H^+ , and Cl^- ions in generation of variation potential in pumpkin plants, *Russ. J. Plant Physiol.*, **58**, 974-981, doi: 10.1134/S1021443711050256.
 39. Shabala, S., Cuin, T. A., Shabala, L., and Newman, I. (2012) Quantifying kinetics of net ion fluxes from plant tissues by non-invasive microelectrode measuring MIFE technique, in *Plant Salt Tolerance* (Shabala, S., and Cuin, T. A., eds), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 119-134, doi: 10.1007/978-1-61779-986-0_7.
 40. Hilleary, R., Choi, W.-G., Kim, S.-H., Lim, S. D., and Gilroy, S. (2018) Sense and sensibility: the use of fluorescent protein-based genetically encoded biosensors in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **46**, 32-38, doi: 10.1016/j.pbi.2018.07.004.
 41. Lewis, B. D., Karlin-Neumann, C., and Spalding, E. P. (1997) Ca^{2+} -activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in *Arabidopsis* seedlings, *Plant Physiol.*, **114**, 1327-1334, doi: 10.1104/pp.114.4.1327.
 42. Krol, E., Dziubinska, H., and Trebacz, K. (2004) Low-temperature-induced transmembrane potential changes in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus* and *Vicia faba*, *Physiol. Plant*, **120**, 265-270, doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0244.x.
 43. Vodeneev, V. A., Opritov, V. A., and Pyatygin, S. S. (2006) Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*, *Russ. J. Plant Physiol.*, **53**, 481-487, doi: 10.1134/S102144370604008X.

44. Dindas, J., Dreyer, I., Huang, S., Hedrich, R., and Roelfsema, M. R. G. (2021) A voltage-dependent Ca^{2+} homeostat operates in the plant vacuolar membrane, *New Phytol.*, **230**, 1449-1460, doi: 10.1111/nph.17272.
45. Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T. A., and Pottosin, I. (2018) Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions, *New Phytol.*, **220**, 49-69, doi: 10.1111/nph.15266.
46. Dreyer, I., and Uozumi, N. (2011) Potassium channels in plant cells: potassium channels in plants, *FEBS J.*, **278**, 4293-4303, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08371.x.
47. Sharma, T., Dreyer, I., and Riedelsberger, J. (2013) The role of K^+ channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant *Arabidopsis thaliana*, *Front. Plant Sci.*, **4**, 224, doi: 10.3389/fpls.2013.00224.
48. Naz, R., Khan, A., Alghamdi, B. S., Ashraf, G. M., Alghanmi, M., Ahmad, A., Bashir, S. S., and Haq, Q. M. R. (2022) An insight into animal glutamate receptors homolog of *Arabidopsis thaliana* and their potential applications – a review, *Plants*, **11**, 2580, doi: 10.3390/plants11192580.
49. Zheng, Y., Luo, L., Wei, J., Chen, Q., Yang, Y., Hu, X., and Kong, X. (2018) The glutamate receptors AtGLR1.2 and AtGLR1.3 increase cold tolerance by regulating jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **506**, 895-900, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.153.
50. Michard, E., Lima, P. T., Borges, F., Silva, A. C., Portes, M. T., Carvalho, J. E., Gilliam, M., Liu, L.-H., Obermeyer, G., and Feijó, J. A. (2011) Glutamate receptor-like genes form Ca^{2+} channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine, *Science*, **332**, 434-437, doi: 10.1126/science.1201101.
51. Yu, B., Liu, N., Tang, S., Qin, T., and Huang, J. (2022) Roles of glutamate receptor-like channels (GLRs) in plant growth and response to environmental stimuli, *Plants*, **11**, 3450, doi: 10.3390/plants11243450.
52. Tapken, D., Anschütz, U., Liu, L.-H., Huelsken, T., Seeböhm, G., Becker, D., and Hollmann, M. (2013) A plant homolog of animal glutamate receptors is an ion channel gated by multiple hydrophobic amino acids, *Sci. Signal.*, **6**, ra47, doi: 10.1126/scisignal.2003762.
53. Nguyen, C. T., Kurenda, A., Stolz, S., Chételat, A., and Farmer, E. E. (2018) Identification of cell populations necessary for leaf-to-leaf electrical signaling in a wounded plant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 10178-10183, doi: 10.1073/pnas.1807049115.
54. Meyerhoff, O., Müller, K., Roelfsema, M. R. G., Latz, A., Lacombe, B., Hedrich, R., Dietrich, P., and Becker, D. (2005) AtGLR3.4, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold, *Planta*, **222**, 418-427, doi: 10.1007/s00425-005-1551-3.
55. Ghosh, S., Bheri, M., and Pandey, G. K. (2021) Delineating calcium signaling machinery in plants: tapping the potential through functional genomics, *Curr. Genomics*, **22**, 404-439, doi: 10.2174/1389202922666211130143328.
56. Salvador-Recatalà, V. (2016) New roles for the *GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE* 3.3, 3.5, and 3.6 genes as on/off switches of wound-induced systemic electrical signals, *Plant Signal. Behav.*, **11**, e1161879, doi: 10.1080/15592324.2016.1161879.
57. Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., Howe, G. A., and Gilroy, S. (2018) Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling, *Science*, **361**, 1112-1115, doi: 10.1126/science.aat7744.
58. Jha, S. K., Sharma, M., and K. Pandey, G. (2016) Role of cyclic nucleotide gated channels in stress management in plants, *Curr. Genomics*, **17**, 315-329, doi: 10.2174/1389202917666160331202125.
59. Wang, L., Ning, Y., Sun, J., Wilkins, K. A., Matthus, E., McNelly, R. E., Dark, A., Rubio, L., Moeder, W., Yoshioka, K., Véry, A., Stacey, G., Leblanc-Fournier, N., Legué, V., Mouliat, B., and Davies, J. M. (2022) *Arabidopsis thaliana* CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL2 mediates extracellular ATP signal transduction in root epidermis, *New Phytol.*, **234**, 412-421, doi: 10.1111/nph.17987.
60. Gobert, A., Park, G., Amtmann, A., Sanders, D., and Maathuis, F. J. M. (2006) *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport, *J. Exp. Bot.*, **57**, 791-800, doi: 10.1093/jxb/erj064.
61. Wang, Y.-F., Munemasa, S., Nishimura, N., Ren, H.-M., Robert, N., Han, M., Puzorjova, I., Kollist, H., Lee, S., Mori, I., and Schroeder, J. I. (2013) Identification of cyclic GMP-activated nonselective Ca^{2+} -permeable cation channels and associated *CNGC5* and *CNGC6* genes in *Arabidopsis* guard cells, *Plant Physiology*, **163**, 578-590, doi: 10.1104/pp.113.225045.
62. Gao, F., Han, X., Wu, J., Zheng, S., Shang, Z., Sun, D., Zhou, R., and Li, B. (2012) A heat-activated calcium-permeable channel – *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated ion channel 6 – is involved in heat shock responses: *CNGC6* is a heat-activated calcium channel, *Plant J.*, **70**, 1056-1069, doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04969.x.
63. Tunc-Ozdemir, M., Rato, C., Brown, E., Rogers, S., Mooneyham, A., Frietsch, S., Myers, C. T., Poulsen, L. R., Malhó, R., and Harper, J. F. (2013) Cyclic nucleotide gated channels 7 and 8 are essential for male reproductive fertility, *PLoS One*, **8**, e55277, doi: 10.1371/journal.pone.0055277.
64. Christopher, D. A., Borsics, T., Yuen, C. Y., Ullmer, W., Andème-Ondzighi, C., Andres, M. A., Kang, B.-H., and Staehelin, L. A. (2007) The cyclic nucleotide gated cation channel AtCNGC10 traffics

- from the ER via Golgi vesicles to the plasma membrane of *Arabidopsis* root and leaf cells, *BMC Plant Biol.*, **7**, 48, doi: 10.1186/1471-2229-7-48.
65. Yoshioka, K., Moeder, W., Kang, H.-G., Kachroo, P., Masmoudi, K., Berkowitz, G., and Klessig, D. F. (2006) The chimeric *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11/12 activates multiple pathogen resistance responses, *Plant Cell*, **18**, 747-763, doi: 10.1105/tpc.105.038786.
 66. Shih, H.-W., DePew, C. L., Miller, N. D., and Monshausen, G. B. (2015) The cyclic nucleotide-gated channel CNGC14 regulates root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*, *Curr. Biol.*, **25**, 3119-3125, doi: 10.1016/j.cub.2015.10.025.
 67. DeFalco, T. A., Moeder, W., and Yoshioka, K. (2016) Opening the gates: insights into cyclic nucleotide-gated channel-mediated signaling, *Trends Plant Sci.*, **21**, 903-906, doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.011.
 68. Tipper, E., Leitão, N., Dangeville, P., Lawson, D. M., and Charpentier, M. (2023) A novel mutant allele of *AtCNGC15* reveals a dual function of nuclear calcium release in the root meristem, *J. Exp. Bot.*, **74**, 2572-2584, doi: 10.1093/jxb/erad041.
 69. Tunc-Ozdemir, M., Tang, C., Ishka, M. R., Brown, E., Groves, N. R., Myers, C. T., Rato, C., Poulsen, L. R., McDowell, S., Miller, G., Mittler, R., and Harper, J. F. (2013) A cyclic nucleotide-gated channel (CNGC16) in pollen is critical for stress tolerance in pollen reproductive development, *Plant Physiol.*, **161**, 1010-1020, doi: 10.1104/pp.112.206888.
 70. Ladwig, F., Dahlke, R. I., Stührwoldt, N., Hartmann, J., Harter, K., and Sauter, M. (2015) Phytosulfokine regulates growth in *Arabidopsis* through a response module at the plasma membrane that includes CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL17, H⁺-ATPase, and BAK1, *Plant Cell*, **27**, 1718-1729, doi: 10.1105/tpc.15.00306.
 71. Meena, M. K., Prajapati, R., Krishna, D., Divakaran, K., Pandey, Y., Reichelt, M., Mathew, M. K., Boland, W., Mithöfer, A., and Vadassery, J. (2019) The Ca²⁺ channel CNGC19 regulates *Arabidopsis* defense against *spodoptera* herbivory, *Plant Cell*, **31**, 1539-1562, doi: 10.1105/tpc.19.00057.
 72. Wang, X., Ma, X., Wang, H., Li, B., Clark, G., Guo, Y., Roux, S., Sun, D., and Tang, W. (2015) Proteomic study of microsomal proteins reveals a key role for *Arabidopsis* annexin 1 in mediating heat stress-induced increase in intracellular calcium levels, *Mol. Cell. Proteomics*, **14**, 686-694, doi: 10.1074/mcp.M114.042697.
 73. Liu, Q., Ding, Y., Shi, Y., Ma, L., Wang, Y., Song, C., Wilkins, K. A., Davies, J. M., Knight, H., Knight, M. R., Gong, Z., Guo, Y., and Yang, S. (2021) The calcium transporter ANNEXIN1 mediates cold-induced calcium signaling and freezing tolerance in plants, *EMBO J.*, **40**, e104559, doi: 10.15252/embj.2020104559.
 74. Liu, T., Du, L., Li, Q., Kang, J., Guo, Q., and Wang, S. (2021) AtCRY2 negatively regulates the functions of AtANN2 and AtANN3 in drought tolerance by affecting their subcellular localization and transmembrane Ca²⁺ flow, *Front. Plant Sci.*, **12**, 754567, doi: 10.3389/fpls.2021.754567.
 75. Davies, J. (2014) Annexin-mediated calcium signalling in plants, *Plants*, **3**, 128-140, doi: 10.3390/plants3010128.
 76. Huh, S. M., Noh, E. K., Kim, H. G., Jeon, B. W., Bae, K., Hu, H.-C., Kwak, J. M., and Park, O. K. (2010) *Arabidopsis* annexins AnnAt1 and AnnAt4 interact with each other and regulate drought and salt stress responses, *Plant Cell Physiol.*, **51**, 1499-1514, doi: 10.1093/pcp/pcq111.
 77. Laohavisit, A., Shang, Z., Rubio, L., Cuin, T. A., Véry, A.-A., Wang, A., Mortimer, J. C., Macpherson, N., Coxon, K. M., Battey, N. H., Brownlee, C., Park, O. K., Sentenac, H., Shabala, S., Webb, A. A. R., and Davies, J. M. (2012) *Arabidopsis* Annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable conductance in root cells, *Plant Cell*, **24**, 1522-1533, doi: 10.1105/tpc.112.097881.
 78. Lichocka, M., Rymaszewski, W., Morgiewicz, K., Barymow-Filoniuk, I., Chlebowski, A., Sobczak, M., Samuel, M. A., Schmelzer, E., Krzymowska, M., and Hennig, J. (2018) Nucleus- and plastid-targeted annexin 5 promotes reproductive development in *Arabidopsis* and is essential for pollen and embryo formation, *BMC Plant Biol.*, **18**, 183, doi: 10.1186/s12870-018-1405-3.
 79. Zhu, J., Wu, X., Yuan, S., Qian, D., Nan, Q., An, L., and Xiang, Y. (2014) Annexin5 plays a vital role in *Arabidopsis* pollen development via Ca²⁺-dependent membrane trafficking, *PLoS One*, **9**, e102407, doi: 10.1371/journal.pone.0102407.
 80. Yadav, D., Ahmed, I., Shukla, P., Boyidi, P., and Kirti, P. (2016) Overexpression of *Arabidopsis AnnAt8* alleviates abiotic stress in transgenic *Arabidopsis* and tobacco, *Plants*, **5**, 18, doi: 10.3390/plants5020018.
 81. Evans, M. J., Choi, W.-G., Gilroy, S., and Morris, R. J. (2016) A ROS-assisted calcium wave dependent on the AtRBOHD NADPH oxidase and TPC1 cation channel propagates the systemic response to salt stress, *Plant Physiol.*, **171**, 1771-1784, doi: 10.1104/pp.16.00215.
 82. Yamanaka, T., Nakagawa, Y., Mori, K., Nakano, M., Imamura, T., Kataoka, H., Terashima, A., Iida, K., Kojima, I., Katagiri, T., Shinozaki, K., and Iida, H. (2010) MCA1 and MCA2 that mediate Ca²⁺ uptake have distinct and overlapping roles in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, **152**, 1284-1296, doi: 10.1104/pp.109.147371.
 83. Hattori, T., Otomi, Y., Nakajima, Y., Soga, K., Wakabayashi, K., Iida, H., and Hoson, T. (2020) MCA1 and MCA2 are involved in the response

- to hypergravity in *Arabidopsis* hypocotyls, *Plants*, **9**, 590, doi: 10.3390/plants9050590.
84. Yuan, F., Yang, H., Xue, Y., Kong, D., Ye, R., Li, C., Zhang, J., Theprungsirikul, L., Shrift, T., Krichilsky, B., Johnson, D. M., Swift, G. B., He, Y., Siedow, J. N., and Pei, Z.-M. (2014) OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*, *Nature*, **514**, 367–371, doi: 10.1038/nature13593.
 85. Thor, K., Jiang, S., Michard, E., George, J., Scherzer, S., Huang, S., Dindas, J., Derbyshire, P., Leitão, N., DeFalco, T. A., Köster, P., Hunter, K., Kimura, S., Gronnier, J., Stransfeld, L., Kadota, Y., Bücherl, C. A., Charpentier, M., Wrzaczek, M., MacLean, D., Oldroyd, G. E. D., Menke, F. L. H., Roelfsema, M. R. G., Hedrich, R., Fejój, J., and Zipfel, C. (2020) The calcium-permeable channel OSCA1.3 regulates plant stomatal immunity, *Nature*, **585**, 569–573, doi: 10.1038/s41586-020-2702-1.
 86. Fang, X., Liu, B., Shao, Q., Huang, X., Li, J., Luan, S., and He, K. (2021) AtPiezo plays an important role in root cap mechanotransduction, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 467, doi: 10.3390/ijms22010467.
 87. Radin, I., Richardson, R. A., Coomey, J. H., Weiner, E. R., Bascom, C. S., Li, T., Bezanilla, M., and Haswell, E. S. (2021) Plant PIEZO homologs modulate vacuole morphology during tip growth, *Science*, **373**, 586–590, doi: 10.1126/science.abe6310.
 88. Tran, D., Galletti, R., Neumann, E. D., Dubois, A., Sharif-Naeini, R., Geitmann, A., Frachisse, J.-M., Hamant, O., and Ingram, G. C. (2017) A mechanosensitive Ca^{2+} channel activity is dependent on the developmental regulator DEK1, *Nat. Commun.*, **8**, 1009, doi: 10.1038/s41467-017-00878-w.
 89. Lee, C. P., Maksaev, G., Jensen, G. S., Murcha, M. W., Wilson, M. E., Fricker, M., Hell, R., Haswell, E. S., Millar, A. H., and Sweetlove, L. J. (2016) MSL1 is a mechanosensitive ion channel that dissipates mitochondrial membrane potential and maintains redox homeostasis in mitochondria during abiotic stress, *Plant J.*, **88**, 809–825, doi: 10.1111/tpj.13301.
 90. Hamilton, E. S., Schlegel, A. M., and Haswell, E. S. (2015) United in diversity: mechanosensitive ion channels in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 113–137, doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114700.
 91. Hamilton, E. S., Jensen, G. S., Maksaev, G., Katims, A., Sherp, A. M., and Haswell, E. S. (2015) Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination, *Science*, **350**, 438–441, doi: 10.1126/science.aac6014.
 92. Haswell, E. S., Peyronnet, R., Barbier-Brygoo, H., Meyerowitz, E. M., and Frachisse, J.-M. (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root, *Curr. Biol.*, **18**, 730–734, doi: 10.1016/j.cub.2008.04.039.
 93. Moe-Lange, J., Gappel, N. M., Machado, M., Wudick, M. M., Sies, C. S. A., Schott-Verdugo, S. N., Bonus, M., Mishra, S., Hartwig, T., Bezruczyk, M., Basu, D., Farmer, E. E., Gohlke, H., Malkovskiy, A., Haswell, E. S., Lercher, M. J., Ehrhardt, D. W., Frommer, W. B., and Kleist, T. J. (2021) Interdependence of a mechanosensitive anion channel and glutamate receptors in distal wound signaling, *Sci. Adv.*, **7**, eabg4298, doi: 10.1126/sciadv.abg4298.
 94. Tran, D., Girault, T., Guichard, M., Thomine, S., Leblanc-Fournier, N., Moullia, B., De Langre, E., Allain, J.-M., and Frachisse, J.-M. (2021) Cellular transduction of mechanical oscillations in plants by the plasma-membrane mechanosensitive channel MSL10, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e1919402118, doi: 10.1073/pnas.1919402118.
 95. Guerringue, Y., Thomine, S., and Frachisse, J.-M. (2018) Sensing and transducing forces in plants with MSL10 and DEK1 mechanosensors, *FEBS Lett.*, **592**, 1968–1979, doi: 10.1002/1873-3468.13102.
 96. Basu, D., and Haswell, E. S. (2020) The mechanosensitive ion channel MSL10 potentiates responses to cell swelling in *Arabidopsis* seedlings, *Curr. Biol.*, **30**, 2716–2728.e6, doi: 10.1016/j.cub.2020.05.015.
 97. Hedrich, R., and Geiger, D. (2017) Biology of SLAC1-type anion channels – from nutrient uptake to stomatal closure, *New Phytol.*, **216**, 46–61, doi: 10.1111/nph.14685.
 98. Barbier-Brygoo, H., De Angeli, A., Filleur, S., Frachisse, J.-M., Gambale, F., Thomine, S., and Wege, S. (2011) Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**, 25–51, doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103741.
 99. Lehmann, J., Jørgensen, M. E., Fratz, S., Müller, H. M., Kusch, J., Scherzer, S., Navarro-Retamal, C., Mayer, D., Böhm, J., Konrad, K. R., Terpitz, U., Dreyer, I., Mueller, T. D., Sauer, M., Hedrich, R., Geiger, D., and Maierhofer, T. (2021) Acidosis-induced activation of anion channel SLAH3 in the flooding-related stress response of *Arabidopsis*, *Curr. Biol.*, **31**, 3575–3585.e9, doi: 10.1016/j.cub.2021.06.018.
 100. Ye, W., Koya, S., Hayashi, Y., Jiang, H., Oishi, T., Kato, K., Fukatsu, K., and Kinoshita, T. (2021) Identification of genes preferentially expressed in stomatal guard cells of *Arabidopsis thaliana* and involvement of the aluminum-activated malate transporter 6 vacuolar malate channel in stomatal opening, *Front. Plant Sci.*, **12**, 744991, doi: 10.3389/fpls.2021.744991.
 101. Meyer, S., Scholz-Starke, J., De Angeli, A., Kovermann, P., Burla, B., Gambale, F., and Martinoia, E. (2011) Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation: AtALMT6 mediates malate transport in guard cells, *Plant J.*, **67**, 247–257, doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04587.x.

102. Boccaccio, A., Picco, C., Di Zanni, E., and Scholz-Starke, J. (2022) Phospholipid scrambling by a TMEM16 homolog of *Arabidopsis thaliana*, *FEBS J.*, **289**, 2578-2592, doi: 10.1111/febs.16279.
103. Zhang, H., Zhao, F.-G., Tang, R.-J., Yu, Y., Song, J., Wang, Y., Li, L., and Luan, S. (2017) Two tonoplast MATE proteins function as turgor-regulating chloride channels in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E2036-E2045, doi: 10.1073/pnas.1616203114.
104. Herdean, A., Teardo, E., Nilsson, A. K., Pfeil, B. E., Johansson, O. N., Ünneper, R., Nagy, G., Zsiros, O., Dana, S., Solymosi, K., Garab, G., Szabó, I., Spetea, C., and Lundin, B. (2016) A voltage-dependent chloride channel fine-tunes photosynthesis in plants, *Nat. Commun.*, **7**, 11654, doi: 10.1038/ncomms11654.
105. Cuin, T., Dreyer, I., and Michard, E. (2018) The role of potassium channels in *Arabidopsis thaliana* long distance electrical signalling: AKT2 modulates tissue excitability while GORK shapes action potentials, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 926, doi: 10.3390/ijms19040926.
106. Demidchik, V., Cuin, T. A., Svistunenko, D., Smith, S. J., Miller, A. J., Shabala, S., Sokolik, A., and Yurin, V. (2010) *Arabidopsis* root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death, *J. Cell Sci.*, **123**, 1468-1479, doi: 10.1242/jcs.064352.
107. Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J.-B., and Sentenac, H. (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap, *Cell*, **94**, 647-655, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81606-2.
108. Lebaudy, A., Pascaud, F., Véry, A.-A., Alcon, C., Dreyer, I., Thibaud, J.-B., and Lacombe, B. (2010) Preferential KAT1-KAT2 heteromerization determines inward K⁺ current properties in *Arabidopsis* guard cells, *J. Biol. Chem.*, **285**, 6265-6274, doi: 10.1074/jbc.M109.068445.
109. Jeanguenin, L., Alcon, C., Duby, G., Boeglin, M., Chérel, I., Gaillard, I., Zimmermann, S., Sentenac, H., and Véry, A.-A. (2011) AtKC1 is a general modulator of *Arabidopsis* inward Shaker channel activity: Modulatory subunit of inward K⁺ channel activity, *Plant J.*, **67**, 570-582, doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04617.x.
110. Kwak, J. M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V. M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S. D., Tallman, G., and Schroeder, J. I. (2001) Dominant negative guard cell K⁺ channel mutants reduce inward-rectifying K⁺ currents and light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, **127**, 473-485, doi: 10.1104/pp.010428.
111. Michard, E., Dreyer, I., Lacombe, B., Sentenac, H., and Thibaud, J.-B. (2005) Inward rectification of the AKT2 channel abolished by voltage-dependent phosphorylation: regulation of AKT2 by phosphorylation, *Plant J.*, **44**, 783-797, doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02566.x.
112. Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K., and Maathuis, F. J. M. (2007) The two-pore channel *TPK1* gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10726-10731, doi: 10.1073/pnas.0702595104.
113. Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K., and Hedrich, R. (2004) AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15621-15626, doi: 10.1073/pnas.0401502101.
114. Rocchetti, A., Sharma, T., Wulfetange, C., Scholz-Starke, J., Grippa, A., Carpaneto, A., Dreyer, I., Vitale, A., Czempinski, K., and Pedrazzini, E. (2012) The putative K⁺ channel subunit AtKCO3 forms stable dimers in *Arabidopsis*, *Front. Plant Sci.*, **3**, 251, doi: 10.3389/fpls.2012.00251.
115. Li, D.-D., Guan, H., Li, F., Liu, C.-Z., Dong, Y.-X., Zhang, X.-S., and Gao, X.-Q. (2017) *Arabidopsis* shaker pollen inward K⁺ channel SPIK functions in SnRK1 complex-regulated pollen hydration on the stigma: SPIK functions in pollen hydration on stigma, *J. Integr. Plant Biol.*, **59**, 604-611, doi: 10.1111/jipb.12563.
116. Jammes, F., Hu, H.-C., Villiers, F., Bouten, R., and Kwak, J. M. (2011) Calcium-permeable channels in plant cells: plant calcium channels, *FEBS J.*, **278**, 4262-4276, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08369.x.
117. Basu, D., and Haswell, E. S. (2017) Plant mechanosensitive ion channels: an ocean of possibilities, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **40**, 43-48, doi: 10.1016/j.pbi.2017.07.002.
118. Mori, K., Renhu, N., Naito, M., Nakamura, A., Shiba, H., Yamamoto, T., Suzuki, T., Iida, H., and Miura, K. (2018) Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 mediate cold-induced cytosolic Ca²⁺ increase and cold tolerance in *Arabidopsis*, *Sci. Rep.*, **8**, 550, doi: 10.1038/s41598-017-17483-y.
119. Zhang, Z., Tong, X., Liu, S.-Y., Chai, L.-X., Zhu, F.-F., Zhang, X.-P., Zou, J.-Z., and Wang, X.-B. (2019) Genetic analysis of a Piezo-like protein suppressing systemic movement of plant viruses in *Arabidopsis thaliana*, *Sci. Rep.*, **9**, 3187, doi: 10.1038/s41598-019-39436-3.
120. Véry, A.-A., and Sentenac, H. (2003) Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**, 575-603, doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134831.

121. Vincent, T. R., Avramova, M., Canham, J., Higgins, P., Bilkey, N., Mugford, S. T., Pitino, M., Toyota, M., Gilroy, S., Miller, A. J., Hogenhout, S. A., and Sanders, D. (2017) Interplay of plasma membrane and vacuolar ion channels, together with BAK1, elicits rapid cytosolic calcium elevations in *Arabidopsis* during aphid feeding, *Plant Cell*, **29**, 1460–1479, doi: 10.1105/tpc.17.00136.
122. Fichman, Y., and Mittler, R. (2021) Integration of electric, calcium, reactive oxygen species and hydraulic signals during rapid systemic signaling in plants, *Plant J.*, **107**, 7–20, doi: 10.1111/tpj.15360.
123. Yu, B., Wu, Q., Li, X., Zeng, R., Min, Q., and Huang, J. (2022) Glutamate receptor-like gene *OsGLR3.4* is required for plant growth and systemic wound signaling in rice (*Oryza sativa*), *New Phytol.*, **233**, 1238–1256, doi: 10.1111/nph.17859.
124. Kong, D., Hu, H.-C., Okuma, E., Lee, Y., Lee, H. S., Munemasa, S., Cho, D., Ju, C., Pedoeim, L., Rodriguez, B., Wang, J., Im, W., Murata, Y., Pei, Z.-M., and Kwak, J. M. (2016) L-Met activates *Arabidopsis* GLR Ca^{2+} channels upstream of ROS production and regulates stomatal movement, *Cell Rep.*, **17**, 2553–2561, doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.015.
125. Velez, K. M., Maksaev, G., Frick, E. M., January, E., Kloepper, S. C., and Haswell, E. S. (2014) *Arabidopsis* MSL10 has a regulated cell death signaling activity that is separable from its mechanosensitive ion channel activity, *Plant Cell*, **26**, 3115–3131, doi: 10.1105/tpc.114.128082.
126. Xue, N., Zhan, C., Song, J., Li, Y., Zhang, J., Qi, J., and Wu, J. (2022) The glutamate receptor-like 3.3 and 3.6 mediate systemic resistance to insect herbivores in *Arabidopsis*, *J. Exp. Bot.*, **73**, 7611–7627, doi: 10.1093/jxb/erac399.
127. Bellandi, A., Papp, D., Breakspear, A., Joyce, J., Johnston, M. G., de Keijzer, J., Raven, E. C., Ohtsu, M., Vincent, T. R., Miller, A. J., Sanders, D., Hogenhout, S. A., Morris, R. J., and Faulkner, C. (2022) Diffusion and bulk flow of amino acids mediate calcium waves in plants, *Sci. Adv.*, **8**, eabo6693, doi: 10.1126/sciadv.abo6693.
128. Hu, C., Duan, S., Zhou, J., and Yu, J. (2021) Characteristics of herbivory/wound-elicited electrical signal transduction in tomato, *Front. Agr. Sci. Eng.*, **8**, 292–301, doi: 10.15302/J-FASE-2021395.
129. Scherzer, S., Böhm, J., Huang, S., Iosip, A. L., Kreuzer, I., Becker, D., Heckmann, M., Al-Rasheid, K. A. S., Dreyer, I., and Hedrich, R. (2022) A unique inventory of ion transporters poises the Venus flytrap to fast-propagating action potentials and calcium waves, *Curr. Biol.*, **32**, 4255–4263.e5, doi: 10.1016/j.cub.2022.08.051.
130. Hedrich, R., and Kreuzer, I. (2023) Demystifying the Venus flytrap action potential, *New Phytol.*, **239**, 2108–2112, doi: 10.1111/nph.19113.
131. Zeng, H., Zhao, B., Wu, H., Zhu, Y., and Chen, H. (2020) Comprehensive *in silico* characterization and expression profiling of nine gene families associated with calcium transport in soybean, *Agronomy*, **10**, 1539, doi: 10.3390/agronomy10101539.
132. Maksaev, G., and Haswell, E. S. (2012) MscS-Like10 is a stretch-activated ion channel from *Arabidopsis thaliana* with a preference for anions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 19015–19020, doi: 10.1073/pnas.1213931109.
133. Choi, W.-G., Toyota, M., Kim, S.-H., Hilleary, R., and Gilroy, S. (2014) Salt stress-induced Ca^{2+} waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 6497–6502, doi: 10.1073/pnas.1319955111.
134. Kiep, V., Vadassery, J., Lattke, J., Maaß, J., Boland, W., Peiter, E., and Mithöfer, A. (2015) Systemic cytosolic Ca^{2+} elevation is activated upon wounding and herbivory in *Arabidopsis*, *New Phytol.*, **207**, 996–1004, doi: 10.1111/nph.13493.
135. Cui, Y., Lu, S., Li, Z., Cheng, J., Hu, P., Zhu, T., Wang, X., Jin, M., Wang, X., Li, L., Huang, S., Zou, B., and Hua, J. (2020) CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNELS 14 and 16 promote tolerance to heat and chilling in rice, *Plant Physiol.*, **183**, 1794–1808, doi: 10.1104/pp.20.00591.
136. Finka, A., Cuendet, A. F. H., Maathuis, F. J. M., Saidi, Y., and Goloubinoff, P. (2012) Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance, *Plant Cell*, **24**, 3333–3348, doi: 10.1105/tpc.112.095844.

ION CHANNELS IN ELECTRICAL SIGNALING IN HIGHER PLANTS

Review

M. A. Mudrilov, M. M. Ladeynova, D. V. Kuznetsova, and V. A. Vodeneev*

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod — National Research University, Department of Biophysics, 603022 Nizhny Novgorod, Russia; e-mail: v.vodeneev@mail.ru

Electrical signals (ESs) of plants occurring under the action of various external factors play an important role in adaptation to changing environmental conditions. The generation of ESs in higher plant cells is associated

with the activation of Ca^{2+} , K^{+} , and anion fluxes, as well as changes in the activity of plasma membrane H^{+} -ATPase. In the present review, the molecular nature of ion channels contributing to ESs transmission in higher plants is analyzed based on the comparison of data from molecular-genetic and electrophysiological studies. Based on such characteristics of ion channels as selectivity, activation mechanism, and intracellular and tissue localization, those ion channels that meet the requirements for potential participants of ESs generation were selected from a wide variety of ion channels in higher plants. Analysis of the data of experimental studies performed on mutants with suppressed or enhanced expression of a certain channel gene revealed those channels whose activation contributes to ESs formation. The channels responsible for Ca^{2+} flux during ESs generation include channels of GLR family, for K^{+} flux – GORK, for anions – MSL. Consideration of the prospects for further studies suggests the need to combine electrophysiological and genetic approaches along with the analysis of ion concentrations in intact plants within a single study.

Keywords: electrical signals in plants, long-distance signals, ion channels, action potential, variation potential

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ H^+ -АТРАЗЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КАК СВЯЗУЮЩЕЕ ЗВЕНО МЕЖДУ ФОРМИРОВАНИЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ И РАЗВИТИЕМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ОТВЕТОВ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Обзор

© 2023 Е.М. Сухова, Л.М. Юдина, В.С. Сухов*

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
603022 Нижний Новгород, Россия; электронная почта: vssuh@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2023

После доработки 05.09.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Действие многочисленных неблагоприятных факторов окружающей среды на высшие растения является пространственно-неоднородным; это означает, что для развития системного адаптационного ответа необходима генерация и распространение стрессовых сигналов. Вызванные локальным действием стрессоров электрические сигналы (ЭС), которые представлены потенциалом действия, переменным потенциалом и системным потенциалом, играют важную роль в развитии быстрых физиологических изменений на уровне целого растения, включая фотосинтетические ответы. Развитие всех отмеченных электрических сигналов сопровождается изменениями активности H^+ -АТРАЗЫ, которая является основной системой электрогенного транспорта протонов на плазматической мембране. На основании литературных данных, представляется вероятным, что изменения активности H^+ -АТРАЗЫ и связанные с ними изменения вне- и внутриклеточного pH играют ключевую роль в формировании вызванной ЭС инактивации фотосинтетических процессов в интактных частях растений. Такая инактивация обусловлена как нарушением притока CO_2 в клетки мезофилла листа, вызванным защелачиванием апопласта и, возможно, закислением цитоплазмы, так и непосредственным влиянием закисления стромы и люмена хлоропластов на процессы световой и, возможно, темновой стадии фотосинтеза. Конечным результатом вызванной ЭС фотосинтетической инактивации является повышение устойчивости фотосинтетического аппарата к действию неблагоприятных факторов и вероятности выживания растения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: высшие растения, электрические сигналы, потенциал действия, переменный потенциал, системный потенциал, H^+ -АТРАза, внутриклеточный pH, внеклеточный pH, фотосинтез.

DOI: 10.31857/S0320972523100068, EDN: OSZEJ

ВВЕДЕНИЕ

Растения существуют в нестабильной окружающей среде и могут быть подвержены действию неблагоприятных факторов, многие из которых действуют пространственно-неоднородно (например, избыточное освещение, высокие и низкие температуры, недостаток воды, биотическое поражение и многие другие).

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ВП — переменный потенциал; ПД — потенциал действия; СП — системный потенциал; ЭС — электрические сигналы.

* Адресат для корреспонденции.

Вследствие этого у растений должны существовать системы «дальних» стрессовых сигналов, которые возникают в зоне локального действия стрессора и распространяются в интактные части растительного организма, вызывая адаптивные физиологические изменения. Электрические сигналы (ЭС) являются важной группой стрессовых сигналов, оказывающих влияние на широкий спектр физиологических процессов и приводящих к возмущению устойчивости растения к действию неблагоприятных факторов [1–7].

ЭС представляют собой обратимые и способные к распространению по растению изменения разности электрических потенциалов

на плазматической мембране, основным методом измерения которых является применение неполяризующихся электродов [1, 2]. При этом в случае внеклеточного отведения измерительные электроды контактируют с различными участками поверхности растения, что позволяет более эффективно исследовать распространение сигналов; в случае внутриклеточного отведения – измерительный электрод вводится внутрь растительной клетки, что позволяет более детально изучать параметры ЭС и их ионные механизмы.

Известно, что ЭС могут вызывать у высших растений стимуляцию экспрессии защитных генов (в частности, *pin1*, *pin2* и *vsp2*, участвующих в защите от насекомых [8, 9]), усиление продукции стрессовых фитогормонов (например, абсцизовой и жасмоновой кислот [10–12]), активацию дыхания [13–15], возрастание содержания АТФ в листьях [16], остановку потока ассимилятов во флоэме [17–19], изменения транспирации [20, 21], замедление ростовых процессов [22] и многие другие ответы. Роль ЭС в развитии подобных физиологических ответов подтверждается связью их параметров с характеристиками электрических сигналов [2, 6]. Такая роль дополнительно показана путем выявления индукции физиологических ответов при имитации генерации ЭС (обработка ингибиторами протонного транспорта или протонофорами) и подавления развития ответов при блокировании распространения сигнала локальным действием низких температур или азидом натрия на стебель [2, 6, 13, 23]. В частности, показано, что экспрессия защитных генов наблюдается только в тех листьях арабидопсиса, в которые проходят ЭС с большой длительностью или которые подвержены прямому действию электрического тока [9].

В качестве отдельной «мишени» для действия ЭС можно отметить фотосинтетические процессы, так как известно, что электрические сигналы могут вызывать как быструю (5–10 мин), так и длительную (десятки минут и, возможно, часы) инактивацию фотосинтеза [6, 7, 23]. Такая инаktivация проявляется в снижении фотосинтетической ассимиляции CO_2 [10, 11, 16, 20, 24], квантовых выходов фотосистем I и II [25–27] и нециклического потока электронов [28] и в возрастании нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла [14, 27–29] (в частности, энергозависимой компоненты [30]), а также циклического потока электронов вокруг фотосистемы I [28].

Предполагаемым результатом вызванных ЭС физиологических изменений является воз-

растание устойчивости растительного организма к действию неблагоприятных факторов среды [6, 7, 23, 31]. В частности, показано, что распространение ЭС уменьшает повреждение клеточных мембран и фотосинтетического аппарата при избыточном освещении [32, 33], снижает негативное влияние тепла [33–39] и холода [34] на фотосинтетические процессы, а также повышает устойчивость на уровне целого растения к низким [40] и высоким [36] температурам.

Таким образом, ЭС играют важную роль в системной адаптации высших растений к нестабильным условиям окружающей среды [6, 7, 31]. Значительный вклад в такую адаптацию вносят фотосинтетические ответы, развитие которых важно для формирования вызванного ЭС повышения устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов [23]. Вследствие этого основной целью нашего обзора стал анализ путей формирования таких ответов при различных типах электрических сигналов, опирающийся на их ионные механизмы.

ТИПЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ РАСТЕНИЙ И РОЛЬ H^+ -АТРа́зы ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ В ИХ ФОРМИРОВАНИИ

Потенциал действия (ПД), вариабельный потенциал (ВП) и системный потенциал (СП) являются основными типами ЭС у высших растений [5–7].

ПД представляет собой относительно короткую импульсную реакцию (десятки секунд), возникающую при локальном действии неповреждающих стрессоров (например, охлаждение на несколько градусов) и включающую в себя две фазы (деполяризация и реполяризация) [1, 6, 7] (рис. 1). У высших растений такой сигнал характеризуется наличием порога генерации, подчинением закону «все или ничего», длительным периодом рефрактерности (в течение часов) и способностью к активному распространению по ситовидным элементам и/или по симпласту паренхимных клеток проводящих пучков растений за счет идущих по плазмодесмам местных электрических токов.

Следует отметить, что механизмы генерации ПД являются сходными у высших растений и харовых водорослей, вследствие чего ионные механизмы ПД и связь его генерации с изменениями активности протонного транспорта были впервые показаны у харовых водорослей [41–44] и подтверждены в дальнейшем

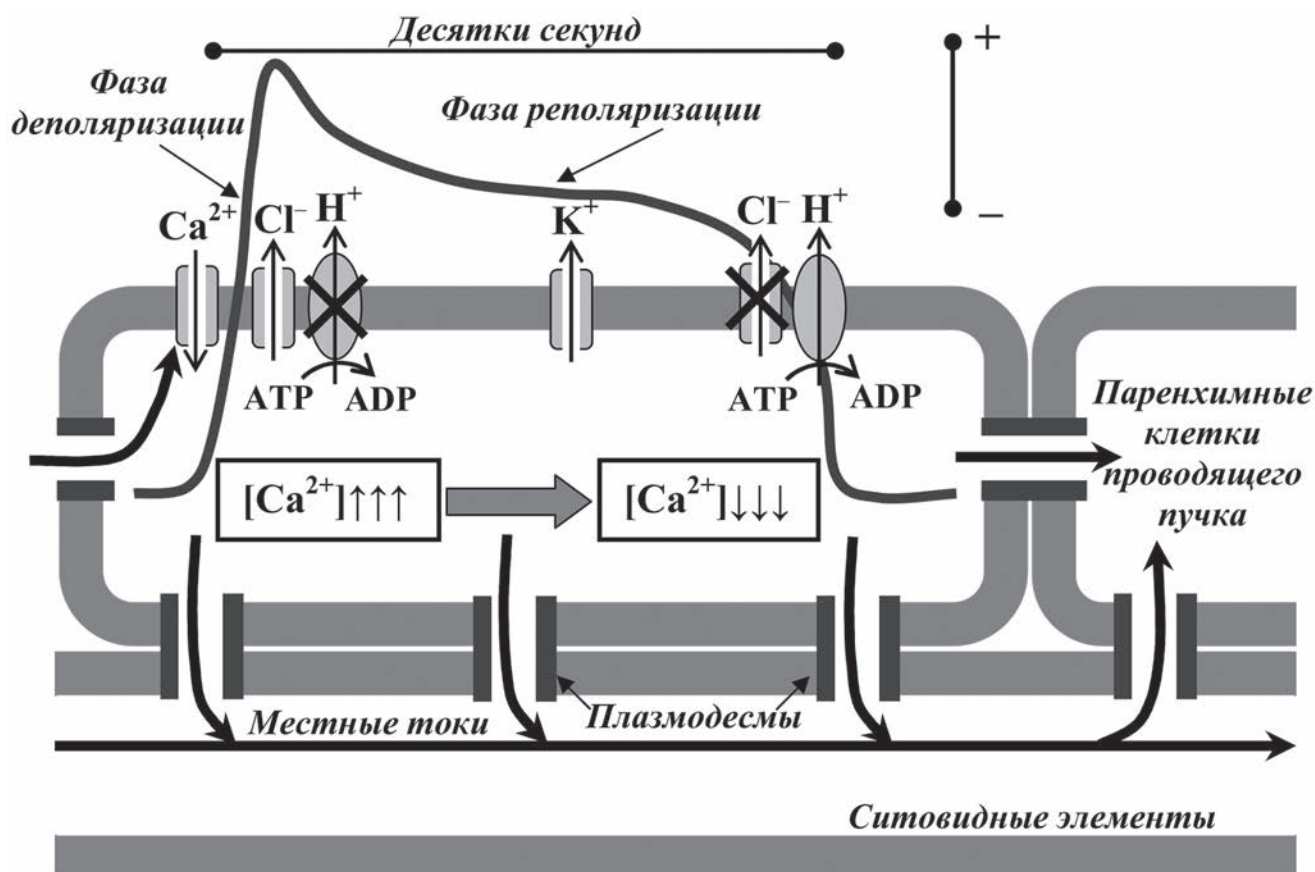


Рис. 1. Потенциал действия у высших растений и схема механизмов его генерации и распространения по проводящим пучкам растений

у высших растений. Фактором, инициирующим генерацию ПД, является деполяризация мембранного потенциала до порогового уровня, приводящая к активации потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны и к входу ионов кальция в клетку [1, 45–47]. Значительное повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме [47] приводит к активации анионных каналов и выходу Cl^- из клетки [45], а также к временной инактивации H^+ -АТФазы плазматической мембраны [46]; результатом обоих процессов является формирование фазы деполяризации ПД. Деполяризация приводит к активации outwardly-rectifying K^+ -каналов, обеспечивающих выход ионов калия из цитоплазмы во внеклеточную среду [47]. Значительная деполяризация приводит также к закрытию Ca^{2+} -каналов, уменьшению концентрации ионов кальция в цитоплазме и, как следствие, к снижению активности анионных каналов и реактивации H^+ -АТФазы [47]. Такие процессы приводят к формированию фазы реполяризации и возвращению мембранного потенциала к исходным значениям.

ВП возникает при действии повреждающих раздражителей (включая ожог, экстре-

мальный нагрев, механическое повреждение) и имеет большую длительность (до десятков минут и более) и сложную форму [6, 23, 48], включающую две компоненты: длительную волну деполяризации и «ПД-образные» спайки, присутствие которых не является обязательным (рис. 2). «ПД-образные» спайки представляют собой типичные потенциалы действия, вызванные положительным сдвигом мембранного потенциала в ходе формирования длительной волны деполяризации, которые имеют такие же ионные механизмы, как и ПД [48]; в то же время именно длительная волна является основным компонентом ВП. Важной особенностью ВП (прежде всего, длительной волны деполяризации) является снижение скорости его распространения [49, 50] и/или амплитуды [16, 29, 50] с увеличением расстояния от зоны повреждения.

ВП является местной электрической реакцией на распространение сигнала неэлектрической природы [48], который может быть гидравлическим или химическим. Гидравлическая гипотеза [22, 48, 51, 52] предполагает, что при локальных повреждениях в зоне действия стрессора формируется область повышенного

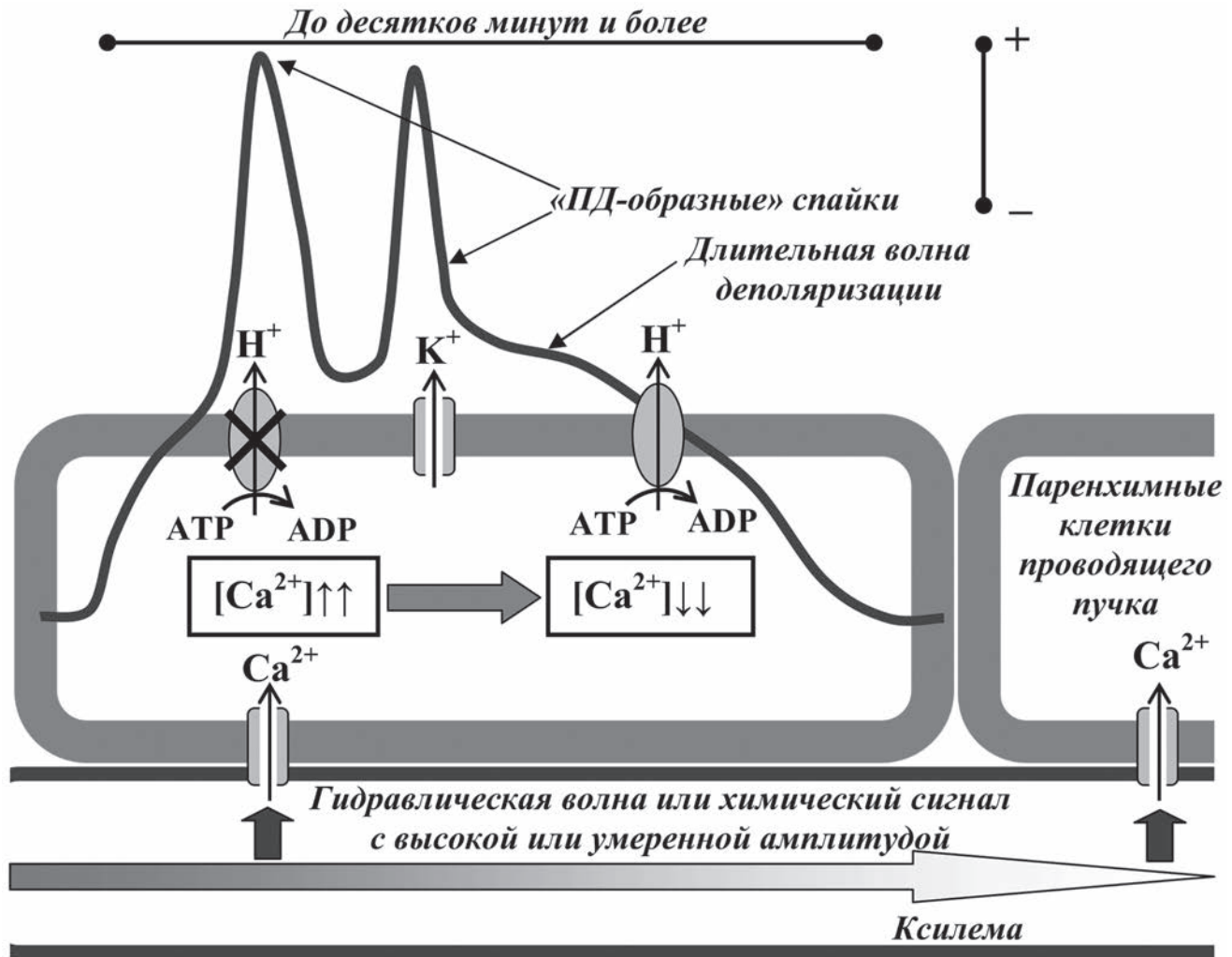


Рис. 2. Вариабельный потенциал у высших растений и схема потенциальных механизмов его генерации и распространения по проводящим пучкам растений. На рисунке приведена схема формирования длительной волны деполяризации, связанной с сильным или умеренным повышением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Механизмы «ПД-образных» спайков аналогичны механизмам ПД (см. рис. 1) и не показаны на рисунке

давления, индуцирующая распространение по растению затухающей гидравлической волны, которая вызывает активацию механо-чувствительных Ca^{2+} -каналов и последующее развитие ВП [44]. Экспериментальные [51] и теоретические [53] работы показывают, что уменьшение амплитуды гидравлической волны приводит к возрастанию лаг-фазы перед началом изменений электрического потенциала и тем самым вызывает замедление кажущейся скорости распространения ВП с увеличением расстояния от зоны действия стрессора. При низкой амплитуде гидравлической волны ВП не возникает.

Альтернативная гипотеза предполагает, что в зоне повреждения происходит выделение специального химического соединения («раневое вещество»), распространение которого вызывает активацию лиганд-зависимых

Ca^{2+} -каналов и развитие ВП [48]; при низкой величине такого сигнала индукция вариабельного потенциала отсутствует. В качестве потенциального раневого вещества часто рассматривается H_2O_2 [54–56]; однако нельзя исключать участие других соединений (например, система [57] или глутамата [58]). Ключевой проблемой химической гипотезы является низкая скорость распространения раневого вещества посредством молекулярной диффузии [48]. Существует несколько подходов, позволяющих преодолеть такое ограничение. Во-первых, в соответствии с гипотезой Malone [59], которая была теоретически проверена на серии математических моделей [60, 61], локальное повышение давления в зоне повреждения может приводить к возникновению дополнительных водных потоков по ксилеме, которые переносят раневое вещество в неповрежденные части

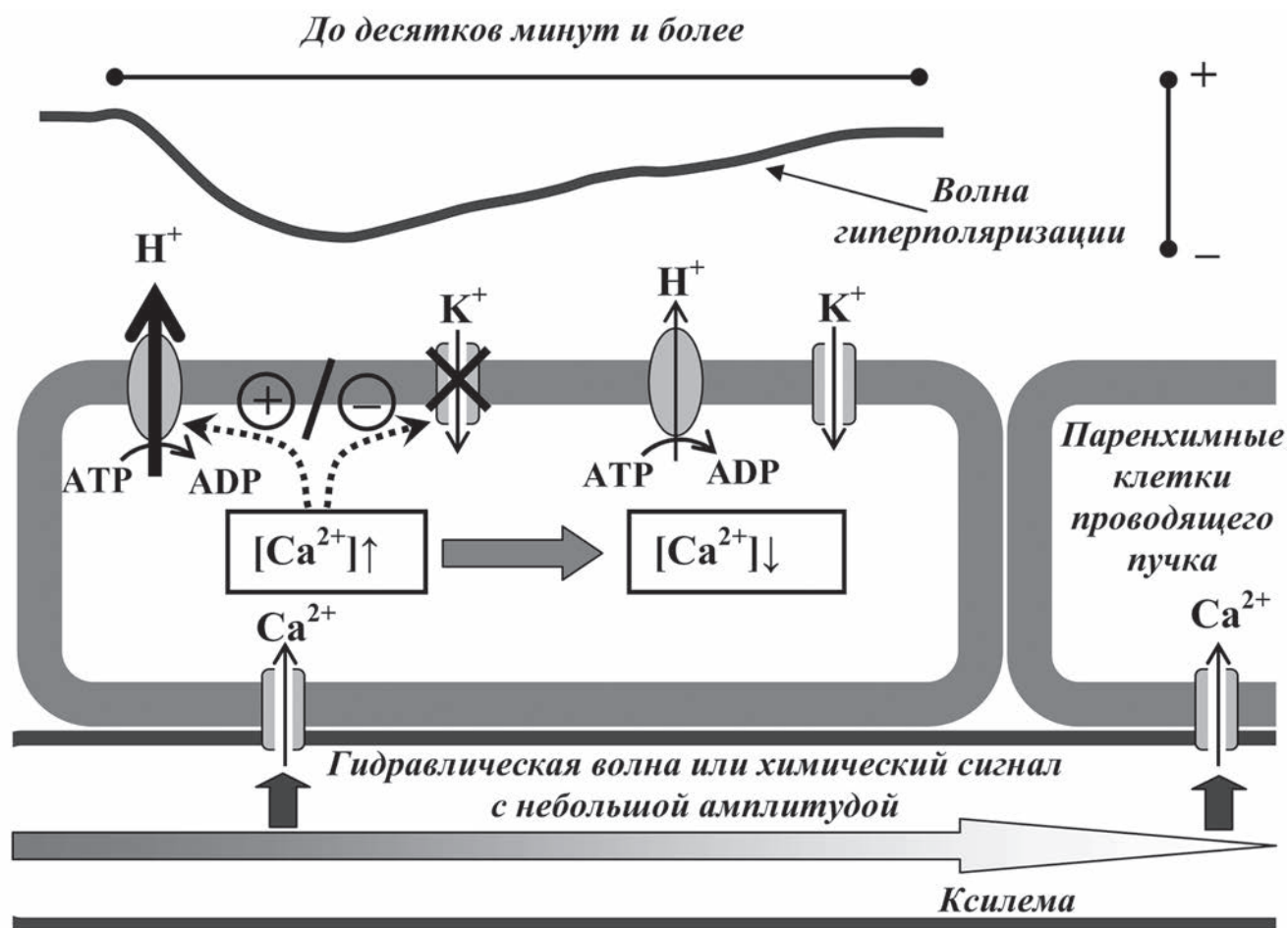


Рис. 3. Системный потенциал у высших растений и схема возможных механизмов его генерации и распространения по проводящим пучкам растений. Пунктирными линиями показано возможное влияние небольшого повышения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме на H^+ -АТФазу (активация) и на inwardly-rectifying K^+ -каналы плазматической мембраны (инактивация)

растения. Во-вторых, нами ранее была показана возможность ускоренного распространения химического агента по растению, которое, вероятно, связано с усилением конвективной (турбулентной) диффузии в потоке жидкости по ксилеме [49, 62]. Следует отметить, что несмотря на относительно низкие скорости движения жидкости по сосудам ксилемы, турбулентные потоки могут потенциально возникать в результате периодических сужений их диаметра [62]. В-третьих, согласно гипотезе Mittler et al. [54], развитой в ряде последующих работ [55, 56, 63], при распространении химического сигнала может происходить вторичная генерация H_2O_2 (базирующаяся на активации Ca^{2+} -каналов и возрастании концентрации Ca^{2+} , что приводит к активации NADPH оксидаз RbohD в плазматической мембране, которые продуцируют активные формы кислорода (АФК)); такая вторичная генерация может ускорять распространение химического сигнала по растению. В пользу данной гипотезы

свидетельствуют как экспериментальные данные [63], показывающие распространение волны АФК (повышение их концентрации) и подавление такой волны при действии ингибиторов оксидаз RbohD, так и результаты математического моделирования.

Считается, что распространение химического сигнала или гидравлической волны приводит к долговременной активации лиганд-зависимых или механочувствительных Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны соответственно и входу ионов кальция в клетку [48]. Умеренное (или сильное) и долговременное повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (500–600 нМ и более [49]) приводит к инактивации H^+ -АТФазы [64] и формированию длительной волны деполяризации. На ее фоне мембранный потенциал может достигать пороговых значений и активировать потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, формируя «ПД-образные» спайки, механизм которых аналогичен механизму ПД [48, 49].

СП, который представляет собой распространяющуюся волну гиперполяризации (рис. 3), является наименее изученным электрическим сигналом у растений [6]. Известно, что СП может возникать при локальном действии широкого спектра стрессоров, включая неорганические соли, умеренный и сильный нагрев, ожог, механическое повреждение и атаки насекомых [9, 65–71]. При этом форма и длительность СП может существенно варьировать в зависимости от типа стрессора, вида растения и расстояния от зоны повреждения [9, 65–71]. Следует отметить, что СП может быть тесно связан с ВП, так как (i) ряд стрессоров вызывают генерацию ВП вблизи зоны воздействия на растение, а на удалении от нее наблюдается появление СП [9, 67, 69–71]; (ii) локальный ожог вызывает ВП у растений с регулярным поливом, но может вызывать СП при сильном водном дефиците [69]; (iii) стрессоры могут вызывать ВП при первом действии, а при повторном – СП [66]; (iv) в зависимости от участка растения действие одних и тех же стрессоров может вызывать как ВП, так и СП [65].

Считается, что основным механизмом генерации СП является активация H^+ -АТРазы плазматической мембраны [66], что подтверждается угнетением сигнала при предварительном ингибировании этого транспортера (ортованадат натрия) и индукцией СП при локальном действии активатора H^+ -АТРазы (фузикокцин); однако природа сигнала, вызывающего такую активацию, остается дискуссионной. Ранее мы предположили [69–71], что передача СП связана с распространением гидравлического сигнала с малой амплитудой, который активирует механочувствительные Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны и вызывает небольшое возрастание концентрации ионов кальция в цитоплазме. Существуют отдельные электрофизиологические данные [72, 73], показывающие, что небольшое возрастание концентрации Ca^{2+} может вызывать активацию H^+ -АТРазы плазматической мембраны; и, таким образом, происходит гиперполяризация. С другой стороны, ряд работ показывает, что небольшое возрастание концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (200–400 нМ) вызывает инактивацию inwardly-rectifying K^+ -каналов плазматической мембраны [74, 75], которые обеспечивают вход ионов калия из внеклеточной среды в цитоплазму клетки. Учитывая, что inwardly-rectifying K^+ -каналы и H^+ -АТРаза плазматической мембраны являются основными системами электрогенного ионного транспорта в условиях покоя [47, 76, 77] (в соответствии с

ранее проведенным теоретическим анализом разработанной нами математической модели электрогенеза клетки высшего растения [47]), снижение проницаемости K^+ -каналов должно приводить к гиперполяризации. При этом развитие гиперполяризации будет обусловлено уменьшением вклада электрической проводимости inwardly-rectifying K^+ -каналов в общую электрическую проводимость плазматической мембраны. Последнее может быть подтверждено изменениями мембранного потенциала (E_M), упрощенно описанного уравнением:

$$E_M = \frac{E_P + g_K/g_P E_K}{1 + g_K/g_P},$$

где E_P – электродвижущая сила (ЭДС) H^+ -АТРазы (около –450 мВ) и E_K – потенциал Нернста для ионов калия (около –100 мВ; на основе [49, 76, 77]) в условиях уменьшения собственной проводимости K^+ -каналов (g_K) по отношению к собственной проводимости H^+ -АТРазы (g_P). Приведенное уравнение, опирающееся на параллельное электрическое соединение inwardly-rectifying K^+ -каналов и H^+ -АТРазы, показывает стационарное решение для мембранного потенциала.

Гипотеза об инактивации inwardly-rectifying K^+ -каналов хорошо согласуется с подавлением генерации СП при действии специфичного блокатора K^+ -каналов, тетраэтиламмония [65]. Важным преимуществом предложенной гипотезы является ее способность объяснить связь ВП и СП, так как при уменьшении амплитуды гидравлической волны (с уменьшением силы стимула при развитии засухи или с увеличением расстояния от зоны стимуляции [51, 53, 68–71]) должен уменьшаться вход Ca^{2+} в клетку, что приводит к изменению типа ЭС: длительная волна деполяризации (при сильном или умеренном повышении концентрации ионов кальция в цитоплазме) сменяется волной гиперполяризации (при небольшом возрастании концентрации Ca^{2+}). Следует, однако, отметить, что предложенный механизм потенциально совместим и с химической гипотезой распространения сигнала; в этом случае будет происходить индукция входа ионов кальция через лиганд-зависимые Ca^{2+} -каналы [48].

Таким образом, общей чертой ПД, ВП и СП является участие изменений активности H^+ -АТРазы плазматической мембраны в их генерации, что хорошо согласуется с ключевой ролью этих АТРаз Р-типа в поддержании ряда физиологических процессов растений и рецепции действия факторов окружающей среды [78, 79], включая изменения активности

H⁺-АТФазы при действии абиотических и биотических стрессоров. При этом ключевым механизмом изменения активности H⁺-АТФазы является фосфорилирование аминокислотных остатков R-домена на C-конце фермента [78, 79]: фосфорилирование Thr947 обеспечивает присоединение белков 14-3-3 к C-концу и вызывает активацию фермента; напротив, фосфорилирование ряда других аминокислотных остатков нарушает связывание белков 14-3-3 и приводит к инактивации H⁺-АТФазы. Следует отметить, что Ca²⁺-зависимая инактивация H⁺-АТФазы, которая предотвращается при обработке ингибитором протеинкиназы H-7 [46], связана, по-видимому, с фосфорилированием одного из аминокислотных остатков (Ser944, Thr942, Tyr946) и нарушением присоединения белков 14-3-3 к C-концу фермента [79].

По-видимому, непосредственный вклад H⁺-АТФазы в формирование электрических сигналов варьирует. Так, в случае ПД исключение инактивации H⁺-АТФазы слабо влияет на форму и амплитуду сигнала, но полностью подавляет сопровождающее ПД защелачивание апопласта [46, 47]. С другой стороны, инактивация H⁺-АТФазы является основным механизмом генерации ВП [48], так как снижение активности этого транспортера приводит к существенному подавлению длительной волны деполяризации, составляющей основу вариабельного потенциала [49, 64, 80].

В случае СП наблюдается более сложная картина. Базовая гипотеза [66, 67, 69–71], описывающая механизмы СП, предполагает возрастание абсолютной величины активности H⁺-АТФазы; однако такое предположение противоречит данным о защелачивании апопласта во время развития системного потенциала [66]. Аналогичное защелачивание, которое наблюдается при инактивации H⁺-АТФазы во время генерации ПД [46, 47] и ВП [25, 27], показывает, скорее, снижение активности этого транспортера. Предположение о возрастании относительной активности H⁺-АТФазы вследствие Ca²⁺-зависимого снижения активности inwardly-rectifying K⁺-каналов [74, 75] в большей степени согласуется с такими данными, так как развитие гиперполяризации должно снижать активный транспорт протонов из клетки и приводить к защелачиванию апопласта вследствие возрастания электрохимического градиента протонов, направленного против такого транспорта.

Завершая раздел, следует отдельно отметить, что изменения pH, сопровождающие изменения активности H⁺-АТФазы плазматической мембраны при развитии ЭС, в значительной

степени связаны с наличием противоположно направленных протонных потоков. В соответствии с ранее разработанной нами математической моделью электрогенеза клетки высшего растения [47, 77], такие потоки могут быть обусловлены активностями H⁺/K⁺-антипортера и 2H⁺/Cl⁻-симпортера и утечкой протонов через плазматическую мембрану. В частности, подобные потоки могут обеспечивать быстрый транспорт протонов внутрь клетки при снижении компенсирующего выхода H⁺ в условиях инактивации H⁺-АТФазы. Потенциально, отмеченные противоположные потоки протонов также могут регулироваться теми или иными факторами. Однако такая регуляция не является необходимым условием для реалистичного описания электрических ответов растений при моделировании [47, 76, 77], вследствие чего гипотеза о регуляции направленных внутрь потоков H⁺ является, скорее, избыточной в случае клеток высших растений.

В целом участие изменений активности H⁺-АТФазы в генерации всех основных типов ЭС позволяет предположить, что такие изменения могут играть определенную физиологическую роль; в частности, значительный интерес вызывает их участие в регуляции фотосинтетических процессов электрическими сигналами у высших растений [23].

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ H⁺-АТФАЗЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КАК МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ НА ФОТОСИНТЕЗ

Как отмечалось выше, существует ряд аргументов в пользу сходного снижения абсолютной активности H⁺-АТФазы плазматической мембраны при генерации всех трех типов ЭС; прежде всего, это наблюдаемое при генерации ПД [46, 47], ВП [25, 27] и СП [66] защелачивание апопласта. В том случае, если такое снижение действительно связано с вызванной ЭС инактивацией фотосинтеза, можно ожидать, что подобная инактивация будет наблюдаться при распространении всех трех типов ЭС. Данные литературы показывают, что ПД [14, 81, 82], ВП [16, 24–30, 83] и СП [66, 71] действительно могут вызывать сходное изменение интенсивности фотосинтетических процессов у растений, включая, в частности, снижение интенсивности ассимиляции CO₂, уменьшение квантового выхода фотосистемы II и увеличение нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла.

Вызванные ЭС ответы фотосинтеза включают в себя быструю (5–10 мин) и длительную (десятки минут и, возможно, часы) инактивацию [6, 7, 23]. В некоторых случаях у растений может наблюдаться только длительная фотосинтетическая инактивация (см., например, работы Hlavácková et al. [10], Herde et al. [84] и Sherstneva et al. [85]). В ряде работ показано [14, 26, 35], что снижение концентрации CO_2 в среде приводит к инактивации световой стадии фотосинтеза, сходной с вызванной ЭС, и уменьшает амплитуду индуцированных электрическими сигналами фотосинтетических ответов; однако полного подавления быстрых и длительных изменений параметров световой стадии не происходит. На основании этого было предположено [6, 23], что быстрая и, возможно, длительная инактивация фотосинтеза связаны с двумя различными группами механизмов.

(i) Со снижением интенсивности темновой стадии фотосинтеза, приводящим к уменьшению отношений ADP/ATP и $NADP^+/NADPH$ в строме хлоропластов и, соответственно, к угнетению процессов световой стадии вследствие роста электрохимического градиента на тилакоидной мембране (результат снижения активности H^+ -АТФ-синтазы в условиях нехватки субстрата) и нарушения «стока» электронов из электрон-транспортной цепи [14, 26]. Вероятными механизмами подавления темновой стадии фотосинтеза являются уменьшение проводимости мезофилла листа для CO_2 [24] и, возможно, закрытие устьиц [21].

(ii) С подавлением световой стадии фотосинтеза, не вызванным замедлением функционирования цикла Кальвина, которое, потенциально, также может иметь различные механизмы (в частности, возрастание нефотохимического тушения [27, 29] и снижение активности ферредоксин- $NADP^+$ -редуктазы [26]).

Существует несколько гипотез, объясняющих механизмы инактивации фотосинтеза [23]. Среди них можно отметить подавление активности ферментов цикла Кальвина вследствие поступления Ca^{2+} в цитоплазму и далее, в строму хлоропластов [81] и инактивирующее влияние АФК (вероятно, H_2O_2) [83]. В случае длительной инактивации фотосинтеза также рассматривается участие стрессовых фитогормонов (абсцизовой и жасмоновой кислоты [10, 11, 50]), которые приводят к закрытию устьиц и подавлению фотосинтеза. В то же время обратимая инактивация H^+ -АТФазы плазматической мембраны выглядит наиболее вероятным механизмом развития вызванных ЭС фотосинтетических ответов у высших растений [6, 23].

Прежде всего, следует отметить, что такая инактивация может быть следствием всех остальных приведенных механизмов. В частности, известно, что повышение концентрации ионов кальция может приводить к подавлению активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны [86], распространение H_2O_2 считается связанным с активацией Ca^{2+} -каналов, входом ионов кальция и инактивацией H^+ -АТФазы [6, 54–56]. Действие же абсцизовой кислоты на фотосинтез также может опосредоваться снижением активности H^+ -АТФазы [87, 88].

Результаты наших предыдущих работ [88, 89] показывают, что умеренное возрастание или снижение исходной активности H^+ -АТФазы при предварительной обработке растений активаторами (фузикоцином) или ингибиторами (ортованадат натрия) этого ионного транспортера приводит, соответственно, к возрастанию или снижению фотосинтетического ответа, возникающего при последующей индукции ВП. Такие результаты подтверждают участие H^+ -АТФазы в формировании вызванных ЭС изменений фотосинтеза, так как при сохранении постоянной относительной величины изменения ее активности абсолютная величина такого изменения будет возрастать при предварительной активации H^+ -АТФазы или снижаться при ее предварительной инактивации, приводя к увеличению или снижению амплитуды вызванного ЭС фотосинтетического ответа соответственно.

Сопровождающие инактивацию H^+ -АТФазы изменения внутри- и внеклеточного pH рассматриваются как вероятный механизм индукции ЭС фотосинтетических ответов [2, 6, 23]. Существует ряд аргументов, подтверждающих такую гипотезу. Во-первых, значительное число работ показывает, что генерация различных типов ЭС у высших растений сопровождается возрастанием pH в апопласте и снижением pH в цитоплазме [25, 27, 45, 46, 66, 85]. Более того, непрямыми методами выявлено сопровождающее генерацию ВП закисление стромы и люмена хлоропластов [90]. При этом некоторые работы [91, 92] показывают наличие сильной связи между изменениями pH и параметров фотосинтеза, подтверждая их роль в индукции фотосинтетических ответов. Во-вторых, показано, что искусственная индукция изменения pH путем действия протонофоров на участки листа [27] или путем ингибирования активности H^+ -АТФазы у протопластов ортованадатом натрия [89] приводит к индукции фотосинтетических ответов, сходных с наблюдаемыми при распространении ЭС (снижение квантового выхода фотосистемы II и возрастание

нефотохимического тушения). В-третьих, закисление среды инкубации хлоропластов высших растений, имитирующее снижение pH в цитоплазме при развитии ЭС, также индуцирует фотосинтетические ответы, близкие к ответам, вызванным электрическими сигналами [25, 27, 85]; амплитуда таких ответов линейно коррелирует с величиной изменений pH [27, 85]. Аналогичный эффект был выявлен при перфузии клеток харовых водорослей растворами с пониженным pH [93].

Наши предыдущие работы показывают [91, 92], что сопровождающее ВП возрастание внеклеточного pH связано, прежде всего, со снижением фотосинтетической ассимиляции CO_2 , в то время как уменьшение внутриклеточного pH связано с увеличением нефотохимического тушения флуоресценции. На основании этого можно предположить [6, 23], что вызванное ЭС защелачивание апопласта влияет преимущественно на поступление CO_2 в клетки, а закисление цитоплазмы, стромы и люмена хлоропластов может непосредственно влиять на реакции световой стадии фотосинтеза. Такое предположение хорошо согласуется с вызванным ЭС уменьшением проводимости мезофилла листа для CO_2 [24] и с наличием индуцированных электрическими сигналами изменений световой стадии фотосинтеза, которые не были связаны с инактивацией темновой стадии [26, 27, 29].

В качестве простого механизма влияния защелачивания апопласта на поступление CO_2 в фотосинтезирующую клетку можно предположить pH-зависимое снижение отношения $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ [23], так как заряженная форма значительно хуже проникает через биологические мембраны по сравнению с нейтральной [94]. Такое предположение было предварительно подтверждено анализом упрощенной математической модели, описывающей влияние инактивации H^+ -АТФазы на долю нейтральной формы CO_2 [95]; однако дальнейшее исследование более детализированной фотосинтетической модели листа не подтвердило существенного вклада этого механизма в снижение активности фотосинтеза при защелачивании апопласта (по крайней мере для стационарных потоков CO_2 при однородном описании апопласта и при использованных значениях параметров модели) [96, 97].

Альтернативная гипотеза, описывающая влияние вызванных ЭС изменений pH на проводимость мезофилла листа для CO_2 , была предложена в работе Gallé et al. [24]. В соответствии с ней такие изменения влияют на проводимость аквапоринов, которые играют

важную роль в поступлении углекислого газа в клетки высших растений [98] и могут регулироваться pH [99–101]. Такая гипотеза хорошо согласуется с результатами моделирования [97], показывающими зависимость стационарной интенсивности фотосинтеза от проводимости плазматической мембраны для CO_2 ; однако данные литературы [99–101] показывают, что проводимость аквапоринов снижается при закислении цитоплазмы, а не при защелачивании апопласта. Несмотря на то что оба процесса сопровождают генерацию ЭС [25, 27], наши данные показывают [91, 92] слабую связь закисления цитоплазмы со снижением интенсивности темновой стадии фотосинтеза; т.е. имеется определенное противоречие между гипотезой об участии аквапоринов в развитии вызванных ЭС фотосинтетических ответов и экспериментальными особенностями таких ответов.

Таким образом, вопрос о конкретных механизмах влияния изменений pH на поступление CO_2 в клетки мезофилла остается открытым. Потенциально, выявленные противоречия могут быть объяснены неоднородным пространственным распределением карбоангидраз, которые значительно ускоряют взаимное превращение между CO_2 и HCO_3^- , так как такая неоднородность может обеспечить локальные pH-зависимые изменения соотношения нейтральной и заряженной форм углекислого газа, что будет влиять на его прохождение через плазматическую мембрану без существенного изменения средней концентрации таких форм в апопласте (в предложенной фотосинтетической модели листа [96, 97] подобная возможность не учитывалась). Отдельные работы, показывающие совместное функционирование карбоангидраз и аквапоринов в плазматической мембране [102] и влияние карбоангидраз на проводимость мезофилла для CO_2 [103], являются аргументом в пользу такой гипотезы.

Следует отметить, что индуцированное ЭС закрытие устьиц, которое может участвовать в длительной инактивации фотосинтетических процессов [21], также связано с подавлением активности H^+ -АТФазы, так как величина ответа может быть модифицирована изменением начальной активности этого транспортера [36]. В то же время непосредственным механизмом закрытия устьиц является, скорее, не инактивация H^+ -АТФазы, а вызванные такой инактивацией изменения активности ионных каналов, приводящие к выходу ионов из замыкающих клеток. В частности, в ряде работ показан значительный выход ионов хлора, сопровождающий развитие электрических сигналов различного типа [6, 7, 48, 66].

Непосредственное влияние закисления цитоплазмы на параметры световой стадии фотосинтеза обусловлено, по-видимому, прохождением протонов из цитоплазмы в строму и люмен хлоропластов [23]. На основе измерения электрохромного сдвига поглощения света листом и светорассеяния на длине волны 535 нм нами ранее было косвенно показано сопровождающее развитие ВП снижение рН в строме и люмене [90], которое подтверждает транспорт протонов через оболочки хлоропластов и тилакоидные мембраны.

В соответствии с работами Alte et al. [104] и Benz et al. [105], снижение рН стромы хлоропластов может приводить к увеличению сродства ферредоксин-NADP⁺-редуктазы со специальными сайтами связывания (Tic62 и TROL), что обеспечивает пространственное удаление фермента от фотосистемы I и тем самым снижение потока электронов на акцепторной стороне этой фотосистемы. Такой механизм хорошо согласуется с вызванным ВП ростом потерь на акцепторной стороне фотосистемы I [26], который практически не зависит от интенсивности темновой стадии фотосинтеза. По-видимому, этот механизм может также способствовать вызванной ЭС активации циклического потока электронов вокруг фотосистемы I [28], так как уменьшение нециклического потока, конкурирующего за субстрат (восстановленный ферредоксин), должно приводить к возрастанию других потоков, использующих этот же субстрат [106].

Вызванное ЭС закисление люмена хлоропластов будет прежде всего индуцировать возрастание энергозависимой компоненты нефотохимического тушения флуоресценции, так как электрические сигналы могут вызывать значительное возрастание этой компоненты [30], для которой показана тесная связь с рН люмена [107–109]. Непосредственное снижение потока электронов через фотосинтетическую электрон-транспортную цепь также может быть результатом закисления люмена хлоропластов, так как одной из лимитирующих стадий процесса является окисление пластохинолов в комплексе цитохромов b_6f [110, 111]; считается, что эта стадия имеет высокую чувствительность к величине рН в люмене и замедляется при увеличении концентрации протонов. Потенциально, еще одной «мишенью» снижения рН в люмене хлоропластов может быть компонента нефотохимического тушения флуоресценции, обусловленная перемещением главного пигмент-белкового светособирующего комплекса («state transition») [112]; так как показано [29],

что в условиях отсутствия освещения и, соответственно, изменения активности темновой стадии фотосинтеза, ЭС могут приводить к изменению распределения поглощенного света между фотосистемами I и II.

Таким образом, снижение абсолютной величины активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны, сопровождающее генерацию ПД, ВП и, возможно, СП, приводит к возрастанию внеклеточного и уменьшению внутриклеточного рН и, как следствие, вызывает фотосинтетическую инактивацию, включающую в себя ряд связанных друг с другом механизмов (рис. 4).

Вероятным результатом вызванных ЭС изменений фотосинтеза в интактных частях растения является повышение устойчивости фотосинтетического аппарата к действию стрессоров на эти части [6, 7, 23, 31]. Подобное повышение будет иметь высокую значимость для растения в том случае, если локальное действие стрессора, индуцирующее электрические сигналы, является предвестником действия неблагоприятных факторов на другие части растительного организма [6, 7]. Механизмы ЭС-индуцированного повышения устойчивости фотосинтетического аппарата могут быть разделены на несколько групп [6, 7, 23, 31].

(i) Положительное влияние ЭС на устойчивость фотосистемы II при умеренной интенсивности стрессоров (на примере повышенной и пониженной температуры) [34, 39] может быть связано с возрастанием энергозависимой компоненты нефотохимического тушения флуоресценции [30] и активацией циклического потока электронов [28], которые являются эффективными механизмами защиты фотосинтетического аппарата при действии широкого спектра стрессоров [107–100, 113, 114].

(ii) В случае действия высокой температуры влияние ЭС на устойчивость фотосинтетического аппарата имеет более сложный характер [35, 36]: снижение повреждения фотосистемы I сопровождается усилением повреждения фотосистемы II; при этом оба процесса являются связанными [37]. Такой результат может быть объяснен гипотезой [115, 116] о том, что в условиях экстремального действия стрессоров, повреждение фотосистемы II, способной к относительно быстрой репарации, может приводить к сохранению фотосистемы I в результате прекращения притока электронов от воды, уменьшения избыточного восстановления электрон-транспортной цепи и, как следствие, снижения образования АФК. Важно отметить, что сохранение фотосистемы I также важно для последующей репарации фотосинтетического

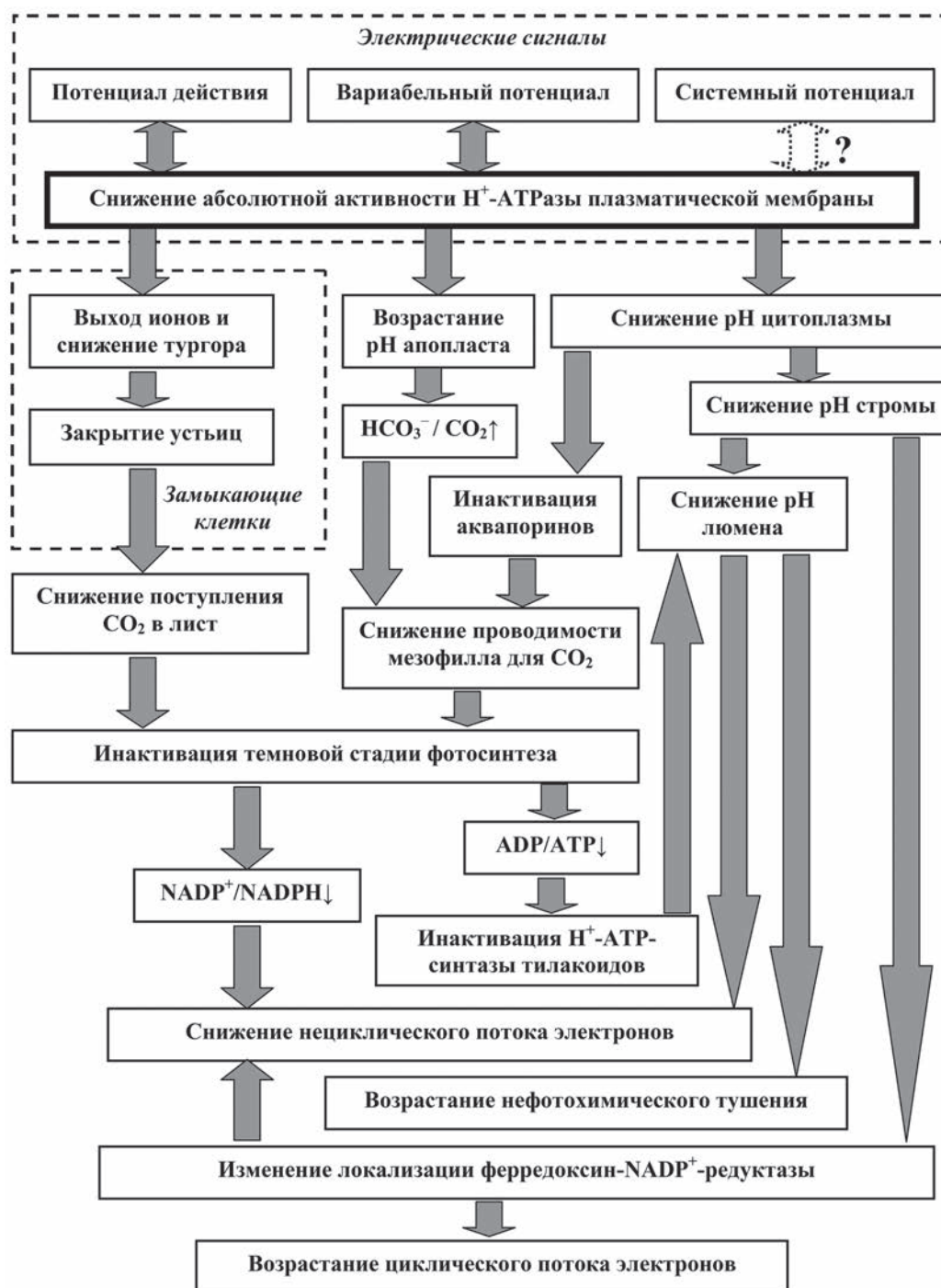


Рис. 4. Схема возможных путей участия инактивации H^+ -АТРазы плазматической мембраны в регуляции фотосинтеза электрическими сигналами. Для СП приведен вариант, предполагающий участие инактивации inwardly-rectifying K^+ -каналов в гиперполяризации

аппарата [23], так как в этом случае сохраняется возможность функционирования циклического потока электронов и синтеза АТФ.

(iii) Так как возрастание содержания АТФ в листьях является важным следствием вызванных ЭС фотосинтетических ответов [16], можно предположить, что это возрастание является механизмом ускорения репарации

фотосинтетического аппарата после повреждающего действия стрессоров. Положительное влияние АТФ на устойчивость фотосинтетического аппарата растений [117] и данные о вызванном ЭС ускорении репарации фотосистемы II [34] подтверждают эту гипотезу.

Итоговым результатом вызванного ЭС увеличения устойчивости фотосинтетического

аппарата является общее повышение устойчивости растения, которое проявляется в меньшем подавлении роста [36] и электрической активности [40] в условиях системного действия стрессоров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный обзор литературы показывает, что формирование всех типов электрических сигналов высших растений связано с изменениями активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны; при этом инактивация H^+ -АТФазы играет важную роль в формировании потенциалов действия и переменных потенциалов. В случае системного потенциала вопрос о конкретных изменениях активности H^+ -АТФазы имеет более сложный характер: с одной стороны, нельзя исключать возрастание абсолютной активности транспортера, которое может быть обусловлено двухфазной зависимостью такой активности от концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (активация при небольшом возрастании концентрации и инактивация при умеренном и высоком возрастании). С другой стороны, ряд аргументов (защелачивание апопласта во время генерации системного потенциала, роль калиевых каналов в такой генерации) показывают большую вероятность участия относительного возрастания активности H^+ -АТФазы в формировании системного потенциала; такое возрастание обусловлено Ca^{2+} -зависимой инактивацией inwardly-rectifying K^+ -каналов плазматической мембраны при небольшом повышении концентрации ионов кальция. Абсолютная активность H^+ -АТФазы может при этом снижаться вследствие возрастания при гиперполяризации величины электрохимического градиента протонов, направленного внутрь клетки. Возрастание электрохимического градиента протонов может также снижать общую эффективность транспорта H^+ из клетки за счет активации систем вторичного активного транспорта (например, протон-анионный симпортер [118]) и усиления пассивных потоков H^+ в цитоплазму [119].

По-видимому, снижение абсолютной активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны является основным механизмом инактивирующего влияния потенциалов действия, переменных потенциалов и, вероятно, системных потенциалов на фотосинтез. Вызванная электрическими сигналами инактивация фотосинтеза проявляется в снижении ассимиляции CO_2 , квантовых выходов фотосистем I и II и нециклического потока электронов, а также в возрастании нефотохимического тушения флуоресценции и циклического потока электронов вокруг фотосистемы I. При этом индуцированное электрическими сигналами возрастание рН апопласта обеспечивает снижение поступления CO_2 в клетку, инактивацию темновой стадии фотосинтеза и, как следствие, подавление процессов световой стадии фотосинтеза; в свою очередь, уменьшение рН цитоплазмы и, как следствие, стромы и люмена хлоропластов приводит к дополнительному подавлению световой стадии.

Конечным результатом вызванных электрическими сигналами фотосинтетических ответов является, по-видимому, повышение устойчивости фотосинтетического аппарата к действию стрессоров и облегчение его последующей репарации. Такие изменения, в свою очередь, вносят вклад в общее повышение устойчивости растения к системному действию неблагоприятных факторов и способствуют его выживанию в меняющихся условиях окружающей среды.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в формулировке концепции статьи, подготовке материала и написании черновика обзора. В.С. Сухов осуществлял итоговое редактирование текста обзора.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-10088).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fromm, J., and Lautner, S. (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants, *Plant Cell Environ.*, **30**, 249-257, doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01614.x.
2. Gallé, A., Lautner, S., Flexas, J., and Fromm, J. (2015) Environmental stimuli and physiological responses: the current view on electrical signaling, *Environ. Exp. Bot.*, **114**, 15-21, doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.013.

3. Choi, W.G., Hilleary, R., Swanson, S.J., Kim, S.H., and Gilroy, S. (2016) Rapid, long-distance electrical and calcium signaling in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **67**, 287-307, doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-112130.
4. Hedrich, R., Salvador-Recatalà, V., and Dreyer, I. (2016) Electrical wiring and long-distance plant communication, *Trends Plant Sci.*, **21**, 376-387, doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.016.
5. Szechyńska-Hebda, M., Lewandowska, M., and Karpiński, S. (2017) Electrical signaling, photosynthesis and systemic acquired acclimation, *Front. Physiol.*, **8**, 684, doi: 10.3389/fphys.2017.00684.
6. Sukhov, V., Sukhova, E., and Vodeneev, V. (2019) Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **146**, 63-84, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.11.009.
7. Sukhova, E., and Sukhov, V. (2021) Electrical signals, plant tolerance to actions of stressors, and programmed cell death: is interaction possible? *Plants*, **10**, 1704, doi: 10.3390/plants10081704.
8. Wildon, D. C., Thain, J. F., Minchin, P. E. H., Gubb, I. R., Reilly, A. J., Skipper, Y. D., Doherty, H. M., O'Donnell, P. J., and Bowles, D. (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor Induction in the wounded plant, *Nature*, **360**, 62-65, doi: 10.1038/360062a0.
9. Mousavi, S. A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., and Farmer, E. E. (2013) Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling, *Nature*, **500**, 422-426, doi: 10.1038/nature12478.
10. Hlaváčková, V., Krchnák, P., Naus, J., Novák, O., Spundová, M., and Strnad, M. (2006) Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning, *Planta*, **225**, 235-244, doi: 10.1007/s00425-006-0325-x.
11. Hlavinka, J., Nožková-Hlaváčková, V., Floková, K., Novák, O., and Nauš, J. (2012) Jasmonic acid accumulation and systemic photo-synthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient sitiens mutants and sitiens pretreated by ABA, *Plant Physiol. Biochem.*, **54**, 89-96, doi: 10.1016/j.plaphy.2012.02.014.
12. Farmer, E. E., Gao, Y. Q., Lenzone, G., Wolfender, J. L., and Wu, Q. (2020) Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses, *New Phytol.*, **227**, 1037-1050, doi: 10.1111/nph.16646.
13. Filek, M., and Kościelniak, J. (1997) The effect of wounding the roots by high temperature on the respiration rate of the shoot and propagation of electric signal in horse bean seedlings (*Vicia faba* L. minor), *Plant Sci.*, **123**, 39-46, doi: 10.1016/S0168-9452(96)04567-0.
14. Pavlovič, A., Slováková, L., Pandolfi, C., and Mancuso, S. (2011) On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis), *J. Exp. Bot.*, **62**, 1991-2000, doi: 10.1093/jxb/erq404.
15. Lautner, S., Stummer, M., Matyssek, R., Fromm, J., and Grams, T. E. E. (2014) Involvement of respiratory processes in the transient knockout of net CO₂ uptake in *Mimosa pudica* upon heat stimulation, *Plant Cell Environ.*, **37**, 254-260, doi: 10.1111/pce.12150.
16. Surova, L., Sherstneva, O., Vodeneev, V., Katicheva, L., Semina, M., and Sukhov, V. (2016) Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves, *J. Plant Physiol.*, **202**, 57-64, doi: 10.1016/j.jplph.2016.05.024.
17. Furch, A. C., van Bel, A. J., Fricker, M. D., Felle, H. H., Fuchs, M., and Hafke, J. B. (2009) Sieve element Ca²⁺ channels as relay stations between remote stimuli and sieve tube occlusion in *Vicia faba*, *Plant Cell*, **21**, 2118-2132, doi: 10.1105/tpc.108.063107.
18. Furch, A. C., Zimmermann, M. R., Will, T., Hafke, J. B., and van Bel, A. J. (2010) Remote-controlled stop of phloem mass flow by biphasic occlusion in *Cucurbita maxima*, *J. Exp. Bot.*, **61**, 3697-3708, doi: 10.1093/jxb/erq181.
19. Van Bel, A. J., Furch, A. C., Will, T., Buxa, S. V., Musetti, R., and Hafke, J. B. (2014) Spread the news: systemic dissemination and local impact of Ca²⁺ signals along the phloem pathway, *J. Exp. Bot.*, **65**, 1761-1787, doi: 10.1093/jxb/ert425.
20. Kaiser, H., and Grams, T. E. (2006) Rapid hydropassive opening and subsequent active stomatal closure follow heat-induced electrical signals in *Mimosa pudica*, *J. Exp. Bot.*, **57**, 2087-2092, doi: 10.1093/jxb/erj165.
21. Yudina, L. M., Sherstneva, O. N., Mysyagin, S. A., Vodeneev, V. A., and Sukhov, V. S. (2019) Impact of local damage on transpiration of pea leaves at various air humidity, *Russ. J. Plant Physiol.*, **66**, 87-94, doi: 10.1134/S1021443719010163.
22. Stahlberg, R., and Cosgrove, D. J. (1996) Induction and ionic basis of slow wave potentials in seedlings of *Pisum sativum* L., *Planta*, **200**, 416-425, doi: 10.1007/BF00231397.
23. Sukhov, V. (2016) Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants, *Photosynth. Res.*, **130**, 373-387, doi: 10.1007/s11120-016-0270-x.
24. Gallé, A., Lautner, S., Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Hanson, D., Roesgen, J., and Fromm, J. (2013) Photosynthetic responses of soybean (*Glycine max* L.) to heat-induced electrical signalling are predominantly governed by modifications of mesophyll conductance for CO₂, *Plant Cell Environ.*, **36**, 542-552, doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02594.x.
25. Grams, T. E., Lautner, S., Felle, H. H., Matyssek, R., and Fromm, J. (2009) Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf,

- Plant Cell Environ.*, **32**, 319-326, doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01922.x.
26. Sukhov, V., Orlova, L., Mysyagin, S., Sinitsina, J., and Vodeneev, V. (2012) Analysis of the photosynthetic response induced by variation potential in geranium, *Planta*, **235**, 703-712, doi: 10.1007/s00425-011-1529-2.
 27. Sukhov, V., Sherstneva, O., Surova, L., Katicheva, L., and Vodeneev, V. (2014) Proton cellular influx as a probable mechanism of variation potential influence on photosynthesis in pea, *Plant Cell Environ.*, **37**, 2532-2541, doi: 10.1111/pce.12321.
 28. Sukhov, V., Surova, L., Sherstneva, O., Katicheva, L., and Vodeneev, V. (2015) Variation potential influence on photosynthetic cyclic electron flow in pea, *Front. Plant Sci.*, **5**, 766, doi: 10.3389/fpls.2014.00766.
 29. Sukhova, E., Mudrilov, M., Vodeneev, V., and Sukhov, V. (2018) Influence of the variation potential on photosynthetic flows of light energy and electrons in pea, *Photosynth. Res.*, **136**, 215-228, doi: 10.1007/s11120-017-0460-1.
 30. Sukhov, V., Sukhova, E., Gromova, E., Surova, L., Nerush, V., and Vodeneev, V. (2019) The electrical signal-induced systemic photosynthetic response is accompanied by changes in the photochemical reflectance index in pea, *Funct. Plant Biol.*, **46**, 328-338, doi: 10.1071/FP18224.
 31. Sukhova, E., and Sukhov, V. (2023) Electrical signals in systemic adaptive response of higher plants: Integration through separation, *Bioelectricity*, **5**, 126-131, doi: 10.1089/bioe.2022.0042.
 32. Szechyńska-Hebda, M., Kruk, J., Górecka, M., Karpińska, B., and Karpiński, S. (2010) Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **22**, 2201-2218, doi: 10.1105/tpc.109.069302.
 33. Zandalinas, S. I., Fichman, Y., Devireddy, A. R., Sengupta, S., Azad, R. K., and Mittler, R. (2020) Systemic signaling during abiotic stress combination in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 13810-13820, doi: 10.1073/pnas.2005077117.
 34. Ретивин В. Г., Опритов В. А., Лобов С. А., Тараканов С. А., Худяков В. А. (1999). Модификация устойчивости фотосинтезирующих клеток к охлаждению и прогреву после раздражения корней раствором KCl, *Физиология растений*, **46**, 790-798.
 35. Sukhov, V., Surova, L., Sherstneva, O., and Vodeneev, V. (2014) Influence of variation potential on resistance of the photosynthetic machinery to heating in pea, *Physiol. Plant.*, **152**, 773-783, doi: 10.1111/ppl.12208.
 36. Sukhov, V., Surova, L., Sherstneva, O., Bushueva, A., and Vodeneev, V. (2015) Variation potential induces decreased PSI damage and increased PSII damage under high external temperatures in pea, *Funct. Plant. Biol.*, **42**, 727-736, doi: 10.1071/FP15052.
 37. Surova, L., Sherstneva, O., Vodeneev, V., and Sukhov, V. (2016) Variation potential propagation decreases heat-related damage of pea photosystem I by 2 different pathways, *Plant. Sign. Behav.*, **11**, e1145334, doi: 10.1080/15592324.2016.1145334.
 38. Sukhov, V., Gaspirovich, V., Mysyagin, S., and Vodeneev, V. (2017) High-temperature tolerance of photosynthesis can be linked to local electrical responses in leaves of pea, *Front. Physiol.*, **8**, 763, doi: 10.3389/fphys.2017.00763.
 39. Grinberg, M. A., Gudkov, S. V., Balalaeva, I. V., Gromova, E., Sinitsyna, Y., Sukhov, V., and Vodeneev, V. (2021) Effect of chronic β -radiation on long-distance electrical signals in wheat and their role in adaptation to heat stress, *Environ. Exp. Bot.*, **184**, 104378, doi: 10.1016/j.envexpbot.2021.104378.
 40. Ретивин В. Г., Опритов В. А., Федулина С. Б. (1997) Преадаптация тканей стебля CUCURBITA PEPO к повреждающему действию низких температур, индуцированная потенциалами действия, *Физиология растений*, **44**, 499-510.
 41. Williamson, R. E., and Ashley, C. C. (1982) Free Ca²⁺ and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*, *Nature*, **296**, 647-650, doi: 10.1038/296647a0.
 42. Lunevsky, V. Z., Zherelova, O. M., Vostrikov, I. Y., and Berestovsky, G. N. (1983) Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels, *J. Membr. Biol.*, **72**, 43-58, doi: 10.1007/BF01870313.
 43. Bulychev, A. A., Kamzolnikina, N. A., Luengviriyi, J., Rubin, A. B., and Müller, S. C. (2004) Effect of a single excitation stimulus on photosynthetic activity and light-dependent pH banding in *Chara* cells, *J. Membr. Biol.*, **202**, 11-19, doi: 10.1007/s00232-004-0716-5.
 44. Bulychev, A. A., and Krupenina, N. A. (2009) Transient removal of alkaline zones after excitation of *Chara* cells is associated with inactivation of high conductance in the plasmalemma, *Plant. Signal. Behav.*, **4**, 727-734, doi: 10.4161/psb.4.8.9306.
 45. Felle, H. H., and Zimmermann, M. R. (2007) Systemic signalling in barley through action potentials, *Planta*, **226**, 203-214, doi: 10.1007/s00425-006-0458-y.
 46. Vodeneev, V. A., Opritov, V. A., and Pyatygin, S. S. (2006) Reversible changes of extracellular pH during action potential generation in a higher plant *Cucurbita pepo*, *Russ. J. Plant Physiol.*, **53**, 481-487, doi: 10.1134/S102144370604008X.
 47. Sukhov, V., and Vodeneev, V. (2009) A mathematical model of action potential in cells of vascular plants, *J. Membr. Biol.*, **232**, 59-67, doi: 10.1007/s00232-009-9218-9.
 48. Vodeneev, V., Akinchits, E., and Sukhov, V. (2015) Variation potential in higher plants: mechanisms of generation and propagation, *Plant Sign. Behav.*, **10**, e1057365, doi: 10.1080/15592324.2015.1057365.

49. Sukhov, V., Akinchits, E., Katicheva, L., and Vodeneev, V. (2013) Simulation of variation potential in higher plant cells, *J. Membr. Biol.*, **246**, 287-296, doi: 10.1007/s00232-013-9529-8.
50. Ladeynova, M., Mudrilov, M., Berezina, E., Kior, D., Grinberg, M., Brilkina, A., Sukhov, V., and Vodeneev, V. (2020) Spatial and temporal dynamics of electrical and photosynthetic activity and the content of phytohormones induced by local stimulation of pea plants, *Plants*, **9**, 1364, doi: 10.3390/plants9101364.
51. Stahlberg, R., and Cosgrove, D. J. (1997) The propagation of slow wave potentials in pea epicotyls, *Plant Physiol.*, **113**, 209-217, doi: 10.1104/pp.113.1.209.
52. Mancuso, S. (1999) Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*, *Aust. J. Plant Physiol.*, **26**, 55-61, doi: 10.1071/PP98098.
53. Sukhova, E., Akinchits, E., Gudkov, S. V., Pishchalnikov, R. Y., Vodeneev, V., and Sukhov, V. A. (2021) Theoretical analysis of relations between pressure changes along xylem vessels and propagation of variation potential in higher plants, *Plants*, **10**, 372, doi: 10.3390/plants10020372.
54. Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., Dangel, J. L., and Mittler, R. (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli, *Sci. Signal.*, **2**, ra45, doi: 10.1126/scisignal.2000448.
55. Suzuki, N., and Mittler, R. (2012) Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants, *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 2269-2276, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.538.
56. Choi, W. G., Miller, G., Wallace, I., Harper, J., Mittler, R., and Gilroy, S. (2017) Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca²⁺, ROS and electrical signals, *Plant J.*, **90**, 698-707, doi: 10.1111/tpj.13492.
57. Peña-Cortés, H., Fisahn, J., and Willmitzer, L. (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4106-4113, doi: 10.1073/pnas.92.10.4106.
58. Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., Howe, G. A., and Gilroy, S. (2018) Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling, *Science*, **361**, 1112-1115, doi: 10.1126/science.aat7744.
59. Malone, M. (1994) Wound-induced hydraulic signals and stimulus transmission in *Mimosa pudica* L., *New Phytol.*, **128**, 49-56, doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb03985.x.
60. Evans, M. J., and Morris, R. J. (2017) Chemical agents transported by xylem mass flow propagate variation potentials, *Plant J.*, **91**, 1029-1037, doi: 10.1111/tpj.13624.
61. Blyth, M. G., and Morris, R. J. (2019) Shear-enhanced dispersion of a wound substance as a candidate mechanism for variation potential transmission, *Front. Plant Sci.*, **10**, 1393, doi: 10.3389/fpls.2019.01393.
62. Vodeneev, V., Orlova, A., Morozova, E., Orlova, L., Akinchits, E., Orlova, O., and Sukhov, V. (2012) The mechanism of propagation of variation potentials in wheat leaves, *J. Plant Physiol.*, **169**, 949-954, doi: 10.1016/j.jplph.2012.02.013.
63. Evans, M. J., Choi, W. G., Gilroy, S., and Morris, R. J. (2016) A ROS-assisted calcium wave dependent on the AtRBOHD NADPH oxidase and TPC1 cation channel propagates the systemic response to salt stress, *Plant Physiol.*, **171**, 1771-1784, doi: 10.1104/pp.16.00215.
64. Julien, J. L., Desbiez, M. O., de Jaeger, G., Frachisse, J. M. (1991) Characteristics of the wave of depolarization induced by wounding in *Bidens pilosa* L., *J. Exp. Bot.*, **42**, 131-137, doi: 10.1093/jxb/42.1.131.
65. Lautner, S., Grams, T. E. E., Matyssek, R. Fromm, J. (2005) Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis, *Plant Physiol.*, **138**, 2200-2209, doi: 10.1104/pp.105.064196.
66. Zimmermann, M. R., Maischak, H., Mithöfer, A., Boland, W., and Felle, H. H. (2009) System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding, *Plant Physiol.*, **149**, 1593-1600, doi: 10.1104/pp.108.133884.
67. Zimmermann, M. R., Mithöfer, A., Will, T., Felle, H. H., and Furch, A. C. (2016) Herbivore-triggered electrophysiological reactions: candidates for systemic signals in higher plants and the challenge of their identification, *Plant Physiol.*, **170**, 2407-2419, doi: 10.1104/pp.15.01736.
68. Vuralhan-Eckert, J., Lautner, S., and Fromm, J. (2018) Effect of simultaneously induced environmental stimuli on electrical signalling and gas exchange in maize plants, *J. Plant Physiol.*, **223**, 32-36, doi: 10.1016/j.jplph.2018.02.003.
69. Yudina, L., Gromova, E., Grinberg, M., Popova, A., Sukhova, E., and Sukhov, V. (2022) Influence of burning-induced electrical signals on photosynthesis in pea can be modified by soil water shortage, *Plants*, **11**, 534, doi: 10.3390/plants11040534.
70. Yudina, L., Sukhova, E., Popova, A., Zolin, Yu., Abasheva, K., Grebneva, K., and Sukhov V. (2023) Local action of moderate heating and illumination induces propagation of hyperpolarization electrical signals in wheat plants, *Front. Sustain. Food Syst.*, **6**, 1062449, doi: 10.3389/fsufs.2022.1062449.
71. Yudina, L., Sukhova, E., Popova, A., Zolin, Y., Abasheva, K., Grebneva, K., and Sukhov, V. (2023) Hyperpolarization electrical signals induced by local action of moderate heating influence photosynthetic light reactions in wheat plants, *Front. Plant Sci.*, **14**, 1153731, doi: 10.3389/fpls.2023.1153731.
72. Lew, R. R. (1989) Calcium activates an electrogenic proton pump in neurospora plasma mem-

- brane, *Plant Physiol.*, **91**, 213-216, doi: 10.1104/pp.91.1.213.
73. Grinberg, M., Mudrilov, M., Kozlova, E., Sukhov, V., Sarafanov, F., Evtushenko, A., Ilin, N., Vodeneev, V., Price, C., and Mareev, E. (2022) Effect of extremely low-frequency magnetic fields on light-induced electric reactions in wheat, *Plant Signal. Behav.*, **17**, e2021664, doi: 10.1080/15592324.2021.2021664.
 74. Grabov, A., and Blatt, M. R. (1999) A steep dependence of inward-rectifying potassium channels on cytosolic free calcium concentration increase evoked by hyperpolarization in guard cells, *Plant Physiol.*, **119**, 277-288, doi: 10.1104/pp.119.1.277.
 75. Gao, Y. Q., Wu, W. H., and Wang, Y. (2019) Electrophysiological identification and activity analyses of plasma membrane K⁺ channels in maize guard cells, *Plant Cell Physiol.*, **60**, 765-777, doi: 10.1093/pcp/pcy242.
 76. Sukhova, E., Akinchits, E., and Sukhov, V. (2017) Mathematical models of electrical activity in plants, *J. Membr. Biol.*, **250**, 407-423, doi: 10.1007/s00232-017-9969-7.
 77. Sukhova, E., Ratnitsyna, D., and Sukhov, V. (2021) Stochastic spatial heterogeneity in activities of H⁺-ATPases in electrically connected plant cells decreases threshold for cooling-induced electrical responses, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8254, doi: 10.3390/ijms22158254.
 78. Falhof, J., Pedersen, J. T., Fuglsang, A. T., and Palmgren, M. (2016) Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology, *Mol. Plant.*, **9**, 323-337, doi: 10.1016/j.molp.2015.11.002.
 79. Fuglsang, A. T., and Palmgren, M. (2021) Proton and calcium pumping P-type ATPases and their regulation of plant responses to the environment, *Plant Physiol.*, **187**, 1856-1875, doi: 10.1093/plphys/kiab330.
 80. Katicheva, L., Sukhov, V., Akinchits, E., and Vodeneev, V. (2014) Ionic nature of burn-induced variation potential in wheat leaves. *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1511-1519, doi: 10.1093/pcp/pcu082.
 81. Krupenina, N. A., and Bulychiev, A. A. (2007) Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 781-788, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.01.004.
 82. Krausko, M., Perutka, Z., Šebela, M., Šamajová, O., Šamaj, J., Novák, O., and Pavlovič, A. (2017) The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis*, *New Phytol.*, **213**, 1818-1835, doi: 10.1111/nph.14352.
 83. Białasek, M., Górecka, M., Mittler, R., and Karpiński, S. (2017) Evidence for the Involvement of electrical, calcium and ROS signaling in the systemic regulation of non-photochemical quenching and photosynthesis, *Plant Cell Physiol.*, **58**, 207-215, doi: 10.1093/pcp/pcw232.
 84. Herde, O., Peña-Cortés, H., Fuss, H., Willmitzer, L., and Fisahn, J. (1999) Effects of mechanical wounding, current application and heat treatment on chlorophyll fluorescence and pigment composition in tomato plants, *Physiol. Plant.*, **105**, 179-184, doi: 10.1034/j.1399-3054.1999.105126.x.
 85. Sherstneva, O. N., Vodeneev, V. A., Katicheva, L. A., Surova, L. M., and Sukhov, V. S. (2015) Participation of intracellular and extracellular pH changes in photosynthetic response development induced by variation potential in pumpkin seedlings, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 776-784, doi: 10.1134/S0006297915060139.
 86. Kinoshita, T., Nishimura, M., and Shimazaki, Ki. (1995) Cytosolic concentration of Ca²⁺ regulates the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells of fava bean, *Plant Cell*, **7**, 1333-1342, doi: 10.1105/tpc.7.8.1333.
 87. Sukhov, V. S., Gaspirovich, V. V., Gromova, E. N., Ladeynova, M. M., Sinitsyna, Yu. V., Berezina, E. V., Akinchits, E. K., and Vodeneev, V. A. (2017) Decrease of mesophyll conductance to CO₂ is a possible mechanism of abscisic acid influence on photosynthesis in seedlings of pea and wheat, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **11**, 237-247, doi: 10.1134/S1990747817030096.
 88. Yudina, L., Sukhova, E., Sherstneva, O., Grinberg, M., Ladeynova, M., Vodeneev, V., and Sukhov, V. (2020) Exogenous abscisic acid can influence photosynthetic processes in peas through a decrease in activity of H⁺-ATPase in the plasma membrane, *Biology*, **9**, 324, doi: 10.3390/biology9100324.
 89. Yudina, L., Sherstneva, O., Sukhova, E., Grinberg, M., Mysyagin, S., Vodeneev, V., and Sukhov, V. (2020) Inactivation of H⁺-ATPase participates in the influence of variation potential on photosynthesis and respiration in peas, *Plants*, **9**, 1585, doi: 10.3390/plants9111585.
 90. Sukhov, V., Surova, L., Morozova, E., Sherstneva, O., and Vodeneev, V. (2016) Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential, *Front. Plant Sci.*, **7**, 1092, doi: 10.3389/fpls.2016.01092.
 91. Sherstneva, O. N., Surova, L. M., Vodeneev, V. A., Plotnikova, Yu. I., Bushueva, A. V., and Sukhov, V. S. (2016) The role of the intra- and extracellular protons in the photosynthetic response induced by the variation potential in pea seedlings, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **10**, 60-67, doi: 10.1134/S1990747815050116.
 92. Sherstneva, O. N., Vodeneev, V. A., Surova, L. M., Novikova, E. M., and Sukhov, V. S. (2016) Application of a mathematical model of variation potential for analysis of its influence on photosynthesis in higher plants, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **10**, 269-277, doi: 10.1134/S1990747816030089.
 93. Bulychiev, A. A., Alova, A. V., and Rubin, A. B. (2013) Fluorescence transients in chloroplasts of *Chara*

- corallina* cells during transmission of photoinduced signal with the streaming cytoplasm, *Russ. J. Plant Physiol.*, **60**, 33-40, doi: 10.1134/S1021443712060039.
94. Tholen, D., and Zhu, X.-G. (2011) The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion, *Plant Physiol.*, **156**, 90-105, doi: 10.1104/pp.111.172346.
 95. Sukhova, E. M., and Sukhov, V. S. (2018) Dependence of the CO₂ uptake in a plant cell on the plasma membrane H⁺-ATPase activity: theoretical analysis, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **12**, 146-159, doi: 10.1134/S1990747818020149.
 96. Sukhova, E., Ratnitsyna, D., Gromova, E., and Sukhov, V. (2022) Development of two-dimensional model of photosynthesis in plant leaves and analysis of induction of spatial heterogeneity of CO₂ assimilation rate under action of excess light and drought, *Plants*, **11**, 3285, doi: 10.3390/plants11233285.
 97. Sukhova, E., Ratnitsyna, D., and Sukhov, V. (2022) Simulated analysis of influence of changes in H⁺-ATPase activity and membrane CO₂ conductance on parameters of photosynthetic assimilation in leaves, *Plants*, **11**, 3435, doi: 10.3390/plants11243435.
 98. Uehlein, N., Otto, B., Hanson, D. T., Fischer, M., McDowell, N., and Kaldenhoff, R. (2008) Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability, *Plant Cell*, **20**, 648-657, doi: 10.1105/tpc.107.054023.
 99. Luu, D.-Y., and Maurel, C. (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status, *Plant Cell Environ.*, **28**, 85-96, doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01295.x.
 100. Chaumont, F., and Tyerman, S. D. (2014) Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations, *Plant Physiol.*, **164**, 1600-1618, doi: 10.1104/pp.113.233791.
 101. Kapilan, R., Vaziri, M., and Zwiazek, J. J. (2018) Regulation of aquaporins in plants under stress, *Biol. Res.*, **51**, 4, doi: 10.1186/s40659-018-0152-0.
 102. Wang, C., Hu, H., Qin, X., Zeise, B., Xu, D., Rappel, W. J., Boron, W. F., and Schroeder, J. I. (2016) Reconstitution of CO₂ regulation of SLAC1 anion channel and function of CO₂-permeable PIP₂₁ aquaporin as CARBONIC ANHYDRASE₄ interactor, *Plant Cell*, **28**, 568-582, doi: 10.1105/tpc.15.00637.
 103. Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Diaz-Espejo, A., Galmés, J., and Medrano, H. (2008) Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects, *Plant Cell Environ.*, **31**, 602-621, doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01757.x.
 104. Alte, F., Stengel, A., Benz, J. P., Petersen, E., Soll, J., Groll, M., and Bölter, B. (2010) Ferredoxin:NADPH oxidoreductase is recruited to thylakoids by binding to a polyproline type II helix in a pH-dependent manner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19260-19265, doi: 10.1073/pnas.1009124107.
 105. Benz, J. P., Stengel, A., Lintala, M., Lee, Y. H., Weber, A., Philippar, K., Gügel, I. L., Kaieda, S., Ikegami, T., Mulo, P., Soll, J., and Bölter, B. (2010) *Arabidopsis* Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise, *Plant Cell*, **21**, 3965-3983, doi: 10.1105/tpc.109.069815.
 106. Joliot, P., and Alric, J. (2013) Inhibition of CO₂ fixation by iodoacetamide stimulates cyclic electron flow and non-photochemical quenching upon far-red illumination, *Photosynth. Res.*, **115**, 55-63, doi: 10.1007/s11120-013-9826-1.
 107. Müller, P., Li, X. P., and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy, *Plant Physiol.*, **125**, 1558-1566, doi: 10.1104/pp.125.4.1558.
 108. Jajoo, A., Mekala, N. R., Tongra, T., Tiwari, A., Grieco, M., Tikkanen, M., and Aro, E. M. (2014) Low pH-induced regulation of excitation energy between the two photosystems, *FEBS Lett.*, **588**, 970-974, doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.056.
 109. Ruban, A. V. (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage, *Plant Physiol.*, **170**, 1903-1916, doi: 10.1104/pp.15.01935.
 110. Tikhonov, A. N. (2013) pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **116**, 511-534, doi: 10.1007/s11120-013-9845-y.
 111. Tikhonov, A. N. (2014) The cytochrome *b₆f* complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways, *Plant Physiol. Biochem.*, **81**, 163-183, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.12.011.
 112. Rochaix, J.-D., Lemeille, S., Shapiguzov, A., Samol, I., Fucile, G., Willig, A., and Goldschmidt-Clermont, M. (2012) Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment, *Philos. Trans. R. Soc. B*, **367**, 3466-3474, doi: 10.1098/rstb.2012.0064.
 113. Joliot, P., and Joliot, A. (2006) Cyclic electron flow in C3 plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 362-368, doi: 10.1016/j.bbabbio.2006.02.018.
 114. Joliot, P., and Johnson, G. N. (2011) Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13317-13322, doi: 10.1073/pnas.1110189108.
 115. Tikkanen, M., and Aro, E. M. (2014) Integrative regulatory network of plant thylakoid energy transduction, *Trends Plant Sci.*, **19**, 10-17, doi: 10.1016/j.tplants.2013.09.003.
 116. Tikkanen, M., Mekala, N. R., and Aro, E. M. (2014) Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 210-215, doi: 10.1016/j.bbabbio.2013.10.001.
 117. Allakhverdiev, S. I., Nishiyama, Y., Takahashi, S., Miyairi, S., Suzuki, I., and Murata, N. (2005)

- Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in *Synechocystis*, *Plant Physiol.*, **137**, 263-273, doi: 10.1104/pp.104.054478.
118. Gradmann, D. (2001) Impact of apoplast volume on ionic relations in plant cells, *J. Membr. Biol.*, **184**, 61-69, doi: 10.1007/s00232-001-0074-5.
119. Tyerman, S. D., Beilby, M., Whittington, J., Juswono, U., Neyman, L., and Shabala, S. (2001) Oscillations in proton transport revealed from simultaneous measurements of net current and net proton fluxes from isolated root protoplasts: MIFE meets patch-clamp, *Aust. J. Plant Physiol.*, **28**, 591-604, doi: 10.1071/PP01030.

CHANGES IN ACTIVITY OF H⁺-ATPase OF PLASMA MEMBRANE AS A LINK BETWEEN FORMING ELECTRICAL SIGNALS AND INDUCTION OF PHOTOSYNTHETIC RESPONSES IN HIGHER PLANTS

Review

E. M. Sukhova, L. M. Yudina, and V. S. Sukhov*

*N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
603022 Nizhny Novgorod, Russia; e-mail: vssuh@mail.ru*

Action of numerous adverse environmental factors on higher plants is spatially-heterogenous; it means that induction of a systemic adaptive response requires generation and propagation stress signals. Electrical signals (ESs) induced by local action of stressors include action potential, variation potential, and system potential and participate in forming fast physiological changes at the level of the whole plant, including photosynthetic responses. Generation of these ESs is accompanied by changes in activity of H⁺-ATPase which is the main system of electrogenic proton transport across the plasma membrane. Literature data show that the changes in H⁺-ATPase activity and related changes in intra- and extracellular pH play a key role in ESs-induced photosynthetic inactivation in non-irritated parts of plants. This inactivation is caused by both suppression of CO₂ flux into mesophyll cells in leaves, which can be induced by the apoplast alkalization and, probably, cytoplasm acidification, and direct influence of acidification of stroma and lumen of chloroplasts on photosynthetic light and, probably, dark reactions. Result of the ESs-induced photosynthetic inactivation is increasing tolerance of photosynthetic machinery to action of adverse factors and probability of survive of plants.

Keywords: higher plants, electrical signals, action potential, variation potential, system potential, H⁺-ATPase, intracellular pH, extracellular pH, photosynthesis

ГЕНЕРАЦИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЦИТОХРОМОМ *bd*

Обзор

© 2023 В.Б. Борисов

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: bor@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 10.06.2023

После доработки 08.07.2023

Принята к публикации 11.07.2023

В обзоре даны современные представления о механизме генерации трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в ходе каталитического цикла трёхгемовой терминальной хинол-оксидазы типа *bd*. Предполагается, что основной вклад в образование $\Delta\psi$ вносит перемещение H^+ поперёк мембраны по внутрибелковому гидрофильному протон-проводящему пути из цитоплазмы к кислородоредуктазному активному центру этого бактериального фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дыхательная цепь, терминальная оксидаза, цитохром *bd*, гем, протон-движущая сила, мембранный потенциал.

DOI: 10.31857/S032097252310007X, EDN: OTSSEC

ВВЕДЕНИЕ

В 1974 г. в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ Л.А. Драчёв и соавторы разработали электрометрический метод прямого измерения электрической активности сопрягающих мембран, дающий уникальную возможность отслеживать внутрибелковое перемещение электрических зарядов в пределах одного молекулярного оборота фермента [1]. С помощью этого метода удалось наблюдать в реальном времени генерацию трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) бактериородопсином [2], реакционными центрами [3] и цитохромом *bc₁* [4] фотосинтезирующих бактерий, а также терминальной цитохром *c*-оксидазой [5–7] и неканоническими ретиналь-содержащими бактериальными белками [8, 9]. Для изучения электрогенного механизма цитохром *c*-оксидаз применяются два разных подхода. В первом подходе используется фотохимическая инъекция одного электрона во встроенный в липосому фермент. При этом в качестве непосред-

ственного фотоактивируемого восстановителя выступает трис(2,2'-бипиридил)рутений(II) хлорид ($Ru(bpy)_3$), образующий за счёт электростатических взаимодействий комплекс с сайтом связывания цитохрома *c* в оксидазе вблизи входного редокс-центра Cu_A [5, 6]. В результате фотовозбуждения $Ru(bpy)_3$ импульсным лазером электрон с $Ru(bpy)_3^*$ переносится на Cu_A . Окисленный $Ru(bpy)_3$ ревосстанавливается анилином. Этот подход позволяет регистрировать с разрешением во времени электрогенный перенос зарядов в ходе отдельных одноэлектронных переходов в каталитическом цикле цитохром *c*-оксидазы [7]. Во втором подходе для инициирования ферментативной реакции в режиме одного оборота используется лазерный импульсный фотолиз комплекса монооксида углерода (CO) с кислородсвязывающим высокоспиновым гемом a_3 . Образование комплекса CO с частично или полностью восстановленным ферментом происходит в анаэробных условиях. Затем в анаэробную ячейку с оксидазой, связавшей CO, вносят при помощи техники быстрого смешивания растворён-

Принятые сокращения: H^+/e^- — стехиометрия протон/электрон, которая в случае дыхательной цепи *Escherichia coli* подразумевает количество высвобождаемых в периплазму протонов на один электрон, используемый для восстановления кислорода до воды; Δp — протон-движущая сила; $\Delta\psi$ — трансмембранная разность электрических потенциалов; τ — характеристическое время, обратное константе скорости ($t_{1/e}$).

ный в воде кислород (O_2). В ходе распада комплекса СО—оксидаза, запускаемого фотолизом, O_2 связывается с гемом *a*₃ и восстанавливается электронами, присутствующими в оксидазе, что сопровождается генерацией $\Delta\psi$ [10]. Таким образом, во втором подходе используется сочетание прямого электрометрического метода [1] и метода «флоу-флэш» [11]. У терминальных хинолоксидаз, в том числе цитохрома *bd*, которому и посвящён этот обзор, сайт связывания цитохрома *c* отсутствует. По этой причине для отслеживания перемещения электрических зарядов внутри их белковой молекулы первый подход неприменим.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМА *bd*

Мембраносвязанные терминальные оксидазы аэробных дыхательных цепей организмов относят к транслоказам (класс 7 ферментов). Они катализируют реакцию четырехэлектронного восстановления молекулярного кислорода до воды ферроцитохромом *c* либо хинолом (убихинолом, менахинолом и, возможно, пластохинолом) [12, 13]. Катализируемая окислительно-восстановительная реакция сопряжена с генерацией Δp (протон-движущей силы). Δp представляет собой «энергетическую валюту» и используется клеткой для синтеза АТФ с помощью механизма окислительного фосфорилирования [14]. Терминальные оксидазы делят на два эволюционно неродственных надсемейства: гем/Сu-содержащих оксидаз и оксидаз типа *bd*, также называемых цитохромами *bd* [15–18]. В отличие от гем-медных оксидаз, все биохимически охарактеризованные цитохромы *bd* являются хинолоксидазами, не содержат Сu и встречаются только у бактерий и архей, в том числе патогенных [19–21]. Последнее обстоятельство позволяет рассматривать *bd*-ферменты в качестве перспективных терапевтических мишеней [21, 22]. Поскольку генерация $\Delta\psi$ в режиме одного молекулярного оборота изучена пока только у терминальных *bd*-оксидаз *Escherichia coli*, следует остановиться на этих ферментах подробнее.

Подобно электрон-транспортным цепям многих бактерий, аэробная дыхательная цепь *E. coli* разветвлена. Её терминальный участок в общем случае представлен тремя хинолоксидазами: гем-медным цитохромом *bo*₃ и двумя цитохромами *bd* — *bd*-I и *bd*-II [23, 24]. В отличие от оксидаз типа *bd*, цитохром *bo*₃ образует Δp по механизму протонного насоса, что позволяет двукратно увеличить стехиометрию пере-

качки протон/электрон (H^+/e^-) [25, 26]. Цитохромы *bo*₃, *bd*-I и *bd*-II кодируются оперонами *cyoABCDE*, *cydABX* и *appCBX* соответственно. *cyoABCDE* экспрессируется преимущественно при высоком парциальном давлении O_2 , тогда как *cydABX* — преимущественно в микроаэробных условиях. Экспрессия *appCBX* индуцируется при анаэробном росте *E. coli*, вступлении культуры в стационарную фазу роста и фосфатном голодании [24]. В последнее время появляется всё больше свидетельств того, что, помимо функционирования в качестве молекулярных преобразователей энергии, оксидазы типа *bd* принимают участие в других жизненно важных процессах в бактериальной клетке [27–30]. Цитохром *bd*-I вовлечён в образование дисульфидных связей при сворачивании белка [31], процесс биосинтеза гема [32], а также защиту бактерии от антибиотиков [33], пероксинитрита [34], монооксида азота [35–41] и аммиака [42]. Обе *bd*-оксидазы (*bd*-I и *bd*-II) также наделяют *E. coli* устойчивостью к цианиду [43], сульфиду [43–45] и перекиси водорода [46–54].

Недавно были опубликованы трёхмерные структуры обоих *bd*-ферментов *E. coli* (рис. 1, 2) [55–58]. Обнаружено, что цитохром *bd*-I содержит четыре субъединицы (CydA, CydB, CydX, CydY), тогда как цитохром *bd*-II — только три (AppC, AppB, AppX). При этом субъединицы CydA, CydB и CydX имеют гомологию с субъединицами AppC, AppB и AppX соответственно. Две большие субъединицы, CydA/AppC и CydB/AppB, образуют структурную сердцевину белка. Из других структурных отличий между двумя *bd*-оксидазами следует отметить, что белок *bd*-II, встроенный в амфилолы, в основном присутствует в виде димера (рис. 2), тогда как фермент *bd*-I существует только в виде мономера [57] (рис. 1). Кислородный канал в цитохроме *bd*-II имеет меньший диаметр по сравнению с таковым цитохрома *bd*-I [57]. Кроме того, предполагаемый протон-проводящий путь в ферменте *bd*-II короче, чем в оксидазе *bd*-I [57]. Субъединица CydA/AppC содержит в своём составе три разных гема, выступающих в качестве редокс-кофакторов: один низкоспиновый гексакоординированный, *b*₅₅₈, и два высокоспиновых пентакоординированных, *b*₅₉₅ и *d*. Аксиальными лигандами гемов служат аминокислотные остатки субъединицы CydA/AppC. Это His186 и Met393 для гема *b*₅₅₈ и Glu445 для гема *b*₅₉₅ [55–58]. В цитохроме *bd*-II аксиальным лигандом гема *d* является His19 [57–58]. В случае цитохрома *bd*-I данные о природе аксиального лиганда гема *d* противоречивы. Safarian et al. [56] утверждают, что это также His19, однако согласно модели

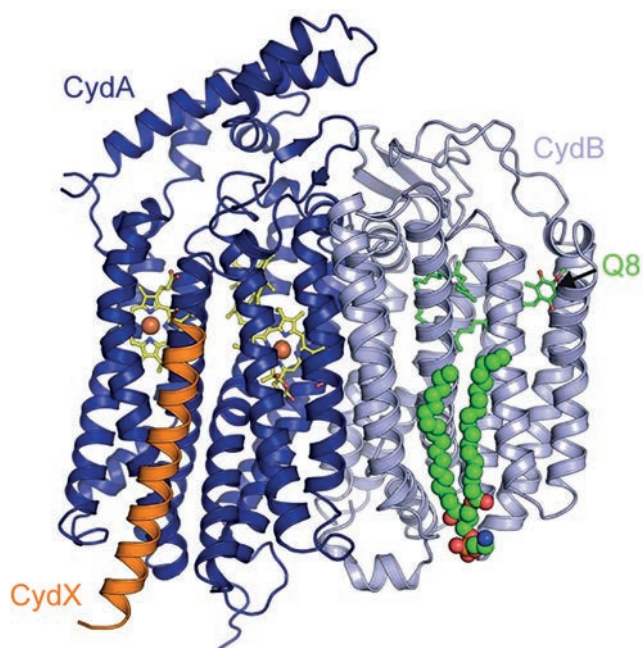


Рис. 1. Трёхмерная структура цитохрома *bd-I* *E. coli* с разрешением 3,3 Å (PDB ID 6RX4). Помимо гемов b_{558} , b_{595} и d , связанных с субъединицей CydA, в структуре белка обнаруживаются убихинон-8 (Q8) и глицерофосфолипид (показан символами сферической формы), связанные с субъединицей CydB. Рисунок взят из работы Theßeling et al. [55] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License

Theßeling et al. [55], таким лигандом служит Glu99. Гемы в белке расположены треугольником (рис. 3). Дополнительным структурным элементом в CydA/AppC является так называемая Q-петля. Она находится вблизи гема b_{558} и непосредственно участвует в связывании хинола, липофильного донора электронов. Другая большая субъединица, CydV/AppB, не обнаруживает в своём составе каких-либо металл-содержащих кофакторов. Вместо этого она несёт на себе прочно связанный убихинон-8 или деметилменахинон-8. Этот хинон занимает положение, эквивалентное сайту связывания гема в CydA/AppC, и, вероятно, играет роль в стабилизации структуры белка. Гем b_{558} является первичным акцептором электронов при окислении хинола. Гем d служит сайтом связывания O_2 и его последующего восстановления до $2H_2O$ [59, 60]. Гем d в цитохроме *bd-I* имеет необычайно высокое сродство к O_2 , при этом образующийся оксигенированный комплекс очень стабилен [61–64]. Функция гема b_{595} не вполне понятна. Слишком большое расстояние между центральными атомами Fe гемов b_{595} и d (10,9–11,3 Å), скорее всего, не позволяет им сформировать структурный биядерный центр, подобный таково-

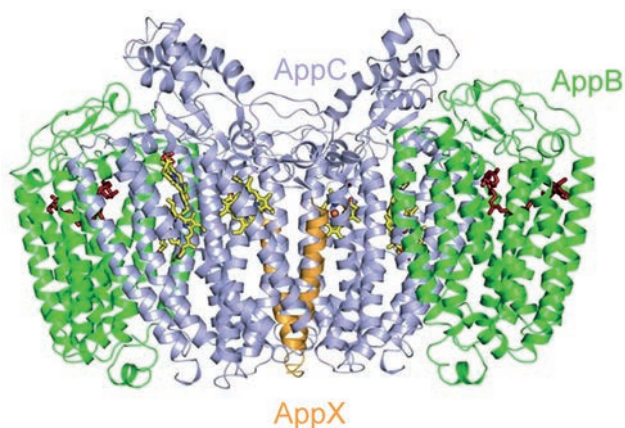


Рис. 2. Трёхмерная структура димера цитохрома *bd-II* *E. coli* с разрешением 3,0 Å (PDB ID 7OSE). Помимо гемов b_{558} , b_{595} и d , связанных с субъединицей AppC, в структуре белка обнаруживается убихинон-8 (показан красным цветом), связанный с субъединицей AppB. Рисунок взят из работы Grauel et al. [57] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License

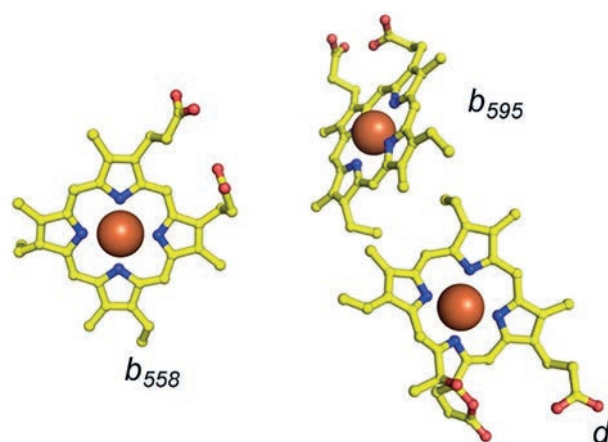


Рис. 3. Треугольное расположение гемов b_{558} , b_{595} и d в субъединице CydA цитохрома *bd-I* *E. coli*. Периплазма — сверху рисунка, цитоплазма — внизу рисунка. Рисунок взят из работы Theßeling et al. [55] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License

му у гем-медных оксидаз. Тем не менее ван-дер-ваальсовы контакты между этими гемами возможны, поскольку расстояние между их краями гораздо меньше (3,5–3,8 Å) [55–58]. Последнее обстоятельство предполагает возможность очень быстрого переноса электрона между гемами b_{595} и d , что получило экспериментальное подтверждение [65, 66]. Поэтому можно считать, что эти гемы образуют функциональный дигемовый центр. Такое предположение согласуется с данными ряда исследований [67–79]. Электрон, пришедший с хинола на гем b_{558} , по-видимому, переносится на гем b_{595} и затем на гем d .

ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ И КАТАЛИТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ ЦИТОХРОМА *bd-I E. coli*

Использование оптического и электрометрических методов в сочетании с методом «флоу-флэш» позволило наблюдать в реальном времени промежуточное образование и распад отдельных интермедиатов каталитического цикла цитохрома *bd-I E. coli* при температуре 21 °C [26, 80–83]. Предполагаемая схема последнего показана на рис. 4. В спектроскопических исследованиях гемопротеин находился в мицеллах детергента, а в электрометрических был встроен в липосомы. Исходно в эксперименте фермент переводился в полностью восстановленное состояние, в котором гем *d* был связан с CO (R^3-CO , $b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}-CO$). Фотолиз CO из этого состояния оксидазы приводит к промежуточному появлению формы цитохрома *bd-I*, не связанной с CO (R^3 , $b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}$). Этот переход ($R^3-CO \rightarrow R^3$) не разрешается во времени как в спектрофотометрических, так и в электрометрических измерениях. В присутствии O_2 происходит связывание молекулы этого двухатомного газа с гемом *d*. В результате образуется оксигенированный комплекс — интермедиат A^3 ($b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}-O_2$). Скорость образования A^3 прямо пропорциональна концентрации O_2 , при этом константа скорости второго порядка составляет около $2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ [64, 82]. Переход $R^3 \rightarrow A^3$ не сопровождается генерацией $\Delta\psi$ [26, 82, 83]. A^3 быстро ($\tau \sim 4,5$ мкс, τ — характеристическое время, обратное константе скорости, $t_{1/e}$) превращается в интермедиат, который Belevich et al. впервые описали и назвали соединением *P* [82]. Обнаружено, что переход $A^3 \rightarrow P$ также не сопряжён с генерацией $\Delta\psi$ [26, 82, 83]. В отличие от генерации A^3 из R^3 , скорость образования соединения *P* не зависит от концентрации O_2 . В ходе перехода $A^3 \rightarrow P$ гем b_{595} подвергается окислению, гем b_{558} остаётся в восстановленном состоянии, а новая кислородная форма гема *d* демонстрирует необычный максимум поглощения при 635 нм [82]. Единого мнения о химической структуре соединения *P* до сих пор нет. Belevich et al. в первоначальной работе [82] предположили, что *P* — истинный перекисный комплекс либо феррильный интермедиат с аминокислотным радикалом или катион-радикалом порфиринового кольца. Согласно более поздним данным Paulus et al. [84], соединение *P* представляет собой феррильную форму гема *d* с π -катион-радикалом на порфириновом кольце, которая находится в магнитном взаимодействии с гемом b_{595} . Важно

подчеркнуть, что Paulus et al. [84] наблюдали образование соединения *P* при температуре +1 °C, то есть в нефизиологических условиях. Возможно, что спектральный интермедиат *P*, появление которого в реальном времени зарегистрировали Belevich et al. [82], является смесью истинного перекисного комплекса ($b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{3+}-O-O-(H)$) и феррил π -катион-радикала ($b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{*4+}=O^{2-}$) при условии того, что они имеют схожие спектры поглощения. На следующей стадии *P* превращается ($\tau \sim 47$ мкс) в нерадикальную форму феррильного комплекса гема *d* (соединение *F*), что сопровождается окислением гема b_{558} . Каталитический интермедиат *F*, скорее всего, имеет структуру $b_{558}^{3+}b_{595}^{3+}d^{4+}=O^{2-}$. Переход $P \rightarrow F$ сопряжён с генерацией $\Delta\psi$ [26, 82, 83].

bd-Оксидаза имеет в своём составе три гема. Поэтому если выделенный фермент не содержит связанного хинола, то можно ожидать, что в полностью восстановленном состоянии он несёт на себе три электрона (R^3). В этом случае реакция R^3 с O_2 останавливается на образовании соединения *F* [80]. Если же цитохром *bd-I* включает в себя молекулу связанного хинола, являющегося двухэлектронным донором, то его окисление в присутствии O_2 позволяет осуществить превращение *F* в интермедиат A^1 с $\tau \sim 0,6-1,1$ мс [81, 82]. A^1 , вероятно, представляет собой одноэлектронную форму оксидазы с оксикомплексом

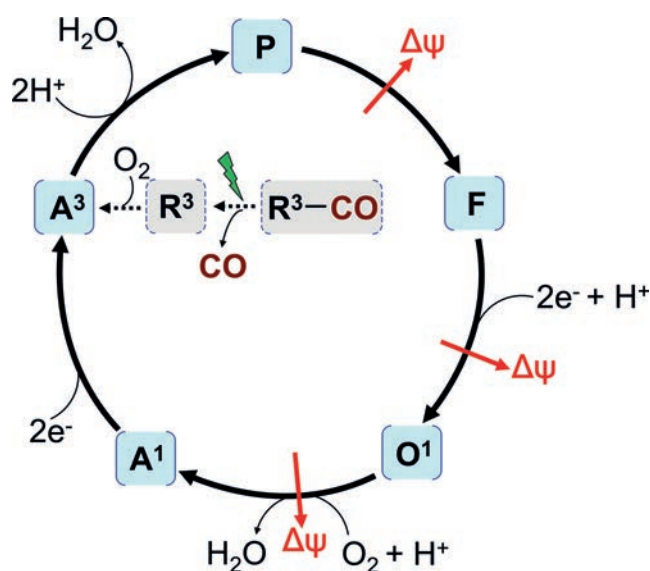


Рис. 4. Каталитический цикл цитохрома *bd-I E. coli*. Соединения A^3 , *P*, *F*, O^1 , A^1 — каталитические интермедиаты фермента. Соединения R^3 и R^3-CO не являются частью каталитического цикла оксидазы, но могут быть получены искусственным путём. Красные «стрелки сопряжения» обозначают генерацию $\Delta\psi$ при переходах $P \rightarrow F$ и $F \rightarrow A^1$. Структура соединений обсуждается в тексте обзора

гема d ($b_{558}^{3+}b_{595}^{3+}d^{2+}-O_2$). Переход $F \rightarrow A^1$, как и предыдущий, $P \rightarrow F$, сопровождается генерацией $\Delta\psi$ [81, 82]. Образуется ли $\Delta\psi$ ещё на одной частной стадии каталитического цикла — в переходе $A^1 \rightarrow A^3$ (рис. 4), пока неизвестно.

Обнаружено, что в стационарных условиях в присутствии O_2 и убихинола-1 основными каталитическими интермедиатами цитохрома $bd-I$ являются F и A^1 (каждый составляет примерно по 40% от общего количества) [60]. При этом около 20% оксидазы, вероятно, находится в состоянии O^1 — одноэлектронной форме с окисленным гемом d ($b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{3+}-OH$). Состояние O^1 в экспериментах в режиме одного оборота с использованием метода «флуо-флэш» зарегистрировано не было [80, 82, 83]. Тем не менее в настоящее время принято думать, что O^1 , по-видимому, также является каталитическим интермедиатом цитохрома $bd-I$ (рис. 4). Стоит также отметить, что форма R^3 фермента, скорее всего, не входит в число его каталитических интермедиатов [59, 60], однако для нужд эксперимента может быть легко произведена искусственным путём.

В 2005 г. Belevich et al. [81] на основании полученных результатов постулировали существование внутрибелкового протон-проводящего пути для переноса H^+ из цитоплазмы в кислородоредуктазный центр цитохрома $bd-I$. Авторы предположили, что такое перемещение H^+ поперёк мембраны, сопряжённое с переносом электрона с гема b_{558} на гемы b_{595} и d , сопровождается генерацией $\Delta\psi$, наблюдаемой в экспериментах [26, 80–83]. Выброс H^+ в периплазматическое пространство при окислении хинола ферментом также вносит вклад в создание Δp . Опубликованные в 2019 г. трёхмерные структуры $bd-I$ -оксидазы с разрешением 2,68 Å (PDB ID 6RKO) [56] и 3,3 Å (PDB ID 6RX4) [55] подтвердили гипотезу, выдвинутую Belevich et al. [81]. В структурах видна цепочка молекул воды, тянущаяся вдоль гидрофильного протон-проводящего пути, который начинается в цитоплазматическом интерфейсе между субъединицами $CydA$ и $CydB$ и проходит перпендикулярно плоскости мембраны к гему d . Этот протон-проводящий путь составляют несколько гидрофильных аминокислотных остатков (рис. 5). С цитоплазматической стороны путь начинается с $Asp119^{CydA}$, затем, по-видимому, в его состав входят $Lys57^{CydA}$, $Lys109^{CydA}$, $Asp105^{CydA}$, $Tyr379^{CydB}$ и, наконец, $Asp58^{CydB}$, с которого протоны, вероятно, поступают на пропионатную группу гема d [55]. Высказано предположение, что консервативные гидрофильные остатки $Ser108^{CydA}$, $Glu107^{CydA}$ и $Ser140^{CydA}$ также относятся к этому пути,

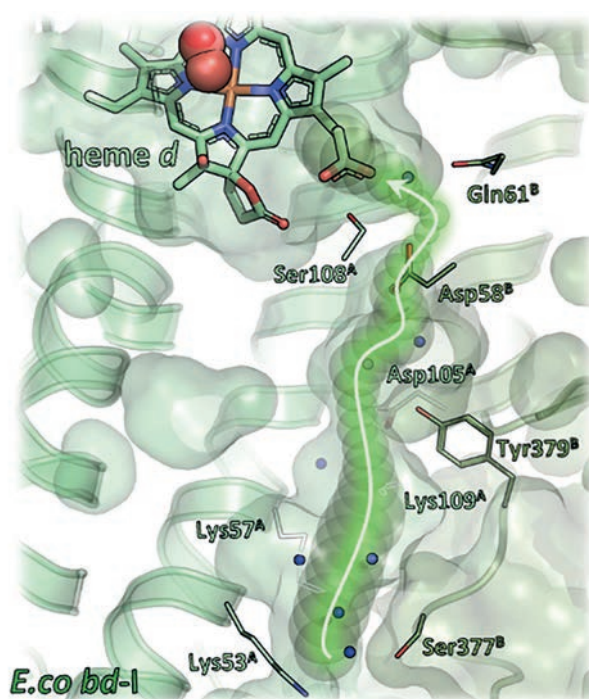


Рис. 5. Предполагаемый протон-проводящий путь в цитохроме $bd-I$ *E. coli*. Путь выстлан боковыми цепями нескольких гидрофильных аминокислот и позволяет переносить протоны с цитоплазматической стороны мембраны к пропионату гема d . В нём также обнаруживаются многочисленные молекулы воды (обозначены символами сферической формы синего цвета). Рисунок взят из работы Friedrich et al. [22] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License

облегчая перенос H^+ с $Asp58^{CydB}$ на пропионат гема d [56].

Belevich et al. [81] также выдвинули гипотезу, согласно которой в молекуле $bd-I$ два аминокислотных остатка с протонируемыми группами чувствительны к редокс-состоянию высокоспиновых пентакоординированных гемов b_{595} и d . Исследования мутантных форм $Glu445Ala$ и $Glu107Leu$ цитохрома $bd-I$ *E. coli* методами электрометрии и абсорбционной спектроскопии с микросекундным разрешением указывают на то, что такими функционально важными остатками служат высококонсервативные $Glu445^{CydA}$ и $Glu107^{CydA}$ соответственно [81, 83].

Как указано выше, $Glu445^{CydA}$ — аксиальный лиганд железа гема b_{595} [55, 56]. Его замена на Ala в субъединице $CydA$ приводит к инактивации фермента. При этом гем b_{595} удерживается в белке, но теряет способность к восстановлению даже в присутствии сильного донора электронов — дитионита, добавленного в избытке [81]. Как и в случае цитохрома $bd-I$ дикого типа, в реакции восстановленного мутантного фермента $Glu445Ala$ с кислородом наблюдается начальная неэлектрогенная стадия,

состоящая из переходов $R^3 \rightarrow A^3$ и $A^3 \rightarrow P$. Однако у мутанта, в отличие от дикого типа, при генерации $\Delta\psi$ не выявляется микросекундная фаза. Вместо этого у мутантной формы наблюдается более медленная, небольшая электрогенная фаза ($\tau \sim 1,3$ мс; амплитуда — 0,36 мВ), за которой следует электрогенный переход гораздо большей амплитуды ($\tau \sim 12,5$ мс; амплитуда — 1,7 мВ). Обе электрогенные фазы, скорее всего, отражают переход $P \rightarrow F$ в разных субпопуляциях фермента Glu445Ala [81]. Таким образом, замена Glu445 на Ala сильно ингибирует перенос заряда поперёк мембраны, сопряжённый с окислением цитохрома *bd-I* кислородом.

Аналогично, замена Glu107 на Leu в субъединице CudA ведёт к потере цитохромом *bd-I* хинолоксидазной активности. Полностью восстановленная мутантная форма Glu107Leu белка (R^3) связывает O_2 примерно с той же скоростью, что и фермент дикого типа. Однако образование феррильного интермедиата (F) в мутантной оксидазе, как полагают, существенно замедляется в сравнении с ферментом дикого типа. Об этом свидетельствуют результаты спектрофотометрических экспериментов, согласно которым продукции соединения F в 100-микросекундной временной шкале у мутантной оксидазы не наблюдается, в отличие от белка дикого типа [83]. Этот вывод согласуется с тем фактом, что скорость генерации $\Delta\psi$ (основной фазы) мутантной оксидазой примерно в 350 раз ниже, чем таковая, измеренная для фермента дикого типа [83].

Glu445^{CydA}, по-видимому, протонируется при переходе гема b_{595} из окисленной в восстановленную форму, т.е. служит для компенсации отрицательного заряда электрона, пришедшего на гем. В случае гема d такую же роль, возможно, выполняет Glu107^{CydA}. Согласно опубликованной трёхмерной структуре цитохрома *bd-I* *E. coli*, гем b_{595} расположен вблизи периплазматической поверхности [55, 56]. Поэтому если H^+ при восстановлении гема b_{595} поступает на Glu445^{CydA} с периплазматической стороны мембраны, то он вряд ли используется в катализируемой ферментом кислородоредуктазной реакции.

МОЖЕТ ЛИ ЦИТОХРОМ *bd-II* ИЗ *E. coli* ГЕНЕРИРОВАТЬ $\Delta\psi$?

Функциональные исследования цитохрома *bd-II* *E. coli* пока находятся на самом начальном этапе. Bekker et al. [85] сообщили, что для фермента *bd-II* соотношение H^+/e^-

равно 0, то есть он является несопряжённой хинолоксидазой. При этом известно, что цитохромы *bd-I* и bo_3 *E. coli* — сопряжённые хинолоксидазы, со значениями H^+/e^- 1 и 2 соответственно [25, 26]. Bekker et al. сконструировали мутантный штамм *E. coli* MB37, в дыхательной цепи которого присутствовал цитохром *bd-II*, но отсутствовали все известные на тот момент первичные генераторы протонного потенциала: NADH-дегидрогеназа 1 (NDH-1), цитохром bo_3 и цитохром *bd-I*. Авторы вычисляли H^+/e^- , используя сравнительные значения специфических скоростей потребления кислорода и синтеза АТФ штамма MB37 с другими мутантными штаммами *E. coli*, для которых уже были измерены величины H^+/e^- [85]. Бактериальные клетки всех штаммов росли в одинаковых условиях, а скорость синтеза АТФ рассчитывали из скоростей образования продуктов метаболизма — CO_2 , ацетата, этанола и лактата. Неожиданным оказалось следующее наблюдение: штамм MB37, который, по предположению авторов работы, должен был обладать полностью несопряжённой аэробной дыхательной цепью, оказался способен к росту в аэробных условиях на несбраживаемых субстратах. Однако возникает вопрос: как же в таком случае обеспечивается синтез АТФ? Bekker et al. выдвинули гипотезу [85], согласно которой АТФ в штамме MB37 продуцируется исключительно за счёт субстратного фосфорилирования. В более поздней работе Shepherd et al. [86] предположили, что в этом мутантном штамме протонный потенциал образуется за счёт функционирования электрогенного антипортера, который переносит внутрь клетки анион глутаминовой кислоты (глутамат) в обмен на выброс из клетки нейтральной γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). При этом ГАМК в клетке синтезируется из глутамата, в процессе чего потребляется внутриклеточный протон.

Borisov et al. [26] нашли неубедительными выводы авторов этих двух работ и экспериментально проверили, генерирует ли цитохром *bd-II* Δp . Обнаружили, что в стационарных условиях оба компонента Δp — $\Delta\psi$ и ΔpH — образуются за счёт хинолоксидазной активности цитохрома *bd-II* [26]. Измерили соотношение H^+/e^- . Как и в случае цитохрома *bd-I*, оно оказалось равным 1 [26]. Также показали, что оксидаза *bd-II* способна генерировать $\Delta\psi$ в ходе одного молекулярного оборота фермента, предположительно, при переходах $P \rightarrow F$ и $F \rightarrow A^1$ [26]. Таким образом, можно заключить, что цитохром *bd-II* *E. coli* является первичным генератором Δp . Следовательно, для объяснения роста клеток штамма *E. coli* MB37 в аэроб-

ных условиях альтернативные механизмы образования АТР, предложенные в работах Bekker et al. и Shepherd et al. [85, 86], не требуются.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-24-00045 (<https://rscf.ru/project/22-24-00045/>).

Благодарность. Автор хотел бы выразить свою глубочайшую благодарность М.И. Верховскому (безвременно ушедшему), И.Н. Бе-

левичу, Н.П. Белевичу, Д.А. Блоху (безвременно ушедшему) и А. Ясайтису за то чудесное время, которое мы провели, измеряя электрогенную активность загадочного цитохрома *bd*.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или любой другой сфере.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, выполненных автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321–324, doi: 10.1038/249321a0.
2. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Khitrina, L. V., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 461–470, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06361.x.
3. Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Y., Skulachev, V. P., Arutjunjan, A. M., Shulalov, V. A., and Zaberezhnaya, S. M. (1988) Electrogenic steps in the redox reactions catalyzed by photosynthetic reaction-centre complex from *Rhodospseudomonas viridis*, *Eur. J. Biochem.*, **171**, 253–264, doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13784.x.
4. Mulkidjanian, A. Y., Mamedov, M. D., Semenov, A. Y., Shinkarev, V. P., Verkhovsky, M. I., and Drachev, L. A. (1990) Partial reversion of the electrogenic reaction in the ubiquinol: cytochrome c_2 -oxidoreductase of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores under neutral and alkaline conditions, *FEBS Lett.*, **277**, 127–130, doi: 10.1016/0014-5793(90)80825-4.
5. Zaslavsky, D., Kaulen, A. D., Smirnova, I. A., Vygodina, T., and Konstantinov, A. A. (1993) Flash-induced membrane potential generation by cytochrome c oxidase, *FEBS Lett.*, **336**, 389–393, doi: 10.1016/0014-5793(93)80843-j.
6. Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., and Gennis, R. B. (1997) The roles of the two proton input channels in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9085–9090, doi: 10.1073/pnas.94.17.9085.
7. Siletsky, S., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1999) Resolution of electrogenic steps couples to conversion of cytochrome c oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo state, *Biochemistry*, **38**, 4853–4861, doi: 10.1021/bi982614a.
8. Bogachev, A. V., Bertsova, Y. V., Verkhovskaya, M. L., Mamedov, M. D., and Skulachev, V. P. (2016) Real-time kinetics of electrogenic Na^+ transport by rhodopsin from the marine flavobacterium *Dokdonia* sp. PRO95, *Sci. Rep.*, **6**, 21397, doi: 10.1038/srep21397.
9. Siletsky, S. A., Lukashev, E. P., Mamedov, M. D., Borisov, V. B., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2021) His57 controls the efficiency of ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum* at low and high pH, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1862**, 148328, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148328.
10. Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., Verkhovskaya, M., and Wikstrom, M. (1997) Translocation of electrical charge during a single turnover of cytochrome- c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 6–10, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00147-8.
11. Gibson, Q., and Greenwood, C. (1963) Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide, *Biochem. J.*, **86**, 541–554, doi: 10.1042/bj0860541.
12. Siletsky, S. A., Borisov, V. B., and Mamedov, M. D. (2017) Photosystem II and terminal respiratory oxidases: molecular machines operating in opposite directions, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **22**, 1379–1426, doi: 10.2741/4550.
13. Azarkina, N. V., Borisov, V. B., Oleynikov, I. P., Sudakov, R. V., and Vygodina, T. V. (2023) Interaction of terminal oxidases with amphipathic molecules, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 6428, doi: 10.3390/ijms24076428.
14. Zharova, T. V., Grivennikova, V. G., and Borisov, V. B. (2023) F1-Fo ATP Synthase/ATPase: contemporary view on unidirectional catalysis, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 5417, doi: 10.3390/ijms24065417.
15. Arutyunyan, A. M., Sakamoto, J., Inadome, M., Kabashima, Y., and Borisov, V. B. (2012) Optical and magneto-optical activity of cytochrome *bd* from *Geobacillus thermodenitrificans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 2087–2094, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.06.009.
16. Borisov, V. B., and Siletsky, S. A. (2019) Features of organization and mechanism of catalysis of two families of terminal oxidases: heme-copper and *bd*-type,

- Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1390-1402, doi: 10.1134/S0006297919110130.
17. Murali, R., Gennis, R. B., and Hemp, J. (2021) Evolution of the cytochrome *bd* oxygen reductase superfamily and the function of CydAA' in Archaea, *ISME J.*, **15**, 3534-3548, doi: 10.1038/s41396-021-01019-4.
 18. Siletsky, S. A., and Borisov, V. B. (2021) Proton pumping and non-pumping terminal respiratory oxidases: Active sites intermediates of these molecular machines and their derivatives, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10852, doi: 10.3390/ijms221910852.
 19. Forte, E., Borisov, V. B., Vicente, J. B., and Giuffre, A. (2017) Cytochrome *bd* and gaseous ligands in bacterial physiology, *Adv. Microb. Physiol.*, **71**, 171-234, doi: 10.1016/bs.ampbs.2017.05.002.
 20. Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J., and Verkhovskiy, M. I. (2011) The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1398-1413, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.06.016.
 21. Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., Giuffre, A., and Poole, R. K. (2021) Bacterial oxidases of the cytochrome *bd* family: Redox enzymes of unique structure, function and utility as drug targets, *Antioxid. Redox Signal.*, **34**, 1280-1318, doi: 10.1089/ars.2020.8039.
 22. Friedrich, T., Wohlgend, D., and Borisov, V. B. (2022) Recent advances in structural studies of cytochrome *bd* and its potential application as a drug target, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3166, doi: 10.3390/ijms23063166.
 23. Borisov, V. B. (1996) Cytochrome *bd*: structure and properties, *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 565-574.
 24. Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2015) Oxygen as acceptor, *EcoSal Plus*, **6**, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2015.
 25. Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B., and Wikstrom, M. (1991) Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **30**, 3936-3942, doi: 10.1021/bi00230a019.
 26. Borisov, V. B., Murali, R., Verkhovskaya, M. L., Bloch, D. A., Han, H., Gennis, R. B., and Verkhovsky, M. I. (2011) Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17320-17324, doi: 10.1073/pnas.1108217108.
 27. Forte, E., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., Brunori, M., Giuffre, A., and Sarti, P. (2007) Cytochrome *bd*, a key oxidase in bacterial survival and tolerance to nitrosative stress, *Ital. J. Biochem.*, **56**, 265-269.
 28. Giuffre, A., Borisov, V. B., Mastronicola, D., Sarti, P., and Forte, E. (2012) Cytochrome *bd* oxidase and nitric oxide: From reaction mechanisms to bacterial physiology, *FEBS Lett.*, **586**, 622-629, doi: 10.1016/j.febslet.2011.07.035.
 29. Giuffre, A., Borisov, V. B., Arese, M., Sarti, P., and Forte, E. (2014) Cytochrome *bd* oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1178-1187, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.01.016.
 30. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Arese, M., Davletshin, A. I., Sarti, P., and Giuffre, A. (2015) Cytochrome *bd* protects bacteria against oxidative and nitrosative stress: a potential target for next-generation antimicrobial agents, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 565-575, doi: 10.1134/S0006297915050077.
 31. Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C., and Bardwell, J. C. A. (1999) Oxidative protein folding is driven by the electron transport system, *Cell*, **98**, 217-227, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81016-8.
 32. Mobius, K., Arias-Cartin, R., Breckau, D., Hannig, A. L., Riedmann, K., Biedendieck, R., Schroder, S., Becher, D., Magalon, A., Moser, J., Jahn, M., and Jahn, D. (2010) Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10436-10441, doi: 10.1073/pnas.1000956107.
 33. Seregina, T. A., Lobanov, K. V., Shakulov, R. S., and Mironov, A. S. (2022) Inactivation of terminal oxidase *bd*-I leads to supersensitivity of *E. coli* to quinolone and beta-lactam antibiotics, *Mol. Biol. (Mosk)*, **56**, 619-627, doi: 10.1134/S0026893322040100.
 34. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Sarti, P., and Giuffre, A. (2015) Cytochrome *bd* from *Escherichia coli* catalyzes peroxynitrite decomposition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 182-188, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.10.006.
 35. Borisov, V. B., Forte, E., Konstantinov, A. A., Poole, R. K., Sarti, P., and Giuffre, A. (2004) Interaction of the bacterial terminal oxidase cytochrome *bd* with nitric oxide, *FEBS Lett.*, **576**, 201-204, doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.013.
 36. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., and Giuffre, A. (2006) Nitric oxide reacts with the ferryl-oxo catalytic intermediate of the Cu_B-lacking cytochrome *bd* terminal oxidase, *FEBS Lett.*, **580**, 4823-4826, doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.072.
 37. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., and Giuffre, A. (2007) Redox control of fast ligand dissociation from *Escherichia coli* cytochrome *bd*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 97-102, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.118.
 38. Mason, M. G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P. S., Dodsworth, K. S., Poole, R. K., and Cooper, C. E. (2009) Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 94-96, doi: 10.1038/nchembio.135.
 39. Borisov, V. B., Forte, E., Giuffre, A., Konstantinov, A., and Sarti, P. (2009) Reaction of nitric oxide with the oxidized di-heme and heme-copper oxygen-reducing centers of terminal oxidases: different reaction pathways and end-products, *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 1185-1187, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.06.002.

40. Shepherd, M., Achard, M. E., Idris, A., Totsika, M., Phan, M. D., Peters, K. M., Sarkar, S., Ribeiro, C. A., Holyoake, L. V., Ladakis, D., Ulett, G. C., Sweet, M. J., Poole, R. K., McEwan, A. G., and Schembri, M. A. (2016) The cytochrome *bd*-I respiratory oxidase augments survival of multidrug-resistant *Escherichia coli* during infection, *Sci. Rep.*, **6**, 35285, doi: 10.1038/srep35285.
41. Borisov, V. B., and Forte, E. (2022) Bioenergetics and reactive nitrogen species in bacteria, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 7321, doi: 10.3390/ijms23137321.
42. Forte, E., Siletsky, S. A., and Borisov, V. B. (2021) In *Escherichia coli* ammonia inhibits cytochrome *bo*₃ but activates cytochrome *bd*-I, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 13, doi: 10.3390/antiox10010013.
43. Forte, E., Borisov, V. B., Falabella, M., Colaco, H. G., Tinajero-Trejo, M., Poole, R. K., Vicente, J. B., Sarti, P., and Giuffre, A. (2016) The terminal oxidase cytochrome *bd* promotes sulfide-resistant bacterial respiration and growth, *Sci. Rep.*, **6**, 23788, doi: 10.1038/srep23788.
44. Borisov, V. B., and Forte, E. (2021) Terminal oxidase cytochrome *bd* protects bacteria against hydrogen sulfide toxicity, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 22-32, doi: 10.1134/S000629792101003X.
45. Borisov, V. B., and Forte, E. (2021) Impact of hydrogen sulfide on mitochondrial and bacterial bioenergetics, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12688, doi: 10.3390/ijms222312688.
46. Borisov, V., Gennis, R., and Konstantinov, A. A. (1995) Peroxide complex of cytochrome *bd*: kinetics of generation and stability, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **37**, 975-982.
47. Borisov, V. B., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (1995) Interaction of cytochrome *bd* from *Escherichia coli* with hydrogen peroxide, *Biochemistry (Moscow)*, **60**, 231-239.
48. Lindqvist, A., Membrillo-Hernandez, J., Poole, R. K., and Cook, G. M. (2000) Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **78**, 23-31, doi: 10.1023/a:1002779201379.
49. Borisov, V. B., Davletshin, A. I., and Konstantinov, A. A. (2010) Peroxidase activity of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 428-436, doi: 10.1134/S000629791004005X.
50. Borisov, V. B., Forte, E., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffre, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: an additional defense against oxidative stress, *FEBS Lett.*, **587**, 2214-2218, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.047.
51. Forte, E., Borisov, V. B., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffre, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase and hydrogen peroxide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *MBio*, **4**, e01006-01013, doi: 10.1128/mBio.01006-13.
52. Al-Attar, S., Yu, Y., Pinkse, M., Hoeser, J., Friedrich, T., Bald, D., and de Vries, S. (2016) Cytochrome *bd* displays significant quinol peroxidase activity, *Sci. Rep.*, **6**, 27631, doi: 10.1038/srep27631.
53. Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Nastasi, M. R., and Forte, E. (2021) ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 839, doi: 10.3390/antiox10060839.
54. Forte, E., Nastasi, M. R., and Borisov, V. B. (2022) Preparations of terminal oxidase cytochrome *bd*-II isolated from *Escherichia coli* reveal significant hydrogen peroxide scavenging activity, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 720-730, doi: 10.1134/S0006297922080041.
55. Theßeling, A., Rasmussen, T., Burschel, S., Wohlwend, D., Kagi, J., Muller, R., Bottcher, B., and Friedrich, T. (2019) Homologous *bd* oxidases share the same architecture but differ in mechanism, *Nat. Commun.*, **10**, 5138, doi: 10.1038/s41467-019-13122-4.
56. Safarian, S., Hahn, A., Mills, D. J., Radloff, M., Eisinger, M. L., Nikolaev, A., Meier-Credo, J., Melin, F., Miyoshi, H., Gennis, R. B., Sakamoto, J., Langer, J. D., Hellwig, P., Kuhlbrandt, W., and Michel, H. (2019) Active site rearrangement and structural divergence in prokaryotic respiratory oxidases, *Science*, **366**, 100-104, doi: 10.1126/science.aay0967.
57. Grauel, A., Kagi, J., Rasmussen, T., Makarchuk, I., Oppermann, S., Moumbock, A. F. A., Wohlwend, D., Muller, R., Melin, F., Gunther, S., Hellwig, P., Bottcher, B., and Friedrich, T. (2021) Structure of *Escherichia coli* cytochrome *bd*-II type oxidase with bound aurachin D, *Nat. Commun.*, **12**, 6498, doi: 10.1038/s41467-021-26835-2.
58. Grund, T. N., Radloff, M., Wu, D., Goojani, H. G., Witte, L. F., Josting, W., Buschmann, S., Muller, H., Elamri, I., Welsch, S., Schwalbe, H., Michel, H., Bald, D., and Safarian, S. (2021) Mechanistic and structural diversity between cytochrome *bd* isoforms of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2114013118, doi: 10.1073/pnas.2114013118.
59. Yang, K., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., and Gennis, R. B. (2008) The fully oxidized form of the cytochrome *bd* quinol oxidase from *E. coli* does not participate in the catalytic cycle: direct evidence from rapid kinetics studies, *FEBS Lett.*, **582**, 3705-3709, doi: 10.1016/j.febslet.2008.09.038.
60. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., and Giuffre, A. (2011) Catalytic intermediates of cytochrome *bd* terminal oxidase at steady-state: Ferryl and oxy-ferrous species dominate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 503-509, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.02.007.
61. Borisov, V. B., Smirnova, I. A., Krasnosel'skaya, I. A., and Konstantinov, A. A. (1994) Oxygenated cytochrome *bd* from *Escherichia coli* can be converted into the oxidized form by lipophilic electron acceptors, *Biochemistry (Moscow)*, **59**, 437-443.
62. D'mello, R., Hill, S., and Poole, R. K. (1996) The cytochrome *bd* quinol oxidase in *Escherichia coli* has

- an extremely high oxygen affinity and two-oxygen-binding haems: implications for regulation of activity *in vivo* by oxygen inhibition, *Microbiology*, **142**, 755-763, doi: 10.1099/00221287-142-4-755.
63. Belevich, I., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., and Verkhovsky, M. I. (2005) Oxygenated complex of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*: stability and photolability, *FEBS Lett.*, **579**, 4567-4570, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.011.
 64. Belevich, I., Borisov, V. B., Bloch, D. A., Konstantinov, A. A., and Verkhovsky, M. I. (2007) Cytochrome *bd* from *Azotobacter vinelandii*: evidence for high-affinity oxygen binding, *Biochemistry*, **46**, 11177-11184, doi: 10.1021/bi700862u.
 65. Siletsky, S. A., Zaspas, A. A., Poole, R. K., and Borisov, V. B. (2014) Microsecond time-resolved absorption spectroscopy used to study CO compounds of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *PLoS One*, **9**, e95617, doi: 10.1371/journal.pone.0095617.
 66. Siletsky, S. A., Rappaport, F., Poole, R. K., and Borisov, V. B. (2016) Evidence for fast electron transfer between the high-spin haems in cytochrome *bd*-I from *Escherichia coli*, *PLoS One*, **11**, e0155186, doi: 10.1371/journal.pone.0155186.
 67. Hill, J. J., Alben, J. O., and Gennis, R. B. (1993) Spectroscopic evidence for a heme-heme binuclear center in the cytochrome *bd* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5863-5867, doi: 10.1073/pnas.90.12.5863.
 68. Muntyan, M. S., Bloch, D. A., Drachev, L. A., and Skulachev, V. P. (1993) Kinetics of CO binding to putative Na⁺-motive oxidases of the *o*-type from *Bacillus FTU* and of the *d*-type from *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **327**, 347-350, doi: 10.1016/0014-5793(93)81018-u.
 69. Tsubaki, M., Hori, H., Mogi, T., and Anraku, Y. (1995) Cyanide-binding site of *bd*-type ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 28565-28569, doi: 10.1074/jbc.270.48.28565.
 70. Borisov, V., Arutyunyan, A. M., Osborne, J. P., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (1999) Magnetic circular dichroism used to examine the interaction of *Escherichia coli* cytochrome *bd* with ligands, *Biochemistry*, **38**, 740-750, doi: 10.1021/bi981908t.
 71. Vos, M. H., Borisov, V. B., Liebl, U., Martin, J. L., and Konstantinov, A. A. (2000) Femtosecond resolution of ligand-heme interactions in the high-affinity quinol oxidase *bd*: A di-heme active site? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1554-1559, doi: 10.1073/pnas.030528197.
 72. Borisov, V. B., Sedelnikova, S. E., Poole, R. K., and Konstantinov, A. A. (2001) Interaction of cytochrome *bd* with carbon monoxide at low and room temperatures: evidence that only a small fraction of heme *b*₅₉₅ reacts with CO, *J. Biol. Chem.*, **276**, 22095-22099, doi: 10.1074/jbc.M011542200.
 73. Borisov, V. B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J. L., Zhang, J., Gennis, R. B., Konstantinov, A. A., and Vos, M. H. (2002) Interactions between heme *d* and heme *b*₅₉₅ in quinol oxidase *bd* from *Escherichia coli*: a photoselection study using femtosecond spectroscopy, *Biochemistry*, **41**, 1654-1662, doi: 10.1021/bi0158019.
 74. Arutyunyan, A. M., Borisov, V. B., Novoderezhkin, V. I., Ghaim, J., Zhang, J., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2008) Strong excitonic interactions in the oxygen-reducing site of *bd*-type oxidase: the Fe-to-Fe distance between hemes *d* and *b*₅₉₅ is 10 Å, *Biochemistry*, **47**, 1752-1759, doi: 10.1021/bi701884g.
 75. Borisov, V. B. (2008) Interaction of *bd*-type quinol oxidase from *Escherichia coli* and carbon monoxide: heme *d* binds CO with high affinity, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 14-22, doi: 10.1134/S0006297908010021.
 76. Bloch, D. A., Borisov, V. B., Mogi, T., and Verkhovsky, M. I. (2009) Heme/heme redox interaction and resolution of individual optical absorption spectra of the hemes in cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1246-1253, doi: 10.1016/j.bbabbio.2009.05.003.
 77. Rappaport, F., Zhang, J., Vos, M. H., Gennis, R. B., and Borisov, V. B. (2010) Heme-heme and heme-ligand interactions in the di-heme oxygen-reducing site of cytochrome *bd* from *Escherichia coli* revealed by nanosecond absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1657-1664, doi: 10.1016/j.bbabbio.2010.05.010.
 78. Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2013) Accommodation of CO in the di-heme active site of cytochrome *bd* terminal oxidase from *Escherichia coli*, *J. Inorg. Biochem.*, **118**, 65-67, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.09.016.
 79. Siletsky, S. A., Dyuba, A. V., Elkina, D. A., Monakhova, M. V., and Borisov, V. B. (2017) Spectral-kinetic analysis of recombination reaction of heme centers of *bd*-type quinol oxidase from *Escherichia coli* with carbon monoxide, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1354-1366, doi: 10.1134/S000629791711013X.
 80. Jasaitis, A., Borisov, V. B., Belevich, N. P., Morgan, J. E., Konstantinov, A. A., and Verkhovsky, M. I. (2000) Electrogenic reactions of cytochrome *bd*, *Biochemistry*, **39**, 13800-13809, doi: 10.1021/bi001165n.
 81. Belevich, I., Borisov, V. B., Zhang, J., Yang, K., Konstantinov, A. A., Gennis, R. B., and Verkhovsky, M. I. (2005) Time-resolved electrometric and optical studies on cytochrome *bd* suggest a mechanism of electron-proton coupling in the di-heme active site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3657-3662, doi: 10.1073/pnas.0405683102.
 82. Belevich, I., Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2007) Discovery of the true peroxy intermediate in the catalytic cycle of terminal oxidases by real-time measurement, *J. Biol. Chem.*, **282**, 28514-28519, doi: 10.1074/jbc.M705562200.
 83. Borisov, V. B., Belevich, I., Bloch, D. A., Mogi, T., and Verkhovsky, M. I. (2008) Glutamate 107 in

- subunit I of cytochrome *bd* from *Escherichia coli* is part of a transmembrane intraprotein pathway conducting protons from the cytoplasm to the heme *b₅₉₅*/heme *d* active site, *Biochemistry*, **47**, 7907-7914, doi: 10.1021/bi800435a.
84. Paulus, A., Rossius, S. G., Dijk, M., and de Vries, S. (2012) Oxoferryl-porphyrin radical catalytic intermediate in cytochrome *bd* oxidases protects cells from formation of reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.*, **287**, 8830-8838, doi: 10.1074/jbc.M111.333542.
 85. Bekker, M., de Vries, S., Ter Beek, A., Hellingwerf, K. J., and de Mattos, M. J. (2009) Respiration of *Escherichia coli* can be fully uncoupled via the nonelectrogenic terminal cytochrome *bd*-II oxidase, *J. Bacteriol.*, **191**, 5510-5517, doi: 10.1128/JB.00562-09.
 86. Shepherd, M., Sanguinetti, G., Cook, G. M., and Poole, R. K. (2010) Compensations for diminished terminal oxidase activity in *Escherichia coli*: cytochrome *bd*-II-mediated respiration and glutamate metabolism, *J. Biol. Chem.*, **285**, 18464-18472, doi: 10.1074/jbc.M110.118448.

MEMBRANE POTENTIAL GENERATION BY CYTOCHROME *bd*

Review

V. B. Borisov

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: bor@belozersky.msu.ru*

This treatise gives an overview of current thinking on the mechanism of generation of a transmembrane electric potential difference ($\Delta\psi$) during the catalytic cycle of a *bd*-type triheme terminal quinol oxidase. It is assumed that the main contribution to the $\Delta\psi$ formation is made by the movement of H^+ across the membrane along the intraprotein hydrophilic proton-conducting pathway from the cytoplasm to the active site for oxygen reduction of this bacterial enzyme.

Keywords: respiratory chain, terminal oxidase, cytochrome *bd*, heme, protonmotive force, membrane potential

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЕМ-МЕДНЫМИ ДЫХАТЕЛЬНЫМИ ОКСИДАЗАМИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Обзор

© 2023 С.А. Силецкий

*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: siletsky@belozersky.msu.ru*

Поступила в редакцию 29.06.2023

После доработки 15.08.2023

Принята к публикации 15.08.2023

Гем-медные дыхательные оксидазы являются высокоэффективными молекулярными машинами. Эти мембранные ферменты катализируют конечный этап клеточного дыхания эукариот и многих прокариот: перенос электронов от цитохромов или хинолов к молекулярному кислороду и восстановление O_2 до воды. Высвобождаемая в этой окислительно-восстановительной реакции свободная энергия преобразуется гем-медными дыхательными оксидазами в трансмембранный градиент электрохимического потенциала ионов водорода ($\Delta\mu H^+$). Гем-медные дыхательные оксидазы обладают уникальным механизмом генерации $\Delta\mu H^+$ — редокс-сопряженной протонной помпой. Использование в исследовании гем-медных оксидаз комбинации прямого электрометрического метода измерения кинетики генерации мембранного потенциала с подходами и методами стационарной кинетики и направленного мутагенеза позволяет получать уникальную информацию о перемещении протонов внутри белка в режиме реального времени. В обзоре суммированы результаты применения разрешенной во времени электрометрии к расшифровке механизмов работы этих важнейших биоэнергетических ферментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биоэнергетика, цитохромоксидаза, протеолипосомы, электрогенный, перенос протонов, генерация $\Delta\psi$, протонный насос, фотовосстановление, цитохром *aaz*, кинетика, прямой электрометрический метод, емкостная потенциометрия, временное разрешение, ионы цинка.

DOI: 10.31857/S0320972523100081, EDN: OTDXSA

ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМ-МЕДНЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ОКСИДАЗ

Терминальные дыхательные оксидазы представляют собой ключевой компонент дыхательной цепи митохондрий и большинства аэробных бактерий [1, 2]. Будучи распространены повсеместно, эти ферменты располагаются в конце дыхательной цепи и катализируют восстановление молекулярного кислорода цитохромом *c* или убихинолом, сопряженно с образованием протон-движущей силы — трансмембранного градиента электрохимического

потенциала ионов водорода ($\Delta\mu H^+$) [3–7]. Образующийся $\Delta\mu H^+$ используется в клетках в дальнейшем в качестве источника энергии для энергопотребляющих процессов: биохимического синтеза, мембранного транспорта, механического движения бактериальных клеток и т.д.

Терминальные дыхательные оксидазы принято делить на две основные подгруппы: надсемейство гем-медных оксидаз и надсемейство цитохромов *bd* [7]. Характерной чертой гем-медных оксидаз является кислород-восстанавливающий каталитический центр, который образован близко расположенными

Принятые сокращения: ЦО — цитохромоксидаза; BNC — биядерный центр; F, O, O_n , P, E, E_n , R — состояния цитохром *c* оксидазы; *P*- и *N*-стороны мембраны — положительно и отрицательно заряженные водные фазы, разделенные сопрягающей мембраной; PLS — сайт загрузки протонов; Rubru — трис-бипиридинный комплекс рутения; $\Delta\psi$ — трансмембранная разность электрических потенциалов; $\Delta\mu H^+$ — трансмембранный градиент электрохимического потенциала ионов водорода.

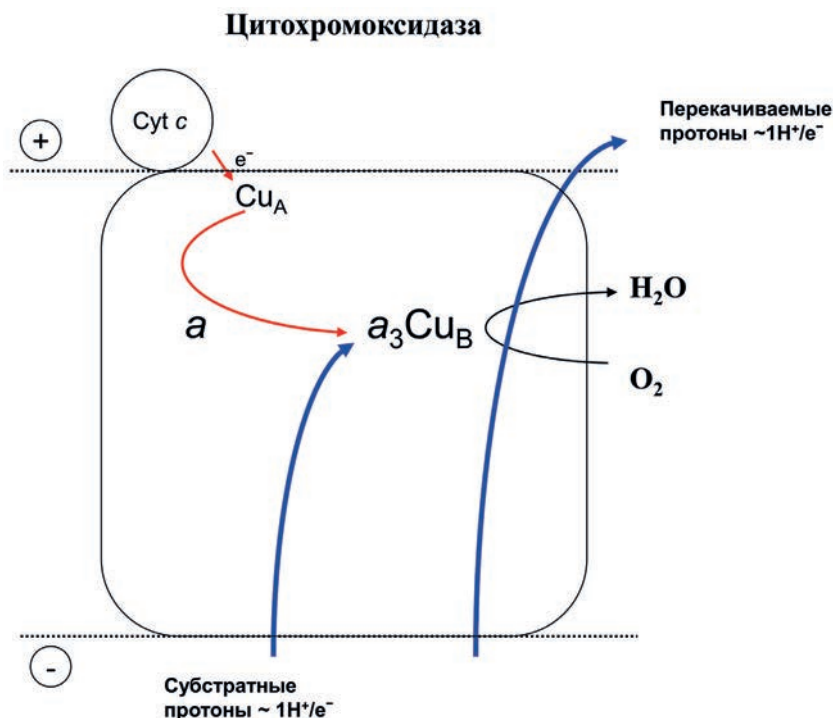


Рис. 1. Общая схема функционирования цитохромоксидазы. Отрицательно и положительно заряженные стороны мембраны обращены в матрикс митохондрий и в межмембранное пространство соответственно. В случае прокариотического фермента соответствующие стороны мембраны обращены в цитоплазму и в периплазматическое пространство. Красными и синими стрелками обозначены перенос электронов и протонов соответственно

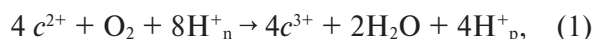
ионом железа гемовой группы и ионом меди (так называемый биядерный или бинуклеарный центр, BNC). Цитохромоксидаза (ЦО) из митохондрий содержит четыре редокс-центра (рис. 1). Каталитический центр в гидрофобном ядре ЦО состоит из двух редокс-центров: высокоспинового железа гема a_3 и иона меди Cu_B . Через 2 других редокс-центра (Cu_A и низкоспиновый гем a) в BNC последовательно поступают 4 электрона от четырех молекул цитохрома c , что приводит в итоге к восстановлению одной молекулы кислорода до двух молекул воды. В бактериальных ЦО низкоспиновый гем a может заменяться гемом b -типа, а вместо высокоспинового гема a_3 могут быть гемы o_3 - или b_3 -типа. Некоторые бактериальные оксидазы могут иметь дополнительные гемовые центры c -типа.

В надсемействе гем-медных оксидаз принято выделять 3 большие группы: семейства А, В и С [8]. Помимо них, сравнительный анализ геномов и структурное моделирование позволили идентифицировать гены 5 новых (D, E, F, G и H) семейств терминальных оксидаз, встречающихся в археобактериях [5]. К семейству А относится наиболее представительная и наиболее изучаемая группа ферментов, включающая такие модельные объекты, как цитохромоксидазы из митохондрий сердеч-

ной мышцы быка и дрожжей, оксидазы aa_3 из *Paracoccus denitrificans* и *Rhodobacter sphaeroides*, оксидаза caa_3 из *Thermus thermophilus*, а также хинол-оксидаза bo -типа из *Escherichia coli* [9–17]. Типичным представителем значительно менее изученного семейства В является цитохромоксидаза ba_3 из *T. thermophilus*, имеющая низкую гомологию аминокислотной последовательности с представителями семейства А [18, 19]. Наиболее удаленное, с эволюционной точки зрения, семейство С составляют представители оксидаз cbb_3 из различных организмов [20, 21].

Цитохромоксидаза генерирует протон-движущую силу вследствие векторной (т.е. направленной поперек мембраны) организации доставки электронов и протонов, необходимых для протекания каталитической реакции восстановления кислорода до воды, в BNC. При этом так называемые «химические» (или субстратные) протоны переносятся в BNC из внутренней водной фазы (с отрицательно заряженной N -стороны мембраны), в то время как электроны переносятся туда же от цитохрома c с внешней (положительной) стороны мембраны (P -сторона) (рис. 1; [22]). Кроме этого, ЦО дополнительно переносит с N -сторон на P -сторону мембраны в среднем 4 протона («помпируемые» или перекачиваемые

мые протоны) на каждую восстановленную молекулу кислорода, т.е. является протонной помпой [23, 24]. Таким образом, катализируемая ЦО химическая реакция сопряжена с разделением зарядов, соответствующим направленному трансмембранному переносу 8 зарядов на каждую восстановленную молекулу кислорода. Полная реакция, катализируемая цитохромоксидазой, может быть описана уравнением (1):



где п — внутримитохондриальное пространство; р — межмембранное пространство.

Генерация мембранного потенциала встроенной в протеолипосомы ЦО митохондрий в стационарном режиме (т.е. в режиме многократных оборотов фермента) была продемонстрирована в лаборатории Л.А. Драчева на заре развития прямого электрометрического метода [25]. Однако эти эксперименты не могли раскрыть электрогенный механизм генерации мембранного потенциала и формирования $\Delta\mu H^+$ в ходе каталитического цикла фермента. Развитие прямого электрометрического метода с адекватным временным разрешением для изучения событий внутри каталитического цикла фотоактивных белков [26] было позднее успешно применено к изучению механизмов работы гем-медных оксидаз. Поскольку гем-медные оксидазы не относятся к фотоактивируемым белкам, для изучения их электрогенных механизмов с высоким временным разрешением были разработаны и использованы методические подходы (см. далее), основанные на комбинации прямого электрометрического метода и специальных фотоактивируемых химических реакций для запуска реакции переноса электронов и протонов в ЦО с помощью наносекундных импульсов лазерного света. Это позволяет получать уникальную информацию об устройстве и работе редокс-зависимого протонного насоса ЦО, механизме сопряжения, об этапах перемещения протонов внутри белка в режиме реального времени (предстационарном режиме) [27–31].

ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

С помощью рентгеноструктурного анализа установлена трехмерная кристаллическая структура нескольких типичных представителей семейства А гем-медных терминальных оксидаз. Это ЦО из митохондрий

сердечной мышцы быка [32–35], бактериальные ЦО *aa*₃-типа из *P. denitrificans* [36–38] и *R. sphaeroides* [39, 40], хинол-оксидаза *bo*₃ из *E. coli* [41] и ЦО *caa*₃ из *T. thermophiles* [42]. Кроме того, атомная структура была получена для представителей семейств В и С, цитохрома *ba*₃ из *T. thermophilus* [19, 43] и *cbb*₃ из *Pseudomonas shutzeri* [21] соответственно.

Для гем-медных оксидаз характерно наличие центральной самой крупной субъединицы I, построенной из 12 пересекающих мембрану α -спиральных столбов. В то время как бактериальные ЦО содержат не более 4-х субъединиц, цитохромоксидаза из митохондрий млекопитающих состоит из 13 субъединиц и имеет примерно вдвое большую молекулярную массу (~200 кДа). Три наибольшие субъединицы ЦО митохондрий кодируются митохондриальным геномом, образуют каталитическое ядро фермента и гомологичны трем основным субъединицам, встречающимся в большинстве типичных прокариотических ЦО *aa*₃-типа семейства А надсемейства гем-медных терминальных оксидаз.

В структурах всех ЦО семейства А выявлены 2 потенциальных протон-проводящих пути из внутренней водной фазы в направлении к BNC, включающие в себя консервативные протон-обменивающие аминокислотные остатки и молекулы связанной воды [19, 32, 36, 39, 42]. Протон-проводящий путь D (D-канал [30–32]) ведет от остатка D132 через цепочку связанных водородными связями молекул воды и аминокислотных остатков к консервативному аминокислотному остатку E286, располагающемуся на расстоянии 10–12 Å от BNC и 24–26 Å — от остатка D132 [24–26]. Молекулы воды в канале стабилизированы посредством водородных связей с рядом высококонсервативных гидрофильных аминокислотных остатков: N139, N121, N207, S142, S200, S201 и S197 [33]. Протон-проводящий путь K (K-канал [44–46]) расположен непосредственно под BNC и ведет от поверхности белка с N-стороны мембраны через остатки T352, T359, K362 и связанную воду к остатку Y288 вблизи BNC. В формировании входа в K-канал участвует остаток E101 второй субъединицы I [38, 47]. Цепочка водородных связей прерывается на пути между остатками K362 и T359. Предполагается, что изменение конформации остатка K362 замыкает цепочки водородных связей, обеспечивая контролируемое проведение протона [38, 48].

Над гемовыми группами и $Si_{\text{в}}$ располагается гидрофильный домен, через который теоретически может происходить выход

перекачиваемого протона в водную фазу с внешней стороны мембраны [49]. Этот домен включает в себя кластер отрицательно заряженных групп белка (в том числе консервативные остатки D399 и D404), несколько остатков аргинина, пропионатные заместители гемов, молекулы воды и связанный редокс-неактивный атом металла (ион Mg^{2+} — в ЦО митохондрий, частично замещаемый ионом Mn^{2+} — в ЦО прокариот) [38]. Путь переноса молекулярного кислорода в BNC организован посредством нескольких гидрофобных каналов в срединной части мембранного бислоя по направлению к активному центру [32, 39, 50, 51]. Выход на *P*-сторону мембраны молекул воды, образующихся в биядерном каталитическом центре, происходит, по-видимому, над гемовыми группами в области контакта субъединиц I и II, вблизи Mg^{2+}/Mn^{2+} сайта [52].

ИНТЕРМЕДИАТЫ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ЦИКЛА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Каталитический цикл ЦО семейства А может быть описан двумя фазами реакции: окислительной и восстановительной полуреакциями (рис. 2), каждая из которых включает в себя по 2 одноэлектронных перехода [53]. В ходе восстановительной фазы (переходы $O \rightarrow E$ и $E \rightarrow R$) первые 2 электрона переносятся в BNC, в результате чего он приобретает способность связывать молекулярный кислород. Окислительная фаза начинается с взаимодействия восстановленного BNC (состояние R; рис. 2) с молекулой кислорода с образованием первичного двухатомного кислородного аддукта (состояние A; не показано на рис. 2) [54]. Молекула кислорода переносится через Si_B к центральному атому железа высокоспинового гема a_3 с образованием оксикомплекса [55], представляющего собой смесь состояний: $Fe^{2+}-O_2$ и $Fe^{3+}-O_2^-$ [56]. На следующей стадии происходит разрыв межатомной $O-O$ связи и образование состояния P_M (рис. 2). Образование P_M требует переноса на O_2 четырех электронов из активного центра и по крайней мере одного протона [57, 58]. Два электрона поступают при окислении иона Fe^{2+} гема a_3 до оксоферрильного состояния $Fe^{4+}=O^{2-}$. Один электрон поступает от Si_B^{2+} , окисляющейся до Si_B^{2+} . Четвертый электрон и протон поступают от близко расположенного консервативного остатка Y288 [59], образующего ковалентную связь с гистидиновым лигандом Si_B [33, 60, 61]. Отдавая электрон и протон, остаток тирозина образует радикальную форму [62].

После образования интермедиата P_M , одноэлектронное восстановление P_M переводит ЦО в состояние F (перенос третьего электрона в каталитическом цикле на тирозин Y288). Окисление четвертой молекулы цитохрома c и перенос четвертого электрона в BNC завершает каталитический цикл с образованием полностью окисленного состояния O_H (рис. 2). При отсутствии доноров электронов окисленное «неотрелаксированное» состояние O_H в течение нескольких секунд спонтанно превращается в окисленное стабильное состояние (O). Состояния O и O_H отличаются между собой сродством к электрону соответствующих редокс-центров фермента, а также способностью к трансмембранной перекачке протонов [11, 29, 63–66]. Путем специфической обработки перекисью водорода или окисью углерода практически вся популяция фермента может быть переведена в стационарное состояние P_M или F, которые соответствуют в каталитическом цикле ЦО частичному восстановлению молекулярного кислорода в BNC двумя или тремя электронами.

ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ПЕРЕНОСА ЗАРЯДОВ В ЦИТОХРОМОКСИДАЗЕ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

В ходе измерений прямым электрометрическим методом протеолипосомы с изучаемым белком прикрепляют к искусственной макроscopicкой мембране (коллодиевая пленка, пропитанная раствором фосфолипидов в декане) и регистрируют кинетику генерации трансмембранного потенциала с помощью хлор-серебряных макроscopicких электродов с субмикросекундным временным разрешением. Трансмембранная разность электрических потенциалов ($\Delta\Psi$) на измеряемой макроscopicкой мембране нарастает пропорционально генерации разности электрических потенциалов на мембране протеолипосом, что позволяет отслеживать кинетику электрогенной транслокации зарядов в изучаемом белке с адекватным временным разрешением в предстационарном режиме [26, 67, 68].

Каталитический цикл ЦО происходит в миллисекундном временном диапазоне и включает в себя последовательность промежуточных состояний кислород-редуктазного биядерного центра и наборов отдельных стадий переноса электронов и протонов внутри переходов между промежуточными состояниями BNC. Все эти реакции происходят быстрее временного разрешения методов быстрого

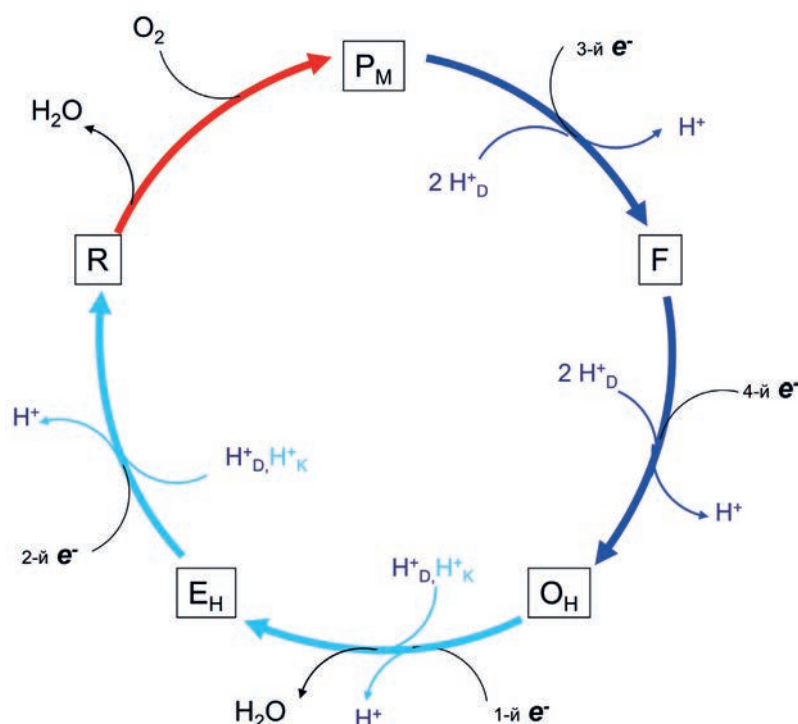


Рис. 2. Схема каталитического цикла цитохромоксидазы семейства А. Переходы от состояния R к O_H образуют окислительную фазу, в то время как переходы от O_H к R — восстановительную фазу каталитического цикла. В переходе $R \rightarrow P_M$ (красная стрелка) происходит связывание молекулы O_2 с гемом a_3 BNC в полностью восстановленном состоянии $Fe^{2+} Cu_B^{1+}$, разрыв межатомной $O-O$ связи и образование оксоферрильного комплекса гема $a_3 Fe^{4+}=O^{2-}$ и $Cu_B^{1+}-OH^-$. В переходах $P_M \rightarrow F$, $F \rightarrow O_H$, $O_H \rightarrow E_H$, $E_H \rightarrow R$ (синие и сине-зеленые стрелки) происходит последовательный перенос 4-х электронов в BNC ЦО и перекачивание протонов

смешивания. При исследовании каталитического цикла ЦО с временным разрешением для синхронизации всего ансамбля молекул фермента (одновременного запуска реакции переноса электронов внутри всей популяции фермента) используются реакции окисления либо восстановления ЦО, индуцированные с помощью наносекундной лазерной вспышки. В первом варианте (так называемый метод «флоу-флэш») изучается кинетика окисления молекулярным кислородом полностью восстановленного фермента (состояние R) в режиме одного оборота фермента. Чтобы время смешивания с кислородом не было лимитирующей стадией реакции, процесс взаимодействия с кислородом запускается фотолизом предварительно образованного комплекса CO с восстановленным биядерным центром ЦО [69]. Во втором случае — в фермент, переведенный исходно в одно из состояний восстановленности кислорода в BNC (O, P или F), производится «инъекция» электрона с помощью фотоактивируемых комплексов Rubpr (трис-бипиридилный комплекс рутения) [70].

Несмотря на то что второй подход был разработан позднее первого, в комбинации с прямым электрометрическим методом он был

использован раньше. Нужно отметить важное преимущество «инъекций» электрона в ЦО, которое заключается в возможности разделить наборы элементарных стадий переноса зарядов, сопряженные с отдельными одно-электронными переходами в каталитическом цикле. Кроме этого, методически окисление фермента молекулой кислорода в первом подходе происходит из ненаблюдаемого в обычных условиях полностью восстановленного состояния R (в котором в ферменте восстановлены, помимо BNC, еще и входные редокс-центры). В этом обзоре более детально освещены результаты, полученные при использовании «инъекций» электрона с помощью фотоактивируемых комплексов Rubpr. Подробное описание результатов, полученных при использовании метода «флоу-флэш», можно найти в блестящих обзорах [71, 72].

КИНЕТИКА ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ЦО

Впервые стадии транслокации зарядов в переходе $F \rightarrow O$ цитохромоксидазы митохон-

дрий сердечной мышцы быка были зарегистрированы совместными усилиями сотрудников лабораторий А.Д. Каулена и А.А. Константинова [73, 74]. Перенос электрона в ЦО запускался с помощью индуцированной лазерной вспышкой одноэлектронной «инъекции» от комплекса RubpV. Позднее применение данного технического подхода было распространено на ЦО, зафиксированную в состоянии P_M (третий электрон в каталитическом цикле; рис. 2), а также полностью окисленное состояние O [63, 75, 76]. Через несколько лет после получения разрешенной во времени кинетики генерации мембранного потенциала ЦО в НИИФХБ имени Белозерского в Хельсинкской Биоэнергетической группе (Verkhovsky et al. [77]) был разработан подход, в котором использована комбинация разрешенной во времени электрометрической техники и метода «флюо-флэш».

При «инъекции» электрона в состояние F (переход $F \rightarrow O_N$) цитохромоксидазы семейства A были разрешены 3 основных компоненты генерации мембранного потенциала [73, 74]. «Быстрая» микросекундная фаза (~40 мкс) отражала перенос электрона от Cu_A к гему a. Две другие компоненты («средняя» (~1 мс) и «медленная» (~4 мс)) отражают стадии векторного переноса протонов в ферменте, вызванные переносом электрона от гема a в BNC. Сам по себе перенос электрона между гемом a и биядерным центром происходит вдоль мембраны, т.е. неэлектрогенно [22]. «Инъекция» электрона от RubpV в состояние P митохондриальной ЦО (переход $P \rightarrow F$) сопровождается сходным по амплитуде, но несколько более быстрым набором протонных компонент генерации $\Delta\Psi$ [63], в то время как фотовосстановление окисленной ЦО («инъекция» в состоянии O) ограничивается восстановлением гема a от Cu_A [63, 70, 76].

Суммарная амплитуда миллисекундных электрогенных компонент в кинетиках генерации потенциала для стадий $P \rightarrow F$ и $F \rightarrow O$ имела близкое значение (~80%), что привело к первоначальной оценке суммарного перекачивания через мембрану ~3-х протонов (или по ~1,5 «перекачиваемых» протона на каждой из одноэлектронных стадий окислительной фазы каталитического цикла [63, 73]). Данная оценка амплитуд в предстационарных измерениях была получена, используя эффект мембранного потенциала на стационарное редокс-равновесие между цитохромом c и гемом a [78]. Из него следовало, что перенос электрона от Cu_A к гему a (20% фотоэлектрического ответа; «быстрая» компонента) может быть эквива-

лентен транслокации элементарного заряда на $\frac{1}{2}$ величины диэлектрического барьера мембраны. Отсюда, суммарная амплитуда миллисекундных протонных фаз (80%) эквивалентна трансмембранной транслокации двух полных зарядов, что соответствовало бы переносу из внутренней водной фазы в BNC одного протона на половину толщины мембраны для протонирования восстановленного кислородного атома («субстратный» протон) и сопряженной транслокации двух «перекачиваемых» протонов: одного — через всю мембрану и еще одного — на половину ее толщины [63, 73]. Эта оценка согласовывалась со сделанными ранее выводами, полученными при изучении стационарного квазиравновесного обращения цитохромоксидазной реакции в сопряженных митохондриях. Предполагалось, что в окислительной фазе каталитического цикла ЦО может происходить перенос через мембрану всех четырех перекачиваемых протонов [79]. Было принято считать, что восстановительная часть фотоцикла не обладает достаточным запасом свободной энергии и не сопряжена с перекачиванием протонов, что следовало также из относительно низких значений редокс-потенциалов BNC в стационарных условиях (в состоянии O) [80].

КИНЕТИКА ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦО СЕМЕЙСТВА A

Применение прямой электрометрии к изучению механизма работы ЦО получило дальнейшее развитие благодаря возможности направленного мутагенеза бактериальных ЦО семейства A, гомологичных ЦО митохондрий. Основными объектами большинства исследований являются 2 бактериальные ЦО aa_3 -типа: ЦО из *R. sphaeroides* [15, 28, 30, 31, 45, 81, 82] и из *P. denitrificans* [76, 83–86].

Исследование перехода $F \rightarrow O$ в мутантной ЦО aa_3 -типа из *R. sphaeroides* с несопряженным фенотипом (с заменой N139D [30, 87, 88]) привело к переоценке электрогенности одноэлектронных переходов в окислительной фазе ЦО. Оксидаза с мутацией N139D в D-канале полностью сохраняет кислород-редуктазную активность в стационарных измерениях, утратив способность к закислению внешнего пространства протеолипосом (т.е. к перекачке протонов через мембрану в стационарных измерениях). Генерация мембранного потенциала на стадии $F \rightarrow O$ в ответ на «инъекцию» электрона в этом мутанте отражает транслока-

цию через мембрану одного элементарного заряда, а именно: перенос электрона и протона с противоположных сторон мембраны к оксоферильному комплексу гема a_3 [30].

Соотношение амплитуд электрогенных составляющих переноса электрона с внешней стороны мембраны [30, 31] и субстратного протона из внутренней водной фазы в BNC ЦО с заменой N139D позволило оценить электрогенное расстояние гема a и биядерного центра от внешней водной фазы ($\sim 0,4$ толщины мембранного диэлектрика), что находится в близком соответствии со структурными данными [32, 36]. Соответственно, относительная амплитуда электрогенной фазы, отражающей перенос субстратного протона в мутанте N139D из внутренней водной фазы в BNC составило $\sim 0,6$ толщины мембранного диэлектрика. Суммарная амплитуда «средней» и «медленной» электрогенных фаз в переходах $P \rightarrow F$ и $F \rightarrow O$ ЦО дикого типа и ЦО митохондрий в ~ 4 раза больше амплитуды электрогенной фазы переноса электрона с внешней стороны мембраны к гему a [31, 63, 73], что эквивалентно переносу $\sim 1,6$ положительного заряда через всю толщину мембранного диэлектрика. То есть, помимо переноса одного субстратного протона из внутренней водной фазы в BNC ($\sim 0,6$ толщины мембранного диэлектрика), дополнительный электрогенный вклад в одноэлектронном переходе ЦО дикого типа, в сравнении с N139D, соответствует переносу через мембрану приблизительно одного протона. Иными словами, оба одноэлектронных перехода окислительной фазы каталитического цикла ЦО сопряжены с переносом одного субстратного протона в BNC и перекачиванием через мембрану не более одного протона. Близкие оценки были получены для переходов $P \rightarrow F$ и $F \rightarrow O$ в реакции полностью восстановленной ЦО с кислородом при измерении электрометрическим методом [89] и с помощью измерения кинетики протонирования pH-индикатора [90].

Независимо, Verkhovsky et al. [53] в Хельсинкской биоэнергетической группе были получены экспериментальные указания на то, что генерация суммарного мембранного потенциала восстановительной полуреакции каталитического цикла ЦО может включать в себя не только перенос протонов в BNC, но и трансмембранную перекачку протонов. Позднее в этой лаборатории была использована комбинация метода «флоу-флэш» для окисления полностью восстановленной ЦО молекулой O_2 в режиме одного оборота с последующей «инъекцией» электрона от Rubpr.

Таким образом, была исследована кинетика генерации мембранного потенциала, сопряженная с одноэлектронным восстановлением метастабильного окисленного состояния O_H цитохромоксидазы. С временным разрешением было показано [85, 86], что непосредственно после быстрого окисления полностью восстановленной ЦО образуется короткоживущее окисленное состояние O_H , в котором редокс-потенциал BNC значительно положительнее, чем в O . В отличие от O , «инъекция» электрона в ЦО в состоянии O_H сопровождается быстрым переносом электрона в BNC и сопряженными стадиями электрогенной транслокации протонов [65, 85, 86, 91, 92]. Характеристики электрогенных фаз в одноэлектронном переходе $O_H \rightarrow E_H$ [85, 86], в целом, напоминают таковые для переходов в окислительной фазе и согласуются с трансмембранной перекачкой одного протона. Перекачка протона в ходе перехода $O_H \rightarrow E_H$ была подтверждена и в случае естественного (а не искусственного, как Rubpr) донора электрона при исследовании гем-медной оксидазы семейства A (подсемейства A2) caa_3 из *T. thermophilus*, имеющей дополнительный редокс-центр (цитохром c) и соответственно, 5 электронов в полностью восстановленном состоянии [11]. При окислении молекулой кислорода полностью восстановленной оксидазы caa_3 из *T. thermophilus* в режиме одного оборота конечным переходом естественным образом является переход $O_H \rightarrow E_H$ [92]. Конечным акцептором электрона в переходе $O_H \rightarrow E_H$ ЦО caa_3 из *T. thermophiles*, как и в случае с искусственным донором электрона Rubpr, являлся $Сu_B$.

Переход $E_H \rightarrow R$, по-видимому, также сопряжен с перекачкой одного протона. Однако стадия переноса второго электрона в каталитическом цикле ЦО до сих пор остается наименее изученной, поскольку не удается получить гомогенную популяцию фермента в одноэлектронном состоянии (E_H). В первую очередь это связано с трудностью зафиксировать фермент в одноэлектронном состоянии E_H и с множественностью возможных состояний как одноэлектронного (E и E_H), так и окисленного фермента (O и O_H), отличающихся функциональными свойствами. Так, обработка состояния F окисью углерода в стационарных условиях переводит ЦО в состояние E , имеющее на 1 электронный эквивалент больше, чем окисленное состояние O . Электронная инъекция в это состояние от Rubpr приводила к фотоэлектрическому ответу, схожему по характеристикам с переходом $F \rightarrow O$ [84]. Однако распределение электрона между редокс-

центрами в полученном таким образом состоянии E существенно отличается от такового для состояния E_H , образующегося при «инъекции» электрона от Rubp в ЦО в состоянии O_H [65, 86, 92].

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ПРОТОН-ПРОВОДЯЩИХ ПУТЕЙ В КАТАЛИТИЧЕСКОМ ЦИКЛЕ ЦИТОХРОМОКСИДАЗ СЕМЕЙСТВА А

Изучение влияния мутаций протон-обменивающих групп на функциональные характеристики сопряженного переноса протонов ЦО свидетельствует о том, что электрогенная транслокация протонов цитохромоксидазами семейства А происходит через протон-проводящие структуры («каналы» D и K), содержащие критически важные консервативные протон-обменивающие остатки [30, 31, 45, 81]. Однако участие каналов в проведении протонов разных типов на отдельных стадиях каталитического цикла организовано нетривиально. Исходя из влияния мутаций по ряду аминокислотных остатков [93, 94], а также разрешенной трехмерной структуры ЦО [32, 36], предполагалось, что эти два канала специализированы и служат для проведения, соответственно, субстратных протонов (K-канал) и протонов, перекачиваемых через мембрану (D-канал).

Мутации, блокирующие как D-, так и K-канал, в том случае, если бы они отвечали за перенос протонов разных типов, должны были ингибировать переход $F \rightarrow O$. Однако если замены в D-канале приводят к подавлению миллисекундных компонент генерации потенциала и, соответственно, электрогенного переноса протонов на стадии $F \rightarrow O$, то блокирование K-канала не ингибировало электрогенный перенос протонов на этой стадии [30, 31, 45, 81]. При этом в условиях избытка субстратов дыхания, т.е. когда приток электронов не является лимитирующей стадией реакции, в мутантах по K-каналу затруднено восстановление биядерного центра (переход $O \rightarrow R$) вследствие блокирования захвата протонов из матрикса в BNC в восстановительной части каталитического цикла. Был сделан вывод, что D- и K-каналы отличаются не по типу проводимых протонов (субстратный или помпируемый), а по типу обслуживаемой полуреакции каталитического цикла [45, 81, 85].

Более поздние экспериментальные результаты свидетельствовали о том, что K-канал, по-видимому, не участвует в проведении перекачиваемых протонов вовсе, в то время

как D-канал обеспечивает перенос субстратных протонов в окислительной части цикла и всех перекачиваемых протонов в каталитическом цикле (как в окислительной фазе, так и в восстановительной). Действительно, если бы через K-канал происходил перенос перекачиваемых протонов, то мутация N139D в D-канале (сохраняющая кислород-редуктазную функцию, но полностью ингибирующая перекачивание протона через мембрану [30, 87]) не должна была бы влиять на перенос перекачиваемых протонов в восстановительной фазе каталитического цикла. В соответствии с этим не было выявлено мутаций по каналу K, специфически ингибирующих способность к перекачиванию протонов через мембрану. В настоящее время принято считать, что K-канал переносит один или оба (рис. 2) субстратных протона в восстановительной части цикла [12, 85, 95]. Было обнаружено, что присутствующая в структурах окисленной ЦО водородная связь гидроксильной группы фарнезильного заместителя гема a_3 с редокс-активным остатком тирозина (Y288) отсутствует в кристаллах восстановленной формы ЦО [40] и замещается молекулами воды. То есть может служить своего рода «защелкой» в верхней части K-канала.

Сигналом к выключению K-канала может служить образование оксоферрильного состояния гема a_3 при образовании интермедиата P в переходе $A \rightarrow P$. Образующееся оксеновое состояние атома кислорода (в качестве сильного аксиального лиганда гемового железа) может вызывать изменение конформации фермента, аналогично переходу $R \rightarrow T$ в гемоглобине [45]. Незначительное смещение зарядов внутри K-канала, перекрытого в верхней части, может происходить и на стадиях окислительной полуреакции каталитического цикла [31, 82]. Роль таких смещений зарядов внутри канала не ясна, но может приводить к уменьшению энергетического барьера для реакций переноса электрона внутрь гидрофобного белкового ядра ЦО.

В митохондриальной цитохромоксидазе в дополнение к D- и K-каналам рассматривается возможное участие третьего протонного пути — H-канала, роль которого в проведении протонов остается предметом дискуссий [34, 96]. Согласно мнению авторов рентгеноструктурного анализа ЦО млекопитающих [34, 35, 96], идентифицировавших этот гипотетический протон-проводящий путь, H-канал служит для проведения перекачиваемых протонов в ЦО с N-стороны мембраны через окрестность гема a к остатку D51, располагающемуся вблизи P-стороны мембраны. Функция этого

канала и регуляция проведения протонов по нему, включая физиологические аспекты этой регуляции, изучена мало [14]. Согласно одной из гипотез, Н-канал участвует в проведении перекачиваемого протона через всю мембрану [97]; согласно другой — используется только верхняя часть этого пути [98]. Наконец, согласно третьей гипотезе, Н-канал не выполняет функцию перекачивания протонов вообще, а является так называемым диэлектрическим «колодцем», роль которого может заключаться в модуляции редокс-потенциала близлежащего переносчика электронов гема *a* [99, 100].

Есть указания, что мутации в Н-канале могут ингибировать протон-транслоцирующую функцию в митохондриальной ЦО [34, 96]. Однако направленный мутагенез в ферменте высших эукариот сложен технически, что затрудняет интерпретацию получаемых результатов [101]. В то же время выходная часть протонного Н-канала, конформационные изменения в которой являются ключевым моментом альтернативного гипотетического механизма перекачивания протонов митохондриальной ЦО, не сохраняется в гомологичных бактериальных оксидазах [102, 103]. Более того, мутации по гомологичным остаткам канала Н не ингибируют бактериальные ЦО *aa₃*-типа [103, 104]. Исследования цитохром-оксидазы низших эукариот (дрожжей) не поддерживают концепцию о роли Н-канала в перекачивании протонов [16].

МЕХАНИЗМ ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЦО В ХОДЕ ОДНОЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕХОДА $F \rightarrow O$

Для идентификации электрогенных процессов, лежащих в основе «средней» и «медленной» фаз кинетики генерации мембранного потенциала ЦО в переходе $F \rightarrow O$, оказалось полезным исследованием эффектов влияния на них изотопного замещения и ионов цинка. Электрогенные фазы значительно отличаются между собой эффектом изотопного замещения, что позволило идентифицировать их аналоги при исследовании мутантных форм и соотнести их с переносом протонов разного типа [30]. «Средняя» фаза отсутствовала в несопряженном мутанте с заменой в D-канале (N139D), сохраняющем кислород-редуктазную активность без перекачивания протонов через мембрану. Это указывает на связь «средней» фазы с переносом перекачиваемого протона и на то, что перекачиваемый протон переме-

щается раньше субстратного. Соответственно, «медленная» фаза сохранялась в мутанте и была интерпретирована как перенос субстратного протона в BNC.

В присутствии ионов цинка (ингибитора протонного транспорта), добавленных снаружи к протеолипосомам с ЦО митохондрий или ЦО *aa₃* дикого типа из *R. sphaeroides* [15, 105], «медленная» электрогенная протонная фаза замедлялась. Такого же эффекта на «среднюю» электрогенную фазу не наблюдалось. Также отсутствовал эффект ионов цинка на протонную электрогенную фазу в несопряженном мутанте N139D. В совокупности это свидетельствует о том, что «медленная» электрогенная фаза в диком типе содержит в своем составе стадию высвобождения перекачиваемого протона на внешнюю сторону мембраны и что именно этот процесс, по всей вероятности, является скоростью-лимитирующей реакцией для всей «медленной» электрогенной фазы [15]. В отличие от входных протонных путей, траектории выхода протонов на внешнюю сторону мембраны в ЦО мало изучены. Есть указания на то, что путь выхода молекул воды организован в виде дискретной траектории через две каналоподобные структуры, которые могут принимать участие также в проведении перекачиваемого протона на внешнюю сторону мембраны [52, 106]. В ходе изучения влияния разных концентраций цинка на кинетику генерации мембранного потенциала встроенной в мембрану протеолипосомы цитохром-оксидазы *aa₃* из *R. sphaeroides* были получены экспериментальные результаты, указывающие на наличие не менее двух отдельных эффективных сайтов связывания ионов Zn^{2+} ЦО с *P*-стороны мембраны. Также они свидетельствовали о том, что выход перекачиваемого протона из сайта загрузки протонов (PLS) ЦО во внешнюю водную фазу может осуществляться по нескольким траекториям [15].

В случае анализа «средней» и «медленной» протонных фаз, согласно модели последовательных реакций, значения их относительных амплитуд имеют близкую величину [107, 108]. При нормировании к амплитуде «быстрой» электрогенной компоненты относительная амплитуда «средней» и «медленной» электрогенных фаз для перехода $F \rightarrow O$ в митохондриальном ферменте составляет ~1,9–2,1 от величины «быстрой» электрогенной фазы, т.е. соответствует переносу суммарно двух протонов через большую часть мембранного диэлектрика [108]. Как уже было сказано, D-канал обеспечивает перенос и перекачиваемого, и субстратного протонов в переходах

окислительной фазы каталитического цикла ЦО [45, 81]. Поэтому «средняя» и «медленная» протонные электрогенные фазы могут быть интерпретированы как 2 последовательных идентичных процесса репротонирования некоторого ключевого остатка в D-канале, располагающегося в окрестности биядерного центра, с минорным вкладом других сопряженных внутрибелковых перемещений заряда [107, 109, 110].

В качестве промежуточного донора протона, обеспечивающего проведение перекачиваемого и субстратного протонов, служит консервативный остаток E286, располагающийся в верхней части D-канала (рис. 3). E286 является точкой бифуркации в транслокации протонов через D-канал либо по пути переноса субстратного протона к центру гема a_3/Cu_B , либо на внешнюю сторону мембраны. Замена E286 на непротонируемый аналог (E286Q) ингибирует перенос и перекачиваемого, и субстратного протонов в одноэлектронном переходе $F \rightarrow O$ [45, 81]. При исследовании мутации N139L, перекрывающей вход в D-канал, была выявлена электрогенная стадия переноса протона от предполагаемого первичного донора протона для BNC (остатка E286) в каталитический центр BNC и установлено электрогенное расстояние между ними ($\sim 0,15$ толщины мембранного диэлектрика) [31]. Это находится в близком соответствии со структурными данными, согласно которым расстояние до остатка E286 от внутренней водной фазы составляет $\sim 0,56$ геометрической толщины мембраны [107]. В условиях дефицита протонов в D-канале (с депротонированным E286) роль донора протона для BNC может выполнять остаток Y35 в средней части канала [27].

Одноэлектронный переход $F \rightarrow O$ в гем-медных оксидазах семейства А при «инъекции» электрона от Rubp начинается с восстановления Cu_A и электрогенного переноса электрона от Cu_A на гем a («быстрая» компонента кинетики генерации $\Delta\Psi$) (рис. 3; [17]). Возможное смещение положительного заряда внутри закрытого K-канала в ответ на восстановление гема a может облегчить этот процесс (стадия 2' на рис. 3; [31]). Перенос электрона от гема a к гему $a_3^{4+}=\text{O}^{2-}$ происходит вдоль плоскости мембраны практически электро-нейтрально. Транслокация протонов начинается с переноса перекачиваемого протона от остатка E286 в «ловушку» протонов (PLS), расположенную выше BNC. В разных гем-медных оксидазах семейства А в качестве PLS могут рассматриваться А-пропионат гема a_3 и/или один из гистидиновых лигандов Cu_B [111, 112].

Есть указания на то, что роль PLS может выполняться кластером протон-обменивающих групп, включающим пропионаты А и D гема a_3 и расположенные вблизи остатки (D52 и K171, как в случае ЦО митохондрий) [113], либо гидрофильным доменом над гемом a [98].

В переходе $F \rightarrow O$ субстратный протон переносится также от остатка E286 непосредственно в BNC, а сам остаток E286 в ходе всего перехода дважды репротонируется через D-канал. «Средняя» электрогенная фаза включает в себя электрогенный перенос протона H^+ от остатка E286 к первичному акцептору протона (PLS), а также одно из последовательных электрогенных репротонирований остатка E286 из внутренней водной N-фазы через D-канал (рис. 3). «Медленная» электрогенная фаза включает в себя второе репротонирование остатка E286, следующее за переносом протона, участвующего в химическом превращении кислорода, от E286—COOH к BNC.

Есть указания на то, что собственно перенос протона от E286 в BNC (стадия 5) входит в состав «медленной» электрогенной фазы в случае ЦО из *R. sphaeroides* и в состав «средней» электрогенной фазы в случае ЦО из митохондрий [28]. В ходе переноса субстратного протона в BNC происходит нейтрализация перенесенного туда электрона, отрицательный заряд которого мог стабилизировать находящийся в PLS перекачиваемый протон. Перенос нового протона вглубь мембранного диэлектрика при репротонировании остатка E286 должен приводить к электростатическому выталкиванию перекачиваемого протона из PLS [112, 114, 115]. Соответственно, «медленная» электрогенная фаза включает в себя также высвобождение протона из PLS на внешнюю сторону мембраны, которое может быть замедлено добавлением ионов цинка с P-стороны мембраны (рис. 3).

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЯМОЙ ЭЛЕКТРОМЕТРИИ К ИССЛЕДОВАНИЮ ГЕМ-МЕДНЫХ ОКСИДАЗ СЕМЕЙСТВА В

Для понимания механизма сопряженного протонного насоса цитохромоксидазы большое значение имеет изучение всего многообразия надсемейства гем-медных терминальных оксидаз [8], включая гораздо менее изученные и эволюционно отдаленные семейства В и С [19, 116, 117]. Изучение оксидаз семейств В и С начато относительно недавно, активно развивается в последние годы [29, 95, 118, 119].

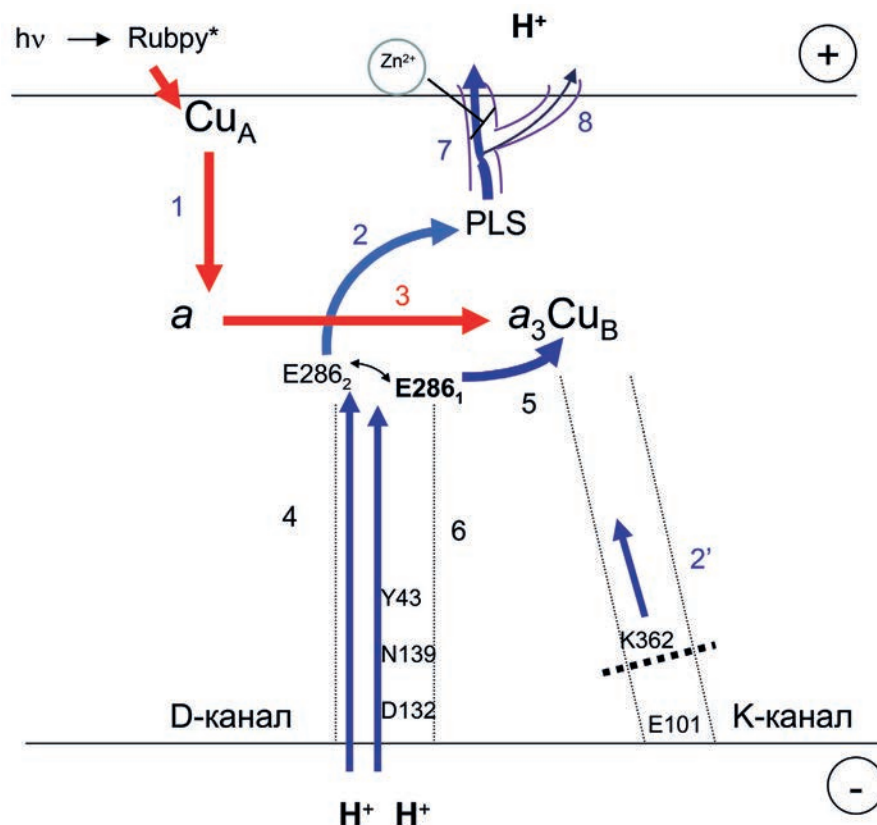


Рис. 3. На схеме приведены электрогенные стадии, разрешаемые при одноэлектронной фотоинъекции с помощью Rubpy в переходе $F \rightarrow O$ (перенос четвертого электрона в каталитическом цикле цитохромоксидазы). Перед началом реакции гем a_3 находится в оксоферрильном состоянии (не показано). Красные стрелки указывают направление переноса электрона, в то время как синие – стадии транслокации протонов. Показаны 2 протон-проводящих пути (D- и K-каналы), приведены ряд консервативных аминокислотных остатков в них. Стадии 1 и 3 отражают перенос электрона от Cu_A к гему a и от гема a в BNC соответственно. В ходе перехода $F \rightarrow O$ оба протона (субстратный и перекачиваемый) переносятся через D-канал. Предполагается, что изомеризация E286 (переход между конформациями E286₁ и E286₂) предшествует переносу протона от E286 к сайту загрузки перекачиваемого протона (PLS). Частные стадии переноса протонов (2, 4) входят в состав «средней» электрогенной фазы, в то время как стадии 6 и 7 – в состав «медленной». Показан дополнительный путь выхода перекачиваемого протона из PLS (8), выявляемый в присутствии ионов цинка [15]. Перенос протона от E286 в BNC (стадия 5) предположительно входит в состав «средней» (в случае ЦО из митохондрий) и «медленной» (ЦО из *R. sphaeroides*) электрогенных фаз соответственно. Стадия 2' – возможное смещение заряда в K-канале в ответ на восстановление гема a [31]

Не в последней степени это связано с их широкой распространенностью в патогенных микроорганизмах, наряду с не содержащими медь оксидазами *bd*-типа, и, соответственно, важным биомедицинским значением [120].

В случае ЦО ba_3 из *T. thermophilus*, типичного представителя семейства В, с помощью прямого электрометрического метода была обнаружена интересная особенность активного центра BNC этого фермента [121]. ЦО ba_3 -типа из *T. thermophilus* в исходном окисленном состоянии не реагирует с экзогенными лигандами и поэтому ее не удастся перевести и стабилизировать в состоянии Р или F с помощью обработки перекисью водорода или СО [121] так, как это делалось для типичных aa_3 -оксидаз [63]. Однако при «инъекции» электрона от Rubpy в находящуюся в полностью окис-

ленном состоянии О цитохромоксидазу ba_3 из *T. thermophilus* в присутствии перекиси водорода наблюдается дополнительная электрогенная реакция, скорость которой прямо пропорциональна концентрации добавленной перекиси. Иными словами, фактически неактивный в окисленном состоянии по отношению к внешним лигандам BNC ЦО ba_3 из *T. thermophilus* приобретает способность связывать лиганды (переходит в активное/открытое состояние) в ответ на одноэлектронную «инъекцию» и восстановление гема b [121].

Важным обстоятельством в контексте уникальности и пользы применения прямого электрометрического метода к изучению цитохромоксидазы ba_3 -типа из *T. thermophilus* является то, что оцениваемые по степени закисления внешнего отсека протеолипосом в условиях

стационарной кислород-редуктазной реакции усредненные параметры каталитического цикла этого фермента свидетельствуют о вариабельности стехиометрии перекачивания протонов. В отличие от оксидаз семейства А, стехиометрия перекачивания протонов в ЦО семейств В и С в стационарных измерениях может варьировать в значительных пределах: в среднем от 0,5 протона на электрон (H^+/e^-), поступающий в ВНС, до $\sim 0,85 H^+/e^-$ [66, 118, 121–124]. Прямой электрометрический метод позволяет получить и сравнить электрогенные параметры одноэлектронных переходов по отдельности и получить уникальную информацию об особенностях механизма сопряжения.

Для ЦО *ba₃* из *T. thermophilus*, как типичного представителя семейства В, были разрешены стадии электрогенного переноса протонов в окислительной фазе каталитического цикла [122] и в первом переходе восстановительной части каталитического цикла [66]. Были выявлены стадии, перенос электрона в которых не сопряжен с перекачиванием протона через мембрану, что объясняет снижение эффективной стехиометрии перекачки протонов и ее значительную вариабельность в оксидазах семейства В [66, 122]. В частности, было показано, что, в отличие от оксидаз семейства А, в окислительной фазе каталитического цикла ЦО *ba₃* из *T. thermophilus* происходит перекачивание одного протона через мембрану вместо двух [122]. В то же время перенос одного электрона в восстановительной части каталитического цикла (переход $O_H \rightarrow E_H$) также не сопряжен с перекачиванием протонов через мембрану, что может быть следствием влияния формирующегося в окислительной фазе каталитического цикла мембранного потенциала [66].

В первичной последовательности ЦО семейства В, по-видимому, сохраняется и функционирует лишь один входной протонный канал, гомологичный К-каналу оксидаз семейства А [5, 29]. С помощью прямого электрометрического метода было прямо показано, что, в отличие от семейства А, в ЦО семейства В для переноса и субстратных, и перекачиваемых протонов в окислительной фазе каталитического цикла необходим К-канал. Мутация T315V в К-канале ЦО *ba₃* из *T. thermophilus* приводит как к замедлению перехода $F \rightarrow O_H$ вследствие замедления переноса субстратного протона в ВНС, так и к десопряжению, т.е. к полному отсутствию перекачки протонов в окислительной фазе каталитического цикла [29].

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00143).

Благодарность. В первую очередь автор хотел бы выразить свою глубочайшую благодарность безвременно ушедшим А.А. Константинову, А.Д. Каулену, М.И. Верховскому, Л.А. Драчеву, В.П. Скулачеву. Сотрудничество с этими выдающимися учеными в разное время оказало на автора неизгладимое впечатление. Также автор очень благодарен Д.Л. Заславскому, И.А. Смирновой, И.Н. Белевичу, проф. М. Викстрему и проф. Р. Геннису за сотрудничество в исследованиях гем-медных оксидаз с применением прямого электрометрического метода.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или любой другой сфере.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, выполненных автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anraku, Y. (1988) Bacterial electron transport chains, *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 101–132, doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.000533.
2. Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., and Gennis, R. B. (1994) The superfamily of heme-copper respiratory oxidases, *J. Bacteriol.*, **176**, 5587–5600, doi: 10.1128/jb.176.18.5587–5600.1994.
3. Babcock, G. T., and Wikström, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration, *Nature*, **356**, 301–309, doi: 10.1038/356301a0.
4. Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1996) Heme/copper terminal oxidases, *Chem. Rev.*, **7**, 2889–2907, doi: 10.1021/cr950051s.
5. Hemp, J., and Gennis, R. B. (2008) Diversity of the heme-copper superfamily in archaea: insights from genomics and structural modeling, *Results Probl. Cell Differ.*, **45**, 1–31, doi: 10.1007/400_2007_046.
6. Rich, P. R. (2017) Mitochondrial cytochrome c oxidase: catalysis, coupling and controversies, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 813–829, doi: 10.1042/BST20160139.
7. Siletsky, S. A., and Borisov, V. B. (2021) Proton pumping and non-pumping terminal respiratory oxidases: active sites intermediates of these molecular machines and their derivatives, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10852, doi: 10.3390/ijms221910852.

8. Pereira, M. M., Santana, M., and Teixeira, M. (2001) A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 185-208, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00169-4.
9. Yoshikawa, S., and Shimada, A. (2015) Reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, **115**, 1936-1989, doi: 10.1021/cr500266a.
10. Fee, J. A., Yoshida, T., Surerus, K. K., and Mather, M. W. (1993) Cytochrome *caa3* from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*: a member of the heme-copper oxidase superfamily, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **25**, 103-114, doi: 10.1007/BF00762852.
11. Siletsky, S. A., Belevich, I., Soulimane, T., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2013) The fifth electron in the fully reduced *caa3* from *Thermus thermophilus* is competent in proton pumping, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1-9, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.09.013.
12. Wikström, M., Krab, K., and Sharma, V. (2018) Oxygen activation and energy conservation by cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, **118**, 2469-2490, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00664.
13. Forte, E., Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Petrosino, M., and Giuffrè, A. (2019) In the respiratory chain of *Escherichia coli* cytochromes *bd-I* and *bd-II* are more sensitive to carbon monoxide inhibition than cytochrome *bo3*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1860**, 148088, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.148088.
14. Bjorck, M. L., Vilhjalmsdottir, J., Hartley, A. M., Meunier, B., Nasvik Ojemyr, L., Marechal, A., and Brzezinski, P. (2019) Proton-transfer pathways in the mitochondrial *S. cerevisiae* cytochrome *c* oxidase, *Sci. Rep.*, **9**, 20207, doi: 10.1038/s41598-019-56648-9.
15. Siletsky, S. A., and Gennis, R. B. (2021) Time-resolved electrometric study of the $F \rightarrow O$ transition in cytochrome *c* oxidase. The effect of Zn^{2+} ions on the positive side of the membrane, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 105-122, doi: 10.1134/S0006297921010107.
16. Marechal, A., Xu, J. Y., Genko, N., Hartley, A. M., Haraux, F., Meunier, B., and Rich, P. R. (2020) A common coupling mechanism for A-type heme-copper oxidases from bacteria to mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 9349-9355, doi: 10.1073/pnas.2001572117.
17. Siletsky, S. A. (2013) Steps of the coupled charge translocation in the catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **18**, 36-57, doi: 10.2741/4086.
18. Fee, J. A., Sanders, D., Slutter, C. E., Doan, P. E., Aasa, R., Karpfors, M., and Vänngård, T. (1995) Multi-frequency epr evidence for a binuclear Cu_A center in cytochrome *c* oxidase: studies with a ^{63}Cu - and ^{65}Cu -enriched, soluble domain of the cytochrome *ba3*, subunit II from *Thermus Thermophilus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 77-83, doi: 10.1006/bbrc.1995.1938.
19. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. B., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant *ba3*-cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*, *EMBO J.*, **19**, 1766-1776, doi: 10.1093/emboj/19.8.1766.
20. Pitcher, R. S., and Watmough, N. J. (2004) The bacterial cytochrome *cbb3* oxidases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 388-399, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.09.017.
21. Buschmann, S., Warkentin, E., Xie, H., Langer, J. D., Ermler, U., and Michel, H. (2010) The structure of *cbb3* cytochrome oxidase provides insights into proton pumping, *Science*, **329**, 327-330, doi: 10.1126/science.1187303.
22. Mitchell, P. (1968) *Chemiosmotic coupling and energy transduction*, Glynn Research Ltd., Bodmin.
23. Wikström, M. (1977) Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria, *Nature*, **266**, 271-273, doi: 10.1038/266271a0.
24. Wikström, M. (2004) Cytochrome *c* oxidase: 25 years of the elusive proton pump, *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 241-247, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.07.013.
25. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A., and Skulachev, V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324, doi: 10.1038/249321a0.
26. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Khitrina, L. V., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 461-470, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06361.x.
27. Belevich, I., Gorbikova, E., Belevich, N. P., Rauhamaki, V., Wikström, M., and Verkhovsky, M. I. (2010) Initiation of the proton pump of cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 18469-18474, doi: 10.1073/pnas.1010974107.
28. Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 476-488, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.08.003.
29. Siletsky, S. A., Soulimane, T., Belevich, I., Gennis, R. B., and Wikström, M. (2021) Specific inhibition of proton pumping by the T315V mutation in the K channel of cytochrome *ba3* from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1862**, 148450, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148450.
30. Siletsky, S. A., Pawate, A. S., Weiss, K., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2004) Transmembrane charge separation during the ferryl-oxo $\rightarrow$ oxidized transition in a non-pumping mutant of cytochrome *c* oxidase, *J. Biol. Chem.*, **279**, 52558-52565, doi: 10.1074/jbc.M407549200.
31. Siletsky, S. A., Zhu, J., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2010) Partial steps of charge

- translocation in the nonpumping N139L mutant of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase with a blocked D-channel, *Biochemistry*, **49**, 3060-3073, doi: 10.1021/bi901719e.
32. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Takashi, T., Yamaguichi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science*, **272**, 1136-1144, doi: 10.1126/science.272.5265.1136.
 33. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T. (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Science*, **280**, 1723-1729, doi: 10.1126/science.280.5370.1723.
 34. Tsukihara, T., Shimokata, K., Katayama, Y., Shimada, H., Muramoto, K., Aoyama, H., Mochizuki, M., Shinzawa-Itoh, K., Yamashita, E., Yao, M., Ishimura, Y., and Yoshikawa, S. (2003) The low-spin heme of cytochrome *c* oxidase as the driving element of the proton-pumping process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15304-15309, doi: 10.1073/pnas.2635097100.
 35. Muramoto, K., Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoko-o, S., Yamashita, E., Aoyama, H., Tsukihara, T., and Yoshikawa, S. (2007) A histidine residue acting as a controlling site for dioxygen reduction and proton pumping by cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7881-7886, doi: 10.1073/pnas.0610031104.
 36. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Nature*, **376**, 660-669, doi: 10.1038/376660a0.
 37. Ostermeier, C., Iwata, S., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) F_V fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome *c* oxidase, *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 842, doi: 10.1038/nsb1095-842.
 38. Koepke, J., Olkhova, E., Angerer, H., Muller, H., Peng, G., and Michel, H. (2009) High resolution crystal structure of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase: New insights into the active site and the proton transfer pathways, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 635-645, doi: 10.1016/j.bbabo.2009.04.003.
 39. Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P., and Iwata, S. (2002) The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome *c* oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Mol. Biol.*, **321**, 329-339, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00619-8.
 40. Qin, L., Liu, J., Mills, D. A., Proshlyakov, D. A., Hiser, C., and Ferguson-Miller, S. (2009) Redox dependent conformational changes in cytochrome *c* oxidase suggest a gating mechanism for proton uptake, *Biochemistry*, **48**, 5121-5130, doi: 10.1021/bi9001387.
 41. Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., and Wikström, M. (2000) The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 910-917, doi: 10.1038/82824.
 42. Noor, M. R., and Soulimane, T. (2013) Structure of *caa*(₃) cytochrome *c* oxidase – a nature-made enzyme-substrate complex, *Biol. Chem.*, **394**, 579-591, doi: 10.1515/hsz-2012-0343.
 43. Luna, V. M., Chen, Y., Fee, J. A., and Stout, C. D. (2008) Crystallographic studies of Xe and Kr binding within the large internal cavity of cytochrome *ba*₃ from *Thermus thermophilus*: structural analysis and role of oxygen transport channels in the heme-Cu oxidases, *Biochemistry*, **47**, 4657-4665, doi: 10.1021/bi800045y.
 44. Fetter, J. R., Qian, J., Shapleigh, J., Thomas, J. W., Garcia-Horsman, A., Schmidt, E., Hosler, J., Babcock, G. T., Gennis, R. B., and Ferguson-Miller, S. (1995) Possible proton relay pathways in cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1604-1608, doi: 10.1073/pnas.92.5.1604.
 45. Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., and Gennis, R. B. (1997) The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time resolved electrogenic intraprotein proton transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9085-9090, doi: 10.1073/pnas.94.17.9085.
 46. Gennis, R. B. (1998) Multiple proton-conducting pathways in cytochrome oxidase and a proposed role for the active-site tyrosine, *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 241-248, doi: 10.1016/S0005-2728(98)00075-9.
 47. Branden, M., Tomson, F., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2002) The entry point of the K-proton-transfer pathway in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **41**, 10794-10798, doi: 10.1021/bi026093+.
 48. Hofacker, I., and Schulten, K. (1998) *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **30**, 100-107, doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(199801)30:1<100::AID-PROT9>3.0.CO;2-S.
 49. Popovic, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2005) Proton exit channels in bovine cytochrome *c* oxidase, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 1999-2006, doi: 10.1021/jp0464371.
 50. Riistama, S., Puustinen, A., Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., and Wikström, M. (2000) Binding of O₂ and its reduction are both retarded by replacement of valine 279 by isoleucine in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **39**, 6365-6372, doi: 10.1021/bi000123w.
 51. Salomonsson, L., Lee, A., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2004) A single-amino-acid lid renders a gas-tight compartment within a membrane-bound transporter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11617-11621, doi: 10.1073/pnas.0402242101.

52. Schmidt, B., McCracken, J., and Ferguson-Miller, S. (2003) A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15539-15542, doi: 10.1073/pnas.2633243100.
53. Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan, L., and Wikström, M. (1999) Proton translocation by cytochrome *c* oxidase, *Nature*, **400**, 480-483, doi: 10.1038/22813.
54. Chance, B., Saronio, C., and Leigh, J. S., Jr. (1975) Functional intermediates in the reaction of membrane-bound cytochrome oxidase with oxygen, *J. Biol. Chem.*, **250**, 9226-9237, doi: 10.1016/S0021-9258(19)40634-0.
55. Hill, B. C., and Greenwood, C. (1983) Spectroscopic evidence for the participation of compound A ($\text{Fea}_3^{2+}\text{-O}_2$) in the reaction of mixed-valence cytochrome *c* oxidase with oxygen at room temperature, *Biochem. J.*, **215**, 659-667, doi: 10.1042/bj2150659.
56. Muramoto, K., Ohta, K., Shinzawa-Itoh, K., Kanda, K., Taniguchi, M., Nabekura, H., Yamashita, E., Tsukihara, T., and Yoshikawa, S. (2010) Bovine cytochrome *c* oxidase structures enable O_2 reduction with minimization of reactive oxygens and provide a proton-pumping gate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7740-7745, doi: 10.1073/pnas.0910410107.
57. Kitagawa, T., and Ogura, T. (1997) Oxygen activation mechanism at the binuclear site of heme-copper oxidase superfamily as revealed by time-resolved resonance Raman spectroscopy, in *Progress in Inorganic Chemistry* (Karlin, K. D., ed) Wiley & Sons, pp. 431-479, doi: 10.1002/9780470166468.ch6.
58. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., and Babcock, G. T. (1998) Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8020-8025, doi: 10.1073/pnas.95.14.8020.
59. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., DeMaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D. L., and Babcock, G. T. (2000) Oxygen activation and reduction in respiration: involvement of redox-active tyrosine 244, *Science*, **290**, 1588-1591, doi: 10.1126/science.290.5496.1588.
60. Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E., and Bloggel, M. (1999) Evidence for a copper coordinated histidine-tyrosine crosslink in the active site of cytochrome oxidase, *Protein Sci.*, **8**, 985-990, doi: 10.1110/ps.8.5.985.
61. Rauhamaki, V., Baumann, M., Soliymani, R., Puustinen, A., and Wikström, M. (2006) Identification of histidin-tyrosin cross-link in the active site of the *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16135-16140, doi: 10.1073/pnas.0606254103.
62. Babcock, G. T. (1999) How oxygen is activated and reduced in respiration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12971-12973, doi: 10.1073/pnas.96.23.12971.
63. Siletsky, S., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1999) Resolution of electrogenic steps coupled to conversion of cytochrome *c* oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo state, *Biochemistry*, **38**, 4853-4861, doi: 10.1021/bi982614a.
64. Sharma, V., Karlin, K. D., and Wikstrom, M. (2013) Computational study of the activated OH state in the catalytic mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16844-16849, doi: 10.1073/pnas.1220379110.
65. Siletsky, S. A., Belevich, I., Wikström, M., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2009) Time-resolved $\text{O}_\text{H} \rightarrow \text{E}_\text{H}$ transition of the aberrant *ba₃* oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 201-205, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.12.020.
66. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Wikström, M. (2017) Time-resolved generation of membrane potential by *ba₃* cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus* coupled to single electron injection into the O and OH states, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 915-926, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.007.
67. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2016) Electrogenic steps of light-driven proton transport in ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1741-1750, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.08.004.
68. Kaulen, A. D. (2000) Electrogenic processes and protein conformational changes accompanying the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 204-219, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00140-7.
69. Gibson, Q. H., and Greenwood, C. (1963) Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide, *Biochem. J.*, **86**, 541-554, doi: 10.1042/bj0860541.
70. Nilsson, T. (1992) Photoinduced electron transfer from tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium to cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6497-6501, doi: 10.1073/pnas.89.14.6497.
71. Belevich, I., and Verkhovsky, M. I. (2008) Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome *c* oxidase, *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 1-29, doi: 10.1089/ars.2007.1705.
72. Kaila, V. R., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2010) Proton-coupled electron transfer in cytochrome oxidase, *Chem. Rev.*, **110**, 7062-7081, doi: 10.1021/cr1002003.
73. Zaslavsky, D., Kaulen, A., Smirnova, I. A., Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (1993) Flash-induced membrane potential generation by cytochrome *c* oxidase, *FEBS Lett.*, **336**, 389-393, doi: 10.1016/0014-5793(93)80843-J.
74. Zaslavsky, D. L., Smirnova, I. A., Siletsky, S. A., Kaulen, A. D., Millett, F., and Konstantinov, A. A. (1995) Rapid kinetics of membrane potential

- generation by cytochrome *c* oxidase with the photoactive Ru(II)-tris-bipyridyl derivative of cytochrome *c* as electron donor, *FEBS Lett.*, **359**, 27-30, doi: 10.1016/0014-5793(94)01443-5.
75. Siletsky, S. A., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1997) Electrogenic events associated with peroxy- to ferryl-oxo state transition in cytochrome *c* oxidase, *Eur. J. Biophys.*, **26**, 98.
 76. Verkhovsky, M. I., Tuukkanen, A., Backgren, C., Puustinen, A., and Wikström, M. (2001) Charge translocation coupled to electron injection into oxidized cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **40**, 7077-7083, doi: 10.1021/bi010030u.
 77. Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., Verkhovskaya, M., and Wikström, M. (1997) Translocation of electrical charge during a single turnover of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 6-10, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00147-8.
 78. Hinkle, P., and Mitchell, P. (1970) Effect of membrane potential on the redox poise between cytochrome *a* and cytochrome *c* in rat liver mitochondria, *J. Bioenerg.*, **1**, 45-60, doi: 10.1007/BF01516088.
 79. Wikström, M. (1989) Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping, *Nature*, **338**, 776-778, doi: 10.1038/338776a0.
 80. Wikström, M., Krab, K., and Saraste, M. (1981) *Cytochrome Oxidase – A Synthesis*, Academic Press, New York.
 81. Siletsky, S. A., Kaulen, A. D., Mitchell, D., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (1996) Resolution of two proton conduction pathways in cytochrome *c* oxidase, *EBEC Short Rep.*, **9**, 90.
 82. Lepp, H., Svahn, E., Faxen, K., and Brzezinski, P. (2008) Charge transfer in the K proton pathway linked to electron transfer to the catalytic site in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **47**, 4929-4935, doi: 10.1021/bi7024707.
 83. Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel, H., and Fendler, K. (2000) Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4632-4636, doi: 10.1073/pnas.080079097.
 84. Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Fendler, K., and Michel, H. (2002) Reduction of cytochrome *c* oxidase by a second electron leads to proton translocation, *Nature*, **417**, 99-102, doi: 10.1038/417099a.
 85. Bloch, D., Belevich, I., Jasaitis, A., Ribacka, C., Puustinen, A., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2004) The catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase is not the sum of its two halves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 529-533, doi: 10.1073/pnas.0306036101.
 86. Belevich, I., Bloch, D. A., Wikström, M., and Verkhovsky, M. I. (2007) Exploring the proton pump mechanism of cytochrome *c* oxidase in real time, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2685-2690, doi: 10.1073/pnas.0608794104.
 87. Pawate, A. S., Morgan, J., Namslawer, A., Mills, D., Brzezinski, P., Ferguson-Miller, S., and Gennis, R. B. (2002) A mutation in subunit I of cytochrome oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* results in an increase in steady-state activity but completely eliminates proton pumping, *Biochemistry*, **41**, 13417-13423, doi: 10.1021/bi026582+.
 88. Pfitzner, U., Hoffmeier, K., Harrenga, A., Kannt, A., Michel, H., Bamberg, E., Richter, O.-M. H., and Ludwig, B. (2000) Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **39**, 6756-6762, doi: 10.1021/bi992235x.
 89. Ribacka, C., Verkhovsky, M. I., Belevich, I., Bloch, D. A., Puustinen, A., and Wikström, M. (2005) An elementary reaction step of the proton pump is revealed by mutation of tryptophan-164 to phenylalanine in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **44**, 16502-16512, doi: 10.1021/bi0511336.
 90. Faxen, K., Gilderson, G., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2005) A mechanistic principle for proton pumping by cytochrome *c* oxidase, *Nature*, **437**, 286-289, doi: 10.1038/nature03921.
 91. Brand, S. E., Rajagukguk, S., Ganesan, K., Geren, L., Fabian, M., Han, D., Gennis, R. B., Durham, B., and Millett, F. (2007) A new ruthenium complex to study single-electron reduction of the pulsed O_H state of detergent-solubilized cytochrome oxidase, *Biochemistry*, **46**, 14610-14618, doi: 10.1021/bi701424d.
 92. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2011) Time-resolved single-turnover of *caa*₃ oxidase from *Thermus thermophilus*. Fifth electron of the fully reduced enzyme converts O_H into E_H state, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1162-1169, doi: 10.1016/j.bbabbio.2011.05.006.
 93. Thomas, J. W., Puustinen, A., Alben, J. O., Gennis, R. B., and Wikström, M. (1993) Substitution of asparagine for aspartate-135 in subunit I of the cytochrome *bo* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* eliminates proton-pumping activity, *Biochemistry*, **32**, 10923-10928, doi: 10.1021/bi00091a048.
 94. Garcia-Horsman, J. A., Puustinen, A., Gennis, R. B., and Wikström, M. (1995) Proton transfer in cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase of *Escherichia coli*: second site mutations in subunit I that restore proton pumping in the decoupled mutant Asp135Asn, *Biochemistry*, **34**, 4428-4433, doi: 10.1021/bi00013a035.
 95. Siletsky, S. A., Borisov, V. B., and Mamedov, M. D. (2017) Photosystem II and terminal respiratory oxidases: molecular machines operating in opposite directions, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **22**, 1379-1426, doi: 10.2741/4550.
 96. Shimokata, K., Katayama, Y., Murayama, H., Sue-matsu, M., Tsukihara, T., Muramoto, K., Aoyama, H.,

- Yoshikawa, S., and Shimada, H. (2007) The proton pumping pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4200-4205, doi: 10.1073/pnas.0611627104.
97. Yoshikawa, S., Shimada, A., and Shinzawa-Itoh, K. (2015) Respiratory conservation of energy with dioxygen: cytochrome *c* oxidase, *Met. Ions Life Sci.*, **15**, 89-130, doi: 10.1007/978-3-319-12415-5_4.
 98. Capitanio, N., Palese, L. L., Capitanio, G., Martino, P. L., Richter, O. M., Ludwig, B., and Papa, S. (2012) Allosteric interactions and proton conducting pathways in proton pumping *aa₃* oxidases: heme *a* as a key coupling element, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 558-566, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.11.003.
 99. Rich, P. R., and Marechal, A. (2013) Functions of the hydrophilic channels in protonmotive cytochrome *c* oxidase, *J. R. Soc. Interface*, **10**, 20130183, doi: 10.1098/rsif.2013.0183.
 100. Sharma, V., Jambrina, P. G., Kaukonen, M., Rosta, E., and Rich, P. R. (2017) Insights into functions of the H channel of cytochrome *c* oxidase from atomistic molecular dynamics simulations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E10339-E10348, doi: 10.1073/pnas.1708628114.
 101. Wikström, M., and Verkhovsky, M. I. (2007) Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1200-1214, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.06.008.
 102. Salje, J., Ludwig, B., and Richter, O.-M. H. (2005) Is a third proton-conducting pathway operative in bacterial cytochrome *c* oxidase? *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 829-831, doi: 10.1042/BST0330829.
 103. Lee, H.-m., Das, T. K., Rousseau, D. L., Mills, D., Fergusson-Miller, S., and Gennis, R. (2000) Mutations in the putative H-channel in the cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* show that this channel is not important for proton conduction but reveals modulation of the properties of heme *a*, *Biochemistry*, **39**, 2989-2996, doi: 10.1021/bi9924821.
 104. Pfitzner, U., Odenwald, A., T., O., Weingard, L., Ludwig, B., and Richter, O. M. (1998) Cytochrome *c* oxidase (heme *aa₃*) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 89-97, doi: 10.1023/A:1020515713103.
 105. Kuznetsova, S. S., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2005) Zinc ions as cytochrome *c* oxidase inhibitors: two sites of action, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 128-136, doi: 10.1007/s10541-005-0091-6.
 106. Sugitani, R., and Stuchebrukhov, A. A. (2009) Molecular dynamics simulation of water in cytochrome *c* oxidase reveals two water exit pathways and the mechanism of transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1140-1150, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.04.004.
 107. Medvedev, D. M., Medvedev, E. S., Kotelnikov, A. I., and Stuchebrukhov, A. A. (2005) Analysis of the kinetics of the membrane potential generated by cytochrome *c* oxidase upon single electron injection, *Biochim. Biophys. Acta*, **1710**, 47-56, doi: 10.1016/j.bbabi.2005.08.008.
 108. Siletsky, S., and Konstantinov, A. A. (2006) Electro-genic mechanism of cytochrome *c* oxidase, *The 8th European Biological Chemistry Conference*, p. 80.
 109. Siletsky, S. A., Han, D., Brand, S., Morgan, J. E., Fabian, M., Geren, L., Millett, F., Durham, B., Konstantinov, A. A., and Gennis, R. B. (2006) Single-electron photoreduction of the P_M intermediate of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1122-1132, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.07.003.
 110. Sugitani, R., Medvedev, E. S., and Stuchebrukhov, A. A. (2008) Theoretical and computational analysis of the membrane potential generated by cytochrome *c* oxidase upon single electron injection into the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1129-1139, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.05.006.
 111. Kaila, V. R., Sharma, V., and Wikström, M. (2011) The identity of the transient proton loading site of the proton-pumping mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 80-84, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.08.014.
 112. Popovic, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2004) Proton pumping mechanism and catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase: Coulomb pump model with kinetic gating, *FEBS Lett.*, **566**, 126-130, doi: 10.1016/j.febslet.2004.04.016.
 113. Lu, J., and Gunner, M. R. (2014) Characterizing the proton loading site in cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 12414-12419, doi: 10.1073/pnas.1407187111.
 114. Rich, P. R. (1995) Towards an understanding of the chemistry of oxygen reduction and proton translocation in the iron-copper respiratory oxidases, *Aust. J. Plant Physiol.*, **22**, 479-486, doi: 10.1071/PP9950479.
 115. Wikström, M., and Sharma, V. (2018) Proton pumping by cytochrome *c* oxidase – a 40 year anniversary, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1859**, 692-698, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.03.009.
 116. Zimmermann, B. H., Nitsche, C. I., Fee, J. A., Rusnak, F., and Munck, E. (1988) Properties of a copper-containing cytochrome *ba₃*: a second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5779-5783, doi: 10.1073/pnas.85.16.5779.
 117. Rauhamaki, V., Bloch, D. A., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2009) Active site of cytochrome *cbb₃*, *J. Biol. Chem.*, **284**, 11301-11308, doi: 10.1074/jbc.M808839200.
 118. Rauhamaki, V., Bloch, D. A., and Wikström, M. (2012) Mechanistic stoichiometry of proton translocation by cytochrome *cbb₃*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7286-7291, doi: 10.1073/pnas.1202151109.

119. Steimle, S., van Eeuwen, T., Ozturk, Y., Kim, H. J., Braitbard, M., Selamoglu, N., Garcia, B. A., Schneidman-Duhovny, D., Murakami, K., and Daldal, F. (2021) Cryo-EM structures of engineered active $bc_1\text{-cbb}_3$ type CIII₂CIV super-complexes and electronic communication between the complexes, *Nat. Commun.*, **12**, 929, doi: 10.1038/s41467-021-21051-4.
120. Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Nastasi, M. R., and Forte, E. (2021) ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 839, doi: 10.3390/antiox10060839.
121. Siletskiy, S., Soulimane, T., Azarkina, N., Vygodina, T. V., Buse, G., Kaulen, A., and Konstantinov, A. (1999) Time-resolved generation of membrane potential by ba_3 cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. Evidence for reduction-induced opening of the binuclear centre, *FEBS Lett.*, **457**, 98-102, doi: 10.1016/S0014-5793(99)01019-4.
122. Siletsky, S. A., Belevich, I., Jasaitis, A., Konstantinov, A. A., Wikström, M., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2007) Time-resolved single-turnover of ba_3 oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1383-1392, doi: 10.1016/j.bbabo.2007.09.010.
123. Kannt, A., Lancaster, C. R., and Michel, H. (1998) The coupling of electron transfer and proton translocation: electrostatic calculations on *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase, *Biophys. J.*, **74**, 708-721, doi: 10.1016/S0006-3495(98)73996-7.
124. Rauhamaki, V., and Wikström, M. (2014) The causes of reduced proton-pumping efficiency in type B and C respiratory heme-copper oxidases, and in some mutated variants of type A, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 999-1003, doi: 10.1016/j.bbabo.2014.02.020.

INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF MEMBRANE POTENTIAL GENERATION BY HEME-COPPER RESPIRATORY OXIDASES IN REAL TIME MODE

Review

S. A. Siletsky

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: siletsky@belozersky.msu.ru*

Heme-copper respiratory oxidases are highly efficient molecular machines. These membrane enzymes catalyze the final stage of cellular respiration of eukaryotes and many prokaryotes: the transfer of electrons from cytochromes or quinols to molecular oxygen and the reduction of O₂ to water. The free energy released in this redox reaction is converted by heme-copper respiratory oxidases into a transmembrane gradient of the electrochemical potential of hydrogen ions ($\Delta\mu\text{H}^+$). Heme-copper respiratory oxidases have a unique mechanism for generation $\Delta\mu\text{H}^+$ — a redox-coupled proton pump. The use of a combination of a direct electrometric method for measuring the kinetics of membrane potential generation with approaches and methods of prestationary kinetics and directed mutagenesis in the study of heme-copper oxidases makes it possible to obtain unique information about the movement of protons inside the protein in real time. The review summarizes the results of the use of the permitted time.

Keywords: bioenergetics, cytochrome oxidase, proteoliposomes, electrogenic, proton transfer, generation $\Delta\Psi$, proton pump, photoreduction, cytochrome *aa₃*, kinetics, direct electrometric method, capacitive potentiometry, time resolution, zinc ions

СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЕ ФОТОХИМИИ РОДОПСИНОВ I И II ТИПОВ

Обзор

© 2023 М.А. Островский^{1,2}, О.А. Смитиенко², А.В. Боченкова³, Т.Б. Фельдман^{1,2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: feldmantb@mail.ru

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.07.2023

После доработки 20.07.2023

Принята к публикации 12.08.2023

Разнообразие ретиналь-содержащих белков (родопсинов) в природе чрезвычайно велико. Принципиальное сходство структуры и фотохимических свойств объединяет их в одно семейство. Однако до сих пор идет дискуссия о происхождении родопсинов: дивергентная или конвергентная эволюция? В обзоре на основе результатов собственных и литературных данных проведен сравнительный анализ сходства и различий фотопревращения родопсинов I и II типов. Представлены результаты экспериментальных исследований прямых и обратных фотореакций бактериородопсина (родопсина I типа) и зрительного родопсина (родопсина II типа) в фемто- и пикосекундном интервале времен, фотообратимой реакции родопсина осьминога (родопсина II типа), фотоэлектрических реакций родопсинов I и II типов, а также квантово-химические расчеты прямых фотореакций. Обсуждается вопрос о вероятной конвергентной эволюции родопсинов I и II типов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретиналь-содержащие белки, зрительный родопсин, бактериородопсин, конвергентная эволюция, фотохимия, фемтосекундная спектроскопия, квантово-химические расчеты.

DOI: 10.31857/S0320972523100093, EDN: OTFNWZ

ВВЕДЕНИЕ

Семейство ретиналь-содержащих белков (РСБ) содержит три типа родопсинов: микробные (I тип), животные (II тип) и сравнительно недавно обнаруженные гелиородопсины (III тип) [1–7]. Несмотря на то что функции их чрезвычайно разнообразны, принципиальное сходство структуры, 7- α -спиральной трансмембранной топографии белковой части и ретиналя в качестве хромофорной группы, а также фотохимических и спектральных свойств поражают воображение. Естественно, возникает вопрос об их эволюционном происхождении. При всей противоречивости мнений об их дивергентной [8–10]

или конвергентной [11–15] эволюции чаша весов, как нам представляется, склоняется в пользу последней. Другими словами, предполагается, что нет общего предка для всех трех типов родопсинов. И если это так, то, скорее всего, давление внешних факторов (дарвиновский естественный отбор) и физиологическая потребность привели к столь удивительной похожести столь неродственных РСБ. В этой связи сравнение и понимание эволюции каждого из этих типов родопсинов представляет самостоятельный и исключительно большой интерес. Об этом свидетельствует все нарастающее число публикаций по этому поводу [3–5, 11, 16–18].

Разнообразие РСБ, как сейчас становится ясно, чрезвычайно велико. В настоящее время

Принятые сокращения: волновой пакет – набор когерентных возбужденных колебательных состояний; ППЭ – поверхность потенциальной энергии; РСБ – ретиналь-содержащие белки; РПШО – протонированное шиффово основание ретиналя; ТМ – трансмембранная спираль; ф/и – фотоиндуцированный; BR – бактериородопсин археи *Halobacterium salinarum*; CI – коническое пересечение ППЭ; FC – франк-кондоновское состояние; HOOP – внеплоскостные колебания атомов водорода; Rh – зрительный родопсин быка *Bos taurus*.

* Адресат для корреспонденции.

они обнаружены во всех доменах живой природы — бактериях, археях и эукариотах, а также в гигантских вирусах. Родопсины I типа характерны для бактерий, архей, вирусов и низших эукариот; они очень разнообразны по выполняемым функциям, основные из которых — фотоэнергетическая (ионные насосы) и фотоинформационная (сенсорные родопсины, катионные и анионные каналы) [6]. Родопсины II типа характерны для высших животных, в большинстве случаев они представляют собой специализированные G-белок-связывающие рецепторы, которые обеспечивают в основном фотоинформационные функции, основная из которых — зрительная [1, 2]. Родопсины III типа широко распространены в живых организмах из тех же доменов, что и родопсины I типа, и, предположительно, выполняют фотоинформационную функцию [7].

Изначально термин родопсин относился только к зрительному белку. Открытый в 1876 г. Ференцем Боллем (Ferenz Boll), он был назван «зрительным веществом» (Sehestoff), затем в силу своего цвета — «зрительным пурпуром» (Sehpurpur) и позже — родопсином от греческих слов: «*rhodo*» — розовый и «*opsis*» — видеть. Открытый Уолтером Стоккениусом (Walther Stoeckenius) и Дитером Остерхельтом (Dieter Oesterhelt) почти 100 лет спустя РСБ — протонный насос галофильной археи *Halobacterium salinarum*, был назван ими по аналогии со зрительным родопсином — бактериородопсином [19]. В настоящее время название родопсины распространилось на все семейство РСБ I, II и III типов. Общим для них являются, во-первых, структура апо-белка — опсина, с его семью трансмембранными α -спиральными «тяжами» и, во-вторых, кофактор (хромофор) — ретиналь, поглощающий кванты света. Становится все более очевидным, что 7- α -спиральный белковый каркас РСБ и консервативен, и одновременно необыкновенно пластичен. Что касается ретиналя, то он, как правило, ковалентно связан протонированным шиффовым основанием (РПШО) с лизинным аминокислотным остатком опсина в седьмой трансмембранной α -спирали (TM7) и находится в полностью-*транс* (родопсины I и III типов) или 11-*цис* (родопсины II типа) изомерной форме. Следует подчеркнуть, что хромофорный центр — это наиболее консервативный домен опсина. Ближайшее белковое окружение РПШО является принципиально важным как для спектральной настройки молекулы родопсина, так и для осуществления сверхбыстрой и эффективной фотохимиче-

ской реакции изомеризации хромофора, лежащей в основе функционирования всех РСБ. Рассматривая роль ближайшего белкового окружения РПШО в хромофорном центре опсина, допустимо говорить о белковом катализе процесса фотоизомеризации. При этом вопрос о природе взаимодействия белок—хромофор — стерическом, электростатическом, водородном и гидрофобном — остается предметом активного изучения [20].

Что касается топологии в мембране белковой части молекулы, то если в родопсинах I и II типов *N*-конец обращен наружу клетки, а *C*-конец — внутрь, в родопсинах III типа наблюдается противоположное расположение, при котором *N*-конец обращен внутрь клетки, а *C*-конец — наружу [4, 7, 21]. Причина и биологический смысл такого расположения родопсинов III типа в мембране клетки остаются неясными. Удивительно и то, что «перевернутая» топология белковой части молекулы обнаружена и у обонятельных G-белок-связывающих рецепторов насекомых [22].

Родопсины зубактерий и архей I типа, включая бактериородопсин, осуществляющий простейший фотосинтез, — одни из самых древних белков биосферы, они возникли в клетках прокариот около 3,8 млрд лет назад. Родопсины одноклеточных эукариот I типа возникли около 3,2 млрд лет назад, в то время как родопсины высших животных II типа, включая зрительный родопсин, появились в многоклеточных эукариотах менее 1 млрд лет назад [5, 11, 18, 23–25].

В рамках теории конвергентной эволюции родопсинов предполагается, что предшественниками микробных родопсинов были лизосомальные переносчики цистеина, имеющие 7- α -спиральную структуру [15]. Предшественниками животных родопсинов были, как считается, сАМР-зависимые G-белок-связывающие рецепторы с классической 7- α -спиральной структурой, то есть не содержащие ретиналь рецепторы [12–14], а ретиналь в качестве хромофора был «вставлен» в хромофорный центр зрительных опсинов позже.

В рамках теории дивергентной эволюции в одной из работ предполагается, что сначала из сАМР-рецепторов произошли родопсины II типа (как и другие G-белок-связывающие рецепторы класса A), от которых затем произошли родопсины I типа путем горизонтального переноса генов от эукариот к прокариотам [9]. В другой работе, исходя из оптимизации электронных свойств хромофора, невзирая при этом на явное различие аминокислотных последовательностей,

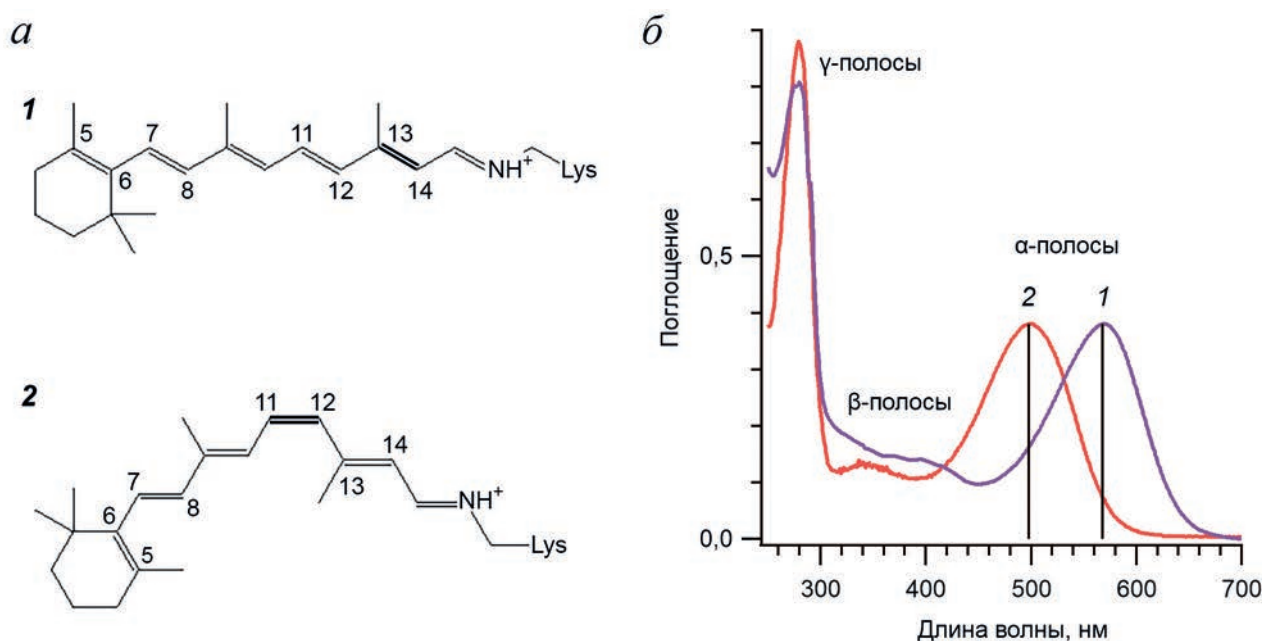


Рис. 1. Физико-химические характеристики хромофорной группы родопсинов I и II типов. *а* – Химические структуры хромофорной группы родопсинов – полностью-*транс* РПШО в родопсинах I типа (1) и 6-*s-цис*–11-*цис* РПШО в родопсинах II типа (2). Реакционная связь выделена жирным. *б* – Нормированные по α-полосе стационарные спектры поглощения суспензии пурпурных мембран, содержащих бактериородопсин археи *Halobacterium salinarum* (BR) (1), и детергентного экстракта зрительного родопсина быка *Bos taurus* (Rh) (2)

авторы предполагают существование дивергентного пути эволюции, но уже от родопсинов I типа к родопсинам II типа [8]. Еще в одной работе, сравнивая структуры Na-связывающего центра в консервативном ароматическом остатке в ТМ6 и функционально важный наклон этой спирали в микробных родопсинах и G-белок-связывающих рецепторах, авторы приходят к предположению об их общем происхождении [10].

Что касается недавно обнаруженных родопсинов III типа, то их происхождение остается загадкой. По мнению авторов одной из работ, гелиородопсины произошли от эукариотических родопсинов II типа, впоследствии были захвачены гигантскими вирусами и перешли в клетки прокариот [16]. Это предполагает, как и в одной из гипотез происхождения родопсинов I типа [9], необычную направленность эволюции от эукариот к прокариотам.

Как бы то ни было, совокупность накопленных к настоящему времени данных позволяет предпочесть представление о конвергентной, независимой эволюции всех трех типов РСБ I, II и III типов. В данном обзоре рассматривается сходство и различие молекулярных механизмов фотохимической реакции в родопсинах I и II типов. На основании наших собственных экспериментальных данных и квантово-химических расчетов приводятся доводы в пользу конвергентной эволюции РСБ.

СРАВНЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ РЕАКЦИЙ ФОТОПРЕВРАЩЕНИЯ РОДОПСИНОВ I И II ТИПОВ

В основе функционирования родопсинов лежит фотохимическая реакция изомеризации хромофорной группы РПШО (полностью-*транс* → 13-*цис* в родопсинах I типа и 11-*цис* → полностью-*транс* в родопсинах II типа) (рис. 1, *а*) [1, 2, 26–30]. Фотореакция протекает в возбужденном состоянии и характеризуется уникальными параметрами, которые определяются как химическими свойствами самого хромофора, так и влиянием белкового окружения на хромофор [26, 31–33]. При этом энергия кванта света запасается путем образования напряженной, сильно скрученной конфигурации изомеризованного РПШО в хромофорном центре [34]. Кроме того, в случае родопсинов I типа дополнительный вклад в запасание энергии кванта света вносит изменение структуры водородных связей в области РПШО [27]. Эти процессы протекают в фемто- и раннем пикосекундном временных диапазонах [27]. Далее, происходит переход напряженной конфигурации хромофора в отрелаксированное состояние с высвобождением запасенной энергии, что, в свою очередь, приводит к перестройке его ближайшего белкового окружения в хромофорном центре. Этот процесс в конечном итоге

запускает глобальные структурные изменения во всей белковой части молекулы, необходимые для ее функционирования.

В данном разделе обзора рассматриваются механизмы фотоиндуцированных (ф/и) реакций родопсинов I и II типов на примере наиболее изученных представителей этих двух классов РСБ — протонного насоса бактериородопсина археи *H. salinarum* (BR) и G-белок-связывающего зрительного родопсина быка *Bos taurus* (Rh).

На рис. 1, б представлены стационарные спектры поглощения BR и Rh, которые состоят из α -, β - и γ -полос, последняя из которых определяется поглощением опсина и имеет максимум при 280 нм. α - и β -полосы связаны с поглощением РПШО в составе хромофорного центра. При этом в зависимости от изомерной формы, протонирования шиффового основания и особенностей строения хромофорного центра спектральные, фотохимические и ряд других функционально важных свойств молекулы меняются самым существенным образом [35]. Положение α -полосы поглощения определяет спектральный диапазон функционирования родопсинов (300–700 нм) [2]. В случае BR максимум положения α -полосы — 568 нм (рис. 1, б (1)), а в случае Rh — 498 нм (рис. 1, б (2)). На положение максимума поглощения РПШО большое влияние оказывает положение β -иононового кольца [36]. В BR хромофорная группа имеет плоскую *транс*-конфигурацию связей $C_5 = C_6$ и $C_7 = C_8$ относительно одинарной связи $C_6 - C_7$ (6-*s-транс*; рис. 1, а (1)), тогда как в Rh — *цис*-конфигурацию (6-*s-цис*; рис. 1, а (2)), которая является неплоской из-за стерических затруднений, что приводит к уменьшению длины цепи сопряжения хромофора и сдвигу максимума поглощения Rh в более коротковолновую область.

Прямые фотореакции родопсинов I и II типов. При поглощении кванта света происходит фотохимическая реакция изомеризации РПШО и образуются первичные фотопродукты, обладающие спектральными свойствами, отличными от исходного состояния. В данном обзоре представлены наши собственные результаты по динамике первичных процессов фотопревращения BR и Rh, полученные методом фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии [37–46] и дополненные данными квантово-химических расчетов [32, 47–50].

На рис. 2 представлены дифференциальные спектры и кинетические кривые ф/и-поглощения BR и Rh, полученные на временах задержки зондирующего импульса до 10 пс. Первые ф/и-сигналы, наблюдаемые в раннем

фемтосекундном временном диапазоне, — это поглощение и вынужденное испускание из возбужденного состояния S_1 (рис. 2, а (2 и 3); рис. 2, б (2)). Далее, эти сигналы сменяются поглощением первого фотопродукта, находящегося в основном электронном состоянии S_0 , а в области поглощения исходного состояния родопсина проявляется отрицательная полоса выцветания (рис. 2, а (5), 600–700 нм; рис. 2, б (4), 540–700 нм). В течение нескольких пикосекунд полоса поглощения первого фотопродукта немного сдвигается в коротковолновую область, что отражает образование следующего продукта в результате процессов колебательной релаксации хромофорной группы и ее ближайшего аминокислотного окружения (рис. 2, а (6); рис. 2, б (6)). Часть возбужденных молекул BR и Rh возвращается в исходное состояние с неизомеризованным РПШО, что определяет квантовый выход реакции.

Сравнительный анализ спектров ф/и-поглощения BR и Rh показывает различия как в положении полос поглощения и вынужденного испускания, так и во времени образования первичных продуктов. В случае BR сигналы из возбужденного состояния (I_{460}) возникают ко времени задержки 100 фс (рис. 2, а (2 и 3); 400–540 нм и 700–880 нм) [42–44]. В течение 1 пс эти сигналы практически полностью исчезают и сменяются положительным сигналом поглощения первого продукта (J_{625}) (рис. 2, а (5)), содержащего РПШО в 13-*цис*-конфигурации. Следующий продукт (K_{590}) образуется в пикосекундном масштабе времени (рис. 2, а (6)).

В случае Rh сигналы из возбужденного состояния (Rh_{510}^*) возникают за время < 30 фс (рис. 2, б (2); 410–480 нм и 620–720 нм) [41, 42], что значительно быстрее, чем в BR. Ко времени задержки 100 фс эти сигналы уже исчезают и сменяются положительным сигналом поглощения первого продукта ($Фото_{570}$), который окончательно образуется к 200 фс после поглощения кванта света (рис. 2, б (3 и 4)) [37, 38, 41, 42]. Следующий продукт ($Бато_{535}$) образуется в течение нескольких пикосекунд (рис. 2, б (5 и 6)).

На рис. 2 приведены кинетические кривые ф/и-поглощения BR и Rh, отражающие образование и распад возбужденного состояния (I_{460} и Rh_{510}^* соответственно; рис. 2, в) и образование первого продукта фотореакции (J_{625} и $Фото_{570}$ соответственно; рис. 2, г). В случае Rh фотореакция протекает значительно быстрее (60 фс) по сравнению с BR (480 фс) [40, 42–44], что хорошо согласуется с данными работ Kochendoerfer и Mathies [51],

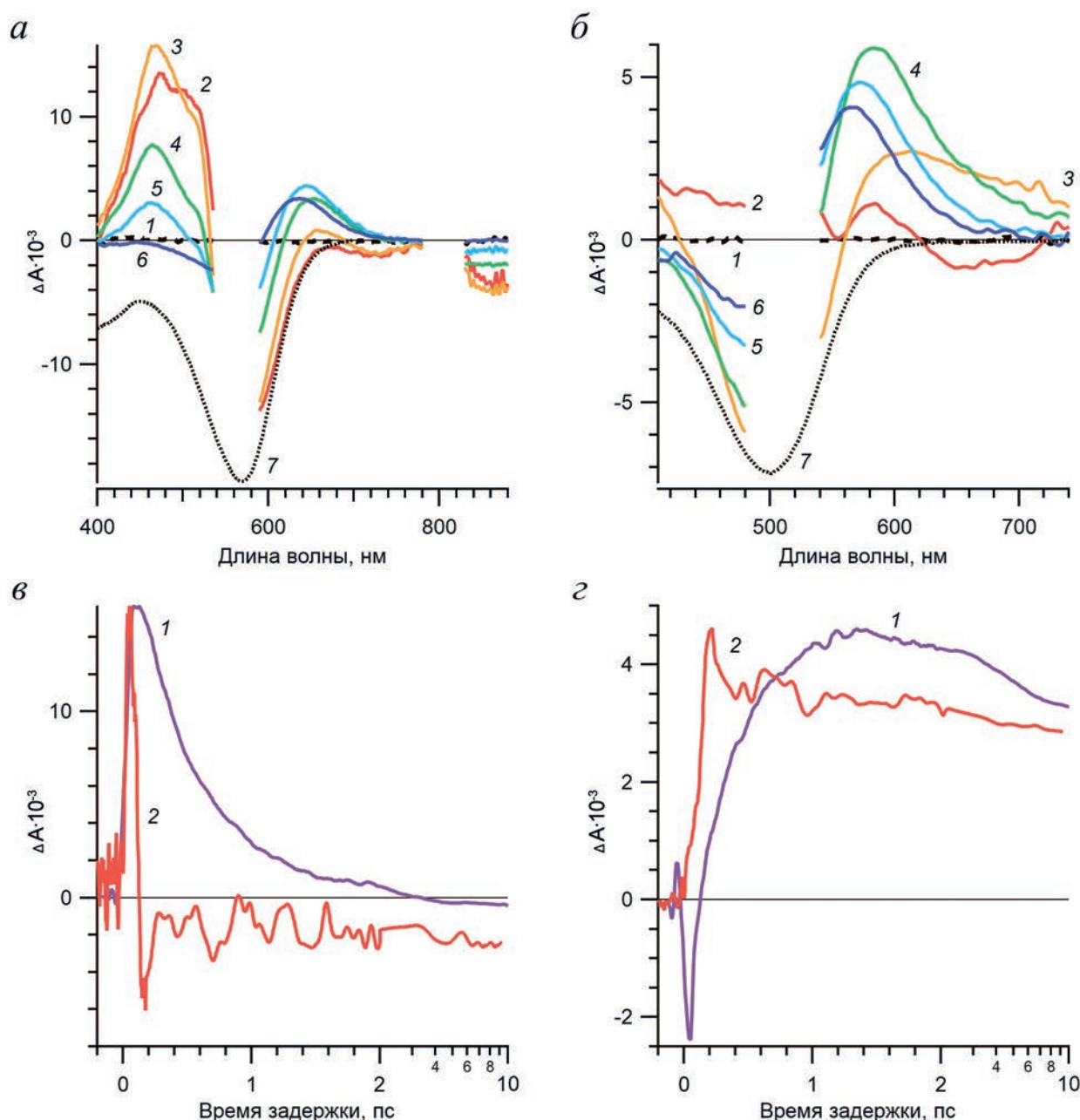


Рис. 2. Прямые фотореакции BR и Rh. *а* – Спектры ф/и-поглощения BR, зарегистрированные на временах задержки: –0,2 (1), 0,05 (2), 0,12 (3), 0,5 (4), 1 (5) и 10 (6) пс. *б* – Спектры ф/и-поглощения Rh, зарегистрированные на временах задержки: –0,2 (1), 0,03 (2), 0,1 (3), 0,2 (4), 0,8 (5) и 10 (6) пс. Стационарные спектры поглощения BR (*а*) и Rh (*б*) представлены с обратным знаком (7). *в, з* – Нормированные кинетические кривые ф/и-поглощения BR (1) и Rh (2), зарегистрированные в полосе поглощения возбужденного состояния (*в*) на длинах волн зондирования 470 (BR) и 410 (Rh) нм и в полосе поглощения продукта фотореакции (*з*) на длинах волн зондирования 640 (BR) и 580 (Rh) нм. Кинетические кривые представлены в линейном масштабе времени задержки до 2 пс и далее – в логарифмическом масштабе. Рисунок адаптирован с разрешения [44]

Polli et al. [52] и Johnson et al. [53, 54]. Время образования второго продукта реакции BR (K_{590}) оценивается в 1,8 пс, а второго продукта реакции Rh (Бато₅₃₅) – в 2,2 пс [44]. Анализ динамики распада возбужденного состояния (как Rh, так и BR) показывает, что в небольшой доле молекул ($\approx 4\%$) возбужденное состояние живет гораздо дольше (2,4 пс), а его

распад приводит к образованию только исходного состояния РСБ, поэтому такой путь распада называется нереакционным [44]. Наличие нескольких путей распада возбужденного состояния, некоторые из которых могут быть нереакционными, в целом характерно для родопсинов I типа [55–58] и в меньшей степени – для родопсинов II типа [59]. Это связывают

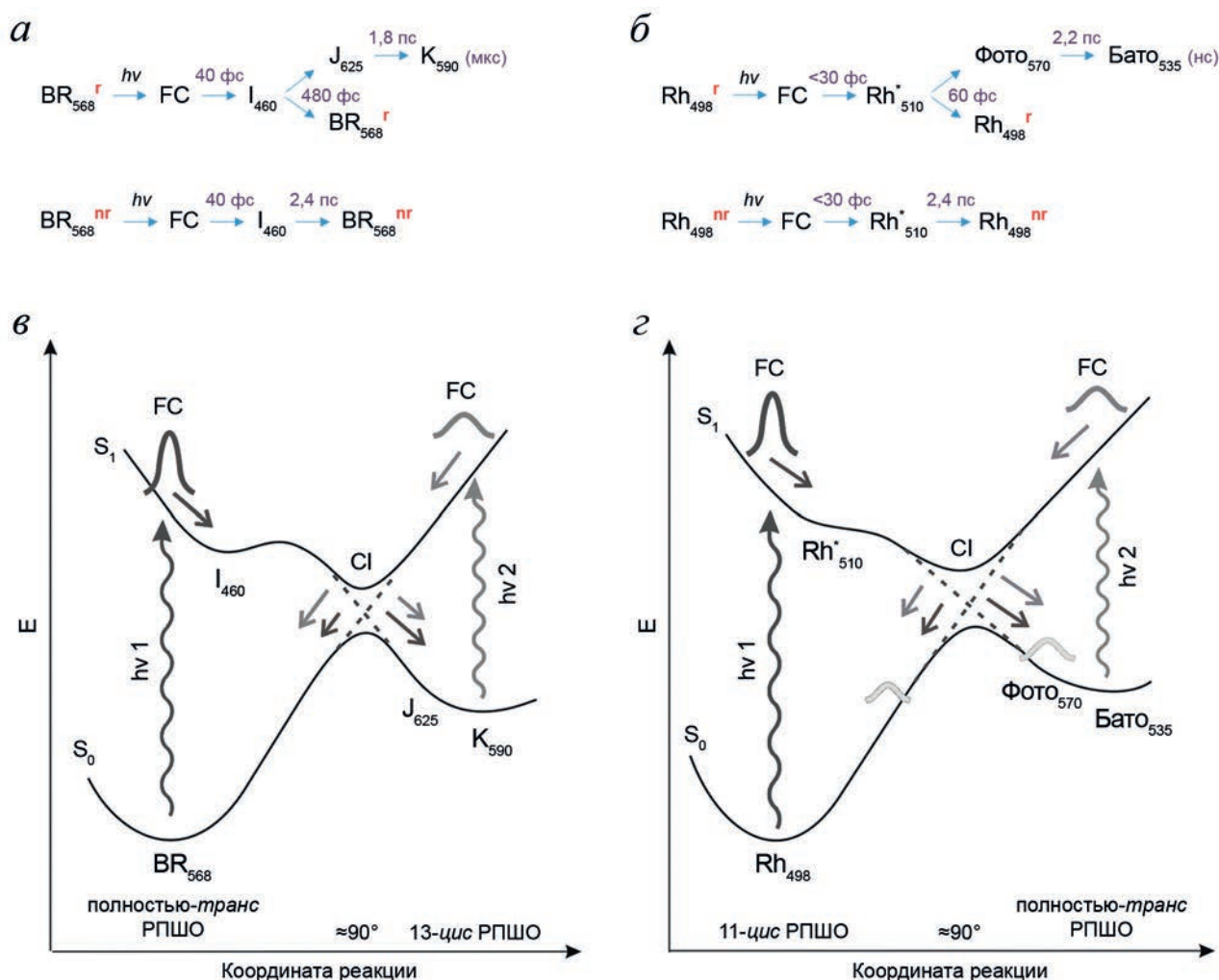


Рис. 3. Кинетические схемы элементарной реакции фотоизомеризации в родопсине I типа – BR (а) и в родопсине II типа – Rh (б). На схемах приведены времена жизни промежуточных состояний и указаны реакционные (индекс «г») и нереакционные (индекс «nr») пути распада возбужденного состояния. Строение поверхностей потенциальной энергии (S_0 и S_1) родопсинов I типа на примере BR (в) и родопсинов II типа на примере Rh (г), показывающее реакционный путь их прямой (темно-серый цвет) и обратной (серый цвет) фотореакций в фемто- и пикосекундном диапазонах времен. FC – франк-кондоновское состояние; CI – коническое пересечение. Рисунок адаптирован с разрешения [42]

с разделением путей реакции во франк-кондоновском состоянии (FC) или с исходной гетерогенностью белковой части молекулы [28, 60]. Последнее предположение было подтверждено для натриевого насоса KR2 бактерии *Krokinobacter eikastus* [49, 57] и для протонных насосов протеородопсина и BR [58]. Соотношение доли возбужденных молекул, претерпевающих изомеризацию, и доли возбужденных молекул, возвращающихся в исходное состояние по реакционному и нереакционному путям, определяет квантовый выход изомеризации, который составляет 0,64 для BR [61] и 0,65 – для Rh [62]. Кинетическая схема и времена наблюдаемых процессов представлены на рис. 3, а и б.

Отличительной особенностью фотореакции РПШО в родопсинах и в растворе явля-

ется наличие осцилляционной составляющей в ее динамике на ранних временах [29, 42, 53, 63, 64]. Фазы и амплитуды этих осцилляций позволили интерпретировать их возникновение как результат нестационарного колебательного движения в возбужденном и основном электронных состояниях реагента и продуктов реакции. В фотохимических реакциях такого типа, вопреки классическим представлениям, образование продукта происходит как результат согласованного движения ядер молекулы и завершается быстрее процессов колебательной релаксации и дефазировки различных колебательных состояний в возбужденном состоянии [65, 66]. Такие реакции называются когерентными и могут быть описаны как движение волнового пакета (набора когерентных возбужденных колебательных

состояний) сначала по S_1 , а потом по S_0 -поверхности потенциальной энергии (ППЭ) вдоль координаты реакции. Такой быстрый переход $S_1 \rightarrow S_0$ возможен из-за наличия многомерной области конического пересечения (conical intersection, CI) S_1/S_0 ППЭ, благодаря которой происходит эффективное и сверхбыстрое преобразование энергии квантов света в химическую энергию [31, 67].

Основные отличия динамики прямых фотореакций BR и Rh связаны со строением S_0 , S_1 и S_2 ППЭ реакционных форм этих родопсинов (рис. 3, в и г), которое определяется как изомерной формой РПШО, так и влиянием на хромофор специфического белкового окружения.

В случае BR, как и других родопсинов I типа, прямая фотореакция описывается моделью трех состояний (S_0 , S_1 и S_2) [26, 28, 55, 68], постулирующей наличие небольшого барьера на пути распада возбужденного состояния S_1 из-за взаимодействия с S_2 ППЭ, что сильно влияет на динамику реакции (рис. 3, в). При возбуждении молекулы BR на S_1 ППЭ образуется состояние FC, которое в результате движения волнового пакета вдоль полносимметричных ($C=C$ и $C-C$) колебательных мод РПШО за время 40 фс переходит в возбужденное состояние I_{460} . Далее волновой пакет начинает двигаться вдоль реакционных колебательных мод — внеплоскостных колебаний атомов водорода $H-C=C-H$ (hydrogen-out-of-plane, HOOP) и торсионных колебаний и, преодолевая небольшой барьер на S_1 ППЭ, достигает области CI с характерным временем 480 фс. В области CI волновой пакет разделяется на два подпакета, один из которых переходит на S_0 ППЭ продукта J_{625} , а второй — на S_0 ППЭ исходного состояния BR_{568} . В результате преодоления барьера на S_1 ППЭ волновой пакет сильно теряет свои когерентные свойства, что видно по отсутствию ярко выраженных осцилляций во время разрешенных сигналах поглощения первого продукта J_{625} (рис. 2, г (1)) [29, 42–44, 55, 56]. Такой тип динамики называется диффузным [26].

В случае Rh, как и других родопсинов II типа, прямая фотореакция описывается моделью двух состояний (S_0 и S_1) (рис. 3, г) [2, 26, 28, 69]. В результате возбуждения молекулы Rh на S_1 ППЭ образуется состояние FC, которое меньше чем за 30 фс переходит в возбужденное состояние Rh_{510}^* , как результат движения волнового пакета вдоль полносимметричных ($C=C$ и $C-C$) колебательных мод РПШО, как и в случае BR. Далее волновой пакет двигается вдоль реакционных внеплоскостных (HOOP и торсионных) колебательных мод, через

≈ 60 фс достигает области CI, где разделяется на два подпакета. Первый подпакет двигается по S_0 ППЭ Фото₅₇₀, что сопровождается колебательной релаксацией этого продукта и отражается в ярко выраженных осцилляциях кинетических кривых (рис. 2, г), а второй подпакет переходит на S_0 ППЭ исходного состояния Rh_{498} , где также продолжает свое движение. Таким образом, переход $S_1 \rightarrow S_0$ волнового пакета в процессе фотореакции Rh происходит быстро, направленно и безбарьерно с сохранением значительной доли когерентности [37, 38, 42, 63]. Такой тип динамики называется баллистическим или импульсным [26, 70].

Для объяснения различий в динамике протекания ф/и-процессов и специфичности реакции фотоизомеризации в BR и Rh были проведены квантово-химические расчеты структуры этих РСБ и проведен анализ активности колебательных мод при фотовозбуждении $S_0 \rightarrow S_1$ и их связи с реакционными модами при безызлучательном переходе $S_1 \rightarrow S_0$.

На рис. 4 показаны оптимизированные структуры полностью-*транс* и 11-*цис* РПШО в основном электронном состоянии в белковом окружении BR и Rh соответственно, полученные при помощи комбинированного метода квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) [48].

В белковом окружении хромофоры оказываются существенно скрученными по реакционным связям (рис. 4, а и в). При этом вне белкового окружения такая скрученность отсутствует и π -сопряженная система является плоской за исключением двойной связи β -ионового кольца. Эта связь в зависимости от конфигурации РПШО либо лежит в плоскости сопряжения остальных пяти двойных связей (6-*s-транс*; рис. 1, а (1)), либо выходит из плоскости сопряжения (6-*s-цис*; рис. 1, а (2)). Необходимо отметить, что в белковом окружении угол выхода двойной связи β -ионового кольца из плоскости сопряжения в BR практически не меняется, тогда как в Rh он значительно увеличивается [48].

Таким образом, белковое окружение действительно способствует изменению конформации и «скручиванию» хромофорной группы, что обусловлено ее взаимодействием с ближайшими аминокислотными остатками в хромофорном центре. Это связано главным образом с образованием водородных связей между протонированным шиффовым основанием и первичным противополоионом, что сильно влияет на торсионный угол реакционной связи. Кроме того, речь идет и о стерических взаимодействиях в области β -ионового кольца ретиналя.

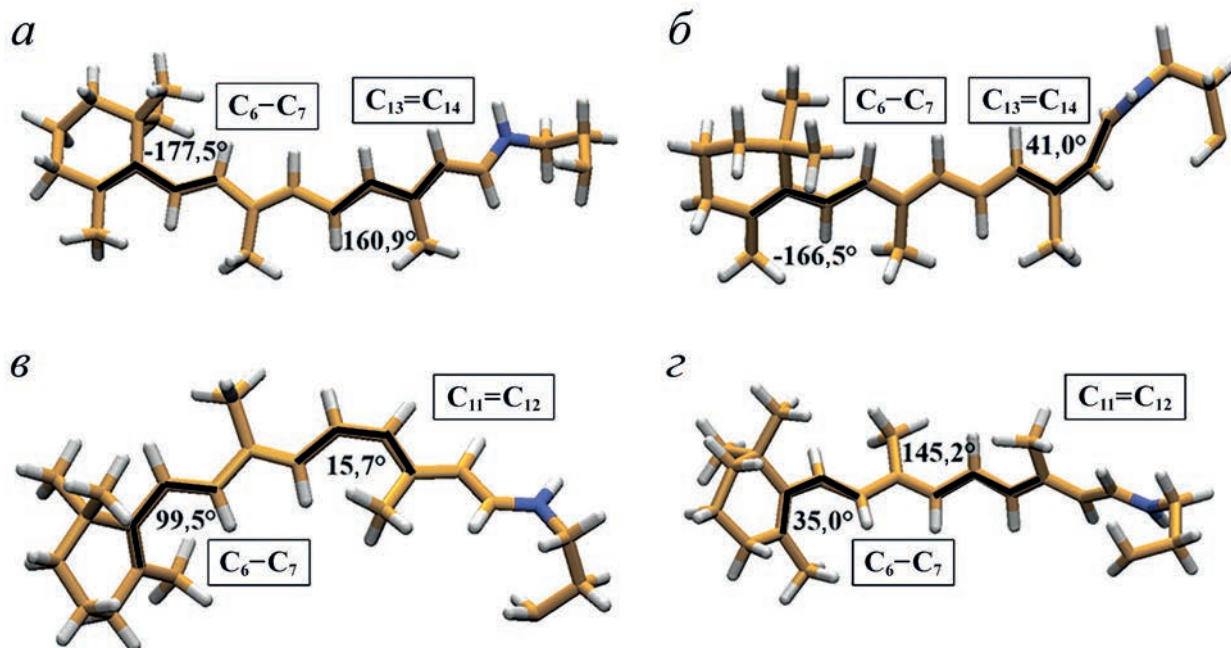


Рис. 4. Оптимизированные структуры реагентов и первичных фотопродуктов BR и Rh — полностью-*транс* РПШО в BR₅₆₈ (а), 13-*цис* РПШО в K₅₉₀ (б), 11-*цис* РПШО в Rh₄₉₈ (в) и полностью-*транс* РПШО в Bato₅₃₅ (г). Черными линиями обозначены двугранные углы, их значения приведены на рисунке

Как и ожидалось, геометрии первичных фотопродуктов оказываются еще более скрученными по реакционным связям из-за их нерелаксированности в белковом окружении, которое на пикосекундных временах еще остается более оптимальным для исходных изомеров РПШО (рис. 4, б и г).

Интересно отметить, что в газовой фазе барьер вращения по одинарной связи C₆—C₇ не превышает 3 ккал/моль [50], что обуславливает практически свободный переход между конформациями 6-*s-транс* и 6-*s-цис* РПШО. Как было отмечено выше, длина цепи π-сопряжения является важным фактором, влияющим на положение длины волны максимума поглощения. Внутримолекулярное вращение по одинарной связи C₆—C₇ приводит к аномально широкому спектру поглощения изомеров РПШО в газовой фазе [71], тогда как белковое окружение может легко влиять на конформацию РПШО в области β-иононового кольца и, в зависимости от величины двугранного угла по связи C₆—C₇, регулировать длину цепи π-сопряжения в хромофоре, тем самым настраивая его поглощение на определенный диапазон. Такой механизм регуляции фотофизических свойств РПШО может лежать в основе спектральной настройки родопсинов II типа. Примечательно, что в BR положение β-иононового кольца не меняется ни по сравнению с газовой фазой, ни при переходе в первичные фотопродукты, тогда как в Rh его конформация пре-

терпевает существенные изменения. Таким образом, конформация β-иононового кольца оказывается менее значимой в родопсинах I типа по сравнению с родопсинами II типа.

О влиянии скрученности по реакционным связям различных изомеров РПШО на динамику фотоизомеризации в белковом окружении можно также судить, исходя из сравнения их с фотооткликом в газовой фазе. Как было отмечено выше, в изолированном состоянии изомеры РПШО обладают плоской структурой основной части π-сопряженной системы. С помощью экспериментов в газовой фазе с фемтосекундным временным разрешением и квантово-химических расчетов было показано, что динамика релаксации электронно-возбужденного состояния S₁ 11-*цис*-изомера РПШО проходит на субпикосекундных временах (400 фс) [32] и сопоставима со сверхбыстрыми временами фотоизомеризации хромофора в Rh (50–100 фс) [40, 42, 51–54]. При этом специфичность реакции и средние времена жизни возбужденного состояния полностью-*транс*-изомера РПШО значительно различаются в изолированном состоянии (3 пс) [32] и белковом окружении BR (≈500 фс) [29, 55, 56, 58]. Важно отметить, что в газовой фазе фотоизомеризация плоского полностью-*транс*-изомера РПШО происходит медленно, но селективно. Наименьший барьер изомеризации в состоянии S₁ наблюдается в случае связи C₁₁=C₁₂, а не связи C₁₃=C₁₄, как в BR.

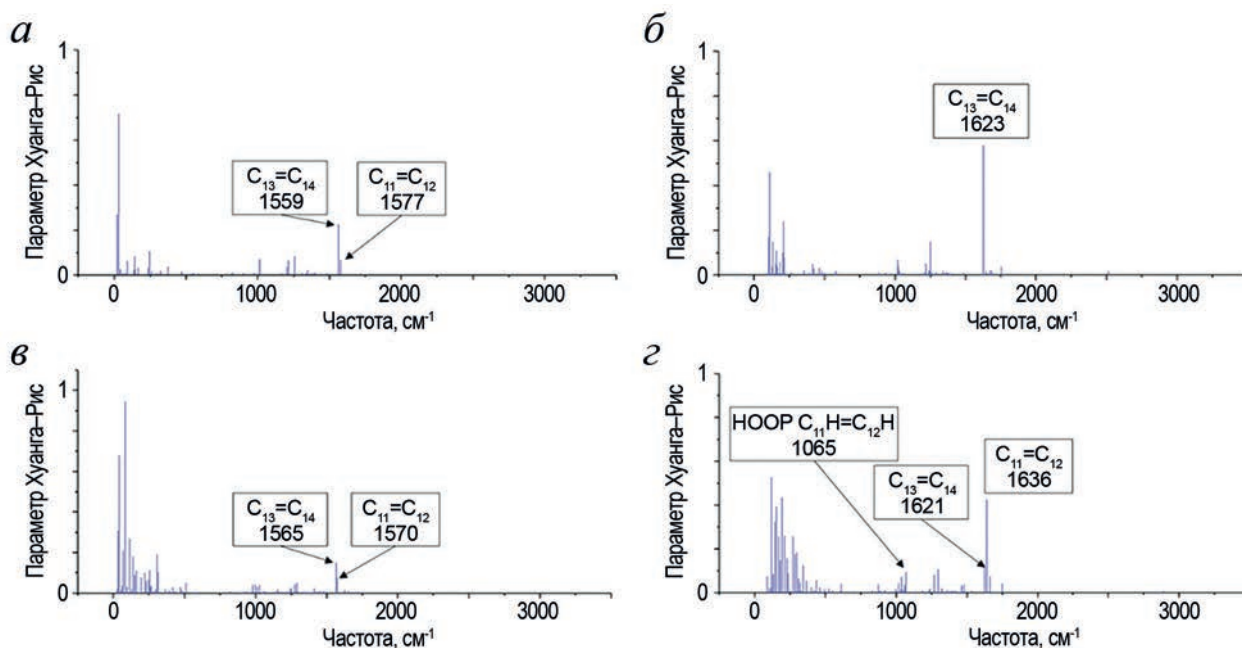


Рис. 5. Активность колебательных мод РПШО при переходе $S_0 \rightarrow S_1$ в газовой фазе и белковом окружении: полностью-*транс* РПШО в газовой фазе (а) и в BR₅₆₈ (б); 11-*цис* РПШО в газовой фазе (в) и в Rh₄₉₈ (г)

Таким образом, влияние белкового окружения является ключевым в случае родопсинов I типа. В случае же родопсинов II типа используется более совершенный, с точки зрения фотохимических свойств, 11-*цис*-изомер РПШО. При этом в Rh реакция идет на сверхкоротких временах, что также говорит о важном влиянии белкового окружения в хромофорном центре. Это отличие приводит к протеканию первичной фотохимической реакции в родопсинах II типа в ярко выраженном когерентном режиме.

Влияние конформации реакционных связей РПШО на динамику фотоизомеризации независимо подтверждено и при изучении химически модифицированного полностью-*транс*-хромофора, скрученного по одной из двойных связей. Изменение конформации РПШО по реакционной связи приводит к значительному уменьшению величины барьера фотоизомеризации и к субпикосекундным временам, что характерно для реакции в белковом окружении [47].

Скрученность по реакционной связи в электронном состоянии S_0 не только изменяет топографию ППЭ в состоянии S_1 , уменьшая барьер фотоизомеризации, но и способствует одновременному возбуждению определенных колебательных мод при переходе $S_0 \rightarrow S_1$ [48, 49]. Происходит возбуждение как валентных колебаний, локализованных преимущественно на реакционной двойной связи, так и НООР-колебаний при этой связи. При этом белко-

вое окружение BR способствует возбуждению колебаний связи $C_{13}=C_{14}$, тогда как в случае Rh белковое окружение способствует возбуждению колебаний связи $C_{11}=C_{12}$. Об активности колебательных мод при фотовозбуждении можно судить по смещениям минимумов ППЭ состояний S_0 и S_1 вдоль этих мод. Смещения характеризуют изменения геометрии хромофора в S_1 -состоянии по сравнению с S_0 . Определенное колебание будет тем активнее при фотовозбуждении, чем больше смещение вдоль этой моды. Удобным безразмерным параметром, по которому можно судить об активности колебательной моды при электронном переходе, является так называемый фактор Хуанга–Рис, который связан с квадратом смещения вдоль нормальной моды в гармоническом приближении. На рис. 5 представлены факторы Хуанга–Рис для полностью-*транс* и 11-*цис* РПШО в белковом окружении и газовой фазе, рассчитанные при помощи метода КМ/ММ с использованием многоконфигурационной квазивыврожденной теории возмущений второго порядка [48, 49].

В газовой фазе у плоских изомеров полностью-*транс* и 11-*цис* РПШО при возбуждении в состояние S_1 активны два высокочастотных валентных колебания связей $C_{11}=C_{12}$ и $C_{13}=C_{14}$. В случае BR активность колебательной моды, локализованной на связи $C_{13}=C_{14}$, становится значительно больше по сравнению с газовой фазой, а валентное колебание связи $C_{11}=C_{12}$ полностью пропадает. В случае же Rh,

наоборот, интенсивность моды, связанной с колебаниями связи $C_{11}=C_{12}$, заметно увеличивается, а интенсивность моды $C_{13}=C_{14}$ уменьшается. Более того, в Rh также становятся активными внеплоскостные НООР-колебания атомов водорода при связи $C_{11}=C_{12}$.

Таким образом, увеличение скрученности по реакционной связи способствует увеличению активности соответствующего валентного колебания при фотовозбуждении. Следует отметить, что специфичность фотоотклика РПШО и активность колебаний, способствующих фотоизомеризации по определенной двойной связи (в данном случае валентные и НООР-колебания), в большей степени характерны именно для Rh. Это коррелирует с очень высокой скоростью фотохимической реакции в этом родопсине II типа. Важным фактором также является возможность возбуждения различного типа реакционных мод в одинаковой фазе, что способствует когерентному протеканию реакции в Rh.

Таким образом, результаты квантово-химических расчетов позволили объяснить обнаруженную экспериментально разницу в динамике протекания ф/и-процессов в BR и Rh. Основным фактором, влияющим на эти процессы и определяющим различие в динамике протекания фотореакции в обоих случаях, является белковое окружение РПШО. Фотоотклик хромофорной группы в родопсинах I и II типа становится высоко специфичным по сравнению с газовой фазой уже на ранних временах, приводя к возбуждению определенных колебательных мод, способствующих изомеризации по реакционной связи. Хромофор 11-*цис* РПШО родопсинов II типа является более быстрым и селективным по сравнению с полностью-*транс* РПШО BR. Кроме этого, белковое окружение Rh приводит к возбуждению не только валентных колебаний реакционной связи, но и внеплоскостных колебаний атомов водорода при этой связи, непосредственно приводящих к реакции фотоизомеризации. Необходимо также отметить, что конформация β -иононового кольца 6-*s-цис*—11-*цис* изомера РПШО, по всей видимости, является важным фактором регуляции фотофизических свойств хромофорной группы родопсинов II типа, что связано с механизмом спектральной настройки.

Таким образом, судя по всему, эволюционно более «молодые» родопсины II типа обладают более совершенными хромофорным центром опсина и изомерной формой хромофора для осуществления эффективной прямой фотохимической реакции.

Фотохромизм родопсинов I и II типов. Родопсины обладают фотохромными свойствами [30, 34, 61, 72], то есть способностью осуществлять фотопереходы из промежуточных продуктов прямой фотореакции обратно в исходное состояние. Эта способность, реализуемая в природе в ряде родопсинов, начиная с наносекундного временного диапазона, служит для выполнения определенных физиологических функций в таких родопсинах I типа, как сенсорный родопсин I *H. salinarum* [73], сенсорный родопсин цианобактерии *Anabaena* sp. [29] и канальный родопсин одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [74] и в таких родопсинах II типа, как зрительные родопсины беспозвоночных [75–77] и близкородственные им меланопсины позвоночных [78].

Несмотря на то что на первых стадиях фотопревращения родопсинов обратные фотопереходы в природе практически не реализуются, тем не менее изучение такого сверхбыстрого фотохромизма в условиях *in vitro* может дать дополнительные сведения о молекулярных механизмах фотохимической реакции этих РСБ. В данном обзоре представлены результаты наших исследований по изучению обратной фотореакции BR и Rh, инициированной в фемто- и раннем пикосекундном временных диапазонах [39, 41, 42].

На рис. 6 представлен спектр ф/и-поглощения BR, зарегистрированный на времени задержки 100 пс после действия первого возбуждающего импульса с длиной волны 560 нм (импульс 1) и состоящий из полосы поглощения продукта K_{590} и полосы выцветания исходного состояния BR_{568} (рис. 6, а (1)). Вторым возбуждающий импульс с длиной волны 680 нм (импульс 2), следующий с задержкой 5 пс, возбуждает молекулы K_{590} , часть из которых в результате обратной фотореакции (13-*цис* $\rightarrow$ полностью-*транс* РПШО) возвращается в исходное состояние BR_{568} . При этом уменьшается темновое образование продукта K_{590} и увеличивается поглощение исходного состояния BR_{568} (рис. 6, а (2)). Квантовый выход обратной фотореакции BR из продукта K_{590} составляет 0,81 [16], что согласуется с данными работ Kim et al. [61] и Balashov et al. [79]. Обратный фотопереход может быть осуществлен не только из продукта K_{590} (рис. 6, а (вставка: 3 и 5 пс)), но и из продукта J_{625} (рис. 6, а (вставка: 1 пс)) примерно с одинаковой эффективностью [42].

В случае Rh действие импульса 2 (620 нм), следующего с задержкой относительно импульса 1 (500 нм) 0,2–3,8 пс, также приводит

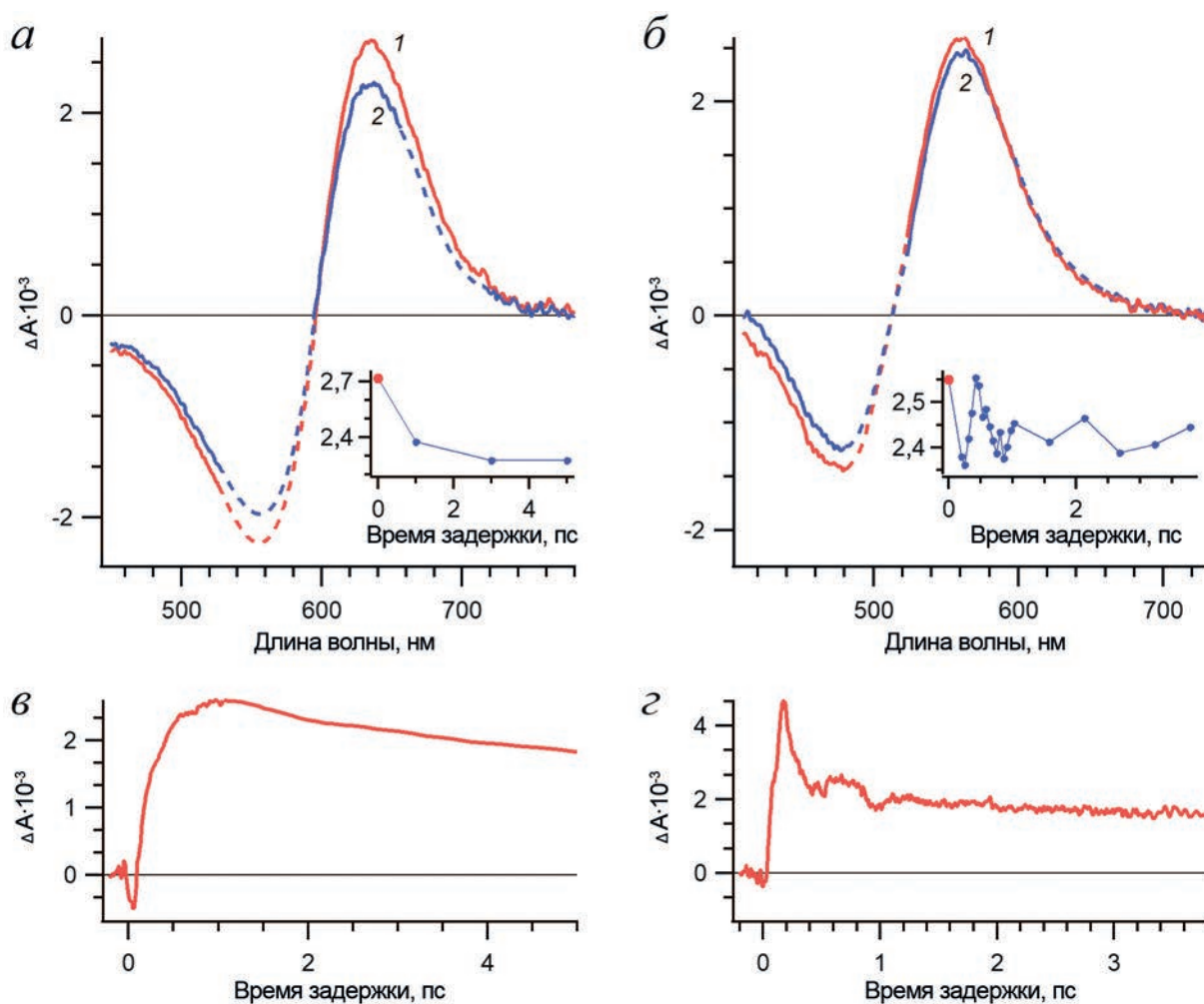


Рис. 6. Обратные фотореакции BR и Rh. *а, б* – Спектры ф/и-поглощения BR (*а*) и Rh (*б*), зарегистрированные на времени задержки зондирования 100 пс после действия одного (1) и двух (2) возбуждающих импульсов с задержкой второго возбуждающего импульса 5 пс (*а*) и 200 фс (*б*). В спектральных областях прохождения возбуждающих импульсов экспериментальные кривые были достроены модельными кривыми (пунктирные кривые). Вставка: значения ф/и-поглощения BR (*а*) и Rh (*б*), зарегистрированные на длинах волн зондирования 635 нм (*а*) и 560 нм (*б*) до и после действия второго возбуждающего импульса в зависимости от его времени задержки. *в, з* – Кинетические кривые ф/и-поглощения BR (*в*) и Rh (*з*), зарегистрированные после действия одного возбуждающего импульса на длинах волн зондирования 680 нм (*в*) и 620 нм (*з*). Рисунок адаптирован с разрешения [41, 42]

к индуцированию обратной фотореакции (рис. 6, б) [39, 41, 42, 46]. В зависимости от задержки импульса 2 происходит обратный фотопереход (полностью-*транс* → 11-*цис* РПШО) из продукта Фото₅₇₀ (рис. 6, б (вставка: 0,2–2 пс)) или из продукта Бато₅₃₅ (рис. 6, б (вставка: 3–3,8 пс)). Эффективность обратной фотореакции Rh из продукта Фото₅₇₀ зависит от фазы осцилляций во время разрешенных сигналах поглощения этого продукта (рис. 6, б (вставка); рис. 6, з), а время этой фотореакции сравнимо или меньше времени прямой фотореакции [41]. Квантовый выход обратной фотореакции Rh из продукта Бато₅₃₅ составляет 0,15 [41, 42, 46], что значительно меньше значения (0,5), полученного ранее при 77 К в работе Suzuki и Callender [80].

Обратный фотохимический процесс BR и Rh, индуцированный на ранних стадиях, можно описать как движение волнового пакета вдоль правой ветви S_1 ППЭ продуктов исходной фотохимической реакции в направлении области CI S_1/S_0 ППЭ (рис. 3, в и з). Для Rh теоретические расчеты показали, что это та же область CI, которая участвует в прямой фотореакции [81]. Переход молекул из возбужденного состояния S_1 на S_0 ППЭ через область CI приводит к образованию тех же состояний, что и в процессе прямой фотореакции: BR₅₆₈ и J₆₂₅ – в случае BR; Rh₄₉₈ и Фото₅₇₀ – в случае Rh. Если эффективность обратной фотореакции BR практически не зависит от времени задержки импульса 2 (рис. 6, а (вставка)), то для Rh она напрямую коррелирует

с динамикой волнового пакета в продукте Фото₅₇₀ (рис. 6, б (вставка); рис. 6, г), что связано с ярко выраженным когерентным характером прямой фотореакции Rh. В данном случае эффективность обратной фотореакции коррелирует с количеством молекул продукта Фото₅₇₀, возбужденных импульсом 2.

Скорость обратной фотохимической реакции в родопсинах сильно зависит от конкретной изомерной формы РПШО. Фотопереход из *транс*- в *цис*-форму обычно протекает медленнее по сравнению с фотопереходом *цис* → *транс*, и это наблюдается как в белке, так и в газовой фазе, и растворе [26, 29, 32, 52, 57, 58, 82]. Это различие обусловлено строением S₀, S₁ и S₂ ППЭ, как было описано выше на примерах BR и Rh (рис. 3, в и г). В работе Gai et al. [56] было показано, что в случае BR при возбуждении продукта K₅₉₀ обратная фотохимическая реакция из 13-*цис*- в полностью-*транс*-форму РПШО проходит за время ≈ 100 фс, что значительно короче, чем время протекания прямой фотореакции (480 фс). Можно предположить, что для Rh будет наблюдаться обратная закономерность. Однако, как было показано экспериментально для продукта Фото₅₇₀ [41] и теоретически для продукта Бато₅₃₅ [81], время обратного фотоперехода из полностью-*транс*- в 11-*цис*-форму РПШО сравнимо или меньше времени прямого фотоперехода (60 фс). Предположительно, на скорость (и селективность) обратной фотохимической реакции BR и Rh влияет значительный поворот реакционной связи хромофора в их первичных продуктах на угол от -39° до -20° и от -36° до -34,8° соответственно [31, 83]. Это позволяет быстро и безбарьерно достичь области С1 даже в случае перехода *транс* → *цис*, как это имеет место в случае обратной фотореакции Rh.

Следует подчеркнуть, что если квантовые выходы прямой фотореакции BR и Rh практически совпадают (≈ 0,65), то квантовые выходы их обратной фотореакции из первых фотопродуктов сильно отличаются — 0,81 и 0,15 соответственно. Согласно теоретическим расчетам [31, 81], квантовый выход образования продукта, как прямой, так и обратной фотореакций родопсинов, определяется соотношением фаз НООР и торсионных колебательных мод РПШО в момент перехода S₁ → S₀. Также немаловажную роль в эффективности фотореакции играет исходное заселение C=C и НООР колебательных мод при реакционной связи при возбуждении, как было сказано выше. В растворе метанола фотореакции 13-*цис* → полностью-*транс* и полно-

стью-*транс* → 11-*цис* РПШО идут с квантовыми выходами, близкими по значению (0,11 и 0,14 соответственно) [84]. Исходя из этого можно заключить, что столь различные квантовые выходы аналогичных обратных фотореакций BR и Rh определяются специфическим влиянием белкового окружения в хромофорном центре.

Можно отметить, что, с функциональной точки зрения, столь малый квантовый выход обратной фотореакции Rh, по сравнению с BR, является преимуществом, способствующим более надежному осуществлению прямой реакции, запускающей процесс фототрансдукции. Поглощение света родопсинами I типа служит в основном фотоэнергетической функции, как в случае BR, и обратные фотореакции, вполне вероятно, не могут существенно повлиять на ее эффективность. Однако в случае родопсинов II типа, которые являются G-белок-связывающими рецепторами, 11-*цис* РПШО действует как эффективный лиганд-антагонист, поддерживающий низкий тепловой «темновой» шум фоторецепторной клетки. При поглощении света изомеризованный полностью-*транс* РПШО превращается в мощный лиганд-агонист, и активированный Rh инициирует процесс фототрансдукции. В этом случае вероятность возникновения обратной фотореакции может значительно снизить эффективность запуска процесса фототрансдукции.

Таким образом, меньшая эффективность обратной фотореакции Rh, повышающая надежность прямой фотореакции, может рассматриваться как один из аргументов в пользу отбора в ходе эволюции 11-*цис*-изомера в качестве хромофорной группы родопсинов II типа. Это свидетельствует о более совершенном строении хромофорного центра Rh и выборе в процессе эволюции такого хромофора (11-*цис* РПШО), который позволяет эффективно осуществлять процесс фототрансдукции. Естественно, в реальных, физиологических условиях вероятность попадания второго кванта света на столь короткоживущий интермедиат фотолиза Rh, как Бато₅₃₅ и тем более Фото₅₇₀, крайне низка, однако потенциальная возможность снижения вероятности обратной фотореакции в структуре Rh и его хромофорного центра заложена.

Вместе с тем совершенно очевиден физиологический смысл обратных фотохимических реакций родопсинов II типа беспозвоночных животных с поздних промежуточных стадий фотопревращения. У большинства беспозвоночных животных это один из основных путей

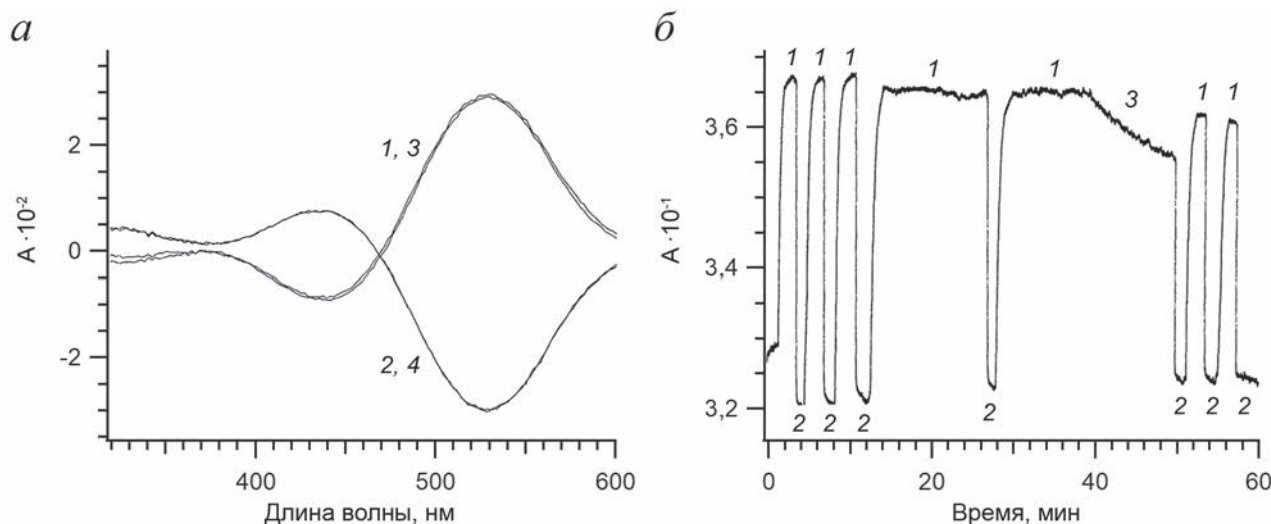


Рис. 7. Фотохромные реакции родопсина осьминога. *а* – Дифференциальные спектры двух последовательных циклов родопсина осьминога, демонстрирующие обратимое фотопревращение родопсина в кислый метародопсин: метародопсин минус родопсин (1 и 3, после освещения синим светом) и фоторегенерированный родопсин минус метародопсин (2 и 4, после освещения красным светом). *б* – Фотообратимость родопсина осьминога, зарегистрированная на длине волны максимума кислого метародопсина 528 нм при действии синего света (1), красного света (2) и в темноте (3). Рисунок адаптирован с разрешения [76]

регенерации (фоторегенерации) зрительного пигмента [75, 77]. Например, конечным продуктом прямой фотореакции родопсина осьминога является так называемый кислый метародопсин, а обратной – снова родопсин (рис. 7, *а*) [76].

В ходе прямой фотореакции образуется несколько интермедиатов с разными спектрами поглощения, а в ходе обратной – только два состояния, соответствующие конформационным изменениям сначала вблизи хромофора, а затем во всем белке, которые возвращают родопсин в исходное состояние. Как нами было показано на детергентных экстрактах родопсина осьминога, фотообратимая реакция родопсина II типа беспозвоночных животных исключительно стабильна, в условиях *in vitro* она может быть повторена многократно в течение достаточно длительного времени (рис. 7, *б*) [76].

Сравнение механизмов фотопревращения родопсинов I и II типов. При сравнении первичных реакций фотопревращения BR и Rh можно выделить как общие, так и отличительные особенности. Модельные кинетические схемы (рис. 3, *а* и *б*) имеют много общего и отражают предположение, что гетерогенность возбужденных состояний исследуемых родопсинов связана с гетерогенностью их начальных состояний. В BR и Rh в процессе реакции образуются аналогичные по своим свойствам интермедиаты: I_{460} , J_{625} , K_{590} и Rh_{510}^* , Фото $_{570}$, Бато $_{535}$ соответственно. Элементарный акт изомеризации РПШО протекает в возбуж-

денном состоянии путем перехода через CI S_1/S_0 ППЭ, и время этого перехода находится в фемтосекундном диапазоне. Первые продукты ф/и-превращения BR и Rh с изомеризованным РПШО (J_{625} и Фото $_{570}$ соответственно) образуются в основном (S_0) состоянии и являются колебательно-возбужденными предшественниками следующих продуктов (K_{590} и Бато $_{535}$ соответственно), образующихся в масштабе нескольких пикосекунд. На этом этапе завершается изомеризация РПШО, а в напряженной структуре продуктов K_{590} и Бато $_{535}$ запасается часть энергии кванта света. Квантовый выход прямых фотореакций BR и Rh практически совпадает ($\approx 0,65$). Реакция фотоизомеризации РПШО в BR и Rh, как и в других родопсинах, а также и в растворе протекает когерентно, что является внутренним свойством хромофора.

Динамика и эффективность фотореакции РПШО в родопсинах зависит от его изомерной формы (посредством длины сопряженных π -связей) и взаимодействия с белковым окружением, что приводит не только к дополнительному скручиванию хромофора, но и к сильным электростатическим взаимодействиям с противоионом. Эти факторы влияют на структуру S_0 , S_1 и S_2 ППЭ хромофора, например, уменьшая барьер на S_1 ППЭ в родопсинах I типа, что сильно влияет на скорость и когерентный характер реакции. Также меняется активность определенных колебательных мод при электронном переходе $S_0 \rightarrow S_1$. Селективное и одновременное возбуждение колебательных мод,

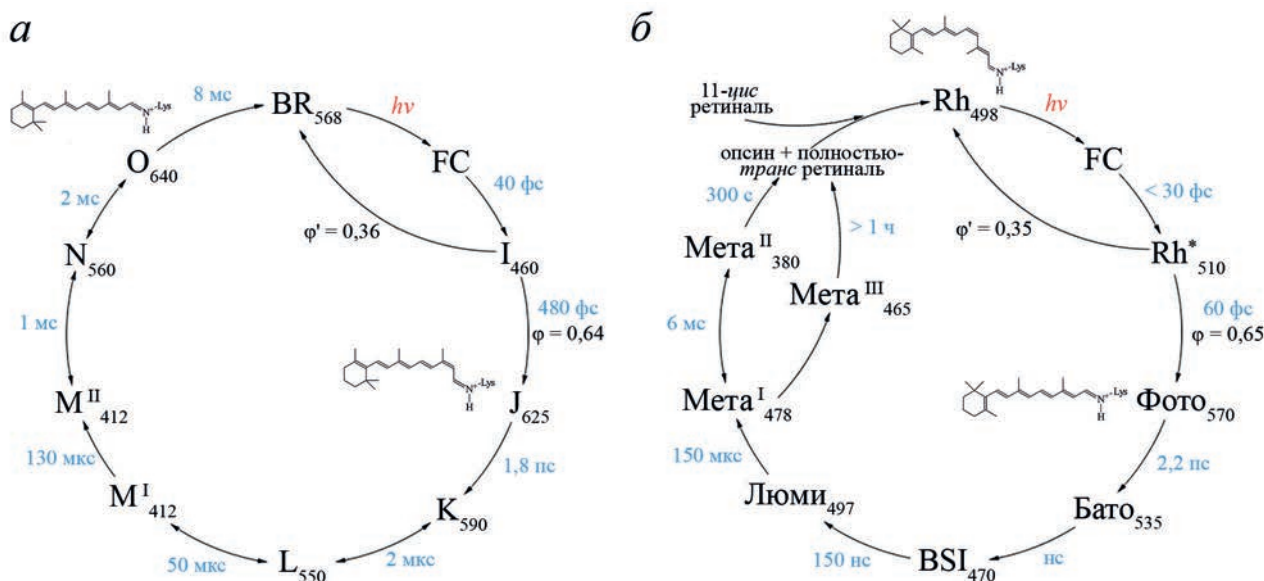


Рис. 8. Схемы фотоцикла родопсинов I типа на примере BR (а) и фотолиза родопсинов II типа позвоночных животных на примере Rh (б)

связанных с реакционными модами безызлучательного перехода $S_1 \rightarrow S_0$ в продукты реакции, уже на ранних этапах ф/и-динамики приводит к высокой скорости и большому квантовому выходу реакции фотоизомеризации.

Можно заключить, что взаимодействие РПШО с опсином существенно повышает скорость и квантовый выход фотореакции по сравнению с наблюдаемыми в газовой фазе и растворе, а селективность реакции достигает 100%. Наиболее тонкая регуляция этих параметров осуществляется в родопсинах II типа, в которых фотореакция имеет более выраженный когерентный характер. Хромофор-белковые взаимодействия также могут быть причиной возникновения гетерогенности начального состояния РСБ, поскольку в газовой фазе она не наблюдается [32].

Уменьшение длины цепи π -сопряжения в 6-*s-цис*–11-*цис* РПШО по сравнению с полностью-*транс*-изомером также приводит к сдвигу максимума поглощения родопсина в синюю область и, что очень важно, к увеличению барьера тепловой 11-*цис* $\rightarrow$ *транс* изомеризации [26]. Первый эффект активно используется родопсинами II типа как один из факторов для спектральной настройки. Второй имеет большое значение для уменьшения «темнового шума» фоторецепторной клетки, чему также сильно способствует ограниченный объем хромофорного центра [85]. В случае же BR и некоторых других родопсинов I типа хромофорный центр достаточно просторный и не препятствует тепловой *транс* $\rightarrow$ 13-*цис* изомеризации, происходящей в темноте.

Все перечисленные выше особенности 11-*цис* РПШО крайне важны для функционирования родопсинов II типа, выполняющих фотоинформационную функцию. Возможно, именно поэтому 11-*цис* РПШО был выбран в ходе эволюции в качестве хромофорной группы зрительных родопсинов и беспозвоночных, и позвоночных животных.

Следует подчеркнуть, что, хотя реакция фотоизомеризации является общей для родопсинов I и II типа, конечная стадия фотоактивируемых процессов существенно различается. В родопсинах I типа 13-*цис* РПШО на одной из последних стадий претерпевает тепловую изомеризацию обратно в полностью-*транс*-форму, замыкая фотоактивируемые процессы в фотоцикл (рис. 8. а). В родопсинах II типа большинства беспозвоночных животных для замыкания цикла требуется поглощение второго кванта света одним из долгоживущих промежуточных продуктов фотопревращения. В родопсинах II типа позвоночных животных цикл не замыкается, и изомеризованный полностью-*транс*-ретиналь высвобождается из хромофорного центра опсина, что называется «фотообесцвечиванием» или фотолизом родопсина (рис. 8, б). Иными словами, молекула родопсина II типа позвоночных животных — это молекула однократного действия. Для ее дальнейшей работы — регенерации родопсина — требуется доставка в хромофорный центр нового ретиналя в 11-*цис*-форме (подробнее см. в обзоре Островского и Фельдман [20]).

Принципиальная похожесть первичных фотохимических реакций родопсинов I и II типов

и их существенное различие на последующих стадиях фотопревращения ярко проявились в их фотоэлектрических реакциях. В конце 70-х—начале 80-х гг., используя разработанный Л.А. Драчевым метод [86], мы совместно с ним и группой В.П. Скулачева подробно сравнили генерацию фотопотенциала Rh на фоторецепторной мембране дисков палочек и BR на пурпурной мембране галоархей [87–89]. Как и следовало ожидать, как переход полностью-*транс* → 13-*цис* в BR, так и переход 11-*цис* → полностью-*транс* в Rh сопровождаются возникновением быстрого фотоэлектрического ответа. Однако и в этом есть существенное различие: если генерация потенциала на пурпурной мембране сопровождается еще и переносом протона, что принципиально важно для фотоэнергетической функции BR, то в случае Rh такой перенос отсутствует. Именно с этого момента физиологические пути BR и Rh расходятся. Отсутствие переноса протона через фоторецепторную мембрану диска было нами затем показано в прямом эксперименте [90].

В случае Rh одновременно с разделением зарядов происходят конформационные изменения белковой части молекулы, что приводит на стадии метародопсина II сначала к быстрому депротонированию РПШО, а затем к медленному высвобождению протона во внешнюю среду [91]. В результате всех этих конформационных перестроек Rh на стадии метародопсина II приобретает способность взаимодействовать с G-белком (трансдуцином) и запускать процесс фототрансдукции [24, 92]. По своим характерным временам и по полярности быстрый компонент фотоответа Rh является, по существу, так называемым ранним рецепторным потенциалом, который регистрируется при обычном электрофизиологическом отведении от сетчатки [93].

В то время как BR, фотоактивируемые процессы которого замкнуты в фотоцикл, генерирует на пурпурной мембране устойчивый электрический потенциал в течение всего периода освещения, в случае Rh, претерпевающего фотолиз, быстрый фотоэлектрический ответ необратимо падает задолго до выключения света и на повторное включение света никак не реагирует [88, 89].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно заключить, что сходство фотохимии родопсинов I и II типов связано с природой общей хромофорной груп-

пы — ретиналем, который во многом определяет механизм фотореакции как ключевой стадии функционирования РСБ. А наблюдаемые различия в характере фотореакции родопсинов I и II типов, судя по всему, определяются различной изомерной формой хромофора, выбранной в процессе эволюции в соответствии с выполняемыми ими функциями. В рамках теории конвергентной эволюции родопсинов I и II типа можно предположить, что похожие и вместе с тем пластичные 7- α -спиральные белковые структуры этих двух типов совершенствовались независимо, движимые в том числе необходимостью оптимизации электронных свойств своих хромофорных групп в полностью-*транс* и 11-*цис* изомерных формах.

Сходство структуры и механизма работы такой сложной молекулярной системы, как ретиналь-содержащие трансмембранные светочувствительные белки, явилось результатом давления естественно отбора при, подчеркнем, определенных физико-химических ограничениях. Сам же этот отбор был направлен на максимально эффективное выполнение функции каждым из типов родопсинов.

Совершенно очевидно, что механизмы эволюции на молекулярном и субмолекулярном уровнях всех трех известных в настоящее время типов РСБ — микробных (I тип), животных (II тип) и сравнительно недавно обнаруженных гелиородопсинов (III тип) — еще ждут своего дальнейшего подробного изучения.

Вклад авторов. М.А. Островский — концепция и руководство работой; М.А. Островский, О.А. Смитиенко, А.В. Боченкова, Т.Б. Фельдман — написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-795, внутренний № 13.1902.21.0027).

Благодарности. Авторы выражают благодарность м.н.с, к.ф.-м.н. П.А. Кусочек и В.В. Логвинову за проведение части квантово-химических расчетов. Расчеты проведены с использованием вычислительного кластера лаборатории квантовой фотодинамики химического факультета, закупленного по программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Spudich, J. L., Yang, C.-S., Jung, K.-H., and Spudich, E. N. (2000) Retinylidene proteins: Structures and functions from archaea to humans, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 365-392, doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.365.
- Ernst, O. P., Lodowski, D. T., Elstner, M., Hege- mann, P., Brown, L. S., and Kandori, H. (2014) Microbial and animal rhodopsins: Structures, functions, and molecular mechanisms, *Chem. Rev.*, **114**, 126-163, doi: 10.1021/cr4003769.
- Nagata, T., and Inoue, K. (2021) Rhodopsins at a glance, *J. Cell Sci.*, **134**, jcs258989, doi: 10.1242/jcs.258989.
- Rozenberg, A., Inoue, K., Kandori, H., and Bèjà, O. (2021) Microbial rhodopsins: The last two decades, *Annu. Rev. Microbiol.*, **75**, 427-447, doi: 10.1146/annurev-micro-031721-020452.
- Gordeliy, V., Kovalev, K., Bamberg, E., Rodriguez-Valera, F., Zinovev, E., Zabelskii, D., Alekseev, A., Rosselli, R., Gushchin, I., and Okhrimenko, I. (2022) Microbial rhodopsins, in *Rhodopsin* (Gordeliy, V., ed) *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 1-52, Humana, New York, NY, doi: 10.1007/978-1-0716-2329-9_1.
- Kandori, H. (2020) Biophysics of rhodopsins and optogenetics, *Biophys. Rev.*, **12**, 355-361, doi: 10.1007/s12551-020-00645-0.
- Pushkarev, A., Inoue, K., Larom, S., Flores-Urbe, J., Singh, M., Konno, M., Tomida, S., Ito, S., Nakamura, R., Tsunoda, S. P., Philosof, A., Sharon, I., Yutin, N., Koonin, E. V., Kandori, H., and Bèjà, O. (2018) A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics, *Nature*, **558**, 595-599, doi: 10.1038/s41586-018-0225-9.
- Luk, H. L., Melaccio, F., Rinaldi, S., and Olivucci, M. (2015) Molecular bases for the selection of the chromophore of animal rhodopsins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 15297-15302, doi: 10.1073/pnas.1510262112.
- Mackin, K. A., Roy, R. A., and Theobald, D. L. (2014) An empirical test of convergent evolution in rhodopsins, *Mol. Biol. Evol.*, **31**, 85-95, doi: 10.1093/molbev/mst171.
- Shalaeva, D. N., Galperin, M. Y., and Mulkidjanian, A. Y. (2015) Eukaryotic G protein-coupled receptors as descendants of prokaryotic sodium-translocating rhodopsins, *Biol. Direct*, **10**, 63, doi: 10.1186/s13062-015-0091-4.
- Kojima, K., and Sudo, Y. (2023) Convergent evolution of animal and microbial rhodopsins, *RSC Adv.*, **13**, 5367-5381, doi: 10.1039/d2ra07073a.
- Krishnan, A., Almen, M. S., Fredriksson, R., and Schiöth, H. B. (2012) The origin of GPCRs: Identification of mammalian like *rhodopsin*, *adhesion*, *glutamate* and *frizzled* GPCRs in fungi, *PLoS One*, **7**, e29817, doi: 10.1371/journal.pone.0029817.
- Feuda, R., Hamilton, S. C., McInerney, J. O., and Pisani, D. (2012) Metazoan opsin evolution reveals a simple route to animal vision, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 18868-18872, doi: 10.1073/pnas.1204609109.
- Feuda, R., Menon, A. K., and Göpfert, M. C. (2022) Rethinking opsins, *Mol. Biol. Evol.*, **39**, doi: 10.1093/molbev/msac033.
- Zhai, Y., Heijne, W. H., Smith, D. W., and Saier, M. H., Jr. (2001) Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi: Structural and functional predications for a putative fungal chaperone protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1511**, 206-223, doi: 10.1016/s0005-2736(00)00389-8.
- Bulzu, P.-A., Kavagutti, V. S., Andrei, A.-S., and Ghai, R. (2022) The evolutionary kaleidoscope of rhodopsins, *mSystems*, **7**, e00405-22, doi: 10.1128/msystems.00405-22.
- Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2022) Emerging diversity of channelrhodopsins and their structure-function relationships, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 800313, doi: 10.3389/fncel.2021.800313.
- Островский М. А. (2017) Родопсин: эволюция и сравнительная физиология, *Палеонтол. Журн.*, **5**, 103-113.
- Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nat. New Biol.*, **233**, 149-152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
- Островский М. А., Фельдман Т. Б. (2012) Химия и молекулярная физиология зрения: светочувствительный белок родопсин, *Успехи химии*, **81**, 1071-1090, doi: 10.1070/RC2012v081n11ABEH004309.
- Kovalev, K., Volkov, D., Astashkin, R., Alekseev, A., Gushchin, I., Haro-Moreno, J. M., Chizhov, I., Siletsky, S., Mamedov, M., Rogachev, A., Balandin, T., Borshchevskiy, V., Popov, A., Bourenkov, G., Bamberg, E., Rodriguez-Valera, F., Büldt, G., and Gordeliy, V. (2020) High-resolution structural insights into the heliorhodopsin family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 4131-4141, doi: 10.1073/pnas.1915888117.
- Benton, R., Sachse, S., Michnick, S.W., and Vossahl, L.B. (2006) Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*, *PLoS Biol.*, **4**, e20, doi: 10.1371/journal.pbio.0040020.
- Lamb, T. D., Collin, S. P., and Pugh, E. N., Jr. (2007) Evolution of the vertebrate eye: Opsins, photoreceptors, retina and eye cup, *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 960-976, doi: 10.1038/nrn2283.
- Hofmann, K. P., and Lamb, T. D. (2023) Rhodopsin, light-sensor of vision, *Prog. Retin. Eye Res.*, **93**, 101116, doi: 10.1016/j.preteyeres.2022.101116.
- Розанов А.Ю. (2009) Условия жизни на ранней земле после 4,0 млрд лет назад, Проблемы происхождения жизни, *ПИН РАН*, Москва, стр. 185-201.

26. Gozem, S., Luk, H. L., Schapiro, I., and Olivucci, M. (2017) Theory and simulation of the ultrafast double-bond isomerization of biological chromophores, *Chem. Rev.*, **117**, 13502-13565, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00177.
27. Kandori, H. (2011) Protein-controlled ultrafast photoisomerization in rhodopsin and bacteriorhodopsin, *Supramolecular Photochemistry: Controlling Photochemical Processes*, Chapter 14, 571-595, doi: 10.1002/9781118095300.ch14.
28. Diller, R. (2008) Primary reactions in retinal proteins, In: Braun M., Gilch P., Zinth W. (eds) *Ultrashort laser pulses in biology and medicine. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*, Springer, Berlin. Heidelberg, Germany, Chapter 10, 243-277, doi: 10.1007/978-3-540-73566-3_10.
29. Wand, A., Gdor, I., Zhu, J., Sheves, M., and Ruhman, S. (2013) Shedding new light on retinal protein photochemistry, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **64**, 437-458, doi: 10.1146/annurev-physchem-040412-110148.
30. Hampp, N. (2000) Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories, *Chem. Rev.*, **100**, 1755-1776, doi: 10.1021/cr980072x.
31. Schapiro, I., Melaccio, F., Laricheva, E. N., and Olivucci, M. (2011) Using the computer to understand the chemistry of conical intersections, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **10**, 867-886, doi: 10.1039/c0pp00290a.
32. Kiefer, H.V., Gruber, E., Langeland, J., Kusochev, P. A., Bochenkova, A. V., and Andersen, L. H. (2019) Intrinsic photoisomerization dynamics of protonated Schiff-base retinal, *Nat. Commun.*, **10**, 1210, doi: 10.1038/s41467-019-09225-7.
33. Agathangelou, D., Roy, P. P., del Carmen Marin, M., Ferre, N., Olivucci, M., Buckup, T., Léonard, J., and Haacke, S. (2021) Sub-picosecond C=C bond photoisomerization: evidence for the role of excited state mixing, *Comptes Rendus Physique*, **22**, S2, 111-138, doi: 10.5802/crphys.41.
34. Birge, R. R., Cooper, T. M., Lawrence, A. F., Masthay, M. B., Vasilakis, C., Fan Zhang, C., and Zidovetzki, R. (1989) A spectroscopic, photocalorimetric, and theoretical investigation of the quantum efficiency of the primary event in bacteriorhodopsin, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4063-4074, doi: 10.1021/ja00193a044.
35. Wang, W., Geiger, J. H., and Borhan, B. (2013) The photochemical determinants of color vision, *BioEssays*, **36**, 65-74, doi: 10.1002/bies.201300094.
36. Okada, T., Sugihara, M., Bondar, A.-N., Elstner, M., Entel, P., and Buss, V. (2004) The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure, *J. Mol. Biol.*, **342**, 571-583, doi: 10.1016/j.jmb.2004.07.044.
37. Смитиенко О. А., Шелаев И. В., Гостев Ф. Е., Фельдман Т. Б., Надточенко В. А. Саркисов О. М., Островский М. А. (2008) Когерентные процессы при образовании первичных продуктов фотолиза зрительного пигмента родопсина, *Докл. Акад. Наук*, **421**, 277-281.
38. Смитиенко О. А., Мозговая М. Н., Шелаев И. В., Гостев Ф. Е., Фельдман Т. Б., Надточенко В. А., Саркисов О. М., Островский М. А. (2010) Фемтосекундная динамика образования первичных продуктов фотопревращения зрительного пигмента родопсина, *Биохимия*, **75**, 34-45.
39. Мозговая М. Н., Смитиенко О. А., Шелаев И. В., Гостев Ф. Е., Фельдман Т. Б., Надточенко В. А., Саркисов О. М., Островский М. А. (2010) Фотохромизм зрительного пигмента родопсина в фемтосекундной шкале времени: когерентное управление фотоизомеризацией хромофора ретиналя, *Докл. Акад. Наук*, **435**, 262-266.
40. Надточенко В. А., Смитиенко О. А., Фельдман Т. Б., Мозговая М. Н., Шелаев И. В., Гостев Ф. Е., Саркисов О. М., Островский М. А. (2012) Участие конического пересечения в фемтосекундной динамике *цис-транс* фотоизомеризации хромофора зрительного пигмента родопсина, *Докл. Акад. Наук*, **446**, 460-465.
41. Smitienko, O., Nadtochenko, V., Feldman, T., Balatskaya, M., Shelaev, I., Gostev, F., Sarkisov, O., and Ostrovsky, M. (2014) Femtosecond laser spectroscopy of the rhodopsin photochromic reaction: A concept for ultrafast optical molecular switch creation (ultrafast reversible photoreaction of rhodopsin), *Molecules*, **19**, 18351-18366, doi: 10.3390/molecules191118351.
42. Feldman, T. B., Smitienko, O. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Nekrasova, O. V., Dolgikh, D. A., Nadtochenko, V. A., Kirpichnikov, M. P., and Ostrovsky, M. A. (2016) Femtosecond spectroscopic study of photochromic reactions of bacteriorhodopsin and visual rhodopsin, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **164**, 296-305, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.041.
43. Смитиенко О. А., Некрасова О. В., Кудрявцев А. В., Яковлева М. А., Шелаев И. В., Гостев Ф. Е., Долгих Д. А., Кольчугина И. Б., Надточенко В. А., Кирпичников М. П., Фельдман Т. Б., Островский М. А. (2017) Фемто- и пикосекундная динамика первичных реакций рекомбинантного бактериородопсина в сравнении с природным белком в тримерном и мономерном состояниях, *Биохимия*, **82**, 664-676.
44. Smitienko, O., Feldman, T., Petrovskaya, L., Nekrasova, O., Yakovleva, M., Shelaev, I., Gostev, F., Cherepanov, D., Kolchugina, I., Dolgikh, D., Nadtochenko, V., Kirpichnikov, M., and Ostrovsky, M. (2021) Comparative femtosecond spectroscopy of primary photoreactions of *Exiguobacterium sibiricum* rhodopsin and *Halobacterium salinarum* bacteriorhodopsin, *J. Phys. Chem. B.*, **125**, 4, 995-1008, doi: 10.1021/acs.jpccb.0c07763.
45. Медведева А. С., Смитиенко О. А., Фельдман Т. Б., Островский М. А. (2020) Сравнительное исследо-

- вание фотохимии микробиальных родопсинов (I типа) и родопсинов животных (II типа), *Журн. Эвол. Биохим. и Физиол.*, **56**, 519-523, doi: 10.31857/S0044452920070943.
46. Островский М. А., Надточено В. А. (2021) Фемтохимия родопсинов, *Хим. Физ.*, **40**, 76-84, doi: 10.31857/S0207401X21040117.
 47. Gruber, E., Kabylda, A. M., Nielsen, M. B., Rasmussen, A. P., Teiwes, R., Kusocheck, P. A., Bochenkova, A. V., and Andersen, L. H. (2022) Light driven ultrafast bioinspired molecular motors: Steering and accelerating photoisomerization dynamics of retinal, *J. Am. Chem. Soc.*, **144**, 69-73, doi: 10.1021/jacs.1c10752.
 48. Kusocheck, P. A., Logvinov, V. V., and Bochenkova, A. V. (2021) Role of the protein environment in photoisomerization of type I and type II rhodopsins: A theoretical perspective, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **76**, 407-416, doi: 10.3103/S0027131421060110.
 49. Kusocheck, P. A., Scherbinin, A. V., and Bochenkova, A. V. (2021) Insights into the early-time excited-state dynamics of structurally inhomogeneous rhodopsin KR2, *J. Phys. Chem. Lett.*, **12**, 8664-8671, doi: 10.1021/acs.jpcllett.1c02312.
 50. Toker, Y., Svendsen, A., Bochenkova, A. V., and Andersen, L. H. (2012) Probing the barrier for internal rotation of the retinal chromophore, *Angew. Chem. Intl. Ed.*, **51**, 8757-8761, doi: 10.1002/anie.201203746.
 51. Kochendoerfer, G. G., and Mathies, R. A. (1996) Spontaneous emission study of the femtosecond isomerization dynamics of rhodopsin, *J. Phys. Chem.*, **100**, 14526-14532, doi: 10.1021/jp960509+.
 52. Polli, D., Altoè, P., Weingart, O., Spillane, K. M., Manzoni, C., Brida, D., Tomasello, G., Orlandi, G., Kukura, P., Mathies, R. A., Garavelli, M., and Cerullo, G. (2010) Conical intersection dynamics of the primary photoisomerization event in vision, *Nature*, **467**, 440-443, doi: 10.1038/nature09346.
 53. Johnson, P. J. M., Halpin, A., Morizumi, T., Prokhorenko, V. I., Ernst, O. P., and Miller, R. J. D. (2015) Local vibrational coherences drive the primary photochemistry of vision, *Nat. Chem.*, **7**, 980-986, doi: 10.1038/nchem.2398.
 54. Johnson, P. J. M., Farag, M. H., Halpin, A., Morizumi, T., Prokhorenko, V. I., Knoester, J., Jansen, T. L. C., Ernst, O. P., and Miller, R. J. D. (2017) The primary photochemistry of vision occurs at the molecular speed limit, *J. Phys. Chem. B*, **121**, 4040-4047, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b02329.
 55. Hasson, K. C., Gai, F., and Anfinrud, P. A. (1996) The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin: Experimental evidence for a three-state model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15124-15129, doi: 10.1073/pnas.93.26.15124.
 56. Gai, F., Hasson, K. C., McDonald, J. C., and Anfinrud, P. A. (1998) Chemical dynamics in proteins: The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin, *Science*, **279**, 1886-1891, doi: 10.1126/science.279.5358.1886.
 57. Tahara, S., Takeuchi, S., Abe-Yoshizumi, R., Inoue K., Ohtani H., Kandori, H., and Tahara, T. (2018) Origin of the reactive and nonreactive excited states in the primary reaction of rhodopsins: pH dependence of femtosecond absorption of light-driven sodium ion pump rhodopsin KR2, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 4784-4792, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b01934.
 58. Chang, C.-F., Kuramochi, H., M., Abe-Yoshizumi, R., Tsukuda, T., Kandori, H., and Tahara, T. (2022) A unified view on varied ultrafast dynamics of the primary process in microbial rhodopsins, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **61**, e202111930, doi: 10.1002/anie.202111930.
 59. Kandori, H., Futurani, Y., Nishimura, S., Shichida, Y., Chosrowjan, H., Shibata, Y., and Mataga, N. (2001) Excited-state dynamics of rhodopsin probed by femtosecond fluorescence spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **334**, 271-276, doi: 10.1016/S0009-2614(00)01457-3.
 60. Kochendoerfer, G. G., and Mathies, R. A. (1995) Ultrafast spectroscopy of rhodopsins – photochemistry at its best! *Isr. J. Chem.*, **35**, 211-226, doi: 10.1002/ijch.199500028.
 61. Kim, J. E., Tauber, M. J., and Mathies, R. A. (2001) Wavelength dependent *cis-trans* isomerization in vision, *Biochemistry*, **40**, 13774-13778, doi: 10.1021/bi0116137.
 62. Govindjee, R., Balashov, S. P., and Ebrey T. G. (1990) Quantum efficiency of the photochemical cycle of bacteriorhodopsin, *Biophys. J.*, **58**, 597-608, doi: 10.1016/S0006-3495(90)82403-6.
 63. Wang, Q., Shoenlein, R. W., Peteanu, L. A., Mathies, R. A., and Shank, C. V. (1994) Vibrationally coherent photochemistry in the femtosecond primary event of vision, *Science*, **266**, 422-424, doi: 10.1126/science.7939680.
 64. Liebel, M., Schnedermann, C., Bassolino, G., Taylor, G., Watts, A., and Kukura, P. (2014) Direct observation of the coherent nuclear response after the absorption of a photon, *Phys. Rev. Lett.*, **112**, 238301, doi: 10.1103/PhysRevLett.112.238301.
 65. Zewail, A. H. (2000) Femtochemistry: Atomic-scale dynamics of the chemical bond, *J. Phys. Chem. A*, **104**, 5660-5694, doi: 10.1021/jp001460h.
 66. Саркисов О. М., Уманский С. Я. (2001) Фемтохимия, *Успехи химии*, **70**, 515-538, doi: 10.1070/RC2001v070n06ABEH000664.
 67. Klessinger, M. (1995) Conical intersections and the mechanism of singlet photoreactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 549-551, doi: 10.1002/anie.199505491.
 68. Gozem, S., Johnson, P. J. M., Halpin, A., Luk, H. L., Morizumi, T., Prokhorenko, V. I., Ernst, O. P., Olivucci, M., and Miller, R. J. D. (2020) Excited-

- state vibronic dynamics of bacteriorhodopsin from two-dimensional electronic photon echo spectroscopy and multiconfigurational quantum chemistry, *J. Phys. Chem. Lett.*, **11**, 3889-3896, doi: 10.1021/acs.jpcclett.0c01063.
69. Rivalta, I., Nenov, A., Weingart, O., Cerullo, G., Garavelli, M., and Mukamel, S. (2014) Modelling time-resolved two-dimensional electronic spectroscopy of the primary photoisomerization event in rhodopsin, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 8396-8405, doi: 10.1021/jp502538m.
70. Hayashi, S., Tajkhorshid, E., and Schulten, K. (2009) Photochemical reaction dynamics of the primary event of vision studied by means of a hybrid molecular simulation, *Biophys. J.*, **96**, 403-416, doi: 10.1016/j.bpj.2008.09.049.
71. Rajput, J., Rahbek, D. B., Andersen, L. H., Hirshfeld, A., Sheves, M., Altoè, P., Orlandi, G., and Garavelli, M. (2010) Probing and modeling the absorption of retinal protein chromophores *in vacuo*, *Angew. Chem. Intl. Ed.*, **49**, 1790-1793, doi: 10.1002/anie.200905061.
72. Yoshizawa, T., and Wald, G. (1963) Pre-lumirhodopsin and the bleaching of visual pigments, *Nature*, **197**, 1279-1286, doi: 10.1038/1971279a0.
73. Takahashi, T., Mochizuki, Y., Kamo, N., and Kobatake, Y. (1985) Evidence that the long-lifetime photointermediate of s-rhodopsin is a receptor for negative phototaxis in *Halobacterium halobium*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 99-105, doi: 10.1016/s0006-291x(85)80131-5.
74. Bruun, S., Stoeppler, D., Keidel, A., Kuhlmann, U., Luck, M., Diehl, A., Geiger, M. A., Woodmansee, D., Trauner, D., Hegemann, P., Oschkinat, H., Hildebrandt, P., and Stehfest, K. (2015) Light-dark adaptation of channelrhodopsin involves photoconversion between the all-*trans* and 13-*cis* retinal isomers, *Biochemistry*, **54**, 5389-5400, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00597.
75. Dixon, S. F., and Cooper, A. (1987) Quantum efficiencies of the reversible photoreaction of octopus rhodopsin, *Photochem. Photobiol.*, **46**, 115-119, doi: 10.1111/j.1751-1097.1987.tb04744.x.
76. Ostrovsky, M. A., and Weetall, H. H. (1998) Octopus rhodopsin photoreversibility of a crude extract from whole retina over several weeks' duration, *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 61-65, doi: 10.1016/S0956-5663(97)00078-X.
77. Inoue, K., Tsuda, M., and Terazima, M. (2007) Photoreverse reaction dynamics of octopus rhodopsin, *Biophys. J.*, **92**, 3643-3651, doi: 10.1529/biophysj.106.101741.
78. Koyanagi, M., and Terakita, A. (2008) Gq-coupled rhodopsin subfamily composed of invertebrate visual pigment and melanopsin, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1024-1030, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00369.x.
79. Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Govindjee, R., and Ebrey, T. G. (1991) Quantum yield ratio of the forward and back light reactions of bacteriorhodopsin at low temperature and photosteady-state concentration of the bathoproduct K, *Photochem. Photobiol.*, **54**, 955-961, doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02116.x.
80. Suzuki, T., and Callender, R. H. (1981) Primary photochemistry and photoisomerization of retinal at 77 degrees K in cattle and squid rhodopsins, *Biophys. J.*, **34**, 261-270, doi: 10.1016/S0006-3495(81)84848-5.
81. Schapiro, I., Ryazantsev, M. N., Frutos, L. M., Ferré, N., Lindh, R., and Olivucci, M. (2011) The ultrafast photoisomerizations of rhodopsin and bathorhodopsin are modulated by bond length alternation and HOOP driven electronic effects, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 3354-3364, doi: 10.1021/ja1056196.
82. Schoenlein, R. W., Peteanu, L. A., Mathies, R. A., and Shank, C. V. (1991) The first step in vision: Femtosecond isomerization of rhodopsin, *Science*, **254**, 412-415, doi: 10.1126/science.1925597.
83. Altoè, P., Cembran, A., Olivucci, M., and Garavelli, M. (2010) Aborted double bicycle-pedal isomerization with hydrogen bond breaking is the primary event of bacteriorhodopsin proton pumping, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 20172-20177, doi: 10.1073/pnas.1007000107.
84. Koyama, Y., Kubo, K., Komori, M., Yasuda, H., and Mukai, Y. (1991) Effect of protonation on the isomerization properties of n-butylamine Schiff base of isomeric retinal as revealed by direct HPLC analyses: Selection of isomerization pathways by retinal proteins, *Photochem. Photobiol.*, **54**, 433-443, doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02038.x.
85. Ikuta, T., Shihoya, W., Sugiura, M., Yoshida, K., Watari, M., Tokano, T., Yamashita, K., Katayama, K., Tsunoda, S. P., Uchihashi, T., Kandori, H., and Nureki, O. (2020) Structural insights into the mechanism of rhodopsin phosphodiesterase, *Nat. Commun.*, **11**, 5605, doi: 10.1038/s41467-020-19376-7.
86. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. (1977) Временные характеристики бактериородопсина как молекулярного биологического генератора тока, *Мол. Биол.*, **11**, 1377-1387.
87. Большаков В. И., Драчев Л. А., Каламкаров Г. Р., Каулен А. Д., Островский М. А., Скулачев В. П. (1979) Общность свойств бактериального и зрительного родопсина: превращение энергии света в разность электрических потенциалов, *ДАН СССР*, **249**, 1462-1466.
88. Drachev, L. A., Kalamkarov, G. R., Kaulen, A. D., Ostrovsky, M. A., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. II. Visual rhodopsin, *Eur. J. Bio-*

- chem.*, **117**, 471-481, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06362.x.
89. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Khitrina, L. V., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 461-470, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06361.x.
 90. Шевченко Т. Ф., Каламкаров Г. Р., Островский М. А. (1987) Отсутствие переноса H^+ через фоторецепторную мембрану в ходе фотолиза родопсина, *Сенс. Сист.*, **1**, 117-126.
 91. Островский М. А., Федорович И. Б., Поляк С. Е. (1968) Изменение pH-среды при освещении суспензии наружных сегментов фоторецепторов сетчатки, *Биофизика*, **13**, 338-339.
 92. Каламкаров Г. Р., Островский М. А. (2002) *Молекулярные механизмы зрительной рецепции*, Наука, Москва, стр. 1-280.
 93. Brindley, G. S., and Gardner-Medwin, A. R. (1966) The origin of the early receptor potential of the retina, *J. Physiol.*, **182**, 185-194, doi: 10.1113/jphysiol.1966.sp007817.

SIMILARITY AND DIFFERENCE IN THE PHOTOCHEMISTRY OF TYPE I AND II RHODOPSINS

Review

M. A. Ostrovsky^{1,2}, O. A. Smitienko², A. V. Bochenkova³, and T. B. Feldman^{1,2*}

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: feldmantb@mail.ru

² Emanuel Institute of Biochemical Physics, 119334 Moscow, Russia

³ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

The diversity of retinal-containing proteins in nature is extremely large. The fundamental similarity of the structure and photochemical properties unites them into one family. However, there is still a debate about the origin of retinal-containing proteins: divergent or convergent evolution? In this review, based on the results of our own and literature data, a comparative analysis of the similarities and differences in the photoconversion of rhodopsin types I and II is carried out. The results of experimental studies of direct and reverse photoreactions of rhodopsin types I (bacteriorhodopsin) and II (visual rhodopsin) in the femto- and picosecond time interval, photo-reversible reaction of rhodopsin type II (octopus rhodopsin), photovoltaic reactions of rhodopsin types I and II, as well as quantum chemical calculations of forward photoreactions of bacteriorhodopsin and visual rhodopsin are presented. The question of the probable convergent evolution of rhodopsin types I and II is discussed.

Keywords: retinal-containing proteins, visual rhodopsin, bacteriorhodopsin, convergent evolution, photochemistry, femtosecond spectroscopy, quantum chemical calculations

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА ТРАНСПОРТА ПРОТОНОВ В ESR, РЕТИНАЛЬНОМ БЕЛКЕ *Exiguobacterium sibiricum*

Обзор

© 2023 Л.Е. Петровская^{1*}, С.А. Силецкий², М.Д. Мамедов², Е.П. Лукашев³,
С.П. Балашов⁴, Д.А. Долгих^{1,3}, М.П. Кирпичников^{1,3}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: lpetr65@yahoo.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия

⁴ Университет Калифорнии, Отдел физиологии и биофизики, 92697 Ирвайн СА, США

Поступила в редакцию 15.06.2023

После доработки 11.07.2023

Принята к публикации 11.07.2023

Ретиналь-содержащие светочувствительные белки — родопсины — обнаружены у многих микроорганизмов. Интерес к ним во многом объясняется их ролью в запасании энергии света и фоторегуляции в микроорганизмах, а также перспективами использования в оптогенетике с целью контроля активности нейронов, в том числе для терапии различных заболеваний. Одним из представителей микробных родопсинов является ESR, ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*. От гомологичных белков ESR отличает наличие остатка лизина (Lys96) в качестве донора протонов для основания Шиффа. Эта особенность, наряду с водородной связью акцептора протонов Asp85 с остатком His57, определяет его функциональные характеристики как протонного насоса. В обзоре рассматриваются результаты исследований ESR, проведенных с использованием различных методов, включая метод прямой электрометрии. Сравнение полученных данных с результатами определения пространственной структуры и с другими ретинальными белками позволяет сделать выводы о механизмах транспорта ионов водорода в молекуле ESR и подобных ретинальных белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретинальный белок, протеродопсин, основание Шиффа, акцептор протонов, донор протонов, фотоцикл, прямой электрометрический метод.

DOI: 10.31857/S032097252310010X, EDN: OTMNUZ

ВВЕДЕНИЕ

Микробные родопсины относятся к семейству ретиналь-содержащих белков, осуществляющих светозависимый транспорт ионов, сенсорные и другие функции [1–3]. Молекулы этих белков обладают схожей структурой, включающей семь или восемь (в случае ферментных родопсинов) трансмембранных альфа-спиральных сегментов и ретиналь, ковалентно связанный через основание Шиффа с остатком лизина [3, 4]. Поглощение кванта

света инициирует изомеризацию ретиналя из all-trans в конфигурацию 13-cis. Релаксация ретиналя в исходное состояние сопровождается рядом конформационных преобразований в молекуле белка, сопряженных с транспортом протона (для родопсинов, выполняющих функцию протонного насоса) [5, 6]. Детали этого процесса наиболее подробно изучены для бактериородопсина *Halobacterium salinarum* (BR), первого представителя семейства микробных родопсинов, который был открыт более 50 лет назад [7–9]. Установлено, что в процессе

Принятые сокращения: BR — бактериородопсин *Halobacterium salinarum*; ESR — ретинальный белок *Exiguobacterium sibiricum*; PR — протеродопсин; PRG — протон-выделяющая группа.

* Адресат для корреспонденции.

фотоцикла происходит депротонирование основания Шиффа, образованного ретиналем и остатком лизина, и перенос протона на акцепторный остаток Asp85. Одновременно с этим осуществляется выделение протона на внеклеточной поверхности белка с участием остатков Glu194 и Glu204 (так называемой PRG – протон-выделяющей группы [10]). Затем основание Шиффа репротонируется при участии донорного остатка Asp96, который затем получает протон из цитоплазмы. В конце фотоцикла протон переносится от акцептора на остатки протон-выделяющей группы [7, 10]. Указанные молекулярные события соответствуют возникновению и распаду спектрально идентифицируемых промежуточных состояний (интермедиатов) фотоцикла $BR + h\nu \rightarrow K \rightarrow L \rightarrow M1 \leftrightarrow M2 \leftrightarrow N1 \leftrightarrow N2 \leftrightarrow O \rightarrow BR$ [7, 10]. Данные функциональных исследований BR хорошо согласуются с результатами определения его пространственной структуры в различных состояниях [11–13].

В дальнейшем в ходе различных геномных и метагеномных исследований было обнаружено множество новых белков, гомологичных BR и выполняющих сходные функции [3, 14, 15]. В частности, протеородопсины (PR) встречаются у многих представителей *Proteobacteria* и играют важную роль в выживании микроорганизмов в неблагоприятных условиях. Исследования PR позволили установить, что они, подобно BR, содержат акцепторный и донорный остатки (аспарат и глутамат соответственно), однако PRG в их молекулах отсутствует [16, 17]. Важной особенностью PR является водородная связь между акцепторным остатком (аспаратом) и боковой группой остатка гистидина, которая регулирует степень протонирования и функциональное состояние акцептора в зависимости от pH и участвует в выделении протона [18, 19].

ESR, ретиальный белок почвенной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*, также относится к протеородопсинам, однако обнаруживает существенное структурное отличие от типичных представителей семейства. Аминокислотная последовательность ESR содержит остаток Lys96 в положении, соответствующем карбоксильным остаткам с функцией донора протонов для основания Шиффа в молекулах BR и PR (Asp96 и Glu108 соответственно) [20] (рис. 1). Эта особенность, наряду с другими, вызвала интерес к исследованиям структуры и механизма функционирования ESR, которые проводятся нами на протяжении более 10 лет. В 2015 году мы опубликовали обзор этих работ [21], однако за прошедшее

время был получен ряд важных новых результатов, во многом благодаря использованию метода прямой электрометрии, разработанного Л.А. Драчевым и его коллегами [22, 23].

Примененный нами вариант данного метода основан на использовании протеолипосом, содержащих исследуемый белок, и макроскопической плоской фосфолипидной мембраны, армированной для большей стабильности коллоидной пленкой. Перед измерением протеолипосомы адсорбируются на поверхности макроскопической мембраны, разделяющей отсеки измерительной ячейки [23]. В ответ на вспышку за счет трансмембранного переноса протонов, а также движения заряженных групп белка перпендикулярно плоскости мембраны генерируется разность электрических потенциалов ($\Delta\Psi$) на мембране протеолипосом и пропорциональная ей $\Delta\Psi$ на макроскопической мембране, которая регистрируется с помощью электрометрической техники с высоким временным разрешением.

Одним из первых белков, для которого были проведены прямые электрометрические измерения, стал BR [22, 24]. Впоследствии метод широко использовался в исследованиях различных ретиальных белков [25–27], компонентов фотосистем I и II [28–30], цитохром-оксидазы [31–35] и других объектов. В данном обзоре обсуждаются недавние результаты, полученные нами в ходе исследований ESR и его мутантных вариантов, в том числе с использованием метода прямой электрометрии, и проводится их анализ в сравнении с ранее опубликованными для BR и других ретиальных белков.

ФОТОЦИКЛ ESR: СОПРЯЖЕНИЕ РЕАКЦИЙ С ПОГЛОЩЕНИЕМ И ВЫДЕЛЕНИЕМ ПРОТОНОВ

Изучение светоиндуцированных изменений поглощения в ESR методом флэш-фотолиза обнаружило в его фотоцикле наличие основных интермедиатов, характерных также для BR [36] и PR [37]. Вслед за распадом интермедиатов K и L наблюдается рост поглощения при 410 нм в микросекундной временной шкале, что соответствует образованию M-состояния (депротонированного основания Шиффа). Интересно отметить, что для ESR в мицеллах детергента DDM (n-додецил- β -D-мальтопиранозид) этот интермедиат детектируется только при pH выше 8, в то время как для белка в мицеллах липидоподобного детергента LPG (1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-

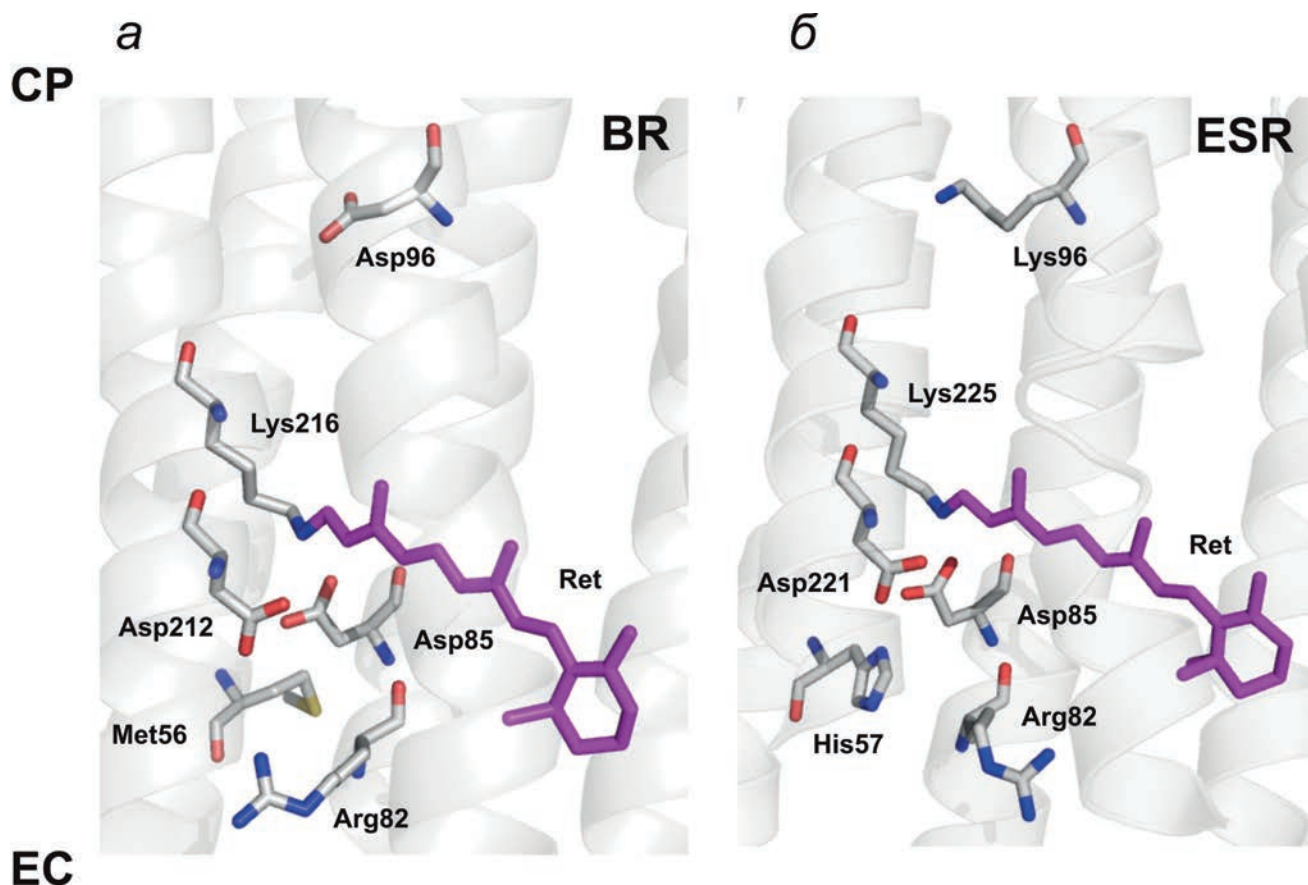


Рис. 1. Пространственная структура BR (а) и ESR (б). Показаны участки молекул, расположенные вблизи основания Шиффа. Рисунки подготовлены в программе PyMol с использованием координат 1C3W и 4HYJ соответственно. Ret — *all-trans* ретиналь; CP — цитоплазматическая поверхность белка; EC — внеклеточная поверхность белка

глицеро-3-фосфо-1'-гас-глицерин) или в протеолипосомах pK_a его образования составляет $\sim 6,5$ [38, 39]. Репротонирование основания Шиффа сопровождается снижением поглощения при 410 нм (отражающим распад состояния M) и возникновением интермедиатов N1 и N2, для которых характерен рост поглощения при 510 и 550 нм. В результате реизомеризации ретиналя образуется интермедиат O, который поглощает при 590 нм и распадается с возвращением в исходное состояние ESR. N-Интермедиат присутствует в фотоцикле ESR вплоть до его завершения [40], таким образом, схема фотоцикла включает следующие переходы: $ESR-h\nu \rightarrow K, L \rightarrow M1 \leftrightarrow M2 \leftrightarrow N1 \leftrightarrow N2/O \rightarrow ESR$ [39].

При освещении суспензии клеток *Escherichia coli*, экспрессирующих ESR, или ESR-содержащих протеолипосом наблюдается закисление суспензии, подтверждающее трансмембранный перенос протонов с участием данного белка [20, 38]. Добавление к клеткам протонифора CCCP устраняет этот эффект, что подтверждает протон-транспортную функцию ESR [38]. Установлено, что, в отличие

от BR, ESR осуществляет выделение протонов в конце фотоцикла, что коррелирует с отсутствием в его молекуле остатков, гомологичных PRG [20]. Измерения, проведенные в присутствии pH-чувствительного красителя пиранина, позволили уточнить временную связь этого события с распадом длинноволновых интермедиатов фотоцикла и восстановлением исходного состояния [41]. Сравнение кинетик поглощения протона и распада M-интермедиата в ESR дикого типа показало, что, в отличие от BR, поглощение протона в этом белке предшествует репротонированию основания Шиффа, что особенно заметно при проведении измерений в D_2O .

ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ СТАДИИ ФОТОЦИКЛА ESR

Использование метода прямой электрометрии с временным разрешением обеспечивает возможность вычленения и изучения отдельных электрогенных (т.е. направленных перпендикулярно плоскости мембраны) стадий

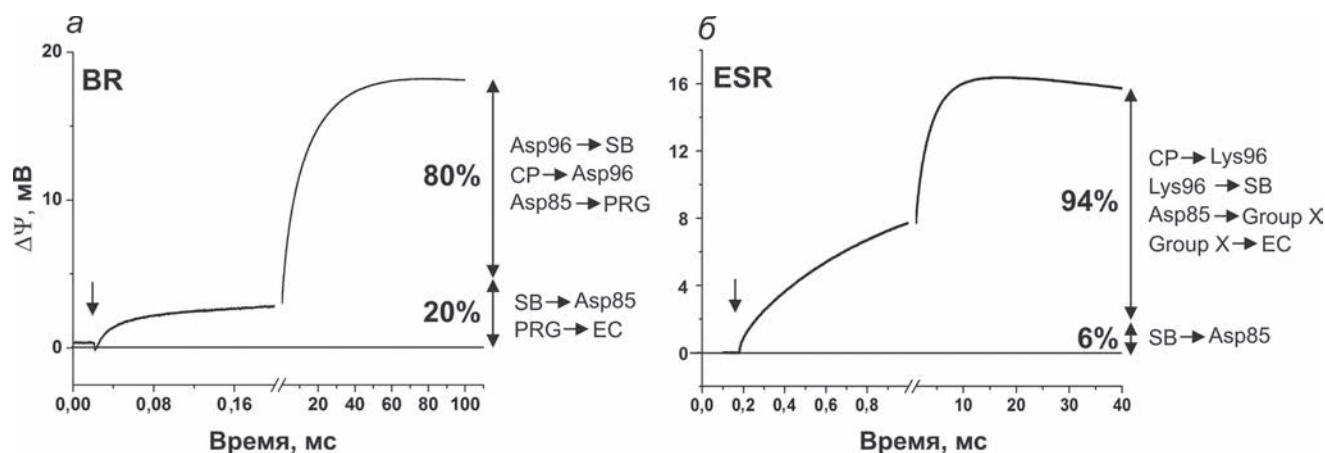


Рис. 2. Кинетика светоиндуцированного образования мембранного электрического потенциала ($\Delta\Psi$) протеолипосомами, содержащими BR (а) и ESR (б), при pH 7,5. Стрелкой обозначен момент лазерной вспышки. Приведены относительные амплитуды микросекундной и миллисекундной электрогенных фаз с указанием соответствующих стадий переноса протона. SB – основание Шиффа; PRG – протон-выделяющая группа; EC – внеклеточная поверхность белка; CP – цитоплазматическая поверхность белка; Group X – неидентифицированный остаток/группа остатков, осуществляющих выделение протонов на внеклеточной поверхности ESR. Для удобства фотоэлектрический ответ обоих белков приводится в одном направлении

перемещения зарядов внутри белка в ответ на одиночную вспышку, а параллельный анализ кинетики изменений поглощения позволяет связать их со стадиями фотоцикла в ретинальном белке. В отличие от метода с использованием красителя, такие измерения, во-первых, позволяют получать прямую уникальную информацию о перемещении протона внутри белка, а не только данные об исчезновении или появлении протона на его поверхности; во-вторых, не ограничены областью pH, близкой к pK_a красителя, что в целом открывает перспективы воссоздания полной картины функционирования протонной помпы при различных значениях pH.

Для ESR-содержащих протеолипосом измерения проводили при pH 5,1–9,5 [39]. Общая амплитуда фотоэлектрического ответа при нейтральных значениях pH достигала 50 мВ, что сопоставимо с максимальной величиной ответа BR [22]. Однако направление ответа у этих белков было противоположным вследствие различной ориентации их молекул в протеолипосомах (ESR встраивается в том же направлении, что и в клетках, N-концом наружу [20, 38], а BR – в противоположном [42]). Соответственно, ESR переносит протоны из протеолипосом наружу, а для BR наблюдается транспорт протонов внутрь протеолипосом вследствие обратной по сравнению с клетками ориентации.

Ранее было показано, что фотоэлектрический ответ BR включает три основных электрогенных процесса, причем наиболее быстрый (<1 мкс) имеет отрицательный знак и соответ-

ствует стадиям BR → K → L (фотоиндуцированной изомеризации ретиналя и последующей релаксации соседних остатков). Вторая стадия (30–50 мкс) отражает перемещение протона от основания Шиффа на акцептор Asp85 и одновременное освобождение протона во внешнюю среду протон-выделяющей группой. Амплитуда последней фазы (5–20 мс) составляет до 80% всего ответа и соответствует переносу протона от внутреннего донора Asp96 на основание Шиффа и последующее репротонирование донора, а также перенос протона от Asp85 к PRG [43] (рис. 2, а).

Кинетика образования мембранного потенциала ESR существенно отличается от вышеописанной для BR. В частности, в фотоэлектрическом ответе ESR не наблюдается быстрая негативная фаза, характерная для BR (рис. 2, б). Детальный анализ кинетических кривых при pH 5,1 позволил, однако, обнаружить ее наличие, «замаскированное» положительными сигналами электрогенных фаз, совпадающих с ней во времени. Относительная суммарная амплитуда микросекундных электрогенных фаз ESR (3, 24 и 100 мкс при pH 7,5) оказалась примерно в три раза меньше, чем у BR, что может быть связано с отсутствием раннего выделения протонов в молекуле ESR. Распад интермедиата М включает две электрогенные фазы, 0,6 и 3,4 мс, с общим вкладом 75%, предположительно, отражающие переход $M \leftrightarrow N1 \leftrightarrow N2/O$. Последняя электрогенная фаза ESR (~18,4 мс) ассоциирована с возвращением к исходному состоянию ($N2/O \rightarrow ESR$) и отражает депротонирование

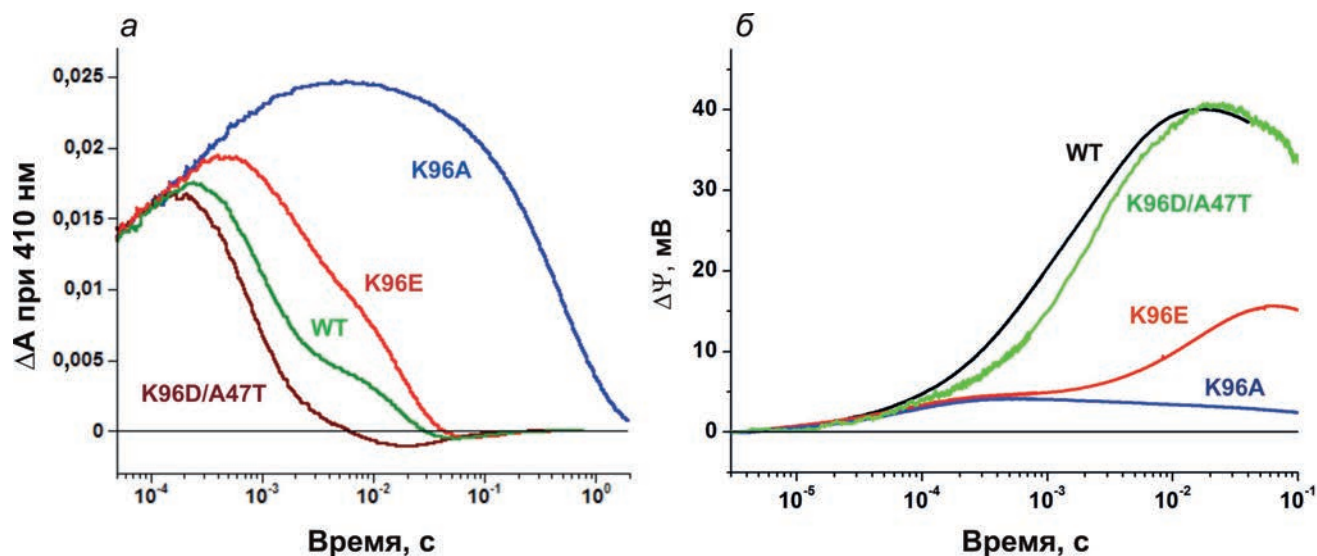


Рис. 3. Свойства мутантных вариантов ESR, содержащих замены остатка Lys96. *a* – Кинетика светоиндуцированных изменений поглощения при 410 нм ESR дикого типа (WT) и его мутантных вариантов в 0,06%-ном липидоподобном детергенте LPG, 100 mM NaCl, pH 7,5; *б* – кинетика образования трансмембранной разницы потенциалов ($\Delta\Psi$) протеолипосомами, содержащими ESR дикого типа и его мутантные варианты, при pH 7,5. Из [46], с изменениями

акцептора Asp85 и высвобождение протона молекулой белка во внешнюю водную среду [39].

Следует отметить, что в фотоэлектрическом ответе ESR-содержащих протеолипосом при pH 8,4 наблюдается 10-кратное (по сравнению с pH 6,5) замедление электрогенных стадий, соответствующих распаду М-интермедиата, в результате изменения относительного вклада кинетических составляющих в пользу более медленной компоненты. При этом дополнительно выделяется отдельная электрогенная фаза с $\tau \sim 0,25$ мс, соответствующая протонированию исходно нейтрального Lys96 [39]. Эти данные свидетельствуют о том, что в ESR Lys96 и/или взаимодействующая с ним молекула воды приобретает протон после образования М-состояния и вскоре после этого передает его на основание Шиффа. Таким образом, подтверждается ранее сделанное заключение, что остаток Lys96 не протонирован в исходном состоянии при нейтральном pH и временно протонируется в М-состоянии с $pK_a \sim 8,5$ [41]. В молекуле ESR Lys96 окружен преимущественно гидрофобными остатками [44], что предположительно способствует поддержанию состояния со сниженным pK_a . Сходная ситуация наблюдается для остатка Asp96 в BR, который нейтрален и имеет очень высокий pK_a в исходном состоянии ($\sim 11,4$) и, соответственно, протонирован благодаря гидрофобному окружению [45].

Понижение pH до 5,1 сопровождается практически полным подавлением фотоэлектрического ответа ESR и возникновением заметных отрицательных по направлению фаз, предположительно в результате протонирования ак-

цептора Asp85 и/или связанного с ним остатка His57 в исходном состоянии.

Lys96 – ЭФФЕКТИВНЫЙ ДОНОР ПРОТОНОВ ДЛЯ ОСНОВАНИЯ ШИФФА В ESR

Для определения функциональной роли остатка Lys96 мы использовали классический подход, включающий получение и исследование мутантных вариантов ESR [41, 46]. На первом этапе был сконструирован мутант K96A, характерными чертами фотоцикла которого явились значительное (более чем в 100 раз) замедление распада интермедиата М (рис. 3, *a*) и зависимость скорости этого процесса от pH [41]. Клетки *E. coli*, экспрессирующие этот мутант, демонстрировали значительное снижение протонного транспорта по сравнению с клетками, содержащими белок дикого типа. Таким образом, было показано, что наличие остатка Lys96 ускоряет репротонирование основания Шиффа в молекуле ESR.

В результате измерений фотоэлектрического ответа протеолипосом, содержащих K96A, было установлено, что данная мутация сопровождается практически полным исчезновением миллисекундной электрогенной фазы, которая связана с репротонированием основания Шиффа (распадом интермедиата М) [47] (рис. 3, *б*). Как показали расчеты, замедление этого процесса, характерное для мутанта K96A, само по себе не должно было привести к такому результату.

Аппроксимация экспериментальной кривой суммой кинетических компонент выявило наличие в миллисекундной части кинетики нескольких электрогенных фаз, имеющих отрицательное направление. Отрицательное значение амплитуд миллисекундных фаз, соответствующих быстрому распаду М-интермедиата в мутантном белке, указывает на то, что репротонирование основания Шиффа происходит в необычном направлении — со стороны внеклеточной поверхности белка. Об этом же свидетельствует и незначительная амплитуда положительной компоненты электрогенного ответа, которая, по-видимому, включает в себя как диффузию протона с цитоплазматической поверхности белка, так и его движение в противоположном направлении. При низких рН преобладает первый из указанных механизмов, в то время как при рН 8,5 начинает доминировать второй. Добавление азида к данному мутанту приводило к ускорению доставки протонов с цитоплазматической стороны белка и к увеличению амплитуды положительных компонентов электрогенного ответа [47].

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что пониженная эффективность транспорта протонов в мутанте K96A объясняется не только замедлением фотоцикла, но и уменьшением прямого транспорта и повышением вклада обратных реакций, предположительно, со стороны акцепторного участка His57–Asp85. Следует отметить, что в BR мутации по донорному остатку (D96N и D96A) сопровождаются замедлением фотоэлектрического ответа в миллисекундной области, но не его исчезновением, что является следствием различной конфигурации протон-акцепторного участка BR и ESR (рис. 1) и указывает на отличия в механизме протонного транспорта в этих белках [48, 49]. Дополнительные аргументы в пользу роли остатка His57 в возникновении обратных реакций были получены в ходе исследования мутантов по этому остатку (см. ниже).

КАРБОКСИЛЬНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ НА МЕСТЕ Lys96 В ESR

«Могут ли карбоксильные остатки выполнять функцию донора протонов в молекуле ESR?» — такой вопрос мы задавали в предыдущем обзоре [21]. Сейчас можно уверенно ответить на него: «В целом да, но есть отличия по сравнению с тем, как они работают в BR». Мы исследовали кинетику фотоцикла, переноса

протонов и электрогенности мутантов ESR K96E и K96D/A47T [46]. В отличие от мутанта K96A, скорости поглощения протона и его переноса на основание Шиффа в этих белках сопоставимы с таковыми в белке дикого типа. В K96E распад М происходит несколько медленнее, чем в диком типе — с большей долей медленного компонента, а в K96D/A47T — даже быстрее, чем в диком типе (временная константа быстрого компонента составляет ~ 0,7 мс против 1 мс у дикого типа) (рис. 3, а). Репротонирование основания Шиффа и поглощение протонов из среды у этих мутантов происходят почти одновременно во время перехода М в N (как в ESR дикого типа при нейтральном рН), тогда как у BR эти две стадии хорошо разделены и совпадают во времени с переходами М в N и N в О соответственно [48, 50]. Это отражает различный механизм участия донора в репротонировании основания Шиффа в BR и ESR. Интересно отметить, что у мутантов K96D/A47T и K96E образование состояния М сопровождается частичным высвобождением протона, предположительно на цитоплазматической поверхности белка (т.е. перемещением в обратном направлении). Причины этого явления будут рассмотрены ниже.

Фотоэлектрический ответ мутантов K96D/A47T и K96E содержит электрогенные миллисекундные фазы, связанные с репротонированием основания Шиффа, которые аналогичны таковым у дикого типа, но отсутствуют у мутанта K96A. Основным отличием в электрогенной кинетике мутанта K96E является гораздо более медленный основной миллисекундный компонент генерации $\Delta\Psi$ (рис. 3, б). В протеолипосомах, содержащих K96D/A47T, генерация $\Delta\Psi$ происходит в основном во время распада интермедиата М, в то время как у мутанта K96E — во время распада N. Это является независимым доказательством того, что карбоксильные остатки функционируют как доноры протонов в ESR с эффективностью, сравнимой с эффективностью лизина в случае двойного мутанта и несколько меньшей — в K96E.

Следует отметить, что японские ученые опубликовали исследование мутантных вариантов PR, в котором остаток аспартата заменили на лизин и глутамин (E108K и E108Q), а также ESR с заменами K96D, K96Q и K96E [51]. Мутант K96D демонстрировал быструю скорость распада М, сравнимую с диким типом, в то время как мутация K96E демонстрировала более медленную скорость распада М. Было показано также, что Lys может заменять нативный Glu в донорном участке PR [51].

Отсутствие существенной задержки между поглощением протонов и репротонированием основания Шиффа у мутантов K96D/A47T и K96E, а также раннее освобождение протона с обратной стороны мембраны свидетельствуют о том, что у мутантов ESR карбоксильные остатки в положении 96 протонированы (не заряжены) в исходном состоянии, аналогично BR. Предположительно, после образования промежуточного продукта М они попадают в более гидрофильное окружение по сравнению с исходным состоянием, в результате чего происходит снижение их pK_a до 6,5–8,5. Это приводит к частичному депротонированию донорных остатков и освобождению протона в среду, за которыми следуют репротонирование основания Шиффа и почти одновременное поглощение протона. Следовательно, донорные остатки в ESR способны быстро переключаться от равновесия со средой на равновесие с основанием Шиффа во время перехода от М к N, что согласуется с данными структурных исследований. Боковая цепь Lys96 обладает определенной подвижностью, а полость вокруг этого остатка находится очень близко к поверхности белка и отделена от водной среды только полярной боковой цепью Thr43, что отличает ESR от более скрытого положения протонных донорных групп в BR и XR [44]. Аналогичный вывод был сделан Sasaki et al. [51], которые предположили, что конформационные изменения белка, связанные с репротонированием основания Шиффа, меньше у мутантов ESR, чем у BR, и могут включать движения боковой цепи донорного остатка, соединяя его со средой или с основанием Шиффа.

ЗАМЕНА His57 ОБЕСПЕЧИВАЕТ ТРАНСПОРТ ПРОТОНОВ ESR В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ pH

Наличие остатка гистидина, связанного водородной связью с акцепторным остатком аспартата, является отличительной чертой белков, относящихся к семейству протеородопсинов, включая ESR, а также ксантородопсинов (XR) [38, 52, 53]. Взаимодействие между боковой цепью гистидина и остатками соседней субъединицы играет важную роль в олигомеризации PR и родопсина *Gloeobacter* (GR) [54–56]. Тесное взаимодействие His57 и Asp85 в молекуле ESR было выявлено как в результате функциональных исследований мутантов по этому остатку [38], так и благодаря определению пространственной структуры белка [44] (рис. 1). Установлено,

что замена His57 оказывает радикальное воздействие на различные свойства ESR, включая pH-зависимость максимума поглощения и pK_a образования интермедиата М [38]. В отличие от ESR дикого типа, максимум поглощения которого слабо зависит от pH в диапазоне 3–10, для мутанта H57M характерен значительный (на 47 нм) сдвиг максимума при повышении pH от 5 до 8,5. При pH 5 максимум поглощения H57M составляет 565 нм, что соответствует максимуму поглощения мутанта D85N. Таким образом, связь с His57 определяет степень протонирования остатка Asp85, т.е. его способность функционировать в качестве акцептора протонов от основания Шиффа. С целью уточнения функциональной роли данного взаимодействия мы продолжили изучение свойств ESR с заменой H57N и двойного мутанта H57N/K96A с помощью метода прямой электрометрии.

В результате измерений фотоцикла протеолипосом, содержащих данный мутант, установлено, что замена H57N приводит к ускорению образования интермедиата М благодаря отсутствию в этом процессе медленной фазы спектральных изменений, ранее обнаруженной в фотоцикле ESR и мутанта K96A (рис. 4, а). Аналогичная компонента отсутствует также и в фотоэлектрическом ответе, что указывает на связь медленной фазы генерации М в ESR с остатком His57 (возможное объяснение этой связи приводится в следующем разделе). По сравнению с диким типом ESR, распад М в мутанте H57N также происходит быстрее и включает единственную стадию, поскольку не сопровождается накоплением состояния N1.

Интересно, что в двойном мутанте H57N/K96A распад интермедиата М происходит в 1000 раз медленнее, чем в диком типе и в мутанте H57N, и в 10 раз медленнее, чем в K96A (рис. 4, а). Это явление можно объяснить устранением обратного перемещения протонов на основание Шиффа в результате замены H57N. Предположительно, замена остатка His57 в окружении акцептора протонов Asp85 приводит к изменениям заряда или других свойств среды, в результате чего создается кинетический барьер для такого перемещения.

Ранее при исследовании pH-зависимости транспорта протонов клетками *E. coli*, экспрессирующими ESR, было установлено, что при pH ниже 5 эффективность работы белка дикого типа как протонной помпы существенно снижена [38]. Оказалось, что в тех же условиях мутанты H57N и H57N/K96A демонстрируют высокую эффективность транспорта [57].

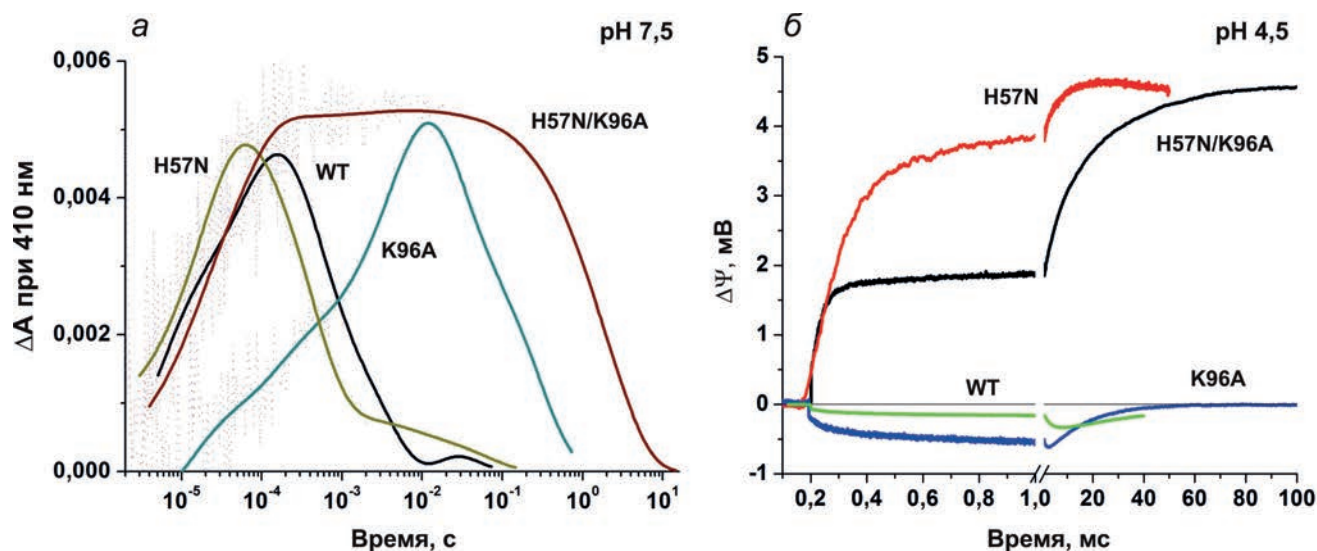


Рис. 4. Свойства мутантных вариантов ESR, содержащих замены остатка His57. *a* – Кинетика светоиндуцированных изменений поглощения при 410 нм протеолипосомами, содержащими ESR дикого типа (WT) и его мутантные варианты, при pH 7,5; *б* – кинетика образования трансмембранной разницы потенциалов ($\Delta \Psi$) протеолипосомами, содержащими ESR дикого типа и его мутантные варианты, при pH 4,5. Из [57], с изменениями

В соответствии с этими данными, при pH 4,5 мутанты с заменой H57N сохраняют амплитуду и направление фотоэлектрического ответа, в отличие от дикого типа и мутанта с одиночной заменой K96A (рис. 4, б). Таким образом, взаимодействие His57 и Asp85 ограничивает транспорт протонов при низких pH для дикого типа ESR. В мутанте H57N при pH 4,5 остаток Lys96, предположительно, протонирован уже в исходном состоянии. Благодаря этому репротонирование основания Шиффа в процессе распада интермедиата М происходит с высокой скоростью, после чего донор получает протон из среды, подобно тому, как это происходит при нейтральных pH в BR, где донор Asp96 исходно протонирован. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что Lys96 может эффективно выполнять функцию донора и при низких значениях pH.

Как указывалось выше, на основании pH-зависимости максимума поглощения от pH ранее был сделан вывод о том, что при pH < 6 акцептор протонов от основания Шиффа Asp85 в мутанте H57N должен находиться в протонированном состоянии в детергенте DDM. Однако последующие эксперименты продемонстрировали эффективную работу этого мутанта как протонной помпы при pH ниже 5 в мембранах липосом. Можно предположить, что pK_a Asp85 в H57N понижается в более гидрофобном окружении липосом и после изомеризации ретиналя в конфигурацию 13-*cis*, открывая возможность для перехода протона на основание Шиффа в процессе распада интермедиата L.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ESR КАК ПРОТОННОГО НАСОСА

На основании полученных результатов мы предложили схемы функционирования ESR и его мутантных вариантов в различных условиях [21, 39, 46, 47, 57]. Ранее опубликованная последовательность реакций переноса протона для дикого типа ESR включала в себя: 1) перенос протона от основания Шиффа на акцептор Asp85 в процессе образования интермедиата М; 2) протонирование донора Lys96 с цитоплазматической поверхности белка; 3) репротонирование основания Шиффа с участием Lys96 и 4) депротонирование Asp85 и освобождение протона на внеклеточной поверхности белка с участием неуставленной группы остатков [41]. Основные этапы этой схемы были прямо подтверждены и охарактеризованы при измерении с временным разрешением электрогенных событий перемещения протона в ходе фотоцикла ESR. Кроме того, схема была дополнена с учетом данных, полученных в результате измерений прямым электрометрическим методом. В частности, было уточнено происхождение медленных стадий образования интермедиата М, которые наблюдаются в ESR при нейтральных значениях pH. Поскольку в мутанте H57N этот процесс ускорен и не включает медленные компоненты, так же как и в белке дикого типа в щелочных условиях, был сделан вывод об их связи с наличием положительного заряда на остатке гистидина, который препятствует переносу протона от основания Шиффа на акцептор Asp85.

Наличие остатка His57 и его взаимодействие с Asp85 объясняет также и некоторые другие особенности протонного транспорта в ESR, включая пониженную эффективность транспорта при низких значениях pH и повышенную роль обратных реакций в мутанте K96A по сравнению с аналогичными мутантами BR. Обратные реакции, т.е. возвращение протона от акцептора Asp85 на основание Шиффа, могут определяться пониженным значением pK_a акцептора ESR (Asp85–His57) в М-состоянии по сравнению с BR или меньшим барьером для обратного переноса от Asp85 на основание Шиффа. Высокое значение pK Asp85 в BR на этой стадии (~11) связано с удалением положительно заряженного остатка аргинина от Asp85, повышением гидрофобности окружения Asp85 и ранним выделением протона с участием PRG [10, 58]. В молекуле ESR выделение протона происходит в конце фотоцикла [20, 38], вследствие чего внеклеточная часть белка может сохранять положительный заряд достаточно длительное время. Это, предположительно, приводит к увеличению вероятности обратного переноса протона от акцептора на основание Шиффа [47]. В ESR дикого типа благодаря присутствию донора Lys96 и быстрому репротонированию основания Шиффа обратные реакции играют незначительную роль, однако в мутанте K96A их влияние оказывается драматическим, приводя к существенному снижению эффективности транспорта протонов [41, 47].

Таким образом, важной функцией Lys96 в молекуле ESR является, помимо непосредственно репротонирования основания Шиффа, еще и предотвращение обратных реакций, снижающих эффективность работы помпы. В отличие от BR и PR, в которых функцию донора протонов выполняют исходно протонированные карбоксильные остатки, остаток лизина в молекуле ESR приобретает протон непосредственно перед передачей его на основание Шиффа. Такая последовательность событий ранее была установлена в экспериментах с использованием pH-чувствительного красителя [41] и затем подтверждена с помощью метода прямой электрометрии [39]. Обнаружение отдельной электрогенной стадии, соответствующей протонированию донора в процессе перехода $M1 \leftrightarrow M2$ в результате повышения pH до 8,4 и соответствующего замедления репротонирования основания Шиффа, дополнительно продемонстрировало возможности данного метода, поскольку в оптических измерениях эта стадия никак не проявлялась. Описанные закономерности могут иметь

значение для понимания механизма функционирования открытых позднее ретинальных белков, также содержащих остаток лизина в качестве донора протонов для основания Шиффа [59, 60].

Как было отмечено выше, отсутствие протон-выделяющей группы и раннего выделения протонов является важным отличием ESR от BR. Однако в ходе исследования мутантных вариантов белка были обнаружены данные, свидетельствующие о частичном освобождении протона на более ранних стадиях фотоцикла – в момент образования интермедиата М. Так, относительная амплитуда соответствующей электрогенной фазы у мутанта H57N оказалась существенно больше, чем у ESR дикого типа (28% и 5% соответственно). Предположительно, у мутанта она включает в себя также освобождение протона на внеклеточной стороне белка, подобно тому, как это происходит у BR [56]. Раннее выделение протона было также зафиксировано у мутантов, содержащих замены лизина на карбоксильные остатки, K96D/A47T и K96E. В этом случае, по-видимому, оно происходит на цитоплазматической поверхности белка и является результатом увеличения гидратированности полости, содержащей донорные остатки, в процессе образования интермедиата М [46]. Для уточнения механизмов этих процессов в дальнейшем будут проведены дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные работы последних лет, посвященные ретинальным белкам, продемонстрировали их впечатляющее природное разнообразие, а также широкое распространение среди микроорганизмов, населяющих различные экологические ниши. Так, установлено, что более половины представителей микробных сообществ Мирового океана содержат гены родопсинов, которые вносят существенный вклад в усвоение солнечной энергии микроорганизмами [61, 62]. Общее устройство молекулы и основные механизмы функционирования этих белков являются универсальными для всего семейства, однако эволюционная адаптация к конкретным условиям существования приводит к возникновению тонких настроек этих механизмов [5]. На примере ESR, ретинального белка почвенной бактерии, мы показали, каким образом изменения первичной структуры находят отражение в особенностях протонного транспорта в его молекуле. Неоценимую роль в этих исследованиях играют методы, позво-

ляющие с высоким временным разрешением наблюдать за процессами, происходящими в молекуле белка в ответ на поглощение кванта света. В этой связи метод прямой электрометрии занимает особую нишу, обеспечивая получение уникальной информации о перемещении протона внутри молекул протонных помп. Изучение деталей пространственной структуры и функциональных особенностей микробных родопсинов способствует более полному пониманию принципов их устройства, а также открывает возможность разработки подходов для направленного изменения их свойств, например, с целью создания новых инструментов для оптогенетики [6, 63–65].

Вклад авторов. Л.Е. Петровская, С.А. Силецкий, С.П. Балашов, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников – концепция и руководство работой, редактирование текста статьи; Л.Е. Петровская, С.А. Силецкий, М.Д. Мамедов, Е.П. Лукашев, С.П. Балашов – написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00104).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Engelhard, M. (2022) Molecular Biology of Microbial Rhodopsins, in *Rhodopsin: Methods and Protocols* (Gordeliy, V., ed) Springer US, New York, NY, pp. 53-69, doi: 10.1007/978-1-0716-2329-9_2.
- Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., and Spudich, J. L. (2017) Microbial rhodopsins: diversity, mechanisms, and optogenetic applications, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 845-872, doi: 10.1146/annurev-biochem-101910-144233.
- Rozenberg, A., Inoue, K., Kandori, H., and Bèjà, O. (2021) Microbial rhodopsins: the last two decades, *Annu. Rev. Microbiol.*, **75**, 427-447, doi: 10.1146/annurev-micro-031721-020452.
- Gushchin, I., and Gordeliy, V. (2018) Microbial Rhodopsins, in *Membrane Protein Complexes: Structure and Function* (Harris, J. R., and Boekema, E. J., eds) Springer Singapore, Singapore. pp 19-56, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_2.
- Brown, L. S. (2022) Light-driven proton transfers and proton transport by microbial rhodopsins – A biophysical perspective, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, **1864**, 183867, doi: 10.1016/j.bbamem.2022.183867.
- Kandori, H. (2020) Biophysics of rhodopsins and optogenetics, *Biophys. Rev.*, **12**, 355-361, doi: 10.1007/s12551-020-00645-0.
- Lanyi, J. K. (2006) Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1012-1018, doi: 10.1016/j.bbabi.2005.11.003.
- Skulachev, V. P., Bogachev, A. V., and Kasparinsky, F. O. (2013) Bacteriorhodopsin, in *Principles of Bioenergetics*, Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, pp. 139-156, doi: 10.1007/978-3-642-33430-6_6.
- Oesterhelt, D., and Stoekenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halo-bacterium halobium*, *Nat. New Biol.*, **233**, 149-152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
- Balashov, S. P. (2000) Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1460**, 75-94, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00131-6.
- Neutze, R., Pebay-Peyroula, E., Edman, K., Royant, A., Navarro, J., and Landau, E. M. (2002) Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, **1565**, 144-167, doi: 10.1016/S0005-2736(02)00566-7.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., and Lanyi, J. K. (1999) Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution, *Science*, **286**, 255-260, doi: 10.1126/science.286.5438.255.
- Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., Arima, T., Yamashita, A., Kobayashi, J., Hosaka, T., Mizohata, E., Nogly, P., Sugahara, M., et al. (2016) A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin, *Science*, **354**, 1552-1557, doi: 10.1126/science.aah3497.
- Pushkarev, A., and Bèjà, O. (2016) Functional metagenomic screen reveals new and diverse microbial rhodopsins, *ISME J.*, **10**, 2331-2335, doi: 10.1038/ismej.2016.7.
- Inoue, K. (2021) Diversity, Mechanism, and Optogenetic Application of Light-Driven Ion Pump Rhodopsins, in *Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications in Neuroscience and Beyond* (Yawo, H., Kandori, H., Koizumi, A., and Kageyama, R., eds) Springer Singapore, Singapore, pp. 89-126, doi: 10.1007/978-981-15-8763-4_6.
- Bamann, C., Bamberg, E., Wachtveitl, J., and Glaubit, C. (2014) Proteorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1837**, 614-625, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.09.010.

17. Brown, L. S. (2014) Eubacterial rhodopsins – unique photosensors and diverse ion pumps, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1837**, 553-561, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.05.006.
18. Bergo, V. B., Sineshchekov, O. A., Kralj, J. M., Partha, R., Spudich, E. N., Rothschild, K. J., and Spudich, J. L. (2009) His-75 in proteorhodopsin, a novel component in light-driven proton translocation by primary pumps, *J. Biol. Chem.*, **284**, 2836-2843, doi: 10.1074/jbc.M803792200.
19. Hempelmann, F., Holper, S., Verhoefen, M. K., Woerner, A. C., Kohler, T., Fiedler, S. A., Pflieger, N., Wachtveitl, J., and Glaubitz, C. (2011) His75-Asp97 cluster in green proteorhodopsin, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4645-4654, doi: 10.1021/Ja111116a.
20. Petrovskaya, L. E., Lukashev, E. P., Chupin, V. V., Sychev, S. V., Lyukmanova, E. N., Kryukova, E. A., Ziganshin, R. H., Spirina, E. V., Rivkina, E. M., Khatypov, R. A., Erokhina, L. G., Gilichinsky, D. A., Shuvalov, V. A., and Kirpichnikov, M. P. (2010) Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump, *FEBS Lett.*, **584**, 4193-4196, doi: 10.1016/j.febslet.2010.09.005.
21. Petrovskaya, L., Balashov, S., Lukashev, E., Imasheva, E., Gushchin, I. Y., Dioumaev, A., Rubin, A., Dolgikh, D., Gordeliy, V., Lanyi, J., and Kirpichnikov, M. (2015) ESR – A retinal protein with unusual properties from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 688-700, doi: 10.1134/S000629791506005X.
22. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324, doi: 10.1038/249321a0.
23. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Semenov, A. Y., Severina, I. I., and Skulachev, V. P. (1979) Lipid-impregnated filters as a tool for studying the electric current-generating proteins, *Anal. Biochem.*, **96**, 250-262, doi: 10.1016/0003-2697(79)90580-3.
24. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Khitrina, L. V., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 461-470, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06361.x.
25. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., and Petrovskaya, L. E. (2022) Application of direct electrometry in studies of microbial rhodopsins reconstituted in proteoliposomes, *Biophys. Rev.*, **14**, 771-778, doi: 10.1007/s12551-022-00986-y.
26. Kovalev, K., Volkov, D., Astashkin, R., Alekseev, A., Gushchin, I., Haro-Moreno, J. M., Chizhov, I., Siletsky, S., Mamedov, M., and Rogachev, A. (2020) High-resolution structural insights into the heliorhodopsin family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 4131-4141, doi: 10.1073/pnas.1915888117.
27. Rokitskaya, T. I., Maliar, N. L., Siletsky, S. A., Gordeliy, V., and Antonenko, Y. N. (2022) Electrophysiological Characterization of Microbial Rhodopsin Transport Properties: Electrometric and ΔpH Measurements Using Planar Lipid Bilayer, Collodion Film, and Fluorescent Probe Approaches, in *Rhodopsin: Methods and Protocols* (Gordeliy, V. ed) Springer US, New York, NY, pp. 259-275, doi: 10.1007/978-1-0716-2329-9_12.
28. Mamedov, M. D., Beshta, O. E., Samuilov, V. D., and Semenov, A. Y. (1994) Electrogenicity at the secondary quinone acceptor site of cyanobacterial photosystem II, *FEBS Lett.*, **350**, 96-98, doi: 10.1016/0014-5793(94)00742-X.
29. Mamedov, M., Gadzhieva, R., Gourovskaya, K., Drachev, L., and Semenov, A. Y. (1996) Electrogenicity at the donor/acceptor sides of cyanobacterial photosystem I, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **28**, 517-522, doi: 10.1007/BF02110441.
30. Mamedov, M. D., Tyunyatkina, A. A., Siletsky, S. A., and Semenov, A. Y. (2006) Voltage changes involving photosystem II quinone–iron complex turnover, *Eur. Biophys. J.*, **35**, 647-654, doi: 10.1007/s00249-006-0069-3.
31. Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1817**, 476-488, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.08.003.
32. Siletsky, S. A., Soulimane, T., Belevich, I., Gennis, R. B., and Wikström, M. (2021) Specific inhibition of proton pumping by the T315V mutation in the K channel of cytochrome *ba₃* from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1862**, 148450, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148450.
33. Siletsky, S. A., and Gennis, R. B. (2021) Time-resolved electrometric study of the F→O transition in cytochrome *c* oxidase. The effect of Zn²⁺ ions on the positive side of the membrane, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 105-122, doi: 10.1134/S0006297921010107.
34. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Wikström, M. (2017) Time-resolved generation of membrane potential by *ba₃* cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus* coupled to single electron injection into the O and O_H states, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1858**, 915-926, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.007.
35. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2011) Time-resolved single-turnover of *caa₃* oxidase from *Thermus thermophilus*. Fifth electron of the fully reduced enzyme converts O_H into E_H state, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1807**, 1162-1169, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.05.006.

36. Lozier, R. H., Bogomolni, R. A., and Stoerkenius, W. (1975) Bacteriorhodopsin: A light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*, *Biophys. J.*, **15**, 955-963, doi: 10.1016/S0006-3495(75)85875-9.
37. Dioumaev, A. K., Brown, L. S., Shih, J., Spudich, E. N., Spudich, J. L., and Lanyi, J. K. (2002) Proton transfers in the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin, *Biochemistry*, **41**, 5348-5358, doi: 10.1021/bi025563x.
38. Balashov, S. P., Petrovskaya, L. E., Lukashev, E. P., Imasheva, E. S., Dioumaev, A. K., Wang, J. M., Sychev, S. V., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Lanyi, J. K. (2012) Aspartate-histidine interaction in the retinal Schiff base counterion of the light-driven proton pump of *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochemistry*, **51**, 5748-5762, doi: 10.1021/bi300409m.
39. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2016) Electrogenic steps of light-driven proton transport in ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1857**, 1741-1750, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.08.004.
40. Dioumaev, A. K., Petrovskaya, L. E., Wang, J. M., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Kirpichnikov, M. P., and Lanyi, J. K. (2013) Photocycle of *Exiguobacterium sibiricum* rhodopsin characterized by low-temperature trapping in the IR and time-resolved studies in the visible, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 7235-7253, doi: 10.1021/jp402430w.
41. Balashov, S. P., Petrovskaya, L. E., Imasheva, E. S., Lukashev, E. P., Dioumaev, A. K., Wang, J. M., Sychev, S. V., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Lanyi, J. K. (2013) Breaking the carboxyl rule: lysine 96 facilitates reprotonation of the Schiff base in the photocycle of a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 21254-21265, doi: 10.1074/jbc.M113.465138.
42. Huang, K.-S., Bayley, H., and Khorana, H. G. (1980) Delipidation of bacteriorhodopsin and reconstitution with exogenous phospholipid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 323-327, doi: 10.1073/pnas.77.1.323.
43. Kaulen, A. D. (2000) Electrogenic processes and protein conformational changes accompanying the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1460**, 204-219, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00140-7.
44. Gushchin, I., Chervakov, P., Kuzmichev, P., Popov, A. N., Round, E., Borshchevskiy, V., Ishchenko, A., Petrovskaya, L., Chupin, V., Dolgikh, D. A., Arseniev, A. S., Kirpichnikov, M., and Gordeliy, V. (2013) Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 12631-12636, doi: 10.1073/pnas.1221629110.
45. Zscherp, C., Schlesinger, R., Tittor, J., Oesterhelt, D., and Heberle, J. (1999) *In situ* determination of transient pKa changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5498-5503, doi: 10.1073/pnas.96.10.5498.
46. Petrovskaya, L. E., Lukashev, E. P., Siletsky, S. A., Imasheva, E. S., Wang, J. M., Mamedov, M. D., Kryukova, E. A., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., Balashov, S. P., and Lanyi, J. K. (2022) Proton transfer reactions in donor site mutants of ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **234**, 112529, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112529.
47. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2019) Elimination of proton donor strongly affects directionality and efficiency of proton transport in ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1860**, 1-11, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.09.365.
48. Otto, H., Marti, T., Holtz, M., Mogi, T., Lindau, M., Khorana, H. G., and Heyn, M. P. (1989) Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9228-9232, doi: 10.1073/pnas.86.23.9228.
49. Holz, M., Drachev, L. A., Mogi, T., Otto, H., Kaulen, A. D., Heyn, M. P., Skulachev, V. P., and Khorana, H. G. (1989) Replacement of aspartic acid-96 by asparagine in bacteriorhodopsin slows both the decay of the M intermediate and the associated proton movement, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2167-2171, doi: 10.1073/pnas.86.7.2167.
50. Dioumaev, A. K., Brown, L. S., Needleman, R., and Lanyi, J. K. (2001) Coupling of the reisomerization of the retinal, proton uptake, and reprotonation of Asp-96 in the N photointermediate of bacteriorhodopsin, *Biochemistry*, **40**, 11308-11317, doi: 10.1021/bi011027d.
51. Sasaki, S., Tamogami, J., Nishiya, K., Demura, M., and Kikukawa, T. (2021) Replaceability of Schiff base proton donors in light-driven proton pump rhodopsins, *J. Biol. Chem.*, **297**, 101013, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101013.
52. Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Boichenko, V. A., Antón, J., Wang, J. M., and Lanyi, J. K. (2005) Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna, *Science*, **309**, 2061-2064, doi: 10.1126/science.1118046.
53. Luecke, H., Schobert, B., Stagno, J., Imasheva, E. S., Wang, J. M., Balashov, S. P., and Lanyi, J. K. (2008) Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16561-16565, doi: 10.1073/pnas.0807162105.
54. Ran, T., Ozorowski, G., Gao, Y., Sineshchekov, O. A., Wang, W., Spudich, J. L., and Luecke, H. (2013) Cross-protomer interaction with the photoactive site

- in oligomeric proteorhodopsin complexes, *Acta Cryst.*, **D69**, 1965–1980, doi: 10.1107/S0907444913017575.
55. Maciejko, J., Kaur, J., Becker-Baldus, J., and Glaubitz, C. (2019) Photocycle-dependent conformational changes in the proteorhodopsin cross-protomer Asp–His–Trp triad revealed by DNP-enhanced MAS-NMR, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **116**, 8342–8349, doi: 10.1073/pnas.1817665116.
 56. Morizumi, T., Ou, W.-L., Van Eps, N., Inoue, K., Kandori, H., Brown, L. S., and Ernst, O. P. (2019) X-ray crystallographic structure and oligomerization of *Gloeobacter* rhodopsin, *Sci. Rep.*, **9**, 1–14, doi: 10.1038/s41598-019-47445-5.
 57. Siletsky, S. A., Lukashev, E. P., Mamedov, M. D., Borisov, V. B., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2021) His57 controls the efficiency of ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum* at low and high pH, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1862**, 148328, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148328.
 58. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., and Lanyi, J. K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **291**, 899–911, doi: 10.1006/jmbi.1999.3027.
 59. Iverson, V., Morris, R. M., Frazar, C. D., Berthiaume, C. T., Morales, R. L., and Armbrust, E. V. (2012) Untangling genomes from metagenomes: revealing an uncultured class of marine Euryarchaeota, *Science*, **335**, 587–590, doi: 10.1126/science.1212665.
 60. Martin-Cuadrado, A. B., Garcia-Heredia, I., Molto, A. G., Lopez-Ubeda, R., Kimes, N., Lopez-Garcia, P., Moreira, D., and Rodriguez-Valera, F. (2015) A new class of marine Euryarchaeota group II from the Mediterranean deep chlorophyll maximum, *ISME J.*, **9**, 1619–1634, doi: 10.1038/ismej.2014.249.
 61. Finkel, O. M., Béjà, O., and Belkin, S. (2013) Global abundance of microbial rhodopsins, *ISME J.*, **7**, 448–451, doi: 10.1038/ismej.2012.112.
 62. Gómez-Consarnau, L., Raven, J. A., Levine, N. M., Cutter, L. S., Wang, D., Seegers, B., Arístegui, J., Fuhrman, J. A., Gasol, J. M., and Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2019) Microbial rhodopsins are major contributors to the solar energy captured in the sea, *Sci. Adv.*, **5**, eaaw8855, doi: 10.1126/sciadv.aaw8855.
 63. Kojima, K., Shibukawa, A., and Sudo, Y. (2020) The unlimited potential of microbial rhodopsins as optical tools, *Biochemistry*, **59**, 218–229, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00768.
 64. De Grip, W. J., and Ganapathy, S. (2022) Rhodopsins: an excitingly versatile protein species for research, development and creative engineering, *Front. Chem.*, **10**, 879609, doi: 10.3389/fchem.2022.879609.
 65. Emiliani, V., Entcheva, E., Hedrich, R., Hegemann, P., Konrad, K. R., Lüscher, C., Mahn, M., Pan, Z.-H., Sims, R. R., Vierock, J., and Yizhar, O. (2022) Optogenetics for light control of biological systems, *Nat. Rev. Meth. Primers*, **2**, 55, doi: 10.1038/s43586-022-00136-4.

FEATURES OF PROTON TRANSPORT MECHANISM IN ESR, A RETINAL PROTEIN FROM *Exiguobacterium sibiricum*

Review

L. E. Petrovskaya^{1*}, S. A. Siletsky², M. D. Mamedov², E. P. Lukashev³, S. P. Balashov⁴,
D. A. Dolgikh^{1,3}, and M. P. Kirpichnikov^{1,3}

¹ Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: lpetr65@yahoo.com

² Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁴ Department of Physiology and Biophysics, University of California, Irvine 92697, USA

Retinal-containing photosensitive proteins, rhodopsins, have been detected in many microorganisms. The interest in them is largely explained by their role in storing light energy and photoregulation in microorganisms and the prospects for use in optogenetics in order to control the activity of neurons, including for the treatment of various diseases. One of the representatives of microbial rhodopsins is ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*. The presence of a lysine residue (Lys96) as a proton donor for the Schiff base distinguishes ESR from homologous proteins. This feature, along with the hydrogen bonding of the proton acceptor Asp85 with the His57 residue, determines its functional characteristics as a proton pump. The review examines the results of ESR studies conducted using various methods, including the method of direct electrometry. Comparison of the obtained data with the results of spatial structure determination and with other retinal proteins allows drawing conclusions about the mechanisms of transport of hydrogen ions in the ESR molecule and similar retinal proteins.

Keywords: retinal protein, proteorhodopsin, Schiff base, proton acceptor, proton donor, photocycle, direct electrometric method

КАНАЛЬНЫЕ РОДОПСИНЫ: ОТ ФОТОТАКСИСА К ОПТОГЕНЕТИКЕ

Обзор

© 2023 Е.Г. Говорунова, О.А. Синешев*

электронная почта: egovoru@yahoo.com; oleg_sinesh@yahoo.com

Поступила в редакцию 24.06.2023

После доработки 09.07.2023

Принята к публикации 09.07.2023

Среди всего многообразия ретинальных белков каналные родопсины выделяются своей уникальной способностью к генерации пассивных ионных токов при фотовозбуждении. Благодаря этой способности каналные родопсины широко используются в нейрофизиологии и кардиологии как инструменты для оптогенетической манипуляции активностью возбудимых клеток. Впервые токи, генерируемые каналными родопсинами, были обнаружены в нативных клетках зеленых водорослей в 1970-е гг. В этом обзоре мы прослеживаем историю этого открытия и обсуждаем современное состояние исследований в этой области.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: родопсины, ионные каналы, фоторецепция, мембранный потенциал, жгутиковые водоросли, нейроны.

DOI: 10.31857/S0320972523100111, **EDN:** ОТОРОФ

ВВЕДЕНИЕ

Бактериородопсин, у истоков изучения которого стоял Л.А. Драчев [1–3], был первым ретинальным белком, обнаруженным не в тканях животных, а у микроорганизмов. Открытие бактериородопсина Oesterhelt и Stoeckenius [4] в начале 1970-х гг. стало сенсацией, а легкость выделения этого белка в больших количествах из организма-хозяина, галоархеи *Halobacterium salinarum*, и исключительная стабильность сделали его излюбленным объектом интенсивных биофизических, биохимических и структурно-биологических исследований [5–8]. Без преувеличения можно сказать, что сегодня мы знаем о бактериородопсине не только больше, чем о любом другом ретинальном белке, но и больше, чем о любом интегральном мембранном белке, моделью изучения которых он служит. В отличие от зрительных родопсинов, выполняющих сенсорную функцию посредством активирования энзиматического каскада, бактериородопсин — электрогенная протонная помпа, осуществляющая трансмембранный пе-

ренос протона из цитоплазмы во внеклеточную среду и обеспечивающая основной механизм утилизации солнечной энергии в клетках галоархей.

Обнаружение фотоэлектрической активности бактериородопсина стимулировало поиски подобных процессов у других микроорганизмов. Большинство подвижных про- и эукариот способны реагировать на свет изменением характера своего движения [9, 10]. Первые сенсорные родопсины, SRI [11–13] и SRII [14], были открыты у *Hal. salinarum*. При фотовозбуждении эти белки не генерируют трансмембранные электрические токи, а запускают энзиматический каскад, в конце концов приводящий к двигательным реакциям клеток. В отличие от галоархей, реагирующих на свет изменением частоты реверсий направления движения, одноклеточные зеленые водоросли способны к настоящему фототаксису, т.е. к ориентированному движению по направлению светового луча [15]. Обсуждение этого явления с Е.Н. Кондратьевой, известным специалистом по фототрофным микроорганизмам [16], а также успешная регистрация фотоиндуцированных изменений потенциала изолированных хлоропластов высших растений [17] способствовали началу работ по изучению возможной роли электрических процессов в фото-

Принятые сокращения: КР — каналный родопсин; ПФТ — поздний фоторецепторный ток; РФТ — ранний фоторецепторный ток.

* Адресат для корреспонденции.

рецепции зеленых водорослей на кафедре физико-химической биологии биологического факультета МГУ под руководством Ф.Ф. Литвина. Электрические стадии трансдукции фотосенсорного сигнала не удалось обнаружить, вводя микроэлектрод в клетку водоросли, как это делается для регистрации электрических явлений, связанных с фотосинтезом [18]. Только разработка нового метода внеклеточного отведения при помощи электрода-присоски вторым автором настоящего обзора позволила этого достичь [19, 20].

При помощи этого метода было показано, что освещение в спектральной области, характерной для фототаксиса, приводит к генерации трансмембранного фоторецепторного потенциала в области мембраны, прилегающей к «глазку» (стигме) — внутриклеточному органеллу, представляющему собой скопление каротиноидных гранул и служащему для модуляции освещенности фоторецептора во время движения клетки. Изотоническое распространение деполяризующего фоторецепторного потенциала на мембрану жгутиков вызывает регенеративную электрическую реакцию, подобную потенциалу действия нейронов. Успех этих работ был в значительной мере связан с удачным выбором объекта — *Haematococcus pluvialis*, зеленой водоросли относительно большого размера с эластичной клеточной стенкой. Разработка вторым автором этого обзора другого оригинального метода — измерения фототоков в суспензии свободно плавающих микроорганизмов — позволяет регистрировать обе стадии этого фотоэлектрического сенсорного каскада практически в любом организме, обладающем фототаксисом, независимо от его размера [21]. При помощи суспензиального метода удалось измерить фототоки у всех исследованных зеленых и криптофитовых водорослей [22–27].

В отличие от бактериородопсина, основного компонента пурпурных мембран, занимающих ~50% поверхности клетки, фоторецепторные белки, ответственные за фототаксис жгутиковых водорослей, присутствуют в их клетках в очень низкой концентрации [28] и не поддаются очистке биохимическими методами. На основании анализа спектров действия фототаксиса Foster и Smyth [29] было высказано предположение, что они могут быть ретинальными белками. Обширный набор косвенных данных, полученных в 1980–1990-е гг., включая восстановление фототаксиса у «слепых» мутантов зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, не способных синтезировать каротиноиды, после добавления экзогенного

ретинала, позволил подтвердить это предположение [30–32]. Идентифицировать же фоторецепторные белки хламидомонады (а точнее, кодирующие их гены) на молекулярном уровне удалось только после того, как были разработаны дешевые методы секвенирования полинуклеотидных последовательностей, причем оказалось, что геном *C. reinhardtii* кодирует не один, а два таких белка [23, 33–35]. Примечательно, что по своей аминокислотной последовательности, изомерному составу хромофора и первичным фотохимическим процессам родопсины *C. reinhardtii* оказались ближе к бактериородопсину, чем к зрительным родопсинам животных. Исследование фоторецепторных токов генетических трансформантов хламидомонады с пониженным содержанием родопсинов позволило установить, что эти белки служат фоторецепторами при фототаксисе и фотофобной (фотошоковой) двигательной реакции этой водоросли, хотя генерируемые ими фоторецепторные токи различаются по своим свойствам [23, 28].

Но в полной мере уникальность родопсинов хламидомонады выявилась путем экспрессии их генов в клетках животных, таких как ооциты шпорцевой лягушки, выполненной Nagel et al. [33, 34] (ранее эта методика была успешно применена и к бактериородопсину [36]). Оказалось, что, в отличие от этого последнего, родопсины хламидомонады осуществляют пассивный транспорт катионов (не только протонов, но и ионов натрия, калия и, в значительно меньшей степени, кальция) через клеточную мембрану, т.е. представляют собой фотоактивируемые катионные каналы, единственные в своем роде. Эта особенность послужила основанием для введения специального термина для обозначения этих белков, «канальные родопсины» (channelrhodopsins, КР), быстро вытеснившего их прежние наименования «сенсорные родопсины хламидомонады» [23] и «родопсины архейного типа» [35].

Широкую известность КР приобрели после того, как было показано, что с их помощью можно стимулировать активность нейронов освещением [37–39]. Эта методика, получившая название «оптогенетики», произвела настоящую революцию в нейрофизиологии и смежных областях [40–43]. Более того, есть основания надеяться, что КР могут оказаться полезными для генной терапии многих нервных, психиатрических и сердечно-сосудистых заболеваний [44, 45]. Особый оптимизм вызывает возможность оптогенетического восстановления зрения у пациентов с дегенерацией

сетчатки [46]. Протонные помпы, подобные бактериородопсину, тоже находят применение в оптогенетике в качестве инструментов для подавления активности нейронов [47], хотя они переносят против электрохимического градиента менее одного заряда на каждый поглощенный фотон и потому генерируют не такие большие токи, как КР, что требует более интенсивного и/или длительного освещения для изменения мембранного потенциала.

Массовое секвенирование геномов и транскриптомов привело к открытию КР у эукариот из нескольких других базовых таксонов, помимо зеленых водорослей. Более того, выяснилось, что кроме катионных КР, у фототрофных [48] и даже гетеротрофных [49] протистов широко распространены КР, селективно проводящие анионы. Катионная же проводимость, по всей вероятности, независимо возникла по крайней мере дважды в эволюции КР, причем в одном случае эти белки сохранили многие черты, роднящие их с бактериородопсином [50]. Наконец, в прошлом году были обнаружены катионные КР, проводящие ионы калия много лучше, чем ионы натрия [51], и можно предполагать, что этим разнообразие КР еще не исчерпывается.

У ретинальных ионных помп, подобных бактериородопсину, все этапы ионного транспорта строго привязаны к определенным стадиям цикла фотохимических превращений пигмента (фотоцикла), регистрируемого оптическими методами на очищенных белках или мембранах [52]. В отличие от помп, фототоки КР различных семейств коррелируют с разными стадиями фотоцикла, предоставляя информацию о механизмах функционирования каналов [50, 53–55].

В этом обзоре мы рассмотрим методы регистрации канальной активности родопсинов в нативных клетках, фотоэлектрический каскад жгутиковых водорослей, фоторецепторную роль КР в фототаксисе, а также затронем их разнообразие и оптогенетическое применение. Более детальные сведения о молекулярных механизмах КР могут быть почерпнуты из других обзоров [56–59]. Истории и принципам оптогенетики также посвящено много публикаций [42, 60–65].

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ КАНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РОДОПСИНОВ В КЛЕТКАХ ЖГУТИКОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Внутриклеточные микроэлектроды широко применяются для регистрации фотоиндуциро-

ванных изменений мембранного потенциала палочек и колбочек сетчатки, опосредованных закрытием каналов, регулируемых циклическими нуклеотидами [66]. Малый объем клеток жгутиковых водорослей, однако, затрудняет использование этого метода для изучения канальной активности их родопсинов. Некоторые зеленые жгутиконосцы, в первую очередь *H. pluvialis*, обладают эластичной клеточной стенкой, позволяющей всасывать их клетки в микроприсоску. При этом не образуется гигантского контакта мембраны клетки со стеклом присоски, необходимого для фиксации мембранного потенциала (технология пэтч-кламп), но асимметричное распределение КР в мембране позволяет регистрировать генерируемые ими фотоиндуцированные сигналы [19, 20]. Тринадцать лет спустя этот метод (получивший название метода электрода-присоски; рис. 1, а) был применен к мутанту *C. reinhardtii*, лишенному твердых слоев клеточной оболочки [67], а еще через восемь лет – к мутанту *Volvox carteri* [68]. *C. reinhardtii* – модельный объект многих биологических исследований, и именно в его геноме впоследствии были идентифицированы первые гены КР [23, 33–35].

Метод электрода-присоски позволил впервые обнаружить, что восприятие света фоторецепторными молекулами жгутиковых водорослей приводит к деполяризации их мембраны [19, 20], что и заложило основу для развития оптогенетики четверть века спустя. Однако этот метод не только является достаточно трудоемким, но его применение еще и ограничено клетками с эластичной оболочкой, редко встречающимися среди жгутиконосцев. Кроме того, механическое всасывание клетки в присоску может стимулировать активность ее механорецепторов [69] и в любом случае представляет собой неестественную ситуацию. Асимметричная локализация молекул-генераторов фототоков в разных участках клеточной мембраны, установленная методом «электрода-присоски», привела к мысли, что суммарный ток тысяч клеток в суспензии может быть зарегистрирован и без искусственного увеличения сопротивления между различными участками мембраны стеклом присоски.

В первой модификации суспензионного метода фотовспышка направляется вдоль линии, соединяющей электроды (рис. 1, б). Фоторецепторный ток, генерируемый КР в клетках жгутиконосцев, повернутых в момент световой вспышки своими фоторецепторами в сторону источника света, превышает по амплитуде ток, генерируемый клетками, ориентированными противоположным образом,

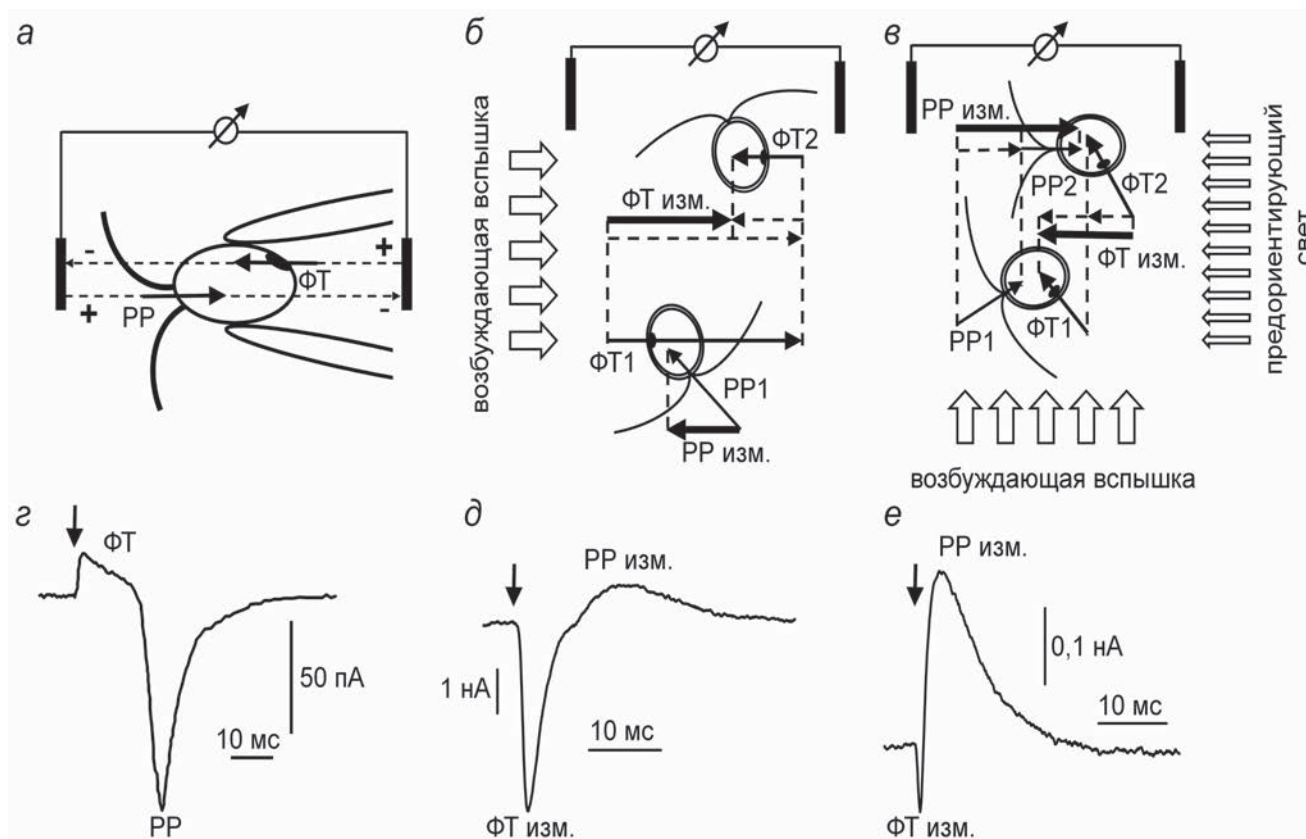


Рис. 1. Методы измерения и примеры фотоэлектрических сигналов, регистрируемых в клетках зеленых жгутиковых водорослей: а–в – схемы метода электрода-присоски (а), измерений в суспензии неориентированных клеток (б) и измерений в суспензии предориентированных клеток (в); з–е – примеры сигналов, отводимых от одиночной клетки (з), суспензии неориентированных клеток (д) и суспензии предориентированных клеток (е). Стрелками на панелях з–е показан момент возбуждающей вспышки. ФТ – фоторецепторный ток; РР – регенеративная реакция; изм. – измераемый

и разница между этими токами регистрируется погруженными в суспензию электродами. Другая модификация метода измерения фоторецепторных токов в суспензии водорослей основана на предориентации клеток светом, вызывающим фототаксис, или гравитационным полем, направленными перпендикулярно измерительной вспышке (рис. 1, в). В этом случае электроды регистрируют проекцию фоторецепторного тока на направление предориентирующего фактора, что позволяет оценить и мгновенное значение степени ориентации [21, 70, 71].

При использовании обеих модификаций суспензионного метода регистрация производится в полностью физиологических условиях и не ограничивается размерами микроорганизмов и строением их клеточной стенки. Универсальность и техническая простота позволили распространить этот метод на исследование большого числа мутантов хламидомонады с нарушениями строения стигмы [72] и дефектами фотоповедения [73, 74]. Кроме того, при помощи суспензионного метода было установлено, что появление фототаксиса

у «слепых» бескаротиноидных мутантов после добавления экзогенного ретиналя действительно связано с регенерацией самих фоторецепторных белков, а не, например, встраиванием ретиналя в стигму [31]. Более того, суспензионный метод позволил обнаружить и охарактеризовать генерируемые КР фотоиндуцированные сигналы еще у целого ряда зеленых водорослей, а именно, представителей родов *Spermatozopsis*, *Hafniomonas*, *Polytomella*, *Mesostigma* и *Platymonas*, а также у филогенетически далекой криптофитовой водоросли *Cryptomonas* [24–27]. Наконец, суспензионный метод измерения фоторецепторных токов был использован как косвенный подход для изучения гравирецепции [21] и хеморецепции [75] хламидомонады, а также послужил основой для разработки экспресс-биотеста для оценки степени загрязнения воды тяжелыми металлами и формальдегидом [76, 77]. С более детальным техническим описанием обоих методов, электрода-присоски и суспензионного, можно ознакомиться в нескольких ранее опубликованных обзорах [25, 70, 71].

Электрофизиологические исследования фоторецепторного тока предоставили сведения о фоторецепторных белках жгутиковых водорослей еще до того, как были клонированы кодирующие их гены. Производство квантового выхода на оптическое сечение поглощения молекулы, полученное путем аппроксимации световой зависимости фоторецепторного тока, имеет характерное для ретинальных белков значение $0,8 \text{ \AA}$ [78]. Восстановление фоторецепторного тока после насыщающей вспышки позволило оценить длительность фотоцикла фоторецепторного пигмента (100 мс). Исследования зависимости амплитуды фоторецепторного тока от ориентации плоскости поляризации светового стимула показало, что ретинальный хромофор расположен в плоскости мембраны клетки [79, 80]. Спектры действия фоторецепторного тока и фотоповедения *H. pluvialis* имеют сложную многополосную форму, указывающую на то, что фоторецепторная система жгутиконосцев может состоять из нескольких пигментов. Вклад двух фоторецепторных белков в фототаксис был непосредственно продемонстрирован на модельном организме *C. reinhardtii* [23], а у других водорослей обнаружено еще больше кандидатов на эту роль. Однако все эти белки представляют собой не светоактивируемые ионные помпы, как бактериородопсин, а светоактивируемые ионные каналы [33, 34].

ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ КАСКАД ПРИ ФОТОТАКСИСЕ ЖГУТИКОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Фотоэлектрический сигнал, отводимый от клеток *H. pluvialis*, фиксированных на микроприсоске, состоит из градуального фоторецепторного тока и вызываемой им вторичной регенеративной реакции, протекающей по принципу «все или ничего». Сравнение знаков этих компонентов сигнала при всасывании в присоску различных частей клетки позволило установить, что первичный ток, направленный внутрь клетки, протекает только через небольшой участок мембраны, подстилающий стигму [19, 20, 67]. Первоначально предполагалось, что сам этот внутриклеточный органоид содержит фоторецепторный пигмент [81], но впоследствии выяснилось, что он играет только вспомогательную роль затеняющего и/или фокусирующего свет образования [29, 82, 83].

После клонирования генов КР появилась возможность исследовать внутриклеточную локализацию кодируемых ими белков методами

иммунофлуоресцентной микроскопии. Было показано, что КР *C. reinhardtii* сосредоточены главным образом в области стигмы [35, 84, 85], что полностью соответствует результатам электрофизиологических измерений. Анализ препарата изолированных стигм методами протеомики тоже показал наличие КР [86]. Согласно текущим представлениям, молекулы КР встроены в плазматическую мембрану, обнаруживающую особую ультраструктуру в области, прилегающей к стигме [87]. У клеток *C. reinhardtii*, выращиваемых при циклическом освещении, иммунофлуоресцентными методами КР найдены, помимо стигмы, еще в жгутиках и базальных телах, причем их количество в этих органоидах зависит от фазы цикла [88, 89]. Функциональное состояние локализованных там родопсинов пока неизвестно.

Во время движения клетки жгутиконосцев вращаются вокруг своей оси, так что фоторецепторный участок плазматической мембраны испытывает периодическое изменение освещенности [9, 29, 90–94]. Для клетки, удерживаемой на микроприсоске, эти условия можно смоделировать периодическим освещением с частотой около 1 Гц. При использовании интенсивности света, вызывающей фототаксис, у клетки *H. pluvialis* наблюдается увеличение частоты биения *цис*-жгутика (ближайшего к стигме) и снижение частоты биения *транс*-жгутика на включение света, и противоположные реакции – на его выключение [78, 90, 95]. У свободно плавающей клетки такие асимметричные изменения биения жгутиков должны приводить к изменению направления ее движения, т.е. фототаксису. Более детально исследованные фотоиндуцированные двигательные реакции жгутиков *C. reinhardtii* выражаются в изменении не только частоты, но и амплитуды и скорости биения [96–99].

Регенеративная электрическая реакция протекает в мембране жгутиков и потому часто описывается в литературе как «жгутиковый ток» [32, 67, 70]. Параллельная регистрация биения жгутиков фиксированной на присоске клетки и ее фотоэлектрического ответа показала, что регенеративная реакция вызывает изменение характера биения жгута, наблюдаемого у свободно движущейся клетки во время фотофобной реакции [19, 20, 78, 95, 100]. Эта реакция представляет собой резкую остановку и/или изменение направления движения клетки, наблюдаемую, когда интенсивность или длительность светового стимула превышает некоторый порог [9, 10, 91, 101, 102].

Амплитуда регенеративной реакции практически не зависит от интенсивности свето-

вого стимула, в то время как длительность лаг-периода от начала освещения до начала этой реакции обнаруживает обратную зависимость от интенсивности света. Интервал под кривой фоторецепторного тока до начала регенеративной реакции остается постоянным при любой интенсивности и увеличивается при использовании красного фонового освещения, гиперполяризующего мембрану за счет фотосинтеза [18, 78, 79, 103]. Это показывает, что для инициации регенеративной реакции требуется перенос через мембрану определенного числа зарядов, деполяризующего ее на несколько мВ.

Выраженная зависимость регенеративной реакции от концентрации Ca^{2+} в среде и ее чувствительность к блокаторам кальциевых каналов свидетельствуют о том, что она является результатом открывания потенциал-зависимых кальциевых каналов в мембране жгутиков клетки [19, 20, 67]. Анализ изменения амплитуды регенеративной реакции в процессе отрастания жгутиков у клеток *C. reinhardtii* после их ампутации показал, что опосредующие ее каналы распределены по всей длине жгутика [104]. Наличие мутанта, не способного к генерации регенеративной реакции [74], позволило клонировать ген *cav2*, кодирующий эти каналы [105]. Иммунофлуоресцентная микроскопия выявила преимущественное сосредоточение белка CAV2 в проксимальной части жгутика.

КОМПОНЕНТЫ ФОТОРЕЦЕПТОРНОГО ТОКА

Использование наносекундных лазерных вспышек и записи с высоким временным разрешением позволило установить, что фоторецепторный ток состоит из двух компонентов, различающихся по своим свойствам [25, 32, 78, 95, 106, 107]. Эти компоненты выявляются у всех исследованных организмов, свидетельствуя об общих принципах организации их фоторецепторных систем и цепей трансдукции сигнала. Появление раннего фоторецепторного тока (РФТ) ограничено только скоростью пропускания измерительной системы (<30 мкс — для клетки на присоске [106] и <3 мкс — для суспензионного метода [31]). Напротив, поздний фоторецепторный ток (ПФТ) регистрируется с задержкой вплоть до нескольких миллисекунд, длительность которой зависит от интенсивности светового стимула. По крайней мере два компонента выявляются и в кинетике спада сигнала. Световое насыщение РФТ

определяется только фотохимическими процессами поглощения света, в то время как насыщение ПФТ наблюдается при интенсивностях примерно в 1000 раз меньше. Только ПФТ, но не РФТ, обнаруживает зависимость от температуры и красного фонового освещения, активирующего фотосинтез и приводящего к гиперполяризации мембраны [18, 106]. Наконец, ПФТ обладает более выраженной зависимостью от концентрации Ca^{2+} в среде, чем РФТ [25]. Таким образом, кинетика собственно ПФТ может быть определена как разностный сигнал до и после всех этих воздействий (рис. 2, а).

Максимальные амплитуды токов, наблюдаемые в насыщении ПФТ и РФТ соотносятся, как $<1 : 10$. Деполяризация мембраны, однако, пропорциональна не максимальному току, а числу зарядов, перенесенному через мембраны, т.е. интегралу тока. Медленное закрытие каналов ПФТ приводит к тому, что деполяризация мембраны благодаря РФТ и ПФТ оказывается практически одинаковой в насыщении, хотя это насыщение отличается в 1000 раз по интенсивности (рис. 2, б).

Кальциевые каналы, через которые протекает ПФТ, локализованы вблизи стигмы, но не обязательно в ее пределах. Именно эти вторичные Ca^{2+} -каналы обеспечивают крайне высокую, почти «single-quantum» чувствительность фототаксиса [108]. Важно подчеркнуть, что, в отличие от каналов в мембране жгутика, они не являются потенциал-зависимыми, поскольку генерируют градуальный ток (т.е. ток, амплитуда которого меняется при изменении величины стимула). В геноме *C. reinhardtii* идентифицировано по крайней мере 43 гена Ca^{2+} -каналов [109], но функции лишь немногих из кодируемых ими белков были установлены. В изолированных препаратах стигм обнаруживается несколько Ca^{2+} -связывающих белков, но не Ca^{2+} -каналы [86, 110]. Одна из возможных причин — недостаточная чувствительность методов протеомики для идентификации интегральных мембранных белков. Также вероятно, что эти гипотетические каналы не являются гомологами каких-либо прежде известных Ca^{2+} -каналов, и потому их последовательности не распознаются как таковые.

Механизмы активации вторичных каналов при генерации ПФТ пока не ясны. В препаратах изолированных стигм, содержащих и фоторецепторную мембрану, были обнаружены гетеротримерные ГТФазы, Ca^{2+} -зависимые протеин-киназы и фосфатазы [111–113]. Однако эти белки могут быть элементами других сигнальных каскадов, например, запускаемых

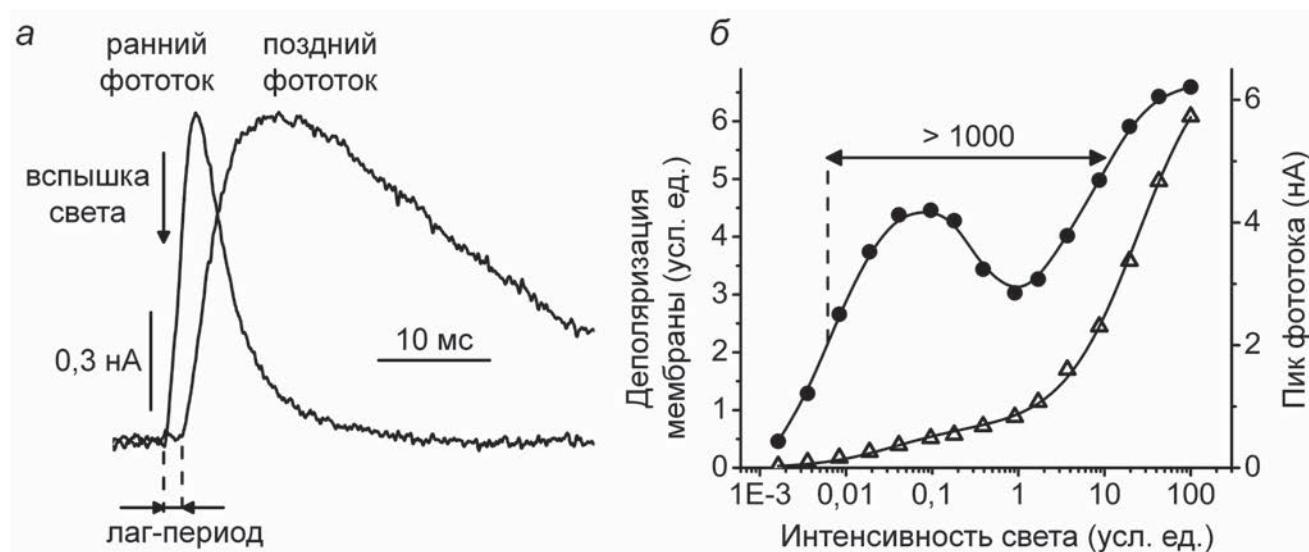


Рис. 2. Характеристики компонентов фоторецепторного тока зеленой жгутиковой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*: а — кинетика раннего и позднего фоторецепторных токов, измеренных в суспензии клеток; б — световая зависимость пиковой амплитуды фоторецепторного тока (правая ось ординат) и интеграла под кривой тока (левая ось ординат)

фотовозбуждением фототропина, также обнаруженного в препаратах стигм [86, 110]. Было показано, что фототропин опосредует фоторегуляцию размера стигмы и количества КР в клетке [114].

Отсутствие лаг-периода и высокие интенсивности насыщения РФТ позволили предположить, что этот ток протекает непосредственно через фоторецепторные пигменты [32, 103]. Попытки определить ионную селективность КР методом электрода-присоски у *C. reinhardtii* [115, 116] и *V. carteri* [68] не дали отчетливого результата из-за невозможности фиксации потенциала и трудности разделения РФТ и ПФТ в таких экспериментах. Ионная селективность КР этих и десятков других микроорганизмов была установлена только в пэтч-кламп-экспериментах на культивируемых клетках животных, трансформированных соответствующими генами.

Идентификация генов КР в геноме *C. reinhardtii* и развитие методов генетической трансформации этого модельного объекта позволило подтвердить роль кодируемых белков как фоторецепторов, опосредующих фототаксис и фотофобную реакцию этой водоросли. При помощи метода РНК-интерференции К. Джангом в лаборатории Дж. Спудича были получены трансформанты с пониженным содержанием каждого из двух родопсинов, первоначально названных родопсинами А и В [23, 28] и впоследствии известных как каналные родопсины 1 и 2 (КР1 и КР2). Интересно, что подавление экспрессии гена, кодирующего КР1, способствовало стимуляции экспрессии гена,

кодирующего КР2, что привело к дальнейшему увеличению соотношения КР2/КР1 у КР1-трансформанта. Ток, генерируемый КР1, по своей кинетике сходен с РФТ, а ток, генерируемый КР2 — с ПФТ. Более того, КР1-генерируемый ток обладает высоким световым насыщением, как и РФТ, а ток, генерируемый КР2, — низким световым насыщением, как и ПФТ. Кроме того, различаются и спектры действия двух токов, свидетельствующие о различии спектров поглощения двух родопсинов: спектральный максимум тока, опосредованного КР1, приходился на 510 нм, а тока, генерируемого КР2, — на 470 нм, что подтвердилось путем измерения абсорбционных спектров выделенных пигментов, полученных благодаря гетерологической экспрессии их генов [84, 117, 118].

Измерение фотоориентации клеток методом регистрации фототоков в суспензии предориентированных клеток и фотофобной реакции путем записи траекторий движения показало, что оба КР служат фоторецепторами в обоих этих фоторегуляторных процессах [23, 28]. Измерение фотоориентации методом светорассеяния у независимо полученного штамма с пониженным содержанием КР1 подтвердило фоторецепторную роль этого белка [84]. Тот факт, что задержанный ПФТ, обладающий более низким световым насыщением, генерируется преимущественно КР2, делает его основным фоторецептором при фототаксисе, в то время как КР1, преимущественно генерирующий РФТ, вносит основной вклад в фотофобную реакцию, возникающую при

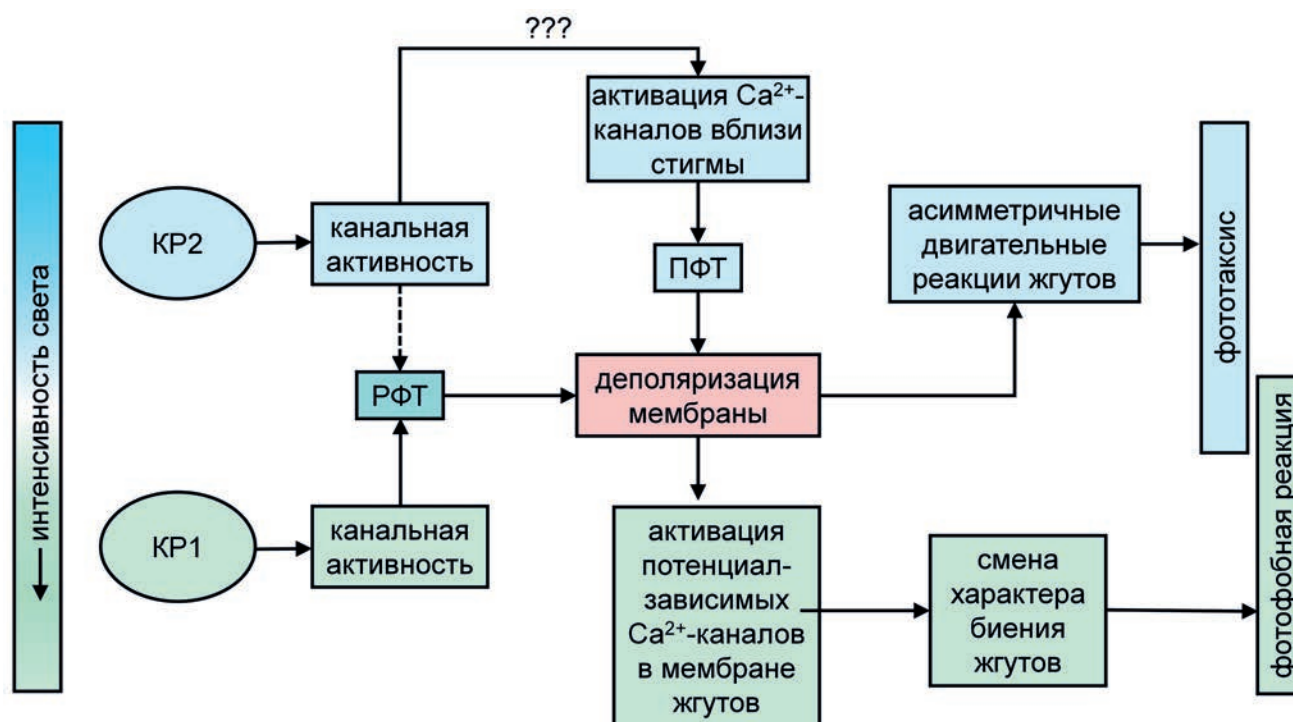


Рис. 3. Схема трансдукции светового сигнала при фототаксисе жгутиковых водорослей. KP1 и KP2 — каналные родопсины 1 и 2; РФТ и ПФТ — ранний и поздний фоторецепторный ток соответственно

более высоких интенсивностях света (рис. 3). Следует, однако, отметить, что сравнительное содержание KP1 и KP2 различается у разных штаммов дикого типа [23, 84, 119], что может сказываться и на сравнительном вкладе этих белков в фотоповедение клеток.

Метод РНК-интерференции позволяет снизить содержание кодируемого белка в клетке, но не полностью подавить его синтез. Последнее было достигнуто сначала при помощи инсерционного мутагенеза [85, 120], а затем — путем целенаправленного разрушения генов KP [119, 121, 122]. У штамма, лишённого KP1 при помощи нуклеаз с цинковыми пальцами, чувствительность фотоориентации снизилась на 3 порядка, разрушение гена, кодирующего KP2, имело менее выраженный эффект, а разрушение обоих генов практически полностью подавило ответ [122]. При использовании же для редактирования генома метода CRISPR/Cas9 разрушение только одного из KP не сказалось на чувствительности фотоориентации, и только разрушение обоих генов подавило ее [119]. Различие между этими результатами связано, по всей вероятности, с использованием материнских штаммов, различающихся и по исходной пропорции KP1 и KP2 в клетках, и по выраженности компенсационной реакции после искусственного снижения концентрации одного из этих белков.

Метод CRISPR/Cas9 позволил не только разрушить гены KP, но и получить штаммы *C. reinhardtii*, содержащие точечные мутации каждого из них [119]. У всех исследованных мутантов наблюдалось снижение чувствительности фотоориентации, однако и содержание большинства мутантных белков в клетке было пониженным по сравнению с контролем. У мутанта KP2, обладающего пониженной проницаемостью для протонов по сравнению с ионами натрия, согласно исследованиям на модельных клетках, фоторецепторные токи удалось обнаружить только в присутствии натрия в среде, что подтвердило значение протонных токов для фототаксиса у дикого типа.

РОЛЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА KP

Молекулы всех известных KP состоят из, собственно, родопсинового домена, представляющего собой комплекс из семи трансмембранных α -спиралей, и почти равного ему по числу аминокислотных остатков цитоплазматического фрагмента. Как показала гетерологическая экспрессия, для осуществления канальной функции необходим и достаточен только семиспиральный родопсиновый домен. Соответственно, для оптогенетических целей

и функциональных исследований КР в модельных клетках используются почти исключительно их трансмембранные домены. Изучение же функций цитоплазматических фрагментов в клетках *C. reinhardtii* потребовало развития методов редактирования генома этого организма [121]. Было показано, что удаление последних 78 С-терминальных аминокислотных остатков КР1 приводит к смещению положения стигмы в переднюю часть клетки (тот же эффект наблюдается и после разрушения всего гена, кодирующего КР1) [122]. Более того, присоединение флуоресцентной метки к С-терминальному участку вызывает нарушение транспортировки КР1 в плазмалемму. Эти наблюдения подтверждают ранее высказанную гипотезу, что цитоплазматические фрагменты КР отвечают за их правильную локализацию в клетке.

Важная роль цитоплазматического домена в функционировании микробных родопсинов была показана ранее на примере сенсорного родопсина из сине-зеленой водоросли *Anabaena* [123]. Модификации цитоплазматического домена КР также влияют на кинетику фототоков [124]. Фосфорилирование аминокислотных остатков в проксимальном цитоплазматическом сегменте КР1 и КР2 было обнаружено при помощи масс-спектрометрического анализа препаратов *C. reinhardtii* [110]. Быстрые изменения степени фосфорилирования КР1 коррелируют со знаком фототаксиса, т.е. направлением движения клеток к источнику света или от него [125]. Очевидно, что как локализация фоторецепторов, так и изменения характеристик его фототока определяют изменения знака фототаксиса.

Биоинформационный анализ цитоплазматических фрагментов КР некоторых протистов (но не *C. reinhardtii*) выявил наличие гомологов разнообразных доменов, задействованных в энзиматических сигнальных каскадах других организмов [126, 127], однако об их функции в клетках пока ничего не известно. Кроме того, цитоплазматические фрагменты КР некоторых зеленых водорослей содержат сайты связывания белка SUMO (small ubiquitin-like modifier), а биохимические данные подтверждают обратимое связывание этого белка с КР1 в лизатах *C. reinhardtii* и регуляцию стабильности последнего [128]. Наконец, методом иммунопреципитации было показано связывание цитоплазматических фрагментов КР1 и КР2 с малой ГТФазой ARL11, принадлежащей к семейству Arf ГТФаз, которые опосредуют транспорт белков в жгутики и реснички клеток животных [128].

РАЗНООБРАЗИЕ КР И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ОПТОГЕНЕТИКЕ

Регистрация фотоиндуцированных электрических сигналов в клетках зеленых жгутиковых водорослей показала, что КР широко распространены у представителей этой систематической группы [25–27]. Зеленые водоросли — ближайшие родственники наземных растений, что послужило основанием для секвенирования геномов многих их видов, включая те, что прежде были исследованы электрофизиологическими методами [129, 130]. Биоинформатический анализ полученных данных выявил >200 индивидуальных последовательностей КР у этих микроорганизмов (списки которых опубликованы в работах Rozenberg et al. [127] и Govorunova et al. [131]), далеко не все из которых были исследованы путем гетерологической экспрессии в модельных клетках. Подавляющее большинство из исследованных таким образом микроорганизмов представляют собой, как и КР *C. reinhardtii*, преимущественно протонные каналы, также способные проводить Na^+ , K^+ и, в значительно меньшей степени, Ca^{2+} [26, 27, 33, 132, 133]. В совокупности эти белки известны в литературе как «катионные КР» [58, 131, 134]. Эти КР широко используются в оптогенетике для стимуляции активности нейронов и других возбудимых клеток при помощи света [40–42].

Все исследованные криптофитовые водоросли способны к фотоориентации [135–137], а у одного из их пресноводных представителей регистрируются фоторецепторные токи, близкие по свойствам к токам зеленых жгутиконосцев [24]. Полностью отсекутированный геном морской водоросли *Guillardia theta* кодирует несколько десятков родопсинов, среди которых есть КР [48, 138], протонные помпы [139] и белки, не обладающие транспортной функцией [24]. По крайней мере пять КР *G. theta* функционируют как катионные каналы при экспрессии в клетках млекопитающих [138, 140, 141], и многие их гомологи обнаружены у других криптофитов [142]. Примечательно, что по своей первичной последовательности и некоторым деталям транспортного механизма эти белки больше похожи на галоархейные протонные помпы, чем на КР зеленых водорослей, и потому получили название «бактериородопсин-подобные КР» [50]. Это сходство подтвердилось еще и тем, что эти белки представляют собой тримеры [143, 144], а не димеры, как КР зеленых водорослей [145–147]. Большинство бактериородопсин-подобных КР генерируют маленькие токи при экспрессии

их генов в клетках животных, но по крайней мере один их представитель, известный как ChRmine, пользуется популярностью в качестве оптогенетического инструмента для стимуляции нейронов зеленым светом [148, 149].

Другая группа КР *G. theta* обладает исключительно анионной селективностью [48]. Гомологичные им белки были обнаружены у многих других видов криптофитовых водорослей и получили название «анионные КР» [150, 151]. Благодаря низкой концентрации Cl^- в соме зрелых нейронов открывание этих КР приводит к вхождению Cl^- внутрь клетки, гиперполяризации мембраны и подавлению генерации потенциалов действия. Анионные КР были успешно использованы в качестве оптогенетических ингибиторов нейронной активности и поведения червей, насекомых, рыб и млекопитающих [48, 152–158]. Кроме того, они нашли применение как инструмент для оптогенетического контроля движения устьичных клеток и направления роста высших растений [159, 160].

Помимо криптофитов, анионные КР были обнаружены у гаптофитовых водорослей [49] и даже у некоторых представителей морских зеленых водорослей [127]. Более того, гомологичные белки (точнее, кодирующие их гены) были выявлены у гетеротрофных организмов, принадлежащих к надотделу страменопиллов [49, 131, 161]. Примечательно, что большинство этих организмов, если не все, обладают жгутиками по крайней мере на одной из стадий своего жизненного цикла. Представляется вероятным, что в своих нативных клетках анионные КР, так же как и катионные, служат фоторецепторами при фототаксисе, хотя эта гипотеза требует экспериментальной проверки.

Применение анионных КР, ~200 последовательностей которых известны в настоящий момент [127, 131] как оптогенетические ингибиторы, ограничено направлением их токов в клетках-реципиентах. В терминалах многих аксонов концентрация Cl^- выше, чем в соме, в результате чего фотовозбуждение анионных КР деполяризует мембрану и даже может приводить к генерации потенциалов действия [162–165]. В какой-то мере эти побочные эффекты удастся преодолеть путем добавления к кодирующей последовательности так называемых «направляющих сигналов», предотвращающих транспорт КР в аксоны [163, 165, 166], но полностью исключить возможность нежелательной деполяризации таким образом не удастся.

Вот почему обнаружение в прошлом году КР, обладающих большей проницаемостью

для K^+ , чем для Na^+ , привлекло внимание пользователей. Первые два белка такого рода, названные «калиевыми КР», были найдены у гетеротрофного страменопила *Hyphochytrium catenoides* [51], а впоследствии их гомологи были обнаружены и у некоторых других организмов [167, 168]. Результаты первых опытов по подавлению нейронной активности при помощи калиевых КР выглядят очень обнадеживающе [51, 167, 169], так что можно надеяться, что в будущем именно они станут основным инструментом для этой цели.

Необходимо отметить, что в настоящее время в оптогенетике, основанной на КР, используется только одна функция этих пигментов — прямой ток через молекулу. Вторая и важнейшая в нативных клетках функция — генерация задержанного фоторецепторного кальциевого тока с усилением в 1000 раз — пока не нашла практического применения, потому что осуществляющие ее кальциевые каналы пока не удалось идентифицировать на молекулярном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 1970-е гг., когда в МГУ начались исследования фотоэлектрической активности бактериородопсина и еще не идентифицированных на молекулярном уровне КР, было, конечно, невозможно предвидеть появление целой новой области биомедицины, известной сегодня как оптогенетика и основанной на использовании этих белков для манипуляции мембранным потенциалом при помощи света. В настоящее время лишь одна из функций рецепторов фототаксиса (их канальная активность) применяется в оптогенетике. Сложный и исключительно чувствительный каскад трансдукции светового стимула при фототаксисе еще ждет своего применения. Тем не менее этот пример служит наглядной иллюстрацией важности фундаментальных исследований для научно-технического прогресса.

Вклад авторов. Е.Г. Говорунова — написание текста обзора; О.А. Синещев — концепция работы, написание и редактирование текста обзора.

Финансирование. Работа выполнена за счет частных средств авторов.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем коллегам, работы которых процитированы в этом обзоре.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания каких-либо ис-

следований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Ostroumov, S. A., and Skulachev, V. P. (1974) Electrogenesis by bacteriorhodopsin incorporated in a planar phospholipid membrane, *FEBS Lett.*, **39**, 43-45, doi: 10.1016/0014-5793(74)80012-8.
2. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., and Skulachev, V. P. (1978) Time resolution of the intermediate steps in the bacteriorhodopsin-linked electrogenesis, *FEBS Lett.*, **87**, 161-167, doi: 10.1016/0014-5793(78)80157-4.
3. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н. (1981) Фазы фотоэлектрического ответа бактериородопсина, *Биохимия*, **46**, 998-1004.
4. Oesterhelt, D., and Stoerkenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nature*, **233**, 149-152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
5. Балашов С. П., Литвин Ф. Ф. (1985) *Фотохимические превращения бактериородопсина*, Издательство МГУ, Москва.
6. Kandori, H. (2000) Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1460**, 177-191, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00138-9.
7. Lanyi, J. K. (2004) Bacteriorhodopsin, *Annu. Rev. Physiol.*, **66**, 665-688, doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.150049.
8. Wickstrand, C., Nogly, P., Nango, E., Iwata, S., Standfuss, J., and Neutze, R. (2019) Bacteriorhodopsin: Structural insights revealed using X-ray lasers and synchrotron radiation, *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 59-83, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111327.
9. Синешечков О. А., Литвин Ф. Ф. (1974) Фототаксис микроорганизмов, его механизм и связь с фотосинтезом, *Усп. соврем. биологии*, **78**, 58-75.
10. Nultsch, W., and Häder, D.-P. (1988) Photomovement in motile microorganisms – II, *Photochem. Photobiol.*, **47**, 837-869, doi: 10.1111/j.1751-1097.1988.tb01668.x.
11. Spudich, E. N., and Spudich, J. L. (1982) Control of transmembrane ion fluxes to select halorhodopsin-deficient and other energy-transduction mutants of *Halobacterium halobium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4308-4312, doi: 10.1073/pnas.79.14.4308.
12. Bogomolni, R., and Spudich, J. L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6250-6254, doi: 10.1073/pnas.79.20.6250.
13. Spudich, J. L., and Bogomolni, R. A. (1984) Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin, *Nature*, **312**, 509-513, doi: 10.1038/312509a0.
14. Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N., and Kobatake, Y. (1985) A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **28**, 161-164, doi: 10.1111/j.1574-6968.1985.tb00784.x.
15. Feinleib, M. E. H., and Curry, G. M. (1971) The relationship between stimulus intensity and oriented phototactic response (topotaxis) in *Chlamydomonas*, *Physiol. Plantarum*, **25**, 346-352, doi: 10.1111/j.1399-3054.1971.tb01453.x.
16. Kondratieva, E. N., and Gogotov, I. N. (1969) Production of hydrogen by green photosynthetic bacteria (*Chloropseudomonas*), *Nature*, **221**, 83-84, doi: 10.1038/221083a0.
17. Булычев А. А., Андрианов В. К., Курелла Г. А., Литвин Ф. Ф. (1971) Трансмембранный потенциал хлоропласта и его фотоиндуцированные изменения, *Докл. Акад. Наук СССР*, **197**, 473-477.
18. Синешечков О. А., Андрианов В. К., Курелла Г. А., Литвин Ф. Ф. (1976) Биоэлектрические явления у одноклеточной зеленой водоросли и их связь с фототаксисом и фотосинтезом, *Физиол. растений*, **23**, 229-237.
19. Синешечков О. А., Синешечков В. А., Литвин Ф. Ф. (1978) Фотоиндуцированные биоэлектрические реакции в фототаксисе одноклеточной жгутиковой водоросли, *Докл. Акад. Наук СССР*, **239**, 471-474.
20. Litvin, F. F., Sineshchekov, O. A., and Sineshchekov, V. A. (1978) Photoreceptor electric potential in the phototaxis of the alga *Haematococcus pluvialis*, *Nature*, **271**, 476-478, doi: 10.1038/271476a0.
21. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Der, A., Keszthelyi, L., and Nultsch, W. (1992) Photoelectric responses in phototactic flagellated algae measured in cell suspension, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **13**, 119-134, doi: 10.1016/1011-1344(92)85051-U.
22. Kreimer, G. (1994) Cell biology of phototaxis in flagellate algae, *Int. Rev. Cytol.*, **148**, 229-310, doi: 10.1016/S0074-7696(08)62409-2.
23. Sineshchekov, O. A., Jung, K.-H., and Spudich, J. L. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8689-8694, doi: 10.1073/pnas.122243399.
24. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Jung, K.-H., Zauner, S., Maier, U.-G., and Spudich, J. L. (2005) Rhodopsin-mediated photoreception in cryptophyte

- flagellates, *Biophys. J.*, **89**, 4310-4319, doi: 10.1529/biophysj.105.070920.
25. Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2005) *Sensory rhodopsin signaling in green flagellate algae*. in *Handbook of Photosensory Receptors*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 25-42, doi: 10.1002/352760510X.ch2.
 26. Govorunova, E. G., Spudich, E. N., Lane, C. E., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2011) New channelrhodopsin with a red-shifted spectrum and rapid kinetics from *Mesostigma viride*, *mBio*, **2**, e00115-00111, doi: 10.1128/mBio.00115-11.
 27. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Janz, R., and Spudich, J. L. (2013) Characterization of a highly efficient blue-shifted channelrhodopsin from the marine alga *Platymonas subcordiformis*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 29911-29922, doi: 10.1074/jbc.M113.505495.
 28. Govorunova, E. G., Jung, K.-W., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2004) *Chlamydomonas* sensory rhodopsins A and B: Cellular content and role in photophobic responses, *Biophys. J.*, **86**, 2342-2349, doi: 10.1016/S0006-3495(04)74291-5.
 29. Foster, K.-W., and Smyth, R. D. (1980) Light antennas in phototactic algae, *Microbiol. Rev.*, **44**, 572-630, doi: 10.1128/mr.44.4.572-630.1980.
 30. Foster, K.-W., Saranak, J., Patel, N., Zarrilli, G., Okabe, M., Kline, T., and Nakanishi, K. (1984) A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*, *Nature*, **311**, 756-759, doi: 10.1038/311756a0.
 31. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Der, A., Keszthelyi, L., and Nultsch, W. (1994) Photoinduced electric currents in carotenoid-deficient *Chlamydomonas* mutants reconstituted with retinal and its analogs, *Biophys. J.*, **66**, 2073-2084, doi: 10.1016/S0006-3495(94)81002-1.
 32. Sineshchekov, O. A., and Govorunova, E. G. (1999) Rhodopsin-mediated photosensing in green flagellated algae, *Trends Plant Sci.*, **4**, 58-63, doi: 10.1016/s1360-1385(98)01370-3.
 33. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science*, **296**, 2395-2398, doi: 10.1126/science.1072068.
 34. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945, doi: 10.1073/pnas.1936192100.
 35. Suzuki, T., Yamasaki, K., Fujita, S., Oda, K., Iseki, M., Yoshida, K., Watanabe, M., Daiyasu, H., Toh, H., Asamizu, E., Tabata, S., Miura, K., Fukuzawa, H., Nakamura, S., and Takahashi, T. (2003) Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 711-717, doi: 10.1016/s0006-291x(02)03079-6.
 36. Nagel, G., Mockel, B., Buldt, G., and Bamberg, E. (1995) Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping, *FEBS Lett.*, **377**, 263-266, doi: 0014-5793(95)01356-3.
 37. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263-1268, doi: 10.1038/nn1525.
 38. Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J. F., Adeishvili, N., Bamberg, E., and Gottschalk, A. (2005) Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses, *Curr. Biol.*, **15**, 2279-2284, doi: 10.1016/j.cub.2005.11.032.
 39. Li, X., Gutierrez, D. V., Hanson, M. G., Han, J., Mark, M. D., Chiel, H., Hegemann, P., Landmesser, L. T., and Herlitze, S. (2005) Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 17816-17821, doi: 10.1073/pnas.0509030102.
 40. Deisseroth, K. (2011) Optogenetics, *Nat. Methods*, **8**, 26-29, doi: 10.1038/nmeth.f.324.
 41. Yawo, H., Asano, T., Sakai, S., and Ishizuka, T. (2013) Optogenetic manipulation of neural and non-neural functions, *Dev. Growth Differ.*, **55**, 474-490, doi: 10.1111/dgd.12053.
 42. Deisseroth, K. (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1213-1225, doi: 10.1038/nn.4091.
 43. Emiliani, V., Entcheva, E., Hedrich, R., Hegemann, P., Konrad, K. R., Lüscher, C., Mahn, M., Pan, Z.-H., Sims, R. R., Vierock, J., and Yizhar, O. (2022) Optogenetics for light control of biological systems, *Nat. Rev. Methods Primers*, **2**, 55, doi: 10.1038/s43586-022-00136-4.
 44. Chow, B. Y., and Boyden, E. S. (2013) Optogenetics and translational medicine, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 177ps175, doi: 10.1126/scitranslmed.3003101.
 45. Sasse, P., Funken, M., Beiart, T., and Bruegmann, T. (2019) Optogenetic termination of cardiac arrhythmia: Mechanistic enlightenment and therapeutic application? *Front. Physiol.*, **10**, 675, doi: 10.3389/fphys.2019.00675.
 46. Sahel, J. A., Boulanger-Scemama, E., Pagot, C., Arleo, A., Galluppi, F., Martel, J. N., Esposti, S. D., Delaux, A., de Saint Aubert, J. B., de Montleau, C., Gutman, E., Audo, I., Duebel, J., Picaud, S., Dalkara, D., Blouin, L., Taiel, M., and Roska, B. (2021) Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy, *Nat. Med.*, **27**, 1223-1229, doi: 10.1038/s41591-021-01351-4.
 47. Chow, B. Y., Han, X., Dobry, A. S., Qian, X., Chuong, A. S., Li, M., Henninger, M. A., Belfort, G. M.,

- Lin, Y., Monahan, P. E., and Boyden, E. S. (2010) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps, *Nature*, **463**, 98-102, doi: 10.1038/nature08652.
48. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Liu, X., Janz, R., and Spudich, J. L. (2015) Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics, *Science*, **349**, 647-650, doi: 10.1126/science.aaa7484.
49. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Wang, Y., Brown, L. S., and Spudich, J. L. (2020) RubyACRs, non-algal anion channelrhodopsins with highly red-shifted absorption, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 22833-22840, doi: 10.1073/pnas.2005981117.
50. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., and Spudich, J. L. (2017) Bacteriorhodopsin-like channelrhodopsins: Alternative mechanism for control of cation conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E9512-E9519, doi: 10.1073/pnas.1710702114.
51. Govorunova, E. G., Gou, Y., Sineshchekov, O. A., Li, H., Lu, X., Wang, Y., Brown, L. S., St-Pierre, F., Xue, M., and Spudich, J. L. (2022) Kalium channelrhodopsins are natural light-gated potassium channels that mediate optogenetic inhibition, *Nat. Neurosci.*, **25**, 967-974, doi: 10.1038/s41593-022-01094-6.
52. Der, A., and Keszthelyi, L. (2001) Charge motion during the photocycle of bacteriorhodopsin, *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 1234-1248, doi: 10.1023/A:1013179101782.
53. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Wang, J., Li, H., and Spudich, J. L. (2013) Intramolecular proton transfer in channelrhodopsins, *Biophys. J.*, **104**, 807-817, doi: 10.1016/j.bpj.2013.01.002.
54. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., and Spudich, J. L. (2015) Gating mechanisms of a natural anion channelrhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 14236-14241, doi: 10.1073/pnas.1513602112.
55. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., Wang, Y., and Spudich, J. L. (2023) Sequential absorption of two photons creates a bistable form of RubyACR responsible for its strong desensitization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2301521120, doi: 10.1073/pnas.2301521120.
56. Schneider, F., Grimm, C., and Hegemann, P. (2015) Biophysics of channelrhodopsin, *Annu. Rev. Biophys.*, **44**, 167-186, doi: 10.1146/annurev-biophys-060414-034014.
57. Deisseroth, K., and Hegemann, P. (2017) The form and function of channelrhodopsin, *Science*, **357**, eaan5544, doi: 10.1126/science.aan5544.
58. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., and Spudich, J. L. (2017) Microbial rhodopsins: Diversity, mechanisms, and optogenetic applications, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 845-872, doi: 10.1146/annurev-biochem-101910-144233.
59. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2021) Emerging diversity of channelrhodopsins and their structure-function relationships, *Front. Cell Neurosci.*, **15**, 800313, doi: 10.3389/fncel.2021.800313.
60. Boyden, E. S. (2011) A history of optogenetics: the development of tools for controlling brain circuits with light, *Front. Biol. Rep.*, **3**, 11, doi: 10.3410/B3-11.
61. Fenno, L., Yizhar, O., and Deisseroth, K. (2011) The development and application of optogenetics, *Annu. Rev. Neurosci.*, **34**, 389-412, doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113817.
62. Hegemann, P., and Nagel, G. (2013) From channelrhodopsins to optogenetics, *EMBO Mol. Med.*, **5**, 1-4, doi: 10.1002/emmm.201202387.
63. Boyden, E. S. (2015) Optogenetics and the future of neuroscience, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1200-1201, doi: 10.1038/nn.4094.
64. Richards, R., and Dempski, R. E. (2015) *From phototaxis to biomedical applications: Investigating the molecular mechanism of channelrhodopsins*, in *Electrophysiology of Unconventional Channels and Pores* (Delcour, A. H., ed) Springer International Publishing Switzerland. pp. 361-381, doi: 10.1007/978-3-319-20149-8_15.
65. Bamberg, E., Gärtner, W., and Trauner, D. (2018) Introduction: Optogenetics and photopharmacology, *Chem. Rev.*, **118**, 10627-10628, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00483.
66. Baylor, D. A., and Hodgkin, A. L. (1973) Detection and resolution of visual stimuli by turtle photoreceptors, *J. Physiol.*, **234**, 163-198, doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010340.
67. Harz, H., and Hegemann, P. (1991) Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*, *Nature*, **351**, 489-491, doi: 10.1038/351489a0.
68. Braun, F. J., and Hegemann, P. (1999) Two light-activated conductances in the eye of the green alga *Volvox carteri*, *Biophys. J.*, **76**, 1668-1678, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77326-1.
69. Yoshimura, K. (1996) A novel type of mechanoreception by the flagella of *Chlamydomonas*, *J. Exp. Biol.*, **199**, 295-302, doi: 10.1242/jeb.199.2.295.
70. Sineshchekov, O. A., and Govorunova, E. G. (2001) *Electrical events in photomovements of green flagellated algae*, in *Comprehensive Series in Photosciences* (Hader, D.-P., and Lebert, M., eds) Elsevier, Amsterdam, pp. 245-280, doi: 10.1016/S1568-461X(01)80013-2.
71. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., and Spudich, J. L. (2021) *Probing channelrhodopsin electrical activity in algal cell populations*, in *Channelrhodopsin* (Dempski, R., ed) 2020/09/01 Ed., Humana, New York. pp. 85-96, doi: 10.1007/978-1-0716-0830-2_6.
72. Kreimer, G., Overländer, C., Sineshchekov, O. A., Stolz, H., Nultsch, W., and Melkonian, M. (1992) Functional analysis of the eyespot in *Chlamydomonas reinhardtii* mutant *ey 627, mt⁻*, *Planta*, **188**, 513-521, doi: 10.1007/BF00197043.
73. Pazour, G., Sineshchekov, O., and Witman, G. B. (1995) Mutational analysis of the phototransduction

- pathway of *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Cell Biol.*, **131**, 427-440, doi: 10.1083/jcb.131.2.427.
74. Matsuda, A., Yoshimura, K., Sineshchekov, O., Hirono, M., and Kamiya, R. (1998) Isolation and characterization of novel *Chlamydomonas* mutants that display phototaxis but not photophobic response, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **41**, 353-362, doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1998)41:4<353::AID-CM7>3.0.CO;2-0.
 75. Govorunova, E. G., and Sineshchekov, O. A. (2003) Integration of photo- and chemosensory signaling pathways in *Chlamydomonas*, *Planta*, **216**, 535-540, doi: 10.1007/s00425-002-0901-7.
 76. Govorunova, E. G., Altschuler, I. M., Häder, D. P., and Sineshchekov, O. A. (2000) A novel express bioassay for detecting toxic substances in water by recording rhodopsin-mediated photoelectric responses in *Chlamydomonas* cell suspensions, *Photochem. Photobiol.*, **72**, 320-326, doi: 10.1562/0031-8655(2000)072<0320:anebfd>2.0.co;2.
 77. Govorunova, E. G., and Sineshchekov, O. A. (2017) *Express detection of water pollutants by photoelectric recording from algal cell suspensions*, in *Bioassays: Advanced Methods and Applications* (Häder, D.-P., and Erzinger, G. S., eds) Elsevier, Amsterdam, pp. 289-308, doi: 10.1016/B978-0-12-811861-0.00014-0.
 78. Sineshchekov, O. A. (1991) *Photoreception in unicellular flagellates: bioelectric phenomena in phototaxis*, in *Light in Biology and Medicine* (Douglas, R. D., ed) Plenum Press, New York, pp. 523-532, doi: 10.1007/978-1-4684-5991-3_53.
 79. Синешечков, О. А. (1988) *Фототаксис микроорганизмов и его роль в регуляции фотосинтеза, Фототрофные микроорганизмы* (под ред. Гоготов, И. Н.) Изд-во Академии Наук СССР, Пущино, стр. 11-18.
 80. Yoshimura, K. (1994) Chromophore orientation in the photoreceptor of *Chlamydomonas* as probed by stimulation with polarized light, *Photochem. Photobiol.*, **60**, 594-597, doi: 10.1111/j.1751-1097.1994.tb05154.x.
 81. Mast, S. O. (1911) *Light and the Behavior of Organisms*, Wiley, New York, doi: 10.5962/bhl.title.4601.
 82. Morel-Laurens, N. M. L., and Feinleib, M. E. (1983) Photomovement in an "eyeless" mutant of *Chlamydomonas*, *Photochem. Photobiol.*, **37**, 189-194, doi: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb04457.x.
 83. Kreimer, G., and Melkonian, M. (1990) Reflection confocal laser scanning microscopy of eyespot in flagellated green algae, *Eur. J. Cell Biol.*, **53**, 101-111, doi: 10.1016/S1434-4610(99)70032-5.
 84. Berthold, P., Tsunoda, S. P., Ernst, O. P., Mages, W., Gradmann, D., and Hegemann, P. (2008) Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization, *Plant Cell*, **20**, 1665-1677, doi: 10.1105/tpc.108.057919.
 85. Mittelmeier, T. M., Thompson, M. D., Ozturk, E., and Dieckmann, C. L. (2013) Independent localization of plasma membrane and chloroplast components during eyespot assembly, *Eukaryot. Cell*, **12**, 1258-1270, doi: 10.1128/EC.00111-13.
 86. Schmidt, M., Gessner, G., Luff, M., Heiland, I., Wagner, V., Kaminski, M., Geimer, S., Eitzinger, N., Reissenweber, T., Voytsekh, O., Fiedler, M., Mittag, M., and Kreimer, G. (2006) Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements, *Plant Cell*, **18**, 1908-1930, doi: 10.1105/tpc.106.041749.
 87. Melkonian, M., and Robenek, H. (1980) Eyespot membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a freeze-fracture study, *J. Ultrastruct. Res.*, **72**, 90-102, doi: 10.1016/S0022-5320(80)90138-0.
 88. Awasthi, M., Ranjan, P., Sharma, K., Veetil, S. K., and Kateriya, S. (2016) The trafficking of bacterial type rhodopsins into the *Chlamydomonas* eyespot and flagella is IFT mediated, *Sci. Rep.*, **6**, 34646, doi: 10.1038/srep34646.
 89. Awasthi, M., Ranjan, P., and Kateriya, S. (2018) Cytoplasmic extensions of the channelrhodopsins 1 and 2 interact in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 84-90, doi: 10.15406/jabb.2018.05.00121.
 90. Синешечков О. А., Литвин Ф. Ф. (1988) *Механизмы фототаксиса микроорганизмов. in Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения* (под ред. Рубин А. Б.) Наука, Москва, стр. 412-427.
 91. Witman, G. B. (1993) *Chlamydomonas* phototaxis, *Trends Cell Biol.*, **3**, 403-408, doi: 10.1016/0962-8924(93)90091-e.
 92. Kateriya, S., Nagel, G., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2004) "Vision" in single-celled algae, *News Physiol. Sci.*, **19**, 133-137, doi: 10.1152/nips.01517.2004.
 93. Kreimer, G. (2009) The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Curr. Genet.*, **55**, 19-43, doi: 10.1007/s00294-008-0224-8.
 94. Böhm, M., and Kreimer, G. (2021) *Orient in the world with a single eye: The green algal eyespot and phototaxis*, in *Prog. Bot.* (Cánovas, F. M., Lüttge, U., Risueño, M.-C., and Pretzsch, H., eds). pp. 259-304, doi: 10.1007/124_2020_38.
 95. Sineshchekov, O. A. (1991) *Electrophysiology of photomovements in flagellated algae. in Biophysics of Photoreceptors and Photomovements in Microorganisms* (Lenci, F., Ghetti, F., Colombetti, G., Haeder, D.-P., and Song, P.-S., eds) Plenum Press, New York. pp. 191-202, doi: 10.1007/978-1-4684-5988-3_15.
 96. Ruffer, U., and Nultsch, W. (1990) Flagella photoresponses of *Chlamydomonas* cells held on micropipettes: I. Change in flagellar beat frequency, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **15**, 162-167, doi: 10.1002/cm.970150305.
 97. Ruffer, U., and Nultsch, W. (1991) Flagellar photoresponses of *Chlamydomonas* cells held on micropipettes: II. Change in flagellar beat pattern,

- Cell Motil. Cytoskeleton*, **18**, 269-278, doi: 10.1002/cm.970180404.
98. Josef, K., Saranak, J., and Foster, K.-W. (2005) Ciliary behavior of a negatively phototactic *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **61**, 97-111, doi: 10.1002/cm.20069.
 99. Josef, K., Saranak, J., and Foster, K.-W. (2006) Linear systems analysis of the ciliary steering behavior associated with negative-phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **63**, 758-777, doi: 10.1002/cm.20158.
 100. Holland, E.-M., Harz, H., Uhl, R., and Hegemann, P. (1997) Control of phobic behavioral responses by rhodopsin-induced photocurrents in *Chlamydomonas*, *Biophys. J.*, **73**, 1395-1401, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78171-2.
 101. Schmidt, J. A., and Eckert, R. (1976) Calcium couples flagella reversal to photostimulation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nature*, **262**, 713-715, doi: 10.1038/262713a0.
 102. Nultsch, W., and Häder, D.-P. (1979) Photomovement of motile microorganisms, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 423-437, doi: 10.1111/j.1751-1097.1979.tb07072.x.
 103. Harz, H., Nonnengässer, C., and Hegemann, P. (1992) The photoreceptor current of the green alga *Chlamydomonas*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **338**, 39-52, doi: 10.1098/rstb.1992.0127.
 104. Beck, C., and Uhl, R. (1994) On the localization of voltage-sensitive calcium channels in the flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Cell Biol.*, **125**, 1119-1125, doi: 10.1083/jcb.125.5.1119.
 105. Fujiu, K., Nakayama, Y., Yanagisawa, A., Sokabe, M., and Yoshimura, K. (2009) *Chlamydomonas* CAV2 encodes a voltage-dependent calcium channel required for the flagellar waveform conversion, *Curr. Biol.*, **19**, 133-139, doi: 10.1016/j.cub.2008.11.068.
 106. Sineshchekov, O. A., Litvin, F. F., and Keszthelyi, L. (1990) Two components of photoreceptor potential of the flagellated green alga *Haematococcus pluvialis*, *Biophys. J.*, **57**, 33-39, doi: 10.1016/S0006-3495(90)82504-2.
 107. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., and Spudich, J. L. (2009) Photosensory functions of channelrhodopsins in native algal cells, *Photochem. Photobiol.*, **85**, 556-563, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00524.x.
 108. Hegemann, P., and Marwan, W. (1988) Single photons are sufficient to trigger movement responses in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photochem. Photobiol.*, **48**, 99-106, doi: 10.1111/j.1751-1097.1988.tb02793.x.
 109. Verret, F., Wheeler, G., Taylor, A. R., Farnham, G., and Brownlee, C. (2010) Calcium channels in photosynthetic eukaryotes: implications for evolution of calcium-based signalling, *New Phytol.*, **187**, 23-43, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03271.x.
 110. Wagner, V., Ullmann, K., Mollwo, A., Kaminski, M., Mittag, M., and Kreimer, G. (2008) The phosphoproteome of a *Chlamydomonas reinhardtii* eyespot fraction includes key proteins of the light signaling pathway, *Plant Physiol.*, **146**, 772-788, doi: 10.1104/pp.107.109645.
 111. Linden, L., and G., K. (1995) Calcium modulates rapid protein phosphorylation/dephosphorylation in isolated eyespot apparatuses of the green alga *Spermatozopsis similis*, *Planta*, **197**, 343-351, doi: 10.1007/BF00202656.
 112. Schlicher, U., Linden, L., Calenberg, M., and Kreimer, G. (1995) G proteins and Ca²⁺ modulated protein kinases of a plasma membrane enriched fraction and isolated eyespot apparatuses of *Spermatozopsis similis* (Chlorophyceae), *Eur. J. Phycol.*, **30**, 319-330, doi: 10.1080/09670269500651111.
 113. Calenberg, M., Brohnsinn, U., Zedlacher, M., and Kreimer, G. (1998) Light- and Ca²⁺-modulated heteromeric GTPases in the eyespot apparatus of a flagellate green alga, *Plant Cell*, **10**, 91-103, doi: 10.1105/tpc.10.1.91.
 114. Trippens, J., Greiner, A., Schellwat, J., Neukam, M., Rottmann, T., Lu, Y., Kateriya, S., Hegemann, P., and Kreimer, G. (2012) Phototropin influence on eyespot development and regulation of phototactic behavior in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell*, **24**, 4687-702, doi: 10.1105/tpc.112.103523.
 115. Holland, E.-M., Braun, F.-J., Nonnengässer, C., Harz, H., and Hegemann, P. (1996) The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. I. Kinetics and influence of divalent ions, *Biophys. J.*, **70**, 924-931, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79635-2.
 116. Nonnengässer, C., Holland, E.-M., Harz, H., and Hegemann, P. (1996) The nature of rhodopsin-activated photocurrents in *Chlamydomonas*. II. Influence of monovalent ions, *Biophys. J.*, **70**, 932-938, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79636-4.
 117. Ritter, E., Stehfest, K., Berndt, A., Hegemann, P., and Bartl, F. J. (2008) Monitoring light-induced structural changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **283**, 35033-35041, doi: 10.1074/jbc.M806353200.
 118. Bamann, C., Kirsch, T., Nagel, G., and Bamberg, E. (2008) Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function, *J. Mol. Biol.*, **375**, 686-694, doi: 10.1016/j.jmb.2007.10.072.
 119. Baidukova, O., Oppermann, J., Kelterborn, S., Fernandez Lahore, R. G., Schumacher, D., Evers, H., Kamrani, Y. Y., and Hegemann, P. (2022) Gating and ion selectivity of channelrhodopsins are critical for photo-activated orientation of *Chlamydomonas* as shown by *in vivo* point mutation, *Nat Commun*, **13**, 7253, doi: 10.1038/s41467-022-35018-6.
 120. Dent, R. M., Haglund, C. M., Chin, B. L., Kobayashi, M. C., and Niyogi, K. K. (2005) Functional genomics of eukaryotic photosynthesis using insertional mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **137**, 545-556, doi: 10.1104/pp.104.055244.

121. Sizova, I., Greiner, A., Awasthi, M., Kateriya, S., and Hegemann, P. (2013) Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases, *Plant J.*, **73**, 873–882, doi: 10.1111/tpj.12066.
122. Greiner, A., Kelterborn, S., Evers, H., Kreimer, G., Sizova, I., and Hegemann, P. (2017) Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9, *Plant Cell*, **29**, 2498–2518, doi: 10.1105/tpc.17.00659.
123. Sineshchekov, O. A., Spudich, E. N., Trivedi, V. D., and Spudich, J. L. (2006) Role of the cytoplasmic domain in *Anabaena* sensory rhodopsin photocycling: vectoriality of Schiff base deprotonation, *Biophys. J.*, **91**, 4519–4527, doi: 10.1529/biophysj.106.093641.
124. Tashiro, R., Sushmita, K., Hososhima, S., Sharma, S., Kateriya, S., Kandori, H., and Tsunoda, S. P. (2021) Specific residues in the cytoplasmic domain modulate photocurrent kinetics of channelrhodopsin from the alga *Klebsormidium nitens*, *Commun. Biol.*, **4**, 235, doi: 10.1038/s42003-021-01755-5.
125. Böhm, M., Boness, D., Fantisch, E., Erhard, H., Frauenholz, J., Kowalzyk, Z., Marcinkowski, N., Kateriya, S., Hegemann, P., and Kreimer, G. (2019) Channelrhodopsin-1 phosphorylation changes with the phototactic behavior and responds to physiological stimuli in *Chlamydomonas*, *Plant Cell*, **31**, 886–910, doi: 10.1105/tpc.18.00936.
126. Awasthi, M., Sushmita, K., Kaushik, M. S., Ranjan, P., and Kateriya, S. (2020) Novel modular rhodopsins from green algae hold great potential for cellular optogenetic modulation across the biological model systems, *Life*, **10**, 259, doi: 10.3390/life10110259.
127. Rozenberg, A., Oppermann, J., Wietek, J., Fernandez Lahore, R. G., Sandaa, R. A., Bratbak, G., Hegemann, P., and Béjà, O. (2020) Lateral gene transfer of anion-conducting channelrhodopsins between green algae and giant viruses, *Curr. Biol.*, **30**, 4910–4920, doi: 10.1016/j.cub.2020.09.056.
128. Sharma, K., Sizova, I., Sanyal, S. K., Pandey, G. K., Hegemann, P., and Kateriya, S. (2023) Deciphering the role of cytoplasmic domain of Channelrhodopsin in modulating the interactome and SUMOylation of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **243**, 125135, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125135.
129. Matasci, N., Hung, L. H., Yan, Z., Carpenter, E. J., Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Ayyampalayam, S., Barker, M., Burleigh, J. G., Gitzendanner, M. A., Wafula, E., Der, J. P., dePamphilis, C. W., Roure, B., Philippe, H., Ruhfel, B. R., Miles, N. W., Graham, S. W., et al. (2014) Data access for the 1,000 Plants (1KP) project, *Giga-science*, **3**, 17, doi: 10.1186/2047-217X-3-17.
130. Wong, G. K., Soltis, D. E., Leebens-Mack, J., Wickett, N. J., Barker, M. S., Van de Peer, Y., Graham, S. W., and Melkonian, M. (2020) Sequencing and analyzing the transcriptomes of a thousand species across the tree of life for green plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **71**, 741–765, doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-041040.
131. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Li, H., Wang, Y., Brown, L. S., Palmateer, A., Melkonian, M., Cheng, S., Carpenter, E., Patterson, J., Wong, G. K. S., and Spudich, J. L. (2021) Cation and anion channelrhodopsins: Sequence motifs and taxonomic distribution, *MBio*, **12**, e0165621, doi: 10.1128/mBio.01656-21.
132. Glock, C., Nagpal, J., and Gottschalk, A. (2015) Microbial rhodopsin optogenetic tools: Application for analyses of synaptic transmission and of neuronal network activity in behavior, *Methods Mol. Biol.*, **1327**, 87–103, doi: 10.1007/978-1-4939-2842-2_8.
133. Tsunoda, S. P., and Hegemann, P. (2009) Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation, *Photochem. Photobiol.*, **85**, 564–569, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00519.x.
134. Говорунова Е. Г., Синешечков О. А., Спудич Д. Л. (2017) Три семейства канальных родопсинов и их использование в оптогенетике, *Журн. Высш. Нервной Деятельности*, **67**, 1–9.
135. Watanabe, M., and Furuya, M. (1982) Phototactic behavior of individual cells of *Cryptomonas* sp. in response to continuous and intermittent light stimuli, *Photochem. Photobiol.*, **35**, 559–563, doi: 10.1111/j.1751-1097.1982.tb02609.x.
136. Rhiel, E., Häder, D.-P., and Wehrmeyer, W. (1988) Photo-orientation in a freshwater *Cryptomonas* species, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **2**, 123–132, doi: 10.1016/1011-1344(88)85041-3.
137. Erata, M., Kubota, M., Takahashi, T., Inouye, I., and Watanabe, M. (1995) Ultrastructure and phototactic action spectra of two genera of cryptophyte flagellate algae, *Cryptomonas* and *Chroomonas*, *Protoplasma*, **188**, 258–266, doi: 10.1007/BF01280378.
138. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., and Spudich, J. L. (2016) Structurally distinct cation channelrhodopsins from cryptophyte algae, *Biophys. J.*, **110**, 2302–2304, doi: S0006-3495(16)30274-0.
139. Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., Diester, I., Goshen, I., Thompson, K. R., and Deisseroth, K. (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics, *Cell*, **141**, 154–165, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.037.
140. Yamauchi, Y., Konno, M., Ito, S., Tsunoda, S. P., Inoue, K., and Kandori, H. (2017) Molecular properties of a DTD channelrhodopsin from *Guillardia theta*, *Biophys. Physicobiol.*, **14**, 57–66, doi: 10.2142/biophysico.14.0_57.
141. Hososhima, S., Ueno, S., Okado, S., Inoue, K. I., Konno, M., Yamauchi, Y., Inoue, K., Terasaki, H., Kandori, H., and Tsunoda, S. P. (2023) A light-gated cation channel with high reactivity to weak light, *Sci Rep.*, **13**, 7625, doi: 10.1038/s41598-023-34687-7.

142. Sineshchekov, O. A., Govorunova, E. G., Li, H., Wang, Y., Melkonian, M., Wong, G. K.-S., Brown, L. S., and Spudich, J. L. (2020) Conductance mechanisms of rapidly desensitizing cation channelrhodopsins from cryptophyte algae, *mBio*, **11**, e00657-20, doi: 10.1128/mBio.00657-20.
143. Kishi, K. E., Kim, Y. S., Fukuda, M., Inoue, M., Kusakizako, T., Wang, P. Y., Ramakrishnan, C., Byrne, E. F. X., Thadhani, E., Paggi, J. M., Matsui, T. E., Yamashita, K., Nagata, T., Konno, M., Quirin, S., Lo, M., Benster, T., Uemura, T., Liu, K., Shibata, M., et al. (2022) Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine, *Cell*, **185**, 672-689.e623, doi: 10.1016/j.cell.2022.01.007.
144. Tucker, K., Sridharan, S., Adesnik, H., and Brohawn, S. G. (2022) Cryo-EM structures of the channelrhodopsin ChRmine in lipid nanodiscs, *Nat. Commun.*, **13**, 4842, doi: 10.1038/s41467-022-32441-7.
145. Kato, H. E., Zhang, F., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Nishizawa, T., Hirata, K., Ito, J., Aita, Y., Tsukazaki, T., Hayashi, S., Hegemann, P., Maturana, A. D., Ishitani, R., Deisseroth, K., and Nureki, O. (2012) Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel, *Nature*, **482**, 369-374, doi: 10.1038/nature10870.
146. Volkov, O., Kovalev, K., Polovinkin, V., Borshchevskiy, V., Bamann, C., Astashkin, R., Marin, E., Popov, A., Balandin, T., Willbold, D., Buldt, G., Bamberg, E., and Gordeliy, V. (2017) Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2, *Science*, **358**, eaan8862, doi: 10.1126/science.aan8862.
147. Oda, K., Vierock, J., Oishi, S., Rodriguez-Rozada, S., Taniguchi, R., Yamashita, K., Wiegert, J. S., Nishizawa, T., Hegemann, P., and Nureki, O. (2018) Crystal structure of the red light-activated channelrhodopsin Chrimson, *Nat. Commun.*, **9**, 3949, doi: 10.1038/s41467-018-06421-9.
148. Marshel, J. H., Kim, Y. S., Machado, T. A., Quirin, S., Benson, B., Kadmon, J., Raja, C., Chibukhchyan, A., Ramakrishnan, C., Inoue, M., Shane, J. C., McKnight, D. J., Yoshizawa, S., Kato, H. E., Ganguli, S., and Deisseroth, K. (2019) Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception, *Science*, **365**, eaaw5202, doi: 10.1126/science.aaw5202.
149. Chen, R., Gore, F., Nguyen, Q. A., Ramakrishnan, C., Patel, S., Kim, S. H., Raffiee, M., Kim, Y. S., Hsueh, B., Krook-Magnusson, E., Soltesz, I., and Deisseroth, K. (2020) Deep brain optogenetics without intracranial surgery, *Nat. Biotechnol.*, **39**, 161-164, doi: 10.1038/s41587-020-0679-9.
150. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Rodarte, E. M., Janz, R., Morelle, O., Melkonian, M., Wong, G. K.-S., and Spudich, J. L. (2017) The expanding family of natural anion channelrhodopsins reveals large variations in kinetics, conductance, and spectral sensitivity, *Sci. Rep.*, **7**, 43358, doi: 10.1038/srep43358.
151. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Hemmati, R., Janz, R., Morelle, O., Melkonian, M., Wong, G. K. S., and Spudich, J. L. (2018) Extending the time domain of neuronal silencing with cryptophyte anion channelrhodopsins, *eNeuro*, **5**, ENEURO.0174-0118.2018, doi: 10.1523/ENEURO.0174-18.2018.
152. Долгих Д. А., Малышев А. Ю., Саложин С. В., Некрасова О. В., Петровская Л. Е., Рошин М. В., Бородинова А. А., Фельдман Т. Б., Балабан П. М., Кирпичников М. П., Островский М. А. (2015) Анионный канальный родопсин, экспрессированный в культуре нейронов и *in vivo* в мозге мыши: светоиндуцированное подавление генерации потенциалов действия, *Докл. Акад. Наук*, **465**, 737-740, doi: 10.7868/S086956521536030X.
153. Mohammad, F., Stewart, J. C., Ott, S., Chlebikova, K., Chua, J. Y., Koh, T. W., Ho, J., and Claridge-Chang, A. (2017) Optogenetic inhibition of behavior with anion channelrhodopsins, *Nat. Methods*, **14**, 271-274, doi: 10.1038/nmeth.4148.
154. Mohamed, G. A., Cheng, R. K., Ho, J., Krishnan, S., Mohammad, F., Claridge-Chang, A., and Jesuthasan, S. (2017) Optical inhibition of larval zebrafish behaviour with anion channelrhodopsins, *BMC Biol.*, **15**, 103, doi: 10.1186/s12915-017-0430-2.
155. Bergs, A., Schultheis, C., Fischer, E., Tsunoda, S. P., Erbguth, K., Husson, S. J., Govorunova, E. G., Spudich, J. L., Nagel, G., Gottschalk, A., and Liewald, J. F. (2018) Rhodopsin optogenetic toolbox v2.0 for light-sensitive excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One*, **13**, e0191802, doi: 10.1371/journal.pone.0191802.
156. Wilson, D. E., Scholl, B., and Fitzpatrick, D. (2018) Differential tuning of excitation and inhibition shapes direction selectivity in ferret visual cortex, *Nature*, **560**, 97-101, doi: 10.1038/s41586-018-0354-1.
157. Forli, A., Vecchia, D., Binini, N., Succol, F., Bovetti, S., Moretti, C., Nespoli, F., Mahn, M., Baker, C. A., Bolton, M. M., Yizhar, O., and Fellin, T. (2018) Two-photon bidirectional control and imaging of neuronal excitability with high spatial resolution *in vivo*, *Cell Rep.*, **22**, 3087-3098, doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.063.
158. Andrei, A. R., Debes, S., Chelaru, M., Liu, X., Rodarte, E., Spudich, J. L., Janz, R., and Dragoi, V. (2021) Heterogeneous side-effects of cortical inactivation in behaving animals, *Elife*, **10**, e66400, doi: 10.7554/eLife.66400.
159. Huang, S., Ding, M., Roelfsema, M. R. G., Dreyer, I., Scherzer, S., Al-Rasheid, K. A. S., Gao, S., Nagel, G., Hedrich, R., and Konrad, K. R. (2021) Optogenetic control of the guard cell membrane potential and stomatal movement by the light-gated anion channel *GtACR1*, *Sci Adv*, **7**, eabg4619, doi: 10.1126/sciadv.abg4619.
160. Zhou, Y., Ding, M., Gao, S., Yu-Strzelczyk, J., Krischke, M., Duan, X., Leide, J., Riederer, M.,

- Mueller, M. J., Hedrich, R., Konrad, K. R., and Nagel, G. (2021) Optogenetic control of plant growth by a microbial rhodopsin, *Nat. Plants*, **7**, 144-151, doi: 10.1038/s41477-021-00853-w.
161. Oppermann, J., Fischer, P., Silapetere, A., Liepe, B., Rodriguez-Rozada, S., Flores-Urbe, J., Peter, E., Keidel, A., Vierock, J., Kaufmann, J., Broser, M., Luck, M., Bartl, F., Hildebrandt, P., Simon Wiegert, J., Beja, O., Hegemann, P., and Wietek, J. (2019) MerMAIDs: a family of metagenomically discovered marine anion-conducting and intensely desensitizing channelrhodopsins, *Nat. Commun.*, **10**, 3315, doi: 10.1038/s41467-019-11322-6.
162. Malyshev, A. Y., Roshchin, M. V., Smirnova, G. R., Dolgikh, D. A., Balaban, P. M., and Ostrovsky, M. A. (2017) Chloride conducting light activated channel GtACR2 can produce both cessation of firing and generation of action potentials in cortical neurons in response to light, *Neurosci. Lett.*, **640**, 76-80, doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.026.
163. Messier, J. E., Chen, H., Cai, Z. L., and Xue, M. (2018) Targeting light-gated chloride channels to neuronal somatodendritic domain reduces their excitatory effect in the axon, *Elife*, **7**, e38506, doi: 10.7554/eLife.38506.
164. Mahn, M., Prigge, M., Ron, S., Levy, R., and Yizhar, O. (2016) Biophysical constraints of optogenetic inhibition at presynaptic terminals, *Nat. Neurosci.*, **19**, 554-556, doi: 10.1038/nn.4266.
165. Mahn, M., Gibor, L., Patil, P., Cohen-Kashi Malina, K., Oring, S., Printz, Y., Levy, R., Lampl, I., and Yizhar, O. (2018) High-efficiency optogenetic silencing with soma-targeted anion-conducting channelrhodopsins, *Nat. Commun.*, **9**, 4125, doi: 10.1038/s41467-018-06511-8.
166. Mardinly, A. R., Oldenburg, I. A., Pegard, N. C., Sridharan, S., Lyall, E. H., Chesnov, K., Brohawn, S. G., Waller, L., and Adesnik, H. (2018) Precise multimodal optical control of neural ensemble activity, *Nat. Neurosci.*, **21**, 881-893, doi: 10.1038/s41593-018-0139-8.
167. Vierock, J., Peter, E., Grimm, C., Rozenberg, A., Chen, I. W., Tillert, L., Castro Scalise, A. G., Casini, M., Augustin, S., Tanese, D., Forget, B. C., Peyronnet, R., Schneider-Warme, F., Emiliani, V., Bèjà, O., and Hegemann, P. (2022) WiChR, a highly potassium selective channelrhodopsin for low-light one- and two-photon inhibition of excitable cells, *Sci. Adv.*, **8**, eadd7729, doi: 10.1126/sciadv.add7729.
168. Govorunova, E. G., Sineshchekov, O. A., Brown, L. S., Bondar, A. N., and Spudich, J. L. (2022) Structural foundations of potassium selectivity in channelrhodopsins, *mBio*, **13**, e0303922, doi: 10.1128/mbio.03039-22.
169. Fan, L. Z., Kim, D. K., Jennings, J. H., Tian, H., Wang, P. Y., Ramakrishnan, C., Randles, S., Sun, Y., Thadhani, E., Kim, Y. S., Quirin, S., Giocomo, L., Cohen, A. E., and Deisseroth, K. (2023) All-optical physiology resolves a synaptic basis for behavioral timescale plasticity, *Cell*, **186**, 543-559, doi: 10.1016/j.cell.2022.12.035.

CHANNELRHODOPSINS: FROM PHOTOTAXIS TO OPTOGENETICS

Review

E. G. Govorunova and O. A. Sineshchekov*

e-mail: egovoru@yahoo.com; oleg_sinesh@yahoo.com

Channelrhodopsins stand out among other retinal proteins because of their capacity to generate passive ionic currents following photoactivation. Owing to that, channelrhodopsins are widely used in neuroscience and cardiology as instruments for optogenetic manipulation of the activity of excitable cells. Photocurrents generated by channelrhodopsins were first discovered in the cells of green algae in the 1970s. In this review we describe this discovery and discuss the current state of research in this field.

Keywords: rhodopsins, ion channels, photoreception, membrane potential, flagellate algae, neurons

РЕТИНАЛЬ-СОДЕРЖАЩАЯ АНИОННАЯ ПОМПА ИЗ ЦИАНОБАКТЕРИИ *Tolypothrix campylonemoides*

© 2023 Т.И. Рокицкая^{1*}, А.А. Алексеев², Ф.М. Цыбров², С.М. Бухалович²,
Ю.Н. Антоненко^{1*}, В.И. Горделий^{3*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: rokitskaya@belozersky.msu.ru; antonen@belozersky.msu.ru

² Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS,
Grenoble, France; электронная почта: valentin.gordeliy@gmail.com

Поступила в редакцию 30.06.2023

После доработки 15.09.2023

Принята к публикации 15.09.2023

В данной работе получена функциональная характеристика родопсина TsaR из цианобактерии *Tolypothrix campylonemoides*. Анализ аминокислотной последовательности TsaR выявил, что этот белок обладает мотивом TSD, который отличается лишь одной аминокислотой от мотива известной хлорной помпы галородопсина TSA. Белок TsaR был экспрессирован в *Escherichia coli*, очищен и реконструирован в протеолипосомы и нанодиски. Функциональная активность измерялась по генерации электрического тока через плоские бислойные липидные мембраны с адсорбированными на одной поверхности мембраны протеолипосомами, а также по флуоресценции с использованием потенциал-зависимого красителя оксонола VI. Мы показали, что родопсин TsaR функционирует как мощная анионная помпа. Наши результаты показывают, что новый микробный анионный транспортер TsaR заслуживает более глубокого изучения и может быть интересен как для фундаментальных исследований мембранных белков, так и в качестве инструмента для оптогенетики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микробный родопсин, светочувствительная ионная помпа, оптогенетика, протеолипосомы, бислойная липидная мембрана.

DOI: 10.31857/S0320972523100123, EDN: OTRGBH

ВВЕДЕНИЕ

Микробные родопсины составляют большое семейство светочувствительных α -спиральных белков, несущих ковалентно-присоединенный ретиналь в качестве кофактора. Такие белки встречаются в микроскопических организмах всех доменов жизни, включая вирусы [1]. Одной из главных функций этих белков является способность осуществлять свето-индуцированный транспорт протонов, катионов или анионов. Ретиналь-содержащие белки участвуют в запасании энергии океанических микроорганизмов, причем, по грубым оценкам, вклад родопсинового фотосинтеза в общую энергетику биосферы сравним или

даже превосходит вклад хлорофильного фотосинтеза [2]. Однако известны и другие функции данного семейства белков, а именно: сенсорная функция, способность формировать светоиндуцированные ионные каналы в мембране [3] и даже регуляция ферментативной активности [4]. Структурно-функциональные исследования новых микробных родопсинов очень важны для получения новых оптогенетических инструментов [5]. Для поиска новых родопсинов часто применяют метагеномный анализ, и при выборе новых объектов исследования особое внимание обращают на необычный мотив консервативных аминокислотных остатков. Наиболее изученная светочувствительная протонная помпа, бактериородопсин *Halobacterium salinarum*, обладает мотивом DTD (D85, T89 и D96 – аминокислотные остатки, ключевые для переноса протона) [6].

Ген, кодирующий опсин TsaR, был обнаружен нами в ходе биоинформатического

Принятые сокращения: БЛМ – плоская бислойная липидная мембрана, ПЛ – протеолипосомы, ХКФ – карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразона.

* Адресат для корреспонденции.

поиска по открытым базам метагеномных данных [7]. Он содержится в геноме цианобактерии *Tolypothrix campylonemoides* VB511288, выделенной из зеленой биопленки, которая была обнаружена на фасаде здания в городе Сант-никетан на востоке Индии. Анализ аминокислотной последовательности TsaR выявил наличие мотива TSD. Родопсины из цианобактерий с таким мотивом были охарактеризованы ранее [8–10], они обладают способностью закачивать анионы в клетки бактерий в ответ на освещение. Мотив TSD отличается лишь одной аминокислотой от мотива известной хлорной помпы галородопсина – TSA [11].

В данной работе мы представляем данные функциональных исследований родопсина TsaR электрофизиологическими [12, 13] и оптическими методами, включая эксперименты по определению его ионной селективности в липидных везикулах и нанодисках. Используемый нами электрофизиологический подход был разработан в работах Л.А. Драчева и А.Д. Каулена и далее стал широко применяться в исследованиях по изучению родопсинов в варианте, предложенном Bamberg et al. [14–16]. В основе метода лежит измерение электрических фотоответов от макроскопической плоской бислойной липидной мембраны (БЛМ), на которой были адсорбированы протеолипосомы с ретиналь-содержащим белком. Такой способ измерения получил широкое применение благодаря тому, что он обладает высокой чувствительностью и, наряду с оптическими методами, позволяет измерять быстрые переходные процессы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали реагенты фирмы «Sigma-Aldrich», США (если не указано особо).

Протеолипосомы с родопсином TsaR. Последовательность нуклеотидов, кодирующая TsaR (GenBank accession no. JXC B00 000 000), была оптимизирована для экспрессии в клетках *Escherichia coli* с использованием GeneArt («ThermoFischer», США). Нуклеотидная последовательность на 5'-конце была оптимизирована с помощью RNA WebServer (Институт теоретической химии, Венский Университет) с целью уменьшения вероятности образования шпильки РНК в области, включающей сайты связывания рибосомы. Ген был коммерчески синтезирован («Eurofins», Люксембург) и клонирован в экспрессионный вектор pET15b («Novagen», США) по сайтам рестрикции XbaI

и XhoI. Таким образом, ген был поставлен непосредственно перед последовательностью LЕNNNNNN (полигистидиновая последовательность, использовавшаяся впоследствии для никель-хелатной хроматографии). Экспрессию в клетках *E. coli* штамма С41(DE3) и очистку белка TsaR проводили по протоколу, описанному ранее [17].

Для приготовления протеолипосом в стеклянную колбу добавляли 1% (w/v) раствор азолектина из соевых бобов в хлороформе («Sigma», США). От хлороформа избавлялись с помощью роторного испарителя и вакуумного насоса. Полученную тонкую липидную пленку, образовавшуюся на стенках колбы, ресуспендировали в растворе, содержащем 0,1 М NaCl («Applichem», ФРГ), 2% (w/v) холата натрия с конечной концентрацией азолектина 1% (w/v). Суспензию липидов обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин при 4 °С, после чего быстро добавляли солюбилизованный родопсин до конечной концентрации 0,7 мг/мл и детергент-абсорбирующие частицы Bio-Beads SM-2 («Bio-Rad», США). Получившуюся смесь перемешивали на орбитальной мешалке 2 ч при минимальном освещении, а затем сменяли частицы (так проводилось минимум 4 смены частиц).

Нанодиски с TsaR. Сборку нанодисков и встраивание TsaR осуществляли по стандартным методикам, описанным ранее в литературе [18]. Димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) («Avanti Polar Lipids», США) использовался в качестве липида. Мы использовали удлиненный вариант белка apolipoprotein-1 под названием MSP1E3D1. Молярное соотношение DMPC/MSP1E3D1/TsaR = 100/2/3. Сухую липидную пленку, полученную путём растворения порошка DMPC в хлороформе с последующим упариванием на роторном испарителе («Heidolph», ФРГ), регидратировали раствором детергента 100 мМ CHAPS так, чтобы соотношение липид/детергент составило 1 : 2. Далее, к раствору солюбилизованного в мицеллах целевого белка TsaR добавляли формирующий нанодиск белок MSP1E3D1. Полученную смесь инкубировали в течение часа при комнатной температуре, после чего добавляли сорбент BioBeads™ («Bio-Rad») для удаления детергентов в расчёте 1 г сорбента на 40 мг детергента. Удаление детергента проводили в течение 3 ч.

Плоская бислойная липидная мембрана формировалась из раствора в декане, который содержал 2% дифитаноилфосфатидилхолина и 0,04% (w/v) димиристоилэтилфосфатидилхолина («Avanti Polar Lipids»), на отверстии

в перегородке, разделяющей на два отсека тефлоновую ячейку, содержащую буферный раствор [19]. Диаметр отверстия составлял 0,8 мм. Состав буферного раствора варьировался и указан в подписях к рисункам. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (23–25 °С).

Электрический ток регистрировался в условиях фиксации потенциала. Разность потенциалов подавалась на хлорсеребряные электроды, помещенные через агаровые мосты в тефлоновую ячейку с двух сторон мембраны. Ток измерялся с помощью пэтч-клэмп усилителя ОЕС-2 («ОПУС», Россия), оцифровывался с помощью NI-DAQmx («National Instruments», США) и анализировался с использованием компьютерной программы WinWCP Strathclyde Electrophysiology Software, написанной Дж. Демпстером (Университет Стратклайда, Великобритания).

Для освещения БЛМ использовали галогенную лампу Novaflex («World Precision Instruments», США), плотность мощности которой составляет 0,77 Вт/см². Лампа освещала ячейку с передней (*cis*) стороны, протеолипосомы добавляли к БЛМ с *cis*-стороны.

Протеолипосомы (ПЛ) со встроенным ретиналь-содержащим белком TsaR добавлялись с *cis*-стороны ячейки, более близкой к осветителю. Высокоомный электрод находился в противоположном отсеке ячейки с *trans*-стороны. После добавления к БЛМ 25–50 мкл TsaR-протеолипосом и инкубации в течение 60 мин в буферном растворе, содержащем 10 мМ Mes и 10 мМ Tris (pH ≈ 7), липидную мембрану освещали светом видимого диапазона. БЛМ формировали из смеси липидов дифитаноил-фосфатидилхолина и катионного липида димиристоилэтилфосфохолина, которая хорошо зарекомендовала себя как благоприятствующая адсорбции отрицательно-заряженных липосом.

Для выявления достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

Измерение генерации потенциала в суспензии протеолипосом, содержащих TsaR, проводили с помощью измерения флуоресценции потенциал-зависимого красителя оксонола VI (конечная концентрация 2 мкМ) в водном буфере, содержащем 100 мМ NaH₂PO₄ и 1 М NaCl (pH 7,2), как это описано ранее [19]. Измерения проводились на спектрофлуориметре Панорама Флюорат-02 («Люмэкс», Россия) при возбуждении на 590 нм и испускании на 620 нм (щели были 5 нм) при температуре 15 °С. После установления заданной температуры в кювету добавляли 10–20 мкл протео-

липосом, которые далее освещали зеленым лазерным модулем, имеющим мощность 1 мВт. Для измерения генерации градиента pH на липосомах использовалась флуоресценция pH-зависимого красителя 9-аминоакридина (возбуждение – 425 нм, регистрация – 455 нм).

Измерение спектров поглощения TsaR проводили с помощью спектрофотометра Specord 50 («Analytik», Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Помповая активность ретиналь-содержащих белков, по литературным данным, регистрируется обычно простым способом по изменению pH в суспензии липосом pH-электродом, однако такой способ обладает низкой чувствительностью и требует больших количеств белка. Существенно большей чувствительностью обладает более сложный метод, в котором протеолипосомы налипают на поверхность плоской бислойной липидной мембраны, но не сливаются с ней и остаются интактными на поверхности БЛМ. Было показано, что в такой системе освещение приводит к генерации переходных электрических потенциалов [12, 13] и переходных токов через БЛМ [14–16], которые можно регистрировать обычными макроскопическими электродами. Добавление протонофоров в такой системе обычно приводит к появлению стационарных фототоков через БЛМ, поскольку увеличивается электрическая доступность внутренней водной фазы протеолипосом [16, 20].

После начала освещения регистрировалось небольшое быстрое изменение тока БЛМ к отрицательным значениям (черная кривая на рис. 1, *a* и *b*), после которого значение тока в секундной шкале возвращалось к первоначальным величинам. Дальнейшее добавление солей холин хлорида (рис. 1, *a*) или фторида калия (KF) (рис. 1, *b*) приводило к моментальному увеличению переходного тока на включение света (светло-серые кривые), а также к продолжающемуся со временем росту (темно-серые кривые, запись через 30 мин). Знак наблюдаемого переходного тока для ПЛ с TsaR соответствует таковому для ПЛ с бактериородопсином и указывает на несколько возможных путей функционирования белка: помпирование протонов или одновалентных катионов внутрь липосом, помпирование одновалентных анионов наружу липосом или другие варианты. Последующее добавление с двух сторон мембраны трибутилолова, который является переносчиком моновалентных

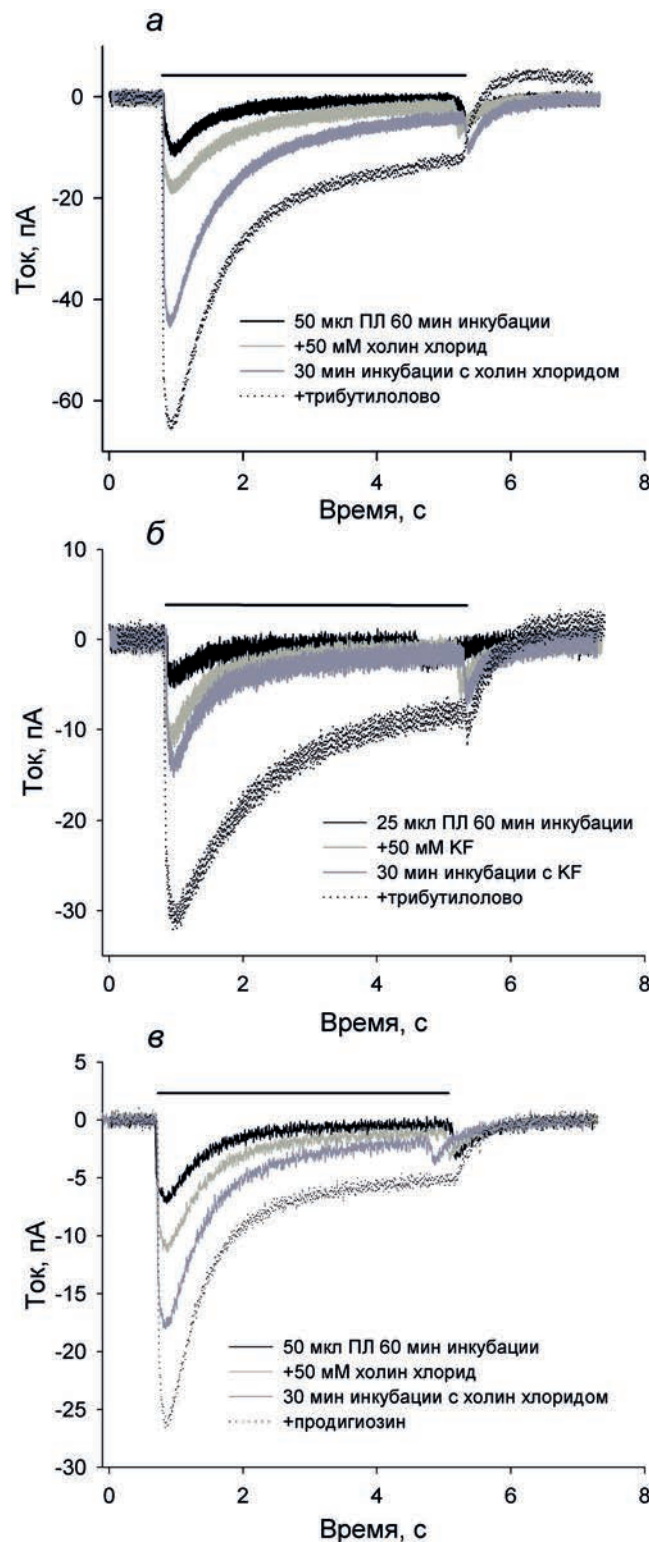


Рис. 1. Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами с TsaR при потенциале на БЛМ 0 мВ. Период освещения мембраны белым светом показан сплошной черной линией. *а* – Записи тока БЛМ при инкубации с липосомами (50 мкл) в течение 60 мин (черная кривая). Светло-серая кривая – запись тока сразу после добавления 50 мМ холин хлорида. Темно-серая кривая – после 30 мин инкубации с холин хлоридом. Пунктирная кривая – после добавления 1 мкг/мл трибутилолова. *б* – Записи тока БЛМ при инкубации с липосомами (25 мкл) в течение 60 мин (черная кривая). Светло-серая кривая – запись тока сразу после добавления 50 мМ KF. Темно-серая кривая – после 30 мин инкубации с KF. Пунктирная кривая – после добавления 1 мкг/мл трибутилолова. *в* – Записи тока БЛМ при инкубации с липосомами (25 мкл) в течение 60 мин (черная кривая). Светло-серая кривая – запись тока сразу после добавления 50 мМ холин хлорида. Темно-серая кривая – после 30 мин инкубации с холин хлоридом. Пунктирная кривая – после добавления 150 нМ продигозина. Буферный раствор содержал 10 мМ Mes и 10 мМ Tris (pH 7,0)

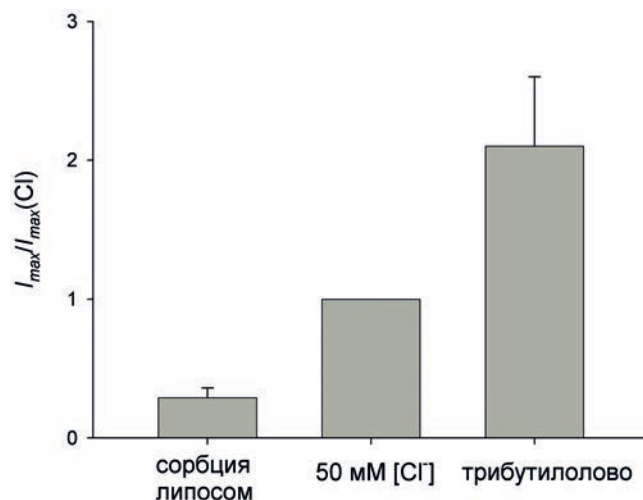


Рис. 2. Суммированные результаты четырех экспериментов с TsaR-протеолипосомами по влиянию добавления 50 mM ионов хлора и последующего добавления 1 мкг/мл трибутилолова на амплитуду начального фототока БЛМ. За единицу принят начальный фототок в условиях 50 mM солей хлорид-аниона

анионов [21, 22], приводило к значительному увеличению не только начального, но и стационарного тока в ответ на освещение (пунктирные кривые). При добавлении вместо трибутилолова в аналогичном эксперименте другого известного переносчика анионов, продигозина [23], также происходило увеличение начального переходного и стационарного фототоков БЛМ (рис. 1, в). На рис. 2 представлены результаты экспериментов с адсорбированными ПЛ по влиянию добавления 50 mM ионов хлора и последующего добавления 1 мкг/мл трибутилолова на амплитуду начального фототока БЛМ (4 эксперимента). За единицу принят начальный фототок в условиях 50 mM солей хлорид-аниона. Видно, что соли хлорида вызывают увеличение начального тока ($p < 0,0003$), последующее добавление анионных переносчиков приводит к росту тока ($p < 0,006$).

При проведении эксперимента в среде с сульфат-анионом в качестве основного аниона в электролите (состав среды: 10 mM Mes, 10 mM Tris и 100 mM Na₂SO₄ (pH 7,0)) длительная инкубация липосом с БЛМ также приводила к их адсорбции на поверхности плоской липидной мембраны, что проявлялось в появлении переходного тока при освещении (рис. 3, черная кривая). Однако в этом случае величина амплитуды переходного тока была меньше по сравнению с той, что наблюдалась в присутствии хлорид-аниона. Протонофор карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон (ХКФ) увеличивал стационарный ток при освещении (светло-серая кривая), а последую-

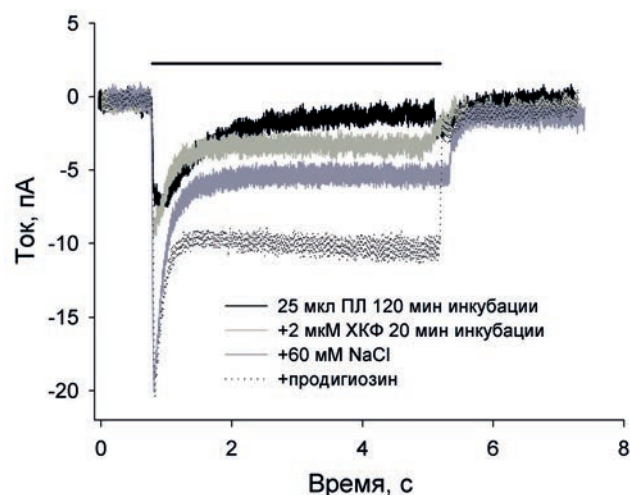


Рис. 3. Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными протеолипосомами с TsaR в среде с 100 mM Na₂SO₄. Период освещения мембраны белым светом показан сплошной черной линией. Записи тока БЛМ при инкубации с липосомами (25 мкл) в течение 120 мин (черная кривая). Светло-серая кривая — запись тока после добавления 2 мкМ ХКФ. Темно-серая кривая — после добавления 60 mM NaCl. Пунктирная кривая — после добавления 150 нМ продигозина. Буферный раствор содержал 10 mM Mes, 10 mM Tris и 100 mM Na₂SO₄ (pH 7,0)

щее добавление 60 mM хлорида натрия (темно-серая кривая) приводило к значительному увеличению начального тока в ответ на включение освещения. Продигозин, добавленный в конце эксперимента, значительно увеличил стационарный фототок БЛМ (рис. 3, пунктирная кривая).

Во всех экспериментах с адсорбцией протеолипосом на БЛМ добавление хлорида калия, хлорида натрия, хлорида холина или фторида калия, а также переносчиков моновалентных анионов (трибутилолова и продигозина) приводило к большому росту переходного фототока. Однако небольшие переходные фототоки наблюдались после налипания липосом на плоскую липидную мембрану и при отсутствии моновалентных анионов. Возможно, это связано с наличием ионов хлора в липосомах или его вытеканием из агарных мостов к электродам. Мы приготовили мембранные нанодиски со встроенным белком TsaR и измерили фототолеты в их присутствии на БЛМ в разных средах. Нанодиски не имеют внутреннего водного объема, поэтому эквивалентная электрическая схема в этом случае может отличаться от опытов с липосомами. На рис. 4 представлены результаты по измерению фототоков БЛМ в буфере со 100 mM NaCl (панель а), 100 mM Na₂SO₄ (панель б) и 100 mM глюконата калия (панель в) при добавлении 10 мкл нанодисков с *cis*-стороны БЛМ. Нанодиски быстро адсорбировались на БЛМ, и уже через 20 мин

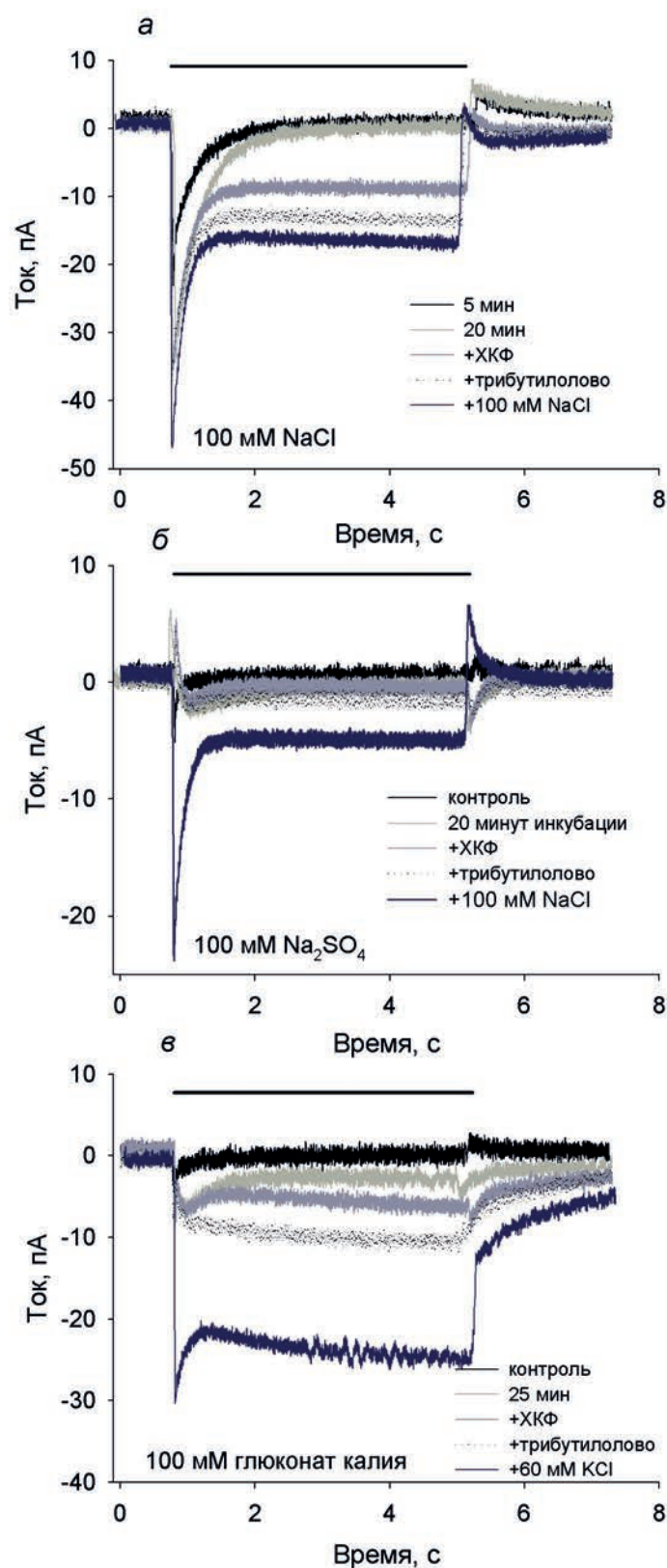


Рис. 4. Измерение электрического тока через БЛМ с адсорбированными нанодисками с TsaR при потенциале на БЛМ 0 мВ. Период освещения мембраны белым светом показан сплошной черной линией. *а* – Записи тока БЛМ при инкубации с нанодисками (10 мкл) в течение 5 мин (черная кривая). Светло-серая кривая – после 20 мин инкубации с нанодисками. Средне-серая кривая – после добавления 2 мкМ ХКФ. Пунктирная кривая – после добавления 1 мкг/мл трибутилолова. Темно-серая кривая – после добавления NaCl (до концентрации 200 мМ). Буферный раствор содержал 10 мМ Mes, 10 мМ Tris и 100 мМ NaCl (pH 7,0). *б* – Аналогичные записи тока в буферном растворе 10 мМ Mes, 10 мМ Tris, 100 мМ Na₂SO₄ (pH 7,0). *в* – Аналогичные записи тока в буферном растворе 10 мМ Mes, 10 мМ Tris, 100 мМ глюконат калия (pH 7,0)

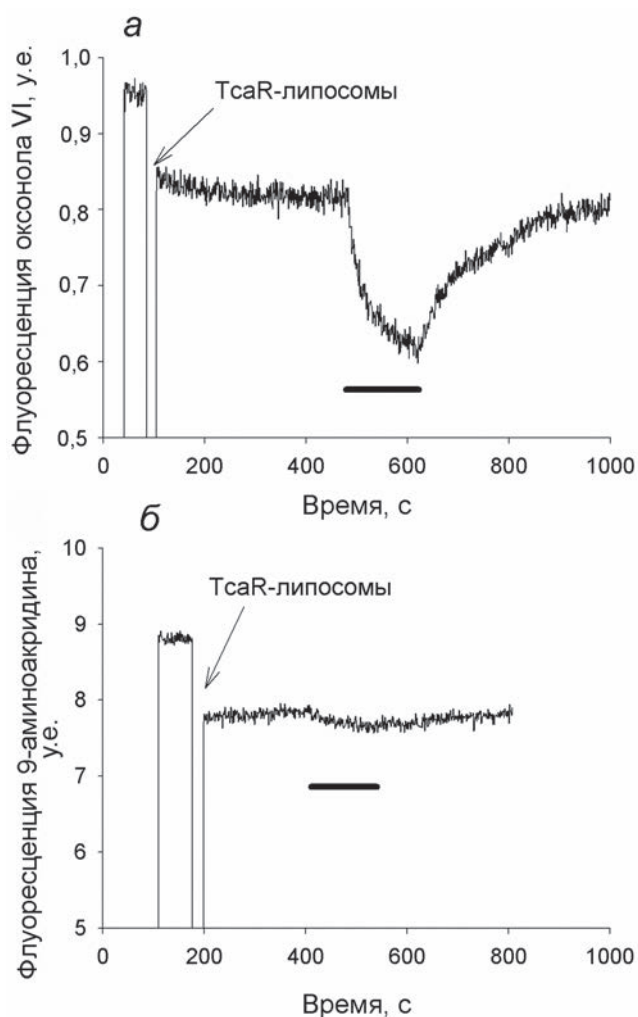


Рис. 5. Измерение ион-транспортирующих свойств TsaR в суспензии протеолипосом по изменению флуоресценции 2 мкМ оксонола VI (а) и 4 мкМ 9-аминоакридина (б). 10 мкл протеолипосом были суспендированы в 1 мл среды, содержащей 1 М NaCl и 100 мМ NaH_2PO_4 (pH 7,2). Период освещения мембраны светом зеленого светодиода показан сплошной черной линией

наблюдались токи через БЛМ в ответ на включение света. Хорошо видно, что значительные переходные токи были только в случае среды с хлоридом натрия (рис. 4, а; светло-серая кривая). В присутствии сульфата натрия или глюконата калия фототоки были значительно меньше (светло-серые кривые на рис. 4, б и в). Более того, в случае 100 мМ Na_2SO_4 (рис. 4, б) первоначальный быстрый ответ имел даже противоположный знак. Добавление хлорида натрия в конце каждой пробы приводило либо к появлению большого мгновенного изменения тока в ответ на включение света (рис. 4, б и в; темно-серые кривые), либо к дальнейшему увеличению начального тока (рис. 4, а). Этот результат дает основание утверждать, что ионы натрия, калия, сульфата и глюконата не переносятся помпой. В присутствии протонифора

ХКФ и анионного переносчика трибутилолова стационарный фототок БЛМ значительно возрастал (средне-серые и пунктирные кривые на рис. 5). В целом эти опыты говорят о способности ретиналь-содержащего белка TsaR транспортировать анионы хлора через мембрану в ответ на освещение.

Данные, представленные на рис. 1, б, говорят о способности этого белка транспортировать анионы фтора. Также мы не исключаем переноса гидроксил-аниона. Ранее было показано, что мембранные фрагменты с галородопсином, имеющим близкую последовательность важных аминокислот в белке TSA, приводят к генерации фототока в присутствии Cl^- , Br^- и I^- , но не в присутствии SO_4^{2-} , F^- и NO_3^- [24]. Однако в зависимости от условий освещения галородопсин может выступать как светочувствительная хлорная помпа или протонная помпа [25]. Согласно нашим результатам, перенос анионов под действием света белком TsaR осуществляется изнутри липосом наружу (эквивалентно переносу в цитоплазму в клетках). Таким образом, направление активного транспорта анионов белком TsaR и галородопсином совпадает.

Ранее было показано, что для измерения активности родопсиновых белков в суспензии протеолипосом можно использовать флуоресцентные методы в присутствии потенциал-чувствительного красителя оксонола VI или ΔpH -чувствительного красителя 9-аминоакридина (9-AA) [19, 26]. На рис 5, а показан типичный ответ оксонола VI, добавленного к суспензии протеолипосом с TsaR. При освещении зеленым светом наблюдается значительное уменьшение сигнала флуоресценции, что свидетельствует о генерации мембранного потенциала на липосомах. Оксонол VI — это анионный краситель и падение его флуоресценции свидетельствует о генерации потенциала со знаком плюс внутри липосом, что соответствует той же полярности, что и в аналогичных экспериментах с бактериородопсином [26]. Следует сказать, что данный метод по своей чувствительности существенно уступает методу измерения фототока на БЛМ [19], и образование больших ответов в суспензии протеолипосом с TsaR (рис. 5, а) свидетельствует о большой эффективности помпы TsaR. Аналогичные опыты с использованием красителя 9-AA показали, что генерация градиента pH в такой системе практически не происходит (рис. 5, б).

На рис. 6 приведена серия спектров поглощения TsaR при отсутствии анионов хлора (черная кривая) и в присутствии нарастающих

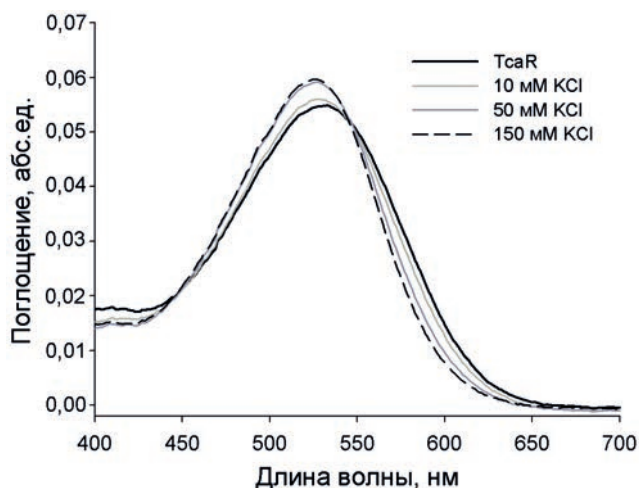


Рис. 6. Спектры поглощения TsaR в нанодисках при различных концентрациях хлорида калия. Среда измерения содержала 10 мМ Mes и 10 мМ Tris (pH 6,5). Концентрация хлорида калия составляла 0 мМ (черная линия), 10 мМ (светло-серая линия), 50 мМ (темно-серая линия) и 150 мМ (пунктирная линия)

концентраций хлорид-аниона (серые и штриховые линии). Положение максимума спектра поглощения белка TsaR в нанодисках составляет 531 нм, и при добавлении 50–150 мМ ионов хлора происходит сдвиг максимума спектра поглощения в коротковолновую область на 5 нм. Кроме того, происходит повышение оптической плотности в максимуме поглощения. Эти данные хорошо соответствуют влиянию анионов хлора на спектры поглощения галородопсинов, исследованных ранее [8, 9, 27], и подтверждают представление о том, что TsaR является хлорной помпой.

Анализ аминокислотной последовательности TsaR и полученные нами результаты позволяют предположить, что TsaR имеет функциональную схожесть с галородопсином. Галородопсин принимает участие в поддержании солевого баланса бактерий, и можно пред-

положить, что физиологическая роль TsaR в цианобактериях сходна. Поскольку галородопсин используется в оптогенетике, можно предположить, что TsaR также может найти свою нишу в палитре используемых оптогенетических инструментов. Представляется, что белок TsaR заслуживает более глубокого и всестороннего исследования, включая изучение особенностей его фотоцикла, а также его структуры.

Вклад авторов. В.И. Горделий — концепция работы; А.А. Алексеев, Т.И. Рокицкая, Ю.Н. Антоненко, С.М. Бухалович, Ф.М. Цыбров — проведение экспериментов; Ю.Н. Антоненко, В.И. Горделий, Т.И. Рокицкая — написание первоначального текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов исследования и редактировании окончательной версии статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00038, электрофизиологические измерения), а также при поддержке Министерства образования и науки РФ (задача «Исследование механизмов преобразования энергии в мембранных системах, связанных с циклическим переносом ионов водорода и натрия ферментами электрон-транспортных цепей, механизмов продукции активных форм кислорода и их роли в физиологии клетки», проект АААА-А19-119031390114-5, спектрофотометрические измерения). Работы по экспрессии и очистке белка были выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00018).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gushchin, I., and Gordeliy, V. (2018) Microbial rhodopsins, *Subcell Biochem.*, **87**, 19–56, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_2.
2. Gomez-Consarnau, L., Raven, J. A., Levine, N. M., Cutter, L. S., Wang, D., Seegers, B., Aristegui, J., Fuhrman, J. A., Gasol, J. M., and Sanudo-Wilhelmy, S. A. (2019) Microbial rhodopsins are major contributors to the solar energy captured in the sea, *Sci. Adv.*, **8**, eaaw8855, doi: 10.1126/sciadv.aaw8855.
3. Spudich, J. L., Sineshchekov, O. A., and Govorunova, E. G. (2014) Mechanism divergence in microbial rhodopsins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 546–552, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.06.006.
4. Mukherjee, S., Hegemann, P., and Broser, M. (2019) Enzymerhodopsins: novel photoregulated catalysts for optogenetics, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **57**, 118–126, doi: 10.1016/j.sbi.2019.02.003.
5. Кирпичников М. П., Островский М. А. (2019) Оптогенетика и зрение, *Вестник Российской Академии Наук*, **89**, 125–130, doi: 10.31857/S0869-5873892125-130.
6. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H. T., Cartailler, J. P., and Lanyi, J. K. (1999) Structure of bacterio-

- rhodopsin at 1.55 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **291**, 899–911, doi: 10.1006/jmbi.1999.3027.
7. Das, S., Singh, D., Madduluri, M., Chandrababunaidu, M. M., Gupta, A., Adhikary, S. P., and Tripathy, S. (2015) Draft genome sequence of bioactive-compound-producing cyanobacterium *Tolypothrix cam-pylonemoides* strain VB511288, *Genome Announc.*, **3**, e00226–15, doi: 10.1128/genomeA.00226–15.
 8. Hasemi, T., Kikukawa, T., Watanabe, Y., Aizawa, T., Miyauchi, S., Kamo, N., and Demura, M. (2019) Photochemical study of a cyanobacterial chloride-ion pumping rhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 136–146, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.12.001.
 9. Yun, J. H., Park, J. H., Jin, Z., Ohki, M., Wang, Y., Lupala, C. S., Liu, H., Park, S. Y., and Lee, W. (2020) Structure-based functional modification study of a cyanobacterial chloride pump for transporting multiple anions, *J. Mol. Biol.*, **432**, 5273–5286, doi: 10.3390/ma13143061.
 10. Astashkin, R., Kovalev, K., Bukhdruker, S., Vaganova, S., Kuzmin, A., Alekseev, A., Balandin, T., Zabelskii, D., Gushchin, I., Royant, A., Volkov, D., Bourenkov, G., Koonin, E., Engelhard, M., Bamberg, E., and Gordeliy, V. (2022) Structural insights into light-driven anion pumping in cyanobacteria, *Nat. Commun.*, **13**, 6460, doi: 10.1038/s41467-022-34019-9.
 11. Oesterhelt, D., Tittor, J., and Bamberg, E. (1992) A unifying concept for ion translocation by retinal proteins, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **24**, 181–191, doi: 10.1007/BF00762676.
 12. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321–324, doi: 10.1038/249321a0.
 13. Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Liberman, E. A., Ostroumov, S. A., Plakunova, V. G., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1976) Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059–7065.
 14. Bamberg, E., Apell, H. J., Dencher, N. A., Sperling, W., Stieve, H., and Lauger, P. (1979) Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes, *Biophys. Struct. Mech.*, **5**, 277–292, doi: 10.1007/BF02426663.
 15. Bamberg, E., Butt, H. J., Eisenrauch, A., and Fendler, K. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, *Q. Rev. Biophys.*, **26**, 1–25, doi: 10.1017/s0033583500003942.
 16. Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., Heberle, J., Engelhard, M., and Bamberg, E. (2002) Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality, *J. Mol. Biol.*, **321**, 821–838, doi: 10.1016/s0022-2836(02)00696-4.
 17. Shevchenko, V., Mager, T., Kovalev, K., Polovinkin, V., Alekseev, A., Juettner, J., Chizhov, I., Bamann, C., Vavourakis, C., Ghai, R., Gushchin, I., Borshchevskiy, V., Rogachev, A., Melnikov, I., Popov, A., Balandin, T., Rodriguez-Valera, F., Manstein, D. J., Bueltdt, G., Bamberg, E., and Gordeliy, V. (2017) Inward H^+ pump xenorhodopsin: mechanism and alternative optogenetic approach, *Sci. Adv.*, **3**, e1603187, doi: 10.1126/sciadv.1603187.
 18. Schuler, M. A., Denisov, I. G., and Sligar, S. G. (2013) Nanodiscs as a new tool to examine lipid-protein interactions, *Methods Mol. Biol.*, **974**, 415–433, doi: 10.1007/978-1-62703-275-9_18.
 19. Rokitskaya, T. I., Maliar, N. L., Siletsky, S. A., Gordeliy, V., and Antonenko, Y. N. (2022) Electrophysiological characterization of microbial rhodopsin transport properties: electrometric and DpH measurements using planar lipid bilayer, collodion film, and fluorescent probe approaches, *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 259–275, doi: 10.1007/978-1-0716-2329-9_12.
 20. Rokitskaya, T. I., Maliar, N., Kovalev, K. V., Volkov, O., Gordeliy, V. I., and Antonenko, Y. N. (2021) Rhodopsin channel activity can be evaluated by measuring the photocurrent voltage dependence in planar bilayer lipid membranes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 409–419, doi: 10.1134/S0006297921040039.
 21. Selwyn, M. J., Dawson, A. P., Stockdale, M., and Gains, N. (1970) Chloride-hydroxide exchange across mitochondrial, erythrocyte and artificial lipid membranes mediated by trialkyl- and triphenyltin compounds, *Eur. J. Biochem.*, **14**, 120–126, doi: 10.1111/j.1432-1033.1970.tb00268.x.
 22. Antonenko, Y. N. (1990) Electrically silent anion transport through bilayer lipid membrane induced by tributyltin and triethyllead, *J. Membr. Biol.*, **113**, 109–113, doi: 10.1007/BF01872884.
 23. Sato, T., Konno, H., Tanaka, Y., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H. H., and Ohkuma, S. (1998) Prodigiosins as a new group of H^+ /Cl $^-$ symporters that uncouple proton translocators, *J. Biol. Chem.*, **273**, 21455–21462, doi: 10.1074/jbc.273.34.21455.
 24. Bamberg, E., Hegemann, P., and Oesterhelt, D. (1984) Reconstitution of the light-driven electrogenic ion-pump halorhodopsin in black lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 53–60, doi: 10.1016/0005-2736(84)90549-2.
 25. Bamberg, E., Tittor, J., and Oesterhelt, D. (1993) Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 639–643, doi: 10.1073/pnas.90.2.639.
 26. Antonenko, Y. N., Denisov, S. S., Silachev, D. N., Khailova, L. S., Jankauskas, S. S., Rokitskaya, T. I., Danilina, T. I., Kotova, E. A., Korshunova, G. A.,

- Plotnikov, E. Y., and Zorov, D. B. (2016) A long-linker conjugate of fluorescein and triphenylphosphonium as mitochondria-targeted uncoupler and fluorescent neuro- and nephroprotector, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 2463-2473, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.014.
27. Steiner, M., Oesterhelt, D., Ariki, M., and Lanyi, J. K. (1984) Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein. I. Effects on the chromophore, *J. Biol. Chem.*, **259**, 2179-2184, doi: 10.1016/S0021-9258(17)43334-5.

RETINAL-BASED ANION PUMP FROM THE CYANOBACTERIUM *Tolypothrix campylonemoides*

T. I. Rokitskaya^{1*}, A. A. Alekseev², F. M. Tsybrov², S. M. Bukhalovich²,
Y. N. Antonenko^{1*}, and V. I. Gordeliy^{3*}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: rokitskaya@belozersky.msu.ru; antonen@belozersky.msu.ru

² Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ Institut de Biologie Structurale (IBS), Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Grenoble, France; e-mail: valentin.gordeliy@gmail.com

In this work, a functional characterization of TcaR rhodopsin from the cyanobacterium *Tolypothrix campylonemoides* was obtained. Analysis of the amino acid sequence of TcaR revealed that this protein possesses a TSD motif that differs by only one amino acid from the motif of the known halorhodopsin chloride pump TSA. The TcaR protein was expressed in *E. coli*, purified and incorporated into proteoliposomes and nanodiscs. Functional activity was measured by electric current generation through the planar bilayer lipid membranes (BLMs) with proteoliposomes adsorbed on one membrane surface, as well as by fluorescence using voltage-dependent dye oxonol VI. We have shown that TcaR rhodopsin functions as a powerful anion pump. Our results show that the novel microbial anion transporter TcaR deserves deeper study and may be of interest both for fundamental studies of membrane proteins and as a tool for optogenetics.

Keywords: microbial rhodopsin, photosensitive ion pump, optogenetics, proteoliposomes, bilayer lipid membrane

ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ДИНАМИКА ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ТЕТРАМЕРА ХЛОРОФИЛЛА В ВОДОРАСТВОРИМОМ ХЛОРОФИЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩЕМ БЕЛКЕ BoWSCP

© 2023 Д.А. Черепанов^{1,2*}, К.В. Неверов^{3,4}, Ю.Н. Обухов³, Ю.В. Малеева⁴,
Ф.Е. Гостев¹, И.В. Шелаев^{1,2}, А.В. Айбуш¹, М.С. Крицкий³, В.А. Надточенко^{1,5*}

¹ ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: tscherepanov@gmail.com

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

³ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
119017 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119992 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119992 Москва, Россия; электронная почта: nadtochenko@gmail.com

Поступила в редакцию 22.06.2023

После доработки 22.09.2023

Принята к публикации 22.09.2023

Методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» измерена абсорбционная динамика хлорофилла *a* в симметричном тетрамерном комплексе водорастворимого хлорофилл-связывающего белка BoWSCP в диапазоне от 400 до 750 нм с временным разрешением 20 фс–200 пс. При возбуждении BoWSCP в области полосы Core на длине волны 430 нм наблюдалась безызлучательная внутримолекулярная конверсия $S_3 \rightarrow S_1$ с характерным временем 83 ± 9 фс. При возбуждении комплекса в области полосы Q_y на длине волны 670 нм наблюдался релаксационный переход между двумя экситонными состояниями димера хлорофилла со временем 105 ± 10 фс. Получены спектры поглощения возбужденных синглетных состояний S_1 и S_3 хлорофилла *a*. Продemonстрировано, что делокализация возбужденного состояния между экситонно-сопряженными молекулами хлорофилла в тетрамере BoWSCP изменяется во времени и зависит от энергии возбуждения. При возбуждении BoWSCP в области полосы Core наблюдается сверхбыстрая фотохимическая реакция, обусловленная, по всей видимости, восстановлением триптофана в ближайшем окружении хлорофилла.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хлорофилл *a*, белки семейства WSCP, фемтосекундная лазерная спектроскопия, спектр возбужденного состояния, экситонная динамика, внутримолекулярная конверсия.

DOI: 10.31857/S0320972523100135, EDN: OTSLKL

ВВЕДЕНИЕ

Анализ фотохимических реакций переноса энергии и разделения зарядов в фотосинтетических пигмент-белковых комплексах затруднен их сложной молекулярной организацией и наличием большого количества экситонно-сопряженных молекул хлорофилла (Хл). Интерпретация абсорбционной динамики фото-

синтетических комплексов, регистрируемой методами фемтосекундной лазерной спектроскопии, представляет значительные методические трудности [1, 2]. Хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP (Water-Soluble Chlorophyll Binding Proteins) из высших растений представляют собой идеальную модельную систему для изучения механизма фотохимических реакций [3–6]. Эти белки водорастворимы,

Принятые сокращения: Хл – хлорофилл; BL – суммарное выцветание в области стимулированного излучения (GSB + SE); BoWSCP – водорастворимый хлорофилл-связывающий белок семейства WSCP из *Brassica oleracea* var. botrytis; GSB – выцветание основного состояния; ESA – поглощение возбужденного состояния; SE – стимулированное излучение возбужденного состояния; TA – переходное поглощение.

* Адресат для корреспонденции.

фото- и термостабильны, могут быть эффективно модифицированы и продуцированы методами генной и белковой инженерии. В клетке растений эти белки локализованы вне тилакоидных мембран хлоропластов и не участвуют в фотосинтетическом процессе. Предполагается, что их физиологические функции связаны с активностью антистрессовых систем клетки [4, 7, 8]. По сравнению с фотосинтетическими пигмент-белковыми комплексами структура белков WSCP относительно проста. Холоформы WSCP представляют собой водорастворимые гомотетрамеры с молекулярной массой 69–80 кДа, при этом каждый комплекс содержит до четырех нековалентно связанных молекул Хл. В зависимости от степени гомологии первичной структуры апобелка семейство WSCP подразделяется на классы I и II, причем в последнем выделяют подклассы IIa и IIb по разной аффинности апобелков к Хл *a* и *b* [6, 9]. Было показано, что при фотовозбуждении Хл в WSCP происходит миграция энергии как внутри димера, так и между димерными парами [10, 11]. Это свойство делает WSCP класса II перспективной моделью для изучения механизмов пигмент-пигментных и пигмент-белковых взаимодействий, с помощью которой возможно исследовать механизмы переноса энергии возбуждения между пигментами [12–14] и взаимодействие возбужденных пигментов с белковым окружением [15–17].

В данной работе методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» изучались фотохимические процессы в симметричном тетрамерном комплексе белка BoWSCP подкласса IIa из *Brassica oleracea* var. botrytis, который связывает преимущественно Хл *a*, то есть их пигментный состав можно считать практически гомогенным [5]. Тетрамерный комплекс Хл в белке BoWSCP организован в виде двух димеров, причем угол между плоскостями порфириновых ядер пигментов в димере составляет около 30° [18]. В совокупности два димера в составе макромолекулы холобелка формируют нековалентную тетрамерную структуру, в которой димерные пары Хл соединены друг с другом фитольными «хвостами» [19]. Энергия экситонного взаимодействия мономеров в димере составляет примерно 100 см⁻¹, взаимодействие между димерами в десять раз слабее [13, 20]. Недавно было показано, что Хл в составе данной структуры обладает фотокаталитической активностью в редокс-процессах [21].

Настоящая работа посвящена количественному анализу процессов безызлучательной внутримолекулярной конверсии из третьего

в низшее возбужденное состояние, а также электронных переходов между экситонными уровнями полосы Q_y тетрамера Хл *a* при возбуждении BoWSCP в области полосы Core и полосы Q_y. Рассматриваются спектральные характеристики, позволяющие определять степень делокализации возбужденного состояния (экситона) между несколькими молекулами Хл в тетрамерном комплексе, а также детектировать реакции переноса электрона с участием возбужденных молекул Хл *a* в данном комплексе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты апобелка BoWSCP получали, экспрессируя гены этого белка, встроенные в плазмиды, которыми были трансформированы клетки штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3), согласно используемым ранее протоколам [5, 6, 22]. Благодаря наличию на N-концах апобелков шести гистидиновых остатков (6xHis) очистку их препаратов проводили с использованием аффинной хроматографии на колонке с Ni-агарозой с последующим диализом препарата. Чистоту препаратов проверяли методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле [5, 6]. Самосборку холоформ BoWSCP осуществляли *in vitro* путем совместной инкубации апобелков и изолированных тилакоидных мембран шпината [4–6, 8, 22]. Учитывая высокую термостабильность тетрамеров белков WSCP, полученные препараты холоформ прогревали (95 °C, 10 мин) с целью удаления посторонних белков, после чего проводили окончательную очистку BoWSCP на колонке с Ni-агарозой [1, 23]. Очищенный препарат диализовали против 10 mM Tris-HCl (pH 8,0). Качество препаратов тетрамеров BoWSCP проверяли методами нативного электрофореза в полиакриламидном геле, абсорбционной, флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма. Электрофорез белков в денатурирующих и нативных условиях проводили в камере Mini PROTEAN Tetra System («Bio-Rad», США). Содержание белка в образцах измеряли методом Брэдфорда [24]. Спектры поглощения образцов регистрировали на спектрофотометрах Cary-50 («Agilent», США) и Shimadzu-1601PC («Shimadzu», Япония). Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали на спектрометре кругового дихроизма Chirascan («Applied Photophysics», США). Пересчет амплитуды сигналов ($\Delta\epsilon$) в единицы эллиптичности (θ) для спектров кругового ди-

хроизма проводили, согласно используемому ранее протоколу [23].

Препараты для фемтосекундной спектроскопии концентрировали путем центрифугирования в центрифужных концентраторах Amicon Ultra-15 («Merck», Германия) с фильтрами на 30 или 50 кДа. Концентрирование проводили серией центрифугирования препаратов белка BoWSCP в 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) с добавлением к ним NaCl до 150 mM или 10% (v/v) глицерина для предотвращения агрегации белка в высококонцентрированном растворе. Полученный концентрат разбавляли буфером такого же состава с NaCl или глицерином до получения 1 мл раствора с ОП₆₇₃ = 5.

Сверхбыстрые абсорбционные изменения $\Delta A(\lambda_i, t_m)$ регистрировались методом широкополосной фемтосекундной лазерной спектроскопии «возбуждение-зондирование» в оптическом диапазоне $400 \leq \lambda \leq 780$ нм на временных задержках t от 20 фс до 200 пс. Экспериментальная установка и методика измерений были описаны ранее [25]. Возбуждение BoWSCP осуществлялось фемтосекундными лазерными импульсами с максимумами на длинах волн 430 нм (длительность — 40 фс, энергия — 20 нДж) и 670 нм (длительность — 16 фс, энергия — 15 нДж). Зондирование обеспечивалось широкополосными импульсами суперконтинуума при углах поляризации 0; 54,7 и 90 градусов относительно поляризации возбуждающего импульса. Разностные спектры поглощения в диапазоне 400–780 нм снимали с помощью ПЗС-камеры SPEC-10 («Roper Scientific», США), соединенной с полихроматором SP-300 («Acton», США). Эксперименты проводились при температуре 6 °C в проточной оптической ячейке (толщина — 0,5 мм; диаметр оптических окон — 0,2 мм; оптическая плотность образца — 10 см⁻¹). Скорость циркуляции в проточной ячейке (9 мл/мин) была достаточно высокой, чтобы избежать многократного возбуждения одного и того же объема пробы. Спектры корректировались дисперсией групповой задержки, как описано ранее [26, 27]. Учет когерентного артефакта и деконволюции аппаратной функции в области $t = 0$ проводился по методике, предложенной в работах Dobryakov et al. [26, 28]. Для этого абсорбционные изменения, вызванные нелинейными взаимодействиями в области перекрытия возбуждающего и зондирующего импульсов (когерентный спайк), аппроксимировались базовой гауссовой функцией:

$$G(t) = 1/\sqrt{2\pi d^2} \exp[-1/2(t/d)^2] \quad (1)$$

и ее производными по времени G' и G'' , где ширина возбуждающего импульса d находилась моделированием абсорбционных изменений чистого растворителя [29]. Сигнал, обусловленный изменением электронных состояний пигментов, аппроксимировался сверткой базовой гауссовой функции $G(t)$ и ступенчатой функции Хевисайда $H(t)$:

$$\chi(t) = G(t) * H(t) = 1/2 \operatorname{Erfc}[-t/\sqrt{2\pi d^2}], \quad (2)$$

а также свертками $G(t)$ и экспоненциальных функций:

$$\begin{aligned} \varepsilon(t, \tau_k) &= G(t) * \exp(-t/\tau_k) = \\ &= 1/2 \exp[1/2(d/\tau_k)^2 - t/\tau_k] \operatorname{Erfc}[(d/\tau_k - t/d)/\sqrt{2}], \end{aligned} \quad (3)$$

амплитуды $A_k(\lambda_i)$ которых находились линейной регрессией, а характерные времена τ_k определялись методом нелинейной минимизации.

Математический анализ абсорбционной динамики включал разложение спектрально-временных матриц $\Delta A(\lambda_i, t_m)$ на линейную комбинацию n дискретных экспоненциальных функций:

$$Q[\tau](\lambda, t) = \sum_{k=1}^n D_k(\lambda) \cdot \exp(-t/\tau_k) + D_{n+1}(\lambda) \quad (4)$$

в предположении, что характерные времена $\tau = \{\tau_k\}$ не зависят от длины волны наблюдения λ и, следовательно, могут рассматриваться как «глобальные» параметры, определяемые нелинейной минимизацией нормированной суммы квадратов невязок:

$$\begin{aligned} R[\tau] &= (L \cdot M - n)^{-1} \sum_{l=1}^L \sum_{m=1}^M [\Delta A(\lambda_l, t_m) - \\ &- Q[\tau](\lambda_l, t_m)]^2. \end{aligned} \quad (5)$$

Зависящие от длины волны предэкспоненциальные амплитуды $D_k(\lambda)$, рассчитываемые стандартным методом линейной регрессии для каждой экспоненциальной функции k , определяют спектры, связанные с распадом (Decay-Associated Spectra, DAS), одновременно рассчитывается финальный спектр $D_{n+1}(\lambda)$. После того как найдены оптимальные значения $\{\tau_k\}$ характерных времен, стандартную ошибку их определения можно оценить с помощью матрицы Якоби J :

$$J_{jk} = \frac{\delta Q_j[\tau]}{\delta \tau_k}, \quad (6)$$

где индекс j пробегает $L \times M$ экспериментальных точек спектрально-временной матрицы $\Delta A(\lambda_i, t_m)$ [30]. Численную оценку якобиана

можно получить, разложив выражение $Q_j[\tau]$ в ряд Тейлора до первого порядка:

$$\frac{\delta Q_j[\tau]}{\delta \tau_k} \approx \frac{Q_j[\tau + \Delta \tau e_k] - Q_j[\tau - \Delta \tau e_k]}{2\Delta \tau_k}, \quad (7)$$

где τ — набор оптимальных значений $\{\tau_k\}$ характерных времен, e_k — k -й единичный вектор, а $\Delta \tau$ — небольшое приращение τ (для числовой оценки использовалось значение $0,015\tau$). Стандартные ошибки σ_k определения характерных времен можно получить из диагональных элементов ковариационной матрицы $C = R[\tau] \times (J^T J)^{-1}$:

$$\sigma_k = \sqrt{C_{kk}}. \quad (8)$$

Значения σ_k представляют собой стандартные отклонения, характеризующие неопределенность оценок $\{\tau_k\}$. Согласно t -распределению Стьюдента, 95%-ная достоверность получается при удвоении стандартных отклонений; соответственно, доверительные интервалы равны $\tau_k \pm 2\sigma_k$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Следуя методу, предложенному в работе Hughes et al. [20], пигментный состав полученных препаратов холоформ BoWSCP был определен с помощью разложения его спектра поглощения в области полосы Core (360–500 нм) на относительные вклады Хл a и Хл b с использованием спектров поглощения индивидуальных пигментов в 90%-ном ацетоне [31]. На рис. 1, a проведено сопоставление спектра поглощения BoWSCP со спектрами Хл a и b . В спектре поглощения свободного Хл a полосы поглощения Core и Q_y с максимумами около 430 и 663 нм имеют близкую амплитуду; в спектре Хл b эти полосы сближены и располагаются соответственно при 458 и 645 нм, при этом амплитуда полосы Core увеличена, а полосы Q_y — уменьшена относительно полос Хл a . Присутствие Хл b в спектре BoWSCP выявляется по небольшому плечу в области 470 нм, тогда как поглощение в интервале 380–430 нм обусловлено преимущественно Хл a . Сравнение спектров BoWSCP и свободного Хл a демонстрирует существенный эффект белкового окружения в области 360–450 нм: во-первых, полосы Хл a сдвинуты в красную область на ~8 нм, во-вторых, интенсивности двух основных переходов Хл a в области полосы Core (полоса B_x с максимумом на длине волны 430 нм соответствует переходу $S_0 \rightarrow S_3$, полоса B_y с максимумом на длине вол-

ны 380 нм соответствует переходу $S_0 \rightarrow S_4$ [32]) заметно изменены в пользу полосы с максимумом на ~380 нм. Электронная структура спектра поглощения Хл a в области полосы Core плохо описывается в рамках четырехорбитальной модели, предложенной Gouterman [33], поскольку между возбужденными состояниями B_x и B_y присутствуют состояния не соответствующие четырехорбитальной модели, смешанные с вибранными переходами полосы B_x , в результате энергии и дипольные силы этих состояний зависят от диэлектрического окружения пигмента [32, 34, 35].

Как видно из рис. 1, a , в белковом окружении BoWSCP относительная вероятность перехода $S_0 \rightarrow S_3$ уменьшена, а вероятность перехода $S_0 \rightarrow S_4$ увеличена по сравнению со свойствами свободного Хл a в растворе. По этой причине моделирование спектра поглощения BoWSCP проводилось с помощью эмпирического выражения, представляющего собой сумму модифицированных спектров поглощения Хл a и Хл b и учитывающего перераспределение интенсивности полос Хл a в области 360–500 нм:

$$A(\lambda) = \alpha \cdot A_{Chla}(\lambda - \delta_a) \times \\ \times [1 - \gamma \cdot \tanh((\lambda - \lambda_a) / \Delta)] + \beta \cdot A_{Chlb}(\lambda - \delta_b), \quad (9)$$

где α и β — относительные количества Хл a и Хл b в тетрамере BoWSCP; A_{Chla} и A_{Chlb} — спектры Хл a и Хл b в 90%-ном ацетоне; δ_a и δ_b — сдвиги спектров Хл a и Хл b в BoWSCP относительно их спектров в растворе; эмпирическая функция $\gamma \tanh((\lambda - \lambda_a) / \Delta)$ описывает изменение соотношения интенсивности полос B_x и B_y Хл a в спектральном интервале шириной Δ с центром на длине волны λ_a . Значения указанных параметров, определенные с помощью нелинейной минимизации, составили $\alpha = 89,2\%$; $\beta = 10,8\%$; $\delta_a = 9,2$ нм; $\delta_b = 1,4$ нм; $\gamma = 0,67$; $\lambda_a = 413$ нм; $\Delta = 50$ нм; модельный спектр показан на рис. 1, b тонкой сплошной линией. Относительные вклады Хл a и Хл b получились равными 89% и 11% соответственно. Соотношение пигментов Хл a/b в пропорции 8 : 1 соответствует диапазону значений (6–10) : 1, полученных в разных работах для нативного белка BoWSCP [3].

Поглощение BoWSCP в области полосы Q_y (660–700 нм) обусловлено преимущественно поглощением Хл a , вклад Хл b в этом спектральном интервале незначителен (рис. 1, b). Спектральные свойства BoWSCP определяются молекулярной структурой пигмент-белкового комплекса: четыре идентичных субъединицы образуют тетрамер, в котором три

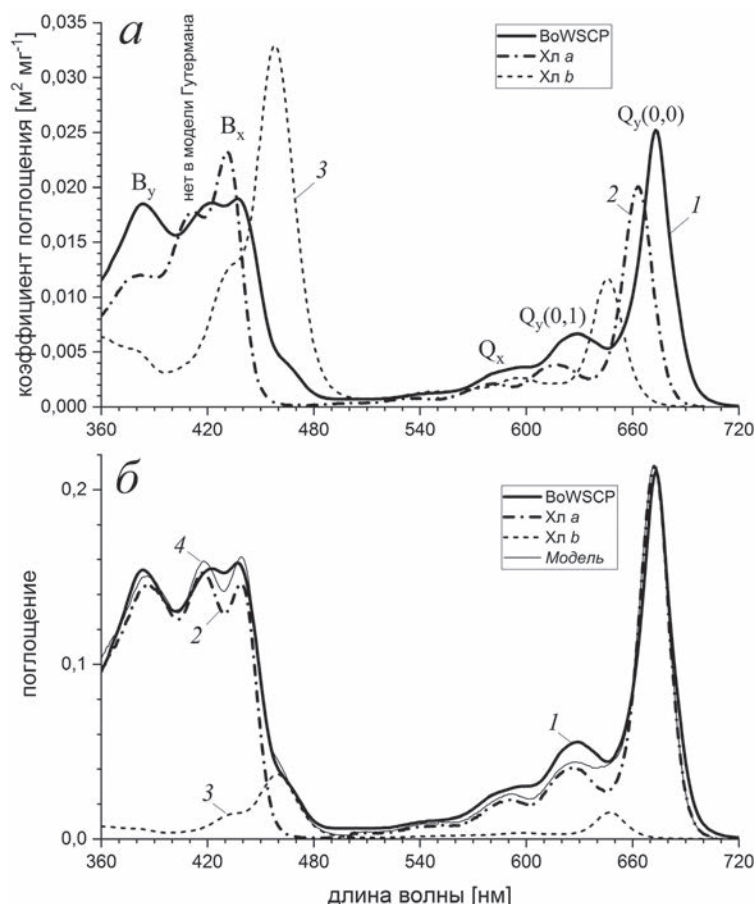


Рис. 1. Определение вкладов Хл *a* и Хл *b* в спектр поглощения BoWSCP. *a* – Сравнение спектра поглощения холо-формы BoWSCP в буферном растворе (1) со спектрами Хл *a* (2) и Хл *b* (3) в 90%-ном ацетоне (взяты из открытой базы спектральных данных [31]). *б* – Моделирование спектра BoWSCP (1) с помощью модифицированного, в соответствии с уравнением (9), спектра Хл *a* (2) и Хл *b* (3). В области 500–720 нм амплитуда спектра Хл *a* увеличена на 15%. Относительные вклады Хл *a* и Хл *b* в модельный спектр (4) составляют 89% и 11% соответственно

взаимно ортогональных оси симметрии вращения $C_2(X)$ $C_2(Y)$ $C_2(Z)$ задают систему координат XYZ [18]. Четыре молекулы хлорофилла, находящиеся в гидрофобном локусе, объединены в двойной димер: взаимодействие между димерами существенно слабее взаимодействия мономеров внутри димера (рис. 2).

Преобладающим эффектом в области 660–700 нм является экситонное взаимодействие молекул Хл *a* внутри димера, тогда как взаимодействие димеров друг с другом выражено значительно слабее. Форма спектра поглощения BoWSCP в области полосы Q_y (рис. 3, *a*) свидетельствует о наличии двух экситонных полос, максимумы которых при 672 и 684 нм соответствуют минимумам второй производной (рис. 3, *б*) и максимумам четвертой производной (рис. 3, *в*). Следуя методу, предложенному для анализа спектров WSCP [20], параметры экситонного взаимодействия Хл *a* были найдены разложением спектра поглощения BoWSCP в области полосы $Q_y(0,0)$ на гауссовы компоненты. Для корректной

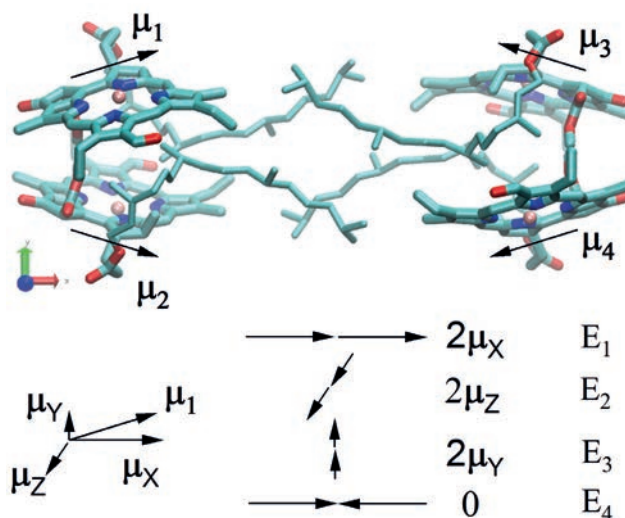


Рис. 2. Расположение молекул хлорофилла в тетрамерном комплексе BoWSCP по данным рентгеновской кристаллографической структуры PDB ID: 6s2z [18], в которой Хл *b* заменен на Хл *a*. Проиллюстрировано направление векторов μ_k (k 1–4) дипольных моментов $S_0 \rightarrow S_1$ перехода мономеров Хл, а также дипольных моментов четырех экситонных состояний E_n тетрамерного комплекса

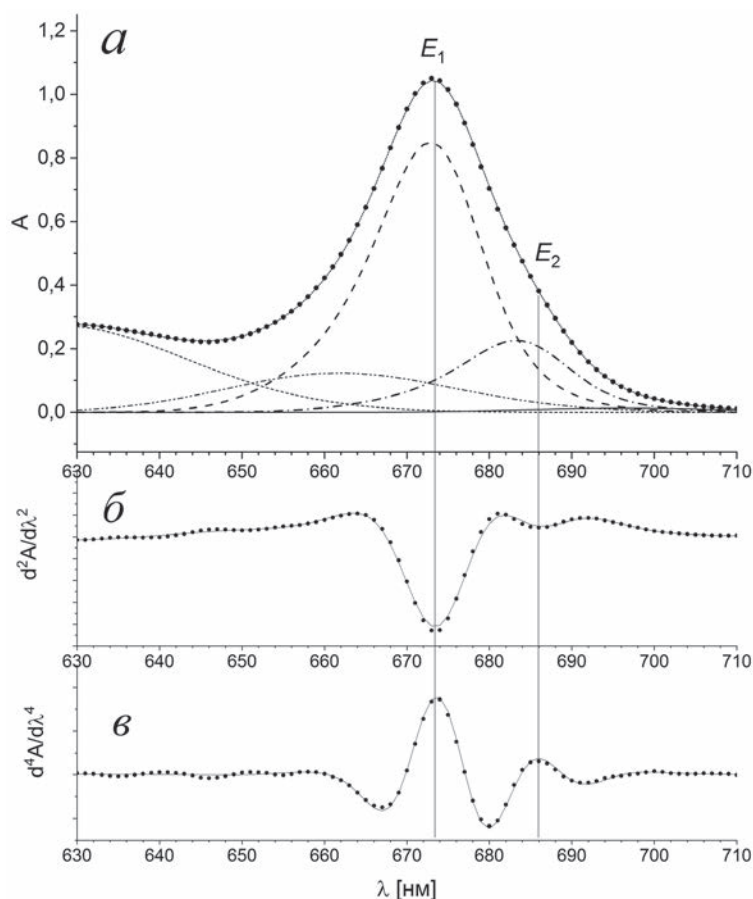


Рис. 3. Спектр поглощения (*a*), его вторая (*б*) и четвертая (*в*) производные холоформы BoWSCP (точки). Сплошными линиями представлен модельный спектр, его основные гауссовские компоненты показаны пунктирными линиями. Вертикальным пунктиром отмечены положения максимумов четвертой производной спектра поглощения

аппроксимации полосы $Q_y(0,0)$ с учетом внутримолекулярных колебательных мод тетрапирольного макроцикла Хл использовались дополнительные гауссовы компоненты в высокоэнергетической области полосы $Q_y(0,0)$ [20, 36, 37]. Относительная интенсивность основной полосы E_1 с максимумом на длине волны 672 нм составила 79%, вклад второй полосы E_2 с максимумом на длине волны 684 нм — ~21%, спектральные характеристики состояния E_3 определить не удалось, состояние E_4 в приближении точечных диполей имеет нулевую интенсивность.

Методом широкополосной фемтосекундной спектроскопии «возбуждение-зондирование» была измерена абсорбционная динамика холоформы BoWSCP, индуцированная возбуждением в области длин волн 430 и 670 нм. Возбуждение в этих спектральных областях связано преимущественно с Хл *a* (квантовый выход >98%) и лишь в малой степени — с Хл *b* (<2%). На рис. 4 приведены абсорбционные изменения в фемтосекундном временном диапазоне на длинах волн 450 нм (*a*) и

670 нм (*б*), индуцированные импульсом 670 нм длительностью 16 фс (толстые сплошные линии). Когерентный артефакт был аппроксимирован суперпозицией гауссовой функции $G(t)$ (уравнение (1)) и ее производных G' и G'' с параметром d , равным 24 фс (пунктирные линии), а абсорбционные изменения BoWSCP — комбинацией функций $\chi(t)$ и $\varepsilon(t, \tau_k)$, задаваемых уравнениями (2) и (3) (штрихпунктирные линии). Абсорбционные изменения BoWSCP, начиная с нулевой временной задержки ($t = 0$), были получены вычитанием когерентного артефакта и деконволюции результирующего сигнала (тонкие сплошные линии).

На рис. 5, *a* приведены переходные спектры при временной задержке 50 фс, индуцированные импульсами 430 нм (1, сплошная линия) и 670 нм (2, штрихпунктирная линия). Возбуждение на длине волны 430 нм связано с переходом Хл преимущественно в третье синглетное возбужденное состояние $S_0 \rightarrow S_3$ (полоса B_x), тогда как при возбуждении на длине волны 670 нм происходило образование состояния S_1 (полоса Q_y). Данную интерпретацию

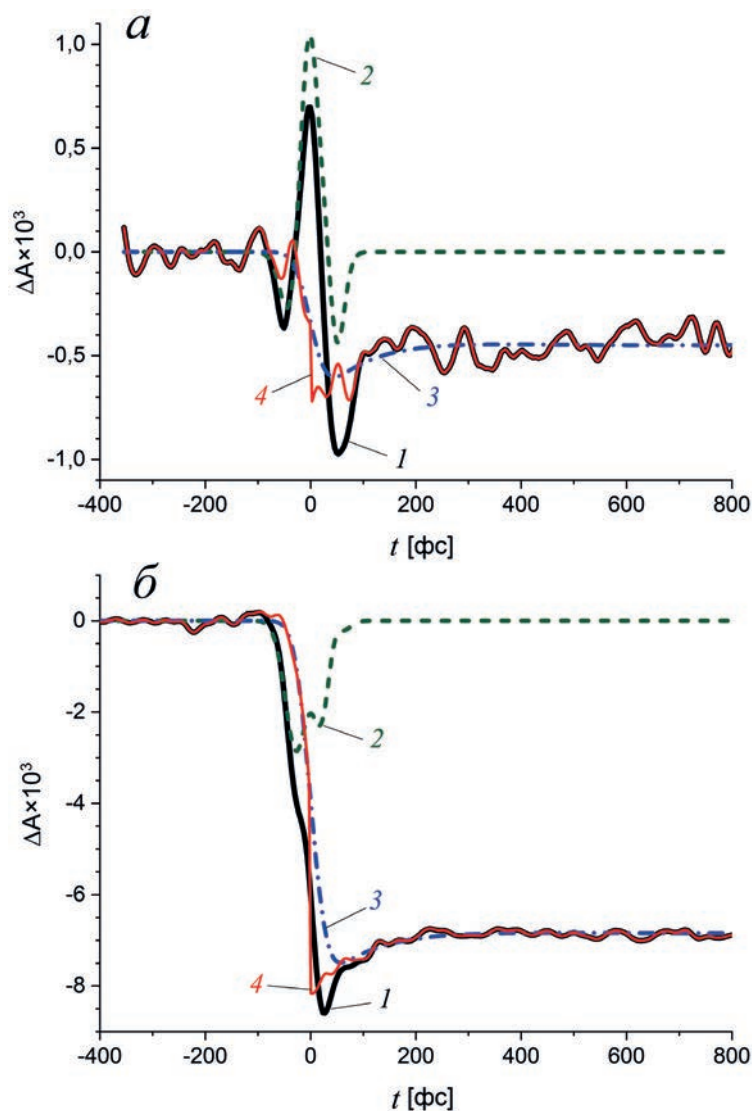


Рис. 4. Абсорбционные изменения VoWSCP на длине волны 450 нм (а) и 670 нм (б), индуцированные импульсом 670 нм длительностью 16 фс (линия 1). Когерентный артефакт был аппроксимирован суперпозицией гауссовой функции $G(t)$ и ее производных G' и G'' , рассчитанных для значения параметра $d = 24$ фс (линия 2), а абсорбционные изменения VoWSCP – комбинацией функций $\chi(t)$ и $\varepsilon(t, \tau_k)$ (линия 3). Абсорбционный отклик VoWSCP с нулевой временной задержкой ($t = 0$) был получен вычитанием когерентного артефакта и деконволюцией результирующего сигнала (линия 4)

подтверждает отрицательный коэффициент анизотропии в области полосы Q_y при возбуждении на длине волны 430 нм, величина которого близка к теоретическому пределу $-0,1$ (вставка на рис. 5, а).

Амплитуда выцветания полосы Q_y в переходных спектрах VoWSCP на рис. 5 в 3–5 раз больше амплитуды выцветания полосы S_{0re} , тогда как в спектре поглощения VoWSCP на рис. 1, а полоса Q_y сравнима по амплитуде с полосой S_{0re} . Переходный спектр, наблюдаемый в фемтосекундных измерениях, представляет собой сумму спектров трех составляющих. Во-первых, это спектр выцветания, появляющийся в результате исчезновения ос-

новного состояния S_0 , его форма соответствует линейному спектру поглощения с отрицательным знаком. Во-вторых, это спектр поглощения возникающего возбужденного состояния S^* , его вклад всегда положительный. В-третьих, это спектр стимулированного излучением обратного перехода $S^* \rightarrow S_0$, для нижнего возбужденного состояния его форма близка спектру спонтанной флуоресценции, а вклад – отрицательный. Основное различие между спектрами (1) и (2) на рис. 5, а наблюдается в области полосы Q_y , где имеет место стимулированное излучение перехода $S_1 \rightarrow S_0$, которое отсутствует на временах жизни состояния S_3 при возбуждении на длине волны 430 нм.

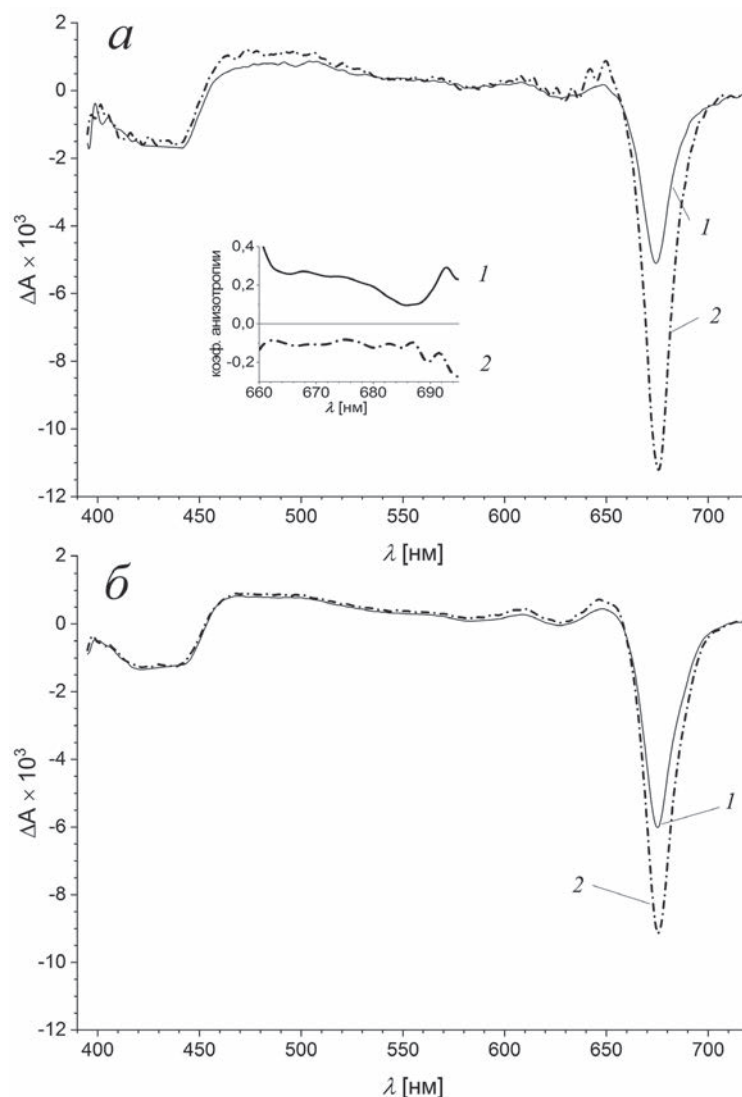


Рис. 5. Переходные спектры BoWSCP на задержках 50 фс (*а*) и 200 пс (*б*), инициированные возбуждением на длинах волн 430 нм (1) и 670 нм (2). Спектры масштабированы по области полосы Core 400–500 нм при задержке 200 пс; угол поляризации – 54,7°. На вставке показан коэффициент анизотропии в области полосы Q_y

Менее значительное различие между спектрами (1) и (2) в области 420–500 нм может быть объяснено стимулированным излучением перехода $S_3 \rightarrow S_0$.

На рис. 5, *б* приведены переходные спектры при временной задержке 200 пс в тех же обозначениях: (1) – возбуждение 430 нм, (2) – 670 нм. В этом временном диапазоне должны завершиться процессы внутримолекулярной конверсии $S_3 \rightarrow S_1$ и установления теплового равновесия в распределении четырех экситонных состояний E_n тетрамерного комплекса. Наблюдаемые финальные спектры близки во всем диапазоне за исключением полосы Q_y , где амплитуда выцветания после возбуждения на длине волны 670 нм значительно превосходит выцветание, индуцированное возбуждением на длине волны 430 нм.

Наиболее значимые абсорбционные изменения BoWSCP связаны с увеличением амплитуды выцветания полосы Q_y после возбуждения на длине волны 430 нм. Его количественные характеристики были определены с помощью разложения абсорбционной динамики на экспоненциальные компоненты, связанные с распадом (DAS, см. раздел «Материалы и методы»); разложение выявило спектральные переходы в диапазоне 100 фс и 10 пс (рис. 6).

На рис. 6, *а* представлены дифференциальные спектры распада для фемтосекундного диапазона. После возбуждения на длине волны 430 нм основные спектральные изменения происходят с характерным временем 83 ± 9 фс, они могут быть приписаны внутримолекулярной безызлучательной конверсии $S_3 \rightarrow S_1$, в результате которой исчезает стимулированное

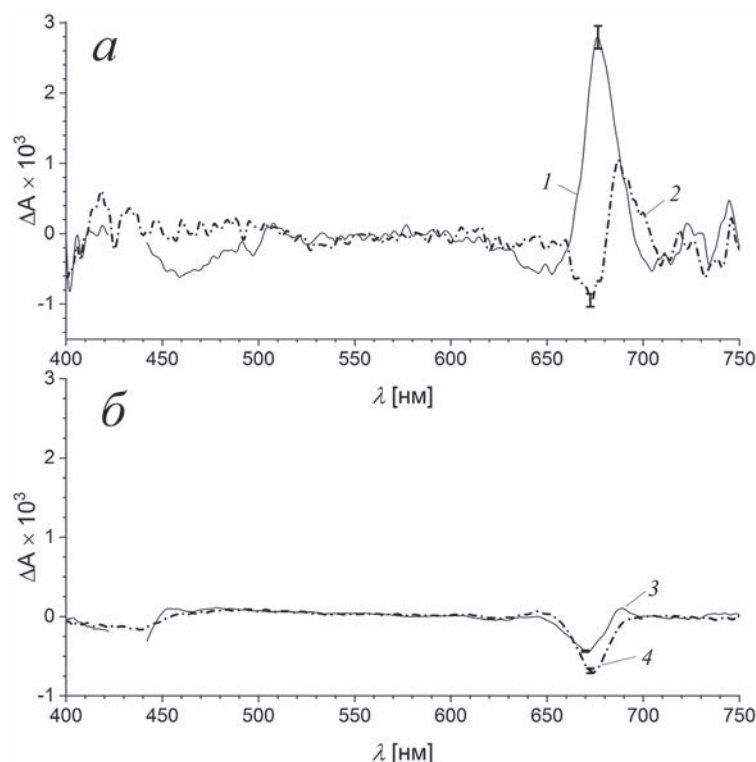


Рис. 6. Ассоциированные с экспоненциальным распадом спектры BoWSCP в диапазоне 100 фс (*а*) и 10 пс (*б*) после возбуждения на длинах волн 430 нм (1, 3) и 670 нм (2, 4). Характерные времена: 1 – 83 фс; 2 – 105 фс; 3 – 19 пс; 4 – 14 пс. Отметки на графиках в области полосы Q_y показывают доверительные интервалы, рассчитанные с помощью уравнения (8)

излучение в области полосы Core (450–480 нм) и появляется стимулированное излучение в области полосы Q_y (670–690 нм). При возбуждении BoWSCP в области полосы Q_y на длине волны 670 нм небольшие спектральные изменения в субпикосекундном диапазоне происходят со временем 105 ± 10 фс, они могут быть отнесены к релаксационному переходу между двумя экситонными уровнями E_1 и E_2 полосы Q_y димера Хл *а*.

В пикосекундном диапазоне значимые изменения поглощения происходят с характерным временем ~ 16 пс. Дифференциальные спектры распада, рассчитанные для возбуждения на длинах волн 430 нм (характерное время 19 ± 3 пс) и 670 нм (характерное время 14 ± 2 пс), близки во всем спектральном диапазоне (рис. 6, *б*) и связаны с незначительным по амплитуде восстановлением поглощения в области полосы Q_y с максимумом около 675 нм. Возможная интерпретация этих изменений будет рассмотрена далее.

Для количественной характеристики фотохимических процессов, наблюдаемых с помощью фемтосекундных измерений в экситонно-сопряженной системе пигментов, было проведено разложение переходных спектров (Transient Absorption, TA) на три составляющих:

выцветание основного состояния (Ground State Bleach, GSB), поглощение возбужденного состояния (Excited State Absorption, ESA) и стимулированное излучение (Stimulated Emission, SE). Вероятность поглощения отдельной молекулой пигмента кванта света энергии $\hbar\omega_0$ пропорциональна квадрату дипольного момента $|\mu|^2$ ее перехода между основным и возбужденным состояниями (дипольной силе перехода). Для мономера Хл *а* в белке дипольный момент перехода $S_0 \rightarrow S_1$ равен 5,5 Д [38]. Импульс накачки переводит в образце ΔN молекул из основного состояния в возбужденное. Пробный импульс разделяется на два пучка: один проходит через невозбужденный образец, другой – через область возбуждения, разница в интенсивности прошедших пучков определяет дифференциальное поглощение. В области возбуждения количество молекул в основном состоянии уменьшено на ΔN , поэтому поглощение на частоте ω_0 в этой области уменьшено на величину, пропорциональную дипольной силе перехода: $\Delta A_{GSB} \propto |\mu|^2$. Одновременно с этим имеет место стимулированное световой волной излучение света при обратном переходе $S_1 \rightarrow S_0$, вероятность которого также пропорциональна квадрату дипольного момента, поэтому поглощение на частоте ω_0 дополнительно

уменьшается на ту же величину $\Delta A_{SE} \propto |\mu|^2$. Для идеальной двухуровневой системы отношение $\beta = \Delta A_{SE}/\Delta A_{GSB}$ равно единице [39]; для Хл *a* в различных растворителях была получена оценка $\beta \approx 0,9$ [40, 41].

Для экситонно-сопряженных пигментов ситуация более сложная. Дипольный момент перехода экситонного комплекса можно представить линейной комбинацией дипольных моментов его мономеров [42]. В кристаллографической структуре BoWSCP [18] дипольные моменты мономеров μ_k ориентированы практически параллельно кристаллографической оси X, а проекции моментов на оси Y и Z много меньше по абсолютной величине [13], и в первом приближении их можно положить равными нулю. Проекция дипольного момента мономера на кристаллографические оси схематически изображены на рис. 2.

При описании взаимодействия световой волны с молекулами Хл в BoWSCP возникает фундаментальный вопрос: является ли возникающее возбужденное состояние локализованным в пределах димера (энергия сопряжения $\sim 100 \text{ см}^{-1}$) или оно делокализовано по всему тетрамерному комплексу (энергия сопряжения $\sim 10 \text{ см}^{-1}$). Данные фемтосекундных измерений позволяют определить степень делокализации возбужденного состояния, то есть количество молекул Хл, эффективно участвующих в экситонном сопряжении.

Для симметричного димера дипольные моменты перехода в два возможных возбужденных состояния E_+ и E_- равны [43]:

$$\mathbf{M}_{\pm} = \frac{1}{\sqrt{2}} (\mu_1 \pm \mu_2). \quad (10)$$

Следует отметить, что экситонное взаимодействие мономеров не меняет суммарную дипольную силу комплекса: $|\mathbf{M}_+|^2 + |\mathbf{M}_-|^2 = \mu_1^2 + \mu_2^2$, поэтому интегральная амплитуда линейного спектра поглощения остается постоянной. В силу геометрии BoWSCP дипольная сила перехода в состояние E_+ равна $|\mathbf{M}_+|^2 \cong \mu_1^2 + \mu_2^2 = 2\mu_1^2$, тогда как дипольная сила перехода в состояние E_- близка к нулю, поэтому при возбуждении BoWSCP широкополосным импульсом с центром на длине волны 670 нм (полуширина — 50 нм, время $\tau = 16 \text{ фс}$) в первоначальном распределении возникающих экситонных состояний существенно преобладает состояние E_+ . В этом случае суммарная амплитуда выцветания ΔA_{BL} начального переходного спектра вблизи полосы экситонного расщепления на частоте ω_0 :

$$\Delta A_{BL} = \Delta A_{GSB} + \Delta A_{SE} \propto (1 + \beta) 2\mu_1^2 \approx 4\mu_1^2. \quad (11)$$

В остальной части спектрального диапазона выцветание основного состояния пропорционально дипольной силе свободного мономера:

$$\Delta A_{GSB}(\omega) \propto \mu_1^2. \quad (12)$$

Для симметричного тетрамера дипольные моменты перехода в четыре возможных экситонных состояния находятся унитарным преобразованием [42], момент с наибольшей амплитудой равен:

$$\mathbf{M}_1 = \frac{1}{2}(\mu_1 + \mu_2 - \mu_3 - \mu_4). \quad (13)$$

В этом случае суммарная амплитуда выцветания переходного спектра вблизи полосы экситонного расщепления:

$$\Delta A_{BL} \propto 8\mu_1^2. \quad (14)$$

В целом количество экситонно-сопряженных молекул n_{excited} , между которыми делокализовано возбужденное состояние, возможно определить по отношению суммарной амплитуды выцветания переходного спектра на частоте экситонного перехода ω_0 и амплитуды линейного спектра, который не учитывает селективный характер возбуждения экситонного комплекса:

$$n_{\text{excited}} = \frac{1}{2} \Delta A_{BL} / \Delta A_{GSB}. \quad (15)$$

При возбуждении BoWSCP в области 670 нм амплитуду выцветания основного состояния ΔA_{GSB} можно определить по полосе Core. На рис. 7 точками показаны переходные спектры BoWSCP при временной задержке 50 фс после возбуждения на длинах волн 430 нм (а) и 670 нм (б).

В области 400–500 нм переходные спектры (1) близки по форме к спектру поглощения BoWSCP (2) за исключением области 450–480 нм, где преобладает поглощение Хл *b* и стимулированное излучение Хл *a* из состояния S_3 . Предполагая, что спектры поглощения возбужденных состояний S_1 и S_3 являются гладкими функциями в указанном интервале длин волн и могут быть корректно описаны полиномами $P_3(\lambda)$ третьей степени, переходные спектры были аппроксимированы выражением:

$$\Delta A_{TA}(\lambda) = \xi \cdot \Delta A_{GSB}(\lambda) + P_3(\lambda), \quad (16)$$

в котором масштабирующий множитель ξ и коэффициенты кубического полинома P_3 находились стандартным решением задачи линейной регрессии. Спектры поглощения

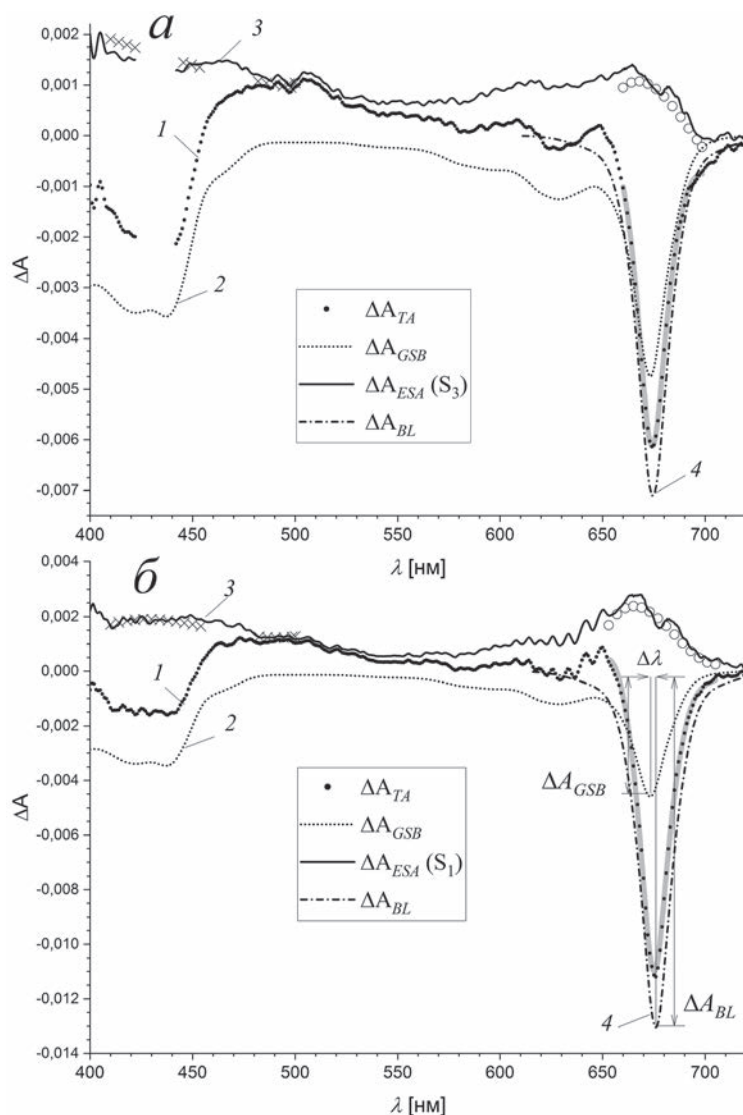


Рис. 7. Разложение переходных спектров поглощения BoWSCP (1 – Transient Absorption, TA) на компоненты выцветания основного состояния (2 – Ground State Bleaching, GSB), поглощения возбужденного состояния (3 – Excited State Absorption, ESA) и выцветания в области стимулированного излучения (4 – Bleach, BL). Переходные спектры получены при задержке 50 фс после возбуждения на длинах волн 430 нм (а) и 670 нм (б). Нормировка спектра выцветания (2) проводилась по переходному спектру (1) в области 400–500 нм с учетом аппроксимации спектра возбужденного состояния кубической полиномиальной функцией (×). Модельный спектр выцветания в области стимулированного излучения (4) в диапазоне 650–700 нм был представлен суммой $\Delta A_{BL} = n_{excited} \cdot (\Delta A_{GSB} + \Delta A_{SE})$ линейного спектра поглощения и его зеркального отражения относительно максимума полосы поглощения Q_y и сдвига Стокса $\Delta\lambda$. Относительная амплитуда модельного спектра $n_{excited}$ находилась линейной регрессией с помощью полиномиальной аппроксимации спектра возбужденного состояния (○). Утолщенная серая линия представляет результат данного разложения

возбужденных состояний в области, где отсутствует стимулированное излучение, находятся как разность $\Delta A_{ESA}(\lambda) = \Delta A_{TA}(\lambda) - \xi \cdot \Delta A_{GSB}(\lambda)$. На рис. 7 показаны полученные таким образом спектры выцветания основного состояния (2), полиномиальные функции P_3 (×) и спектры поглощения возбужденных состояний (3).

Модельный спектр выцветания (4) вблизи полосы Q_y был представлен суммой линейного спектра поглощения, взятого с обратным знаком $\Delta A_{GSB}(\lambda)$, и его зеркального отражения относительно максимума полосы Q_y $\Delta A_{SE}(\lambda)$.

Поскольку положение 0-0-перехода оставалось неизвестным, величину сдвига Стокса $\Delta\lambda$ спектра стимулированного излучения находили нелинейной минимизацией суммарного модельного спектра:

$$\Delta A_{TA}(\lambda) = n_{excited} \cdot \xi \cdot [\Delta A_{GSB}(\lambda) + \Delta A_{GSB}(\lambda_0 + \Delta\lambda - \lambda)] + P_3(\lambda). \quad (17)$$

Эффективное число экситонно-сопряженных молекул $n_{excited}$ и коэффициенты полиномиальной функции P_3 находились линейной

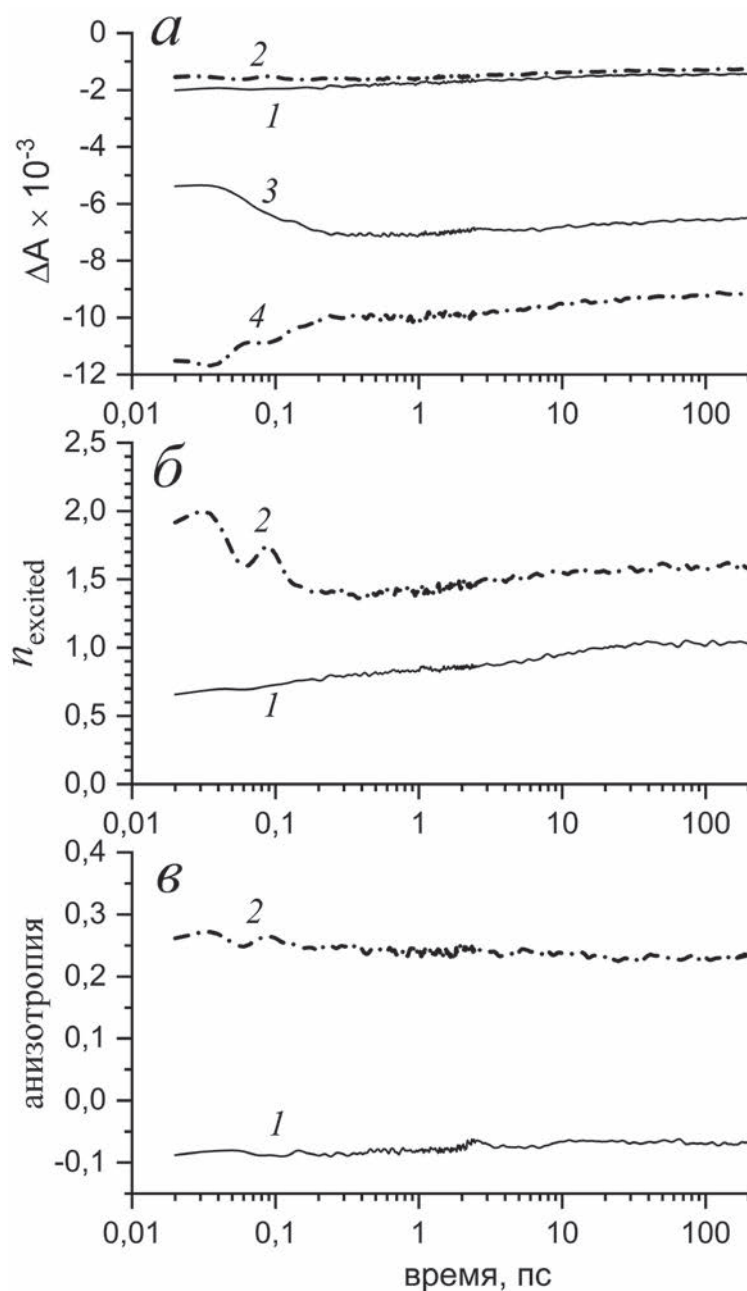


Рис. 8. Изменение во времени основных параметров, характеризующих возбужденное состояние тетрамерного комплекса BoWSCP. *а* – Амплитуда выцветания полосы Soret (1, 2) и полосы Q_y (3, 4) после возбуждения на 430 нм (1, 3) и 670 нм (2, 4). *б* – Эффективное число экситонно-сопряженных молекул Хл, рассчитанное по уравнению (15) при возбуждении на 430 нм (1) и 670 нм (2). *в* – Коэффициент анизотропии, рассчитанный в области полосы Q_y при возбуждении на 430 нм (1) и 670 нм (2)

регрессией. Серая утолщенная линия на рис. 7 представляет результат данного разложения. При возбуждении на длине волны 430 нм наблюдаемая амплитуда выцветания ΔA_{BL} полосы Q_y лишь незначительно превышает амплитуду выцветания основного состояния ΔA_{GSB} , тогда как при возбуждении на длине волны 670 нм амплитуда ΔA_{BL} вдвое превышает амплитуду ΔA_{GSB} .

На рис. 8, *а* показана временная зависимость амплитуды выцветания полосы Soret (1, 2)

и полосы Q_y (3, 4), инициированная возбуждением BoWSCP на длинах волн 430 нм (сплошные кривые) и 670 нм (штрихпунктирные кривые). Изменение поглощения во временном диапазоне 100 фс при возбуждении на длине волны 430 нм (3) отражает появление стимулированного излучения в результате электронного перехода $S_3 \rightarrow S_1$, его характерное время составляет 80 фс. Как было отмечено выше, амплитуда выцветания полосы Q_y после возбуждения в области 430 нм остается во всем

временном интервале существенно меньше амплитуды выцветания этой полосы после возбуждения в области 670 нм. Другой особенностью является высокая амплитуда выцветания полосы Q_y после возбуждения на длине волны 670 нм во всем временном интервале: его амплитуда втрое превышает амплитуду выцветания полосы S_{0e} .

На рис. 8, б показано изменение во времени эффективного числа экситонно-сопряженных молекул Хл, между которыми делокализовано возбужденное состояние тетрамера, рассчитанного по уравнению (15), для двух вариантов возбуждения BoWSCP. На коротких задержках при возбуждении на длине волны 670 нм коэффициент n_{excited} приближается к 2, то есть комплекс BoWSCP ведет себя как экситонно-сопряженный димер. При возбуждении на длине волны 430 нм на коротких задержках коэффициент n_{excited} приближается к 0,5. Как было отмечено ранее, это свидетельствует о преобладании возбужденного состояния S_3 в данных условиях.

Наконец, на рис. 8, в приведено изменение коэффициента анизотропии, $r = (\Delta A_{\parallel} - \Delta A_{\perp}) / (\Delta A_{\parallel} + 2\Delta A_{\perp})$, рассчитанного в области полосы Q_y для двух вариантов возбуждения. Изменение амплитуды выцветания полосы Q_y на временах ~ 100 фс практически не связано с изменением анизотропии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белки класса WSCP представляют собой уникальную по организации модельную систему экситонно-сопряженных молекул хлорофилла [11], с помощью которой возможно исследовать механизмы переноса энергии возбуждения между пигментами [12–14] и взаимодействие возбужденных пигментов с белковым окружением [15–17]. Обмен энергией между электронной подсистемой и колебательными движениями ядер приводит к эволюции электронных состояний [44, 45]. Эффективность энергетического обмена экситона с фононными модами зависит от спектральной плотности колебательных состояний ядер, для экспериментального определения которой используют методы выжигания спектрального провала [46–48] и нестационарной флуоресцентной спектроскопии [10]. Вибронные полосы Хл *a* включают более 40 мод в диапазоне от 1500 до 260 см^{-1} [49–51]. Величина электронного взаимодействия ближайших молекул Хл *a* в тетрамере BoWSCP, полученная совместным разложением спектров поглощения и кругового

дихроизма, составляет $\sim 100 \text{ см}^{-1}$ [20], что позволяет рассматривать делокализованные возбужденные состояния пигментов в терминах теории экситонов [42]. Величина экситонного взаимодействия димеров в тетрамере WSCP, рассчитанная на основе рентгеновской структуры комплекса, составляет всего 10 см^{-1} [13], что позволяет описывать перенос энергии между димерами в рамках теории Förster [52].

Измерение абсорбционной динамики белков WSCP подклассов IIa (BoWSCP, из *Brassica oleracea*) и IIb (LvWSCP, из *Lepidium virginicum*) в фемтосекундном диапазоне проводилось ранее в области полосы Q_y методом двухимпульсной спектроскопии «возбуждение-зондирование» [14] и методом четырехимпульсной 2D-спектроскопии [12, 13]. В работе Theiss et al. [14] измерялись абсорбционные изменения комплекса BoWSCP, содержащего 20–30% Хл *b*, в этой системе был зарегистрирован перенос возбуждения от Хл *b* к Хл *a* с характерным временем 400 фс. Данный процесс был отнесен авторами к экситонной релаксации гетеродимера Chl *a*–Chl *b*, но позднее в работе Alster et al. [12] было показано, что экситонная релаксация гетеродимера происходит быстрее 100 фс, а процессы со временем 250–400 фс относятся к переносу энергии между димерами. В работе Fresch et al. [13] методом 2D-спектроскопии изучалась абсорбционная динамика гомотетрамеров LvWSCP и BoWSCP, содержащих 100% Хл *a*. В обеих системах в субпикосекундном диапазоне наблюдалась моноэкспоненциальная абсорбционная динамика со временем 70 и 100 фс соответственно, которая была интерпретирована как релаксационный переход $E_1 \rightarrow E_2$ в нижнее экситонное состояние [13]. Расчеты в рамках модифицированной теории Редфилда предсказывают, что установление равновесия между экситонными состояниями должно происходить в этом временном диапазоне [15]. Спектральный переход со временем 110 фс, наблюдаемый при возбуждении BoWSCP импульсом 670 нм (рис. 6, а; спектр 2), хорошо соответствует полученным ранее данным.

В данной работе впервые проведены измерения абсорбционной динамики тетрамерного комплекса Хл *a* в широком спектральном диапазоне 400–750 нм с временным разрешением 20 фс, что позволило в одной экспериментальной системе зарегистрировать процессы внутримолекулярной конверсии Хл *a* из возбужденного состояния S_3 в состояние S_1 , проанализировать релаксационную динамику экситонно-сопряженных молекул Хл *a* и количественно характеризовать распределение

экситонных состояний E_1 и E_2 , относящихся к возбужденному состоянию S_1 димера Хл *a*.

Количественное сопоставление абсорбционной динамики в областях *Core* и полосы Q_y требуется для интерпретации данных, полученных при изучении больших фотосинтетических комплексов. Например, амплитуда выцветания Хл *a* в области полосы Q_y в начальных переходных спектрах фотосистемы I цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus* при возбуждении в дальней красной области [53], а также Хл *a* и Хл *f* в аналогичных спектрах фотосистемы I цианобактерии *Fischerella thermalis* PCC 7521 [54] в 3–6 раз превышает амплитуду выцветания полосы *Core*, тогда как в аналогичных спектрах фотосистемы I цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 амплитуда выцветания полосы Q_y лишь незначительно превышает амплитуду полосы *Core* [55]. Van Stokkum et al. [56] предположили, что завышенная амплитуда полосы Q_y в начальных спектрах фотосистемы I свидетельствует о тушении большей части возбужденных состояний окисленным хлорофиллом специальной пары. Однако фотособирающие антенные комплексы фотосистемы I цианобактерий *T. elongatus* и *F. thermalis* PCC 7521, в отличие от антенны *Synechocystis* sp. PCC 6803, содержат экситонно-сопряженные димеры и тримеры Хл с максимумом поглощения в дальней красной области [57–60]. Результаты, полученные в данной работе о влиянии экситонного сопряжения на амплитуду выцветания полосы Q_y (рис. 8), позволяют объяснить наблюдаемые эффекты структурными особенностями фотособирающих антенных комплексов.

Из представленных на рис. 8 зависимостей амплитуды выцветания полосы *Core* и полосы Q_y , а также фактора n_{excited} , представляющего собой оценку количества экситонно-сопряженных молекул Хл, следует несколько выводов о физико-химических свойствах возбужденных состояний BoWSCP.

1. При возбуждении BoWSCP в области Q_y образуется преимущественно верхнее экситонное состояние E_1 с максимумом около 672 нм. Тепловое равновесие между состоянием E_1 и более низким по энергии возбуждения состоянием E_2 (максимум около 684 нм) устанавливается с характерным временем $\tau_1 = 105 \pm 10$ фс; однако состояние E_1 остается преобладающим на временах сотен пикосекунд (его относительный вклад уменьшается до ~80%). Инверсию заселенности можно объяснить существенным вкладом энтропии в разницу свободных энергий состояний E_1 и E_2 . Это, в свою очередь, означает сильное электронное

взаимодействие мономеров в BoWSCP, возникающее при существенном перекрывании волновых функций возбужденных состояний. В подобных димерах возникают резонансные состояния с переносом заряда, поэтому для них характерна высокая энергия электрон-фононного сопряжения [61, 62].

2. При возбуждении BoWSCP в области полосы *Core* образуется преимущественно электронное состояние S_3 (обозначаемое так же, как B_x), которое переходит в состояние S_1 в процессе внутримолекулярной конверсии с характерным временем 83 ± 9 фс. Однако стимулированное излучение в этом состоянии характеризуется примерно вдвое меньшей амплитудой в сравнении с равновесным состоянием, образующимся после возбуждения на 670 нм. Уменьшение амплитуды стимулированного излучения может возникать в результате сверхбыстрой фотохимической реакции окисления Хл и восстановления одного из остатков триптофана, которая конкурирует с реакцией внутримолекулярной конверсии. В этом случае обратная реакция рекомбинации ион-радикальной пары Chl^+Trp^- может происходить медленнее 200 пс. Реакция фотовосстановления триптофана $\text{Chl}^* \rightarrow \text{Chl}^+\text{Trp}^-$ была зарегистрирована при исследовании LvWSCP методами спектроскопии выжигания провалов при температуре 4 К в часовом временном интервале с малым квантовым выходом [47]. Можно предположить, что спектральные изменения с характерным временем $\tau_2 = 16 \pm 3$ пс (рис. 6, б) могут возникать в результате ускорения данной фотохимической реакции при температуре 279 К.

3. Увеличение амплитуды выцветания полосы Q_y относительно полосы *Core* наблюдалось в переходных спектрах фотосистемы I различных цианобактерий при специфическом возбуждении длинноволновых форм хлорофилла [53, 54, 63]. Возникновение длинноволновых форм хлорофилла в светособирающей фотосинтетической антенне и реакционном центре фотосистемы I связано с образованием димерных и тримерных экситонно-сопряженных комплексов [60, 64, 65], что имеет очевидную структурную аналогию с организацией молекул хлорофилла в комплексе WSCP.

Вклад авторов. Д.А. Черепанов — анализ результатов спектральных измерений; К.В. Неверов, Ю.Н. Обухов, Ю.В. Малеева — производство, выделение и биохимическая характеристика препаратов BoWSCP; Ф.Е. Гостев, И.В. Шелаев, А.В. Айбуш — разработка математического аппарата, методики и проведение

фемтосекундных измерений; М.С. Крицкий, В.А. Надточенко — концепция работы. Все авторы внесли значительный вклад в написание рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20155).

Благодарности. Авторы благодарят А.Л. Добрякова за помощь в разработке метода аппроксимации когерентного артефакта и установления аппаратной функции фемтосекундной установки. В работе использовано оборудование (фемтосекундная установка) Центра коллективного пользования ФИЦ ХФ РАН «Анализ химических, биологических систем и

природных материалов: масс-спектральная микроскопия и фемтосекундная лазерная микроскопия-спектроскопия» (рег. номер: 506694). Экспрессионный вектор pET-24b со встроенным геном белка WoWSCP был любезно предоставлен проф. Харальдом Паульсеном (Институт молекулярной физиологии Университета Иоганна Гутенберга, Майнц, Германия).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Charlton, A., and Zachariou, M. (2007) Immobilized metal ion affinity chromatography of histidine-tagged fusion proteins, *Methods Mol. Biol.*, **421**, 137-149, doi: 10.1007/978-1-59745-582-4_10.
2. Cherepanov, D. A., Semenov, A. Y., Mamedov, M. D., Aybush, A. V., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., Shuvalov, V. A., and Nadtochenko, V. A. (2022) Current state of the primary charge separation mechanism in photosystem I of cyanobacteria, *Biophys. Rev.*, **14**, 805-820, doi: 10.1007/s12551-022-00983-1.
3. Murata, T., Toda, F., Uchino, K., and Yakushiji, E. (1971) Water-soluble chlorophyll protein of *Brassica oleracea* var. botrys (cauliflower), *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **245**, 208-215, doi: 10.1016/0005-2728(71)90023-5.
4. Satoh, H., Nakayama, K., and Okada, M. (1998) Molecular cloning and functional expression of a water-soluble chlorophyll protein, a putative carrier of chlorophyll molecules in cauliflower, *J. Biol. Chem.*, **273**, 30568-30575, doi: 10.1074/jbc.273.46.30568.
5. Takahashi, S., Yanai, H., Nakamaru, Y., Uchida, A., Nakayama, K., and Satoh, H. (2012) Molecular cloning, characterization and analysis of the intracellular localization of a water-soluble chl-binding protein from brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. gemmifera), *Plant Cell Physiol.*, **53**, 879-891, doi: 10.1093/pcp/pcs031.
6. Takahashi, S., Yanai, H., Oka-Takayama, Y., Zanma-Sohtome, A., Fujiyama, K., Uchida, A., Nakayama, K., and Satoh, H. (2013) Molecular cloning, characterization and analysis of the intracellular localization of a water-soluble chlorophyll-binding protein (WSCP) from Virginia pepperweed (*Lepidium virginicum*), a unique WSCP that preferentially binds chlorophyll *b in vitro*, *Planta*, **238**, 1065-1080, doi: 10.1007/s00425-013-1952-7.
7. Satoh, H., Uchida, A., Nakayama, K., and Okada, M. (2001) Water-soluble chlorophyll protein in Brassicaceae plants is a stress-induced chlorophyll-binding protein, *Plant Cell Physiol.*, **42**, 906-911, doi: 10.1093/pcp/pce117.
8. Horigome, D., Satoh, H., Itoh, N., Mitsunaga, K., Oonishi, I., Nakagawa, A., and Uchida, A. (2007) Structural mechanism and photoprotective function of water-soluble chlorophyll-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **282**, 6525-6531, doi: 10.1074/jbc.M609458200.
9. Малеева Ю. В., Неверов К. В., Обухов Ю. Н., Крицкий М. С. (2019) Водорастворимые хлорофиллсвязывающие белки растений: структура, свойства и функции, *Мол. Биол.*, **53**, 998-1011, doi: 10.1134/S0026898419060120.
10. Schmitt, F. J., Trostmann, I., Theiss, C., Pieper, J., Renger, T., Fuesers, J., Hubrich, E. H., Paulsen, H., Eichler, H. J., and Renger, G. (2008) Excited state dynamics in recombinant water-soluble chlorophyll proteins (WSCP) from cauliflower investigated by transient fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 13951-13961, doi: 10.1021/jp8024057.
11. Renger, G., Pieper, J., Theiss, C., Trostmann, I., Paulsen, H., Renger, T., Eichler, H. J., and Schmitt, F. J. (2011) Water soluble chlorophyll binding protein of higher plants: A most suitable model system for basic analyses of pigment-pigment and pigment-protein interactions in chlorophyll protein complexes, *J. Plant Physiol.*, **168**, 1462-1472, doi: 10.1016/j.jplph.2010.12.005.
12. Alster, J., Lokstein, H., Dostál, J., Uchida, A., and Zigmantas, D. (2014) 2D spectroscopy study of water-soluble chlorophyll-binding protein from lepidium virginicum, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 3524-3531, doi: 10.1021/jp411174t.
13. Fresch, E., Meneghin, E., Agostini, A., Paulsen, H., Carbonera, D., and Collini, E. (2020) How the protein environment can tune the energy, the coupling, and

- the ultrafast dynamics of interacting chlorophylls: the example of the water-soluble chlorophyll protein, *J. Phys. Chem. Lett.*, **11**, 1059-1067, doi: 10.1021/acs.jpcclett.9b03628.
14. Theiss, C., Trostmann, I., Andree, S., Schmitt, F. J., Renger, T., Eichler, H. J., Paulsen, H., and Renger, G. (2007) Pigment–pigment and pigment–protein interactions in recombinant water-soluble chlorophyll proteins (WSCP) from cauliflower, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 13325-13335, doi: 10.1021/jp0723968.
 15. Renger, T., Trostmann, I., Theiss, C., Madjet, M. E., Richter, M., Paulsen, H., Eichler, H. J., Knorr, A., and Renger, G. (2007) Refinement of a structural model of a pigment–protein complex by accurate optical line shape theory and experiments, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10487-10501, doi: 10.1021/jp0717241.
 16. Friedl, C., Fedorov, D. G., and Renger, T. (2022) Towards a quantitative description of excitonic couplings in photosynthetic pigment-protein complexes: Quantum chemistry driven multiscale approaches, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **24**, 5014-5038, doi: 10.1039/d1cp03566e.
 17. Lahav, Y., Noy, D., and Schapiro, I. (2021) Spectral tuning of chlorophylls in proteins – electrostatics vs. ring deformation, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **23**, 6544-6551, doi: 10.1039/d0cp06582j.
 18. Agostini, A., Meneghin, E., Gewehr, L., Pedron, D., Palm, D. M., Carbonera, D., Paulsen, H., Jaenicke, E., and Collini, E. (2019) How water-mediated hydrogen bonds affect chlorophyll *a/b* selectivity in water-soluble chlorophyll protein, *Sci. Rep.*, **9**, 1-10, doi: 10.1038/s41598-019-54520-54524.
 19. Bednarczyk, D., Dym, O., Prabakar, V., Peleg, Y., Pike, D. H., and Noy, D. (2016) Fine tuning of chlorophyll spectra by protein-induced ring deformation, *Angew. Chemie Int. Ed.*, **55**, 6901-6905, doi: 10.1002/anie.201512001.
 20. Hughes, J. L., Razeghifard, R., Logue, M., Oakley, A., Wydrzynski, T., and Krausz, E. (2006) Magneto-optic spectroscopy of a protein tetramer binding two exciton-coupled chlorophylls, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3649-3658, doi: 10.1021/ja056576b.
 21. Обухов Ю. Н., Неверов К. В., Малеева Ю. В., Крицкий М. С. (2023) Димеры хлорофилла *a* в составе водорастворимого белка BoWSCP фотосенсибилизируют восстановление цитохрома *c*, *Докл. Акад. Наук*, **509**, 191-195, doi: 10.31857/S2686738922600790.
 22. Takahashi, S., Uchida, A., Nakayama, K., and Satoh, H. (2014) Three-step photoconversion of only three subunits of the water-soluble chlorophyll-binding protein tetramer from *Chenopodium album*, *Protein J.*, **33**, 337-343, doi: 10.1007/s10930-014-9565-y.
 23. Kelly, S. M., Jess, T. J., and Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1751**, 119-139, doi: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
 24. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
 25. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Petrova, A. A., Aybush, A. V., Shuvalov, V. A., Semenov, A. Y., and Nadochenko, V. A. (2017) Mechanism of adiabatic primary electron transfer in photosystem I: Femtosecond spectroscopy upon excitation of reaction center in the far-red edge of the Q Y band, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1858**, 895-905, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.008.
 26. Dobryakov, A. L., Pérez Lustres, J. L., Kovalenko, S. A., and Ernstring, N. P. (2008) Femtosecond transient absorption with chirped pump and supercontinuum probe: Perturbative calculation of transient spectra with general lineshape functions, and simplifications, *Chem. Phys.*, **347**, 127-138, doi: 10.1016/j.chemphys.2007.11.003.
 27. Golubeva, E. N., Zubanova, E. M., Melnikov, M. Y., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., and Nadochenko, V. A. (2014) Femtosecond spectroscopy and TD-DFT calculations of CuCl₄²⁻ excited states, *Dalt. Trans.*, **43**, 17820-17827, doi: 10.1039/C4DT01409J.
 28. Dobryakov, A. L., Kovalenko, S. A., Weigel, A., Pérez Lustres, J. L., Lange, J., Müller, A., and Ernstring, N. P. (2010) Femtosecond pump/supercontinuum-probe spectroscopy: Optimized setup and signal analysis for single-shot spectral referencing, *Rev. Sci. Instrum.*, **81**, 113106, doi: 10.1063/1.3492897.
 29. Kovalenko, S. A., Dobryakov, A. L., Ruthmann, J., and Ernstring, N. P. (1999) Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing, *Phys. Rev. A At. Mol. Opt. Phys.*, **59**, 2369-2384, doi: 10.1103/PhysRevA.59.2369.
 30. Šimůnek, J., and Hopmans, J. W. (2002) 1.7 parameter optimization and nonlinear fitting, *Methods Soil Anal. Part 4 Phys. Methods*, **5**, 139-157, doi: 10.2136/sssabookser5.4.c7.
 31. Clementson, L. A., and Wojtasiewicz, B. (2019) Dataset on the absorption characteristics of extracted phytoplankton pigments, *Data Br.*, **24**, 103875, doi: 10.1016/j.dib.2019.103875.
 32. Sirohiwal, A., Berraud-Pache, R., Neese, F., Izsák, R., and Pantazis, D. A. (2020) Accurate computation of the absorption spectrum of chlorophyll *a* with pair natural orbital coupled cluster methods, *J. Phys. Chem. B*, **124**, 8761-8771, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c05761.
 33. Gouterman, M. (1961) Spectra of porphyrins, *J. Mol. Spectrosc.*, **6**, 138-163, doi: 10.1016/0022-2852(61)90236-3.
 34. Bricker, W. P., Shenai, P. M., Ghosh, A., Liu, Z., Enriquez, M. G. M., Lambrev, P. H., Tan, H. S., Lo, C. S., Tretiak, S., Fernandez-Alberti, S., and Zhao, Y. (2015) Non-radiative relaxation of photoexcited chlorophylls: theoretical and experimental study, *Sci. Rep.*, **5**, 1-16, doi: 10.1038/srep13625.

35. Götze, J. P., Anders, F., Petry, S., Witte, J. F., and Lokstein, H. (2022) Spectral characterization of the main pigments in the plant photosynthetic apparatus by theory and experiment, *Chem. Phys.*, **559**, 111517, doi: 10.1016/j.chemphys.2022.111517.
36. Umetsu, M., Wang, Z. Y., Kobayashi, M., and Nozawa, T. (1999) Interaction of photosynthetic pigments with various organic solvents. Magnetic circular dichroism approach and application to chlorosomes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1410**, 19-31, doi: 10.1016/S0005-2728(98)00170-4.
37. Shipman, L. L., Cotton, T. M., Norris, J. R., and Katz, J. J. (1976) An analysis of the visible absorption spectrum of chlorophyll *a* monomer, dimer, and oligomers in solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 8222-8230, doi: 10.1021/ja00441a056.
38. Черепанов Д. А., Милановский Г. Е., Айбуш А. В., Надточенко В. А. (2023) Дипольный момент перехода S₀→S₁ хлорофилла *a* в растворителях с различным индексом рефракции, *Хим. Физ.*, **42**, 77-78, doi: 10.31857/S0207401X23060031.
39. Berera, R., Van Grondelle, R., and Kennis, J. T. M. (2009) Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems, *Photosynth. Res.*, **101**, 105-118, doi: 10.1007/s11120-009-9454-y.
40. Черепанов Д. А., Гостев Ф. Е., Шелаев И. В., Айбуш А. В., Семенов А. Ю., Мамедов М. Д., Шувалов В. А., Надточенко В. А. (2020) Абсорбционный спектр возбужденного синглетного состояния хлорофилла *a* в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах, *Хим. Выс. Энерг.*, **54**, 158-160, doi: 10.31857/S0023119320020059.
41. Cherepanov, D. A., Petrova, A. A., Mamedov, M. D., Vishnevskaya, A. I., Gostev, F. E., Shelaev, I. V., Aybush, A. V., and Nadochenko, V. A. (2022) Comparative absorption dynamics of the singlet excited states of chlorophylls *a* and *d*, *Biochem.*, **87**, 1179-1186, doi: 10.1134/S000629792210011X.
42. Davydov, A. S. (1962) *The Theory Of Molecular Excitons*, McGraw-Hill, New York, NY.
43. Kasha, M., Rawls, H. R., and El-Bayoumi, M. A. (1965) The exciton model in molecular spectroscopy, *Pure Appl. Chem.*, **11**, 371-392, doi: 10.1351/pac196511030371.
44. Scholes, G. D., and Ghiggino, K. P. (1994) Rate expressions for excitation transfer I. Radiationless transition theory perspective, *J. Chem. Phys.*, **101**, 1251-1261, doi: 10.1063/1.467817.
45. Renger, T., and Marcus, R. A. (2002) On the relation of protein dynamics and exciton relaxation in pigment-protein complexes: an estimation of the spectral density and a theory for the calculation of optical spectra, *J. Chem. Phys.*, **116**, 9997-10019, doi: 10.1063/1.1470200.
46. Pieper, J., Rätsep, M., Trostmann, I., Schmitt, F. J., Theiss, C., Paulsen, H., Eichler, H. J., Freiberg, A., and Renger, G. (2011) Excitonic energy level structure and pigment-protein interactions in the recombinant water-soluble chlorophyll protein. II. Spectral hole-burning experiments, *J. Phys. Chem. B*, **115**, 4053-4065, doi: 10.1021/jp111457t.
47. Kell, A., Bednarczyk, D., Acharya, K., Chen, J., Noy, D., and Jankowiak, R. (2016) New insight into the water-soluble chlorophyll-binding protein from *Lepidium virginicum*, *Photochem. Photobiol.*, **92**, 428-435, doi: 10.1111/php.12581.
48. Adolphs, J., Berrér, M., and Renger, T. (2016) Hole-burning spectroscopy on excitonically coupled pigments in proteins: theory meets experiment, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 2993-3001, doi: 10.1021/jacs.5b08246.
49. Gillie, J. K., Lyle, P. A., Small, G. J., and Golbeck, J. H. (1989) Spectral hole burning of the primary electron donor state of Photosystem I, *Photosynth. Res.*, **22**, 233-246, doi: 10.1007/BF00048302.
50. Pieper, J., Voigt, J., and Small, G. J. (1999) Chlorophyll *a* Franck-Condon factors and excitation energy transfer, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2321-2322, doi: 10.1021/jp984460e.
51. Peternian, E. J. G., Pullerits, T., van Grondelle, R., and van Amerongen, H. (1997) Electron-phonon coupling and vibronic fine structure of light-harvesting complex II of green plants: temperature dependent absorption and high-resolution fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 4448-4457, doi: 10.1021/jp962338e.
52. Förster, T. (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence [in German], *Ann. Phys.*, **437**, 55-75, doi: 10.1002/andp.19484370105.
53. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Aybush, A. V., Mamedov, M. D., Shuvalov, V. A., Semenov, A. Y., and Nadochenko, V. A. (2020) Generation of ion-radical chlorophyll states in the light-harvesting antenna and the reaction center of cyanobacterial photosystem I, *Photosynth. Res.*, **146**, 55-73, doi: 10.1007/s11120-020-00731-0.
54. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Aybush, A. V., Mamedov, M. D., Shen, G., Nadochenko, V. A., Bryant, D. A., Semenov, A. Y., and Golbeck, J. H. (2020) Evidence that chlorophyll *f* functions solely as an antenna pigment in far-red-light photosystem I from *Fischerella thermalis* PCC 7521, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148184.
55. Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Sarkisov, O. M., Nadochenko, V. A., Shuvalov, V. A., and Semenov, A. Y. (2010) Femtosecond primary charge separation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1797**, 1410-1420, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.026.
56. Van Stokkum, I. H. M., Müller, M. G., Weißenborn, J., Weigand, S., Snellenburg, J. J., and Holzwarth, A. R. (2023) Energy transfer and trapping in photosystem I with and without chlorophyll-*f*, *IScience*, **26**, 107650, doi: 10.1016/J.ISCI.2023.107650.

57. Pålsson, L.-O. O., Flemming, C., Gobets, B., van Grondelle, R., Dekker, J. P., and Schlodder, E. (1998) Energy transfer and charge separation in photosystem I: P700 oxidation upon selective excitation of the long-wavelength antenna chlorophylls of *Synechococcus elongatus*, *Biophys. J.*, **74**, 2611-2622, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77967-6.
58. Gobets, B., Kennis, J. T. M., Ihalainen, J. A., Brazzoli, M., Croce, R., Stokkum, I. H. M. van, Bassi, R., Dekker, J. P., van Amerongen, H., Fleming, G. R., and van Grondelle, R. (2001) Excitation energy transfer in dimeric light harvesting complex I: a combined streak-camera/fluorescence upconversion study, *J. Phys. Chem. B*, **105**, 10132-10139, doi: 10.1021/jp011901c.
59. Riley, K. J., Reinot, T., Jankowiak, R., Fromme, P., and Zazubovich, V. (2007) Red antenna states of photosystem I from cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 and *Thermosynechococcus elongatus*: single-complex spectroscopy and spectral hole-burning study, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 286-292, doi: 10.1021/jp062664m.
60. Gisriel, C., Shen, G., Kurashov, V., Ho, M. Y., Zhang, S., Williams, D., Golbeck, J. H., Fromme, P., and Bryant, D. A. (2020) The structure of Photosystem I acclimated to far-red light illuminates an ecologically important acclimation process in photosynthesis, *Sci. Adv.*, **6**, eaay6415, doi: 10.1126/sciadv.aay6415.
61. Young, R. M., and Wasielewski, M. R. (2020) Mixed electronic states in molecular dimers: Connecting singlet fission, excimer formation, and symmetry-breaking charge transfer, *Acc. Chem. Res.*, **53**, 1957-1968, doi: 10.1021/acs.accounts.0c00397.
62. Casanova, D. (2018) Theoretical modeling of singlet fission, *Chem. Rev.*, **118**, 7164-7207, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00601.
63. Petrova, A. A., Casazza, A. P., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Aybush, A. V., Nadtochenko, V. A., Semenov, A. Y., Santabarbara, S., and Cherepanov, D. A. (2023) Role of pheophytin a in the primary charge separation of photosystem I from *Acaryochloris marina*: femtosecond optical studies of excitation energy and electron transfer reactions, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1864**, 148984, doi: 10.1016/j.bbabi.2023.148984.
64. Akhtar, P., and Lambrev, P. H. (2020) On the spectral properties and excitation dynamics of long-wavelength chlorophylls in higher-plant photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148274, doi: 10.1016/J.BBABI.2020.148274.
65. Karapetyan, N. V., Bolychevtseva, Y. V., Yurina, N. P., Terekhova, I. V., Shubin, V. V., and Brecht, M. (2014) Long-wavelength chlorophylls in photosystem I of cyanobacteria: origin, localization, and functions, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 213-220, doi: 10.1134/S0006297914030067.

PHOTOCHEMICAL REACTIONS OF CHLOROPHYLL TETRAMER IN WATER-SOLUBLE CHLOROPHYLL-BINDING PROTEIN BoWSCP

D. A. Cherepanov^{1,2*}, K. V. Neverov^{3,4}, Yu. N. Obukhov³, Yu. V. Maleeva⁴, F. E. Gostev¹, I. V. Shelaev^{1,2}, A. V. Aybush¹, M. S. Kritsky³, and V. A. Nadtochenko^{1,5*}

¹ Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: tscherepanov@gmail.com

² Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

³ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁵ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: nadtochenko@gmail.com

The absorption dynamics of chlorophyll *a* in a symmetric tetrameric complex of the water-soluble chlorophyll-binding protein BoWSCP was measured by the broadband femtosecond laser pump-probe spectroscopy within the range from 400 to 780 nm with a time resolution of 20 f-200 ps. When BoWSCP was excited in the region of the Soret band at a wavelength of 430 nm, a nonradiative intramolecular conversion $S_3 \rightarrow S_1$ was observed with a characteristic time of 83 ± 9 fs. When the complex was excited in the region of the Q_y band at a wavelength of 670 nm, a relaxation transition between two excitonic states of the chlorophyll dimer was observed with a time of 105 ± 10 fs. Absorption spectra of excited singlet states S_1 and S_3 of chlorophyll *a* were obtained. It has been demonstrated that the delocalization of the excited state between exciton-coupled Chl molecules in the BoWSCP tetramer changes in time and depends on the excitation energy. Upon excitation of BoWSCP, an ultrafast photochemical reaction is observed in the Soret region, apparently due to the reduction of tryptophan in the vicinity of chlorophyll.

Keywords: chlorophyll *a*, proteins from the WSCP family, femtosecond laser spectroscopy, excited state spectrum, exciton dynamics, intramolecular conversion

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ СЕТЬ: ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ КАБЕЛЬ И МНОГОЕ ДРУГОЕ

Обзор

© 2023 П.А. Абрамичева¹, Н.В. Андрианова¹, В.А. Бабенко^{1,2}, Л.Д. Зорова^{1,2},
С.Д. Зоров^{1,3}, И.Б. Певзнер^{1,2}, В.А. Попков^{1,2}, Д.С. Семенович¹, Э.И. Якупова¹,
Д.Н. Силачев^{1,2}, Е.Ю. Плотников^{1,2}, Г.Т. Сухих², Д.Б. Зоров^{1,2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119991 Москва, Россия; электронная почта: zorov@belozersky.msu.ru

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России, 117997 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.07.2023

После доработки 20.09.2023

Принята к публикации 22.09.2023

Митохондрии в клетке могут объединяться и организовывать сложные, протяженные структуры, которые пронизывают весь объем клетки, обеспечивая равномерное снабжение энергией в виде синтезируемого в митохондриях АТФ. В соответствии с хемиосмотической концепцией, энергия окисления дыхательных субстратов в значительной степени запасается в виде разности электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий. Теория функционирования протяженных митохондриальных структур как внутриклеточных электрических проводов предполагает, что митохондрии обеспечивают максимально быструю доставку электрической энергии по клеточному объему с последующим использованием этой энергии для синтеза АТФ, тем самым ускоряя процесс доставки АТФ по сравнению с достаточно медленной диффузией АТФ в клетке. В аналитическом обзоре дана история кабельной теории, перечислены нерешенные критические проблемы, описаны перестройки митохондриальной сети и роль окислительного стресса в этом процессе. Кроме уже доказанного функционирования протяженных митохондриальных структур как электрических кабелей, предлагается и ряд дополнительных функций, в частности выдвигается гипотеза поддержания митохондриальными сетями редокс-потенциала в клеточном объеме, который может варьировать в зависимости от физиологического состояния в результате изменения трехмерной организации митохондриальной сети (фрагментация/расщепление – слияние). Рассмотрен ряд патологий, сопровождаемых нарушением редокс-статуса, и участие в них митохондрий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, ретикулум, сеть, электричество, мембранный потенциал, фрагментация, расщепление, кардиомиоциты, сперматозоиды, окислительный стресс, редокс, преэклампсия, задержка роста плода.

DOI: 10.31857/S0320972523100147, EDN: OVONXX

ВВЕДЕНИЕ. ХЕМИОСМОТИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ МИТЧЕЛЛА. РЕШЕННЫЕ И НЕРЕШЕННЫЕ ВОПРОСЫ

Исторически в шестидесятые годы XX века произошел переход от чисто химической концепции окислительного фосфорилирования к хемиосмотической, предусматривающей пространственное разделение и функциональное сопряжение процессов окисления (которое

создает протондвижущую силу) и реализацию этой силы для фосфорилирования ADP, и эта концепция стала доминирующей в биоэнергетике [1–3]. Правда, надо отметить, что все еще идут споры о точности терминологии и о принципах сопряжения. В первом случае не очень ясно, насколько термин «осмотика» имеет отношение к этой концепции, ибо во всем протонном цикле осмотических перестроек не предполагалось. Сам автор этой концепции (П. Митчелл) трактовал «осмотику» в терминах существования топологически

* Адресат для корреспонденции.

замкнутых мембран, названных сопрягающими мембранами, которые представляют собой осмотический барьер для веществ вообще и для протонов в частности и в пределах которых существуют системы транспорта протона, осуществляющие осмотическую стабилизацию и обеспечивающие транспорт метаболитов [4]. Недавнее обнаружение цикла транспорта иона K^+ в митохондриальной мембране, также обеспечивающего синтез АТР [5–9], в большей мере соответствует названию хемиосмотической концепции по причине того, что транспорт ионов калия ввиду его высоких сольватирующих свойств (в отличие от протона) может существенным образом менять осмотические свойства сред по обе стороны сопрягающей мембраны, что неминуемо будет сопровождаться не всегда скомпенсированным транспортом воды из одного в другой объем.

Второй, не всеми признанной, частью концепции Митчелла был постулат, что сопряжение окисления и фосфорилирования происходит за счет первичного переноса протона из одной водной фазы, омывающей сопрягающую мембрану, в водную фазу по другую сторону мембраны с последующим переносом протона из второй фазы в исходную, осуществляя при этом химический синтез АТР в АТР-синтазе, локализованной в мембране [10–13]. Эта часть включала концепцию делокализованного (обводненного) протона в отличие от концепции сопряжения за счет локализованного протона, то есть так же транспортируемого через мембрану без выхода его в водную фазу [14, 15]. При наличии этих двух элементов хемиосмотической концепции, которые могут быть подвергнуты некоторой критике, есть один момент, который остается незыблемым и основополагающим в этой концепции — это постулирование и доказательство генерации электрического потенциала в сопрягающих мембранах [16]. Из известного набора сопрягающих мембран, включающего в себя клеточные мембраны некоторых аэробных бактерий, мембраны хроматофоров фотосинтезирующих бактерий, тилакоидные мембраны хлоропластов и внутренние мембраны митохондрий, в этом обзоре будут обсуждаться лишь сопрягающие мембраны митохондрий. В последних в результате работы протонных помп комплексов I, III и IV достигается асимметричное распределение протонов по обе стороны внутренней мембраны с результирующим повышением их концентрации в межмембранном пространстве, что соответствует цитозольной стороне. В итоге более правильным было бы считать первичную концепцию

Митчелла хеми-электрической, и только с учетом недавнего открытия калиевой энергетики — электро-хемиосмотической. Однако великая ценность открытия Митчелла, как основополагающей теории, позволяющей приписать митохондриям функцию клеточных электростанций, не подлежит сомнению.

ВОЗМОЖНОСТЬ ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРИЧЕСТВА ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ МЕМБРАНАМ. СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ

В 1971 году В.П. Скулачев в одной из своих фундаментальных работ [17] постулировал возможность внутриклеточного транспорта энергии в виде мембранного потенциала. Он писал: «Система внутриклеточных (и митохондриальных) мембран и крист может препятствовать передаче энергии в виде таких гидрофильных энергоносителей, как АТР. Проблема была бы упрощена, если бы энергию можно было передавать вдоль мембраны в форме электрического поля. Таким образом, было бы возможно, например, объединить в общую систему тысячи отдельных ферментативных комплексов, вырабатывающих энергию, которые расположены в пространственно удаленных участках митохондриальной мембраны».

Одним из самых сильных подтверждений догадки Скулачева было обнаружение митохондриальной сети в поперечнополосатой мышце диафрагмы [18] и результаты исследований ее развития в онтогенезе [19]. Это была фундаментальная работа, которая сломала имеющуюся на то время парадигму традиционного двумерного мышления, основанную на анализе одиночных электронно-микроскопических срезов. В работе использовался метод реконструкции внутриклеточного объема из серии последовательных тканевых срезов, позволяющий установить трехмерную организацию митохондрий. Обнаруженная сложная структура, образованная ими, была названа митохондриальным ретикулумом. Таким образом, эти работы явились в некоторой степени структурной основой для подтверждения гипотезы функционирования митохондрий как электрического кабеля.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ ПРОНИКАЮЩИМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ АГЕНТАМИ

Немногим позже был внедрен в практику метод визуализации митохондрий в клетке при

помощи избирательного накопления положительно заряженного флуоресцентного зонда родамина 123, который представляет собой метиловый эфир незамещенного родамина [20]. Это открытие также надо признать как революционное, потому что до этого митохондрии в клетке визуализировали почти исключительно при помощи просвечивающей световой микроскопии [21]. Самым ранним, хотя и не очень чувствительным, способом визуализации митохондрий в клетке был очень редко используемый метод окрашивания Янусом Зеленым В [22], основанный на восстановлении красителя за счет процессов деятельности митохондрий. Для визуализации митохондрий необходимо было использовать краситель в высоких концентрациях, поскольку детекция основывалась на изменении оптического поглощения красителя. Использование флуоресцентных красителей, несущих в молекуле делокализованный положительный заряд, позволяло накопить краситель в матриксе митохондрий в многотысячном превышении его концентрации по сравнению с цитоплазмой клетки. В результате митохондрии могли быть визуализированы в клетке при использовании низких концентраций красителя, при этом избирательность окрашивания была очень высокой. Почти одновременно с родамином 123 для окраски структур, несущих мембранный потенциал, являющийся движущей силой накопления флуоресцентного красителя в митохондриях, был использован этиловый эфир незамещенного родамина [23]. Простота процедуры избирательной окраски митохондрий в клетке и разви-

тие флуоресцентной микроскопии позволили быстро распространить этот подход для определения структуры хондриома в разных клетках.

ЛАБИЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО РЕТИКУЛУМА

Через пять лет после введения в практику родаминовых красителей для визуализации митохондрий впервые была продемонстрирована лабильность организации митохондриального ретикулума. Первым агентом, вызывающим быстрое превращение митохондриального филамента в серию из округлых фрагментов (явление было тогда названо митохондриальной фрагментацией, которое соответствует более позднему названию митохондриального расщепления) был бензодиазепин диазепам (который был митохондриально токсичен), потенциально вызывающий окислительный стресс [24]. Позднее в разряд инициаторов митохондриальной фрагментации было помещено множество классических митохондриальных ядов (ротенон, антимицин А, цианид, олигомицин, дициклогексилкарбоксидами и пр. [25, 26]). Стала ясна природа высокой лабильности митохондриальных филаментов, находящейся в прямой зависимости от окислительного стресса [27–30]. Пример митохондриальной фрагментации, вызванной ротеноном, ингибитором комплекса I митохондрий, приведен на рис. 1.

Явление фрагментации митохондрий (их расщепление) стало предметом исследования

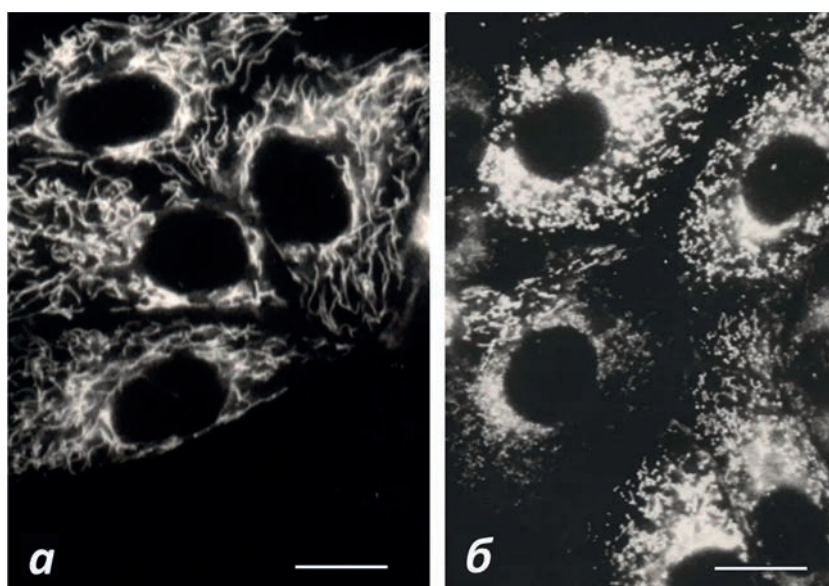


Рис. 1. Фрагментация митохондрий в клеточной культуре почек эмбриона свиньи. *а* — Контрольные клетки; *б* — после обработки ротеноном (1 мкМ, 24 ч). Масштабная линейка — 5 мкм

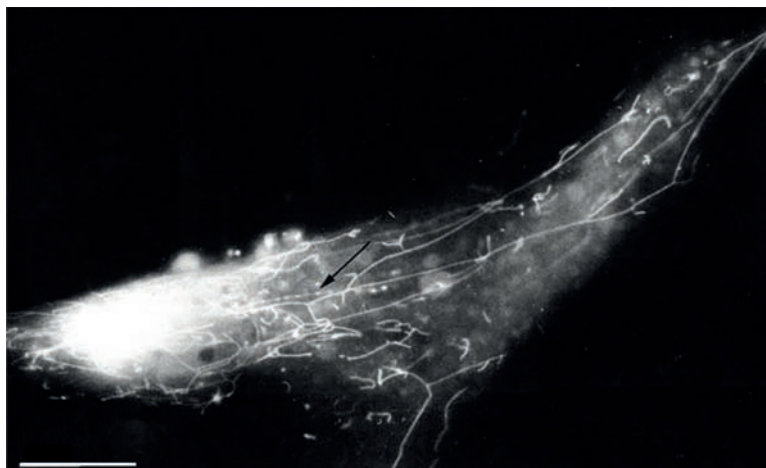


Рис. 2. Митохондриальная сеть в подкожном фибробласте человека (окраска этилпроламином). Стрелка указывает на фрагментированный митохондриальный филамент. Масштабная линейка — 10 мкм

для многих научных групп, и эти работы продолжаются, в результате чего определен целый набор белков, участвующих в этом процессе (например, см. обзор Giacometti et al. [31]). Однако пока никто не проводил анализ минимального размера митохондриального фрагмента и его состава. Этот кажущийся простым вопрос не слишком тривиален и связан с проблемой гетерогенности популяции митохондрий и их асимметрического деления [32–34], в результате которого образуются продукты фрагментации могут сильно отличаться по составу и последующей судьбе. Остается при этом неясным и вопрос: все ли митохондриальные фрагменты имеют в своем составе митохондриальную ДНК, чтобы хоть в малой степени обеспечить себе относительную автономность? Правда, последний вопрос может быть не слишком принципиальным, если учесть, что при устранении окислительного стресса наблюдается процесс, обратный фрагментации, когда митохондриальные фрагменты могут начинать сливаться. Однако вопрос, насколько разными или одинаковыми должны быть фрагменты по составу, чтобы слиться водно, остается открытым.

ОРГАНИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО РЕТИКУЛУМА

Митохондриальный ретикулум может быть организован двумя путями. Одна система образована таким образом, что митохондриальный матрикс един и образует континуум на всем протяжении митохондрии даже в условиях ее разветвления. Примером такой организации является гигантский митохондриальный ретикулум у нормальных фибробластов (рис. 2),

астроглиальных клеток млекопитающих, в клетках *Saccharomyces cerevisiae* [35], в яйцеклетке *Xenopus* [36] и сперматиде насекомых, образующих так называемый небенкерн [37]. По второму сценарию митохондриальный ретикулум организован отдельными малыми митохондриальными единицами, каждая со своим изолированным друг от друга матриксом, объединенными за счет плотных контактов друг с другом. Самый старый, но не очень известный пример — митохондрии в ряде сперматозоидов [38–41], в частности млекопитающих, где отдельные митохондрии, соединяясь друг с другом при помощи определенного «цемента», образуют средний отдел сперматозоида, организованный этими митохондриями по винтовой линии с разным числом витков в зависимости от вида животного. Среди разнообразной терминологии, описывающей межмитохондриальные образования в сперматиде, часто встречается термин «nuage», имеющий более широкое применение для описания внутриклеточных структур [40] (также см. обзор Motta et al. [41]). В скелетной мышце почти 50 лет назад были подробно описаны «межмембранные контакты» в виде электронноплотного материала, соединяющего соседние митохондрии в пределах одной клетки (так называемые четырехмембранные контакты, то есть покрывающие пространство между внутренними мембранами двух митохондрий, включающее и обе внешние мембраны). Одновременно были описаны шестимембранные контакты такого же типа и для зоны так называемого нексуса, где между митохондриями образуется контакт, включающий также две плазматические мембраны соседних клеток [18, 19, 42] и была подробно рассмотрена организация митохондриального ретикулума в онтогенезе [19].

Почти через полвека такого же типа исследования были продублированы [43, 44], но новизна этих более поздних работ ограничивалась лишь более изощренной методической базой, использованием новых терминов «коннектом» и «интерактом» и соотнесением структурной организации митохондриального дерева с мышечной активностью. Последнее является важным моментом, ибо предполагается соответствующая организация митохондриального ретикула в скелетной мускулатуре [45], которая наилучшим образом соответствует энергетическим нуждам мышечной клетки. Надо отметить, что проблема соответствия энергетических потребностей и доставки компонентов и производства энергии в клетке (проблема энергетического поступления и расходования) является одним из ключевых элементов возникновения сердечных, мозговых и других клеточных и органных патологий при нарушении этого соответствия, и митохондриальная организация и коммуникация играет принципиальную роль в этих процессах [45].

Несомненно, что структурное взаимодействие митохондрий между собой и с другими клеточными элементами является лишь одной из частей внутриклеточной коммуникации. В основном эта коммуникация реализуется через обмен химическими сигнальными молекулами, которые могут быть спрятаны в мембранные везикулы, генерируемые разными элементами клетки, включая митохондрии [46–49].

Подводя итог, гипотеза функционирования протяженных митохондриальных структур как электрических энергопередающих кабелей состояла в адекватном и равномерном снабжении всех компонентов клетки электрической энергией, которую можно трансформировать в химическую энергию АТФ.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРОТЯЖЕННЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ СИСТЕМ КАК ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ КАБЕЛЕЙ

Прошло всего три года после открытия фрагментации митохондриального ретикула, когда было проведено экспериментальное доказательство функционирования митохондрии как электрического кабеля [50]. В качестве объекта использовались подкожные фибробласты человека, у которых в норме митохондрии образуют единую сеть из очень протяженных одиночных или объединенных в сеть филаментов длиной в сотни микрон.

Так как флуоресцентные проникающие красители типа родамина 123 или этилродамина позволяют выявить лишь энергизованные митохондрии (у которых есть мембранный потенциал, позволяющий накопить краситель в матриксе митохондрий теоретически до 10 000-кратных концентраций по сравнению с внеклеточным содержанием), то было отмечено изменение мембранного потенциала по всей длине протяженной митохондрии после точечного поражения митохондриального филамента. Последнее было осуществлено при помощи сфокусированного лазерного луча, при этом размер его пятна был сопоставим с толщиной митохондриального тяжа и составлял доли микрона. Результат опытов подтвердил гипотезу об эквипотенциальности митохондриального филамента, поскольку локальный пробой митохондриальной мембраны вызвал полную деэнергизацию всей протяженной митохондрии, проявившуюся в потере флуоресценции митохондриального красителя по всей ее длине [50]. Позже были поставлены аналогичные опыты с неонатальными кардиомиоцитами, митохондрии которых также организованы в виде разветвленного дерева. Но в отличие от фибробластов, где матрикс митохондрии непрерывен и распространяется на всю длину без разрывов, весь митохондриальный ретикулум в данном случае организован в виде отдельных митохондриальных единиц, объединенных при помощи межмитохондриальных контактов. В результате этого митохондриальная сеть неонатальных кардиомиоцитов имеет множество не соединенных между собой митохондриальных матриксов. В этом случае при локальном точечном поражении одного элемента митохондриальной сети деэнергизовалась часть общей сети. Это означало, что в структурно-функциональном плане в неонатальном кардиомиоците митохондрии в одиночной клетке организованы в виде отдельных изопотенциальных кластеров, также состоящих из отдельных митохондрий, объединенных при помощи межмембранных контактов [51]. Полный электрический пробой, наблюдаемый при деэнергизации отдельного кластера, означал, что межмитохондриальные контакты являются электропроницаемыми, обеспечивая коммуникацию соседних матриксов митохондрий предположительно за счет наличия ионных каналов во внутренних и внешних мембранах контактирующих митохондрий. Более того, интересной была архитектура крист в межмитохондриальных контактах — они располагались четко перпендикулярно плану контактной зоны, что, вероятно, облегчало

распространение мембранного потенциала по митохондриальной сети [52].

Позже было обнаружено, что в межмитохондриальных контактах кардиомиоцитов, которые на электронномикроскопических изображениях представлены осмиофильной субстанцией, обильно присутствует поровый белок внешних мембран — вольт-зависимый анионный канал [53], что могло быть рассмотрено как структурное подтверждение ионканального сообщения между митохондриями в зоне контакта.

Впоследствии с использованием тех же подходов была продемонстрирована электрическая связь между митохондриями в сперматозоиде [54] и в клетках трихомы [55]. Это также предполагало наличие ионных каналов в зоне контактов митохондрий сперматозоидов (которые, как мы уже указывали выше, визуализировались как электронно-плотные образования, что послужило основой для их названия «митохондриальным цементом» [40, 41]).

Более чем через 25 лет после формулировки и доказательства существования митохондрий как электрического кабеля в журнале *Nature* была опубликована работа из лаборатории Роберта Балабана, в точности воспроизводящая уже описанную идею, принцип и методический характер организации и функционирования митохондриального ретикула в кардиомиоцитах [56] с той лишь разницей, что использовалась более современная методическая база. Позже в ряде других публикаций (например, Glancy et al. [57]) из этой же лаборатории по непонятным причинам однозначно интерпретируемые опыты, поставленные в Москве, были поставлены под сомнение («However, there are contradictory reports of the functional connectivity of the cardiac mitochondrial reticulum» [57]), правда, с последующим подтверждением правоты ранних идей и доказательств.

Кроме примеров игнорирования первоисточника кабельной теории протяженных сопрягающих мембран, включая внутренние мембраны митохондрий, была осуществлена в какой-то мере критика основ кабельной теории функционирования митохондриального ретикула, что требует особого рассмотрения [58]. На очень хорошей методической основе было показано, что кристы в пределах одной митохондрии могут иметь разный трансмембранный потенциал. Сами авторы данного исследования отчетливо понимали некоторое расхождение их данных с кабельной теорией и предлагали разумное объяснение, основы которого мы обсуждали ранее (см. рис. 3 в статье Зоров и соавт. [59]), когда

приводили как старые, так и современные данные о структуре и организации крист [60, 61]. Эти данные условно можно представить как доказательство наличия внутри митохондрий субмитохондриальных частиц, имеющих или не имеющих электрический контакт с внутренней митохондриальной мембраной, что подбрасывает старые представления о том, что митохондриальные кристы образуют континуум с внутренней мембраной. На основании такого представления о структуре митохондрий кристы могут представлять собой отдельные организации сопрягающих мембран, не всегда имеющие электрическое соединение с внутренней мембраной, и они могут иметь разный трансмембранный потенциал. При этом внутренняя мембрана митохондрий представляет собой непрерывную и эквипотенциальную структуру и является материальной основой теории митохондриального электрического кабеля.

Однако нельзя исключить еще один сценарий, который без критической оценки методических особенностей полученных данных [62] может быть интерпретирован как отсутствие кабельных свойств протяженных митохондрий. Это касается опытов по оценке энергизации митохондрий при использовании красителя JC-1, флуоресценция которого зависит от концентрации зонда. При высоких концентрациях JC-1, соответствующих его концентрации в матриксе высокоэнергизованных митохондрий, образуются так называемые J-агрегаты, при возбуждении испускающие свет в красной области, в то время как в низкопотенциальных митохондриях, где концентрация зонда не столь высокая, J-агрегаты не образуются, и при возбуждении испускается свет в зеленой области спектра. Однако при использовании обычной флуоресцентной микроскопии было замечено, что на протяжении одного митохондриального филамента можно было наблюдать чередование областей с красной и зеленой флуоресценцией, что могло трактоваться как отсутствие эквипотенциальности по длине филамента и определенное чередование низко- и высокопотенциальных отсеков по длине одного митохондриального филамента [62].

Есть два момента, которые надо учитывать при использовании и интерпретации флуоресцентных сигналов от JC-1. Во-первых, этот агент достаточно липофилен и будет распределяться не только в соответствии со значениями мембранного потенциала на внутренней митохондриальной мембране, но и в соответствии с липофильным окружением в митохондрии, которое может быть неодинаково по всему объему митохондрий. Но главное —

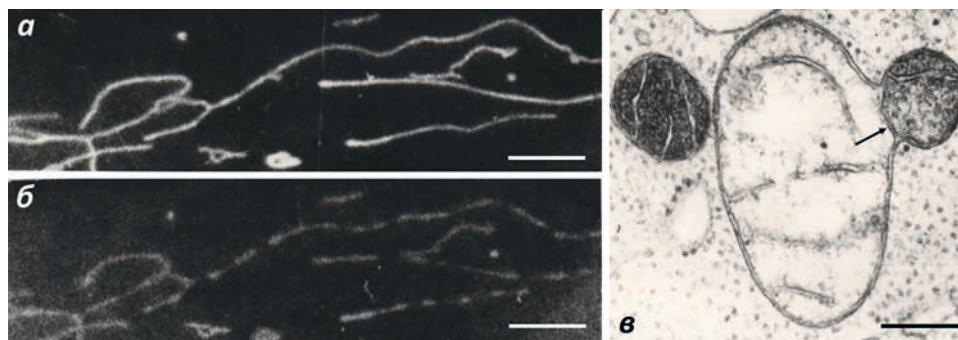


Рис. 3. Фрагментация митохондрий в клетках. Окраска этилпроламином. *а* — Нормальный фибробласт человека. *б* — Та же клетка после 10-секундного воздействия возбуждающим светом. Масштабная линейка — 5 мкм. *в* — Электронная микроскопия митохондрии в клетке культуры почек эмбриона свиньи, подвергнутой воздействию ротенона (1 мкМ, 24 ч). Видно наличие отдельных по морфологии компартментов, разделенных септой (указана стрелкой). Масштабная линейка — 0,3 мкм

это то, что эта «многоцветность» одиночной митохондрии в клетке появляется не сразу, а в процессе наблюдения, что может быть результатом фотодинамического эффекта, приводящего сначала к образованию септ внутри митохондрий, разделяющих одну протяженную митохондрию на ряд электрически изолированных отсеков (рис. 3), с последующей фрагментацией митохондриального филамента.

Этот процесс образования септ может происходить в секундной шкале при облучении достаточно сильным светом, возбуждающим краситель. Электронно-микроскопические данные подтверждают, что в процессе инициации фрагментации митохондриального ретикулума септа может разделять митохондрию на отсеки разной конфигурации, соответствующие разной степени энергизации (рис 3, в, а также рис. 6 в статье Zorov et al. [29]).

Критиков электрической кабельной теории митохондрий было существенно меньше, чем тех, которые поддерживали эту концепцию. Очень важной работой, подкрепляющей базовые принципы кабельной теории, было решение вопроса о том, насколько непрерывен матрикс по всему пространству митохондриального дерева. В одном из исследований использовали фотоактивируемый зеленый флуоресцентный белок, находящийся исключительно в матриксе митохондрий, для мечення отдельных митохондриальных сетей в клетке в сочетании с мониторингом мембранного потенциала митохондрий в режиме реального времени [63]. При этом была обнаружена непрерывность матрикса в пределах одного изопотенциального митохондриального кластера. Неизменная эквипотенциальность отдельных митохондриальных сетей позволила предположить, что гетерогенный характер мембранного потенциала в митохондриях клетки отражает различия между отдельными сетями.

К такому же выводу о непрерывности матрикса в пределах одной несептированной митохондрии (одиночного электрического кабеля) и о невозможности функциональной коммуникации матриксов соседних митохондрий пришли и другие исследователи. Полученные данные послужили структурно-функциональной основой понимания морфологической и функциональной гетерогенности митохондрий в клетке [64, 65].

Завершая этот раздел, можно с достаточной уверенностью сказать, что функционирование митохондрии как электрического кабеля является доказанным. Однако вполне вероятно, что митохондриальные сети могут нести и другие гипотетические функции, которые мы обсудим.

ДРУГИЕ ГИПОТЕТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ПРОТЯЖЕННЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ СТРУКТУР

Обеспечение однородности распределения редокс-потенциала по всему объему клетки. Рассматривая одиночную, но единую, непрерывную по матриксу митохондриальную сеть, на всем протяжении которой $\Delta\Psi$ одинаков (вся сеть эквипотенциальна), а сам мембранный потенциал отражает работу протонных помп, приводимых в действие за счет окисления восстановленных эквивалентов, прежде всего NAD(P)H, надо учесть, что мембранный потенциал ($\Delta\Psi$), вернее, электрохимический потенциал ионов водорода ($\Delta\mu\text{H}^+$) в стационарных условиях должен находиться в термодинамическом равновесии с редокс-потенциалом, создаваемым парой NAD(P)H/NAD(P). В свою очередь, эта пара находится в равновесии с парой восстановленный глутатион/окисленный глутатион (GSH/GSSG), при этом оба являются

основными буферными редокс-системами в клетке [66].

Таким образом, за счет эквипотенциальности митохондриальной сети, в идеальном случае покрывающей всю толщу клетки, эта сеть обеспечивает равномерное распределение редокс-потенциала по всему объему клетки, являясь в некотором роде «мешалкой», не допуская создания больших локальных областей с разным редокс-потенциалом. Ситуация может резко измениться в условиях вынужденной фрагментации/расщепления митохондриальной сети, когда каждый митохондриальный фрагмент будет создавать вокруг себя редокс-окружение в соответствии с величиной мембранного потенциала на внутренней мембране этого фрагмента. Учитывая, что фрагментация ассоциируется с наличием окислительного стресса, приводящего к увеличению гетерогенности митохондрий по мембранному потенциалу [29, 34], вполне ожидаемой является гетерогенность распределения редокс-потенциала в клетке после фрагментации митохондрий.

Проводник кислорода. Известно, что растворимость кислорода в липидных мембранах и их гидрофобных компонентах выше, чем в водной фазе, в результате чего в митохондриальных мембранах концентрация кислорода выше, чем в цитозоле. Несмотря на то что именно во внутренней мембране митохондрий локализован основной потребитель кислорода (цитохромоксидаза), все равно мембраны можно рассматривать как буферы кислорода, помогающие облегчать диффузию O_2 по митохондрии. Это в какой-то степени обеспечивает уравнивание распределения кислорода по объему клетки и не допускает создания локальных гипоксических областей. Конечно же это будет сильно зависеть от активности митохондриального дыхания, что определяет диаметр так называемого цилиндра Крога (объемное распределение кислорода в ткани вокруг капилляров, несущих кислород, зависящее от скорости доставки кислорода и его потребления [67]).

Проводник протонов. В случае равнозначности не только мембранного потенциала по всей длине митохондрии, но и всего $\Delta\mu H^+$, в состав которого, кроме значения мембранного потенциала, входит и градиент ионов водорода (ΔpH), величина ΔpH также будет одинакова по всей ее длине. Это приведет к тому, что окружение гигантской митохондрии будет иметь одинаковые значения pH, даже без учета возможности ускоренного проведения протонов по мембранам в соответствии с меха-

низмом De Grotthuss [68] по упорядоченным молекулам воды в примембранных слоях [69]. Таким образом, как и в случае с предполагаемым «перемешиванием» редокс-потенциала, гигантская митохондрия будет «перемешивать» pH по всей длине своего окружения.

Уравнивание внутриклеточных концентраций ионов калия. Учитывая недавно открытую возможность митохондриальной калиевой энергетики [6–8], приводимой в действие трансмембранным потенциалом, мы вправе ожидать равномерное распределение ионов калия по внутриклеточному объему в окружении гигантской митохондрии.

Таким образом, митохондриальная сеть по многим параметрам может служить структурой, обеспечивающей равномерное распределение по клетке разных компонентов, и служить своеобразной внутриклеточной «мешалкой».

МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ

В приведенном материале мы делали акцент на проблемах адекватного снабжения живой системы необходимым материалом для нормального течения метаболизма, в частности энергетического метаболизма, будь то клетка, орган или организм. Полное соответствие доставки насущным нуждам живой клетки определяет понятие гомеостаза, и отклонения в любую сторону могут быть чреваты возникновением патологического фенотипа. Эти отклонения могут быть вызваны физико-химическим воздействием на систему, и одним из таких факторов является воздействие, сопровождающееся возникновением окислительного стресса. Патогенез окислительного стресса слишком очевиден, и приведение примеров такого рода занимает большую часть научной литературы. Мы можем лишь кратко коснуться тех медицинских проблем, которые составляют малую долю от громадного числа широко обсуждаемых неврологических или кардиологических аспектов, оставляя на заднем плане проблемы акушерства и неонатологии, хотя задача поддержания редокс-гомеостаза в клетках там имеет не меньшее значение.

Из нашего логического предположения, что митохондриальная сеть может служить для обеспечения равновесия редокс-потенциала в клетке, следует, что окислительный стресс, как первопричина или следствие внутренних нарушений и следующие за этим изменения структуры сети, уводит внутриклеточное

содержимое от состояния равновесия, что неминуемо приводит к изменению внутриклеточного метаболического гомеостаза. Это касается громадного ряда патологий, и мы лишь в качестве примера возьмем генеральные проблемы акушерства, гинекологии и неонатологии, которые составляют ведущую часть заболеваемости и детской и взрослой смертности. Особо надлежит обратить внимание на окислительный стресс, сопровождающий разные патологии, являющиеся предметом этих отраслей медицины [70, 71], в частности такие как преэклампсия, определяемая как гипертензия и протеинурия, возникшие после 20 недель гестации, и задержка роста плода [72, 73]. Одной из причин преэклампсии является имплантация плаценты, приводящая к ремоделированию артерий матери и снижению кровотока к плоду. Это может вызывать резкую восприимчивость к колебаниям в кровотоке и, как следствие, приводить к изменениям редокс-статуса клеток как плаценты, так и плода, характерным для ишемии-реперфузии. Реперфузионное повреждение плаценты сопровождается генерацией активных форм кислорода и азота с образованием окисленных продуктов, обладающих сигнальными и патогенными свойствами при значительном повышении их концентраций, что, прежде всего, приводит к дисфункции клеток эндотелия [74, 75]. Таким образом, эти продукты являются факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, что позволяет предположить о возможной функциональной связи между плацентой и сердечно-сосудистой системой, причем в основе такой сигнализации лежат компоненты, поддерживающие или нарушающие редокс-статус матери и плода [76].

Пришло понимание того, что именно митохондрии в должной мере определяют редокс-статус биологической системы и плаценты, в частности [77–80]. Как мы указывали раньше, именно лабильность митохондриальных структур и функций в значительной степени является показателем редокс-статуса клетки и не только. Процесс фрагментации митохондрий, как почти обязательный ответ на возникший окислительный стресс, является также и обязательным в механизме контроля качества митохондрий [29, 33]. Разница между первой и второй опцией состоит в том, что окислительный стресс приводит к глобальной фрагментации митохондриальной популяции в одиночной клетке, в то время как в процессе программируемого уничтожения нефункциональных митохондрий фрагментация локальна, и ей

предшествует внутренняя перестройка митохондрий с последующим отделением фрагмента митохондрий с неправильно функционирующим содержимым от митохондриальной сети (которая может сохранять свою трехмерную структуру), и в этом состоит принцип митофагии (митоптоза) [29]. Однако и в том, и в другом случае фрагментация (расщепление) идет с участием белков расщепления (например, Drp1 и Fis1), уровень которых в плаценте коррелирует с тяжестью заболевания матери и плода, включая размер последнего [81, 82], что свидетельствует о прямой связи патологии с митохондриальной структурой, которая может служить показателем патологического фенотипа клетки.

Очевидность вовлеченности окислительного стресса в патогенез и необходимость поддержания редокс-состояния клетки и ее компонентов, прежде всего митохондрий, привели к пониманию, что одной из возможностей терапевтического вмешательства является нормализация редокс-статуса в клетках органа. В недавней работе при использовании эндотелиальных клеток пупочной вены человека было показано, что после воздействия на них плазмы крови беременных женщин с преэклампсией наблюдается снижение функций митохондрий этих клеток, ассоциированное с повышенной генерацией активных форм кислорода [83]. Одновременно в клетках наблюдалась повышенная экспрессия маркеров воспаления TNF- α , TLR-9 и ICAM-1. Митохондриально-направленный антиоксидант MitoTempo снижал выработку супероксида митохондриями в клетках, подвергшихся воздействию плазмы крови беременных с преэклампсией, нормализовал митохондриальный метаболизм и значительно восстанавливал воспалительный профиль клеток. Эти данные подтверждают функциональную роль митохондриальной редокс-сигнализации в патогенезе преэклампсии и предлагают терапевтические пути, направленные на сохранение митохондриальной структуры и функций.

Вклад авторов. П.А. Абрамичева, Н.В. Андрианова, В.А. Бабенко, Л.Д. Зорова, С.Д. Зоров, И.Б. Певзнер, В.А. Попков, Д.С. Семенович, Э.И. Якупова, Д.Н. Силачев, Е.Ю. Плотников, Г.Т. Сухих, Д.Б. Зоров — общее обсуждение идеологии и планов работы; Д.Б. Зоров — написание рукописи; Д.Н. Силачев, Е.Ю. Плотников, Г.Т. Сухих, Д.Б. Зоров — руководство и контроль исследования; П.А. Абрамичева, Н.В. Андрианова, В.А. Бабенко, Л.Д. Зорова, С.Д. Зоров, И.Б. Певзнер, В.А. Попков,

Д.С. Семенович, Э.И. Якупова, Д.Н. Силачев, Е.Ю. Плотноков, Г.Т. Сухих – редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00173-П).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism, *Nature*, **191**, 144-148, doi: 10.1038/191144a0.
- Mitchell, P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **41**, 445-502, doi: 10.1111/j.1469-185X.1966.tb01501.x.
- Mitchell, P. (2011) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966, *Biochim Biophys Acta*, **1807**, 1507-1538, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.09.018.
- Mitchell, P. (1979) David Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences, *Science*, **206**, 1148-1159, doi: 10.1126/science.388618.
- Juhaszova, M., Koblinsky, E., Zorov, D. B., Aon, M. A., Cortassa, S., and Sollott, S. J. (2022) Setting the record straight: a new twist on the chemiosmotic mechanism of oxidative Phosphorylation, *Function (Oxf)*, **3**, zqac018, doi: 10.1093/function/zqac018.
- Juhaszova, M., Koblinsky, E., Zorov, D. B., Nuss, H. B., Yaniv, Y., Fishbein, K. W., de Cabo, R., Montoliu, L., Gabelli, S. B., Aon, M. A., Cortassa, S., and Sollott, S. J. (2021) ATP synthase K⁺- and H⁺-fluxes drive ATP synthesis and enable mitochondrial K⁺-“Uniporter” function: I. Characterization of ion fluxes, *Function (Oxf)*, **3**, zqab065, doi: 10.1093/function/zqab065.
- Juhaszova, M., Koblinsky, E., Zorov, D. B., Nuss, H. B., Yaniv, Y., Fishbein, K. W., de Cabo, R., Montoliu, L., Gabelli, S. B., Aon, M. A., Cortassa, S., and Sollott, S. J. (2022) ATP synthase K⁺- and H⁺-fluxes drive ATP synthesis and enable mitochondrial K⁺-“Uniporter” function: II. Ion and ATP synthase flux regulation, *Function (Oxf)*, **3**, zqac001, doi: 10.1093/function/zqac001.
- Зоров Д. Б. (2022) Окно в калиевый мир. Открытие калиевой энергетики в митохондриях и идентичности митохондриального АТФ-зависимого K⁺-канала, *Биохимия*, **87**, 1007-1013, doi: 10.31857/S0320972522080024.
- Cortassa, S., Aon, M. A., Juhaszova, M., Koblinsky, E., Zorov, D. B., and Sollott, S. J. (2022) Computational modeling of mitochondrial K⁺- and H⁺-driven ATP synthesis, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **165**, 9-18, doi: 10.1016/j.yjmcc.2021.12.005.
- Williams, R. J. P. (1961) Possible functions of chains of catalysts, *J. Theor. Biol.*, **1**, 1-13, doi: 10.1016/0022-5193(61)90023-6.
- Williams, R. J. P. (1962) Possible functions of chains of catalysts II, *J. Theor. Biol.*, **3**, 209-220, doi: 10.1016/S0022-5193(62)80015-0.
- Williams, R. J. P. (1978) The multifarious couplings of energy transduction, *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 1-44, doi: 10.1016/0304-4173(78)90007-1.
- Williams, R. J. P. (2001) The structures of organelles and reticula: localised bioenergetics and metabolism, *Chembiochem*, **2**, 637-641, doi: 10.1002/1439-7633(20010903)2:9<637::AID-CBIC637>3.0.CO;2-7.
- Kell, D. B. (1979) On the functional proton current pathway of electron transport phosphorylation. An electrodic view, *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 55-99, doi: 10.1016/0304-4173(79)90018-1.
- Mulkidjanian, A. Y., Heberle, J., and Cherepanov, D. A. (2006) Protons and interfaces: implications for biological energy conversion, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 913-930, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.02.015.
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., and Zorov, D. B. (2018) Mitochondrial membrane potential, *Anal. Biochem.*, **552**, 50-59, doi: 10.1016/j.ab.2017.07.009.
- Skulachev, V. P. (1971) Energy transformations in the respiratory chain, *Curr. Top. Bioenergetics*, **4**, 127-190, doi: 10.1016/B978-0-12-152504-0.50010-1.
- Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., and Skulachev, V. P. (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 349-369, doi: 10.1016/0005-2728(78)90104-4.
- Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., and Skulachev, V. P. (1981) Ontogenesis of mitochondrial reticulum in rat diaphragm muscle, *Eur. J. Cell Biol.*, **25**, 175-181.
- Johnson, L. V., Walsh, M. L., and Chen, L. B. (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 990-994, doi: 10.1073/pnas.77.2.990.
- Bereiter-Hahn, J., and Vöth, M. (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria,

- Microsc. Res. Tech.*, **27**, 198-219, doi: 10.1002/jemt.1070270303.
22. Bensley, R. R. (1911) Studies on the pancreas of the guinea pig, *Am. J. Anat.*, **12**, 297-388, doi: 10.1002/aja.1000120304.
 23. Мурванидзе Г. В., Северина И. И., Скулачев В. П. (1981) Этилпродамин – проникающий катион и флуоресцентный индикатор мембранного потенциала цианобактерий *in vivo*, *Докл. Акад. Наук СССР*, **261**, 1252-1254.
 24. Vorobjev, I. A., and Zorov, D. B. (1983) Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum, *FEBS Lett.*, **163**, 311-314, doi: 10.1016/0014-5793(83)80842-4.
 25. Avad, A. S., Vorobjev, I. A., and Zorov, D. B. (1984) Fragmentation of mitochondrial reticulum, *Proceedings of the XVI Congress of FEBS*, abst. XI-80.
 26. Полякова И. А., Зоров Д. Б., Лейкина М. И. (1995) Структурно-функциональные изменения хондриома культивированных клеток при нарушении энергетического метаболизма, *Докл. Акад. Наук СССР*, **342**, 553-555.
 27. Skulachev, V. P., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Domnina, L. V., Minin, A. A., Pletjushkina, O. Y., Saprunova, V. B., Skulachev, I. V., Tsyplenkova, V. G., Vasiliev, J. M., Yaguzhinsky, L. S., and Zorov, D. B. (2004) Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis, *Mol. Cell. Biochem.*, **256-257**, 341-358, doi: 10.1023/B:MCBI.0000009880.94044.49.
 28. Plotnikov, E. Y., Vasileva, A. K., Arkhangelskaya, A. A., Pevzner, I. B., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (2008) Interrelations of mitochondrial fragmentation and cell death under ischemia/reoxygenation and UV-irradiation: protective effects of SkQ1, lithium ions and insulin, *FEBS Lett.*, **582**, 3117-3124, doi: 10.1016/j.febslet.2008.08.002.
 29. Zorov, D. B., Vorobjev, I. A., Popkov, V. A., Babenko, V. A., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Silachev, D. N., Zorov, S. D., Andrianova, N. V., and Plotnikov, E. Y. (2019) Lessons from the discovery of mitochondrial fragmentation (fission): a review and update, *Cells*, **8**, 175, doi: 10.3390/cells8020175.
 30. Pletjushkina, O. Y., Lyamzaev, K. G., Popova, E. N., Nepryakhina, O. K., Ivanova, O. Y., Domnina, L. V., Chernyak, B. V., and Skulachev, V. P. (2006) Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 518-524, doi: 10.1016/j.bbabo.2006.03.018.
 31. Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., and Scorrano, L. (2020) The cell biology of mitochondrial membrane dynamics, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 204-224, doi: 10.1038/s41580-020-0210-7.
 32. Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., and Shirihai, O. S. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy, *EMBO J.*, **27**, 433-446, doi: 10.1038/sj.emboj.7601963.
 33. Zorov, D. B., Popkov, V. A., Zorova, L. D., Vorobjev, I. A., Pevzner, I. B., Silachev, D. N., Zorov, S. D., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., and Plotnikov, E. Y. (2017) Mitochondrial aging: is there a mitochondrial clock? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **72**, 1171-1179, doi: 10.1093/gerona/glw184.
 34. Попков В. А., Плотноков Е. Ю., Лямзаев К. Г., Силачев Д. Н., Зорова Л. Д., Певзнер И. Б., Янкаускас С. С., Зоров С. Д., Бабенко В. А., Зоров Д. Б. (2015) Миторазнообразие, *Биохимия*, **80**, 631-641.
 35. Hoffman, H. P., and Avers, C. H. (1973) Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell, *Science*, **181**, 749-751, doi: 10.1126/science.181.4101.749.
 36. Heasman, J., Quarmby, J., and Wylie, C. C. (1984) The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: the source of germinal granule material, *Dev. Biol.*, **105**, 458-469, doi: 10.1016/0012-1606(84)90303-8.
 37. Pratt, S. A. (1968) An electron microscope study of nebenkern formation and differentiation in spermatids of *Murgantia histrionica* (Hemiptera, Pentatomidae), *J. Morphol.*, **126**, 31-65, doi: 10.1002/jmor.1051260104.
 38. Andre, J. (1962) Contribution to the knowledge of the chondrioma study of its ultrastructural modifications during spermatogenesis [in French], *J. Ultrastruct. Res.*, **Suppl. 3**, 1-185.
 39. Fawcett, D. W. (1958) The structure of the mammalian spermatozoon, *Int. Rev. Cytol.*, **7**, 195-234, doi: 10.1016/S0074-7696(08)62688-1.
 40. Eddy, E. M. (1974) Fine structural observations on the form and distribution of nuage in germ cells of the rat, *Anat. Rec.*, **178**, 731-757, doi: 10.1002/ar.1091780406.
 41. Motta, P. M., Nottola, S. A., Makabe, S., and Heyn, R. (2000) Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells, *Hum. Reprod.*, **15 Suppl 2**, 129-147, doi: 10.1093/humrep/15.suppl_2.129.
 42. Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., and Skulachev, V. P. (1983) Intermitochondrial contacts in myocardiocytes, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **15**, 413-420, doi: 10.1016/0022-2828(83)90261-4.
 43. Bleck, C. K. E., Kim, Y., Willingham, T. B., and Glancy, B. (2018) Subcellular connectomic analyses of energy networks in striated muscle, *Nat. Commun.*, **9**, 5111, doi: 10.1038/s41467-018-07676-y.
 44. Kim, Y., Ajayi, P. T., Bleck, C. K. E., and Glancy, B. (2022) Three-dimensional remodelling of the cellular energy distribution system during postnatal heart development, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **377**, 20210322, doi: 10.1098/rstb.2021.0322.
 45. Yaniv, Y., Juhaszova, M., Nuss, H. B., Wang, S., Zorov, D. B., Lakatta, E. G., and Sollott, S. J. (2010) Matching ATP supply and demand in mammalian heart: *in vivo*, *in vitro*, and *in silico* perspectives,

- Ann. N Y Acad. Sci.*, **1188**, 133-142, doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05093.x.
46. Boardman N. T., Trani, G., Scalabrin, M., Romanello, V., and Wüst, R. C. I. (2023) Intra-cellular to inter-organ mitochondrial communication in striated muscle in health and disease, *Endocr. Rev.*, **44**, 668-692, doi: 10.1210/endrev/bnad004, doi: 10.1210/endrev/bnad004.
 47. Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Popkov, V. A., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Zorov, S. D., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2017) Intercellular signalling cross-talk: to kill, to heal and to rejuvenate, *Heart Lung Circ.*, **26**, 648-659, doi: 10.1016/j.hlc.2016.12.002.
 48. Turovsky, E. A., Golovicheva, V. V., Varlamova, E. G., Danilina, T. I., Goryunov, K. V., Shevtsova, Y. A., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Babenko, V. A., Evtushenko, E. A., Zharikova, A. A., Khutornenko, A. A., Kovalchuk, S. I., Plotnikov, E. Y., Zorov, D. B., Sukhikh, G. T., and Silachev, D. N. (2022) Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles afford neuroprotection by modulating PI3K/AKT pathway and calcium oscillations, *Int. J. Biol. Sci.*, **18**, 5345-5368, doi: 10.7150/ijbs.73747.
 49. Zorova, L. D., Kovalchuk, S. I., Popkov, V. A., Chernikov, V. P., Zharikova, A. A., Khutornenko, A. A., Zorov, S. D., Plokhikh, K. S., Zinovkin, R. A., Evtushenko, E. A., Babenko, V. A., Pevzner, I. B., Shevtsova, Y. A., Goryunov, K. V., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Sukhikh, G. T., and Zorov, D. B. (2022) Do Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells contain functional mitochondria? *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 7408, doi: 10.3390/ijms23137408.
 50. Драчев В. А., Зоров Д. Б. (1986) Митохондрия как электрический кабель. Экспериментальная проверка гипотезы, *Докл. Акад. Наук СССР*, **287**, 1237-1238.
 51. Amchenkova, A. A., Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (1988) Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes, *J. Cell. Biol.*, **107**, 481-495, doi: 10.1083/jcb.107.2.481.
 52. Picard, M., McManus, M. J., Csordás, G., Várnai, P., Dorn, G. W., 2nd, Williams, D., Hajnóczky, G., and Wallace, D. C. (2015) Trans-mitochondrial coordination of cristae at regulated membrane junctions, *Nat. Commun.*, **6**, 6259, doi: 10.1038/ncomms7259.
 53. Konstantinova, S. A., Mannella, C. A., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (1995) Immunoelectron microscopic study of the distribution of porin on outer membranes of rat heart mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**, 93-99, doi: 10.1007/BF02110336.
 54. Zorov, D. B., Skulachev, V. P., and Halangk, V. (1990) Membranous electric cable. 4. Mitochondrial helix of the rat spermatozoa, *Biol. Membr.*, **7**, 243-249.
 55. Severina, I. I., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (1988) Coupling membranes as energy-transmitting cables. II. Cyanobacterial trichomes, *J. Cell Biol.*, **107**, 497-501, doi: 10.1083/jcb.107.2.497.
 56. Glancy, B., Hartnell, L. M., Malide, D., Yu, Z. X., Combs, C. A., Connelly, P. S., Subramaniam, S., and Balaban, R. S. (2015) Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle, *Nature*, **523**, 617-620, doi: 10.1038/nature14614.
 57. Glancy, B., Hartnell, L. M., Combs, C. A., Femnou, A., Sun, J., Murphy, E., Subramaniam, S., and Balaban, R. S. (2017) Power grid protection of the muscle mitochondrial reticulum, *Cell Rep.*, **19**, 487-496, doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.063.
 58. Wolf, D. M., Segawa, M., Kondadi, A. K., Anand, R., Bailey, S. T., Reichert, A. S., van der Blik, A. M., Shackelford, D. B., Liesa, M., and Shrihihi, O. S. (2019) Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent, *EMBO J.*, **38**, e101056, doi: 10.15252/embj.2018101056.
 59. Зоров Д. Б., Плотников Е. Ю., Силачев Д. Н., Зорова Л. Д., Певзнер И. Б., Зоров С. Д., Бабенко В. А., Янкаускас С. С., Попков В. А., Савина П. С. (2014) Микробиота и митобиота. Поставив знак равенства между митохондрией и бактерией, *Биохимия*, **79**, 1252-1268.
 60. Daems, W. T., and Wisse, E. (1966) Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria, *J. Ultrastruct. Res.*, **16**, 123-140, doi: 10.1016/S0022-5320(66)80027-8.
 61. Mannella, C. A., Marko, M., and Buttle, K. (1997) Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle, *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 37-38, doi: 10.1016/S0968-0004(96)30050-9.
 62. Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., Jr., and Chen, L. B. (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3671-3675, doi: 10.1073/pnas.88.9.3671.
 63. Twig, G., Graf, S. A., Wikstrom, J. D., Mohamed, H., Haigh, S. E., Elorza, A., Deutsch, M., Zurgil, N., Reynolds, N., and Shrihihi, O. S. (2006) Tagging and tracking individual networks within a complex mitochondrial web with photoactivatable GFP, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, C176-C184, doi: 10.1152/ajpcell.00348.2005.
 64. Collins, T. J., and Bootman, M. D. (2003) Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells, *J. Exp. Biol.*, **206** (Pt 12), 1993-2000, doi: 10.1242/jeb.00244.
 65. Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2002) Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells, *EMBO J.*, **21**, 1616-1627, doi: 10.1093/emboj/21.7.1616.

66. Ghosh, D., Levault, K. R., and Brewer, G. J. (2014) Relative importance of redox buffers GSH and NAD(P)H in age-related neurodegeneration and Alzheimer disease-like mouse neurons, *Aging Cell*, **13**, 631-640, doi: 10.1111/accel.12216.
67. McGuire, B. J., and Secomb, T. W. (2001) A theoretical model for oxygen transport in skeletal muscle under conditions of high oxygen demand, *J. Appl. Physiol.* (1985), **91**, 2255-2265, doi: 10.1152/jappl.2001.91.5.2255.
68. De Grotthuss, C.J.T. (1806) On the decomposition of water and the bodies it holds in solution using galvanic electricity [in French], *Ann. Chim. (Paris)*, **58**, 54-73.
69. Morelli, A. M., Ravera, S., Calzia, D., and Panfoli, I. (2019) An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane, *Open Biol.*, **9**, 180221, doi: 10.1098/rsob.180221.
70. Mannaerts, D., Faes, E., Cos, P., Briedé, J. J., Gyselaers, W., Cornette, J., Gorbanev, Y., Bogaerts, A., Spaanderman, M., Van Craenenbroeck, E., and Jacquemyn, Y. (2018) Oxidative stress in healthy pregnancy and preeclampsia is linked to chronic inflammation, iron status and vascular function, *PLoS One*, **13**, e0202919, doi: 10.1371/journal.pone.0202919.
71. Toboła-Wróbel, K., Pietryga, M., Dydowicz, P., Napierała, M., Brązert, J., and Florek, E. (2020) Association of oxidative stress on pregnancy, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2020**, 6398520, doi: 10.1155/2020/6398520.
72. Mert, I., Oruc, A. S., Yuksel, S., Cakar, E. S., Buyukkagıncı, U., Karaer, A., and Danisman, N. (2012) Role of oxidative stress in preeclampsia and intrauterine growth restriction, *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **38**, 658-664, doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01771.x.
73. Rashid, C., Bansal, A., and Simmons, R. A. (2018) Oxidative stress, intrauterine growth restriction, and developmental programming of type 2 diabetes, *Physiology*, **33**, 348-359, doi: 10.1152/physiol.00023.2018.
74. Lyall, F., Robson, S. C., and Bulmer, J. N. (2013) Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome, *Hypertension*, **62**, 1046-1054, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01892.
75. Ness, R. B., and Sibai, B. M. (2006) Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **195**, 40-49, doi: 10.1016/j.ajog.2005.07.049.
76. Manna, S., Ruano, C. S. M., Hegenbarth, J. C., Vaiman, D., Gupta, S., McCarthy, F. P., Méhats, C., McCarthy, C., Apicella, C., and Scheel, J. (2022) Computational models on pathological redox signalling driven by pregnancy: a review, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 585, doi: 10.3390/antiox11030585.
77. Holland, O., Dekker Nitert, M., Gallo, L. A., Vejzovic, M., Fisher, J. J., and Perkins, A. V. (2017) Placental mitochondrial function and structure in gestational disorders, *Placenta*, **54**, 2-9, doi: 10.1016/j.placenta.2016.12.012.
78. Salazar-Petres, E., Pereira-Carvalho, D., Lopez-Tello, J., and Sferruzzi-Perri, A. N. (2022) Placental structure, function, and mitochondrial phenotype relate to fetal size in each fetal sex in mice, *Biol. Reprod.*, **106**, 1292-1311, doi: 10.1093/biolre/roac056.
79. Vangrieken, P., Al-Nasiry, S., Bast, A., Leermakers, P. A., Tulen, C. B. M., Schiffers, P. M. H., van Schooten, F. J., and Remels, A. H. V. (2021) Placental mitochondrial abnormalities in preeclampsia, *Reprod. Sci.*, **28**, 2186-2199, doi: 10.1007/s43032-021-00464-y.
80. Vangrieken, P., Al-Nasiry, S., Bast, A., Leermakers, P. A., Tulen, C. B. M., Janssen, G. M. J., Kaminski, I., Geomini, I., Lemmens, T., Schiffers, P. M. H., van Schooten, F. J., and Remels, A. H. V. (2012) Hypoxia-induced mitochondrial abnormalities in cells of the placenta, *PLoS One*, **16**, e0245155, doi: 10.1371/journal.pone.0245155.
81. Bartho, L. A., Fisher, J. J., Cuffe, J. S. M., and Perkins, A. V. (2020) Mitochondrial transformations in the aging human placenta, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **319**, E981-E994, doi: 10.1152/ajpendo.00354.2020.
82. Kolac, U. K., Kurek Eken, M., Ünübol, M., Donmez Yalcin, G., and Yalcin, A. (2021) The effect of gestational diabetes on the expression of mitochondrial fusion proteins in placental tissue, *Placenta*, **115**, 106-114, doi: 10.1016/j.placenta.2021.09.015.
83. McCarthy, C., and Kenny, L. C. (2016) Therapeutically targeting mitochondrial redox signalling alleviates endothelial dysfunction in preeclampsia, *Sci. Rep.*, **6**, 32683, doi: 10.1038/srep32683.

MITOCHONDRIAL NETWORK: ELECTRIC CABLE AND MORE

Review

P. A. Abramicheva¹, N. V. Andrianova¹, V. A. Babenko^{1,2}, L. D. Zorova^{1,2}, S. D. Zorov^{1,3},
I. B. Pevzner^{1,2}, V. A. Popkov^{1,2}, D. S. Semenov¹, E. I. Yakupova¹, D. N. Silachev^{1,2},
E. Y. Plotnikov^{1,2}, G. T. Sukhikh², and D. B. Zorov^{1,2*}

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: zorov@belozersky.msu.ru*

² *Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, 117997 Moscow, Russia*

³ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Mitochondria in a cell can unite and organize complex extended structures that extend over the entire cellular volume, ensuring a uniform supply of energy to cellular compartments with ATP synthesized in the mitochondria. In accordance with the chemiosmotic concept, the energy of oxidation of respiratory substrates is largely stored in the form of an electrical potential difference on the inner membrane of mitochondria. The theory of the functioning of extended mitochondrial structures as intracellular electrical wires suggests that mitochondria provide the fast delivery of electrical energy through the cellular volume, with following use of this energy for ATP synthesis, thereby speeding up the process of ATP delivery compared to the rather slow diffusion of ATP in the cell. The analytical review gives the history of the cable theory, solved and unsolved critical problems, the lability of the mitochondrial network and the role of oxidative stress in this process. In addition to the already proven functioning of extended mitochondrial structures as electrical cables, a few of additional functions are proposed, in particular, the hypothesis is put forward that mitochondrial networks provide a uniform distribution of redox potential throughout the cell, which can change in pathological conditions during fragmentation of the mitochondrial reticulum. A few of pathologies accompanied by a violation of the redox status and the participation of mitochondria in them are considered.

Keywords: mitochondria, reticulum, network, electricity, membrane potential, fragmentation, fission, cardiomyocytes, spermatozoa, oxidative stress, redox, preeclampsia, fetal growth retardation

РОЛЬ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА Th2-ЦИТОКИНОВ IL-4 И IL-5 В АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Обзор

© 2023 И.П. Шиловский^{1*}, В.И. Ковчина¹, Е.Д. Тимотиевич¹,
А.А. Никольский¹, М.Р. Хаитов^{1,2}

¹ ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,
115522 Москва, Россия; электронная почта: ip.shilovsky@nrcii.ru

² ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 05.05.2023

После доработки 15.08.2023

Принята к публикации 15.08.2023

Бронхиальная астма (БА) — это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, включающее в себя несколько фенотипов, самым распространенным из которых (до 80% от всех случаев) является аллергическая БА. Ключевыми участниками патогенеза этого заболевания являются Th2-цитокины (IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13). Гены, кодирующие эти цитокины, как и подавляющее большинство генов человека, состоят из нескольких экзонов, и, соответственно, из единого мРНК-предшественника в результате альтернативного сплайсинга может образовываться несколько вариантов зрелых мРНК и изоформ белка, которые также могут участвовать в патогенезе БА. Анализ научной литературы и баз данных показал наличие альтернативных мРНК-транскриптов для IL-4, IL-5 и IL-13. При этом у IL-4 и IL-5 альтернативные транскрипты несут открытые рамки считывания, а следовательно, могут кодировать функциональные белки. Для IL-4 показано существование не только альтернативных мРНК-транскриптов, но и альтернативной изоформы белка (IL-4δ2), которая утратила часть, кодируемую экзоном-2. Сходный по структуре альтернативный транскрипт, утративший экзон-2 (IL-5δ2) был идентифицирован для IL-5. В данном обзоре мы обобщаем сведения об известных на данный момент альтернативных мРНК-транскриптах и белковых изоформах Th2-цитокининов, прежде всего, IL-4 и IL-5. Мы проанализировали известные биологические свойства альтернативных вариантов этих цитокинов, их возможную роль в развитии аллергической БА, а также рассмотрели диагностический и терапевтический потенциал.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бронхиальная астма, Th2-цитокины, альтернативный сплайсинг, сигнальный путь.

DOI: 10.31857/S0320972523100159, **EDN:** OSYUPD

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) — гетерогенное заболевание, обычно характеризующееся хроническим воспалением дыхательных путей [1]. В отдельных странах заболеваемость достигает 15–18% [2], в России — около 7% населения [3]. Рост распространенности БА, по всей видимости, связан с недостаточностью суще-

ствующих способов терапии. В то же время создание новых методов лечения невозможно без раскрытия молекулярных и клеточных механизмов патогенеза.

За последние три десятилетия получены убедительные доказательства участия клеток Т-хелперов типа 2 (Th2) и продуцируемых ими цитокинов (IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13) в формировании основных проявлений БА [4]. Длительное время считалось, что это заболевание развивается исключительно по Th2-зависимому механизму и ассоциировано с инфильтрацией респираторного тракта провоспалительными клетками — эозинофилами. Однако в свете новых данных астму рассматривают как гетерогенное заболевание, включающее

Принятые сокращения: АПК — антигенпрезентирующие клетки; БА — бронхиальная астма; пре-мРНК — мРНК-предшественник; ЭР — эндоплазматический ретикулум; ILC2 — врожденные лимфоидные клетки 2-го типа; ORF — открытая рамка считывания; Th2-клетки — Т-хелперы типа 2.

* Адресат для корреспонденции.

в себя несколько фенотипов. Так, например, в отдельный фенотип выделяют нейтрофильную БА, характеризующуюся нейтрофильным (или смешанным) воспалением дыхательных путей, которая развивается по Th17-зависимому механизму. Такая астма зачастую протекает тяжело и трудно поддается традиционному лечению кортикостероидами. Тем не менее самым распространенным фенотипом является аллергическая БА (до 80% всех случаев), которая развивается с участием Th2-клеток и продуцируемых ими цитокинов [5, 6].

Согласно современным представлениям, патогенез аллергической БА развивается в два этапа: 1) этап сенсибилизации, 2) эффекторный этап [4]. Сенсибилизация происходит при первичном контакте с аллергенами, которые попадают в организм через повреждения в эпителии. Происходит презентация аллергена с помощью молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II на антигенпрезентирующих клетках (АПК), прежде всего дендритных клетках и альвеолярных макрофагах [7]. После контакта с аллергеном АПК мигрируют в региональные лимфоузлы, где активируют наивные Th0-клетки, которые под влиянием определенного цитокинового окружения дифференцируются в Th2-клетки, продуцирующие так называемые Th2-цитокины (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) [4, 8]. Именно данные цитокины обеспечивают формирование основных проявлений патологии. Каким образом происходит дифференцировка Th0- в Th2-клетки, окончательно не известно. Согласно одному из предположений, ключевую роль в этом процессе могут играть эпителиальные клетки и врожденные лимфоидные клетки 2-го типа (ILC2). Некоторые аллергены способны активировать эпителиальные клетки (в том числе за счет взаимодействия с рецептором TLR4 [9]), что индуцирует продукцию ими провоспалительных факторов (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TSLP, IL-25 и IL-33) [10]. В свою очередь, IL-25 и IL-33 активируют ILC2, которые продуцируют IL-5 и IL-13, последний из которых может способствовать дифференцировке Th2-клеток [11–13]. Примечательно, что, согласно новым данным, не только ILC2 активируют Th2-клетки, но и, наоборот, Th2-клетки, продуцируя IL-4 и прочие факторы, способствуют экспансии ILC2 [14].

Параллельно в регионарных лимфоузлах происходит контакт аллергена с В-клетками, что способствует их дифференцировке в плазматические клетки, продуцирующие антитела. Под действием Th2-цитокінов (IL-4 и IL-13) В-клетки синтезируют IgE, который, связы-

ваясь с рецепторами на поверхности тучных клеток и базофилов, опосредует последующие аллергические реакции [4, 15] (рис. 1). Кроме того, дендритные клетки и альвеолярные макрофаги, помимо выполнения функций АПК, способны активироваться аллергенами (за счет распознавания их рецепторами TLR2, TLR4 и Dectin-1) и продуцировать провоспалительные цитокины, например TNF α , что также вносит вклад в патогенез БА [16, 17].

На эффекторной стадии при повторном контакте с аллергеном происходит его взаимодействие с IgE, который находится на поверхности тучных клеток и базофилов, что способствует их дегрануляции и высвобождению провоспалительных медиаторов (гистамина, лейкотриенов и хемокинов) во внесклеточное пространство. Гистамин и лейкотриены влияют на гладкую мускулатуру дыхательных путей, вызывая бронхоспазм, а также увеличивают проницаемость кровеносных сосудов, благодаря чему провоспалительные клетки (эозинофилы, нейтрофилы и лимфоциты) проникают в ткань легких из системного кровотока. В участке воспаления Th2-клетки активируются при повторном контакте с аллергеном и продуцируют IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13. Эти цитокины способствуют гиперпродукции слизи бронхиальным эпителием, гиперреактивности бронхов и привлечению эозинофилов в участок воспаления и их активации. Эозинофилы в ходе своей дегрануляции дополнительно высвобождают медиаторы воспаления, приводящие к повреждению окружающих тканей [4, 15] (рис. 1). Накоплено много экспериментальных доказательств участия Th2-цитокінов в патогенезе аллергической БА, что обобщено в ряде современных обзоров [18–20].

Примечательно, что гены всех вышеуказанных Th2-цитокінов в своей структуре имеют несколько интронов и экзонов. Соответственно, при формировании зрелых транскриптов молекулы мРНК-предшественников (пре-мРНК) подвергаются сплайсингу – процессу удаления интронов. Сплайсинг осуществляется мультисубъединичным комплексом – сплайсосомой, которая включает несколько малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП) и большое количество вспомогательных белков. Процесс сплайсинга представляет собой последовательное связывание и высвобождение мяРНП и вспомогательных факторов, в результате чего в цепи пре-мРНК происходит два разрыва (на 5'- и на 3'-конце интрона) с последующим сшиванием двух экзонов. В результате образуется зрелый мРНК-транскрипт. Молекулярный механизм сплайсинга

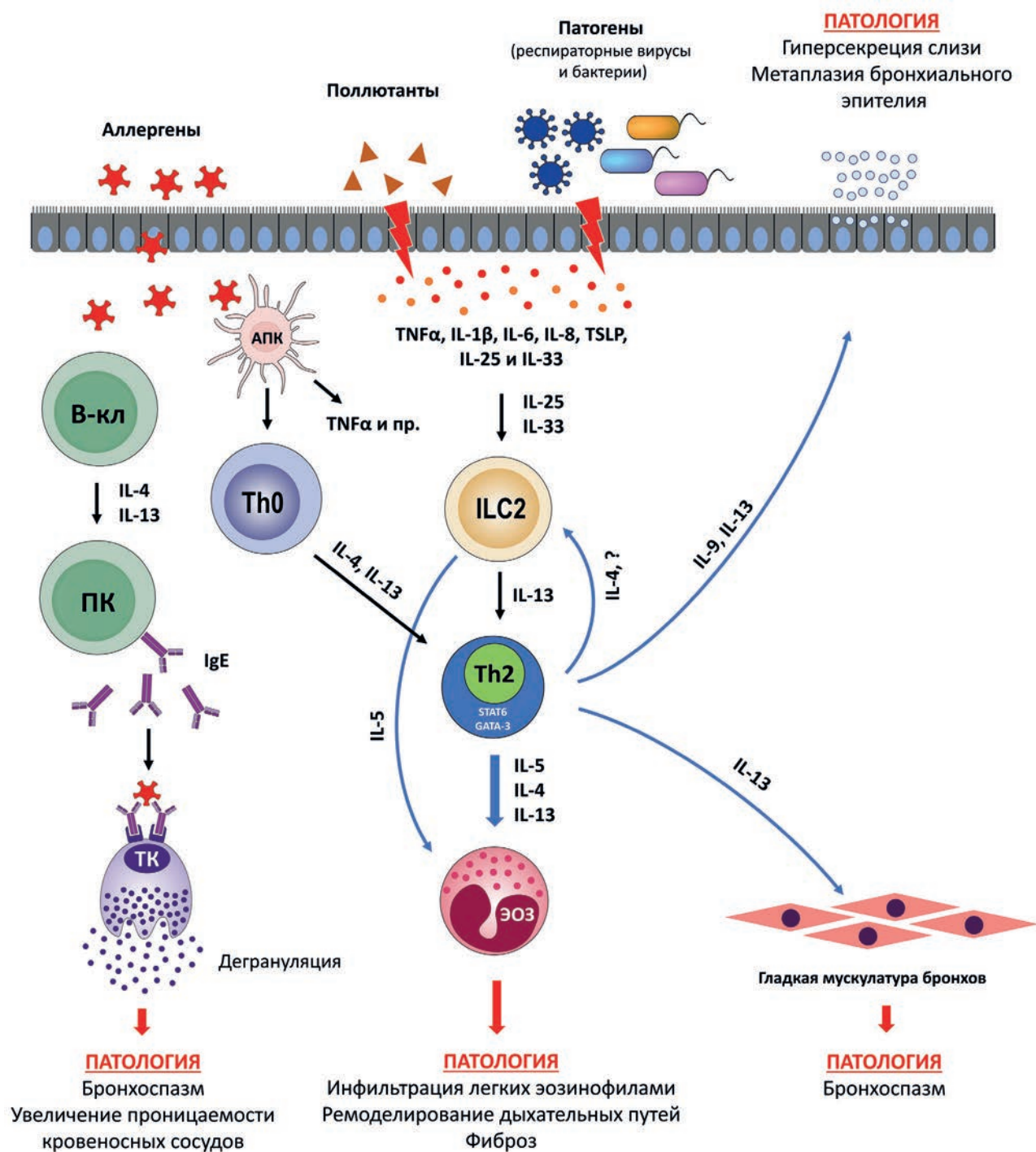


Рис. 1. Роль Th2-цитокинов в патогенезе аллергической БА. Аллерген поглощается АПК (например, дендритными клетками, макрофагами и др.), которые мигрируют в регионарные лимфоузлы, где стимулируют дифференцировку наивных Th0-клеток. Th0-Клетки дифференцируются в Th2 под действием IL-4 и IL-13. В свою очередь, Th2-клетки вырабатывают цитокины IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13. Под влиянием цитокинов (IL-4 и IL-13) происходит дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки (ПК) и синтез IgE. Молекулы IgE связываются со специфическими рецепторами (Fc ϵ R) на тучных клетках (ТК) и базофилах, что при повторном контакте с аллергеном приводит к их дегрануляции и высвобождению гистамина, лейкотриенов, и т.д., вызывая бронхоспазм и увеличивая проницаемость кровеносных сосудов. IL-5 способствует привлечению эозинофилов в участок воспаления, которые, в свою очередь, вызывают повреждение ткани легких. IL-13 напрямую действует на гладкую мускулатуру, вызывая бронхоспазм. IL-9 и IL-13 действуют на бронхиальный эпителий, приводя к гиперсекреции слизи. Аллергены (и прочие факторы) способны активировать эпителиальные клетки, что индуцирует продукцию ими провоспалительных факторов ($TN\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8, TSLP, IL-25 и IL-33). IL-25 и IL-33 активируют ILC2, которые продуцируют IL-5 и IL-13, последний из которых может усилить Th2-иммунный ответ. Th2-Клетки также способствуют экспансии ILC2 за счет продукции IL-4 и других факторов. Кроме того, аллергены активируют АПК при помощи рецепторов TLR2, TLR4 и Dectin-1, которые выступают дополнительными источниками провоспалительных цитокинов, например $TN\alpha$.

относительно хорошо изучен и подробно описан в ряде обзоров [21, 22].

Под альтернативным сплайсингом понимают процесс образования различных зрелых мРНК из одного предшественника, которые образуются в результате удаления из пре-мРНК не только интронов, но и экзонов (альтернативных экзонов). Этот механизм обеспечивает разнообразие транскриптов, белков и их функций. Большинство генов человека содержат несколько экзонов, при этом для 95% мультиэкзонных генов человека характерен альтернативный сплайсинг [23, 24]. Процесс альтернативного сплайсинга имеет сложную систему регуляции, которая заключается главным образом в повышении или уменьшении стерической доступности сайтов сплайсинга для сплайсосомы. В итоге, включение или исключение альтернативного экзона в зрелую мРНК определяется балансом активаторов и ингибиторов сплайсинга, наличием регуляторных последовательностей (энхансеров и сайленсеров) в пре-мРНК, ее вторичной структурой, которая может «маскировать» сайты сплайсинга [25], а также «скоростью работы» РНК-полимеразы [26]. Современные представления о молекулярных механизмах альтернативного сплайсинга обобщены в обзорах [24, 27, 28].

Поскольку гены Th2-цитокинов содержат несколько экзонов, то возможно существование альтернативных мРНК-транскриптов и изоформ белков. Для некоторых Th2-цитокинов (IL-4 и IL-5) были идентифицированы альтернативные изоформы белка и альтернативные мРНК-транскрипты, которые наравне с полноразмерными вариантами могут участвовать в патогенезе аллергической БА. В данном обзоре мы обобщаем сведения об известных на данный момент альтернативных мРНК-транскриптах и белковых изоформах Th2-цитокинов и анализируем их возможную роль в развитии аллергической БА, а также диагностический и терапевтический потенциал.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ Th2-ЦИТОКИНОВ

Принимая во внимание тот факт, что гены всех Th2-цитокинов в своей структуре имеют несколько интронов и экзонов, можно ожидать, что в результате альтернативного сплайсинга образуется несколько мРНК-транскриптов (таблица) [29–32]. Для генов, кодирующих IL-4 и IL-5, идентифицированы альтернативные изоформы белка и альтернативные мРНК-транскрипты, которые, предпо-

жительно, могут кодировать белки, так как содержат открытые рамки считывания (ORF, open reading frame) [29, 33]. Для гена, кодирующего IL-9, не идентифицировано альтернативных транскриптов. Единственный известный на сегодняшний день мРНК-транскрипт этого гена, кодирует полноразмерный IL-9 человека (144 а.о.); он имеет размер 605 нуклеотидов и состоит из 5 экзонов (таблица). Еще один Th2-цитокин (IL-13), хотя и имеет 4 альтернативных мРНК-транскрипта, однако все они не содержат ORF и, скорее всего, не кодируют белковые продукты, а следовательно их биологическая значимость неочевидна (таблица).

Учитывая, что альтернативные мРНК-транскрипты, кодирующие ORF, выявлены для IL-4 и IL-5, в данном обзоре мы более подробно рассматриваем именно эти цитокины. Также мы приводим анализ опубликованных экспериментальных данных о возможной роли альтернативных вариантов IL-4 и IL-5 в развитии аллергической астмы.

РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ IL-4 В БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

IL-4 – это многофункциональный цитокин, который был открыт в 1980-х гг. Главным образом он продуцируется Th2-клетками, а также тучными клетками, базофилами и эозинофилами [39]. IL-4 играет важную патогенетическую роль при астме. В частности, он вызывает дифференцировку Th2-лимфоцитов, синтез IgE В-клетками, альтернативную активацию макрофагов, выработку коллагена фибробластами, а также эозинофильное воспаление легких [40].

Свои биологические функции IL-4 реализует при помощи двух типов рецепторов. Тип I формируется цепями IL-4R α и γ c, а тип II – цепями IL-4R α и IL-13R α 1. Примечательно, что с рецептором типа II может связываться другой Th2-цитокин – IL-13. Большинство видов клеток экспрессируют оба типа рецепторов, однако тип I наиболее представлен на гемопоэтических клетках (Т-, В-клетках, макрофагах, эозинофилах, базофилах и тучных клетках), вследствие чего эти клетки реагируют преимущественно на IL-4. Рецептор типа II представлен на негемопоэтических клетках (эпителиальных, клетках гладкой мускулатуры и др.) (рис. 2) [41]. Вследствие значительного сходства рецепторов биологические эффекты IL-4 и IL-13 схожи. Однако различный профиль представленности рецепторов типов I и II на разных видах клеток обуславливают

Альтернативные мРНК-транскрипты Th2-цитокинов человека и их характеристика

Цитокин	ID мРНК-транскрипта в https://www.ensembl.org/	Размер мРНК- транскрипта, нукл	Белок	Описание	Ссылка
IL-4	ENST00000231449.7	615	153 а.о.	содержит все 4 экзона и кодирует полноразмерный белок IL-4	база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org
	ENST00000622422.1	717	предполагаемый белок 136 а.о.	отсутствует часть экзона-3 и экзона-4, кодирует ORF	
	ENST00000350025.2	414	137 а.о.	отсутствует экзон-2, кодирует изоформу IL-4δ2	база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org , [29, 34–38]
	ENST00000495905.1	305	нд	содержит фрагменты двух экзонов, не кодирует ORF	база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org
IL-5	ENST00000231454.6	815	134 а.о.	содержит все 4 экзона и кодирует полноразмерный белок IL-5	
	нд	нд	предполагаемый белок 123 а.о.	отсутствует экзон-2, предположительно, кодирует изоформу IL-5δ2	[33]
	ENST00000450655.1	276	51 а.о.	содержит фрагменты трех экзонов, кодирует ORF	
	ENST00000462418.1	905	нд	содержит фрагменты двух экзонов, не кодирует ORF	
IL-9	ENST00000274520.2	605	144 а.о.	содержит все 5 экзонов и кодирует полноразмерный белок IL-9	база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org
IL-13	ENST00000304506.7	1283	146 а.о.	содержит все 4 экзона и кодирует полноразмерный белок IL-13	
	ENST00000468334.5	1082	нд	не содержит экзонов, кодирующих ORF	
	ENST00000487267.5	1033	нд	не содержит экзонов, кодирующих ORF	
	ENST00000459878.5	777	нд	не содержит экзонов, кодирующих ORF	
	ENST00000462480.1	1562	нд	содержит фрагменты трех экзонов, не кодирует ORF	

Примечание. ORF – открытая рамка считывания (open reading frame); нукл – нуклеотиды; нд – данные отсутствуют.

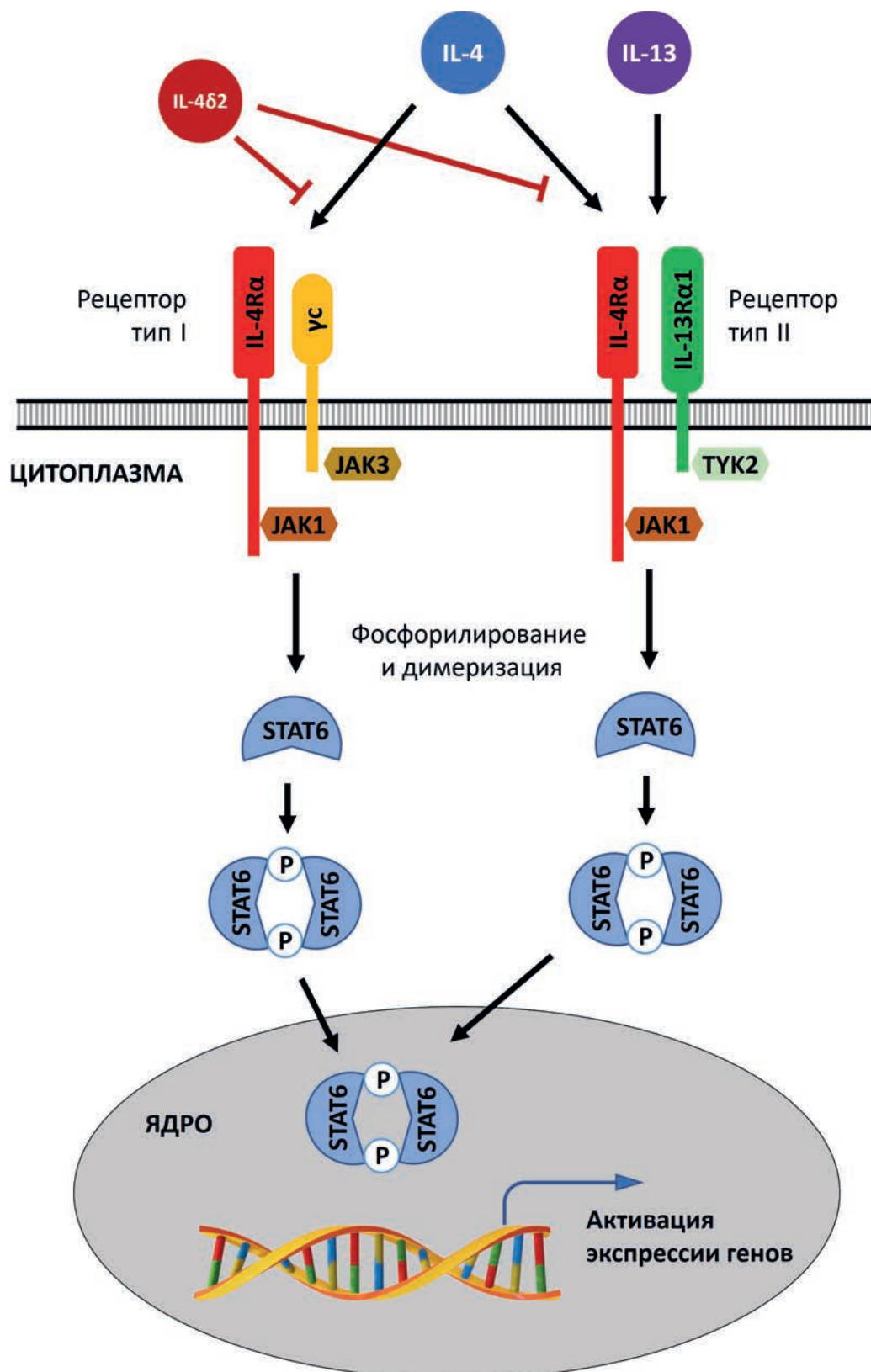


Рис. 2. Рецептор и сигнальные пути IL-4 и IL-4δ2, а также IL-13. IL-4 способен связываться с двумя типами рецепторов. Рецептор типа I состоит из цепей IL-4Rα и γc; рецептор типа II состоит из цепей IL-4Rα и IL-13Rα1. Другой Th2-цитокин – IL-13 – способен связываться только с рецептором типа II. После связывания IL-4 или IL-13 со своим рецепторным комплексом происходит фосфорилирование киназ YAK и TYK, а также фактора транскрипции STAT6. Фосфорилированный STAT6 димеризуется, после чего транслируется в ядро, где активирует экспрессию генов, отвечающих за развитие Th2-иммунного ответа. IL-4δ2 способен связываться с цепью рецептора IL-4Rα, препятствуя связыванию полноразмерного IL-4 со своим рецептором, тем самым ингибируя его активность

некоторые различия в биологических функциях этих цитокинов. В отличие от IL-4, IL-13 способен оказывать прямой эффект на клетки гладкой мускулатуры бронхов и тем самым опосредовать бронхоконстрикцию при БА [41, 42]. Кроме того, IL-13, действуя на эпителиальные клетки респираторного тракта, индуцирует гиперсекрецию слизи, что также является характерным проявлением этой патологии [41].

Связывание IL-4 с рецептором типа I приводит к активации киназ JAK1 и JAK3, а связывание IL-4 (или IL-13) с рецептором типа II активирует киназы JAK1 и TYK2/JAK2. Активированные киназы осуществляют фосфорилирование остатков тирозина в цитоплазматических доменах цепей рецептора, которые, в свою очередь, выступают в роли сайтов докинга для передачи сигнала последующей адапторной молекуле — фактору транскрипции STAT6. После активации путем фосфорилирования этот фактор формирует димеры, которые транслоцируются в ядро, где активирует транскрипцию определенных генов, вовлеченных в активацию Th2-клеток и развитие аллергических реакций (рис. 2) [41].

Ген, кодирующий IL-4, состоит из четырех экзонов [43, 44]. Полноразмерный белок IL-4 (153 а.о.) кодируется всеми четырьмя экзонами. У человека идентифицирована еще одна изоформа этого белка (IL-4δ2 размером 136 а.о.), кодируемая экзонами 1, 3 и 4; т.е. в результате альтернативного сплайсинга происходит делеция экзона-2. мРНК-транскрипт, кодирующий IL-4δ2, был идентифицирован методом секвенирования в 1996 г. [29]. Аналогичный мРНК-транскрипт был идентифицирован и у мышей, он выявлялся в селезенке и костном мозге [45]; позднее был идентифицирован соответствующий белок [36]. Также было показано, что оба транскрипта (кодирующих как полноразмерный, так и укороченный белок) выявлялись в более широком спектре тканей и клеток мыши [29, 34, 46–51]. При анализе базы данных было идентифицировано еще два альтернативных транскрипта, один из которых несет ORF, кодирующую предполагаемый белок размером 136 а.о. (таблица). Однако отсутствуют публикации, описывающие его возможные свойства.

Биологические функции IL-4δ2. После получения рекомбинантного белка IL-4δ2 была проведена серия экспериментов с целью установить его биологические эффекты. В культуре клеток было продемонстрировано, что, в отличие от полноразмерного цитокина, IL-4δ2 не влиял на пролиферацию Т-клеток [34] или экспрессию цитокинов (IFNγ, IL-1, IL-6, IL-8

и др.) моноцитами человека. В то же время IL-4δ2 ингибировал пролиферацию Т-клеток, индуцируемую полноразмерным IL-4 [34], и уменьшал его продукцию Th2-клетками [35], блокировал эффекты IL-4 в культуре моноцитов, а также ингибировал способность IL-4 запускать синтез IgE В-клетками [34]. Все эти данные указывают на то, что изоформа IL-4δ2 является негативным регулятором IL-4. Было показано, что IL-4δ2 способен связываться с теми же рецепторами, что и полноразмерный IL-4, это позволяет укороченной форме конкурентно ингибировать эффекты полноразмерной. Отсутствие фрагмента белка, кодируемого экзоном-2, приводит к изменению его трехмерной структуры, что уменьшает сродство IL-4δ2 к рецептору по сравнению с IL-4. Тем не менее этого сродства достаточно для конкурентного ингибирования эффектов IL-4 *in vitro* [34, 38] (рис. 2).

Дополнительно было показано, что в культуре первичных Т-лимфоцитов человека IL-4δ2 активировал продукцию IFNγ, IL-6, IL-10, MCP-1 и TNFα [35]. Способность этой изоформы активировать продукцию IFNγ подтверждает представления о том, что IL-4δ2 является негативным регулятором Th2-иммунного ответа и, соответственно, может принимать участие в патогенезе аллергической БА. Таким образом, исследования на клеточных культурах показали, что IL-4δ2 может быть антагонистом IL-4 и многообещающим терапевтическим агентом.

Способность IL-4δ2 негативно регулировать Th2-иммунный ответ подтверждается экспериментами *in vivo*, т.к. введение животным IL-4δ2 активировало продукцию IFNγ, являющегося антагонистом IL-4 [52–54]. Примечательно, что в ответ на введение IL-4δ2 в дыхательные пути мышей развивалось незначительное воспаление, выражавшееся в накоплении Т- и В-лимфоцитов в легких. В то же время введение IL-4 провоцировало более выраженное воспаление, характеризующееся не только инфильтрацией Т- и В-лимфоцитами, но и эозинофилами, а также гиперплазией бокаловидных клеток респираторного эпителия [36, 55]. Эти данные указывают на наличие собственной биологической активности IL-4δ2, которая, по всей видимости, опосредована рецептором для полноразмерного IL-4, так как нокаут мРНК, кодирующих STAT6 или IL-4R, значительно нивелировал IL-4δ2-индуцированную инфильтрацию лимфоцитов [55]. Независимость биологических свойств IL-4δ2 подтверждается также транскриптомными исследованиями, которые показывают, что IL-4

и IL-4δ2 влияют на экспрессию разных генов; IL-4 регулирует экспрессию 283 генов, а IL-4δ2 – 84 генов, при этом 38 из них регулируются IL-4δ2, но не IL-4. Эти исследования также продемонстрировали, что IL-4δ2 (а не IL-4) активировал IFN γ , тем самым подтверждая, что IL-4δ2 обладает Th1-подобными свойствами [55]. В итоге обе изоформы (IL-4 и IL-4δ2) демонстрируют различные биологические эффекты, реализующиеся по единому IL-4R α /STAT6-сигнальному пути [55]. Чтобы установить, какие молекулярные механизмы лежат в основе биологического эффекта IL-4δ2 *in vivo*, требуются дополнительные исследования.

Примечательно, что, в отличие от экспериментов *in vitro*, в экспериментах *in vivo* IL-4δ2 не ингибировал эффекты полноразмерной формы, т.к. их совместное введение животным не предотвращало эозинофилию легких [55]. Возможно, такое различие обусловлено перекрестными связями между различными типами клеток организма, отсутствующими в клеточной культуре. Также авторы этого исследования считают, что в условиях *in vivo* укороченная изоформа может иметь более высокую стабильность (за счет взаимодействия с другими белковыми факторами) и тем самым оказывает биологический эффект, отсутствующий *in vitro* [55].

Таким образом, ингибирование полноразмерного IL-4 без подавления IL-4δ2 может уменьшить воспаление, опосредованное эозинофилами, и продукцию слизи, но не воспаление, опосредованное другими типами клеток, например, лимфоцитами. Подавление обоих изоформ IL-4, вероятно, будет иметь более выраженный противовоспалительный эффект. С другой стороны, подавление укороченной изоформы (IL-4δ2), которая выступает в роли ингибитора полноразмерного IL-4, может иметь обратный эффект, приводя к усилению IL-4-опосредованного воспаления. Требуются более детальные исследования прежде всего в экспериментах на животных для уточнения биологических эффектов IL-4δ2.

Роль IL-4δ2 в БА. В ранних исследованиях была продемонстрирована экспрессия мРНК IL-4δ2 в мононуклеарных клетках периферической крови, тимоцитах и клетках бронхоальвеолярного лаважа. Эти первичные исследования не выявили связи уровня экспрессии мРНК-транскрипта IL-4δ2 с наличием астмы или ее тяжестью, т.к. мРНК-транскрипты обоих изоформ обнаруживались как у больных, так и у здоровых [35, 50, 56, 57]. В то же время оставалось неясным, продуцируется ли белок IL-4δ2 и какими клетками осуществляется

его секреция, коррелирует ли его уровень с наличием патологии (бронхиальной астмы), а также оказывает ли он регулирующее действие на первичные Т-клетки пациентов и здоровых добровольцев?

Разработка антител, которые селективно распознают изоформу IL-4δ2, позволила провести исследования его возможной роли в различных патологиях человека, включая БА. Было показано, что, несмотря на выявленную экспрессию мРНК-транскрипта IL-4δ2 как у здоровых, так и у пациентов в широком спектре клеток, белок продуцируется в основном активированными Т-клетками пациентов, страдающих БА, а не здоровых добровольцев. При этом дифференцированные Th1-, Th2- и Th17-клетки не являются основными продуцентами IL-4δ2 [35]. Примечательно, что кинетика секреции IL-4δ2 Т-клетками отличалась от таковой для полноразмерной формы. IL-4 имел пик продукции через 12–24 часа после стимуляции и снижался через 48 часов. Напротив, IL-4δ2 не обнаруживался через 12–24 часа, при этом его концентрация достигала максимумов через 48 часов, оставалась высокой через 72 и 96 часов. Таким образом, продукция IL-4δ2 активированными Т-клетками запускается позже, в сравнении с IL-4 [35]; это свидетельствует о том, что в ходе реализации Th2-иммунного ответа происходит переключение продукции с полноразмерной формы на IL-4δ2 путем альтернативного сплайсинга. Вероятнее всего, такое переключение регулируется избыточным Th2-иммунным ответом при БА. В то же время стимулы к переключению на продукцию IL-4δ2 на данный момент не установлены.

Первоначальные исследования в культуре клеток показали, что IL-4δ2 не проявлял собственных биологических эффектов (на пролиферацию Т-клеток, синтез IgE В-клетками и т.д.), а являлся антагонистом полноразмерной формы [34, 37]. Однако в последующих экспериментах на мышах было показано, что IL-4δ2 независимо от IL-4 индуцирует инфильтрацию легких лимфоцитами [36, 55]. В дальнейшем Luzina et al. [35] предположили, что IL-4δ2 активирует лимфоциты, не вызывая их пролиферацию. В действительности Т-клетки как здоровых людей, так и пациентов с астмой после стимуляции этой изоформой продуцировали Th1-цитокин – IFN γ , при этом IL-4δ2 не влиял на продукцию Th2-цитокинов (IL-5, IL-13) и Th17-цитокина (IL-17) [35]. Эти результаты согласуются с предыдущими данными исследований *in vivo* [36, 55], что позволяет считать IL-4δ2 про-Th1-цитокином.

Таким образом, IL-4 δ 2 продуцируется Т-клетками не только в виде мРНК, но и в качестве белка. При этом продукция данной изоформы ассоциирована с аллергической БА, вследствие чего она может выступать в роли биомаркера этой патологии. Выявленные различия в кинетике секреции IL-4 и IL-4 δ 2 позволяют предполагать, что IL-4 δ 2, являясь про-Th1-цитокином, негативно регулирует Th2-иммунный ответ при БА, что позволяет рассматривать ее как потенциальное терапевтическое средство.

РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ IL-5 В БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Цитокин IL-5 был впервые описан несколькими независимыми группами ученых как фактор роста В-клеток и фактор дифференциации эозинофилов [58–61]. Несколько позднее был идентифицирован IL-5 человека [30]. IL-5 мыши имеет размер 133 а.о., включая последовательность сигнального пептида (21 а.о.) и три сайта для N-гликозилирования. IL-5 человека размером 134 а.о. имеет сигнальный пептид размером 22 а.о., а также два сайта для N-гликозилирования. Биологически активный IL-5 существует в виде димеров, связанных дисульфидными связями. Именно в форме димера он взаимодействует со своим рецептором, состоящим из двух цепей (IL5R α и IL5R β), и реализует свои биологические эффекты [62]. Этот цитокин индуцирует дифференцировку, рекрутирование и выживание эозинофилов в очаге воспаления, в т.ч. в легких при аллергической БА [63].

Возможная роль альтернативных форм IL-5 в БА. Анализ структуры гена показал, что IL-5 содержит 4 экзона. Соответственно, возможно существование нескольких альтернативных мРНК-транскриптов. Анализ базы данных показал отсутствие альтернативных мРНК-транскриптов IL-5 мыши. Однако имеются сведения о двух альтернативных транскриптах IL-5 человека (таблица). Первый (TranscriptID: ENST00000450655.1) содержит фрагменты трех экзонов (полностью отсутствует экзон-4) и может кодировать белок размером 51 а.о., а второй (TranscriptID: ENST00000462418.1) содержит фрагменты двух экзонов и не имеет ORF, поэтому, скорее всего, не кодирует белкового продукта.

В недавней работе описана идентификация новых мРНК-транскриптов IL-5 человека и мыши, которые лишены экзона-2 (33 нуклеотида) [33]. Альтернативные тран-

скрипты были обозначены как mIL-5 δ 2 (для мыши) и hIL-5 δ 2 (для человека). Важно отметить, что экзон-2 гена человека имеет такой же размер (33 п.н.), что и экзон-2 гена мыши. Следовательно, предполагаемые белковые изоформы на 11 а.о. короче полноразмерных IL-5 человека и мыши. Делеция экзона-2 может происходить в результате альтернативного сплайсинга. Показано, что мРНК IL-5 δ 2 экспрессируется вместе с канонической формой в различных активированных лимфоидных тканях мыши (тимус, селезенка, лимфоузлы и клетки крови). Как и IL-4 δ 2, мРНК-транскрипт IL-5 δ 2 человека наблюдали в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) здоровых добровольцев и пациентов с аллергической астмой [33].

Поскольку отсутствуют коммерческие моноклональные антитела, которые индивидуально распознают укороченную или полноразмерную форму IL-5, были проведены эксперименты по индивидуальному клонированию этих транскриптов в плазмидный вектор с последующей экспрессией соответствующих белков (полноразмерного и укороченного) в клетках млекопитающих. В ходе этих экспериментов продемонстрировано, что новая изоформа IL-5 δ 2 может экспрессироваться в виде белка внутри клеток и секретироваться во внеклеточное пространство, но с меньшей интенсивностью (примерно на 30%) в сравнении с полноразмерным IL-5. С применением поликлональных антител (распознают обе изоформы IL-5) и метода конфокальной микроскопии продемонстрировано, что полноразмерный IL-5 преимущественно локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), тогда как укороченная изоформа обнаруживается в ЭР в меньшей степени. Обычно сначала цитокины образуются в ЭР, а затем транспортируются в комплекс Гольджи. Такая измененная компартментализация белка IL-5 δ 2 (вне ЭР) может свидетельствовать о его частичной деградации и нарушенной секреции. Тем не менее наблюдаемые различия в экспрессии и секреции полноразмерной и укороченной форм не были существенными [33].

Примечательно, что идентифицированные транскрипты IL-5 δ 2 (человека и мыши) имеют значительное сходство с ранее идентифицированным транскриптом IL-4 δ 2; у обоих происходит делеция второго экзона (который кодирует 11 и 16 а.о. соответственно) [64]. IL-4 δ 2 человека экспрессируется в клетке на уровне белка [50, 55, 56], специфически взаимодействует с рецептором и конкурирует

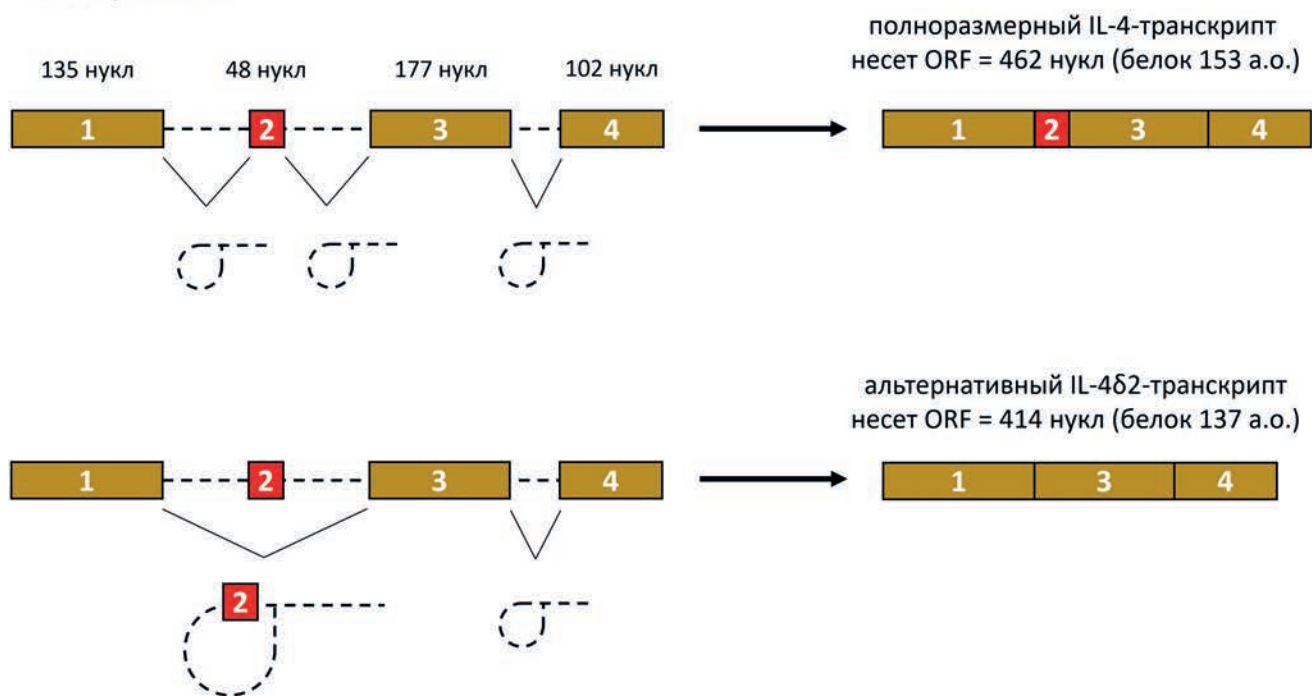
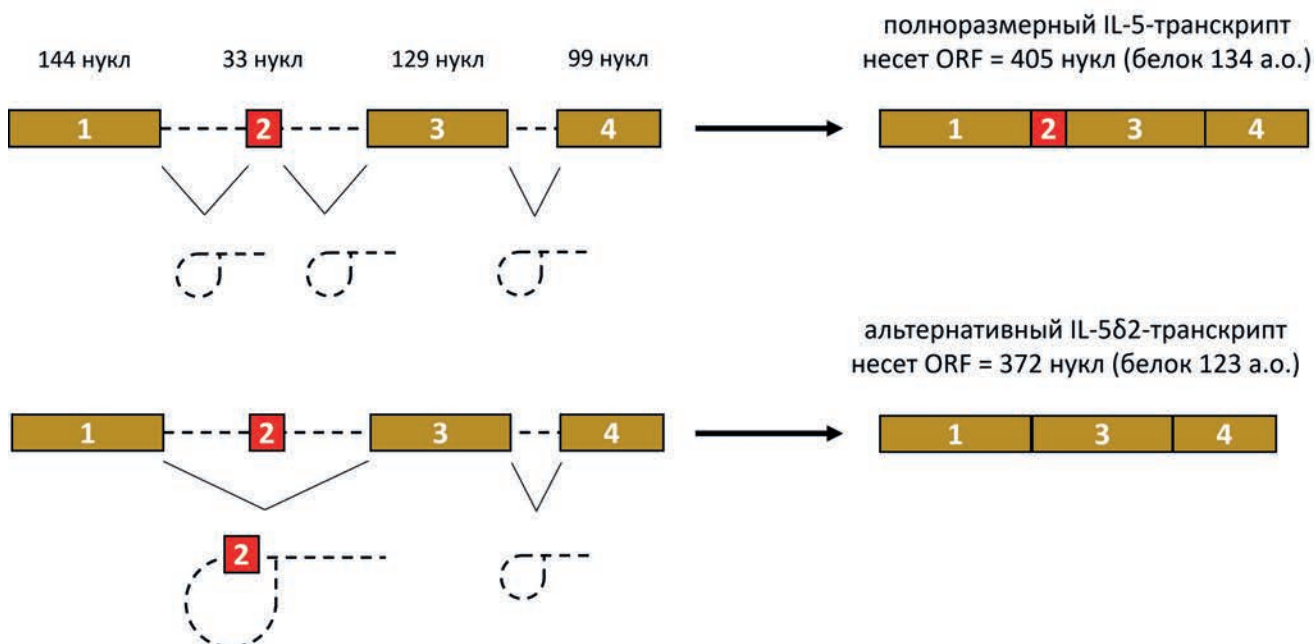
IL-4 пре-мРНК**IL-5 пре-мРНК**

Рис. 3. Механизм альтернативного сплайсинга генов, кодирующих IL-4 и IL-5 человека. На рисунке представлена схема структуры интронов и экзонов генов, кодирующих IL-4 и IL-5. В ходе созревания из пре-мРНК в результате сплайсинга удаляются интроны, а четыре экзона объединяются в зрелый мРНК-транскрипт. Сплайсинг, в ходе которого происходит первый разрыв цепи пре-мРНК на 5'-конце интрона, а второй — на 3'-конце интрона и последующее объединение двух экзонов, осуществляется сплайсосомой (мультисубъединичным комплексом). В результате образуется зрелый мРНК-транскрипт и интрон в циклической форме. В ходе альтернативного сплайсинга происходит удаление самого короткого экзона-2 (альтернативного экзона — отмечен красным) и формирование альтернативного мРНК-транскрипта, включающего экзоны 1, 3 и 4; нукл — нуклеотид

с полноразмерным IL-4 [34, 37]. Таким образом, аффинность IL-4δ2 к рецептору существенно не изменяется, несмотря на делецию 16 а.о. [65].

Размер белка, который транслируется с мРНК IL-5δ2 мыши, должен составлять 122 а.о., а человека — 123 а.о., что на 11 а.о. меньше полноразмерных цитокинов. Ввиду того что происходит делеция самого короткого экзона, предполагаемый белок IL-5δ2 может быть структурно очень похож на полноразмерный IL-5. Однако в проведенном исследовании продемонстрировано, что белок IL-5δ2 мыши обнаруживался с помощью поликлональных, а не моноклональных антител. Это позволяет предположить, что 11 а.о., соответствующие экзону-2, могут быть важны для формирования эпитопной структуры цитокина [33].

Предшествующее исследование [65] показало, что полноразмерный белок IL-5 состоит из четырех α-спиралей (α1–α4), соединенных тремя петлями, содержащими β-тяжи и неупорядоченные участки. Важно отметить, что изоформа IL-5δ2, несмотря на делецию экзона-2, сохраняет консервативный остаток цистеина в положении 62. Этот остаток необходим для образования функционального гомодимера, т.к. он участвует в образовании двух межулярных дисульфидных связей Cys62–Cys104 и Cys104–Cys62. Одиннадцать а.о., отсутствующих в IL-5δ2, полностью локализованы в петле α1–α2. Эти остатки участвуют в образовании межцепочечных водородных связей, тем самым стабилизируют структуру димера IL-5 и формируют правильную ориентацию для взаимодействия с рецептором. Следовательно, делеция этого фрагмента потенциально может влиять на фолдинг белка IL-5δ2 и его взаимодействие с рецептором. Кроме того, показано, что не только петля α3–α4, но и петля α1–α2 принимают непосредственное участие во взаимодействии IL-5 с рецептором [66].

Способен ли IL-5δ2 связываться с рецептором и конкурентно ингибировать полноразмерный IL-5, еще предстоит выяснить. Создание реагентов для специфического обнаружения белка IL-5δ2, очистка рекомбинантного белка, исследования цитокиновых рецепторов, селективный нокдаун мРНК, кодирующих изоформы IL-5, и другие методы позволят уточнить функцию ранее неизвестной изоформы IL-5.

Таким образом, IL-5δ2 образуется в результате альтернативного сплайсинга из пре-мРНК путем делеции самого короткого экзона-2 и включения в зрелый транскрипт экзонов 1, 3 и 4. IL-5δ2 имеет значительное сходство с ранее идентифицированной изоформой IL-4δ2,

которая также в результате альтернативного сплайсинга из четырех экзонов утрачивает самый короткий экзон-2 (рис. 3). Изоформа IL-4δ2 была идентифицирована значительно ранее, чем IL-5δ2, поэтому ее биологические эффекты более изучены. Согласно текущим представлениям, IL-4δ2 негативно регулирует активность полноразмерной формы IL-4, в частности, нивелирует избыточный Th2-иммунный ответ при БА. Учитывая значительное сходство IL-4δ2 и IL-5δ2, можно полагать, что IL-5δ2 также может играть определенную роль в патогенезе БА, например, негативно регулировать активность полноразмерного IL-5 и уменьшать избыточное эозинофильное воспаление в легких. Однако данное предположение требует подтверждения прежде всего в экспериментах *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аллергическая БА к настоящему времени является самым изученным фенотипом этого заболевания. Многими исследованиями показано, что Th2-цитокины (IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13) — это одни из ключевых участников ее патогенеза. Именно они формируют основные проявления патологии: продукцию IgE, эозинофильное воспаление легких, гиперреактивность бронхов и гиперсекрецию слизи респираторным эпителием [4]. Гены, кодирующие эти цитокины, состоят из нескольких экзонов; IL-4, IL-5 и IL-13 имеют четыре экзона, а IL-9 — пять (таблица). Благодаря такому мозаичному строению генов возможно существование альтернативных изоформ этих цитокинов. Анализ научной литературы и баз данных показал наличие альтернативных мРНК-транскриптов для IL-4 [67], IL-5 [33] и IL-13 (база данных строения геномов позвоночных, ensembl.org). При этом у IL-4 и IL-5 выявлены альтернативные транскрипты, которые несут ORF, а следовательно, могут кодировать функциональные белки (таблица).

Для IL-4 была идентифицирована изоформа IL-4δ2, которая в результате альтернативного сплайсинга утратила часть, кодируемую экзонами-2. Т-Клетки пациентов, у которых была диагностирована аллергическая астма, способны секретировать IL-4δ2, тогда как Т-клетки здоровых добровольцев — нет. Это обстоятельство позволяет рассматривать IL-4δ2 в качестве биомаркера этой патологии [67]. Кроме того, обобщив результаты опубликованных исследований, можно полагать, что укороченная изоформа IL-4δ2, скорее всего, является

негативным регулятором полноразмерного IL-4, так как способна конкурировать с ним за связывание с рецептором, а также активировать экспрессию IFN γ , который является антагонистом IL-4 [67]. Учитывая это, IL-4 δ 2 можно рассматривать в качестве потенциального терапевтического средства для подавления избыточного Th2-иммунного ответа, который лежит в основе патогенеза аллергической БА.

Примечательно, что структура экзонов гена, кодирующего IL-5, очень сходна с таковой для IL-4. Оба гена кодируют четыре экзона, при этом самый короткий — это экзон-2. Как и в случае с IL-4, для IL-5 был обнаружен альтернативный мРНК-транскрипт с делецией экзона-2 (IL-5 δ 2). Клонирование этого транскрипта в экспрессионный вектор позволило установить, что IL-5 δ 2 может синтезироваться в виде белка и секретироваться во внеклеточное пространство. Более того, делеция экзона-2 не затрагивает остатки цистеина, необходимые для образования функционального гомодимера. Все эти факты позволяют с высокой степенью вероятности предполагать существование естественной альтернативной изоформы IL-5 δ 2, которая может играть роль негативного регулятора IL-5 в патогенезе БА. Создание моноклональных антител для специфического обнаружения IL-5 δ 2, а также получение рекомбинантного белка позволит в будущем раскрыть его биологическую функцию. В случае подтверждения способности новой изоформы подавлять неблагоприятные эффекты IL-5 она также может выступать в роли потенциального терапевтического средства для лечения аллергической БА.

В настоящее время появляется много лекарственных средств для так называемой антицитокиновой терапии бронхиальной астмы [15]. Суть этого подхода заключается в создании ингибиторов патогенетически значимых цитокинов (прежде всего, Th2-цитокинов). В качестве таких ингибиторов часто

используют моноклональные антитела, которые нейтрализуют либо сам цитокин, либо его рецептор, тем самым прерывая развитие патологического процесса [15]. Многие препараты на основе моноклональных антител, разработанные для терапии БА, имеют ограниченную эффективность [15]. Одним из наиболее успешных препаратов для лечения БА является Dupilumab [68]. Он содержит моноклональное антитело, которое нейтрализует общую цепь рецептора для IL-4 и IL-13 (IL-4R α), тем самым нивелирует патологические эффекты обоих цитокинов одновременно [69]. Клинические исследования подтвердили его эффективность (прежде всего, при лечении пациентов с высоким уровнем эозинофилов) [70–72], а сам препарат одобрен для медицинского применения во многих странах мира, в том числе и в России. Наряду с ограниченной эффективностью [15], один из главных недостатков препаратов на основе моноклональных антител — высокая стоимость [73, 74]. В то же время получение рекомбинантных белковых ингибиторов (например, IL-4 δ 2 и IL-5 δ 2) является более дешевой технологией, чем получение моноклональных антител, что может открыть новые перспективы в создании противовоспалительных препаратов.

Вклад авторов. И.П. Шиловский, М.Р. Хаитов — концепция и руководство работой; В.И. Ковчина — написание текста; Е.Д. Тимофеевич, А.А. Никольский — редактирование текста статьи, подготовка иллюстраций.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00546, <https://rscf.ru/project/23-24-00546/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Initiative for Asthma (2022) *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*.
2. Soriano, J. B., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abera, S. F., Agrawal, A., Ahmed, M. B., Aichour, A. N., Aichour, I., Eddine Aichour, M. T., Alam, K., Alam, N., Alkaabi, J. M., Al-Maskari, F., Alvis-Guzman, N., Amberbir, A., Amoako, Y. A., Ansha, M. G., Antó, J. M., Asayesh, H., Atey, T. M., Avokpaho, E. F. G. A., Barac, A., Basu, S., Bedi, N., Bensenor, I. M., Berhane, A., Beyene, A. S., Bhutta, Z. A., Biryukov, S., Boneya, D. J., Brauer, M., Carpenter, D. O., Casey, D., Christopher, D. J., Dandona, L., Dandona, R., Dharmaratne, S. D., Do, H. P., Fischer, F., Gebrehiwot, T. T., Geleto, A., Ghoshal, A. G., Gillum, R. F., Mohamed Ginawi, I. A., Gupta, V., Hay, S. I., Hedayati, M. T., Horita, N., Hosgood, H. D.,

- Jakovljevic, M. M. B., James, S. L., Jonas, J. B., Kasaecian, A., Khader, Y. S., Khalil, I. A., Khan, E. A., Khang, Y. H., Khubchandani, J., Knibbs, L. D., Kosen, S., Koul, P. A., Kumar, G. A., Leshargie, C. T., Liang, X., Magdy Abd El Razek, H., Majeed, A., Malta, D. C., Manhertz, T., Marquez, N., Mehari, A., Mensah, G. A., Miller, T. R., Mohammad, K. A., Mohammed, K. E., Mohammed, S., Mokdad, A. H., Naghavi, M., Nguyen, C. T., Nguyen, G., Nguyen, Q. Le, Nguyen, T. H., Ningrum, D. N. A., Nong, V. M., Obi, J. I., Odeyemi, Y. E., Ogbo, F. A., Oren, E., Mahesh, P. A., Park, E. K., Patton, G. C., Paulson, K., Qorbani, M., Quansah, R., Rafay, A., Rahman, M. H. U., Rai, R. K., Rawaf, S., Reinig, N., Safiri, S., Sarmiento-Suarez, R., Sartorius, B., Savic, M., Sawhney, M., Shigematsu, M., Smith, M., Tadese, F., Thurston, G. D., Topor-Madry, R., Tran, B. X., Ukwaja, K. N., van Boven, J. F. M., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Wan, X., Werdecker, A., Hanson, S. W., Yano, Y., Yimam, H. H., Yonemoto, N., Yu, C., Zaidi, Z., Sayed Zaki, M. El, Lopez, A. D., Murray, C. J. L., and Vos, T. (2017) Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015, *Lancet Respir. Med.*, **5**, 691-706, doi: 10.1016/S2213-2600(17)30293-X.
3. Avdeev, S. N., Nenasheva, N. M., Zhudnikov, K. V., Petrakovskaya, V. A., and Izyumova, G. V. (2018) Prevalence, morbidity, phenotypes and other characteristics of severe bronchial asthma in Russian Federation, *Pulmonologiya*, **28**, 341-358, doi: 10.18093/0869-0189-2018-28-3-341-358.
4. Bush, A. (2019) Pathophysiological mechanisms of asthma, *Front. Pediatr.*, **7**, 68, doi: 10.3389/fped.2019.00068.
5. Kuruvilla, M. E., Lee, F. E. H., and Lee, G. B. (2019) Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **56**, 219-233, doi: 10.1007/s12016-018-8712.
6. Shilovskiy, I. P., Nikolskii, A. A., Kurbacheva, O. M., and Khaitov, M. R. (2020) Modern view of neutrophilic asthma molecular mechanisms and therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 854-868, doi: 10.1134/S0006297920080027.
7. Lambrecht, B. N., Persson, E. K., and Hammad, H. (2017) Myeloid cells in asthma, *Microbiol. Spectr.*, **5**, 1-17, doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0053-2016.
8. Barnes, P. J. (2001) Th2 cytokines and asthma: an introduction, *Respir. Res.*, **2**, 64-65, doi: 10.1186/rr39.
9. Choi, J., Lim, J. W., and Kim, H. (2015) Lycopene inhibits house dust mites-induced TLR4 activation and oxidative stress in respiratory epithelial cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **86**, S21, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.082.
10. Shin, S. H., Ye, M. K., Lee, D. W., Chae, M. H., and Han, B. D. (2020) Nasal epithelial cells activated with *Alternaria* and house dust mite induce not only Th2 but also Th1 immune responses, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2693, doi: 10.3390/ijms21082693.
11. Wang, C., Liu, Q., Chen, F., Xu, W., Zhang, C., and Xiao, W. (2016) IL-25 promotes Th2 immunity responses in asthmatic mice via nuocytes activation, *PLoS One*, **11**, e0162393, doi: 10.1371/journal.pone.0162393.
12. Eiwegger, T., and Akdis, C. A. (2011) IL-33 links tissue cells, dendritic cells and Th2 cell development in a mouse model of asthma, *Eur. J. Immunol.*, **41**, 1535-1538, doi: 10.1002/eji.201141668.
13. Khaitov, M. R., Gaisina, A. R., Shilovskiy, I. P., Smirnov, V. V., Ramenskaia, G., Nikonova, A. A., and Khaitov, R. M. (2018) The role of interleukin 33 in pathogenesis of bronchial asthma. New experimental data, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 13-25, doi: 10.1134/S0006297918010029.
14. Gurram, R. K., Wei, D., Yu, Q., Butcher, M. J., Chen, X., Cui, K., Hu, G., Zheng, M., Zhu, X., Oh, J., Sun, B., Urban, J. F., Zhao, K., Leonard, W. J., and Zhu, J. (2023) Crosstalk between ILC2s and Th2 cells varies among mouse models, *Cell Rep.*, **42**, 112073, doi: 10.1016/j.celrep.2023.112073.
15. Shilovskiy, I. P., Eroshkina, D. V., Babakhin, A. A., and Khaitov, M. R. (2017) Anticytokine therapy of allergic asthma, *Mol. Biol.*, **51**, 1-13, doi: 10.7868/S0026898416060197.
16. Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L., and Marr, K. A. (2006) Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states, *J. Immunol.*, **176**, 3717-3724, doi: 10.4049/jimmunol.176.6.3717.
17. Ito, T., Hirose, K., Norimoto, A., Tamachi, T., Yokota, M., Saku, A., Takatori, H., Saijo, S., Iwakura, Y., and Nakajima, H. (2017) Dectin-1 plays an important role in house dust mite-induced allergic airway inflammation through the activation of CD11b⁺ dendritic cells, *J. Immunol.*, **198**, 61-70, doi: 10.4049/jimmunol.1502393.
18. Komlósi, Z. I., van de Veen, W., Kovács, N., Szűcs, G., Sokolowska, M., O'Mahony, L., Akdis, M., and Akdis, C. A. (2022) Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma, *Mol. Aspects Med.*, **85**, 100995, doi: 10.1016/j.mam.2021.100995.
19. Habib, N., Pasha, M. A., and Tang, D. D. (2022) Current understanding of asthma pathogenesis and biomarkers, *Cells*, **11**, 2764, doi: 10.3390/cells11172764.
20. Gans, M. D., and Gavrilo, T. (2020) Understanding the immunology of asthma: pathophysiology, biomarkers, and treatments for asthma endotypes, *Paediatr. Respir. Rev.*, **36**, 118-127, doi: 10.1016/j.prrv.2019.08.002.
21. Singh, R. K., and Cooper, T. A. (2012) Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics, *Trends Mol. Med.*, **18**, 472-482, doi: 10.1016/j.molmed.2012.06.006.

22. Sahebi, M., Hanafi, M. M., van Wijnen, A. J., Azizi, P., Abiri, R., Ashkani, S., and Taheri, S. (2016) Towards understanding pre-mRNA splicing mechanisms and the role of SR proteins, *Gene*, **587**, 107-119, doi: 10.1016/j.gene.2016.04.057.
23. Chen, M., and Manley, J. L. (2009) Mechanisms of alternative splicing regulation: Insights from molecular and genomics approaches, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 741-754, doi: 10.1038/nrm2777.
24. Zhang, Y., Qian, J., Gu, C., and Yang, Y. (2021) Alternative splicing and cancer: a systematic review, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **6**, 78, doi: 10.1038/s41392-021-00486-7.
25. Hiller, M., Zhang, Z., Backofen, R., and Stamm, S. (2007) Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition, *PLoS Genet.*, **3**, 2147-2155, doi: 10.1371/journal.pgen.0030204.
26. De La Mata, M., Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A. R. (2003) A slow RNA polymerase II affects alternative splicing *in vivo*, *Mol. Cell*, **12**, 525-532, doi: 10.1016/j.molcel.2003.08.001.
27. Marasco, L. E., and Kornblihtt, A. R. (2023) The physiology of alternative splicing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **24**, 242-254, doi: 10.1038/s41580-022-00545-z.
28. Peng, Q., Zhou, Y., Oyang, L., Wu, N., Tang, Y., Su, M., Luo, X., Wang, Y., Sheng, X., Ma, J., and Liao, Q. (2022) Impacts and mechanisms of alternative mRNA splicing in cancer metabolism, immune response, and therapeutics, *Mol. Ther.*, **30**, 1018-1035, doi: 10.1016/j.ymthe.2021.11.010.
29. Alms, W. J., Atamas, S. P., Yurovsky, V. V., and White, B. (1996) Generation of a variant of human interleukin-4 by alternative splicing, *Mol. Immunol.*, **33**, 361-370, doi: 10.1016/0161-5890(95)00154-9.
30. Kinashi, T., Harada, N., Severinson, E., Tanabe, T., Sideras, P., Konishi, M., Azuma, C., Tominaga, A., Bergstedt-Lindqvist, S., Takahashi, M., Matsuda, F., Yaoita, Y., Takatsu, K., and Honjo, T. (1986) Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and identity with B-cell growth factor II, *Nature*, **324**, 70-73, doi: 10.1038/324070a0.
31. McKenzie, A. N., Li, X., Largaespada, D. A., Sato, A., Kaneda, A., Zurawski, S. M., Doyle, E. L., Milatovich, A., Francke, U., and Copeland, N. G. (1993) Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes, *J. Immunol.*, **150**, 5436-5444, doi: 10.4049/jimmunol.150.12.5436.
32. Townsend, M. J., Fallon, P. G., Matthews, D. J., Smith, P., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. J. (2000) IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development, *Immunity*, **13**, 573-583, doi: 10.1016/S1074-7613(00)00056-X.
33. Shilovskiy, I., Andreev, S., Mazurov, D., Barvinskaya, E., Bolotova, S., Nikolskii, A., Sergeev, I., Maerle, A., Kudlay, D., and Khaitov, M. (2020) Identification of a novel splice variant for mouse and human interleukin-5, *Heliyon*, **6**, e03586, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03586.
34. Atamas, S. P., Choi, J., Yurovsky, V. V., and White, B. (1996) An alternative splice variant of human IL-4, IL-4 delta 2, inhibits IL-4-stimulated T cell proliferation, *J. Immunol.*, **156**, 435-441.
35. Luzina, I. G., Lockatell, V., Lavanian, S., Pickering, E. M., Kang, P. H., Bashkatova, Y. N., Andreev, S. M., and Atamas, S. P. (2012) Natural production and functional effects of alternatively spliced interleukin-4 protein in asthma, *Cytokine*, **58**, 20-26, doi: 10.1016/j.cyto.2011.12.017.
36. Luzina, I. G., Lockatell, V., Todd, N. W., Keegan, A. D., Hasday, J. D., and Atamas, S. P. (2011) Splice isoforms of human interleukin-4 are functionally active in mice *in vivo*, *Immunology*, **132**, 385-393, doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03393.x.
37. Arinobu, Y., Atamas, S. P., Otsuka, T., Niino, H., Yamaoka, K., Mitsuyasu, H., Niho, Y., Hamasaki, N., White, B., and Izuhara, K. (1999) Antagonistic effects of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4delta2, on IL-4 activities in human monocytes and B cells, *Cell. Immunol.*, **191**, 161-167, doi: 10.1006/cimm.1998.1431.
38. Zav'yalov, V. P., Denesyuk, A. I., White, B., Yurovsky, V. V., Atamas, S. P., and Korpela, T. (1997) Molecular model of an alternative splice variant of human IL-4, IL-4delta2, a naturally occurring inhibitor of IL-4-stimulated T cell proliferation, *Immunol. Lett.*, **58**, 149-152, doi: 10.1016/S0165-2478(97)00083-7.
39. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., and Paul, W. E. (1999) The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic functions, *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 701-738, doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.701.
40. Moran, A., and Pavord, I. D. (2020) Anti-IL-4/IL-13 for the treatment of asthma: the story so far, *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **20**, 283-294, doi: 10.1080/14712598.2020.1714027.
41. Nur Husna, S. M., Md Shukri, N., Mohd Ashari, N. S., and Wong, K. K. (2022) IL-4/IL-13 axis as therapeutic targets in allergic rhinitis and asthma, *PeerJ*, **10**, e13444, doi: 10.7717/peerj.13444.
42. Eum, S. Y., Maghni, K., Tolloczko, B., Eidelman, D. H., and Martin, J. G. (2005) IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **288**, 576-584, doi: 10.1152/ajplung.00380.2003.
43. Otsuka, T., Villaret, D., Yokota, T., Takebe, Y., Lee, F., Arai, N., and Arai, K. I. (1987) Structural analysis of the mouse chromosomal gene encoding interleukin 4 which expresses B cell, T cell and mast cell stimulating activities, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 333-344, doi: 10.1093/nar/15.1.333.

44. Arai, N., Nomura, D., Villaret, D., DeWaal Malefijt, R., Seiki, M., Yoshida, M., Minoshima, S., Fukuyama, R., Maekawa, M., and Kudoh, J. (1989) Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression, *J. Immunol.*, **142**, 274-282, doi: 10.4049/jimmunol.142.1.274.
45. Yatsenko, O. P., Filipenko, M. L., Khrapov, E. A., Voronina, E. N., Kozlov, V. A., and Sennikov, S. V. (2004) Alternative splicing of mRNA of mouse interleukin-4 and interleukin-6, *Cytokine*, **28**, 190-196, doi: 10.1016/j.cyto.2004.08.009.
46. Orsini, B., Vivas, J. R., Ottanelli, B., Amedei, A., Surrenti, E., Galli, A., Milani, S., Pinzani, P., Del Prete, G., Surrenti, C., Baldari, C. T., Touati, E., and D'Elis, M. M. (2007) Human gastric epithelium produces IL-4 and IL-4 δ 2 isoform only upon *Helicobacter pylori* infection, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **20**, 809-818, doi: 10.1177/039463200702000417.
47. Orsini, B., Ottanelli, B., Amedei, A., Surrenti, E., Capanni, M., Del Prete, G., Amorosi, A., Milani, S., D'Elis, M. M., and Surrenti, C. (2003) *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island is associated with reduced expression of interleukin-4 (IL-4) mRNA and modulation of the IL-4 δ 2 mRNA isoform in human gastric mucosa, *Infect. Immun.*, **71**, 6664-6667, doi: 10.1128/IAI.71.11.6664-6667.2003.
48. Pouliot, P., Turmel, V., G  linas,   ., Laviolette, M., and Bissonnette,   . Y. (2005) Interleukin-4 production by human alveolar macrophages, *Clin. Exp. Allergy*, **35**, 804-810, doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02246.x.
49. Plante, S., Semlali, A. H., Joubert, P., Bissonnette,   ., Laviolette, M., Hamid, Q., and Chakir, J. (2006) Mast cells regulate procollagen I (α 1) production by bronchial fibroblasts derived from subjects with asthma through IL-4/IL-4 δ 2 ratio, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **117**, 1321-1327, doi: 10.1016/j.jaci.2005.12.1349.
50. Glare, E. M., Divjak, M., Rolland, J. M., and Walters, E. H. (1999) Asthmatic airway biopsy specimens are more likely to express the IL-4 alternative splice variant IL-4 δ 2, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, 978-982, doi: 10.1016/S0091-6749(99)70078-3.
51. De Moraes-Pinto, M. I., Vince, G. S., Flanagan, B. F., Hart, C. A., and Johnson, P. M. (1997) Localization of IL-4 and IL-4 receptors in the human term placenta, decidua and amniochorionic membranes, *Immunology*, **90**, 87-94, doi: 10.1046/j.1365-2567.1997.00139.x.
52. Elser, B., Lohoff, M., Kock, S., Giaisi, M., Kirchhoff, S., Krammer, P. H., and Li-Weber, M. (2002) IFN- γ represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2, *Immunity*, **17**, 703-712, doi: 10.1016/S1074-7613(02)00471-5.
53. Oriss, T. B., McCarthy, S. A., Morel, B. F., Campana, M. A., and Morel, P. A. (1997) Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: Inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1, *J. Immunol.*, **158**, 3666-3672, doi: 10.4049/jimmunol.158.8.3666.
54. Gajewski, T. F., and Fitch, F. W. (1988) Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones, *J. Immunol.*, **140**, 4245-4252, doi: 10.4049/jimmunol.140.12.4245.
55. Luzina, I. G., Lockatell, V., Todd, N. W., Highsmith, K., Keegan, A. D., Hasday, J. D., and Atamas, S. P. (2011) Alternatively spliced variants of interleukin-4 promote inflammation differentially, *J. Leukoc. Biol.*, **89**, 763-770, doi: 10.1189/jlb.0510271.
56. Seah, G. T., Gao, P. S., Hopkin, J. M., and Rook, G. A. W. (2001) Interleukin-4 and its alternatively spliced variant (IL-4 δ 2) in patients with atopic asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **164**, 1016-1018, doi: 10.1164/ajrccm.164.6.2012138.
57. Glare, E. M., Divjak, M., Bailey, M. J., and Walters, E. H. (2001) The usefulness of competitive PCR: airway gene expression of IL-5, IL-4, IL-4 δ 2, IL-2, and ifn γ in asthma, *Thorax*, **56**, 541-548, doi: 10.1136/thorax.56.7.541.
58. Schimpl, A., and Wecker, E. (1972) Replacement of t-cell function by a t-cell product, *Nat. New Biol.*, **237**, 15-17, doi: 10.1038/newbio237015a0.
59. Dutton, R. W., Falkoff, R., Hirst, J., Hoffman, M., Kappler, J., Kettman, J. R., Lesley, J. F., and Vann, D. (1971) Is there evidence for a nonantigen specific diffusible chemical mediator from the thymus-derived cell in the initiation of the immune response? *Prog. Immunol.*, **1**, 355-368, doi: 10.1016/B978-0-12-057550-3.50033-8.
60. Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T., and Paul, W. E. (1982) Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2, *J. Exp. Med.*, **155**, 914-923, doi: 10.1084/jem.155.3.914.
61. Sanderson, C. J., Warren, D. J., and Strath, M. (1985) Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation *in vitro*. Its relationship to interleukin 3, and functional properties of eosinophils produced in cultures, *J. Exp. Med.*, **162**, 60-74, doi: 10.1084/jem.162.1.60.
62. Milburn, M. V., Hassell, A. M., Lambert, M. H., Jordan, S. R., Proudfoot, A. E. I., Graber, P., and Wells, T. N. C. (1993) A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4   resolution of human interleukin-5, *Nature*, **363**, 172-176, doi: 10.1038/363172a0.
63. Foster, P. S., Hogan, S. P., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., and Young, I. G. (1996) Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model, *J. Exp. Med.*, **183**, 195-201, doi: 10.1084/jem.183.1.195.
64. Vasiliev, A. M., Vasilenko, R. N., Kulikova, N. L., Andreev, S. M., Chikileva, I. O., Puchkova, G. Y., Kosarev, I. V., Khodyakova, A. V., Khlebnikov, V. S., Ptitsyn, L. R., Shcherbakov, G. Y., Uversky, V. N.,

- DuBuske, L. M., and Abramov, V. M. (2003) Structural and functional properties of IL-4 α 2, an alternative splice variant of human IL-4, *J. Proteome Res.*, **2**, 273–281, doi: 10.1021/pr025586y.
65. Tavernier, J., Tuijens, T., Plaetinck, G., Verhee, A., Fiers, W., and Devos, R. (1992) Molecular basis of the membrane-anchored and two soluble isoforms of the human interleukin 5 receptor alpha subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7041–7045, doi: 10.1073/pnas.89.15.7041.
 66. Kusano, S., Kukimoto-Niino, M., Hino, N., Ohsawa, N., Ikutani, M., Takaki, S., Sakamoto, K., Hara-Yokoyama, M., Shirouzu, M., Takatsu, K., and Yokoyama, S. (2012) Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its α receptor, *Protein Sci.*, **21**, 850–864, doi: 10.1002/pro.2072.
 67. Luzina, I. G., Keegan, A. D., Heller, N. M., Rook, G. A. W., Shea-Donohue, T., and Atamas, S. P. (2012) Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”, *J. Leukoc. Biol.*, **92**, 753–764, doi: 10.1189/jlb.0412214.
 68. Grey, A., and Katelaris, C. H. (2019) Dupilumab in the treatment of asthma, *Immunotherapy*, **11**, 859–872, doi: 10.2217/imt-2019-0008.
 69. Harb, H., and Chatila, T. A. (2020) Mechanisms of Dupilumab, *Clin. Exp. Allergy*, **50**, 5–14, doi: 10.1111/cea.13491.
 70. Bacharier, L. B., Maspero, J. F., Katelaris, C. H., Fiocchi, A. G., Gagnon, R., de Mir, I., Jain, N., Sher, L. D., Mao, X., Liu, D., Zhang, Y., Khan, A. H., Kapoor, U., Khokhar, F. A., Rowe, P. J., Deniz, Y., Ruddy, M., Laws, E., Patel, N., Weinreich, D. M., Yancopoulos, G. D., Amin, N., Mannent, L. P., Lederer, D. J., and Hardin, M. (2021) Dupilumab in children with uncontrolled moderate-to-severe asthma, *New Engl. J. Med.*, **385**, 2230–2240, doi: 10.1056/nejmoa2106567.
 71. Castro, M., Corren, J., Pavord, I. D., Maspero, J., Wenzel, S., Rabe, K. F., Busse, W. W., Ford, L., Sher, L., FitzGerald, J. M., Katelaris, C., Tohda, Y., Zhang, B., Staudinger, H., Pirozzi, G., Amin, N., Ruddy, M., Akinlade, B., Khan, A., Chao, J., Martincova, R., Graham, N. M. H., Hamilton, J. D., Swanson, B. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., and Teper, A. (2018) Dupilumab efficacy and safety in moderate-to-severe uncontrolled asthma, *New Engl. J. Med.*, **378**, 2486–2496, doi: 10.1056/nejmoa1804092.
 72. Busse, W. W., Maspero, J. F., Rabe, K. F., Papi, A., Wenzel, S. E., Ford, L. B., Pavord, I. D., Zhang, B., Staudinger, H., Pirozzi, G., Amin, N., Akinlade, B., Eckert, L., Chao, J., Graham, N. M. H., and Teper, A. (2018) Liberty asthma QUEST: Phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study to evaluate Dupilumab efficacy/safety in patients with uncontrolled, moderate-to-severe asthma, *Adv. Ther.*, **35**, 737–748, doi: 10.1007/S12325-018-0702-4.
 73. Tohda, Y., Matsumoto, H., Miyata, M., Taguchi, Y., Ueyama, M., Joulain, F., and Arakawa, I. (2022) Cost-effectiveness analysis of dupilumab among patients with oral corticosteroid-dependent uncontrolled severe asthma in Japan, *J. Asthma*, **59**, 2162–2173, doi: 10.1080/02770903.2021.1996596.
 74. Buendía, J., and Patiño, D. (2022) Dupilumab in children with moderate-to-severe asthma: a cost utility analysis, *Pediatr. Pulmonol.*, **57**, 2313–2319, doi: 10.1002/ppul.26033.

THE ROLE AND MOLECULAR MECHANISMS OF ALTERNATIVE SPLICING OF Th2-CYTOKINES IL-4 AND IL-5 IN ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

Review

**I. P. Shilovskiy^{1*}, V. I. Kovchina¹, E. D. Timotievich¹,
A. A. Nikolskii¹, and M. R. Khaitov^{1,2}**

¹ *Institute of Immunology, National Research Center, Federal Medical-Biological Agency Russia,
115522 Moscow, Russia; e-mail: ip.shilovsky@nrcii.ru*

² *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
“N. I. Pirogov Russian National Research Medical University”
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
117997 Moscow, Russia*

Bronchial asthma (BA) is a heterogeneous chronic inflammatory disease of the respiratory tract. Allergic asthma is the most common (up to 80% of cases) phenotype developing through Th2-dependent mechanisms involving cytokines: IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13. The genes encoding Th2-cytokines have a mosaic structure (encode exons and introns). Therefore, several mature mRNA transcripts and protein isoforms

can be derived from a single mRNA precursor through alternative splicing, and they may contribute to BA pathogenesis. Analysis of published studies and databases revealed the existence of alternative mRNA transcripts for IL-4, IL-5, and IL-13. Alternative transcripts of IL-4 and IL-5 carry open reading frames and therefore can encode functional proteins. It was shown that not only alternative mRNA transcripts are exist for IL-4, but alternative protein isoforms, as well. Natural protein isoform IL-4 δ 2 lacking part encoded by exon-2 was identified. Similarly, alternative mRNA transcript omitting exon-2 (IL-5 δ 2) was also identified for IL-5. In this review, we summarize current knowledge about identified alternative mRNA transcripts and protein isoforms of Th2-cytokines, first of all IL-4 and IL-5. We have analyzed biological properties of alternative variants of these cytokines, their possible role in the allergic asthma pathogenesis, and considered their diagnostic and therapeutic potential.

Keywords: bronchial asthma, Th2-cytokines, alternative splicing, signaling pathway

МАРКЕРЫ ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИИ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ: НЕ ТОЛЬКО СКФ

Обзор

© 2023 Э.И. Якупова^{1*}, П.А. Абрамичева¹, А.Д. Бочарников²,
Н.В. Андрианова¹, Е.Ю. Плотников^{1,3*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: elmira.yaku@gmail.com; plotnikov@belozersky.msu.ru

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
119991 Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.04.2023

После доработки 20.07.2023

Принята к публикации 20.08.2023

Хроническая болезнь почек может прогрессировать до терминальной стадии почечной недостаточности (ТСПН), характеризующейся высоким риском развития осложнений и даже смерти. ТСПН является показанием к немедленному интенсивному лечению и принятию решения о начале диализа или трансплантации почки. В связи с этим своевременная диагностика данной патологии имеет решающее значение для многих пациентов. ТСПН связана с развитием таких патологических процессов, как воспаление, фиброз, нарушение гормонального фона и сопутствующие эпигенетические изменения в различных клетках, что может служить маркерами для определения ТСПН. В обзоре рассматриваются как традиционные, так и новые перспективные биомаркеры ТСПН, которые могут быть определены в почках, крови или моче. Одни из них узкоспецифичны для конкретной патологии, другие носят более универсальный характер. На основе анализа предложено несколько универсальных воспалительных, фиброзных, гормональных и эпигенетических маркеров, свидетельствующих о существенном ухудшении функции почек и прогрессировании ТСПН, которые могут служить для улучшения диагностики ТСПН.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фиброз почки, маркеры фиброза, хроническая болезнь почек, почечная недостаточность, терминальная стадия почечной недостаточности.

DOI: 10.31857/S0320972523100160, EDN: OZTSWQ

ВВЕДЕНИЕ

Различные локальные или системные патологические процессы могут привести к развитию хронической болезни почек (ХБП), которая связана со снижением почечной функции. ХБП приводит к снижению скорости клубоч-

ковой фильтрации (СКФ), вплоть до развития терминальной стадии почечной недостаточности (ТСПН) [1–3]. Развитие ХБП и, в частности, ТСПН остаются значимыми факторами ухудшения качества жизни и гибели пациентов. Смертность среди пациентов с ТСПН значительно выше, чем у больных ХБП без ТСПН,

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; КМБ-7 – костный морфогенетический белок 7; ММП-7 – матриксная металлопротеиназа 7; МХБ-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок 1; РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система; РСБ – ретинол-связывающие белки; рСКФ – расчетная скорость клубочковой фильтрации; СКФ – скорость клубочковой фильтрации; ТСПН – терминальная стадия почечной недостаточности; ХБП – хроническая болезнь почек; AGT – ангиотензиноген; AngII – ангиотензин II; ANP – предсердный натрийуретический пептид; BNP – мозговой натрийуретический пептид; CNP – натрийуретический пептид C; col – коллагены; CTGF – фактор роста соединительной ткани; CXCL16 – хемокиновый лиганд мотива C-X-C 16; DcR2 – рецептор-ловушка DcR2; HE4 – человеческий эпидидимальный секреторный белок E4; MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктаза; TGFβ – трансформирующий фактор бета; TNFR – рецепторы фактора некроза опухоли; TSP-1 – тромбоспондин 1; α-GMA – α-гладкомышечный актин.

* Адресат для корреспонденции.

и даже при использовании современных методов гемодиализа смертность колеблется от 20 до 50% в течение 24 месяцев [4]. Финальная стадия ХБП требует заместительной почечной терапии, такой как перитонеальный диализ или трансплантация почки. Однако аллотрансплантат доступен только для 10% пациентов [5]. На конец 2018 г. число людей с ТСПН в США превысило 785 000 человек [6], и выявление данного заболевания неуклонно растет [4].

На сегодняшний день оценка стадии ХБП и развития ТСПН основывается на выявлении постоянных морфологических и функциональных симптомов поражения почек. Шкала оценки ХБП была предложена организациями NKF-KDOQI (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) и KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes organization) в 2002 и 2004 гг. соответственно [7]. Классификация ХБП в руководстве по клинической практике от KDIGO 2012 [8] основана на значениях расчетной СКФ (рСКФ) (рис. 1): 1 стадия – норма по рСКФ (около 90 мл/мин/1,73 м²), сопровождающаяся микроальбуминурией; 2 стадия – рСКФ 60–89 мл/мин/1,73 м² с микроальбуминурией; 3 стадия – рСКФ 30–59 мл/мин/1,73 м²; 4 стадия – рСКФ 15–29 мл/мин/1,73 м²; 5 стадия/ТСПН – рСКФ ниже 15 мл/мин/1,73 м². Стадии 3–5 характерны для ХБП.

В клинической практике существует несколько способов измерения СКФ, включая подходы, основанные на клиренсе эндогенного креатинина и цистатина С (рСКФ) или на измерении клиренса экзогенных веществ, а именно радиофармпрепаратов, таких как диэтилентриамин пентаацетат, меченный ^{99m}Tc (измеренная СКФ, иСКФ) [9, 10]. иСКФ помогает более точно определить СКФ, но для этого измерения требуется специальное оборудование и разрешение на работу с радиофармпрепаратами, что препятствует широкому использованию метода.

Концепция использования только рСКФ в качестве единственного параметра для диагностики ХБП регулярно подвергалась критике и считается недостаточной. Диагностика по СКФ имеет следующие ограничения: (1) почка является полифункциональным органом и СКФ отражает только одну из функций; (2) различные непочечные факторы могут влиять на измерение СКФ; (3) СКФ имеет внутреннюю изменчивость, которая зависит от приема пищи и жидкости, сердечно-сосудистого статуса и артериального давления, особенно при наличии нарушения ауторегуляции или при приеме лекарств; (4) она меняется с



Рис. 1. Классификация ХБП, основанная на значениях СКФ. Числовые значения вне полукруга – рСКФ, значения внутри полукруга – стадии почечной недостаточности. ТСПН выделена красным цветом

возрастом, причем нелинейно и индивидуально для каждого человека; (5) рСКФ может не коррелировать с СКФ при определенных состояниях и болезнях. Таким образом, рСКФ можно использовать в качестве инструмента начального скрининга, но его не следует применять для диагностики ХБП без тщательной оценки всего клинического профиля [11]. В итоге все еще существует необходимость поиска маркеров для оценки развития ХБП и особенно ТСПН.

Почечный фиброз – типичный исход воспаления, встречающийся практически при всех нефропатиях [12, 13]. Фиброз может поражать все отделы почки, в конечном итоге вызывая разрушение почечной паренхимы и приводя к ТСПН. Таким образом, маркеры фиброза почек можно рассматривать как универсальные молекулы для диагностики ХБП и ТСПН. Почечная недостаточность также сопровождается эпигенетическими изменениями в различных клетках и эндокринными нарушениями, которые также могут служить биомаркерами ТСПН. В этом обзоре мы рассматриваем известные в настоящее время биомаркеры воспаления, фиброза почек, эпигенетических и гормональных изменений и обсуждаем, какие из них можно использовать для определения прогрессирования ХБП в ТСПН.

РАЗВИТИЕ ТСПН

Основной причиной развития ХБП и ТСПН является сахарный диабет [14]. Можно выделить и другие причины [4, 15], которые включают гипертонию, сосудистую нефропатию, гломерулонефрит (первичный или вторичный), кистоз, тубулоинтерстициальный фиброз, обструкцию или дисфункцию мочевыводящих путей, мочекаменную болезнь,

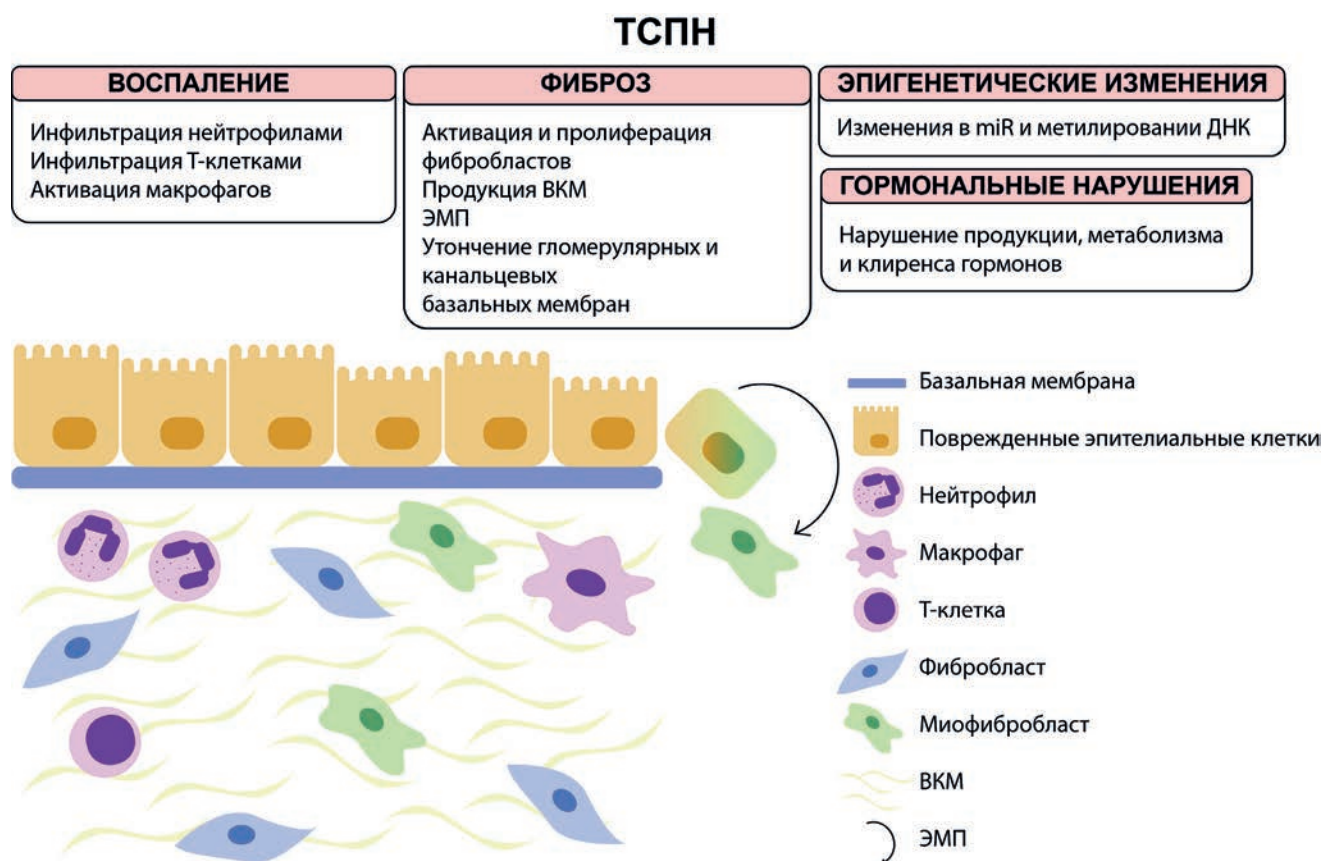


Рис. 2. Патологические механизмы развития ТСПН при ХБП. ВКМ — внеклеточный матрикс; ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход; ТСПН — терминальная стадия почечной недостаточности

врожденные дефекты почек или мочевого пузыря, неразрешенное острое повреждение почек, аутоиммунные заболевания, нефротоксины, ожирение и прием некоторых лекарственных препаратов, включая нестероидные противовоспалительные препараты, ингибиторы кальциневрина и антиретровирусные препараты.

Во всех случаях наблюдается изменение функции почек, отражающее вклад отдельных нефронов в общее значение СКФ [4]. Снижение почечной функции вначале может быть бессимптомным и связано с гиперfiltrацией нефронов. Вместе с компенсаторной гипертрофией нефронов это позволяет почкам поддерживать СКФ. В результате у пациента с легким нарушением функции почек уровень креатинина может быть нормальным, и заболевание может какое-то время оставаться незамеченным [16]. Рано или поздно этот адаптивный механизм исчерпывается и в конечном итоге вызывает повреждение клубочков оставшихся нефронов [4]. Следует отметить, что повышенное капиллярное давление в клубочках может повредить капилляры, что приводит к фокальному и сегментарному гломерулосклерозу и в итоге к глобальному гломерулосклерозу.

На рис. 2 представлено схематическое изображение патоморфологических изменений, характерных для развития ТСПН.

Стоит отметить, что одной из наиболее значимых причин развития почечной патологии является воспаление [15, 17, 18]. ТСПН также сопутствует таким процессам, как гломерулосклероз, тубулоинтерстициальный фиброз и атрофия [15, 19]. И наконец, ТСПН связана с изменениями в гормональной системе и эпигенетике.

МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ

Показано, что процессы хронического воспаления играют существенную роль в развитии болезни почек и могут прогнозировать общую или сердечно-сосудистую смертность пациентов на гемодиализе [20]. В воспалительный ответ вовлекаются такие молекулы, как провоспалительные цитокины, хемокины, молекулы клеточной адгезии, различные факторы роста и транскрипционные факторы [21].

Существует несколько исследований, анализирующих эффективность воспалительных маркеров в выявлении ухудшения функции почек.

Было обнаружено, что воспалительные и протромботические маркеры являются предикторами изменения функции почек у пожилых людей при одновременном использовании показателей на основе креатинина без прямого измерения СКФ [22]. В то же время не выявлено связи между девятью воспалительными и прокоагулянтными маркерами (С-реактивный белок, интерлейкин-6 (ИЛ-6), молекула межклеточной адгезии-1, количество лейкоцитов, фибриноген, фактор VII, фактор VIII, D-димер, плазмин-антиплазминовый комплекс) и быстрым снижением функции почек [23]. Только более низкие исходные уровни сывороточного альбумина коррелировали с рСКФ, измеренной с помощью цистатина С [23].

Было показано, что увеличение уровней ИЛ-6 в плазме связано со стадией ХБП (особенно со стадией 5 ХБП). Уровень ИЛ-6 в плазме предсказывал общую и сердечно-сосудистую смертность при анализе преддиализных пациентов со стадиями 2–5 ХБП [20]. Кроме того, прогнозирование смертности было точнее при использовании уровня ИЛ-6 в плазме крови, чем трех других основных биомаркеров воспаления, а именно: С-реактивного белка, TNF- α и альбумина [20]. Имеются противоречивые данные о С-реактивном белке, широко используемом воспалительном биомаркере, и его связи с рСКФ или предсказанием снижения рСКФ [24–26]. Было показано, что концентрация ИЛ-18 отрицательно коррелировала с клиренсом креатинина, что нивелировалось непрерывным амбулаторным перитонеальным диализом [27].

Анализ потенциальных биомаркеров воспаления и повреждения при диабетической болезни почек в когортных исследованиях выявил противоречивые результаты относительно прогностической ценности рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) для диагностики ТСПН при диабете [28]. При иммуноглобулин А-нефропатии (IgA-нефропатии) уровень TNFR в крови отражал гистологическую и клиническую тяжесть заболевания и негативно коррелировал с рСКФ. Более того, повышенные концентрации TNFR в сыворотке крови в начале заболевания являются ранними биомаркерами последующего прогрессирования почечной недостаточности у пациентов с IgA-нефропатией [29]. Семнадцать белков воспаления, обнаруживаемых в крови и включающих много членов суперсемейства TNF-рецепторов, были предложены в качестве предикторов 10-летнего риска развития ТСПН при диабете 1-го и 2-го типов [30].

Установлено, что основные маркеры системного воспалительного ответа, выявляемые в крови, тесно связаны с развитием ХБП [18]:

- провоспалительные цитокины: TNF- α , ИЛ-6 и ИЛ-18;
- хемокины: ИЛ-8 (CXCL8), ИЛ-34, SDF1 α (CXCL12), MCP-1 (CCL2) и MIP-1 β (CCL4);
- факторы роста: GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов), FGF-23 и HGF (фактор роста гепатоцитов);
- растворимые формы рецепторов: sTNFR1 и sTNFR2, sCD40L и sCD163 (SR-I3);
- циклофилин А.

К сожалению, информация о связи воспалительных маркеров с уровнем СКФ и развитием ТСПН на различных стадиях ХБП, включая пациентов на диализе, весьма ограничена. В недавнем исследовании было показано, что VCAM-1, циркулирующая молекула адгезии, негативно коррелирует с рСКФ и предсказывает уровень снижения рСКФ в общей популяции [26]. Активность аденозин дезаминазы в сыворотке крови измерялась как маркер воспаления на разных стадиях ХБП [31], и наблюдалась ее отрицательная корреляция с рСКФ [31]. Однако авторы отметили, что одного показателя почечной функции недостаточно для оценки ТСПН.

Растворимые молекулы – не единственные биомаркеры воспаления. *In situ* состояние воспаления и фенотип лимфоцитов [32, 33] могут помочь отличить пациентов с ТСПН от контрольной группы. При системной красной волчанке снижение числа регуляторных Т-клеток (Treg) может способствовать развитию ТСПН. Кроме того, у пациентов с ТСПН с низким уровнем Treg наблюдался не только сдвиг в профиле цитокинов от противовоспалительных к провоспалительным, но и было обнаружено повышенное содержание антител к лейкоцитарному антигену человека в периферической крови [32]. Исследование биопсий пациентов с волчаночным нефритом при помощи конфокальной микроскопии показало, что высокая плотность В-клеток была связана с устойчивостью к развитию ТСПН, в то время как высокая плотность CD8⁺, $\gamma\delta$ и других CD4⁺CD8⁺ Т-клеток была связана как с острой почечной недостаточностью, так и с прогрессированием до ТСПН [33]. Особые различия в фенотипическом профиле популяций Т- и В-клеток наблюдались между пациентами с ТСПН и здоровыми людьми. Описано снижение числа наивных CD4⁺-клеток, клеток CD19⁺IgD⁺CD27⁺, а также снижение числа клеток CD8⁺PD1⁺, наряду с тенденцией

к увеличению количества зрелых субпопуляций у пациентов с ТСПН [34].

Отношение нейтрофилов к лимфоцитам и тромбоцитов к лимфоцитам может нести диагностическое значение при анализе воспаления у пациентов с ТСПН. Отношение нейтрофилов к лимфоцитам было связано с воспалением у больных с ТСПН, включая тех, кто был на гемодиализе и перитонеальном диализе [35–37], и также было связано с выживаемостью пациентов на гемодиализе [38, 39]. Существуют исследования, показывающие связь между отношением тромбоцитов к лимфоцитам и воспалением и способностью предсказывать смертность у пациентов на гемодиализе [37, 38]. Семилетнее когортное исследование пациентов, не находящихся на диализе, но имеющих ТСПН, выявило, что эти два отношения могут быть ассоциированы с развитием воспаления у таких больных, что было показано по связи с высокочувствительным С-реактивным белком [40].

Поскольку развитие ТСПН является уникальным процессом при разных патологиях, параметры воспаления представляются весьма противоречивыми маркерами и не могут использоваться без других диагностических подходов при почечной недостаточности.

МАРКЕРЫ, СВЯЗАННЫЕ С ФИБРОЗОМ

В норме в здоровой ткани существует баланс между скоростью синтеза белков внеклеточного матрикса (ВКМ: коллаген, фибронектин, ламинин и др.) и их протеолиза. Нарушение этого баланса может привести к неконтрольному отложению компонентов ВКМ, что в конечном итоге приводит к нарушению морфологии и/или функции органа и развитию фиброза [12]. Этот процесс может происходить во всех органах и является причиной почти 45% смертей в развитых странах [41]. Что касается почек, то распространенность ХБП, характеризующейся фиброзом почек, увеличилась с 1990-х гг., и в 2017 г. во всем мире от этой причины погибло 1,2 млн человек [42].

Чрезмерное отложение ВКМ при фиброзе почек разрушает и заменяет функциональную паренхиму, что приводит к почечной недостаточности [13]. Этот патологический процесс может затрагивать три различных отдела почек: клубочки, вызывая гломерулосклероз; тубулоинтерстиций, приводя к интерстициальному фиброзу; сосудистую сеть, выражаясь в артериосклерозе и периваскулярном фиброзе [43]. Независимо от причины и происхожде-

ния фиброза, его гистологическая картина в основном одинакова при различных заболеваниях почек. Таким образом, маркеры фиброза почек можно рассматривать как универсальные молекулы для диагностики ХБП и ТСПН.

Коллагены. Коллагены (col) представляют собой наиболее распространенные маркеры фиброза и включают белки colI, colII, colIII, colIV, colVI, colVII и colXV, обнаруживаемые в почечном интерстиции [44]. colI признан основным компонентом фиброзных тканей всех органов [44, 45]. colI и colIII, предположительно, накапливаются на ранних стадиях развития фиброза почки [46]. Также показано увеличение содержания colV и colVI в фиброзной ткани почек [47, 48]. colIV является компонентом базальных мембран и используется в качестве маркера гломерулярного склероза и интерстициального фиброза [49, 50].

Главными способами определения фиброза как в клинике, так и в экспериментальных исследованиях является окраска биопсийных препаратов по Массону или пикросириусом красным. Однако, несмотря на широкое использование окраски по Массону, она может иметь низкую специфичность к самому коллагену и отражать интерстициальный объем, а не фиброз как таковой [51]. Окрашивание пикросириусом красным считается более подходящим для фибриллярного коллагена, но оно имеет свои ограничения, в частности отсутствие специфичности к colIV, что не позволяет использовать это окрашивание для анализа утолщения базальной мембраны канальцев или диагностики гломерулосклероза [51]. Иммуногистохимический анализ со специфическими антителами к коллагену не имеет вышеуказанных ограничений и напрямую выявляет содержание и локализацию коллагенов в ткани, позволяя морфометрически оценить степень фиброза почек [52, 53].

Кроме гистологического/гистохимического исследования, содержание коллагена можно проанализировать с помощью выявления гидроксипролина [51]. Метод основан на том, что коллаген является одним из немногих белков, которые содержат аминокислоту гидроксипролин. Кроме того, гидроксипролин составляет фиксированный процент аминокислотного состава коллагена в большинстве органов млекопитающих [54, 55].

В клинических и экспериментальных исследованиях наиболее просто использовать для анализа сыворотку крови и мочу, в которых могут быть обнаружены фрагменты коллагена в качестве маркеров почечного фиброза (табл. 1). Поэтому неинвазивные методы

определения коллагена и его фрагментов в моче или крови могут использоваться для диагностики почечной недостаточности, в частности ТСПН. Такие подходы в клинической практике могут позволить изучить динамику развития почечной недостаточности. Например, изучение связи между уровнем фрагментов colIII , отражающих его активное образование (PRO-C3) и деградацию (СЗМ), и СКФ показало, что соотношение СЗМ/креатинин в моче увеличивается со стадией ХБП [56]. Соотношение PRO-C3/креатинин в моче и сыворотке возрастало только на стадиях 4 и 5 [56]. Наоборот, повышенный риск развития ТСПН связан с низким соотношением СЗМ/креатинин в моче и повышенным уровнем PRO-C3 в сыворотке крови. Это также может свидетельствовать о повышенном риске смерти [56], хотя в недавнем исследовании ни в сыворотке, ни в моче уровень СЗМ не был связан со смертностью при диабетической болезни почек [57].

Анализ базы данных Human Urinary Proteome Database при сравнении здоровых людей и пациентов с ХБП показал, что фрагменты colIa1 могут иметь диагностическую ценность в определении почечной недостаточности. Из 707 фрагментов colIa1 в моче 63 пептида были достоверно положительно связаны с СКФ и только 6 значимо отрицательно коррелировали с СКФ [58].

Более практичным методом для клинической диагностики является иммунодетекция, с помощью которой определяют коллаген и его фрагменты. colIV , обнаруживаемый в моче молодых пациентов с диабетом 1-го типа, коррелировал со снижением СКФ, но такая связь не была определена для ТСПН [59]. Такие же результаты получены в исследованиях пациентов с диабетом 2-го типа [60]. Более высокие уровни PRO-C6 (фрагмент, отражающий активный синтез colVI) в сыворотке крови связаны со снижением СКФ, развитием ТСПН и смертностью у пациентов с диабетом 1-го типа. А высокие уровни PRO-C6 в моче, наоборот, коррелировали со сниженным риском падения СКФ [61]. Другой фрагмент colVI , эндотрофин, измеренный в сыворотке или моче, может предсказывать развитие ТСПН у пациентов с ХБП [62, 63], в связи с чем он был выбран вместо рСКФ в многомерной модели смертности от ХБП, демонстрируя лучшую прогностическую силу, чем остальные маркеры [62]. Отношение эндотрофин/креатинин в моче отражало развитие ХБП в течение первого года независимо от значения СКФ, возраста, пола и отношения альбумин/креатинин в моче [63].

Показано, что применение комбинации всех биомаркеров (sLG1M, sPRO-C3, sPRO-C6, uPRO-C3/Cr, uPRO-C6/Cr, uСЗМ/Cr) может улучшить предсказательную способность диагностики снижения почечной функции (чувствительность – 50,0%; специфичность – 77,8%; AUC – 0,806) в сравнении с такими клиническими параметрами, как рСКФ и протеинурия (чувствительность – 45,2%; специфичность – 87,3%; AUC – 0,751) [64]. Таким образом, компоненты ВКМ, как маркеры фиброза, могут улучшить возможность прогнозировать развитие ХБП и почечной дисфункции.

Маркеры, связанные с ВКМ и промежуточными филаментами. К компонентам ВКМ относится не только коллаген, но также фибронектин и тромбоспондин 1 (TSP-1). Белки промежуточных филаментов (виментин, нес-тин) также связаны с почечным фиброзом (табл. 2). Было показано, что некоторые из этих маркеров могут хорошо выявлять снижение почечной функции, и их уровень коррелирует с СКФ. В частности, содержание фибронектина в моче пациентов с синдромом Барде–Бидля коррелировало с рСКФ [74]. мРНК виментина, выявляемая в моче, также может быть полезной для детекции почечной дисфункции благодаря негативной связи уровня этой мРНК с СКФ у пациентов с ХБП [75].

Другие маркеры почечного фиброза. Другие белки, не связанные с ВКМ, могут также выступать в качестве инструмента для выявления почечного фиброза (табл. 3). Маркеры фиброза могут быть ассоциированы с СКФ, и некоторые из них могут быть использованы, в частности, для прогноза ТСПН при различных заболеваниях и после трансплантации почки.

При диабете 2-го типа обнаружение высокого отношения $\text{TGF}\beta/\text{КМБ-7}$ может говорить о развитии ТСПН [89]. Галектин-3 также может выступать биомаркером почечной недостаточности, так как коррелирует с СКФ у пациентов с диабетической болезнью почек [117]. Кроме того, у таких пациентов обнаружение в моче хемокинового лиганда мотива С-Х-С 16 (CXCL16) указывает на развитие фиброза [72], и его уровень в моче отражает как СКФ, так и переход из ХБП в ТСПН [118, 119]. Содержание CXCL16 у пациентов с ХБП и сахарным диабетом 2-го типа выше, чем у пациентов без диабета [118]; содержание CXCL16 в сыворотке и/или в моче может выступать как прогностический/диагностический маркер тяжести ХБП и развития ТСПН. Сходным образом содержание эндостатина в плазме негативно связано с СКФ [120, 121] и отражает развитие ХБП. Этот показатель может

Таблица 1. Коллаген и его фрагменты, определяемые в моче и сыворотке, для диагностики развития повреждения почек и/или фиброза

Тип коллагена/фрагмент	Моча/ сыворотка	Метод определения	Диагностическая способность	Ссылки
Проколлаген III, N-концевой пропептид (PIINP); Коллаген IV	моча; сыворотка	коллаген IV – иммуноферментный анализ (ИФА); PIINP – радиоиммунологическое исследование	высокая позитивная корреляция между содержанием в крови и моче PIINP и тяжестью интерстициального фиброза почки в образцах пациентов с нефропатией; нет корреляции с коллагеном IV	[65]
PIINP	моча; сыворотка	радиоиммунологическое исследование	повышенный уровень PIINP в моче, как и отношение его содержания в моче к креатинину коррелировало с тяжестью почечного фиброза; однако PIINP в сыворотке не связан с экскрецией PIINP с мочой или со стадией интерстициального фиброза	[66]
PIINP	моча	радиоиммунологическое исследование	отношение PIINP в моче к креатинину может иметь диагностическую ценность для определения почечного фиброза	[67]
PIINP	моча	ИФА	была показана корреляция между уровнем PIINP в моче и тяжестью почечного фиброза у пациентов с кистозным фиброзом после трансплантации легких	[68]
PIINP; Проколлаген типа I N-концевой пропептид I (PINP)	моча	радиоиммунологическое исследование	PIINP и PINP могут выступать в качестве маркера почечного фиброза	[69]
PIINP; Фрагмент C1M; Фрагмент C3M	моча; сыворотка	ИФА	уровни C1M и C3M в сыворотке крыс возрастают в 2–3 раза при нефрэктомии 5/6 почки и аденин-нефропатии, но не при хроническом анти-Thy1.1-нефрите; в то же время уровни C1M и C3M в моче повышаются от 9 до 100 раз при всех трех патологиях в сравнении с контролем, тогда как PIINP сильно повышен только в моче крыс с нефрэктомией	[70]
Фрагмент PRO-C3; Фрагмент PRO-C6; Фрагмент C3M	моча; сыворотка	ИФА	концентрации PRO-C6 в сыворотке и C3M в моче коррелировали с гистологическими маркерами интерстициального фиброза у пациентов с волчаночным нефритом	[71]

Таблица 1 (продолжение)

Тип коллагена/фрагмент	Моча/ сыворотка	Метод определения	Диагностическая способность	Ссылки
Эндостатин (20-кДа C-концевой фрагмент коллагена XVIII)	моча; сыворотка	ИФА	увеличение экспрессии эндостатина в ткани почек (в 5–6 раз) и его уровень в сыворотке сопутствует развитию тубулоинтерстици- ального фиброза у мышей; уровень эндостатина в моче при интерстициальном фиброзе и атрофии почечных канальцев возрастает у пациентов с диабетической болезнью почек	[72, 73]
Эндотрофин (C-концевой фрагмент коллагена VI)	моча; сыворотка	ИФА	отношение измеренного в моче эндотрофина к креатинину было связано с развитием ТСПН в течение одного года у пациентов с ХБП; уровень эндотрофина в сыворотке независимо был связан со смертностью при ХБП и мог предсказать развитие ТСПН	[62, 63]

Примечание. Фрагменты коллагена: PRO-C6 – фрагмент, отражающий активный синтез colVI; C3M – фрагмент, отражающий разрушение colIII; PRO-C3 – фрагмент, отражающий активный синтез colIII; PINP – проколлаген типа I N-концевой пропептид; PIIINP – проколлаген III, N-концевой пропептид; C1M – MMP-разрушенный коллаген 1-го типа.

Таблица 2. Маркеры фиброза почки, связанные с ВКМ

Маркер	Источник выявления	Связь с почечным фиброзом	Ссылки
Фибронектин	почка	накопление фибронектина в почках является одним из самых ранних признаков фиброза	[76]
Нестин	почка	нестин обнаруживается в канальцевых эпителиальных клетках и канальцевых интерстициальных клетках при ООМ; уровень канальцевой и интерстициальной экспрессии нестина положительно коррелирует с тубулоинтерстициальным фиброзом у больных гломерулонефритом	[77]
TSP-1	почка	увеличение экспрессии и количества TSP-1 при гломерулонефрите связано с интерстициальным фиброзом и сопровождает его развитие	[78]
Виментин	почка	увеличение экспрессии виментина наблюдается в почках при фиброзе у мышей с ООМ	[79]

Примечание. ООМ – односторонняя обструкция мочеточника; TSP-1 – тромбоспондин 1.

предсказывать смертность у пациентов с диабетом 2-го типа [122, 123] или повреждение почечного трансплантата [122].

МХБ-1 в плазме может не только отражать развитие фиброза и снижение СКФ, но и прогнозировать смертность при ХБП [124]. Другие маркеры фиброза, связанные с раз-

витием почечной недостаточности и СКФ при ХБП, включают: обнаруживаемый в моче ретинол-связывающий белок (РСБ) [125], циркулирующий в плазме фактор роста соединительной ткани (CTGF) [126] и человеческий эпидидимальный секреторный белок Е4 (HE4) в сыворотке [127]. Кроме того, содержание РСБ,

Таблица 3. Маркеры фиброза почки

Маркер	Источник выявления	Связь с почечным фиброзом
α -Гладкомышечный актин (α -ГМА)	почка	α -ГМА используется как маркер фиброгенной активности миофиibroбластов [80–84]; определение α -ГМА в почках широко применяется при различных моделях повреждения [85–87]; однако, лишь некоторые коллаген-синтезирующие клетки экспрессируют α -ГМА [83]
Костный морфогенетический белок 7 (КМБ-7)	сыворотка	низкий уровень КМБ-7 может говорить о повышенном риске развития ТСПН и сопровождается увеличением содержания TGF β [88]; высокое отношение общего TGF β к КМБ-7 может быть использовано для диагностики ТСПН [89]
Фактор роста соединительной ткани (CTGF)/CCN2	почка; сыворотка	при хроническом тубулоинтерстициальном повреждении обнаруживается повышенное количество клеток, которые экспрессируют мРНК CTGF [90, 91]; количество CTGF в сыворотке пациентов с диабетом 1-го типа коррелирует с развитием ТСПН и общей смертностью [92]
Хемокиновый лиганд мотива C-X-C 16 (CXCL16)	моча	у пациентов с диабетической болезнью почек возрастает уровень CXCL16 в моче при развитии интерстициального фиброза и атрофии почечных канальцев [72]
Рецептор-ловушка DcR2 (decoy receptor 2) и отношение DcR2/креатинин в моче	моча	уровень DcR2 и отношение DcR2/креатинин в моче коррелирует с развитием тубулоинтерстициального фиброза у пациентов с IgA-нефропатией [93]
Эпидермальный фактор роста (EGF) и отношение uEGF/креатинин в моче	моча	снижение содержания мРНК EGF в почке и количество EGF в моче коррелирует с развитием интерстициального фиброза [94, 95]; отношение EGF к креатинину в моче (uEGF/Cr) также связано со стадией ХБП [94, 96]
Галектин-1	почка	показана роль галектина-1 при последней стадии ХБП, связанной с фиброзом [97]
Галектин-3	моча; сыворотка	высокие уровни галектина-3 в плазме и сыворотке связаны с повышенным риском развития ХБП и быстрым снижением функции почек [98–100]; высокие уровни в плазме связаны с более тяжелым фиброзом почек [101]; комбинация галектина-3, измеренного в моче и плазме, может иметь лучшую прогностическую способность [102]
Человеческий эпидидимальный секреторный белок E4 (HE4/Wfdc2)	почка	в модели ООМ наблюдается увеличение экспрессии HE4 в почках при развитии фиброза [103]; количество HE4 возрастает в почках при ХБП [104], что может быть связано с повышенной экспрессией миофиibroбластами [103]
Моноцитарный хемоаттрактантный белок 1 (МХБ-1)	моча	МХБ-1 приводит к интерстициальному и мезангиальному фиброзу [105–107]; в клинической практике количество МХБ-1 может быть измерено в моче для диагностики ХБП [108]
Матриксная металлопротеиназа-7 (ММП-7)	моча; сыворотка	у пациентов с диабетом 2-го типа содержание ММП-7 в сыворотке коррелирует с развитием почечного фиброза [109]; у пациентов с ХБП уровень ММП-7 в моче связан с развитием фиброза [110]

Таблица 3 (продолжение)

Маркер	Источник выявления	Связь с почечным фиброзом
Ретинол-связывающие белки (РСБ)	моча	уровень РСБ в моче, так же как отношение РСБ/креатинин, позитивно ассоциировано с развитием почечного фиброза у пациентов с ХБП [111]
TGF β	моча; сыворотка	исследование биопсий 127 пациентов показало, что тяжесть развития фиброза коррелирует с увеличением в моче TGF β [112–114]; обнаружение TGF β в сыворотке пациентов после трансплантации почек может иметь прогностическое значение для диагностики аллотрансплантатной нефропатии [115]; TGF β в крови также может предсказывать развитие нефропатии при диабете 2-го типа [89]
Уромодулин	сыворотка	показана возможность оценки уромодулина в сыворотке крови для выявления ранних стадий фиброза после трансплантации [116]

Примечание. ООМ – односторонняя обструкция мочеточника.

так же как и отношение рецептор-ловушка DcR2/креатинин в моче, могут быть использованы в качестве диагностики IgA-нефропатии [93, 128]. Содержание CTGF может не только отражать стадию ХБП, но также диагностировать волчаночный нефрит при обнаружении высоких уровней экспрессии его мРНК в почках [129]. Содержание FGF-2 в сыворотке также негативно коррелирует с СКФ и протеинурией у пациентов с гломерулонефритом.

Риск развития ТСПН у пожилых людей может быть определен по измерению уровня уромодулина в сыворотке [130]. Также уровни уромодулина в крови могут указывать на развитие почечной недостаточности после трансплантации почки [116]. Отношение EGF/креатинин в моче пациентов с трансплантацией коррелирует со снижением СКФ [116]. Определение интерстициального фиброза при помощи окраски по Массону вместе с определением уровня α -гладкомышечного актина (α -ГМА) на биопсии может более точно предсказать хроническую дисфункцию почечного аллотрансплантата [131].

Некоторые из описанных выше маркеров фиброза могут иметь более высокую прогностическую способность, чем СКФ, при развитии ХБП и снижении почечной функции. Например, отношение МХБ-1/креатинин в моче может свидетельствовать о присутствии воспалительного процесса в почках, даже если значения рСКФ в норме. Так, измерение МХБ-1 может выявить почечное воспаление на ранних стадиях синдрома Альпорта [132]. При IgA-нефропатии уровень матриксной металлопротеиназы 7 (ММП-7) в моче может

служить независимым и мощным предиктором прогрессирования заболевания даже у пациентов на ранней стадии с рСКФ ≥ 60 мл/мин/1,73 м² [133]. Так, уровень ММП-7 в моче вместе с такими параметрами, как рСКФ, среднее артериальное давление, протеинурия и гистологический показатель, значительно улучшает прогноз риска развития IgA-нефропатии в течение трех лет [133]. Таким образом, маркеры, связанные с почечным фиброзом при различных патологиях, могут отражать тяжесть ХБП и развитие ТСПН, а также прогнозировать возникновение отторжения трансплантата почки и даже смертность.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Роль эпигенетических процессов в фиброзе почек неоднократно демонстрировалась на культурах клеток, животных моделях и у пациентов с диабетической нефропатией, ишемией, волчаночным нефритом и другими патологиями почек [134–137]. Эпигенетические изменения могут непосредственно способствовать переходу острой формы почечного повреждения в хроническую [138–141]. Предполагается, что эпигенетические маркеры могут предсказывать тяжесть ХБП, указывать на разные стадии ХБП и помогать в оценке рисков развития ТСПН. Наиболее многообещающими эпигенетическими маркерами фиброза почек являются микроРНК (miR) и метилирование ДНК. Эти маркеры обычно анализируют в клетках крови или моче и используют в качестве прогностических факторов развития ХБП или ТСПН.

miR. miR представляют собой малые некодирующие РНК, которые могут кодироваться в интронах генов или транскрибироваться независимо. Первичные транскрипты процессируются в зрелую miR, которая может подавлять активность различных генов посредством РНК-интерференции. Эффекты каждой miR многочисленны, почти каждая miR имеет более 100 мишеней, а действие miR зависит от типа и состояния клеток. miR широко изучаются в различных моделях почечных патологий, в частности, идентифицировано большое количество этих молекул, участвующих в развитии фиброза почек [142]. Например, miR-21, miR-92 и miR-122 могут быть использованы для оценки стадии ХБП и рисков развития ТСПН. Основные эффекты miR-21 связаны со сдвигом клеточного метаболизма в сторону гликолиза. miR-21 повышает жизнеспособность клеток во время острой фазы стресса путем

подавления экспрессии ряда генов, в том числе прямых мишеней miR-21, — активируемого пролиферацией пероксисом рецептора- α (PPAR α), ацил-кофермента А-оксидазы 1 (ACOX1), кофермента А-синтазы, пируватдегидрогеназы и пируваткарбоксилазы. Кроме того, miR-21 может подавлять гены Mpv17-подобных белков, регулирующих окислительно-восстановительный метаболизм [143–150]. Существуют и другие miR, ассоциированные с почечными патологиями, но их диагностические возможности в выявлении ТСПН все еще требуют изучения. Данные о miR, потенциально вовлеченных в ХБП и ТСПН, представлены в табл. 4.

Метилирование ДНК. Ранее показана корреляция между уровнем метилирования ДНК и патологиями почек, что делает метилирование ДНК подходящим биомаркером для оценки тяжести ХБП или ТСПН, а также оценки

Таблица 4. miR, связанные с ХБП и ТСПН

miR	Влияние ХБП	Возможность диагностики ХБП и ТСПН	Ссылка
miR-21	↑	+	[143–150]
miR-92	↑	+	[151, 152]
miR-93-5p	↓	+	[153]
		коррелирует с СКФ, уровень отличается у пациентов до/после трансплантации	
miR-95-3p	↓	+	[154]
		низкий уровень может быть маркером развития ТСПН	
miR-122	↓	+	[155]
miR-125b	↓	—	[156]
miR-126	↓	+	[157]
miR-145	↓	—	[156]
miR-155	↓	+	[156, 157]
miR-192	↑	+	[158]
miR-223-3p	↓	+	[153]
		коррелирует с СКФ, уровень отличается у пациентов до и после трансплантации	
miR-342	↓	—	[159]
miR-499	—	+	[158, 160]
miR-631	↑	+	[154]
		высокий уровень может быть маркером развития ТСПН	

Примечание. ↑ — повышение; ↓ — снижение; — — неизвестно; + — есть возможность; — — нет возможности.

рисков их развития. Одним из маркеров метилирования ДНК является 5-метил-2'-дезоксцитидин (5MedC), уровень которого увеличивается в моче у пациентов на поздних стадиях ХБП, а в сочетании с макроальбинурией или появлением белка $\alpha 1$ -микроглобулин ($\alpha 1m$) в моче может предсказывать и терминальную форму [161].

В крови возможным биомаркером ТСПН может служить метилирование промотора белка p66Shc. p66Shc представляет собой белок клеточной реакции на стресс, который участвует в окислительном стрессе и формировании атеросклероза. Снижение метилирования промотора p66Shc обнаруживается в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с ТСПН и коррелирует с повышенным риском смерти от сердечно-сосудистых заболеваний у этих пациентов [162]. Предполагается, что снижение метилирования промотора p66Shc может быть следствием гипергомоцистеинемии, часто сопровождающей заболевания почек.

В целом, был обнаружен широкий спектр сайтов ДНК, уровни метилирования которых связаны с ТСПН [163–166]. Однако практически не было показано совпадений между разными исследованиями, хотя три из них используют одну и ту же технологию (Infinium Human Methylation450 Beadchip) для оценки метилирования. Это указывает на необходимость отдельного рассмотрения этих участков с целью выявления индивидуальных особенностей их регуляции в разных условиях.

Некоторые из этих регионов изучены более подробно, например, ген метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR). MTHFR регулирует метаболизм метильных групп и гомоцистеина. Было показано, что метилирование MTHFR значительно выше у пациентов с ТСПН, что коррелирует с более низкой СКФ, уровнем гликированного гемоглобина (HbA1C), гликемией, уровнями общего холестерина и липопротеинов низкой плотности [165, 167]. Метилирование MTHFR также связано с гипергомоцистеинемией, которая может привести к дальнейшему повреждению клубочков и снижению СКФ [168].

ХБП может вызывать преждевременное старение почечной ткани, поэтому использование эпигенетических часов может представлять некоторый научный интерес для оценки состояния почек. Различными методами оценки эпигенетического возраста было показано, что он коррелирует с маркерами почечной недостаточности [169, 170]. Выявлено, что СКФ связана с параметрами HorvathAA,

HannumAA, PhenoAA, MRS (шкала риска эпигенетической смертности Zhang 10-CpG) и внешними эпигенетическими предикторами возраста/продолжительности жизни, которые основаны на анализе метилирования.

ИЗМЕНЕНИЯ В ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЕ КАК МАРКЕРЫ ХБП И ТСПН

Гормоны играют важную роль в функционировании почки как осморегуляторного и детоксицирующего органа на эндокринном и паракринном уровне. В норме почки участвуют в экскреции различных гормонов, в частности кортизола, альдостерона, половых стероидов, гормонов щитовидной железы, катехоламинов, а также в биodeградации пептидных гормонов, таких как паратгормон, кальцитонин и инсулин [171]. При развитии фиброза почки, как терминальной стадии патогенеза ХБП (стадии 3–5) [172–174], нарушается продукция, метаболизм, клиренс и сигналинг ряда гормонов, что выражается в накоплении гормонов в крови и их выделении с мочой. Практически все эндокринные оси («гипоталамус → гипофиз → эндокринная железа») подвергаются при этом значительным изменениям [171, 175].

Изменение содержания гормонов в различных физиологических жидкостях и в ткани почки может свидетельствовать о развитии фиброза почки и служить сигналом к изменению терапевтической стратегии при лечении ХБП. Далее будет рассмотрена роль гормонов, контролирующих водно-солевой баланс и артериальное давление, как потенциальных маркеров ХБП и ТСПН.

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС). Ангиотензин II (AngII) является основным звеном РААС, которая занимается регуляцией тонуса сосудов, артериального давления и контролем натриевого гомеостаза [176, 177]. Данный гормон является мощным стимулирующим фактором развития фиброза почки: при активации классического профибротического сигнального пути, связанного с активацией AT1-рецепторов (AT1R), AngII прямо или опосредованно стимулирует сигналинг TGF β и образование компонентов ВКМ, являющихся классическими маркерами фиброза [176, 178, 179]. Выделяют циркуляторную и локальные РААС; среди локальных наиболее развитой является интратенальная, поскольку в почке есть все необходимые субстраты и ферменты для функционирования этой системы.

Особую роль в прогрессии ХБП до ТСПН играет интратенальная РААС, ее активация критически важна в патофизиологии почечного повреждения у пациентов с ХБП. Показано, что рост экспрессии ангиотензиногена (AGT), химазы и рецепторов AngII AT1R в почках может усиливать активацию интратенальной РААС и ассоциирован с повреждением почек даже после начала диализа [180]. Активация интратенальной РААС происходит и у доноров трансплантируемой почки, не имевших до трансплантации почечного повреждения, что повышает риск развития ТСПН у доноров [181], причем это не коррелирует с изменением артериального давления, рСКФ, содержанием AngII в плазме и альбуминурией.

Содержание AGT в моче используется как маркер активации интратенальной РААС у пациентов с ХБП [182, 183]. Ряд исследователей считает более информативным анализировать отношение мочевого AGT к креатинину [184, 185]. По результатам Корейского когортного исследования исходов болезни у пациентов с ХБП (Korean Cohort Study for Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease (KNOW-CKD)), высокий уровень AGT в моче связан со снижением рСКФ более чем на 50% у пациентов с ХБП, не находящихся на диализе [185]. Похожие результаты о связи мочевого AGT с неблагоприятным прогнозом протекания ХБП были получены при проведении исследований на пациентах с аутосомно-доминантной поликистозной болезнью почек [184] и диабетом 2-го типа [184, 186].

Натрийуретические пептиды. Натрийуретические пептиды — это семейство пептидов, являющихся антагонистами РААС в регуляции тонуса сосудов и артериального давления, защищающих от гипертензии и связанных с ней патологий, в том числе почечного повреждения [187]. К натрийуретическим пептидам относятся предсердный натрийуретический пептид (ANP), мозговой натрийуретический пептид (BNP), натрийуретический пептид С-типа (CNP), гуанилин и урогуанилин.

Измерения концентрации ANP и BNP в плазме могут быть полезны для стратификации риска у пациентов с ТСПН [188, 189]. Содержание в плазме ANP и BNP или их N-концевых фрагментов повышено у пациентов с ХБП, ряд исследователей допускает возможность использования этих пептидов как прогностических маркеров прогрессирования ХБП до ТСПН и фиброза [189–192]. Основными причинами роста концентрации этих гормонов в плазме служат гипervолемия, артериальная гипертензия и сопутствующие заболевания

сердца, а также резкое снижение или полное отсутствие почечного клиренса [188, 193]. Высокая смертность пациентов с ТСПН обусловлена значительным риском развития сердечной недостаточности, связанной с высокой частотой случаев гипертрофии левого желудочка, различных кардиомиопатий и ишемической болезни сердца [194].

Натрийуретический пептид С (CNP) играет важную роль в предотвращении фиброза почки [195, 196]. Гипоксия, увеличение выброса цитокинов и профибротических ростовых факторов, сопровождающие развитие фиброза почки, служат стимулами для производства и секреции CNP [197]. Среди всех натрийуретических пептидов CNP быстрее всех подвергается разрушению нейтральной эндопептидазой [198], что создает сложности с детекцией его производных в физиологических жидкостях. В связи с тем, что его содержание в кровотоке очень мало, предполагается, что в моче обнаруживается CNP и продукты его распада именно почечного происхождения [197]. Ряд авторов предлагает рассматривать CNP как ранний маркер тубулоинтерстициального фиброза почки: в модели обструктивной нефропатии показано значительное снижение содержания этого гормона в моче крыс, причем это снижение происходит раньше, чем детектируется протеин- и альбуминурия, рост содержания креатинина и азота мочевины в крови [199].

Гуанилин — низкомолекулярный натрийуретический пептидный гормон, продуцируемый главным образом слизистыми клетками кишечника и почек [200–202]. Гуанилин связывают с различными заболеваниями почек: замечен рост его концентрации в крови пациентов с ХБП [203], гломерулонефритом и нефротическим синдромом [204]. Урогуанилин, сходный по своей структуре с гуанилином, мало изучен в контексте почечных патологий, но известно, что его концентрация в плазме растет у больных с ХБП и гломерулонефритом [205]. Есть данные о том, что его содержание повышено у пациентов, находящихся на гемодиализе, по сравнению со здоровыми испытуемыми. Большой вклад в увеличение сывороточной концентрации урогуанилина вносит снижение СКФ у таких пациентов [206], а также имеет значение, какое количество поваренной соли употребляет пациент с пищей [207].

Эритропоэтин. Эритропоэтин — это пептидный гормон, который синтезируется в почке, одна из его основных функций — стимуляция эритропоэза [208]. Поскольку ХБП и ТСПН приводят к значительным нарушениям в био-

синтезе эритропоэтина, у пациентов с различной степенью повреждения почек развивается анемия [209, 210]. Согласно данным ВОЗ, анемия соответствует уровню гемоглобина менее 13 г/дл у мужчин и 12 г/дл — у женщин до наступления менопаузы. У большинства больных ХБП (около 90%), имеющих СКФ 25 мл/мин, диагностируется анемия, так как уровень гемоглобина у таких пациентов менее 10 г/дл [211]. Введение эритропоэтина снижает темпы развития ХБП, риск смерти в результате сердечно-сосудистых заболеваний и повышает толерантность к физической нагрузке [212, 213].

Пролактин. Пролактин выполняет целый спектр функций, связанных с лактацией, размножением, иммуномодуляцией и натрийурезом [207, 214–217]. Уровень пролактина значительно повышен в крови пациентов с ХБП и встречается у 70% пациентов, находящихся на гемодиализе, что связано с нарушением клиренса этого гормона [218, 219]. Примеча-

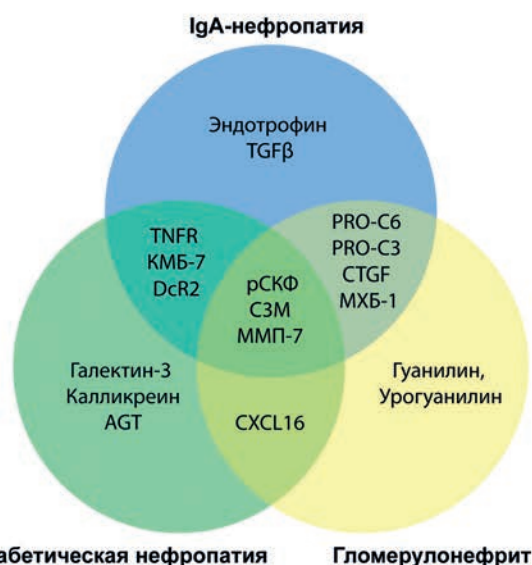
телен тот факт, что увеличение частоты диализа не снижает содержание пролактина в крови [220], в отличие от других гормонов (например, при инсулинорезистентности, связанной с ХБП, диализ решает проблему гиперинсулинемии [171]). Обычно оценивают содержание так называемого макропролактина молекулярной массой больше 100 кДа, который представляет собой комплексы молекул гормона, связавшиеся с иммуноглобулином G [221, 222]. Из литературных данных и клинических исследований можно заключить, что гиперпролактинемия при ТСПН может быть косвенным сигналом для изменения терапевтической тактики в сторону радикальных мер, а именно трансплантации почки.

Кинин-калликреиновая система. Данная система представлена группой полифункциональных белков крови, действующих на эндо- и паракринных уровнях, в том числе ответственных за регуляцию артериального

Таблица 5. Гормональные маркеры, связанные с ХБП и ТСПН

Маркер	Источник выявления	Связь с ХБП и ТСПН
AGT (интратрениальная РААС)	моча	высокое содержание AGT в моче связано со снижением рСКФ более чем на 50% или развитием ТСПН у пациентов с ХБП, не находящихся на диализе [187]; уровень AGT в моче может быть ранним биомаркером ухудшения функции почек у пациентов с ХБП 3–4 стадии [226]
AGT (интратрениальная РААС)	почка	повышенная экспрессия рецепторов AGT, химазы и рецепторов AT1R в ткани почки может усиливать активацию внутрипочечной РААС, что связано с повреждением почек даже после начала диализа [182]
ANP, BNP	сыворотка	содержание в плазме ANP, BNP или их N-концевых фрагментов повышено у пациентов с ХБП [189–192]
CNP	моча	в модели обструктивной нефропатии показано значительное снижение CNP в моче крыс; снижение происходит раньше, чем детектируется протеин- и альбуминурия, рост содержания креатинина и азота мочевины в крови [199]
Эритропоэтин	сыворотка, почка	значительное снижение концентрации в крови и процесса биосинтеза в почке при ХБП и ТСПН [209, 210]
Гуанилин	сыворотка	замечен рост концентрации гуанилина в крови пациентов с ХБП [203], гломерулонефритом и нефротическим синдромом [204]
Кинин-калликреиновая система	сыворотка	у пациентов с ХБП обнаружена положительная корреляция между соотношением калликреин/креатинин в моче и снижением рСКФ [223]
Пролактин	сыворотка	уровень пролактина значительно повышен в крови пациентов с ХБП и встречается у 70% пациентов, находящихся на гемодиализе, что связано с нарушением клиренса этого гормона [218, 219]
Урогуанилин	сыворотка	концентрация урогуанилина растет в плазме крови у больных с ХБП и гломерулонефритом [205]

а Маркеры воспаления, фиброза и гормоны



б Эпигенетические маркеры



Рис. 3. Диаграммы Венна демонстрируют биомаркеры, связанные с основными патологиями, вызывающими ХБП. *а* – Маркеры воспаления, фиброза и гормональные маркеры; *б* – перспективные эпигенетические маркеры. Сокращения: AGT – ангиотензиноген; СЗМ – фрагмент, отражающий разрушение colIII; CTGF – фактор роста соединительной ткани; СХСЛ16 – хемокиновый лиганд мотива С-Х-С 16; DcR2 – рецептор-ловушка DcR2; IgA – иммуноглобулин А; miR – микро-РНК; PRO-C3 – фрагмент, отражающий активный синтез colIII; PRO-C6 – фрагмент, отражающий активный синтез colVI; TGFβ – трансформирующий фактор роста бета; TNFR – рецепторы фактора некроза опухоли; КМБ-7 – костный морфогенетический белок 7; ММП-7 – матриксная металлопротеиназа 7; МХБ-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок 1; рСКФ – расчетная скорость клубочковой фильтрации

давления и вазодилатацию, опосредованную выделением оксида азота. Важнейшими белками этой системы являются калликреин и брадикинин. У пациентов с ХБП обнаружена положительная корреляция между соотношением калликреин/креатинин в моче и снижением рСКФ, а также содержанием в моче маркера воспаления МСР-1, что делает калликреин кандидатом в маркеры, оценивающие функциональное состояние почки [223]. Сходные данные получены и для пациентов с диабетом 1-го типа, у которых снижение калликреина плазмы ассоциировано с развитием диабетической нефропатии. Наиболее низкие значения этой сериновой протеазы обнаружены у пациентов, проходящих гемодиализ. Предполагается, что предотвращение потери калликреина при диабетической нефропатии может помочь сохранить функциональную активность почки [224]. Для промотора гена калликреина *KLK1* характерен полиморфизм, что создает сложности для определения аллелей; тем не менее был обнаружен аллель, чаще встречающийся у пациентов с ТСПН, чем у контрольных испытуемых [225].

Информация о роли гормонов в качестве потенциальных маркеров ХБП и ТСПН суммирована в табл. 5.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДИАГНОСТИКИ ТСПН

Применение описанных выше биомаркеров в повседневной диагностике может позволить персонализировать картину болезни пациентов для прогнозирования ее исхода и выбора терапевтических подходов. Клиническая картина может меняться в ходе развития ХБП и зависеть от характера заболевания и особенностей конкретного больного, поэтому можно наблюдать накопление разных биомаркеров при разных заболеваниях (рис. 3).

Существуют биомаркеры, которые можно оценить только при одном, тогда как другие – при двух или трех основных заболеваниях почек (рис. 3, *а*). Например, СЗМ и ММП-7 выявляются при всех представленных патологиях. Однако биомаркеры, специфичные для какого-то конкретного заболевания, могут селективно использоваться для его выявления. Таким образом, для диагностики заболеваний представляется полезным использовать некоторые биомаркеры в комбинации друг с другом. Например, СЗМ и ММП-7 (с рСКФ) являются основным диагностическим параметром развития ТСПН, а использование

других маркеров (например, TNFR, КМБ-7, DcR2, PRO-C6, PRO-C3, CTGF, МХБ-1, CXCL16) может сузить спектр заболеваний. При этом эндотрофин и TGF β специфичны только для IgA-нефропатии, тогда как галектин-3 специфичен только для диабетической нефропатии. Гормональные маркеры калликреин, AGT, гуанилин и урогуанилин также могут быть предикторами ТСПН только при диабетической нефропатии или гломеруло-нефрите.

Эпигенетические маркеры, такие как miR-21, miR-93-5p и miR-92, не являются уникальными биомаркерами ТСПН. miR-146a специфична для IgA-нефропатии и гломеруло-нефрита. Другие маркеры, представленные на схеме (рис. 3, б), специфичны для определенных заболеваний. Существуют некоторые ограничения для применения miR в клинической практике. Например, на текущий момент недостаточно данных для корреляции miR с различными заболеваниями. miR на диаграмме отражают только имеющиеся научные данные, и дальнейшие исследования могут выявить, что все эти miR находятся, например, в области пересечения множеств (рис. 3, б). Исходя из существующих данных, создается впечатление, что все известные miR слабо специфичны в отношении причины развития ХБП, и использование только miR в качестве биомаркеров недостаточно для определения состояния пациента и замещения рСКФ для диагностики ХБП и ТСПН. Однако разные miR имеют свои особенности, и их комбинация может стать мощным диагностическим инструментом, например,

в виде экспресс-тест-полосок, позволяющих одновременно исследовать несколько miR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в клинических исследованиях и на животных моделях идентифицировано множество маркеров ХБП, указывающих на развитие ТСПН. Некоторые из них специфичны для конкретной почечной патологии, тогда как другие более универсальны. На основании нашего анализа мы выделяем ключевые воспалительные, фиброзные, гормональные и эпигенетические маркеры, указывающие на серьезное ухудшение функции почек и развитие ТСПН. Их использование вместе с традиционными методами диагностики почечной недостаточности, такими как рСКФ, может ускорить диагностику ТСПН и стать основанием для начала соответствующей терапии или рекомендации трансплантации почки.

Вклад авторов. Все авторы — написание статьи; Е.Ю. Плотников — редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-74-00058).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schainuck, L. I., Striker, G. E., Cutler, R. E., and Benditt, E. P. (1970) Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations, *Hum. Pathol.*, **1**, 631-641, doi: 10.1016/S0046-8177(70)80061-2.
2. Bohle, A., Mackensen-Haen, S., and von Gise, H. (1987) Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution, *Am. J. Nephrol.*, **7**, 421-433, doi: 10.1159/000167514.
3. Risdon, R. A., Sloper, J. C., and De Wardener, H. E. (1968) Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis, *Lancet*, **292**, 363-366, doi: 10.1016/S0140-6736(68)90589-8.
4. Hashmi, M. F., Benjamin, O., and Lappin, S. L. (2023) End-Stage Renal Disease, In *StatPearls*, StatPearls Publishing.
5. Roufosse, C., Simmonds, N., Clahsen-van Groningen, M., Haas, M., Henriksen, K. J., Horsfield, C., Loupy, A., Mengel, M., Perkowska-Ptasińska, A., Rabant, M., Racusen, L. C., Solez, K., and Becker, J. U. (2018) A 2018 reference guide to the banff classification of renal allograft pathology, *Transplantation*, **102**, 1795-1814, doi: 10.1097/TP.0000000000002366.
6. Saran, R., Robinson, B., Abbott, K. C., Agodoa, L. Y. C., Bragg-Gresham, J., Balkrishnan, R., Bhav, N., Dietrich, X., Ding, Z., Eggers, P. W., Gaipov, A., Gillen, D., Gipson, D., Gu, H., Guro, P., Haggerty, D., Han, Y., He, K., Herman, W., et al. (2019) US Renal Data System 2018 Annual Data Report: Epidemiology

- of Kidney Disease in the United States, *Am. J. Kidney Dis.*, **73** (3 Suppl 1), A7-A8, doi: 10.1053/j.ajkd.2019.01.001.
7. Levey, A. S., de Jong, P. E., Coresh, J., El Nahas, M., Astor, B. C., Matsushita, K., Gansevoort, R. T., Kasiske, B. L., and Eckardt, K.-U. (2011) The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report, *Kidney Int.*, **80**, 17-28, doi: 10.1038/ki.2010.483.
 8. Acosta-Ochoa, I., Bustamante-Munguira, J., Mendiluce-Herrero, A., Bustamante-Bustamante, J., and Coca-Rojo, A. (2019) Impact on outcomes across KDIGO-2012 AKI criteria according to baseline renal function, *J. Clin. Med. Res.*, **8**, doi: 10.3390/jcm8091323
 9. Uslu, A., Hür, E., Şen, Ç., Şen, S., Akgün, A., Taşlı, F. A., Nart, A., Yilmaz, M., and Töz, H. (2015) To what extent estimated or measured GFR could predict subclinical graft fibrosis: a comparative prospective study with protocol biopsies, *Transplant. Int.*, **28**, 575-581, doi: 10.1111/tri.12534.
 10. Bjornstad, P., Karger, A. B., and Maahs, D. M. (2018) Measured GFR in routine clinical practice-the promise of dried blood spots, *Adv. Chronic Kidney Dis.*, **25**, 76-83, doi: 10.1053/j.ackd.2017.09.003.
 11. Zsom, L., Zsom, M., Salim, S. A., and Fülöp, T. (2022) Estimated glomerular filtration rate in chronic kidney disease: a critical review of estimate-based predictions of individual outcomes in kidney disease, *Toxins*, **14**, 127, doi: 10.3390/toxins14020127.
 12. Henderson, N. C., Rieder, F., and Wynn, T. A. (2020) Fibrosis: from mechanisms to medicines, *Nature*, **7835**, 555-566, doi: 10.1038/s41586-020-2938-9.
 13. Moeller, M. J., Kramann, R., Lammers, T., Hoppe, B., Latz, E., Ludwig-Portugall, I., Boor, P., Floege, J., Kurts, C., Weiskirchen, R., and Ostendorf, T. (2021) New aspects of kidney fibrosis-from mechanisms of injury to modulation of disease, *Front. Med.*, **8**, 814497, doi: 10.3389/fmed.2021.814497.
 14. Ghaderian, S. B., Hayati, F., Shayanpour, S., and Beladi Mousavi, S. S. (2015) Diabetes and end-stage renal disease; a review article on new concepts, *J. Renal Injury Prevent.*, **4**, 28-33, doi: 10.12861/jrip.2015.07.
 15. Watanabe, K., Sato, E., Mishima, E., Miyazaki, M., and Tanaka, T. (2022) What's new in the molecular mechanisms of diabetic kidney disease: recent advances, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 570, doi: 10.3390/ijms24010570.
 16. Lees, J. S., Welsh, C. E., Celis-Morales, C. A., Mackay, D., Lewsey, J., Gray, S. R., Lyall, D. M., Cleland, J. G., Gill, J. M. R., Jhund, P. S., Pell, J., Sattar, N., Welsh, P., and Mark, P. B. (2019) Glomerular filtration rate by differing measures, albuminuria and prediction of cardiovascular disease, mortality and end-stage kidney disease, *Nat. Med.*, **25**, 1753-1760, doi: 10.1038/s41591-019-0627-8.
 17. Frąk, W., Kućmierz, J., Szlagor, M., Młynarska, E., Rysz, J., and Franczyk, B. (2022) New insights into molecular mechanisms of chronic kidney disease, *Biomedicines*, **10**, 2846, doi: 10.3390/biomedicines10112846.
 18. Gusev, E., Solomatina, L., Zhuravleva, Y., and Sarapultsev, A. (2021) The pathogenesis of end-stage renal disease from the standpoint of the theory of general pathological processes of inflammation, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms222111453.
 19. Hewitson, T. D. (2012) Fibrosis in the kidney: is a problem shared a problem halved? *Fibrogen. Tissue Rep.*, **5** (Suppl 1), S14, doi: 10.1186/1755-1536-5-S1-S14.
 20. Barreto, D. V., Barreto, F. C., Liabeuf, S., Temmar, M., Lemke, H.-D., Tribouilloy, C., Choukroun, G., Vanholder, R., Massy, Z. A., and European Uremic Toxin Work Group (EUTox) (2010) Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease, *Kidney Int.*, **77**, 550-556, doi: 10.1038/ki.2009.503.
 21. Alicic, R. Z., Johnson, E. J., and Tuttle, K. R. (2018) Inflammatory mechanisms as new biomarkers and therapeutic targets for diabetic kidney disease, *Adv. Chronic Kidney Dis.*, **25**, 181-191, doi: 10.1053/j.ackd.2017.12.002.
 22. Fried, L., Solomon, C., Shlipak, M., Seliger, S., Stehman-Breen, C., Bleyer, A. J., Chaves, P., Furberg, C., Kuller, L., and Newman, A. (2004) Inflammatory and prothrombotic markers and the progression of renal disease in elderly individuals, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, 3184-3191, doi: 10.1097/01.ASN.0000146422.45434.35.
 23. Keller, C., Katz, R., Sarnak, M. J., Fried, L. F., Kestenbaum, B., Cushman, M., Shlipak, M. G., and CHS study. (2010) Inflammatory biomarkers and decline in kidney function in the elderly: the cardiovascular health study, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **25**, 119-124, doi: 10.1093/ndt/gfp429.
 24. Mentz, R. J., Kelly, J. P., von Lueder, T. G., Voors, A. A., Lam, C. S. P., Cowie, M. R., Kjeldsen, K., Jankowska, E. A., Atar, D., Butler, J., Fiuzat, M., Zannad, F., Pitt, B., and O'Connor, C. M. (2014) Noncardiac comorbidities in heart failure with reduced versus preserved ejection fraction, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **64**, 2281-2293, doi: 10.1016/j.jacc.2014.08.036.
 25. Pouleur, A.-C. (2015) Which biomarkers do clinicians need for diagnosis and management of heart failure with reduced ejection fraction? *Clin. Chim. Acta*, **443**, 9-16, doi: 10.1016/j.cca.2014.10.046.
 26. Feng, Y.-M., Thijs, L., Zhang, Z.-Y., Yang, W.-Y., Huang, Q.-F., Wei, F.-F., Kuznetsova, T., Jennings, A.-M., Delles, C., Lennox, R., Verhamme, P., Dominiczak, A., and Staessen, J. A. (2017) Glomerular function in relation to circulating adhesion molecules and inflammation markers in a general population,

- Nephrol. Dial. Transplant.*, **33**, 426-435, doi: 10.1093/ndt/gfx256.
27. Chiang, C.-K., Hsu, S.-P., Pai, M.-F., Peng, Y.-S., Ho, T.-I., Liu, S.-H., Hung, K.-Y., Tsai, T.-J., and Hsieh, B.-S. (2005) Plasma interleukin-18 levels in chronic renal failure and continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Blood Purif.*, **23**, 144-148, doi: 10.1159/000083620.
 28. Khanijou, V., Zafari, N., Coughlan, M. T., MacIsaac, R. J., and Ekinci, E. I. (2022) Review of potential biomarkers of inflammation and kidney injury in diabetic kidney disease, *Diab. Metab. Res. Rev.*, **38**, e3556, doi: 10.1002/dmrr.3556.
 29. Oh, Y. J., An, J. N., Kim, C. T., Yang, S. H., Lee, H., Kim, D. K., Joo, K. W., Paik, J. H., Kang, S.-W., Park, J. T., Lim, C. S., Kim, Y. S., and Lee, J. P. (2015) Circulating tumor necrosis factor α receptors predict the outcomes of human IgA nephropathy: a prospective cohort study, *PLoS One*, **10**, e0132826, doi: 10.1371/journal.pone.0132826.
 30. Niewczas, M. A., Pavkov, M. E., Skupien, J., Smiles, A., Md Dom, Z. I., Wilson, J. M., Park, J., Nair, V., Schlafly, A., Saulnier, P.-J., Satake, E., Simeone, C. A., Shah, H., Qiu, C., Looker, H. C., Fiorina, P., Ware, C. F., Sun, J. K., Doria, A., et al. (2019) A signature of circulating inflammatory proteins and development of end-stage renal disease in diabetes, *Nat. Med.*, **25**, 805-813, doi: 10.1038/s41591-019-0415-5.
 31. Khan, F., Kapoor, S., Rana, J., and Khan, S. (2022) Evaluation of Inflammatory markers in different stages of chronic renal disease, *Asian J. Med. Sci.*, **13**, 100-107, doi: 10.3126/ajms.v13i5.40454.
 32. Fathi, F., Atapour, A., Eskandari, N., Keyhanmehr, N., Hafezi, H., Mohammadi, S., and Motedayyen, H. (2019) Regulatory T-cells and their impacts on cytokine profile of end-stage renal disease patients suffering from systemic lupus erythematosus, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **33**, doi: 10.1177/2058738419863238.
 33. Abraham, R., Durkee, M. S., Ai, J., Veselits, M., Casella, G., Asano, Y., Chang, A., Ko, K., Oshinsky, C., Peninger, E., Giger, M. L., and Clark, M. R. (2022) Specific *in situ* inflammatory states associate with progression to renal failure in lupus nephritis, *J. Clin. Invest.*, **132**, e155350, doi: 10.1172/JCI155350.
 34. Lioulis, G., Fylaktou, A., Xochelli, A., Sampani, E., Tsouchnikas, I., Giamalis, P., Daikidou, D.-V., Nikolaidou, V., Papagianni, A., Theodorou, I., and Stangou, M. (2022) Clustering of end stage renal disease patients by dimensionality reduction algorithms according to lymphocyte senescence markers, *Front. Immunol.*, **13**, 841031, doi: 10.3389/fimmu.2022.841031.
 35. Turkmen, K., Guney, I., Yerlikaya, F. H., and Tonbul, H. Z. (2012) The relationship between neutrophil-to-lymphocyte ratio and inflammation in end-stage renal disease patients, *Renal Failure*, **34**, 155-159, doi: 10.3109/0886022X.2011.641514.
 36. Turkmen, K., Erdur, F. M., Ozcicek, F., Ozcicek, A., Akbas, E. M., Ozbicer, A., Demirtas, L., Turk, S., and Tonbul, H. Z. (2013) Platelet-to-lymphocyte ratio better predicts inflammation than neutrophil-to-lymphocyte ratio in end-stage renal disease patients, *Hemodial. Int.*, **17**, 391-396, doi: 10.1111/hdi.12040.
 37. Ahbap, E., Sakaci, T., Kara, E., Sahutoglu, T., Koc, Y., Basturk, T., Sevinc, M., Akgol, C., Kayalar, A. O., Ucar, Z. A., Bayraktar, F., and Unsal, A. (2016) Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in evaluation of inflammation in end-stage renal disease, *Clin. Nephrol.*, **85**, 199-208, doi: 10.5414/CN108584.
 38. Catabay, C., Obi, Y., Streja, E., Soohoo, M., Park, C., Rhee, C. M., Kovesdy, C. P., Hamano, T., and Kalantar-Zadeh, K. (2017) Lymphocyte cell ratios and mortality among incident hemodialysis patients, *Am. J. Nephrol.*, **46**, 408-416, doi: 10.1159/000484177.
 39. Ouellet, G., Malhotra, R., Penne, E. L., Usuya, L., Levin, N. W., and Kotanko, P. (2016) Neutrophil-lymphocyte ratio as a novel predictor of survival in chronic hemodialysis patients, *Clin. Nephrol.*, **85**, 191-198, doi: 10.5414/CN108745.
 40. Li, P., Xia, C., Liu, P., Peng, Z., Huang, H., Wu, J., and He, Z. (2020) Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in evaluation of inflammation in non-dialysis patients with end-stage renal disease (ESRD), *BMC Nephrology*, **21**, 511, doi: 10.1186/s12882-020-02174-0.
 41. Keane, T. J., Horejs, C.-M., and Stevens, M. M. (2018) Scarring vs. functional healing: matrix-based strategies to regulate tissue repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **129**, 407-419, doi: 10.1016/j.addr.2018.02.002.
 42. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration (2020) Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017, *Lancet*, **395**, 709-733, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30045-3.
 43. Djurdjaj, S., and Boor, P. (2019) Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis, *Mol. Aspects Med.*, **65**, 16-36, doi: 10.1016/j.mam.2018.06.002.
 44. Genovese, F., Manresa, A. A., Leeming, D. J., Karsdal, M. A., and Boor, P. (2014) The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Rep.*, **7**, 4, doi: 10.1186/1755-1536-7-4.
 45. Buchtler, S., Grill, A., Hofmarksrichter, S., Stöckert, P., Schiechl-Brachner, G., Rodriguez Gomez, M., Neumayer, S., Schmidbauer, K., Talke, Y., Klinkhammer, B. M., Boor, P., Medvinsky, A., Renner, K., Castrop, H., and Mack, M. (2018) Cellular origin and functional relevance of collagen I production in the kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **29**, 1859-1873, doi: 10.1681/ASN.2018020138.

46. Sharma, A. K., Mauer, S. M., Kim, Y., and Michael, A. F. (1993) Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy, *Kidney Int.*, **44**, 774-788, doi: 10.1038/ki.1993.312.
47. Mason, R. M., and Wahab, N. A. (2003) Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 1358-1373, doi: 10.1097/01.ASN.0000065640.77499.D7.
48. Vleming, L. J., Baelde, J. J., Westendorp, R. G., Daha, M. R., van Es, L. A., and Bruijn, J. A. (1995) Progression of chronic renal disease in humans is associated with the deposition of basement membrane components and decorin in the interstitial extracellular matrix, *Clin. Nephrol.*, **44**, 211-219.
49. Boor, P., Konieczny, A., Villa, L., Kunter, U., van Roeyen, C. R. C., LaRochelle, W. J., Smithson, G., Arrol, S., Ostendorf, T., and Floege, J. (2007) PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **22**, 1323-1331, doi: 10.1093/ndt/gfl691.
50. Boor, P., Celec, P., Behuliak, M., Grancic, P., Kebis, A., Kukan, M., Pronayová, N., Liptaj, T., Ostendorf, T., and Sebeková, K. (2009) Regular moderate exercise reduces advanced glycation and ameliorates early diabetic nephropathy in obese Zucker rats, *Metab. Clin. Exp.*, **58**, 1669-1677, doi: 10.1016/j.metabol.2009.05.025.
51. Hewitson, T. D., Smith, E. R., and Samuel, C. S. (2014) Qualitative and quantitative analysis of fibrosis in the kidney, *Nephrology*, **19**, 721-726, doi: 10.1111/nep.12321.
52. Gopala K Rangan, G. H. T. (2007) Quantification of renal pathology by image analysis, *Nephrology*, **12**, 553-558, doi: 10.1111/j.1440-1797.2007.00855.x.
53. Bertram, J. F. (2001) Counting in the kidney, *Kidney Int.*, **59**, 792-796, doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.059002792.x.
54. Ricard-Blum, S., and Ruggiero, F. (2005) The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane, *Patholog. Biol.*, **53**, 430-442, doi: 10.1016/j.patbio.2004.12.024.
55. Ignat'eva, N. Y., Danilov, N. A., Averkiev, S. V., Obrezkova, M. V., Lunin, V. V., and Sobol', E. N. (2007) Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues, *J. Anal. Chem.*, **62**, 51-57, doi: 10.1134/S106193480701011X.
56. Genovese, F., Rasmussen, D. G. K., Karsdal, M. A., Jesky, M., Ferro, C., Fenton, A., and Cockwell, P. (2021) Imbalanced turnover of collagen type III is associated with disease progression and mortality in high-risk chronic kidney disease patients, *Clin. Kidney J.*, **14**, 593-601, doi: 10.1093/ckj/sfz174.
57. Poulsen, C. G., Rasmussen, D. G. K., Genovese, F., Hansen, T. W., Nielsen, S. H., Reinhard, H., von Scholten, B. J., Jacobsen, P. K., Parving, H.-H., Karsdal, M. A., Rossing, P., and Frimodt-Møller, M. (2023) Marker for kidney fibrosis is associated with inflammation and deterioration of kidney function in people with type 2 diabetes and microalbuminuria, *PLoS One*, **18**, e0283296, doi: 10.1371/journal.pone.0283296.
58. Mavrogeorgis, E., Mischak, H., Latosinska, A., Vlahou, A., Schanstra, J. P., Siwy, J., Jankowski, V., Beige, J., and Jankowski, J. (2021) Collagen-derived peptides in CKD: a link to fibrosis, *Toxins*, **14**, 10, doi: 10.3390/toxins14010010.
59. Morita, M., Uchigata, Y., Hanai, K., Ogawa, Y., and Iwamoto, Y. (2011) Association of urinary type IV collagen with GFR decline in young patients with type 1 diabetes, *Am. J. Kidney Dis.*, **58**, 915-920, doi: 10.1053/j.ajkd.2011.04.019.
60. Klimontov, V. V., Eremenko, N. V., Myakina, N. E., and Fazullina, O. N. (2015) Cystatin C and collagen type IV in diagnostics of chronic kidney disease in type 2 diabetic patients, *Diabetes Mellitus*, **18**, 87-93, doi: 10.14341/dm2015187-93.
61. Pilemann-Lyberg, S., Rasmussen, D. G. K., Hansen, T. W., Tofte, N., Winther, S. A., Holm Nielsen, S., Theilade, S., Karsdal, M. A., Genovese, F., and Rossing, P. (2019) Markers of collagen formation and degradation reflect renal function and predict adverse outcomes in patients with type 1 diabetes, *Diabetes Care*, **42**, 1760-1768, doi: 10.2337/dc18-2599.
62. Fenton, A., Jesky, M. D., Ferro, C. J., Sørensen, J., Karsdal, M. A., Cockwell, P., and Genovese, F. (2017) Serum endotrophin, a type VI collagen cleavage product, is associated with increased mortality in chronic kidney disease, *PLoS One*, **12**, e0175200, doi: 10.1371/journal.pone.0175200.
63. Rasmussen, D. G. K., Fenton, A., Jesky, M., Ferro, C., Boor, P., Tepel, M., Karsdal, M. A., Genovese, F., and Cockwell, P. (2017) Urinary endotrophin predicts disease progression in patients with chronic kidney disease, *Sci. Rep.*, **7**, 17328, doi: 10.1038/s41598-017-17470-3.
64. Den Hoedt, C. H., van Gelder, M. K., Grooteman, M. P., Nubé, M. J., Blankestijn, P. J., Goldschmeding, R., Kok, R. J., Bots, M. L., van den Dorpel, M. A., and Gerritsen, K. G. F. (2019) Connective tissue growth factor is related to all-cause mortality in hemodialysis patients and is lowered by on-line hemodiafiltration: results from the convective transport study, *Toxins*, **11**, 268, doi: 10.3390/toxins11050268.
65. Soylemezoglu, O., Wild, G., Dalley, A. J., MacNeil, S., Milford-Ward, A., Brown, C. B., and el Nahas, A. M. (1997) Urinary and serum type III collagen: markers of renal fibrosis, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **12**, 1883-1889, doi: 10.1093/ndt/12.9.1883.
66. Teppo, A.-M., Törnroth, T., Honkanen, E., and Grönhagen-Riska, C. (2003) Urinary amino-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP) as a marker of interstitial fibrosis in renal transplant recipients,

- Transplantation*, **75**, 2113-2119, doi: 10.1097/01.TP.0000066809.60389.48.
67. Ghoul, B. E., Squalli, T., Servais, A., Elie, C., Meas-Yedid, V., Trivint, C., Vanmassenhove, J., Grünfeld, J.-P., Olivo-Marin, J.-C., Thervet, E., Noël, L.-H., Prié, D., and Fakhouri, F. (2010) Urinary procollagen III aminoterminal propeptide (PIIINP): a fibrotest for the nephrologist, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **5**, 205-210, doi: 10.2215/CJN.06610909.
 68. Predictive Value of PIIINP Urinary for the Development of Chronic Renal Failure in Patients with Cystic Fibrosis After Lung Transplantation (MUCO-IRC) (2012, April 6) ClinicalTrials.gov, URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01572194?cond=NCT01572194anddraw=2andrank=1>.
 69. Ix, J. H., Katz, R., Bansal, N., Foster, M., Weiner, D. E., Tracy, R., Jotwani, V., Hughes-Austin, J., McKay, D., Gabbai, F., Hsu, C.-Y., Bostom, A., Levey, A. S., and Shlipak, M. G. (2017) Urine fibrosis markers and risk of allograft failure in kidney transplant recipients: a case-cohort ancillary study of the FAVORIT trial, *Am. J. Kidney Dis.*, **69**, 410-419, doi: 10.1053/j.ajkd.2016.10.019.
 70. Papatirou, M., Genovese, F., Klinkhammer, B. M., Kunter, U., Nielsen, S. H., Karsdal, M. A., Floege, J., and Boor, P. (2015) Serum and urine markers of collagen degradation reflect renal fibrosis in experimental kidney diseases, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **30**, 1112-1121, doi: 10.1093/ndt/gfv063.
 71. Genovese, F., Akhgar, A., Lim, S. S., Farris, A. B., Battle, M., Cobb, J., Sinibaldi, D., Karsdal, M. A., and White, W. I. (2021) Collagen type III and VI remodeling biomarkers are associated with kidney fibrosis in *Lupus nephritis*, *Kidney360*, **2**, 1473-1481, doi: 10.34067/KID.0001132021.
 72. Lee, Y. H., Kim, K. P., Park, S.-H., Kim, D.-J., Kim, Y.-G., Moon, J.-Y., Jung, S.-W., Kim, J. S., Jeong, K.-H., Lee, S.-Y., Yang, D.-H., Lim, S.-J., Woo, J.-T., Rhee, S. Y., Chon, S., Choi, H.-Y., Park, H.-C., Jo, Y.-I., Yi, J.-H., et al. (2021) Urinary chemokine C-X-C motif ligand 16 and endostatin as predictors of tubulointerstitial fibrosis in patients with advanced diabetic kidney disease, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **36**, 295-305, doi: 10.1093/ndt/gfz168.
 73. Lin, C. H. S., Chen, J., Ziman, B., Marshall, S., Maizel, J., and Goligorsky, M. S. (2014) Endostatin and kidney fibrosis in aging: a case for antagonistic pleiotropy? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **306**, H1692-H1699, doi: 10.1152/ajpheart.00064.2014.
 74. Caterino, M., Zacchia, M., Costanzo, M., Bruno, G., Arcaniolo, D., Trepiccione, F., Siciliano, R. A., Mazzeo, M. F., Ruoppolo, M., and Capasso, G. (2018) Urine proteomics revealed a significant correlation between urine-fibronectin abundance and estimated-GFR decline in patients with Bardet-Biedl syndrome, *Kidney Blood Press. Res.*, **43**, 389-405, doi: 10.1159/000488096.
 75. Cao, Y. H., Lv, L. L., Zhang, X., Hu, H., Ding, L. H., Yin, D., Zhang, Y. Z., Ni, H. F., Chen, P. S., and Liu, B. C. (2015) Urinary vimentin mRNA as a potential novel biomarker of renal fibrosis, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **309**, F514-F522, doi: 10.1152/ajprenal.00449.2014.
 76. Eddy, A. A. (1996) Molecular insights into renal interstitial fibrosis, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **7**, 2495-2508, doi: 10.1681/ASN.V7122495.
 77. Sakairi, T., Hiromura, K., Yamashita, S., Takeuchi, S., Tomioka, M., Ideura, H., Maeshima, A., Kaneko, Y., Kuroiwa, T., Nangaku, M., Takeuchi, T., and Nojima, Y. (2007) Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter, *Kidney Int.*, **72**, 307-318, doi: 10.1038/sj.ki.5002277.
 78. Hugo, C., Shankland, S. J., Pichler, R. H., Couser, W. G., and Johnson, R. J. (1998) Thrombospondin 1 precedes and predicts the development of tubulointerstitial fibrosis in glomerular disease in the rat, *Kidney Int.*, **53**, 302-311, doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00774.x.
 79. Wang, Z., Divanyan, A., Jourdeuil, F. L., Goldman, R. D., Ridge, K. M., Jourdeuil, D., and Lopez-Soler, R. I. (2018) Vimentin expression is required for the development of EMT-related renal fibrosis following unilateral ureteral obstruction in mice, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **315**, F769-F780, doi: 10.1152/ajprenal.00340.2017.
 80. Duffield, J. S. (2014) Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis, *J. Clin. Invest.*, **124**, 2299-2306, doi: 10.1172/JCI72267.
 81. Lepreux, S., and Desmoulière, A. (2015) Human liver myofibroblasts during development and diseases with a focus on portal (myo)fibroblasts, *Front. Physiol.*, **6**, 173, doi: 10.3389/fphys.2015.00173.
 82. Hinz, B. (2016) Myofibroblasts, *Exp. Eye Res.*, **142**, 56-70, doi: 10.1016/j.exer.2015.07.009.
 83. Sun, K.-H., Chang, Y., Reed, N. I., and Sheppard, D. (2016) α -Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF β activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **310**, L824-L836, doi: 10.1152/ajplung.00350.2015.
 84. Bochaton-Piallat, M.-L., Gabbiani, G., and Hinz, B. (2016) The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions, *F1000Res.*, **5**, doi: 10.12688/f1000research.8190.1.
 85. Timsit, M. O., Gadet, R., Ben Abdennebi, H., Codas, R., Petruzzo, P., and Badet, L. (2008) Renal ischemic preconditioning improves recovery of kidney function and decreases alpha-smooth muscle actin expression in a rat model, *J. Urology*, **180**, 388-391, doi: 10.1016/j.juro.2008.02.043.
 86. Singh, S. P., Tao, S., Fields, T. A., Webb, S., Harris, R. C., and Rao, R. (2015) Glycogen synthase kinase-3 inhibition attenuates fibroblast activation and develop-

- ment of fibrosis following renal ischemia-reperfusion in mice, *Dis. Models Mech.*, **8**, 931-940, doi: 10.1242/dmm.020511.
87. Zhang, A., Wang, H., Wang, B., Yuan, Y., Klein, J. D., and Wang, X. H. (2019) Exogenous miR-26a suppresses muscle wasting and renal fibrosis in obstructive kidney disease, *FASEB J.*, **33**, 13590-13601, doi: 10.1096/fj.201900884R.
88. Wong M. G., and Pollock C. A. (2014) Biomarkers in kidney fibrosis: are they useful? *Kidney Int. Suppl.*, **4**, 79-83, doi: 10.1038/kisup.2014.15
89. Wong, M. G., Perkovic, V., Woodward, M., Chalmers, J., Li, Q., Hillis, G. S., Yaghoobian Azari, D., Jun, M., Poulter, N., Hamet, P., Williams, B., Neal, B., Mancía, G., Cooper, M., and Pollock, C. A. (2013) Circulating bone morphogenetic protein-7 and transforming growth factor- β 1 are better predictors of renal end points in patients with type 2 diabetes mellitus, *Kidney Int.*, **83**, 278-284, doi: 10.1038/ki.2012.383.
90. Ito, Y., Aten, J., Bende, R. J., Oemar, B. S., Rabelink, T. J., Weening, J. J., and Goldschmeding, R. (1998) Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis, *Kidney Int.*, **53**, 853-861, doi: 10.1111/j.1523-1755.1998.00820.x.
91. Phanish, M. K., Winn, S. K., and Dockrell, M. E. C. (2010) Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2) – a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis, *Nephron Exp. Nephrol.*, **114**, e83-e92, doi: 10.1159/000262316.
92. Nguyen, T. Q., Tarnow, L., Jorsal, A., Oliver, N., Roestenberg, P., Ito, Y., Parving, H.-H., Rossing, P., van Nieuwenhoven, F. A., and Goldschmeding, R. (2008) Plasma connective tissue growth factor is an independent predictor of end-stage renal disease and mortality in type 1 diabetic nephropathy, *Diabetes Care*, **31**, 1177-1182, doi: 10.2337/dc07-2469.
93. Chen, J., Hu, W., Xiao, F., Lin, L., Chen, K., Wang, L., Wang, X., and He, Y. (2019) DCR2, a cellular senescent molecule, is a novel marker for assessing tubulointerstitial fibrosis in patients with immunoglobulin a nephropathy, *Kidney Blood Press. Res.*, **44**, 1063-1074, doi: 10.1159/000502233.
94. Ju, W., Nair, V., Smith, S., Zhu, L., Shedden, K., Song, P. X. K., Mariani, L. H., Eichinger, F. H., Berthier, C. C., Randolph, A., Lai, J. Y.-C., Zhou, Y., Hawkins, J. J., Bitzer, M., Sampson, M. G., Thier, M., Solier, C., Duran-Pacheco, G. C., Duchateau-Nguyen, G. (2015) Tissue transcriptome-driven identification of epidermal growth factor as a chronic kidney disease biomarker, *Sci. Translat. Med.*, **7**, 316ra193, doi: 10.1126/scitranslmed.aac7071.
95. Nowak, G., and Schnellmann, R. G. (1995) Integrative effects of EGF on metabolism and proliferation in renal proximal tubular cells, *Am. J. Physiol.*, **269** (5 Pt 1), C1317-C1325, doi: 10.1152/ajpcell.1995.269.5.C1317.
96. Isaka, Y. (2016) Epidermal growth factor as a prognostic biomarker in chronic kidney diseases, *Ann. Translat. Med.*, **4** (Suppl 1), S62, doi: 10.21037/atm.2016.10.64.
97. Kim, J. E., Han, D., Jeong, J. S., Moon, J. J., Moon, H. K., Lee, S., Kim, Y. C., Yoo, K. D., Lee, J. W., Kim, D. K., Kwon, Y. J., Kim, Y. S., and Yang, S. H. (2021) Multisample mass spectrometry-based approach for discovering injury markers in chronic kidney disease, *Mol. Cell. Proteomics*, **20**, 100037, doi: 10.1074/mcp.RA120.002159.
98. Tang, W. H. W., Shrestha, K., Shao, Z., Borowski, A. G., Troughton, R. W., Thomas, J. D., and Klein, A. L. (2011) Usefulness of plasma galectin-3 levels in systolic heart failure to predict renal insufficiency and survival, *Am. J. Cardiol.*, **108**, 385-390, doi: 10.1016/j.amjcard.2011.03.056.
99. Sotomayor, C. G., Te Velde-Keyzer, C. A., Diepstra, A., van Londen, M., Pol, R. A., Post, A., Gans, R. O. B., Nolte, I. M., Slart, R. H. J. A., de Borst, M. H., Berger, S. P., Rodrigo, R., Navis, G. J., de Boer, R. A., and Bakker, S. J. L. (2021) Galectin-3 and risk of late graft failure in kidney transplant recipients: a 10-year prospective cohort study, *Transplantation*, **105**, 1106-1115, doi: 10.1097/TP.0000000000003359.
100. O'Seaghdha, C. M., Hwang, S.-J., Ho, J. E., Vasan, R. S., Levy, D., and Fox, C. S. (2013) Elevated galectin-3 precedes the development of CKD, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **24**, 1470-1477, doi: 10.1681/ASN.2012090909.
101. Ou, S.-M., Tsai, M.-T., Chen, H.-Y., Li, F.-A., Tseng, W.-C., Lee, K.-H., Chang, F.-P., Lin, Y.-P., Yang, R.-B., and Tarng, D.-C. (2021) Identification of galectin-3 as potential biomarkers for renal fibrosis by RNA-sequencing and clinicopathologic findings of kidney biopsy, *Front. Med.*, **8**, 748225, doi: 10.3389/fmed.2021.748225.
102. Ou, S.-M., Tsai, M.-T., Chen, H.-Y., Li, F.-A., Lee, K.-H., Tseng, W.-C., Chang, F.-P., Lin, Y.-P., Yang, R.-B., and Tarng, D.-C. (2022) Urinary galectin-3 as a novel biomarker for the prediction of renal fibrosis and kidney disease progression, *Biomedicines*, **10**, 585, doi: 10.3390/biomedicines10030585.
103. LeBleu, V. S., Teng, Y., O'Connell, J. T., Charytan, D., Müller, G. A., Müller, C. A., Sugimoto, H., and Kalluri, R. (2013) Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis, *Nat. Med.*, **19**, 227-231, doi: 10.1038/nm.2989.
104. Yuan, T., and Li, Y. (2017) Human epididymis protein 4 as a potential biomarker of chronic kidney disease in female patients with normal ovarian function, *Lab. Med.*, **48**, 238-243, doi: 10.1093/labmed/lmx036.
105. Amer, H., Lieske, J. C., Rule, A. D., Kremers, W. K., Larson, T. S., Franco Palacios, C. R., Stegall, M. D., and Cosio, F. G. (2013) Urine high and low molecular

- weight proteins one-year post-kidney transplant: relationship to histology and graft survival, *Am. J. Transplant.*, **13**, 676-684, doi: 10.1111/ajt.12044.
106. Nadkarni, G. N., Rao, V., Ismail-Beigi, F., Fonseca, V. A., Shah, S. V., Simonson, M. S., Cantley, L., Devarajan, P., Parikh, C. R., and Coca, S. G. (2016) Association of urinary biomarkers of inflammation, injury, and fibrosis with renal function decline: the ACCORD trial, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **11**, 1343-1352, doi: 10.2215/CJN.12051115.
 107. Park, M., Katz, R., Shlipak, M. G., Weiner, D., Tracy, R., Jotwani, V., Hughes-Austin, J., Gabbai, F., Hsu, C. Y., Pfeffer, M., Bansal, N., Bostom, A., Gutierrez, O., Sarnak, M., Levey, A., and Ix, J. H. (2017) Urinary markers of fibrosis and risk of cardiovascular events and death in kidney transplant recipients: the FAVORIT trial, *Am. J. Transplant.*, **17**, 2640-2649, doi: 10.1111/ajt.14284.
 108. Glasscock, R. J. (2016) Urinary chemoattractant protein 1: a new biomarker of renal fibrosis, *Am. J. Nephrol.*, **43**, 451-453, doi: 10.1159/000446864.
 109. Ihara, K., Skupien, J., Kobayashi, H., Md Dom, Z. I., Wilson, J. M., O'Neil, K., Badger, H. S., Bowsman, L. M., Satake, E., Breyer, M. D., Duffin, K. L., and Krolewski, A. S. (2020) Profibrotic circulating proteins and risk of early progressive renal decline in patients with type 2 diabetes with and without albuminuria, *Diabetes Care*, **43**, 2760-2767, doi: 10.2337/dc20-0630.
 110. Zhou, D., Tian, Y., Sun, L., Zhou, L., Xiao, L., Tan, R. J., Tian, J., Fu, H., Hou, F. F., and Liu, Y. (2017) Matrix metalloproteinase-7 is a urinary biomarker and pathogenic mediator of kidney fibrosis, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **28**, 598-611, doi: 10.1681/ASN.2016030354.
 111. Pallet, N., Chauvet, S., Chassé, J.-F., Vincent, M., Avillach, P., Levi, C., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J.-C., Nga-Matsogo, D., Beaune, P., Thervet, E., and Karras, A. (2014) Urinary retinol binding protein is a marker of the extent of interstitial kidney fibrosis, *PLoS One*, **9**, e84708, doi: 10.1371/journal.pone.0084708.
 112. Honkanen, E., Teppo, A. M., Törnroth, T., Groop, P. H., and Grönholm-Riska, C. (1997) Urinary transforming growth factor-beta 1 in membranous glomerulonephritis, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **12**, 2562-2568, doi: 10.1093/ndt/12.12.2562.
 113. Susianti, H., Handono, K., Gunawan, A., Mintaroem, K., Purnomo, B. B., and Kalim, H. (2015) Transforming growth factor β 1 is better than α smooth muscle actin for the prediction of renal fibrosis in patients with nephritic lupus, *Biomarkers Genomic Med.*, **7**, 25-30, doi: 10.1016/j.bgm.2014.08.010.
 114. Murakami, K., Takemura, T., Hino, S., and Yoshioka, K. (1997) Urinary transforming growth factor-beta in patients with glomerular diseases, *Pediatric Nephrol.*, **11**, 334-336, doi: 10.1007/s004670050289.
 115. Harris, S., Coupes, B. M., Roberts, S. A., Roberts, I. S. D., Short, C. D., and Brenchley, P. E. C. (2007) TGF-beta1 in chronic allograft nephropathy following renal transplantation, *J. Nephrol.*, **20**, 177-185.
 116. Chan, J., Svensson, M., Tannæs, T. M., Waldum-Grevbo, B., Jenssen, T., and Eide, I. A. (2022) Associations of serum uromodulin and urinary epidermal growth factor with measured glomerular filtration rate and interstitial fibrosis in kidney transplantation, *Am. J. Nephrol.*, **53**, 108-117, doi: 10.1159/000521757.
 117. Hussain, S., Habib, A., Hussain, M. S., and Najmi, A. K. (2020) Potential biomarkers for early detection of diabetic kidney disease, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **161**, 108082, doi: 10.1016/j.diabres.2020.108082.
 118. Lin, Z., Gong, Q., Zhou, Z., Zhang, W., Liao, S., Liu, Y., Yan, X., Pan, X., Lin, S., and Li, X. (2011) Increased plasma CXCL16 levels in patients with chronic kidney diseases, *Eur. J. Clin. Invest.*, **41**, 836-845, doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02473.x.
 119. Unal, H. U., Kurt, Y. G., Gok, M., Cetinkaya, H., Karaman, M., Eyileten, T., Vural, A., Oguz, Y., and Yilmaz, M. I. (2014) The importance of serum CXCL-16 levels in patients with grade III-V chronic kidney disease, *Turkish Nephrol. Dial. Transplant.*, **23**, 234-239, doi: 10.5262/tndt.2014.1003.10.
 120. Ruge, T., Carlsson, A. C., Larsson, T. E., Carrero, J.-J., Larsson, A., Lind, L., and Ärnlöv, J. (2014) Endostatin level is associated with kidney injury in the elderly: findings from two community-based cohorts, *Am. J. Nephrol.*, **40**, 417-424, doi: 10.1159/000369076.
 121. Chen, J., Hamm, L. L., Kleinpeter, M. A., Husserl, F., Khan, I. E., Chen, C.-S., Liu, Y., Mills, K. T., He, C., Rifai, N., Simon, E. E., and He, J. (2012) Elevated plasma levels of endostatin are associated with chronic kidney disease, *Am. J. Nephrology*, **35**, 335-340, doi: 10.1159/000336109.
 122. Chu, C., Hasan, A. A., Gaballa, M. M. S., Zeng, S., Xiong, Y., Elitok, S., Krämer, B. K., and Hoher, B. (2020) Endostatin is an independent risk factor of graft loss after kidney transplant, *Am. J. Nephrology*, **51**, 373-380, doi: 10.1159/000507824.
 123. Carlsson, A. C., Östgren, C. J., Länne, T., Larsson, A., Nystrom, F. H., and Ärnlöv, J. (2016) The association between endostatin and kidney disease and mortality in patients with type 2 diabetes, *Diab. Metab.*, **42**, 351-357, doi: 10.1016/j.diabet.2016.03.006.
 124. Gregg, L. P., Tio, M. C., Li, X., Adams-Huet, B., de Lemos, J. A., and Hedayati, S. S. (2018) Association of monocyte chemoattractant protein-1 with death and atherosclerotic events in chronic kidney disease, *Am. J. Nephrol.*, **47**, 395-405, doi: 10.1159/000488806.
 125. Domingos, M. A. M., Moreira, S. R., Gomez, L., Goulart, A., Lotufo, P. A., Benseñor, I., and Titan, S. (2016) Urinary retinol-binding protein: relationship to renal function and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease, *PLoS One*, **11**, e0162782, doi: 10.1371/journal.pone.0162782.
 126. Gerritsen, K. G., Abrahams, A. C., Peters, H. P., Nguyen, T. Q., Koeners, M. P., den Hoedt, C. H.,

- Dendooven, A., van den Dorpel, M. A., Blankestijn, P. J., Wetzels, J. F., Joles, J. A., Goldschmeding, R., and Kok, R. J. (2012) Effect of GFR on plasma N-terminal connective tissue growth factor (CTGF) concentrations, *Am. J. Kidney Dis.*, **59**, 619-627, doi: 10.1053/j.ajkd.2011.12.019.
127. Wan, J., Wang, Y., Cai, G., Liang, J., Yue, C., Wang, F., Song, J., Wang, J., Liu, M., Luo, J., and Li, L. (2016) Elevated serum concentrations of HE4 as a novel biomarker of disease severity and renal fibrosis in kidney disease, *Oncotarget*, **7**, 67748-67759, doi: 10.18632/oncotarget.11682.
128. Shen, X., Cheng, J., Yu, G., Li, X., Li, H., and Chen, J. (2021) Urine β 2-microglobulin and retinol-binding protein and renal disease progression in IgA nephropathy, *Front. Med.*, **8**, 792782, doi: 10.3389/fmed.2021.792782.
129. Tachaudomdach, C., Kantachuvesiri, S., Changsirikulchai, S., Wimolluck, S., Pinpradap, K., and Kitiyakara, C. (2012) Connective tissue growth factor gene expression and decline in renal function in lupus nephritis, *Exp. Ther. Med.*, **3**, 713-718, doi: 10.3892/etm.2012.473.
130. Steubl, D., Buzkova, P., Garimella, P. S., Ix, J. H., Devarajan, P., Bennett, M. R., Chaves, P. H. M., Shlipak, M. G., Bansal, N., and Sarnak, M. J. (2019) Association of serum uromodulin with ESKD and kidney function decline in the elderly: the cardiovascular health study, *Am. J. Kidney Dis.*, **74**, 501-509, doi: 10.1053/j.ajkd.2019.02.024.
131. Badid, C., Desmouliere, A., Babici, D., Hadj-Aissa, A., McGregor, B., Lefrancois, N., Touraine, J. L., and Laville, M. (2002) Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **17**, 1993-1998, doi: 10.1093/ndt/17.11.1993.
132. Kashtan, C., Schachter, A., Klickstein, L., Liu, X., Jennings, L., and Finkel, N. (2022) Urinary monocyte chemoattractant protein-1 in patients with Alport syndrome, *Kidney Int. Rep.*, **7**, 1112-1114, doi: 10.1016/j.kir.2022.01.1052.
133. Yang, X., Ou, J., Zhang, H., Xu, X., Zhu, L., Li, Q., Li, J., Xie, D., Sun, J., Zha, Y., Li, Y., Tian, J., Liu, Y., and Hou, F. F. (2020) Urinary matrix metalloproteinase 7 and prediction of IgA nephropathy progression, *Am. J. Kidney Dis.*, **75**, 384-393, doi: 10.1053/j.ajkd.2019.07.018.
134. Kato, M., and Natarajan, R. (2019) Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory, *Nat. Rev. Nephrol.*, **15**, 327-345, doi: 10.1038/s41581-019-0135-6.
135. Ding, H., Zhang, L., Yang, Q., Zhang, X., and Li, X. (2021) Epigenetics in kidney diseases, *Adv. Clin. Chem.*, **104**, 233-297, doi: 10.1016/bs.acc.2020.09.005.
136. Tampe, B., and Zeisberg, M. (2014) Contribution of genetics and epigenetics to progression of kidney fibrosis, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **29**, iv72-iv79, doi: 10.1093/ndt/gft025.
137. Zhao, H., Pan, S., Duan, J., Liu, F., Li, G., Liu, D., and Liu, Z. (2021) Integrative analysis of mA regulator-mediated RNA methylation modification patterns and immune characteristics in lupus nephritis, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 724837, doi: 10.3389/fcell.2021.724837.
138. Chou, Y.-H., Pan, S.-Y., Shao, Y.-H., Shih, H.-M., Wei, S.-Y., Lai, C.-F., Chiang, W.-C., Schrimpf, C., Yang, K.-C., Lai, L.-C., Chen, Y.-M., Chu, T.-S., and Lin, S.-L. (2020) Methylation in pericytes after acute injury promotes chronic kidney disease, *J. Clin. Invest.*, **130**, 4845-4857, doi: 10.1172/JCI135773.
139. Jiang, M., Bai, M., Lei, J., Xie, Y., Xu, S., Jia, Z., and Zhang, A. (2020) Mitochondrial dysfunction and the AKI-to-CKD transition, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **319**, F1105-F1116, doi: 10.1152/ajprenal.00285.2020.
140. Tanemoto, F., Nangaku, M., and Mimura, I. (2022) Epigenetic memory contributing to the pathogenesis of AKI-to-CKD transition, *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 1003227, doi: 10.3389/fmolb.2022.1003227.
141. Nangaku, M., Hirakawa, Y., Mimura, I., Inagi, R., and Tanaka, T. (2017) Epigenetic changes in the acute kidney injury-to-chronic kidney disease transition, *Nephron*, **137**, 256-259, doi: 10.1159/000476078.
142. Fan, Y., Chen, H., Huang, Z., Zheng, H., and Zhou, J. (2020) Emerging role of miRNAs in renal fibrosis, *RNA Biol.*, **17**, 1-12, doi: 10.1080/15476286.2019.1667215.
143. Glowacki, F., Savary, G., Gnemmi, V., Buob, D., Van der Hauwaert, C., Lo-Guidice, J.-M., Bouy  , S., Hazzan, M., Pottier, N., Perrais, M., Aubert, S., and Cauffiez, C. (2013) Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis, *PLoS One*, **8**, e58014, doi: 10.1371/journal.pone.0058014.
144. Gniewkiewicz, M. S., Paszkowska, I., Gozdowska, J., Czerwinska, K., Sadowska-Jakubowicz, A., Deborska-Materkowska, D., Perkowska-Ptasinska, A., Kosieradzki, M., and Durlak, M. (2020) Urinary MicroRNA-21-5p as potential biomarker of interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) in kidney transplant recipients, *Diagnostics*, **10**, 113, doi: 10.3390/diagnostics10020113.
145. Chen, C., Lu, C., Qian, Y., Li, H., Tan, Y., Cai, L., and Weng, H. (2017) Urinary miR-21 as a potential biomarker of hypertensive kidney injury and fibrosis, *Sci. Rep.*, **7**, 17737, doi: 10.1038/s41598-017-18175-3.
146. Szeto, C.-C., Ching-Ha, K. B., Ka-Bik, L., Mac-Moune, L. F., Cheung-Lung, C. P., Gang, W., Kai-Ming, C., and Kam-Tao, L. P. (2012) MicroRNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases, *Disease Markers*, **33**, 137-144, doi: 10.1155/2012/842764.

147. Pezzolesi, M. G., Satake, E., McDonnell, K. P., Major, M., Smiles, A. M., and Krolewski, A. S. (2015) Circulating TGF- β 1-regulated miRNAs and the risk of rapid progression to ESRD in type 1 diabetes, *Diabetes*, **64**, 3285-3293, doi: 10.2337/db15-0116.
148. Lopez-Anton, M., Lambie, M., Lopez-Cabrera, M., Schmitt, C. P., Ruiz-Carpio, V., Bartosova, M., Schaefer, B., Davies, S., Stone, T., Jenkins, R., Taylor, P. R., Topley, N., Bowen, T., and Fraser, D. (2017) miR-21 promotes fibrogenesis in peritoneal dialysis, *Am. J. Pathol.*, **187**, 1537-1550, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.03.007.
149. Chau, B. N., Xin, C., Hartner, J., Ren, S., Castano, A. P., Linn, G., Li, J., Tran, P. T., Kaimal, V., Huang, X., Chang, A. N., Li, S., Kalra, A., Grafals, M., Portilla, D., MacKenna, D. A., Orkin, S. H., and Duffield, J. S. (2012) MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways, *Sci. Translat. Med.*, **4**, 121ra18, doi: 10.1126/scitranslmed.3003205.
150. Lai, J. Y., Luo, J., O'Connor, C., Jing, X., Nair, V., Ju, W., Randolph, A., Ben-Dov, I. Z., Matar, R. N., Briskin, D., Zavadil, J., Nelson, R. G., Tuschl, T., Brosius, F. C., Kretzler, M., and Bitzer, M. (2015) MicroRNA-21 in glomerular injury, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **26**, 805-816, doi: 10.1681/ASN.2013121274.
151. Shang, F., Wang, S.-C., Hsu, C.-Y., Miao, Y., Martin, M., Yin, Y., Wu, C.-C., Wang, Y.-T., Wu, G., Chien, S., Huang, H.-D., Tarng, D.-C., Shiu, Y.-T., Cheung, A. K., Huang, P.-H., Chen, Z., and Shyy, J. Y.-J. (2017) MicroRNA-92a mediates endothelial dysfunction in CKD, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **28**, 3251-3261, doi: 10.1681/ASN.2016111215.
152. Henique, C., Bollée, G., Loyer, X., Grahmmer, F., Dhaun, N., Camus, M., Vernerey, J., Guyonnet, L., Gaillard, F., Lazareth, H., Meyer, C., Bensaada, I., Legrès, L., Satoh, T., Akira, S., Bruneval, P., Dimmeler, S., Tedgui, A., Karras, A., et al. (2017) Genetic and pharmacological inhibition of microRNA-92a maintains podocyte cell cycle quiescence and limits crescentic glomerulonephritis, *Nat. Commun.*, **8**, 1829, doi: 10.1038/s41467-017-01885-7.
153. Ulbing, M., Kirsch, A. H., Leber, B., Lemesch, S., Münzker, J., Schweighofer, N., Hofer, D., Trummer, O., Rosenkranz, A. R., Müller, H., Eller, K., Stadlbauer, V., and Obermayer-Pietsch, B. (2017) MicroRNAs 223-3p and 93-5p in patients with chronic kidney disease before and after renal transplantation, *Bone*, **95**, 115-123, doi: 10.1016/j.bone.2016.11.016.
154. Han, Q., Zhang, Y., Jiao, T., Li, Q., Ding, X., Zhang, D., Cai, G., and Zhu, H. (2021) Urinary sediment microRNAs can be used as potential noninvasive biomarkers for diagnosis, reflecting the severity and prognosis of diabetic nephropathy, *Nutrit. Diabetes*, **11**, 24, doi: 10.1038/s41387-021-00166-z.
155. Rivoli, L., Vliegthart, A. D. B., de Potter, C. M. J., van Bragt, J. J. M. H., Tzoumas, N., Gallacher, P., Farrah, T. E., Dhaun, N., and Dear, J. W. (2017) The effect of renal dysfunction and haemodialysis on circulating liver specific miR-122, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **83**, 584-592, doi: 10.1111/bcp.13136.
156. Chen, N. X., Kiattisunthorn, K., O'Neill, K. D., Chen, X., Moorthi, R. N., Gattone, V. H., 2nd, Allen, M. R., and Moe, S. M. (2013) Decreased microRNA is involved in the vascular remodeling abnormalities in chronic kidney disease (CKD), *PLoS One*, **8**, e64558, doi: 10.1371/journal.pone.0064558.
157. Wang, H., Peng, W., Shen, X., Huang, Y., Ouyang, X., and Dai, Y. (2012) Circulating levels of inflammation-associated miR-155 and endothelial-enriched miR-126 in patients with end-stage renal disease, *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, **45**, 1308-1314, doi: 10.1590/S0100-879X2012007500165.
158. Abdelsalam, L., Ibrahim, A. A., Shalaby, A., Osman, N., Hashad, A., Badawy, D., Elghobary, H., and Amer, E. (2019) Expression of miRNAs-122, -192 and -499 in end stage renal disease associated with acute myocardial infarction, *Arch. Med. Sci.*, **15**, 1247-1253, doi: 10.5114/aoms.2019.87095.
159. Jiang, Z.-H., Tang, Y.-Z., Song, H.-N., Yang, M., Li, B., and Ni, C.-L. (2020) miRNA-342 suppresses renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by targeting SOX6, *Int. J. Mol. Med.*, **45**, 45-52, doi: 10.3892/ijmm.2019.4388.
160. Fawzy, M. S., Abu AlSel, B. T., Al Ageeli, E., Al-Qahtani, S. A., Abdel-Daim, M. M., and Toraih, E. A. (2020) Long non-coding RNA MALAT1 and microRNA-499a expression profiles in diabetic ESRD patients undergoing dialysis: a preliminary cross-sectional analysis, *Arch. Physiol. Biochem.*, **126**, 172-182, doi: 10.1080/13813455.2018.1499119.
161. Onishi, A., Sugiyama, H., Kitagawa, M., Yamanari, T., Tanaka, K., Ogawa-Akiyama, A., Kano, Y., Mise, K., Tanabe, K., Morinaga, H., Kinomura, M., Uchida, H. A., and Wada, J. (2019) Urine 5MedC, a marker of DNA methylation, in the progression of chronic kidney disease, *Dis. Markers*, **2019**, 5432453, doi: 10.1155/2019/5432453.
162. Geisel, J., Schorr, H., Heine, G. H., Bodis, M., Hübner, U., Knapp, J.-P., and Herrmann, W. (2007) Decreased p66Shc promoter methylation in patients with end-stage renal disease, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **45**, 1764-1770, doi: 10.1515/CCLM.2007.357.
163. Wing, M. R., Devaney, J. M., Joffe, M. M., Xie, D., Feldman, H. I., Dominic, E. A., Guzman, N. J., Ramezani, A., Susztak, K., Herman, J. G., Cope, L., Harmon, B., Kwabi-Addo, B., Gordish-Dressman, H., Go, A. S., He, J., Lash, J. P., Kusek, J. W., Raj, D. S., and Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study (2014) DNA methylation profile associated with rapid decline in kidney function: findings from the

- CRIC study, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **29**, 864-872, doi: 10.1093/ndt/gft537.
164. Chu, A. Y., Tin, A., Schlosser, P., Ko, Y.-A., Qiu, C., Yao, C., Joehanes, R., Grams, M. E., Liang, L., Gluck, C. A., Liu, C., Coresh, J., Hwang, S.-J., Levy, D., Boerwinkle, E., Pankow, J. S., Yang, Q., Fornage, M., Fox, C. S., et al. (2017) Epigenome-wide association studies identify DNA methylation associated with kidney function, *Nat. Commun.*, **8**, 1286, doi: 10.1038/s41467-017-01297-7.
165. Sapienza, C., Lee, J., Powell, J., Erinle, O., Yafai, F., Reichert, J., Siraj, E. S., and Madaio, M. (2011) DNA methylation profiling identifies epigenetic differences between diabetes patients with ESRD and diabetes patients without nephropathy, *Epigenetics*, **6**, 20-28, doi: 10.4161/epi.6.1.13362.
166. Qiu, C., Hanson, R. L., Fufaa, G., Kobes, S., Gluck, C., Huang, J., Chen, Y., Raj, D., Nelson, R. G., Knowler, W. C., and Susztak, K. (2018) Cytosine methylation predicts renal function decline in American Indians, *Kidney Int.*, **93**, 1417-1431, doi: 10.1016/j.kint.2018.01.036.
167. Ghattas, M., El-Shaarawy, F., Mesbah, N., and Abo-Elmatty, D. (2014) DNA methylation status of the methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter in peripheral blood of end-stage renal disease patients, *Mol. Biol. Rep.*, **41**, 683-688, doi: 10.1007/s11033-013-2906-7.
168. Li, N., Chen, Y.-F., and Zou, A.-P. (2002) Implications of hyperhomocysteinemia in glomerular sclerosis in hypertension, *Hypertension*, **39** (2 Pt 2), 443-448, doi: 10.1161/hy02t2.102992.
169. Yusipov, I., Kondakova, E., Kalyakulina, A., Krivonosov, M., Lobanova, N., Bacalini, M. G., Franceschi, C., Vedunova, M., and Ivanchenko, M. (2022) Accelerated epigenetic aging and inflammatory/immunological profile (ipAGE) in patients with chronic kidney disease, *GeroScience*, **44**, 817-834, doi: 10.1007/s11357-022-00540-4.
170. Matías-García, P. R., Ward-Caviness, C. K., Raffield, L. M., Gao, X., Zhang, Y., Wilson, R., Gao, X., Nano, J., Bostom, A., Colicino, E., Correa, A., Coull, B., Eaton, C., Hou, L., Just, A. C., Kunze, S., Lange, L., Lange, E., Lin, X., et al. (2021) DNAm-based signatures of accelerated aging and mortality in blood are associated with low renal function, *Clin. Epigenet.*, **13**, 121, doi: 10.1186/s13148-021-01082-w.
171. Niemczyk, S., Niemczyk, L., and Romejko-Ciepielewska, K. (2012) Basic endocrinological disorders in chronic renal failure, *Endokrynol. Polska*, **63**, 250-257.
172. Panizo, S., Martínez-Arias, L., Alonso-Montes, C., Cannata, P., Martín-Carro, B., Fernández-Martín, J. L., Naves-Díaz, M., Carrillo-López, N., and Cannata-Andía, J. B. (2021) Fibrosis in chronic kidney disease: pathogenesis and consequences, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 408, doi: 10.3390/ijms22010408.
173. Liu, Y. (2006) Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics, *Kidney Int.*, **69**, 213-217, doi: 10.1038/sj.ki.5000054.
174. Cho, M. H. (2010) Renal fibrosis, *Korean J. Pediatrics*, **53**, 735-740, doi: 10.3345/kjp.2010.53.7.735.
175. Banaei, S., and Rezagholizadeh, L. (2019) The role of hormones in renal disease and ischemia-reperfusion injury, *Iranian J. Basic Med. Sci.*, **22**, 469.
176. AlQudah, M., Hale, T. M., and Czubryt, M. P. (2020) Targeting the renin-angiotensin-aldosterone system in fibrosis, *Matrix Biol.*, **91-92**, 92-108, doi: 10.1016/j.matbio.2020.04.005.
177. Carey, R. M., Wang, Z. Q., and Siragy, H. M. (2000) Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*, **35** (1 Pt 2), 155-163, doi: 10.1161/01.HYP.35.1.155.
178. Mezzano, S. A., Ruiz-Ortega, M., and Egido, J. (2001) Angiotensin II and renal fibrosis, *Hypertension*, **38** (3 Pt 2), 635-638, doi: 10.1161/hy09t1.094234.
179. Balakumar, P., Sambathkumar, R., Mahadevan, N., Muhsinah, A. B., Alsayari, A., Venkateswaramurthy, N., and Jagadeesh, G. (2019) A potential role of the renin-angiotensin-aldosterone system in epithelial-to-mesenchymal transition-induced renal abnormalities: Mechanisms and therapeutic implications, *Pharmacol. Res.*, **146**, 104314, doi: 10.1016/j.phrs.2019.104314.
180. Ohashi, N., Isobe, S., Ishigaki, S., Suzuki, T., Ono, M., Fujikura, T., Tsuji, T., Kato, A., Ozono, S., and Yasuda, H. (2017) Intrarenal renin-angiotensin system activity is augmented after initiation of dialysis, *Hypertens. Res.*, **40**, 364-370, doi: 10.1038/hr.2016.143.
181. Ohashi, N., Isobe, S., Matsuyama, T., Ishigaki, S., Suzuki, T., Tsuji, T., Otsuka, A., Kato, A., Miyake, H., and Yasuda, H. (2019) The intrarenal renin-angiotensin system is activated immediately after kidney donation in kidney transplant donors, *Internal Med.*, **58**, 643-648, doi: 10.2169/internalmedicine.1756-18.
182. Reams, G., Villarreal, D., Wu, Z., and Bauer, J. H. (1994) Urinary angiotensin II: a marker of renal tissue activity? *Nephron*, **67**, 450-458, doi: 10.1159/000188215.
183. Yamamoto, T., Nakagawa, T., Suzuki, H., Ohashi, N., Fukasawa, H., Fujigaki, Y., Kato, A., Nakamura, Y., Suzuki, F., and Hishida, A. (2007) Urinary angiotensinogen as a marker of intrarenal angiotensin II activity associated with deterioration of renal function in patients with chronic kidney disease, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**, 1558-1565, doi: 10.1681/ASN.2006060554.
184. Park, H. C., Kim, J., Cho, A., Kim, D. H., Lee, Y. K., Ryu, H., Kim, H., Oh, K. H., Oh, Y. K., Hwang, Y. H., Lee, K. B., Kim, S. W., Kim, Y. H., Lee, J., Ahn, C., and KNOW-CKD Investigators Group (2020) Urinary angiotensinogen in addition to imaging classification in the prediction of renal outcome in autosomal

- dominant polycystic kidney disease, *J. Korean Med. Sci.*, **35**, e165, doi: 10.3346/jkms.2020.35.e165.
185. Suh, S. H., Oh, T. R., Choi, H. S., Yang, E. M., Kim, C. S., Bae, E. H., Ma, S. K., Oh, K.-H., Jung, J. Y., Hyun, Y. Y., and Kim, S. W. (2022) Urinary angiotensinogen and progression of chronic kidney disease: results from KNOW-CKD study, *Biomolecules*, **12**, 1280, doi: 10.3390/biom12091280.
 186. Lee, M. J., Kim, S. S., Kim, I. J., Song, S. H., Kim, E. H., Seo, J. Y., Kim, J. H., Kim, S., Jeon, Y. K., Kim, B. H., and Kim, Y. K. (2017) Changes in urinary angiotensinogen associated with deterioration of kidney function in patients with type 2 diabetes mellitus, *J. Korean Med. Sci.*, **32**, 782-788, doi: 10.3346/jkms.2017.32.5.782.
 187. Choi, M. R., and Fernández, B. E. (2021) Protective renal effects of atrial natriuretic peptide: where are we now? *Front. Physiol.*, **12**, 680213, doi: 10.3389/fphys.2021.680213.
 188. Khalifeh, N., Haider, D., and Hörl, W. H. (2009) Natriuretic peptides in chronic kidney disease and during renal replacement therapy: an update, *J. Invest. Med.*, **57**, 33-39, doi: 10.2310/JIM.0b013e318194f44b.
 189. Wang, A. Y.-M., and Lai, K.-N. (2008) Use of cardiac biomarkers in end-stage renal disease, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **19**, 1643-1652, doi: 10.1681/ASN.2008010012.
 190. Spanaus, K.-S., Kronenberg, F., Ritz, E., Schlapbach, R., Fliser, D., Hersberger, M., Kollerits, B., König, P., von Eckardstein, A., and Mild-to-Moderate Kidney Disease Study Group (2007) B-type natriuretic peptide concentrations predict the progression of nondiabetic chronic kidney disease: the mild-to-moderate kidney disease study, *Clin. Chem.*, **53**, 1264-1272, doi: 10.1373/clinchem.2006.083170.
 191. Dieplinger, B., Mueller, T., Kollerits, B., Struck, J., Ritz, E., von Eckardstein, A., Haltmayer, M., Kronenberg, F., and MMKD Study Group (2009) Pro-A-type natriuretic peptide and pro-adrenomedullin predict progression of chronic kidney disease: the MMKD study, *Kidney Int.*, **75**, 408-414, doi: 10.1038/ki.2008.560.
 192. Yandle, T. G., Espiner, E. A., Gary Nicholls, M., and Duff, H. (1986) Radioimmunoassay and characterization of atrial natriuretic peptide in human plasma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **63**, 72-79, doi: 10.1210/jcem-63-1-72.
 193. Safley, D. M., Awad, A., Sullivan, R. A., Sandberg, K. R., Mourad, I., Boulware, M., Merhi, W., and McCullough, P. A. (2005) Changes in B-type natriuretic peptide levels in hemodialysis and the effect of depressed left ventricular function, *Adv. Chronic Kidney Dis.*, **12**, 117-124, doi: 10.1053/j.ackd.2004.11.002.
 194. Wahl, H. G., Graf, S., Renz, H., and Fassbinder, W. (2004) Elimination of the cardiac natriuretic peptides B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP by hemodialysis, *Clin. Chem.*, **50**, 1071-1074, doi: 10.1373/clinchem.2003.030692.
 195. Cataliotti, A., Giordano, M., De Pascale, E., Giordano, G., Castellino, P., Jougasaki, M., Costello, L. C., Boerrigter, G., Tsuruda, T., Belluaro, P., Lee, S.-C., Huntley, B., Sandberg, S., Malatino, L. S., and Burnett, J. C., Jr. (2002) CNP production in the kidney and effects of protein intake restriction in nephrotic syndrome, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **283**, F464-F472, doi: 10.1152/ajprenal.00372.2001.
 196. Hu, P., Zhang, X. C., Kong, H. B., Xia, X., Hu, B., and Qin, Y. H. (2015) Exogenous C-type natriuretic peptide infusion ameliorates unilateral ureteral obstruction-induced tubulointerstitial fibrosis in rats, *Lab. Invest.*, **95**, 263-272, doi: 10.1038/labinvest.2014.149.
 197. Zakeri, R., Burnett, J. C., Jr, and Sangaralingham, S. J. (2015) Urinary C-type natriuretic peptide: an emerging biomarker for heart failure and renal remodeling, *Clin. Chim. Acta*, **443**, 108-113, doi: 10.1016/j.cca.2014.12.009.
 198. Kenny, A. J., Bourne, A., and Ingram, J. (1993) Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11, *Biochem. J.*, **291** (Pt 1), 83-88, doi: 10.1042/bj2910083.
 199. Hu, P., Wang, J., Hu, B., Lu, L., Xuan, Q., and Qin, Y. H. (2012) Increased urinary C-type natriuretic peptide excretion may be an early marker of renal tubulointerstitial fibrosis, *Peptides*, **37**, 98-105, doi: 10.1016/j.peptides.2012.06.009.
 200. Carrithers, S. L., Hill, M. J., Johnson, B. R., O'Hara, S. M., Jackson, B. A., Ott, C. E., Lorenz, J., Mann, E. A., Giannella, R. A., Forte, L. R., and Greenberg, R. N. (1999) Renal effects of uroguanylin and guanylin *in vivo*, *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, **32**, 1337-1344, doi: 10.1590/S0100-879X1999001100003.
 201. Sindić, A., and Schlatter, E. (2005) Mechanisms of actions of guanylin peptides in the kidney, *Pflügers Arch.*, **450**, 283-291, doi: 10.1007/s00424-005-1464-9.
 202. Sindić, A., and Schlatter, E. (2007) Renal electrolyte effects of guanylin and uroguanylin, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **16**, 10-15, doi: 10.1097/MNH.0b013e328011cb4a.
 203. Nakazato, M., Yamaguchi, H., Shiomi, K., Date, Y., Fujimoto, S., Kangawa, K., Matsuo, H., and Matsuura, S. (1994) Identification of 10-kDa proguanylin as a major guanylin molecule in human intestine and plasma and its increase in renal insufficiency, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 1966-1975, doi: 10.1006/bbrc.1994.2901.
 204. Kinoshita, H., Fujimoto, S., Fukae, H., Yokota, N., Hisanaga, S., Nakazato, M., and Eto, T. (1999) Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome, *Nephron*, **81**, 160-164, doi: 10.1159/000045272.

205. Nakazato, M., Yamaguchi, H., Kinoshita, H., Kangawa, K., Matsuo, H., Chino, N., and Matsukura, S. (1996) Identification of biologically active and inactive human uroguanylins in plasma and urine and their increases in renal insufficiency, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**, 586-593, doi: 10.1006/bbrc.1996.0447.
206. Fukae, H., Kinoshita, H., Fujimoto, S., Nakazato, M., and Eto, T. (2000) Plasma concentration of uroguanylin in patients on maintenance dialysis therapy, *Nephron*, **84**, 206-210, doi: 10.1159/000045578.
207. Kinoshita, H., Fujimoto, S., Nakazato, M., Yokota, N., Date, Y., Yamaguchi, H., Hisanaga, S., and Eto, T. (1997) Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases, *Kidney Int.*, **52**, 1028-1034, doi: 10.1038/ki.1997.424.
208. Sasaki, R., Masuda, S., and Nagao, M. (2000) Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1775-1793, doi: 10.1271/bbb.64.1775.
209. Hayat, A. (2009) Erythropoietin friend or foe in chronic kidney disease anemia: an analysis of randomized controlled trials, observational studies and meta-analyses, *Br. J. Med. Practit.*, **2**, 12-20.
210. Sacks, D., Baxter, B., Campbell, B. C. V., Carpenter, J. S., Cognard, C., Dippel, D., Eesa, M., Fischer, U., Hausegger, K., Hirsch, J. A., Shazam Hussain, M., Jansen, O., Jayaraman, M. V., Khalessi, A. A., Kluck, B. W., Lavine, S., Meyers, P. M., Ramee, S., Rüfenacht, D. A., et al. (2018) Multisociety consensus quality improvement revised consensus statement for endovascular therapy of acute ischemic stroke, *Int. J. Stroke*, **13**, 612-632, doi: 10.1016/j.jvir.2017.11.026.
211. Lankhorst, C. E., and Wish, J. B. (2010) Anemia in renal disease: diagnosis and management, *Blood Rev.*, **24**, 39-47, doi: 10.1016/j.blre.2009.09.001.
212. Provatopoulou, S. T., and Ziroyiannis, P. N. (2011) Clinical use of erythropoietin in chronic kidney disease: outcomes and future prospects, *Hippokratia*, **15**, 109-115.
213. Ghasemi, F., Abdi, A., Salari, N., Tohidi, M. R., and Faraji, A. (2019) Comparing the effects of intravenous and subcutaneous Erythropoietin on blood indices in hemodialysis patients, *Sci. Rep.*, **9**, 2284, doi: 10.1038/s41598-018-38193-z.
214. Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., and LaPensee, E. W. (2008) What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr. Rev.*, **29**, 1-41, doi: 10.1210/er.2007-0017.
215. Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., and Nagy, G. (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion, *Physiol. Rev.*, **80**, 1523-1631, doi: 10.1152/physrev.2000.80.4.1523.
216. Devi, Y. S., Sangeeta Devi, Y., and Halperin, J. (2014) Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **382**, 400-410, doi: 10.1016/j.mce.2013.09.016.
217. Takada, M., and Hokari, S. (2007) Prolactin increases Na^+ transport across adult bullfrog skin via stimulation of both ENaC and Na^+/K^+ -pump, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **151**, 325-331, doi: 10.1016/j.ygcen.2007.01.040.
218. Sievertsen, G. D., Lim, V. S., Nakawatase, C., and Frohman, L. A. (1980) Metabolic clearance and secretion rates of human prolactin in normal subjects and in patients with chronic renal failure, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **50**, 846-852, doi: 10.1210/jcem-50-5-846.
219. Dourado, M., Cavalcanti, F., Vilar, L., and Cantilino, A. (2020) Relationship between prolactin, chronic kidney disease, and cardiovascular risk, *Int. J. Endocrinol.*, **2020**, 9524839, doi: 10.1155/2020/9524839.
220. Lo, J. C., Beck, G. J., Kaysen, G. A., Chan, C. T., Kliger, A. S., Rocco, M. V., Chertow, G. M., and for the FHN Study (2017) Hyperprolactinemia in end-stage renal disease and effects of frequent hemodialysis, *Hemodial. Int.*, **2**, 190-196, doi: 10.1111/hdi.12489.
221. Shimatsu, A., and Hattori, N. (2012) Macroprolactinemia: diagnostic, clinical, and pathogenic significance, *Clin. Dev. Immunol.*, **2012**, 167132, doi: 10.1155/2012/167132.
222. Huang, W., and Molitch, M. E. (2021) Prolactin and other pituitary disorders in kidney disease, *Semin. Nephrol.*, **41**, 156-167, doi: 10.1016/j.semnephrol.2021.03.010.
223. Chiang, W.-C., Lin, S.-L., Chen, Y.-M., Wu, K.-D., and Tsai, T.-J. (2008) Urinary kallikrein excretion is related to renal function change and inflammatory status in chronic kidney disease patients receiving angiotensin II receptor blocker treatment, *Nephrology*, **13**, 198-203, doi: 10.1111/j.1440-1797.2008.00933.x.
224. Härma, M.-A., Dahlström, E. H., Sandholm, N., Forsblom, C., Groop, P.-H., Lehto, M., and FinnDiane Study Group (2020) Decreased plasma kallikrein activity is associated with reduced kidney function in individuals with type 1 diabetes, *Diabetologia*, **63**, 1349-1354, doi: 10.1007/s00125-020-05144-1.
225. Yu, H., Song, Q., Freedman, B. I., Chao, J., Chao, L., Rich, S. S., and Bowden, D. W. (2002) Association of the tissue kallikrein gene promoter with ESRD and hypertension, *Kidney Int.*, **61**, 1030-1039, doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00198.x.
226. Study of Urinary Angiotensinogen as a Marker to Warn the Deterioration of Renal Function in CKD Patients Early. (n.d.) ClinicalTrials.gov. Retrieved September 2009, URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT0118494?cond=NCT0118494anddraw=2andrank=1>.

MARKERS OF END-STAGE RENAL DISEASE PROGRESSION: BEYOND THE GFR

Review

**E. I. Yakupova^{1*}, P. A. Abramicheva¹, A. D. Bocharnikov²,
N. V. Andrianova¹, and E. Y. Plotnikov^{1,3*}**

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: elmira.yaku@gmail.com; plotnikov@belozersky.msu.ru*

² *International School of Medicine of the Future, Sechenov First Moscow State Medical University,
119992 Moscow, Russia*

³ *Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology,
117997 Moscow, Russia*

Chronic kidney disease may progress to end-stage renal disease (ESRD) with a high risk of morbidity and mortality. ESRD requires immediate initiation of therapy or a decision on dialysis or kidney transplantation. Therefore, timely diagnosis of pathology progression is critical for many patients. ESRD is associated with pathological changes, including inflammation, fibrosis, endocrine disorders and following epigenetic changes in various cells, all these alterations could serve as markers for ESRD identification. This review summarizes conventional and promising biomarkers of ESRD, which can be evaluated in kidney tissue, blood, or urine. Some of them are narrowly specific to a particular pathology, while others are more versatile. We suggested several universal inflammatory, fibrotic, hormonal, and epigenetic markers indicative of severe deterioration of renal function and progression of ESRD for improvement of ESRD diagnostics.

Keywords: kidney fibrosis, fibrosis markers, chronic kidney disease, kidney failure, end-stage renal disease

ЦИТОХРОМЫ P450: ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ КАТАЛИЗА И ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРОВ И БИОРЕАКТОРОВ

Обзор

© 2023 П.И. Королева¹, Т.В. Булко¹, Л.Е. Агафонова¹, В.В. Шумянцева^{1,2*}

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.06.2023

После доработки 23.08.2023

Принята к публикации 25.08.2023

Цитохромы P450 – уникальное семейство ферментов, обнаруженное во всех царствах живых существ (у животных, бактерий, растений, грибов, архей). Основной функциональной ролью цитохромов P450 является биотрансформация экзогенных и эндогенных соединений. Данный обзор посвящен проблеме повышения эффективности электрокатализа цитохромами P450, которые обладают уникальными возможностями как для создания биосенсоров, так и для биотехнологического применения. В работе рассмотрены основные способы создания реконструированных и электрохимических каталитических систем на основе цитохромов P450, а также современные тенденции и подходы к практическому применению цитохромов P450.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром P450, каталитический механизм, биоэлектрохимия, электрокатализ.

DOI: 10.31857/S0320972523100172, **EDN:** OVNWSI

ВВЕДЕНИЕ.

РОЛЬ ЦИТОХРОМОВ P450 В БИОТРАНСФОРМАЦИИ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Цитохромы P450 являются гемопротеинами, относящимися к цитохромам типа *b*. Они представлены в бактериях, грибах, растениях, дрожжах, беспозвоночных и позвоночных животных. У млекопитающих цитохромы P450 обнаруживаются в различных органах. Их наибольшая концентрация наблюдается в тканях печени, эпителии кишечника, мозга, легких, и почек. У человека выявлено 57 генов различных цитохромов P450. Они подразделяются на 18 семейств и 43 подсемейства. Цитохромы P450 метаболизируют большое разнообразие как эндогенных, так и экзогенных субстратов. Цитохромы P450 1A1, 2B6, 2C9, 3A4 играют важную роль в катаболизме эндогенных сте-

роидов, таких как тестостерон, прогестерон, андростендион, кортизол и желчные кислоты, подвергая их реакции гидроксилирования. Цитохромы P450 11A1, 17A1, 19A1, 21A2 участвуют в биосинтезе стероидных гормонов (прегненолон, прогестерон, андростендион, эстрон, тестостерон, эстрадиол, кортизол и альдостерон) и холестерина [1, 2]. Кроме того, цитохромы P450 участвуют в метаболизме витамина D3, арахидоновой кислоты, жирных кислот [3, 4]. Крайне важным свойством цитохромов P450 является обезвреживание токсинов, попадающих в организм, а также биотрансформация лекарственных средств. Наиболее экспрессируемые в организме человека цитохромы P450 3A4, 2C9, 2E1, 1A2 участвуют в 90% реакций I фазы метаболических превращений всех применяемых лекарств [2, 5].

Цитохромы P450 катализируют стерео- и региоспецифичные реакции в отношении

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДДАБ – дидодецилдиметиламмоний бромид; CPR – NADPH-зависимая цитохром P450 редуктаза.

* Адресат для корреспонденции.

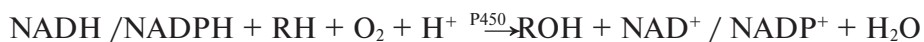


Схема 1. Обобщенный механизм реакции, катализируемой цитохромом P450

насыщенных и ненасыщенных углеводородов, ароматических соединений и стероидов. Под действием цитохромов P450 возможны следующие реакции: окисление спиртов, N-, O-, S-деалкилирование, расщепление насыщенной углерод-углеродной (C–C) и углерод-водородной (C–H) связи с участием молекулярного кислорода при атмосферном давлении, приводящее к образованию более полярного, по сравнению с субстратом, продукта реакции, способствуя тем самым II фазе метаболизма с участием N-ацетилтрансферазы, глутатион-S-трансферазы, глюкуронозилтрансферазы, эпоксидгидролазы и метилтрансферазы [6]. Это приводит к большому разнообразию метаболических путей биотрансформации экзогенных и эндогенных соединений [7]. Окисление лекарственного препарата, осуществляемое при участии изоферментов цитохрома P450, может приводить к снижению, инаktivации или изменению его фармакологических свойств или, наоборот, повышать его фармакологическую активность. Например, изоформы CYP2D6 и CYP3A4 участвуют в метаболизме противоопухолевого препарата — тамоксифена, и образовании эндоксифена, обладающего большей, по сравнению с тамоксифеном, противоопухолевой активностью.

Благодаря разнообразию не только среди цитохромов P450, но и многообразию субстратов, метаболизируемых данными ферментами, а также типов катализируемых реакций, исследование каталитических свойств цитохромов P450 важно для решения медицинских и фармакологических задач. В связи с этим разработка систем для моделирования цитохром P450-зависимых путей биотрансформации и специфических химических реакций является актуальной задачей современной биотехнологии, биохимии, биоэлектрохимии, персонализированной медицины и энзимологии.

В последние годы был опубликован ряд обзоров, посвященных созданию биосенсоров на основе ферментов, в том числе цитохромов P450 и других гемопротеинов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков [8–11]. Основная цель данных обзоров — показать разнообразие электрохимических биосенсоров и их комбинации с другими методами, такими как масс-спектрометрия, газовая и жидкостная хроматография, для исследования метаболитов реакций. Цель данного обзора — рассмотреть

различные подходы, способствующие повышению эффективности цитохром P450-ферментативных систем, и, в перспективе, созданию биореакторов.

МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМ P450-СИСТЕМ

Особенностью каталитического механизма цитохромов P450 является бисубстратная схема — с использованием двух субстратов, молекулярного кислорода и органической молекулы, при этом один из атомов кислорода присоединяется к молекуле субстрата, а другой протонируется с образованием воды (схема 1).

Для цитохромов P450 существуют различные варианты электрон-транспортной цепи [12–14], характерные для различных организмов или различной клеточной локализации. Для цитохромов P450 выделяют 10 классов электрон-транспортных систем. В более общем виде их можно классифицировать на три типа: митохондриальные, микросомальные и самодостаточные (рис. 1) [12–15].

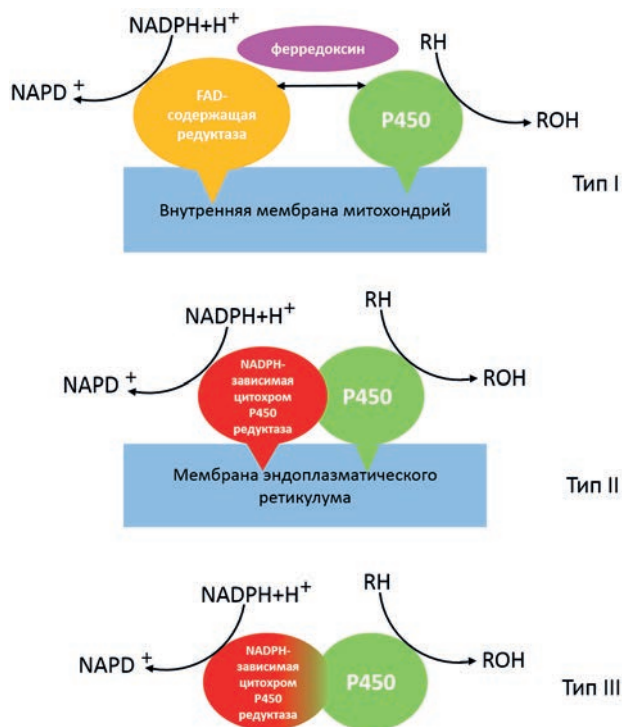


Рис. 1. Структурная организация цитохром P450-систем [12–15]

NADH/NADPH → редуктаза (FAD → FMN) → Цитохром P450

Схема 2. Электронный транспорт в микросомальных системах

К первому типу относятся как некоторые бактериальные изоформы цитохрома P450, так и локализованные в митохондриях эукариот. Электрон-транспортная цепь таких цитохромов P450 состоит из трех отдельных белков: FAD-содержащей редуктазы, переносящей восстановительные эквиваленты на ферредоксин, который передает восстановительные эквиваленты непосредственно на цитохром P450. В бактериальных системах все перечисленные белки растворимы, а в эукариотических клетках только ферредоксин является растворимым и локализован в матриксе митохондрий, а редуктаза и цитохром P450 закреплены на внутренней мембране митохондрий. Примером цитохрома P450 млекопитающих митохондриального типа может служить семейство CYP11, локализованное в надпочечниках и отвечающее за биосинтез стероидных гормонов [16]. Примером бактериальных цитохромов P450 является фермент P450_{cam}, относящийся к семейству CYP101 из *Pseudomonas putida*, отвечающих за биотрансформацию D-камфоры [17].

Второй тип электрон-транспортной цепи характерен для большинства изоформ цитохрома P450 эукариот, обладающих наибольшим разнообразием каталитических реакций. Микросомальная система состоит из двух белков, интегрально закрепленных на поверхности эндоплазматического ретикула: NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы (CPR) и цитохрома P450. Цитохром *b*₅ участвует в независимом от CPR переносе электронов от NADH-зависимой цитохром *b*₅-редуктазы, а также в аллостерической регуляции цитохрома P450 [15].

Некоторые бактериальные цитохромы P450 принадлежат к самодостаточным ферментам. В таких системах белок редокс-партнер находится на одной полипептидной цепи с цитохромом P450. Для таких белков существуют различные комбинации доменов, участвующих в электрон-транспортной цепи цитохромов P450. Наиболее изученным из флавогемопroteинов является CYP102A1 (P450 BM3) из *Bacillus megaterium*, используемый в качестве модели эукариотических цитохромов P450 благодаря идентичной электрон-транспортной цепи, состоящей из редуктазы и цитохрома P450. В молекуле CYP102A1 гемовый домен цитохрома P450 связан через N-конец с CPR [18] (рис. 1).

Электронный транспорт в микросомальных системах происходит в соответствии со схемой 2, где FAD — флавинадениндинуклеотид и FMN — флавинмононуклеотид, входящие в состав флавопротеина CPR [12].

На рис. 2 представлен каталитический цикл цитохрома P450 [2, 13, 19]. Впервые последовательное двухэлектронное восстановление цитохрома P450 и существование нескольких интермедиатов было открыто для бактериального цитохрома P450 101 (CYP101) [20–22] и микросомальных систем [23] в конце 60-х — начале 70-х гг. Связывание субстрата с ферментом в низко-спиновом Fe^{III}-состоянии (I) приводит к образованию фермент-субстратного комплекса и изменению низко-спинового состояния (нередко частично, и иногда с вытеснением координированной воды из активного центра фермента) в высоко-спиновый субстрат-связывающий комплекс (II). Высоко-спиновый ион Fe^{III} имеет более положительный потенциал восстановления и, таким образом, ион железа гема активного центра цитохрома P450 принимает электрон и переходит в Fe^{II}-состояние (III): Fe^{III} + 1 e⁻ → Fe^{II}. Среди различных изоферментов цитохрома P450 возможны вариации в каталитическом цикле и сдвиг спина не всегда осуществляется [24].

Связывание кислорода приводит к образованию окси-P450 (IV), который является последним относительно устойчивым интермедиатом в этом цикле. Далее следует восстановление комплекса окси-P450, последовательное образование интермедиата пероксо-Fe^{III} (Va), его протонирование в интермедиат гидропероксо-Fe^{III} (Vb), второе протонирование дистального атома кислорода с частичным гетеролизом связи O—O и образованием высоковалентной феррильной формы Fe^{IV} (VI) и воды; оксигенация субстрата с формированием комплекса (VII) протекает при высокой скорости, без накопления промежуточных интермедиатов, что затрудняет кинетические исследования данного каскада реакций.

В дополнение к нескольким отдельным промежуточным состояниям, каждое из которых имеет свои собственные уникальные свойства, каталитический цикл цитохрома P450 содержит по меньшей мере 3 разветвляющиеся точки, где возможны дополнительные реакции [25].

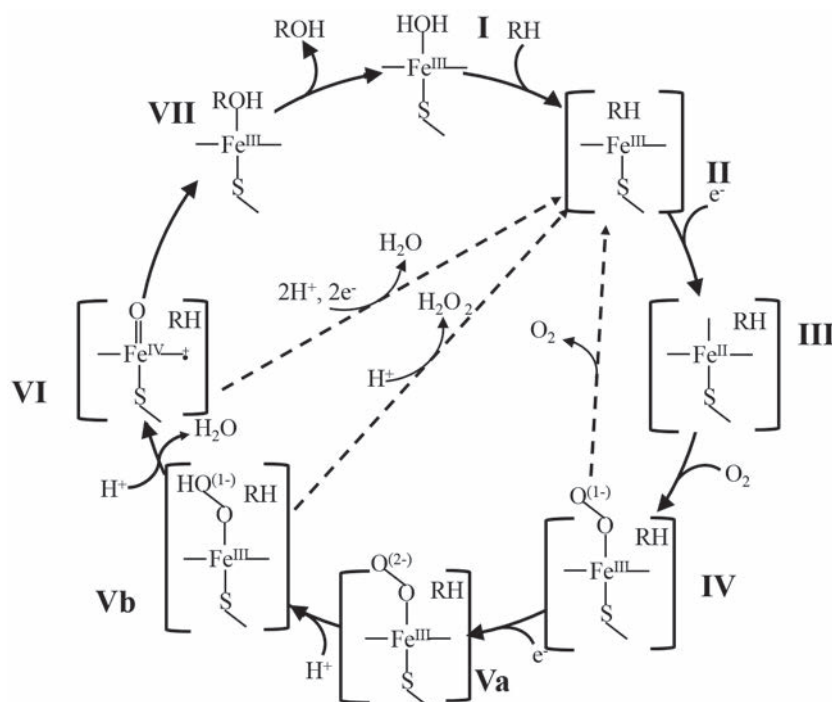


Рис. 2. Каталитический цикл цитохрома Р450. Первым этапом каталитического цикла цитохрома Р450 является образование фермент-субстратного комплекса, и все последующие превращения происходят в этом комплексе [2, 13, 19, 23, 24]

К основным побочным путям протекания реакции относятся [19]:

- автоокисление фермента окси- Fe^{II} (IV) с образованием супероксидного аниона и возвращения фермента к его основному состоянию (II);
- пероксидное направление, когда координированный пероксид или гидропероксидный анион (Va и Vb) отщепляются от иона железа, образуя пероксид водорода, таким образом, завершая непродуктивное (с точки зрения превращения субстрата) двух-электронное восстановление кислорода;
- оксидазное расщепление, где интермедиат оксо- Fe^{IV} (VI) окисляется до воды вместо оксигенации субстрата, что приводит к четырехэлектронному восстановлению молекулы кислорода с последующим образованием двух молекул воды.

Неполная сопряженность каталитического цикла, т.е. нарушение стехиометрии реакции, является одним из затруднений, возникающим при катализе цитохромами Р450. В результате перечисленных выше реакций накапливаются активные формы кислорода (АФК), которые могут повреждать активный центр, что приводит к самоинаktivации фермента, а также участвовать в реакциях неспецифического окисления субстрата [26].

В связи с широкой субстратной специфичностью, большим разнообразием катализируе-

мых химических реакций и метаболической активностью по отношению к лекарственным препаратам разработка биосенсоров и биореакторов на основе цитохромов Р450 представляет важную и перспективную задачу для фармакологии и для персонализированной медицины (поиск новых субстратов и ингибиторов этого класса гемопротеинов в режиме биосенсорного анализа), для биотехнологии в режиме биореакторов (получение прекурсоров, сложных по строению и синтезу химических соединений), для медицины (анализ межлекарственных взаимодействий) (рис. 3) [27–31].

ПЕРСПЕКТИВЫ ЦИТОХРОМ Р450-БИОРЕАКТОРОВ

Цитохромы Р450 являются наиболее универсальными природными катализаторами благодаря следующим характеристикам:

- цитохромы Р450 — функционально разнообразные ферменты;
- цитохромы Р450 катализируют регио- и стереоспецифичное окисление неактивированных углеводов, которое трудно провести с помощью химического синтеза;
- цитохромы Р450 — уникальные хемо- и энантиоселективные ферменты, которые могут быть вовлечены в производство высокоценных продуктов.

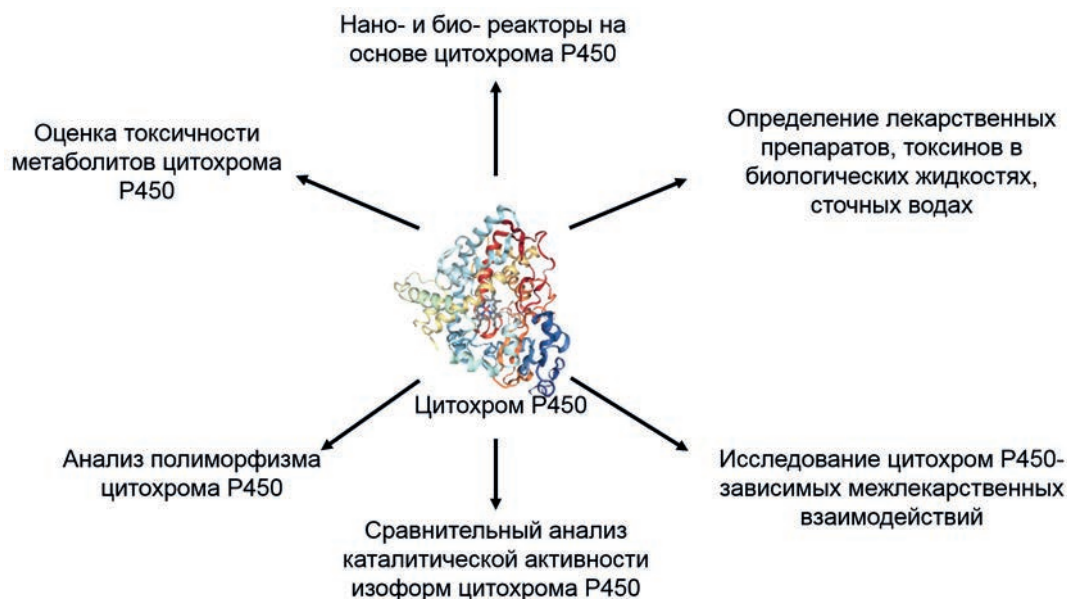


Рис. 3. Потенциальное применение цитохром P450-систем

Особенностью цитохромов P450 является широкая субстратная специфичность. Кроме того, субстраты одного изофермента могут существенно отличаться между собой по структуре и подвергаться ферментативному превращению по различным механизмам. С другой стороны, одно и то же химическое соединение может по-разному метаболизироваться разными изоформами цитохромов P450. Эти причины делают цитохромы P450 крайне перспективными в качестве биореакторов.

Многие биологически активные соединения растительного происхождения, проявляющие разнообразные терапевтические эффекты, могут быть получены биотехнологически с помощью цитохромов P450, найденных в растениях [32]. Например, дитерпеноидный таксол (паклитаксел), один из компонентов коры тихоокеанского тиса (*Taxus brevifolia*), эффективного антимитотического вещества, применяемого как противораковое лекарство, может быть получен с помощью биосинтеза, одной из стадий которого является цитохром P450-зависимое гидроксилирование в положении C-5 с последующей перегруппировкой [33]. Получение аутокаидов, физиологически важных энантиоселективных производных арахидоновой и линоленовой кислот, реализовано с помощью бактериального цитохрома P450 BM3 и его мутантной формы F87V [34].

Одним из примеров применения цитохромов P450 на промышленном уровне является синтез правастатина, который входит в состав статинов, разработанных для снижения уровня холестерина и уменьшения риска сердечно-

сосудистых заболеваний. Они действуют в качестве ингибиторов 3β -гидрокси-3-метил-глутарил-KoA (HMG-CoA) редуктазы, которая является ферментом, контролирующим скорость биосинтеза холестерина. Правастатин синтезируется из соединения компактина через стереоселективное гидроксилирование. Гидроксилирование в положении C-6 осуществляется с использованием бактериальных ферментов CYP105A3 (P450_{scd2}) из *Streptomyces carbophilus* в процессе, разработанном компанией «Daiichi-Sankyo». Такие биореакторы разработаны с использованием дополнительных NADPH-зависимых белков редокс-партнеров. Концентрация NADPH поддерживается постоянной при помощи ферментативной регенерирующей системы [27, 35–37].

СЛОЖНОСТИ В СОЗДАНИИ ЦИТОХРОМ P450-БИОРЕАКТОРОВ И ПУТИ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

Потенциал применения цитохромов P450 в биотехнологии крайне широк, однако имеет ряд ограничений, сдерживающих развитие этого направления [27, 29, 38–40]. Основным затруднением в использовании цитохромов P450 в качестве биореакторов является сложность и многостадийность каталитического цикла, требующая для функционирования фермента дополнительных белков, выполняющих функцию редокс-партнеров, а также кофактор NADPH как источник электронов.

Ниже перечислены сложности, возникающие при работе с цитохром P450-системами. По сравнению с другими классами ферментов цитохромы P450 демонстрируют достаточно низкую скорость превращения субстрата. Это можно объяснить сложностью каталитического цикла цитохромов P450 и большим количеством энергии, затрачиваемым на диссоциацию фермент-субстратного комплекса [38]. Для каталитической реакции необходимы электроны, получаемые от NADH или NADPH. Кроме источника электронов, для цитохромов P450 необходима эффективная электрон-транспортная цепь, состоящая из белков редокс-партнеров. Скорость реакции в этом случае может лимитироваться скоростью передачи электронов от белка к белку, а также эффективностью белок-белкового взаимодействия. Исключение составляют самодостаточные флавогемопротейны, в которых на одной полипептидной цепи содержатся гемовый и редуктазный домены. Примером является цитохром P450 102A1 (BM3), выделенный из *B. megaterium* [41, 42].

Разработаны методы экспрессии слитных конструкций, содержащих гемовый и редуктазный домены [43]. В процессе каталитического цикла цитохрома P450 может возникать разобщение между окислением NADH или NADPH и образованием продукта, что приводит к накоплению АФК, которые могут приводить к деградации как гемовой части, так и апопротеина.

При использовании цельноклеточных систем, решающих проблему необходимости добавления и регенерации кофактора, существуют проблемы низкого потребления субстрата и сниженного вывода продукта во внеклеточное пространство. Также существует проблема токсичности субстрата или продукта для клетки.

Для преодоления сложностей каталитического цикла цитохром P450-зависимых реакций разработаны различные подходы. Применение альтернативных доноров электронов на основе физико-химических методов может быть использовано для прямого восстановления фермент-субстратного комплекса без необходимости в CPR, цитохроме b_5 и NADPH. Один из таких подходов использует протекание реакции по пути «пероксидазного шунта» (пути $\text{VI} \rightarrow \text{II}$ и $\text{Vb} \rightarrow \text{II}$; рис. 2, пунктирные линии) с использованием пероксида водорода и органических пероксидов (например, гидропероксида кумола). Однако пероксид-зависимые реакции, несмотря на высокие каталитические константы, приводят в быстрой необратимой

инактивации гемопротейнов и низкой операционной стабильности системы [28, 44–46].

Неполная сопряженность каталитического цикла цитохромов P450, представленная на рис. 2, может приводить к образованию АФК. Накопление АФК может приводить к окислительному стрессу и ряду заболеваний, а также повреждению и самоинактивации цитохрома P450 [46, 47]. Бактериальные цитохромы P450 более стабильны по сравнению с ферментами из других источников [25, 48, 49]. Для бактериальных цитохромов P450, катализирующих реакции гидроксилирования, в качестве косубстрата может выступать пероксид водорода. При таком механизме реакции с помощью «пероксидазного шунта» происходит превращение соединения II (см. рис. 2) в соединение VI с превращением пероксида водорода в воду. Кроме того, для протекания реакции по данному механизму могут использоваться другие пероксиды, например пероксид кумола или трет-бутилгидропероксид [25, 48]. В такой системе не требуются дорогостоящие кофакторы (NADH или NADPH) в качестве доноров электронов. Данный подход уже был реализован в ряде работ. Например, в работе Chen et al. [49] использовали цитохром P450_{BSB} для реакций гидроксилирования жирных кислот в β -положении. Продукты такого метаболического превращения представляют большой интерес вследствие их биологической активности. Перспективным путем для получения биотоплива является реакция декарбонирования жирных кислот с образованием алкенов с двойной связью в положении C-1. Это превращение катализируется ферментом OleT, представителем семейства CYP152 [50].

Для моделирования цитохром P450-зависимых реакций были разработаны методы реконструкции каталитической активности этого класса гемопротейнов. Реконструированные системы содержат соответствующую изоформу цитохрома P450, CPR, цитохром b_5 , фосфолипиды в соотношении, оптимальном для моделирования и создания мембранного окружения, а также NADPH в качестве источника электронов [51–53]. Разработаны подходы для повышения каталитической активности ферментов в реконструированных системах. В работе Shangguan et al. [53] была создана биферментная система, состоящая из цитохрома P450 1A1 и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, ковалентно иммобилизованных на наночастицах золота, выращенных на внутренних стенках мембраны из пористого оксида алюминия. Проведение каскада реакций в мембране из пористого оксида

алюминия позволило увеличить скорость и выход продуктов в обеих реакциях. Каталитическая константа скорости CYP1A1-зависимой реакции увеличивалась в 11 раз по сравнению с ферментативной реакцией, проводимой в растворе [53].

Для создания биореакторов на основе изоформ цитохрома P450 использовали магнитные бусины, на которых были ковалентно иммобилизованы фракции микросом печени крысы и человека, содержащие цитохромы P450 3A4, 2C9 и 2D6. Авторы также использовали реконструированную систему, где глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, регенерирующая NADPH, также была иммобилизована на магнитных бусинах. Помимо каталитической эффективности данной системы, авторы отметили ее стабильность, используя ее в трех циклах [54]. Использование микросом печени крысы и человека имеет этические проблемы, а также проблемы с воспроизводимостью каталитических параметров. Поэтому такой подход не может рассматриваться как эффективный и надежный метод создания биосенсоров и биореакторов.

Для функционализации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) и их N- и O-содержащих производных использовали цитохром P450 3A4 как фермент с широкой субстратной специфичностью [55, 56]. В качестве биокатализаторов был использован штамм дрожжей *Komagataella phaffii*, экспрессирующих цитохром P450 3A4. Целью работы, по мнению авторов, было получение в препаративных количествах функционализированных ПАУ, что было реализовано на производных флуорена, флуореноле и флуореноне [57]. Авторам удалось масштабировать реакцию до объема 6 литров и получить выход 47,6% — для флуоренола и 9,7% — для флуоренона.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОРЕАКТОРОВ

Использование в качестве биореакторов реконструированных систем не является оптимальным по причине необходимости использования белков редокс-партнеров. Поэтому применение физико-химических методов с альтернативными источниками электронов крайне актуально. Среди таких подходов для создания биореакторов можно выделить фотовосстановление и электровосстановление.

Фотовосстановление. Применение фотосенсибилизирующих веществ для восстановления железа гема цитохрома P450 с помощью

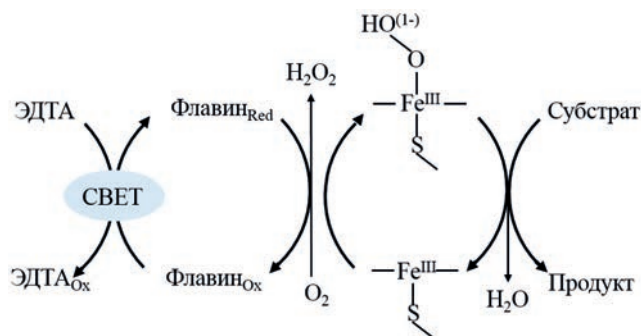


Рис. 4. Схема каталитического превращения субстрата цитохромом P450 под действием света на фотосенсибилизирующие вещества

света в видимом диапазоне может использоваться как альтернативный путь создания биореакторов [58]. В таких системах у рибофлавина, FAD или FMN под действием света и в присутствии ЭДТА (рис. 4), как донора электронов, происходит восстановление изоаллоксазинового цикла либо с последующим переносом электронов на активный центр цитохрома P450, либо с образованием пероксида водорода и катализом по механизму пероксидазного шунта [45]. Использование данного подхода было изучено на реакциях гидроксирования 4-нитрофенола и лауриновой кислоты под действием бактериального цитохрома P450 102A1 [59]. В качестве фотосенсибилизирующего вещества в ряде систем с бактериальными и человеческими цитохромами P450 был использован эозин Y [60].

Электрохимические подходы. Электрохимические системы являются эффективными альтернативными донорами электронов, в которых именно электрод играет роль источника электронов. Используя количественные закономерности электроанализа, обладающие многопараметричностью, можно рассчитать кинетические, каталитические и термодинамические параметры функционирования ферментов [61]. Такой подход для количественного и сравнительного анализа каталитической активности цитохромов P450 используется для поиска новых субстратов, ингибиторов, активаторов, эффекторов цитохромов P450, а также для исследования межлекарственных взаимодействий (рис. 5) [28, 36, 62, 63]. Для эффективной иммобилизации цитохромов P450 на поверхности электродов разработаны различные подходы, использующие наноматериалы для модификации рабочей поверхности электрода, а также модификаторы электродной поверхности, обеспечивающие сохранение нативной конформации и каталитических свойств фермента [61–63].

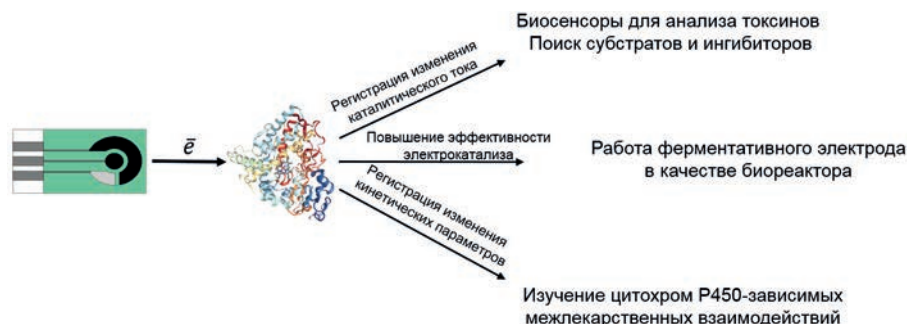


Рис. 5. Возможности применения электрохимических систем на основе цитохрома Р450

Благодаря высокой эффективности цитохром Р450-электрохимических систем, с точки зрения аналитических характеристик, их применение реализовано в режиме биосенсоров для поиска новых лекарственных препаратов в качестве субстратов или ингибиторов, для анализа токсичных соединений в различных средах (сточные воды, биологические жидкости) [64–66].

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ Р450 В ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Образование продуктивного фермент-субстратного комплекса. Электрохимические процессы цитохром Р450-зависимых реакций характеризуются режимом тонкой пленки белка (сорбционный режим) на поверхности электрода. Эти процессы не являются диффузионно-контролируемыми, что проявляется в линейной зависимости максимальной амплитуды анодного и катодного тока от скорости сканирования, как было показано ранее [1, 61, 67]. Количественные закономерности электрохимических методов позволяют оценить количество электроактивного фермента на электроде для адекватного расчета кинетических параметров электроферментативной реакции [61, 62, 67].

Особенностью каталитического цикла цитохромов Р450 является многостадийность процесса. Первая стадия в катализе этого класса гемопroteинов — образование комплекса ферри-формы Fe^{III} с субстратом ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-RH}$). Далее, происходит перенос первого электрона с образованием комплекса восстановленной ферро-формы Fe^{II} с субстратом, а затем и с кислородом в качестве второго субстрата [8, 19, 68–70] (рис. 2). Для фермента, иммобилизованного (ковалентно или нековалентно) на электроде или включенного в матрицу моди-

фикатора, образование фермент-субстратного комплекса может потребовать большее время за счет диффузии субстрата к активному центру фермента. Нами был предложен подход, при котором предварительная инкубация цитохрома Р450 3А4 (CYP3A4), нековалентно иммобилизованного на электроде за счет включения в матрицу ДДАБ с субстратом (антибиотиком группы макролидов, эритромицином) до стадии получения электронов, положительно влияла на выход продукта в электрокаталитической реакции [71]. Выход метаболита (формальдегида) возрос в 1,46 раза, а максимальная скорость реакции увеличилась с $9,21 \times 10^{-11}$ М/мин до $1,40 \times 10^{-10}$ М/мин.

Флавиновые нуклеотиды в качестве участников цепи переноса электронов на электроде. Флавиновые нуклеотиды являются кофакторами редуктаз — белков редокс-партнеров цитохрома Р450, и, соответственно, посредниками в передаче электронов между восстановительным эквивалентом NADPH и цитохромом Р450, согласно схеме 2 [72]. Для моделирования классической электрон-транспортной схемы на электроде были использованы различные подходы, основанные на образовании комплексов или на включении флавиновых кофакторов или флавин-содержащих доменов в структуру цитохрома Р450. Методами генной инженерии к полипептидной последовательности цитохрома Р450 2С9 была присоединена последовательность флаводоксина (FLD) *Desulfovibrio vulgaris*, выбранная за высокую схожесть с последовательностью домена CPR, связывающей FMN. Авторы отмечают, что использование модифицированного белка CYP2C9–FLD, иммобилизованного на стеклоуглеродном электроде, модифицированном ДДАБ, способствует более эффективному переносу электронов, а каталитическая активность в отношении субстрата S-варфарина возрастает в 4 раза по сравнению с цитохромом Р450 2С9 (CYP2C9) [73].

Рибофлавин, как медиатор электронного транспорта, был использован ранее при исследовании полусинтетических флавогемопротеинов на основе цитохрома P450 2B4 [58] и на основе бактериальных цитохромов CYP106A2, CYP107DY1, CYP107DY1, HmtS, HmtT, HmtN [74]. В качестве донора электронов был использован электрод [58] и NADPH [74]. Была исследована электрохимическая система, в которой нековалентный комплекс цитохрома P450 3A4 с рибофлавином, FMN или FAD был иммобилизован на электроде [71]. Флавиновые нуклеотиды, как низкомолекулярные модели редуктазы, являются медиаторами электронного транспорта, способствуя эффективному восстановлению иона железа гема. При использовании флавиновых нуклеотидов в качестве низкомолекулярных моделей редуктазы удалось достичь улучшения электрохимических характеристик системы, таких как электроактивная концентрация фермента, а также рост такого параметра, как каталитический ток в присутствии субстрата, который является одной из важнейших характеристик эффективности электрокатализа. Кроме того, удалось увеличить эффективность цитохром P450 3A4-зависимого электрокатализа реакции N-деметилирования эритромицина в 1,3, 1,7 и 2,1 раза в системе с рибофлавином, FAD и FMN соответственно. Также была рассчитана такая каталитическая характеристика системы, как максимальная скорость реакции для системы без флавинов, равная $9,21 \times 10^{-11}$ М/мин, $1,24 \times 10^{-10}$ М/мин – в случае рибофлавина, $1,57 \times 10^{-10}$ М/мин и $1,87 \times 10^{-10}$ М/мин – для FAD и FMN соответственно [71]. Такое увеличение максимальной скорости реакции можно считать существенным, что позволяет рассматривать метод с использованием нековалентных комплексов цитохрома P450 с флавинами как весьма эффективный.

Модификация поверхности электродов трехмерными структурами для перехода от 2D- к 3D-режиму. Электроды, применяемые в биоэлектрохимии, как правило, представляют собой плоские структуры. Для эффективного электронного транспорта к активному центру фермента требуется иммобилизация белка на рабочей поверхности электрода. При этом существует проблема взаимодействия белка с «твердыми» 2D-поверхностями [75], что может приводить к изменению третичной и четвертичной структуры белка, влияющих на каталитическую активность. Для преодоления плоскостной структуры электродов был предложен подход модификации поверхности

электрода нанопористыми покрытиями на основе таких материалов, как мезопористый оксид кремния, оксид алюминия, оксид титана, мезопористый графен, индий, допированный оксидом олова (ITO) [53, 76–79]. Применение нанопористых материалов для электрохимического изучения ферментативных реакций обеспечивает переход электродной поверхности от 2D- к 3D-режиму, способствует более упорядоченному расположению белка на электроде, что выражается в увеличении эффективности электрокаталитических реакций [64, 77, 80]. В качестве нанопористых материалов могут использоваться материалы, обладающие следующими свойствами: химическая инертность, биосовместимость, электрохимическая нейтральность при сохранении электронтранспортных и проводящих свойств электрода. Проведение ферментативных реакций в «замкнутых» пространствах (нанопорах, наноканалах, мицеллах, обращенных мицеллах) позволяет смоделировать микроокружение ферментов и их молекулярную скученность («краудинг») в биологических системах, где ферменты находятся в высоких концентрациях в ограниченных объемах [81].

Для реализации данного подхода Mie et al. [76] использовали золотой дисковый электрод, который подвергали процедуре анодирования. В результате этой процедуры поверхность электрода становилась развитой и приобретала углубления размером 20 нм. Авторами была показана эффективная иммобилизация цитохрома P450 3A4 на поверхности полученного электрода, модифицированного нафталинтиолом. Для бактериального цитохрома P450 BM3 была разработана электрохимическая система на основе стеклоуглеродного электрода, где для иммобилизации фермента использованы наночастицы кремния с разветвленными порами, модифицированные OH- или NH₂-группами. При этом для закрепления наночастиц с иммобилизованным цитохромом P450 BM3 использовали хитозан. Такая система демонстрировала улучшение электрохимических параметров, таких как гетерогенная константа скорости переноса электронов, каталитический ток, количество электроактивного фермента, по сравнению с системой, в которой цитохром P450 BM3 был иммобилизован непосредственно на поверхности электрода [76]. Кроме того, наблюдались различия в свойствах систем, модифицированных наночастицами кремния с разветвленными порами, содержащими гидроксильные или аминогруппы. При модификации NH₂-группами, заряженными положительно

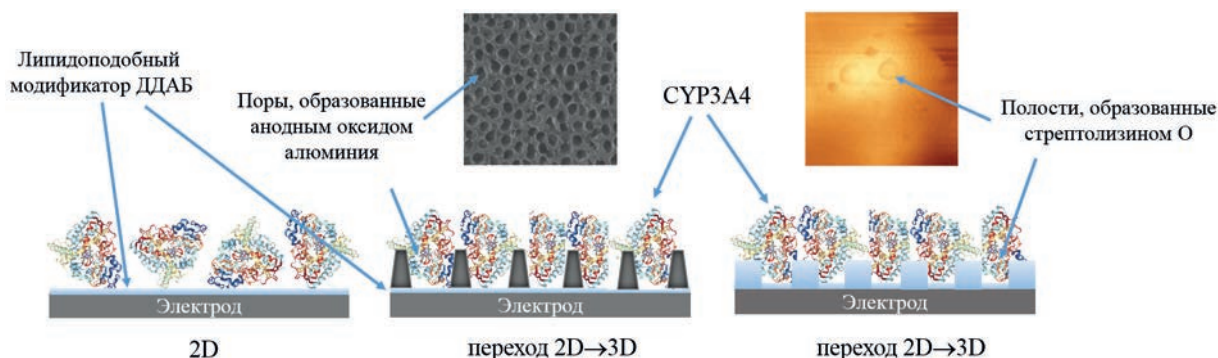


Рис. 6. Схема иммобилизации цитохрома P450 3A4 по стратегии перехода от 2D-поверхности к 3D

в условиях проведения эксперимента, молекулы фермента ориентировались отрицательно заряженным доменом редуктазы к поверхности кремниевой наночастицы. Такой эффект вносил дополнительное упорядочивание и приводил к увеличению сродства к субстрату тестостерону по сравнению с наночастицами с ОН-группами [76, 77].

Для исследования кинетических параметров цитохрома P450 3A4 была разработана система нанореактора на основе сложного композита из сфер оксида кремния, нанопористых графеновых пен и полидофамина [78]. Авторы показали, что кинетические параметры реакций метаболизма стероидных гормонов цитохромом P450 3A4 зависят от размеров образованных пор наноструктур. При меньшем размере пор наблюдались наиболее благоприятные параметры реакции. Для пор размером 65, 120 и 260 нм были получены следующие значения кажущейся константы Михаэлиса (K_M^{app}) для реакции гидроксирования тестостерона: 110 ± 18 мкМ, 276 ± 28 мкМ и 333 ± 25 мкМ соответственно в сравнении с композитом без пор (430 ± 30 мкМ). Изменение данного параметра свидетельствует об увеличении сродства фермента к субстрату и повышении эффективности каталитического процесса почти в 4 раза для наименьшего диаметра пор (65 нм).

Нами была разработана система, в которой в качестве нанопористого материала использовались пластины из анодного оксида алюминия для модификации поверхности электрода (рис. 4). Такой подход позволил значительно увеличить выход продукта реакции N-деметилирования эритромицина цитохромом P450 3A4. При использовании пор размером 100 нм выход продукта увеличивался в 2,32 раза, а при размере пор 200 нм — в 1,32 раза. Такое различие может быть обусловлено более упорядоченной ориентацией молекулы фермента в порах меньшего размера [82]. Для сравнительной

оценки эффективности каталитического цитохромом P450 3A4-зависимого процесса была рассчитана максимальная скорость реакции. Для цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на электроде без нанопористого материала, скорость реакции составила $(4,3 \pm 0,4) \times 10^{-11}$ М/мин; для пор с диаметром 100 нм — $(1,01 \pm 0,04) \times 10^{-10}$ М/мин; а для пор с диаметром 200 нм — $(5,7 \pm 0,3) \times 10^{-11}$ М/мин.

Совмещение двух подходов — создание мембраноподобного покрытия и иммобилизация цитохрома P450 3A4 в замкнутом пространстве, моделирующим краудинг-эффект, — было реализовано нами в работе Koroleva et al. [83]. Для этого был использован липидоподобный модификатор электрода ДДАБ и мембранный белок стрептолизин О (рис. 6). При послойном нанесении на электрод ДДАБ, а затем стрептолизина О в мембранной пленке, образованной ДДАБ, наблюдалось появление полостей, визуализируемых на изображениях, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Данный подход позволил зарегистрировать увеличение каталитического тока цитохрома P450 3A4 в присутствии субстрата эритромицина в 2 раза (с 0,6 мкА до 1,2 мкА) и повысить эффективность электрокатализа реакции N-деметилирования эритромицина в 2,97 раза.

Иммобилизация микросом. Микросомы — это морфологически замкнутые везикулы, содержащие компоненты цитохром P450-монооксигеназной системы, которые образуются из эндоплазматического ретикула при гомогенизации ткани [84]. Микросомы печени используются как удобный источник ферментов цитохрома P450 для анализа токсичности *in vitro* и разработки новых лекарственных препаратов. Микросомы печени — лабораторно приготовленные субклеточные фракции мембраны печени, содержащие метаболизирующие лекарства, цитохромы P450 и их редокс-партнеры (CPR и цитохром b_5). Основным

преимуществом использования микросом является сохранение стабильности структуры фермента и каталитической активности за счет микроокружения, которое не изменяется после выделения микросомальной фракции. Кроме того, белки редокс-партнеры также способствуют ускорению переноса электронов от электрода к активному центру цитохрома P450.

Микросомы клеток насекомых, содержащие цитохромы P450 1A2 и 3A4, экспрессированные при помощи бакуловируса, были иммобилизованы на электроде из пиролитического графита, модифицированного самоорганизующимися слоями полиэтиленimina [85, 86]. Nerimetla и Krishnan [87] использовали микросомы печени крысы, содержащие цитохромы P450 3A, 2C, 2E1, 1A и 4A. Послойную иммобилизацию методом капельного нанесения проводили на электроде из пиролитического графита, модифицированного поли (диаллилдиметиламмоний хлоридом). Микросомы клеток насекомых, содержащие цитохромы P450, экспрессированные при помощи бакуловируса (бактосомы, бакулосомы), используются для иммобилизации на электродах, модифицированных различными методами, направленными на увеличение эффективности электрокаталитических свойств [85–90]. Среди публикаций, посвященных созданию биосенсоров на основе микросом, можно выделить основные тенденции: создание биосенсоров для анализа лекарственных веществ и разработка биореакторов для получения функционально значимых метаболитов.

Углеродные наноматериалы также нашли свое применение в создании биосенсоров на основе микросом благодаря более развитой площади поверхности, что способствует улучшению электрохимических характеристик системы [86]. Наноккомпозитные материалы на основе благородных металлов и углеродных наноматериалов также применялись для иммобилизации микросом [85].

В работе Nerimetla et al. [89] был предложен метод иммобилизации, основанный на электростатическом взаимодействии. Микросомы, заряженные отрицательно благодаря фосфолипидам, смешивали с магнитными наночастицами, модифицированными аминокеттовыми группами, которые затем адсорбировались на электродах из пиролитического графита. Такой подход позволяет увеличить количество микросом на электроде за счет увеличения площади поверхности, доступной для иммобилизации, и, таким образом, повы-

сить чувствительность сенсора к лекарственным препаратам по сравнению с сенсорами, где не были использованы магнитные наночастицы.

Описаны методы иммобилизации микросом непосредственно на электроде без использования модификаторов или медиаторов электронного транспорта. В таких системах роль модификатора, защищающего фермент от денатурации на поверхности электрода, выполняют фосфолипиды оболочки микросом. Впервые такой подход был реализован в работе Walgama et al. [90], где авторы использовали электроды, изготовленные из различных материалов: пиролитического графита, стеклоуглерода или графита высокой степени очистки, при этом обладающих различной неоднородностью поверхности. Авторы установили, что различная неоднородность поверхности электродов влияет на электрохимические параметры, при этом гетерогенная константа скорости переноса электронов выше для электродов из более однородных (гладких) материалов, таких как стеклоуглеродный электрод. Однако количество электроактивного белка, по расчетам авторов, было больше для электродов с неоднородной поверхностью, что можно объяснить более развитой поверхностью для включения белка. В работе Walker et al. [91] исследовали влияние неоднородности поверхности электрода на электрохимические характеристики микросом с использованием дискового электрода. Целью работы было создание биосенсора с прямой иммобилизацией микросом на поверхности электрода без дополнительных медиаторов электронного транспорта. Дисковые электроды из высокочистого графита легко возобновляемы путем полировки. Авторы выяснили, что оптимальным для иммобилизации микросом является поверхность электрода с неоднородностью ~8 мкм; более гладкая поверхность хоть и способствует увеличению скоростей переноса электронов, однако снижает ток в присутствии кислорода, негативно сказываясь на эффективности метаболизма субстрата.

С развитием методических подходов молекулярной биологии стала доступна коэкспрессия в культурах клеток, инфицированных рекомбинантными бакуловирусами, или в бактериальных клетках одновременно цитохрома P450, редуктазы и цитохрома *b₅*. Получаемые данным методом биологические материалы коммерчески доступны и реализуются под названиями бактосомы (BactosomesTM, компания «Сурех»), суперсомы (SupersomesTM, разработанные компанией «Gen Test») или

бакулосомы (BaculosomesTM, компания «Thermo-Fisher») [92, 93]. Применение бактосом для создания биокатализаторов было продемонстрировано в работе Nerimetla et al. [94]. В качестве рабочего электрода авторы использовали покрытые золотом кристаллы кварца, модифицированные самоорганизующимися слоями цистеамина, с адсорбированными пленками бактосом. В исследовании использовались бактосомы, содержащие следующие комбинации белков: CYP2C9, CPR, CYP2C9 + CPR, CYP3A4 + CPR. В качестве субстрата был выбран диклофенак, подвергающийся гидроксигированию под действием CYP2C9 и CYP3A4. Авторы оценили эффективность электрокатализа различных систем и продемонстрировали значимость CPR в бактосомальных пленках для эффективности катализа, а также благотворное влияние каталазы на скорость реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре описаны подходы к повышению эффективности катализа цитохрома P450, представленные в современных работах. Проведен анализ преимуществ в использовании цитохромов P450 при создании биореакторов, а также основные сложности и затруднения на пути к их реализации. В качестве основной тенденции как для реконструированных систем, так и для электрохимических является встраивание цитохрома P450 в

ограниченный объем за счет использования трехмерных конструкций на основе нанопористых материалов. При этом могут использоваться различные материалы и их сочетания, например, мезопористые материалы или пористые мембраны. Электрохимические методы анализа функциональной активности ферментов получили широкое развитие вследствие информативности методов и их многопараметричности. Кроме того, важный аспект — технологическая разработанность приборной базы и наличие программного обеспечения. Это позволяет стандартизовать исследования и проводить сравнительный анализ ансамбля различных биологических объектов. В связи с этим электроанализ ферментов может быть одним из важнейших направлений в создании биосенсоров и биореакторов на основе цитохромов P450.

Вклад авторов. Шумянцева В.В. — концепция и руководство работой; Королева П.И. — написание текста статьи; Булко Т.В., Агафонова Л.Е. — редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00064, <https://rscf.ru/project/23-25-00064/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shumyantseva, V. V., Bulko, T. V., and Archakov, A. I. (2005) Electrochemical reduction of cytochrome P450 as an approach to the construction of biosensors and bioreactors, *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1051-1063, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2005.01.014.
2. Guengerich, F. P. (2015) Human cytochrome P450 enzymes, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (de Montellano, O. P. R., eds) Springer, N. Y., pp. 523-785, doi: 10.1007/978-3-319-12108-6.
3. Zhang, Y.-Y., and Yang, L. (2009) Interactions between human cytochrome P450 enzymes and steroids: physiological and pharmacological implications, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **5**, 621-629, doi: 10.1517/1742525090296764.
4. Oliw, E. H., Guengerich, F. P., and Oates, J. A. (1982) Oxygenation of arachidonic acid by hepatic monooxygenases. Isolation and metabolism of four epoxide intermediates, *J. Biol. Chem.*, **257**, 3771-3781, doi: 10.1016/S0021-9258(18)34848-8.
5. Zanger, U. M., and Schwab, M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol. Ther.*, **138**, 103-141, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.
6. Crettol, S., Petrovic, N., and Murray, M. (2010) Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism, *Curr. Pharm. Des.*, **16**, 204-219, doi: 10.2174/138161210790112674.
7. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., and Dawson, J. H. (1996) Heme-containing oxygenases, *Chem. Rev.*, **96**, 2841-2887, doi: 10.1021/cr9500500.
8. Zuccarello, L., Barbosa, C., Todorovic, S., and Selivera, C. M. (2021) Electrocatalysis by heme enzymes-applications in biosensing, *Catalysts*, **11**, 218, doi: 10.3390/catal11020218.

9. Bandoorkwala, M., Nemani, K. S., Chatterjee, B., and Sengupta, P. (2020) Reactive metabolites: generation and estimation with electrochemistry based analytical strategy as an emerging Screening tool, *Curr. Anal. Chem.*, **16**, 811-825, doi: 10.2174/1573411016666200131154202.
10. Portychova, L., and Schug, K. A. (2017) Instrumentation and applications of electrochemistry coupled to mass spectrometry for studying xenobiotic metabolism: a review, *Anal. Chim. Acta*, **993**, 1-21, doi: 10.1016/j.aca.2017.08.050.
11. Grint, I., Crea, F., and Vasiliadou, R. (2022) The combination of electrochemistry and microfluidic technology in drug metabolism studies, *ChemistryOpen*, **11**, e202200100, doi: 10.1002/open.202200100.
12. Waskell, L., and Kim, J.-J. P. (2015) Electron transfer partners of cytochrome P450, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (de Montellano, O. P. R., eds) Springer, N. Y., pp. 33-68, doi: 10.1007/978-3-319-12108-6.
13. Im, S.-C., and Waskell, L. (2011) The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome *b₅*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **507**, 144-153, doi: 10.1016/j.abb.2010.10.023.
14. Zhang, H., Im, S.-C., and Waskell, L. (2007) Cytochrome *b₅* increases the rate of product formation by cytochrome P450 2B4 and competes with cytochrome P450 reductase for a binding site on cytochrome P450 2B4*, *J. Biol. Chem.*, **282**, 29766-29776, doi: 10.1074/jbc.M703845200.
15. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M., and Bernhardt, R. (2007) Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains, *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 330-344, doi: 10.1016/j.bbagen.2006.07.017.
16. Lambeth, J. D. (1990) in *Molecular Mechanisms of Adrenal Steroidogenesis and Aspects of Regulation and Application* (Ruckpaul, K., and Rein, H., eds) De Gruyter, Berlin, Boston, pp. 58-100, doi: 10.1515/9783112563281-003.
17. Atkins, W. M., and Sligar, S. G. (1988) The roles of active site hydrogen bonding in cytochrome *P-450cam* as revealed by site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.*, **263**, 18842-18849, doi: 10.1016/S0021-9258(18)37359-9.
18. Narhi, L. O., and Fulco, A. J. (1986) Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7160-7169, doi: 10.1016/S0021-9258(17)38369-2.
19. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., and Schlichting, I. (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450, *Chem. Rev.*, **105**, 2253-2278, doi: 10.1021/cr0307143.
20. Katagiri, M., Ganguli, B. N., and Gunsalus, I. C. (1968) A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3543-3546, doi: 10.1016/S0021-9258(18)93343-0.
21. Hedegaard, J., and Gunsalus, I. C. (1965) Mixed function oxidation: IV. Aninduced methylene hydroxylase in camphor oxidation, *J. Biol. Chem.*, **240**, 4038-4043, doi: 10.1016/S0021-9258(18)97147-4.
22. Conrad, H. E., Lieb, K., and Gunsalus, I. C. (1965) Mixed function oxidation: III. An electron transport complex in camphor ketolactonization, *J. Biol. Chem.*, **240**, 4029-4037, doi: 10.1016/S0021-9258(18)97146-2.
23. Estabrook, R. W., Hildebrandt, A., Baron, J., Netter, K. J., and Leibman, K. (1971) A new spectral species associated with cytochrome P-450 in liver microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 260-261, doi: 10.1016/0006-291X(71)90372-X.
24. Guengerich, F. P., and Johnson, W. W. (1997) Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems, *Biochemistry*, **36**, 14741-14750, doi: 10.1021/bi9719399.
25. Bernhardt, R. (1996) Cytochrome P450: structure, function and generation of reactive oxygen species, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **127**, 137-221, doi: 10.1007/BFb0048267.
26. Hrycay, E. G., and Bandiera, S. M. (2012) The mono-oxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450, *Arch. Biochem. Biophys.*, **522**, 71-89, doi: 10.1016/j.abb.2012.01.003.
27. Bernhardt, R., and Urlacher, V. B. (2014) Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 6185-6203, doi: 10.1007/s00253-014-5767-7.
28. Kumar, S. (2010) Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **6**, 115-131, doi: 10.1517/17425250903431040.
29. Venkatakrishnan, K., von Moltke, L. L., and Greenblatt, D. J. (2001) Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of *in vitro* models, *J. Clin. Pharmacol.*, **41**, 1149-1179, doi: 10.1177/00912700122012724.
30. Baj-Rossi, C., De Micheli, G., and Carrara, S. (2011) P450-based nano-bio-sensors for personalized medicine, in *Biosensors Emerging Materials and Applications* (Serra, P. A., ed) InTech, London, doi: 10.5772/16328.
31. Joseph, S., Rusling, J. F., Lvov, Y. M., Friedberg, T., and Fuhr, U. (2003) An amperometric biosensor with human CYP3A4 as a novel drug screening tool, *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 1817-1826, doi: 10.1016/S0006-2952(03)00186-2.
32. Morant, M., Bak, S., Møller, B. L., and Werck-Reichhart, D. (2003) Plant cytochromes P450: tools

- for pharmacology, plant protection and phytoremediation, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 151-162, doi: 10.1016/s0958-1669(03)00024-7.
33. Jennewein, S., and Croteau, R. (2001) Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 13-19, doi: 10.1007/s002530100757.
 34. Falck, J. R., Reddy, Y. K., Haines, D. C., Reddy, K. M., Krishna, U. M., Graham, S., Murry, B., and Peterson, J. A. (2001) Practical, enantiospecific syntheses of 14,15-EET and leukotoxin B (vernolic acid), *Tetrahedron Lett.*, **42**, 4131-4133, doi: 10.1016/S0040-4039(01)00694-3.
 35. Krishnan, S. (2020) Bioelectrodes for evaluating molecular therapeutic and toxicity properties, *Curr. Opin. Electrochem.*, **19**, 20-26, doi: 10.1016/j.coelec.2019.09.004.
 36. Sakaki T. (2012) Practical application of cytochrome P450, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 844-849, doi: 10.1248/bpb.35.844.
 37. Di Nardo, G., and Gilardi, G. (2020) Natural compounds as pharmaceuticals: the key role of cytochromes P450 reactivity, *Trends Biochem. Sci.*, **45**, 511-525, doi: 10.1016/j.tibs.2020.03.004.
 38. Girhard, M., Bakkes, P. J., Mahmoud, O., and Urlacher, V. B. (2015) P450 Biotechnology, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (de Montellano, O. P. R., eds) Springer, N. Y., pp. 451-520, doi: 10.1007/978-3-319-12108-8.
 39. Urlacher, V. B., and Girhard, M. (2012) Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application, *Trends Biotechnol.*, **30**, 26-36, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.06.012.
 40. Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts, *J. Biotechnol.*, **124**, 128-145, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.026.
 41. Yun, C.-H., Kim, K.-H., Kim, D.-H., Jung, H.-C., and Pan, J.-G. (2007) The bacterial P450 BM3: a prototype for a biocatalyst with human P450 activities, *Trends Biotechnol.*, **25**, 289-298, doi: 10.1016/j.tibtech.2007.05.003.
 42. Correddu, D., Di Nardo, G., and Gilardi, G. (2021) Self-sufficient class VII cytochromes P450: from full-length structure to synthetic biology applications, *Trends Biotechnol.*, **39**, 1184-1207, doi: 10.1016/j.tibtech.2021.01.011.
 43. Gilardi, G., Meharena, Y. T., Tsotsou, G. E., Sadeghi, S. J., Fairhead, M., and Giannini, S. (2002) Molecular Lego: design of molecular assemblies of P450 enzymes for nanobiotechnology, *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 133-145, doi: 10.1016/s0956-5663(01)00286-x.
 44. Cirino, P., and Arnold, F. (2002) Regioselectivity and activity of cytochrome P450 BM-3 and mutant f87A in reactions driven by hydrogen peroxide, *Adv. Synth. Catal.*, **344**, 932-937, doi: 10.1002/1615-4169(200210)344:9<932::AID-ADSC932>3.0.CO;2-M.
 45. Strohmaier, S. J., De Voss, J. J., Jurva, U., Andersson, S., and Gillam, E. M. J. (2020) Oxygen surrogate systems for supporting human drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes, *Drug Metab. Dispos.*, **48**, 432-437, doi: 10.1124/dmd.120.090555.
 46. Albertolle, M. E., and Guengerich, F. P. (2018) The relationships between cytochromes P450 and H₂O₂: Production, reaction, and inhibition, *J. Inorg. Biochem.*, **186**, 228-234, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.05.014.
 47. Veith, A., and Moorthy, B. (2018) Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species, *Curr. Opin. Toxicol.*, **7**, 44-51, doi: 10.1016/j.cotox.2017.10.003.
 48. Girhard, M., Kunigk, E., Tihovsky, S., Shumyantseva, V. V., and Urlacher, V. B. (2013) Light-driven biocatalysis with cytochrome P450 peroxygenases, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **60**, 111-118, doi: 10.1002/bab.1063.
 49. Chen, H., Huang, M., Yan, W., Bai, W.-J., and Wang, X. (2021) Enzymatic regio- and enantioselective C-H oxyfunctionalization of fatty acids, *ACS Catal.*, **11**, 10625-10630, doi: 10.1021/acscatal.1c03292.
 50. Wise, C. E., Hsieh, C. H., Poplin, N. L., and Makris, T. M. (2018) Dioxygen activation by the biofuel-generating cytochrome P450 OleT, *ACS Catal.*, **8**, 9342-9352, doi: 10.1021/acscatal.8b02631.
 51. Yamazaki, H., Nakano, M., Imai, Y., Ueng, Y.-F., Guengerich, F. P., and Shimada, T. (1996) Roles of cytochrome *b₅* in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **325**, 174-182, doi: 10.1006/abbi.1996.0022.
 52. Backes, W. L., and Kelley, R. W. (2003) Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes, *Pharmacol. Ther.*, **98**, 221-233, doi: 10.1016/s0163-7258(03)00031-7.
 53. Shangguan, L., Wei, Y., Liu, X., Yu, J., and Liu, S. (2017) Confining a bi-enzyme inside the nanochannels of a porous aluminum oxide membrane for accelerating the enzymatic reactions, *Chem. Commun.*, **53**, 2673-2676, doi: 10.1039/C7CC00300E.
 54. Furlani, I. L., Oliveira, R. V., and Cass, Q. B. (2023) Immobilization of cytochrome P450 enzymes onto magnetic beads: an approach to drug metabolism and biocatalysis, *Talanta Open*, **7**, 100181, doi: 10.1016/j.talo.2023.100181.
 55. Brian, W. R., Sari, M. A., Iwasaki, M., Shimada, T., Kaminsky, L. S., and Guengerich, F. P. (1990) Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, **29**, 11280-11292, doi: 10.1021/bi00503a018.
 56. Rendic, S. (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data, *Drug Metab. Rev.*, **34**, 83-448, doi: 10.1081/dmr-120001392.

57. Srdić, M., Fessner, N. D., Yildiz, D., Glieder, A., Spiertz, M., and Schwaneberg, U. (2022) Preparative production of functionalized (N- and O-Heterocyclic) polycyclic aromatic hydrocarbons by human cytochrome P450 3A4 in a bioreactor, *Biomolecules*, **12**, 153, doi: 10.3390/biom12020153.
58. Shumyantseva, V. V., Bulko, T. V., Schmid, R. D., and Archakov, A. I. (2002) Photochemical properties of a riboflavins/cytochrome P450 2B4 complex, *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 233-238, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00181-6.
59. Le, T.-K., Park, J. H., Choi, D. S., Lee, G.-Y., Choi, W. S., Jeong, K. J., Park, C. B., and Yun, C.-H. (2019) Solar-driven biocatalytic C-hydroxylation through direct transfer of photo induced electrons, *Green Chem.*, **21**, 515-525, doi: 10.1039/c8gc02398k.
60. Park, J. H., Lee, S. H., Cha, Choi, G. S., D. S., Nam, D. H., Lee, J. H., Lee, J.-K., Yun, C.-H. Jeong, K. J., and Park, C. B. (2015) Cofactor-free light-driven whole-cell cytochrome P450 catalysis, *Angew. Chem.*, **127**, 983-987, doi: 10.1002/anie.201410059.
61. Shumyantseva, V. V., Kuzikov, A. V., Masamrekh, R. A., Bulko, T. V., and Archakov, A. I. (2018) From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450, *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 192-204 doi: 10.1016/j.bios.2018.08.040.
62. Schneider, E., and Clark, D. S. (2013) Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, **39**, 1-13, doi: 10.1016/j.bios.2012.05.043.
63. Ducharme, J., and Auclair, K. (2018) Use of bio-conjugation with cytochrome P450 enzymes, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1866**, 32-51, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.06.007.
64. Valikhani, D., Bolivar, J. M., and Pelletier, J. N. (2021) An overview of cytochrome P450 immobilization strategies for drug metabolism studies, biosensing, and biocatalytic applications: challenges and opportunities, *ACS Catal.*, **11**, 9418-9434, doi: 10.1021/acscatal.1c02017.
65. Bistolas, N., Wollenberger, U., Jung, C., and Scheller, F. W. (2005) Cytochrome P450 biosensors – a review, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2408-2423, doi: 10.1016/j.bios.2004.11.023.
66. Asturias-Arribas, L., Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., and Arcos-Martínez, M. J. (2013) Electrochemical determination of cocaine using screen-printed cytochrome P450 2B4 based biosensors, *Talanta*, **105**, 131-134, doi: 10.1016/j.talanta.2012.11.078.
67. Rusling, F., Wang, B., and Yun, S. (2008) Electrochemistry of redox enzymes, in *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications* (Bartlett, P. N., ed) John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, pp. 39-85, doi: 10.1002/9780470753842.ch2.
68. Lamb, D. C., Waterman, M. R., Kelly, S. L., and Guengerich, F. P. (2007) Cytochromes P450 and drug discovery, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 504-512, doi: 10.1016/j.copbio.2007.09.010.
69. Guengerich, F. P. (2021) Drug metabolism: cytochrome P450, in *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, Netherlands, doi: 10.1016/B978-0-12-820472-6.99996-1.
70. Bavishi, K., Laursen, T., Martinez, K. L., Møller, B. L., and Della Pia, E. A. (2016) Application of nanodisc technology for direct electrochemical investigation of plant cytochrome P450s and their NADPH P450 oxidoreductase. *Sci. Rep.*, **6**, 29459, doi: 10.1038/srep29459.
71. Shumyantseva, V. V., Koroleva, P. I., Bulko, T. V., Shkel, T. V., Gilep, A. A., and Veselovsky, A. V. (2023) Approaches for increasing the electrocatalytic efficiency of cytochrome P450 3A4, *Bioelectrochemistry*, **149**, 108277, doi: 10.1016/j.bioelectchem.2022.108277.
72. Miller, W. L. (2005) Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer, *Endocrinology*, **146**, 2544-2550, doi: 10.1210/en.2005-0096.
73. Di Nardo, G., and Gilardi, G. (2021) Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response, *Bioelectrochemistry*, **138**, 107729, doi: 10.1016/j.bioelectchem.2020.107729.
74. Zhang, C., Lu, M., Lin, L., Huang, Z., Zhang, R., Wu, X., and Chen, Y. (2020) Riboflavin is directly involved in N-dealkylation catalyzed by bacterial cytochrome P450 monooxygenases, *ChemBioChem*, **21**, 2297-2305, doi: 10.1002/cbic.202000071.
75. Gray, J. J. (2004) The interaction of proteins with solid surfaces, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 110-115, doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.001.
76. Mie, Y., Ikegami, M., and Komatsu, Y. (2016) Nanoporous structure of gold electrode fabricated by anodization and its efficacy for direct electrochemistry of human cytochrome P450, *Chem. Lett.*, **45**, 640-642, doi: 10.1246/cl.160164.
77. Dai, Q., Yang, L., Wang, Y., Cao, X., Yao, C., and Xu, X. (2020) Surface charge-controlled electron transfer and catalytic behavior of immobilized cytochrome P450 BM3 inside dendritic mesoporous silica nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.*, **412**, 4703-4712, doi: 10.1007/s00216-020-02727-0.
78. Xu, X., Zheng, Q., Bai, G., Dai, Q., Cao, X., Yao, Y., Liu, S., and Yao, C. (2018) Polydopamine functionalized nanoporous graphene foam as nanoreactor for efficient electrode-driven metabolism of steroid hormones, *Biosens. Bioelectron.*, **119**, 182-190, doi: 10.1016/j.bios.2018.08.009.
79. Lu, J., Li, H., Cui, D., Zhang, Y., and Liu, S. (2014) Enhanced enzymatic reactivity for electrochemically driven drug metabolism by confining cytochrome P450 enzyme in TiO₂ nanotube

- arrays, *Anal. Chem.*, **86**, 8003-8009, doi: 10.1021/ac502234x.
80. Shumyantseva, V. V., Kuzikov, A. V., Masamreh, R. A., Filippova, T. A., Koroleva, P. I., Agafonova, L. E., Bulko, T. V., and Archakov, A. I. (2022) Enzymology on an electrode and in a nanopore: analysis algorithms, enzyme kinetics, and perspectives, *BioNanoScience*, **12**, 1341-1355, doi: 10.1007/s12668-022-01037-2.
 81. Kuchler, A., Yoshimoto, M., Luginbühl, S., Maveli F., and Walde, P. (2016) Enzymatic reactions in confined environments, *Nat. Nanotech.*, **11**, 409-420, doi: 10.1038/nnano.2016.54.
 82. Шумянцева В. В., Королева П. И., Гилеп А. А., Напольский К. С., Иванов Ю. Д., Канашенко С. Л., Арчаков А. И. (2022) Повышение эффективности электрокатализа цитохрома P450 3A4 с помощью модификации электрода пространственно-упорядоченными наноструктурами на основе анодного оксида алюминия для исследования метаболических превращений лекарственных препаратов, *Докл. Росс. Акад. Наук Науки о Жизни*, **506**, 62-67, doi: 10.31857/S26867389220502986.
 83. Koroleva, P. I., Gilep, A. A., Kraevskiy, S. V., Tsybruk, T. V., and Shumyantseva, V. V. (2023) Improving the efficiency of electrocatalysis of cytochrome P450 3A4 by modifying the electrode with membrane protein streptolysin o for studying the metabolic transformations of drugs, *Biosensors*, **13**, 457, doi: 10.3390/bios13040457.
 84. Арчаков А. И. (1975) *Микросомальное окисление*, Наука, Москва, 327 с.
 85. Sultana, N., Schenkman, J. B., and Rusling, J. F. (2005) Protein film electrochemistry of microsomes genetically enriched in human cytochrome P450 monooxygenases, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13460-13461, doi: 10.1021/ja0538334.
 86. Krishnan, S., and Rusling, J. F. (2007) Thin film voltammetry of metabolic enzymes in rat liver microsomes, *Electrochem. Commun.*, **9**, 2359-2363, doi: 10.1016/j.elecom.2007.07.002.
 87. Nerimetla, R., and Krishnan, S. (2015) Electrocatalysis by subcellular liver fractions bound to carbon nanostructures for stereoselective green drug metabolite synthesis, *Chem. Commun.*, **51**, 11681-11684, doi: 10.1039/c5cc03364k.
 88. Xu, X., Bai, G., Song, L., Zheng, Q., Yao, Y., Liu, S., and Yao, C. (2017) Fast steroid hormone metabolism assays with electrochemical liver microsomal bioreactor based on polydopamine encapsulated gold-graphene nanocomposite, *Electrochim. Acta*, **258**, 1365-1374, doi: 10.1016/j.electacta.2017.11.195.
 89. Nerimetla, R., Premaratne, G., Liu, H., and Krishnan, S. (2018) Improved electrocatalytic metabolite production and drug biosensing by human liver microsomes immobilized on amine-functionalized magnetic nanoparticles, *Electrochim. Acta*, **280**, 101-107, doi: 10.1016/j.electacta.2018.05.085.
 90. Walgama, C., Nerimetla, R., Materer, N. F., Schildkraut, D., Elman, J. F., and Krishnan, S. (2015) A simple construction of electrochemical liver microsomal bioreactor for rapid drug metabolism and inhibition, *Assays Anal. Chem.*, **87**, 4712-4718, doi: 10.1021/ac5044362.
 91. Walker, A., Walgama, C., Nerimetla, R., Alavi, S. H., Echeverria, E., Harimkar, S. P., McIlroy, D. N., and Krishnan, S. (2020) Roughened graphite biointerfaced with P450 liver microsomes: Surface and electrochemical characterizations, *Colloids Surf. B*, **189**, 110790, doi: 10.1016/j.colsurf.2020.110790.
 92. Kahma, H., Filppula, A. M., Launiainen, T., Viinamäki, J., Neuvonen, M., Evangelista, E. A., Totah, R. A., and Backman, J. T. (2019) Disparities in CYP2C8 inactivation between enzyme sources, *Drug Metab. Dispos.*, **47**, 436-443, doi: 10.1124/dmd.118.085498.
 93. Kumar, V., Rock, D. A., Warren, C. J., Tracy, T. S., and Wahlstrom, J. L. (2006) Enzyme source effects on CYP2C9 kinetics and inhibition, *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1903-1908, doi: 10.1124/dmd.106.010249.
 94. Nerimetla, R., Walgama, C., Singh, V., Hartson, S. D., and Krishnan, S. (2017) Mechanistic insights on the voltage-driven biocatalysis of a cytochrome P450 bacteosomal film on a self-assembled monolayer, *ACS Catal.*, **7**, 3446-3453, doi: 10.1021/acscatal.6b03588.

CATALYTIC AND ELECTROCATALYTIC MECHANISMS OF CYTOCHROMES P450 IN THE DEVELOPMENT OF BIOSENSORS AND BIOREACTORS

Review

P. I. Koroleva¹, T. V. Bulko¹, L. E. Agafonova¹, and V. V. Shumyantseva^{1,2*}

¹ Institute of Biomedical Chemistry (IBMC),
119121 Moscow, Russia; e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

² The Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov, 117997 Moscow, Russia

Cytochromes P450 are unique family of isozymes, discovered in all kingdoms of living species (in animals, bacteria, plants, fungi, archaea). The main functional role of the cytochromes P450 is biotransformation of exogenous and endogenous compounds. This review is highlighted problem of enhancing effectivity of electrocatalysis of cytochromes P450, enzymes that have unique capabilities both for biosensors' design and for biotechnological application. In this review paper, we summarize main methods and modern trends based on biochemical mechanism of cytochromes P450 for development of reconstructing and electrochemical catalytic systems for practical application of these enzymes.

Keywords: cytochrome P450, mechanism of catalysis, bioelectrochemistry, electrocatalysis

НОВАЯ ДВУХДОМЕННАЯ ЛАККАЗА СО СРЕДНИМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА

© 2023 Л.И. Трубицина^{1*}, И.В. Трубицин¹, А.В. Лисов¹, А.Г. Габдулхаков²,
А.Г. Заварзина³, О.В. Белова¹, А.П. Ларионова¹, С.В. Тищенко², А.А. Леонтьевский¹

¹Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: lyubov_yurevich@mail.ru

²Институт белка РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения,
119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.05.2023

После доработки 04.09.2023

Принята к публикации 08.09.2023

Ген ранее неисследованной двухдоменной лакказы был идентифицирован в геноме актинобактерии *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ас-1300. Двухдоменная лакказа, названная ScaSL, была продуцирована в гетерологичной системе экспрессии (штамм *Escherichia coli* M15 [pREP4]). Фермент был очищен до гомогенного состояния с использованием аффинной хроматографии. Лакказа ScaSL, как и большинство двухдоменных лакказ, проявляла активность в форме гомотримера. Однако, в отличие от большинства двухдоменных лакказ, она была активна и в мультимерных формах. Фермент проявлял максимальную активность при 80 °С и был термостабилен. Время полуйнактивации ScaSL при 80 °С составило 40 мин. Лакказа окисляла нефенольное органическое соединение 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфонат) (АБТС) с максимальной скоростью при pH 4,7, окисляла фенольное соединение 2,6-диметоксифенол с максимальной скоростью при pH 7,5. Стабильность лакказы наблюдалась в диапазоне pH 9–11. При pH 7,5 лакказа слабо ингибировалась азидом натрия, фторидом натрия и хлоридом натрия; при pH 4,5 лакказа полностью ингибировалась 100 мМ азидом натрия. Значения K_m и k_{cat} фермента для АБТС составили 0,1 мМ и 20 с⁻¹, а для 2,6-диметоксифенола – 0,84 мМ и 0,36 с⁻¹ соответственно. ScaSL катализировала полимеризацию гуминовых кислот и лигнина. Окислительно-восстановительный потенциал лакказы составил $0,472 \pm 0,007$ В. Таким образом, лакказа ScaSL – первая охарактеризованная двухдоменная лакказа со средним окислительно-восстановительным потенциалом. Кристаллическая структура ScaSL была определена с разрешением 2,35 Å. Сравнительный анализ структур ScaSL и других двухдоменных лакказ позволил предположить, что средний потенциал ScaSL может быть связан с конформационными различиями в положениях боковых групп аминокислот в позиции 230 (в нумерации ScaSL), относящихся ко второй координационной сфере атома меди T1-центра.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: двухдоменная лакказа, *Streptomyces carpinensis*, клонирование, кристаллизация, термостабильность, окислительно-восстановительный потенциал.

DOI: 10.31857/S0320972523100184, EDN: OYBJZH

ВВЕДЕНИЕ

Лакказы – медьсодержащие оксидазы, которые катализируют восстановление кислорода до воды, при этом окисляют широкий спектр органических и неорганических соединений [1]. Лакказы широко распространены у растений, грибов и бактерий [2], обнаружены у на-

секомых [3], лишайников [4], водорослей [5]. В структурном отношении лакказы можно подразделить на двухдоменные (2д) и трёхдоменные (3д) ферменты [6]. 2д-Лакказы обнаружены только у бактерий.

Лакказы выполняют различные функции у живых организмов: участвуют в синтезе вторичных метаболитов, споруляции, патогенезе [7].

Принятые сокращения: 2д – двухдоменная(ые); 3д – трёхдоменная(ые); 2,6-ДМФ – 2,6-диметоксифенол; АБТС – 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфонат); ОВП – окислительно-восстановительный потенциал.

* Адресат для корреспонденции.

Бактерии используют лакказы для трансформации полимерных соединений, таких как лигнин или гуминовые вещества (органические вещества, содержащиеся в почвенных и водных экосистемах) [8, 9, 10]. Грибные 3д-лакказы окисляют гуминовые вещества и лигнин, что приводит к их полимеризации или деполимеризации [8, 11]. Бактериальные 2д-лакказы также способны трансформировать лигнин и гуминовые вещества, но эти субстраты только полимеризуются под действием 2д-лакказ [12, 13]. Бактериальные 2д-лакказы – термостабильные ферменты, которые способны выдерживать инкубирование при 70 °С, 80 °С и даже при 90 °С [14]. В отличие от 3д-лакказ грибов, которые стабильны при кислых или нейтральных значениях pH [15, 16], бактериальные 2д-лакказы стабильны при нейтральных или щелочных значениях pH [17, 18]. К тому же 2д-лакказы окисляют фенольные соединения при нейтральных или щелочных значениях pH [18, 19, 20], тогда как 3д-лакказы окисляют фенольные соединения преимущественно в кислой среде [21]. Ещё одно важное различие между 2д- и 3д-лакказами – устойчивость 2д-лакказ к действию классических ингибиторов 3д-лакказ. При кислых значениях pH азиды и фториды в низких концентрациях способны практически полностью ингибировать активность 3д-лакказ [22, 23], тогда как 2д-лакказы проявляют активность даже при 10 мМ концентрации данных ингибиторов [19]. Более того, при щелочных значениях pH эти ингибиторы не влияют на активность 2д-лакказ или могут незначительно повышать активность ферментов [20, 24].

Известно, что 3д-лакказы грибов используются в биотехнологических процессах [25]: ферменты применяют для биоремедиации сточных вод текстильных заводов, для отбеливания бумажной массы [7, 26], для химического синтеза [27], в пищевой промышленности [28], для создания биосенсоров [29]. Такое широкое применение 3д-лакказ возможно благодаря их низкой субстратной специфичности [30] и высокому окислительно-восстановительному потенциалу (ОВП) [31]. Известно, что лакказа способна окислять соединения, ОВП которых равен или чуть выше ОВП Т1-центра фермента. Исходя из этого, более высокий ОВП позволяет применять фермент в биотехнологических процессах. Установлено, что все 2д-лакказы, описанные к настоящему времени – низкопотенциальные ферменты [32]. Величина ОВП 2д-лакказ составляет 0,33–0,45 В. Поэтому, несмотря на тот факт, что 2д-лакказы имеют определённый

биотехнологический потенциал (они термостабильны, окисляют фенольные соединения в нейтральной или щелочной среде, стабильны в широком диапазоне величин pH, устойчивы к действию классических ингибиторов лакказ), они активно не используются в промышленности из-за низкого ОВП. Исходя из этого, поиск новых 2д-лакказ со средним или высоким ОВП является актуальной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование гена 2д-лакказы. Штамм *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ас-1300 (также известный как =DSM 43835) был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (<http://www.vkm.ru/>). Штамм культивировали при 29 °С (pH 7,2) в среде следующего состава (г/л): крахмал – 20,0; K₂HPO₄ – 0,5; KNO₃ – 1; NaCl – 0,2; MgSO₄ × 7 H₂O – 0,3; CaCO₃ – 0,5; FeSO₄ × 7 H₂O – 0,01; агар – 20. Полученную биомассу использовали для выделения геномной ДНК. Выделение геномной ДНК проводили с использованием коммерческого набора («diaGene», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Полноразмерную последовательность гена идентифицировали и анализировали с помощью онлайн-сервиса Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ген без последовательности сигнального пептида амплифицировали с использованием геномной ДНК в качестве матрицы, прямого и обратного праймеров (1300F3nS – ACCTCGGACAAGCCCG, 1300R3/2 – TCACATGCCGGGCATG) и Taq-ДНК-полимеразы («Сиб-Энзим», Россия). Программа амплификации была следующей: 1) начальная денатурация: 95 °С, 5 мин; 2) 35 циклов: денатурация – 95 °С, 30 с; отжиг – 50 °С, 30 с; элонгация – 72 °С, 1 мин; 3) финальная элонгация: 72 °С, 2 мин. Продукт ПЦР требуемой величины очищали из реакционной смеси с использованием коммерческого набора («diaGene») в соответствии с инструкцией производителя. Последовательность гена подтверждали секвенированием. Для клонирования гена в вектор pQE-30 («Qiagen», Германия) по сайтам эндонуклеаз рестрикции *SacI* и *HindIII* использовали следующие праймеры: 1300Fe3nS – AGTGAGCTC ACCTCGGACAAGCCCG и 1300Re3 – TCA AAGCTTTTCACATGCCGGGCATG (сайты *SacI* и *HindIII* выделены подчёркиванием). Условия амплификации были следующими: 95 °С, 5 мин; 35 циклов: 95 °С, 30 с, 50 °С, 30 с, 72 °С, 1 мин; 72 °С, 2 мин. Ампликон обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SacI* и *HindIII*

(«Thermo Fisher Scientific», США) согласно инструкции производителя. Затем ставили реакцию лигирования вектора и ампликона при +15 °С с использованием Т4-ДНК-лигазы («Thermo Fisher Scientific»). Лигазной смесью, содержащей конструкцию pQE::scaSl, трансформировали компетентные клетки *E. coli* M15 [pREP4] («QiaGen»). Плазмиды с геном-вставкой получали из ночной культуры трансформантов. Последовательность гена-вставки проверяли на отсутствие мутаций секвенированием.

Экспрессия и очистка ScaSL. Для получения рекомбинантного белка ScaSL 1 мл «ночной культуры» трансформантов инокулировали в 200 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (25 мкг/мл). Клетки выращивали при 37 °С и 150 об./мин до оптической плотности 1,0 при 600 нм, затем вносили индуктор — 0,2 мМ ИПТГ, а также 1 мМ CuSO₄. После 15 ч роста температуру снижали до 20 °С и выращивали культуру без перемешивания 24 ч. Клетки осаждали центрифугированием при комнатной температуре (7000 об./мин, 30 мин). Осадок ресуспендировали в буфере 1 (500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0) и разрушали ультразвуком. Клеточный экстракт, полученный после центрифугирования (10 000 об./мин, 40 мин), наносили на колонку HisTrapTMFF («GE Healthcare», США) с Ni-сефарозой. Колонку уравнивали с буфером 1, промывали пятью объёмами буфера 2 (500 мМ NaCl, 50 мМ имидазол, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0) для удаления белков, неспецифично связанных с носителем, и элюировали лакказу буфером 3 (500 мМ NaCl, 300 мМ имидазол, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0). Фракции, содержащие синий ферментный препарат, диализовали против 20 мМ Tris-HCl (pH 9,0). Фермент хранили при +8 °С. Концентрацию белка определяли с использованием коэффициента молярной экстинкции, рассчитанного на основе последовательности белка в программе Vector NTI («Life Technologies», США). Полученное значение коэффициента для ScaSL: $\epsilon_{280} = 38\,930 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Молекулярную массу мономерной формы фермента определяли при помощи денатурирующего электрофореза в 12%-ном ПААГ [33]. Молекулярную массу активной формы фермента определяли при помощи нативного градиентного электрофореза, как описано ранее [14]. Визуализацию активности фермента проводили согласно методике, описанной ранее [14].

Характеристика ScaSL. Активность лакказы измеряли при комнатной температуре

по скорости окисления 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфоната) (АБТС) при 420 нм ($\epsilon_{420} = 36\,000 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) [34] и 2,6-диметоксифенола (2,6-ДМФ) при 469 нм ($\epsilon_{469} = 49\,600 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) [35] в 50 мМ буфере Britton–Robinson [36]. Спектр поглощения измеряли в диапазоне длин волн от 700 до 300 нм на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония). Оптимумы pH измеряли с АБТС и 2,6-ДМФ в 50 мМ буфере Britton–Robinson (диапазон величин pH: 3,0–5,5 для АБТС, 5,5–9,0 для 2,6-ДМФ). Температурный оптимум измеряли в температурном диапазоне 30–80 °С в 50 мМ буфере Britton–Robinson с 0,2 мМ АБТС при pH 4,5. Стабильность фермента измеряли при pH 3, 5, 7, 9, 11 в аналогичных условиях в течение недели. Термостабильность ScaSL определяли, измеряя остаточную активность фермента после часа инкубирования при 70 °С, 80 °С и 90 °С в аналогичных условиях. Влияние азидата натрия (NaN₃), хлорида натрия (NaCl) и фторида натрия (NaF) в концентрациях 1, 10 и 100 мМ на лакказную активность определяли при pH 4,7 по скорости окисления 0,2 мМ АБТС, при pH 7,5 — по скорости окисления 1 мМ 2,6-ДМФ. Кинетические константы определяли для субстратов АБТС и 2,6-ДМФ при pH 4,7 и pH 7,5 соответственно, при 30 °С. Расчёт констант проводили в программе Sigma Plot 11.0. ОВП лакказы ScaSL измеряли методом редокс-титрования с использованием редокс-пары K₃[Fe(CN)₆] / K₄[Fe(CN)₆] ($E'^{\circ} = 0,433 \text{ В}$) в атмосфере азота [14, 37]. ОВП T1-центра рассчитывали согласно уравнению Нернста в программе Origin Pro 2015 («Origin-Lab Corporation», США). Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали не менее чем для трёх повторностей.

Реакция 2д-лакказы с полимерными субстратами. Для эксперимента использовали гуминовую кислоту из торфа («Merck», Германия), натриевую соль лигносульфонокислоты («Sigma-Aldrich», США). Гуминовую кислоту из дерново-подзолистой почвы (Stagnic Retisol, Loamic, Humic, согласно мировой реферативной базе почвенных ресурсов, WRB 2015) с зольностью 3% получали в атмосфере N₂, как описано ранее [38]. Реакцию 2д-лакказы с полимерными веществами в щелочной среде и анализ продуктов реакции методом гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-75 проводили, как описано ранее [13].

Кристаллизация. Кристаллизацию осуществляли при 24 °С с использованием метода диффузии паров в модификации «висящая капля» на силиконизированных стёклах в планшетах Linbro («Molecular Dimensions»,

Великобритания). Кристаллизационные капли готовили путём смешивания 3 мкл белка с концентрацией 14 мг/мл и 1 мкл раствора, содержащего 20% (v/v) смеси ПЭГ (PEG Smear Broad), 0,1 М цитрата натрия, pH 5,6, 0,15 М ацетата магния (условие № 33 набора BCS-1, «Molecular Dimensions»). Перед замораживанием кристаллы вымачивали в криорастворе, состоящем из 20% ПЭГ 4000, 20% глицерина, 0,1 М ацетата натрия, pH 4,6, 0,16 М сульфата аммония (условия № 20 набора Crystal Screen Cryo, «Hampton Research», США).

Сбор и обработка данных. Сбор дифракционных данных проводили посредством лабораторного источника рентгеновского излучения, состоящего из генератора с вращающимся анодом Proteum X8, оснащённого оптикой Montel 200 («Bruker», США) и детектором PLATINUM 135 («Bruker»), в Институте белка РАН. Данные обрабатывали и усредняли с помощью программы PROTEUM2 (<http://www.bruker.ru>).

Решение и уточнение кристаллической структуры. Пространственную структуру лакказы определили методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser [39]. В качестве стартовой модели использовали структуру 2д-лакказы *Streptomyces lividans*, определённую с разрешением 2,4 Å (PDB ID 4GYB). Структуру ScaSL уточняли с помощью программы Phenix.refine [40]. Ручную правку структуры проводили в программе Coot [41]. Качество уточнения оценивали с помощью сервера MolProbity [42]. Атомные координаты модели и структурные факторы лакказы депонировали в банке данных белков PDB, ID 8AIP. Рис. 5 и 6 подготовили с использованием программы PyMOL Molecular Graphics System v2.5 (<https://pymol.org/2/>) [43].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клонирование лакказного гена, его экспрессия и очистка ScaSL. Ген, кодирующий 2д-лакказу ScaSL, был клонирован из штамма *S. carpinensis* ВКМ Ас-1300 в плазмиду pQE-30. Анализ аминокислотной последовательности ScaSL показал наличие сигнального пептида для транслокации лакказы по ТАТ-секреторному пути (1–37 а.о.). В последовательности также присутствовали консервативные аминокислоты: десять гистидинов и один цистеин, координирующие четыре атома меди.

Клетки *E. coli*, несущие рекомбинантный вектор, продуцировали ScaSL с высоким выходом: около 100 мг с 1 л культуры. Очистку про-

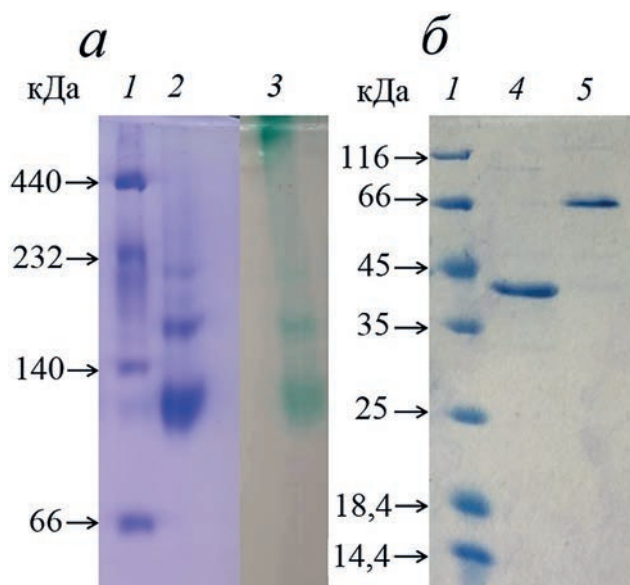


Рис. 1. Нативный градиентный (3–15%) электрофорез в ПААГ (а) и ДСН-ПААГ-электрофорез (б) лакказы ScaSL из *S. carpinensis* ВКМ Ас-1300. 1 – Маркеры молекулярной массы; 2 – окрашивание белка с Coomassie Brilliant Blue R-250; 3 – зимограмма лакказной активности с АБТС; 4 – фермент после очистки, кипячённый с β-меркаптоэтанолом и ДСН; 5 – фермент после очистки с β-меркаптоэтанолом и ДСН, без кипячения

водили в одну стадию при помощи аффинной хроматографии. Чистый белковый препарат имел тёмно-синий цвет. Нативный электрофорез в ПААГ показал, что белковая полоса соответствовала молекулярной массе 100 кДа (белок был активен в гомотримерной форме (рис. 1, а)).

Однако на электрофореze детектировались другие полосы активного белка. Это свидетельствовало о том, что белок олигомеризовался с образованием активных комплексов. Рекомбинантный ScaSL, кипячённый с β-меркаптоэтанолом, имел молекулярную массу 37 кДа, согласно данным электрофореза в ПААГ с ДС-Na; фермент с β-меркаптоэтанолом без кипячения имел молекулярную массу 68 кДа (рис. 1, б). Это указывало на значительное количество водородных связей, участвующих во взаимодействии отдельных субъединиц фермента.

Характеристика лакказы ScaSL. Лакказа ScaSL окисляла типичные субстраты лакказ: 2,6-ДМФ и АБТС. Максимальная активность лакказы в отношении АБТС наблюдалась при pH 4,7; в отношении 2,6-ДМФ – при pH 7,5 (рис. 2, а). Температурный оптимум фермента составлял 80 °C (рис. 2, б). Остаточная активность лакказы после часа инкубирования при 70 °C, 80 °C и 90 °C составляла 62%, 40% и 33% соответственно (рис. 2, в). Фермент сохранял 60% и 52% своей исходной активности после

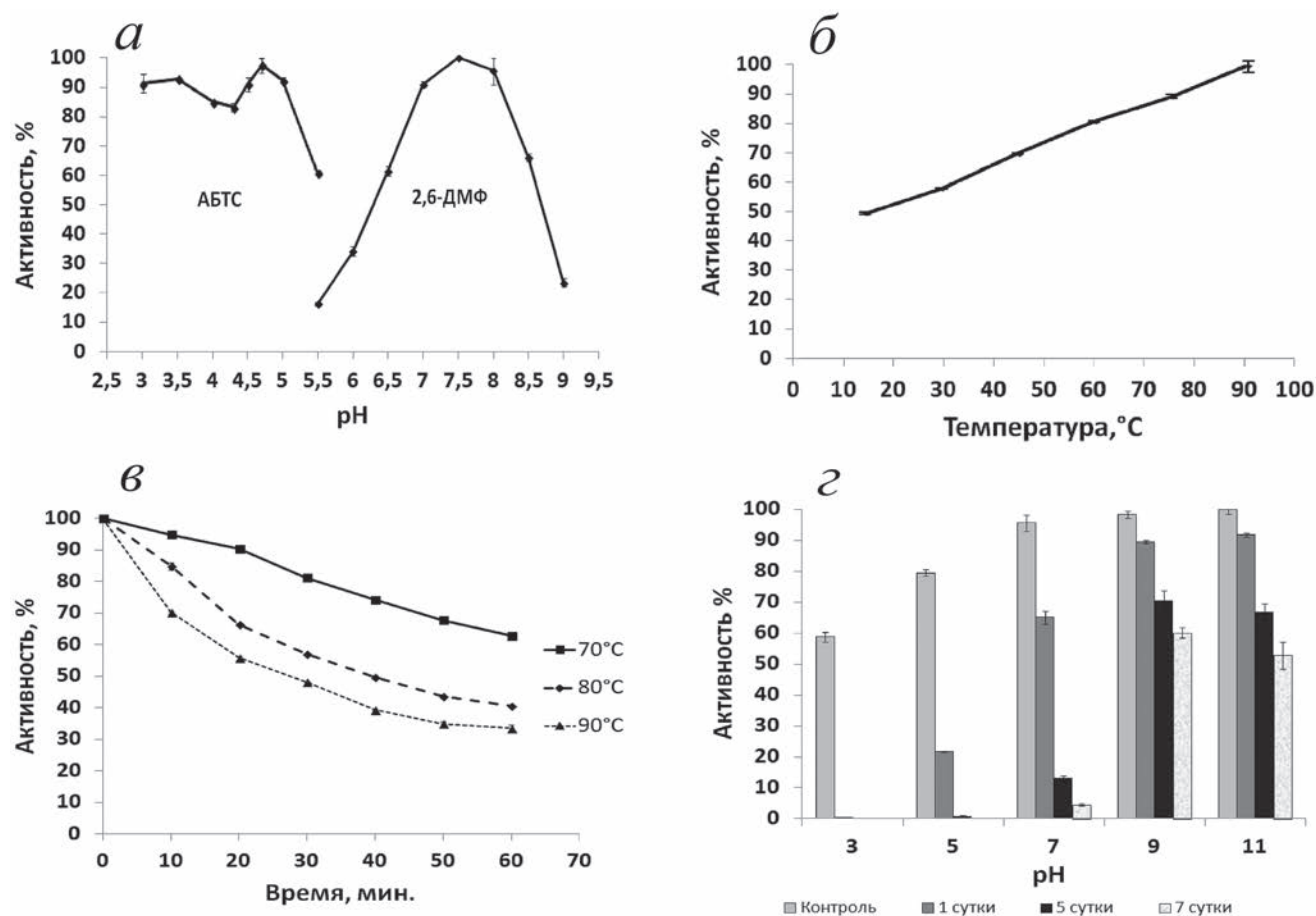


Рис. 2. Биохимические свойства ScaSL. Оптимумы pH фермента по АБТС и 2,6-ДМФ (а); температурный оптимум активности лакказы (б); термостабильность при 70, 80 и 90 °С (в); стабильность при различных pH (г)

одной недели инкубации при значениях pH 9 и pH 11 соответственно (рис. 2, г). При инкубации лакказы при pH 3,0 фермент полностью инактивировался в течение 24 ч.

Спектр поглощения лакказы имел пик при 590 нм и плечо около 330–340 нм из-за присутствия Т1-медного центра и Т3-медного центра соответственно (рис. 3, а). Окислительно-восстановительный потенциал Т1-центра ScaSL составил $0,472 \pm 0,007$ В (рис. 3, б).

Кинетические константы ScaSL определяли в отношении субстратов АБТС и 2,6-ДМФ. Для АБТС K_m составила 0,1 мМ, k_{cat} составил 20 с^{-1} . Для 2,6-ДМФ K_m составила 0,84 мМ, k_{cat} составил $0,36 \text{ с}^{-1}$. Исследовано влияние некоторых ингибиторов лакказы (NaN_3 , NaF, NaCl и ЭДТА) на активность фермента (табл. 1).

Влияние ингибиторов измеряли в кислых (pH 4,7) и щелочных (pH 7,5) условиях. NaN_3 , NaF и NaCl не оказывали сильного ингибирующего эффекта на активность лакказы при pH 7,5: при 100 мМ NaN_3 , NaCl и NaF остаточная активность ScaSL составляла 78%, 95% и 95% соответственно. ЭДТА оказывала сильное ингибирующее действие на ScaSL: остаточная

Таблица 1. Влияние ингибиторов на активность лакказы

Ингибитор	Концентрация, мМ	Остаточная активность, %	
		pH 4,7	pH 7,5
NaN_3	1	50,2	102,3
	10	10,3	110,2
	100	0	78
NaF	1	92,3	100
	10	58,3	100,8
	100	16,6	95,3
NaCl	1	95,2	99,4
	10	74,6	100
	100	36,5	95
ЭДТА	1	105,7	99,2
	10	92,7	63,8
	100	78,1	8,7

Примечание. Стандартные отклонения рассчитаны не менее чем для трёх повторностей.

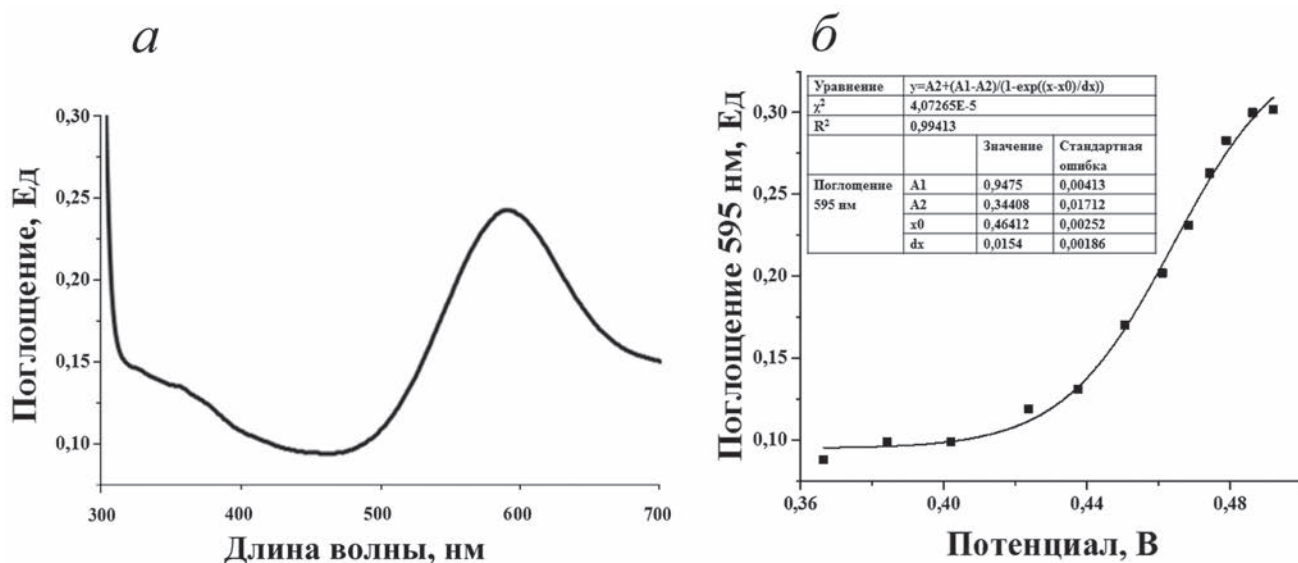


Рис. 3. Спектр поглощения ScaSL (а) и кривая редокс-титрования T1-центра ScaSL (б)

активность фермента в присутствии 100 мМ ЭДТА составляла 8%. При pH 4,7 лакказы сильно ингибировалась 10 мМ NaN_3 , сохраняя примерно 10% от начальной активности; однако фермент сохранял 74% от начальной активности в присутствии 100 мМ NaCl и 58% от начальной активности в присутствии 100 мМ NaF . ЭДТА при pH 7,5 не оказывала сильного ингибирующего действия на активность лакказы.

Гуминовые кислоты. Фермент катализировал окисление гуминовых кислот и лигносульфонокислот. Гуминовые кислоты как из дерново-подзолистой почвы, так и из торфа, а также лигносульфокислота полимеризовались под действием лакказы, о чём свидетельствовало увеличение количества фракции, элюируемой в пустой объём колонки (рис. 4).

Также наблюдалось увеличение количества фракции массой 30–70 кДа в случае гуминовой кислоты из торфа и лигносульфокислоты.

Снижение количества низкомолекулярной фракции, элюируемой в полный объём колонки, уменьшалось для гуминовых кислот.

Кристаллическая структура ScaSL. Кристаллическая структура ScaSL была определена с разрешением 2,35 Å. Кристаллы относились к пространственной группе P23 и содержали одну молекулу мономера в асимметричной части элементарной ячейки. Статистика сбора и уточнения дифракционных данных представлена в табл. 2.

Общая структура функционального тримера ScaSL напоминала структуры других 2д-лакказ (рис. 5), координация ионов меди также была типична для 2д-лакказ. Ион меди T1-центра располагался вблизи поверхности лакказы, тринуклеарный центр находился на стыках мономеров. Ион меди T2 отсутствовал, что достаточно часто встречается в лакказах. В асимметричной части ячейки находился один мономер.

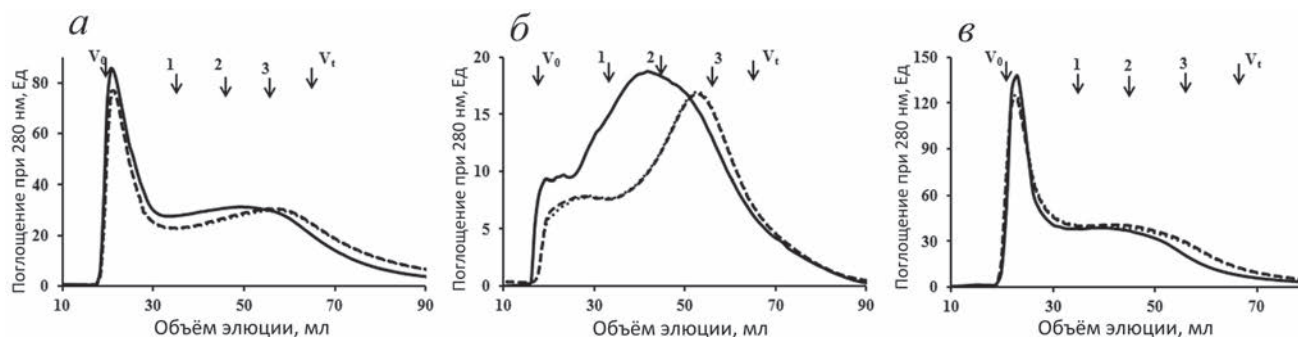


Рис. 4. Реакция ScaSL с гуминовыми кислотами и лигносульфонокислотой: данные гель-фильтрации. Гуминовая кислота из торфа (а); натриевая соль лигносульфоновой кислоты (б); гуминовая кислота из дерново-подзолистой почвы (в). Сплошная линия — образец после взаимодействия с ScaSL, штриховая линия — исходный образец, пунктирная линия — образец с инактивированной ScaSL. Стрелки указывают на свободный объём колонки ($V_0 > 80$ кДа) и общий объём колонки ($V_t < 5$ кДа); 1 — элюция БСА (66 кДа), 2 — элюция карбоангидразы (29 кДа), 3 — элюция цитохрома с (12,4 кДа)

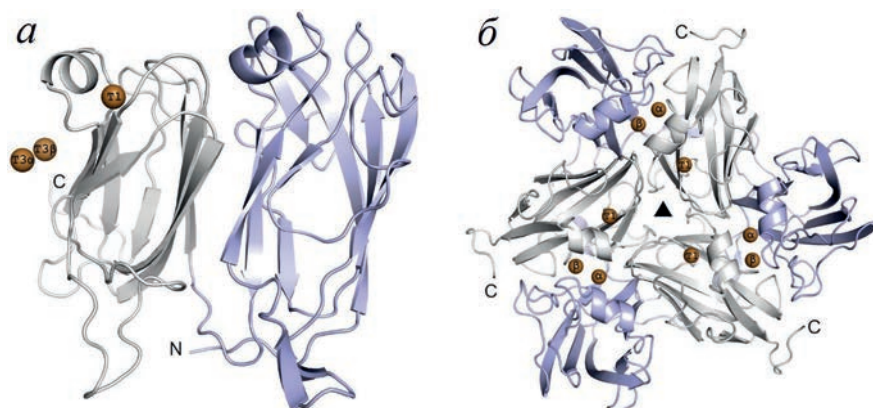


Рис. 5. Структура мономера и функционального тримера ScaSL. *a* – Мономер ScaSL, первый домен показан сиреневым, второй домен серым цветом. Ионы меди показаны оранжевыми сферами. *б* – Функциональный тример, полученный с использованием оси третьего порядка

Таблица 2. Статистические характеристики дифракционного набора и кристаллографического уточнения

Статистика набора	
Пространственная группа	P23
$a = b = c$, (Å)	97,96
$\alpha = \beta = \gamma$, (°)	90,00
Пределы разрешения, Å	32,65–2,3 (2,4–2,3)
R_{sigma} , %	11,1 (64,2)
Среднее $I/\sigma(I)$	6,54 (1,56)
Полнота набора, %	97,0 (83,4)
Избыточность	4,29 (2,13)
Число уникальных отражений	13 826 (1409)
Статистика уточнения	
Разрешение, Å	32,65–2,35 (2,53–2,35)
Общее количество отражений	13 065 (2341)
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$, %	23,1/28,1 (27,5/36,4)
Усреднённый В-фактор, Å ²	30,3
На карте Рамачандрана	
Наиболее предпочтительные районы, %	95,6
Дополнительно разрешённые районы, %	4,4
Среднеквадратичное отклонение	
Длины связей, Å	0,009
Валентные углы, °	0,957

Примечание. Данные в скобках соответствуют интервалу наиболее высокого разрешения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В геноме бактерии *S. carpinensis* ВКМ Ас-1300 был идентифицирован ген ранее неизученной 2д-лакказы. Последовательность гена, кодирующую каталитическую часть белка (без последовательности сигнального пептида), успешно клонировали в вектор pQE-30. Выбор пал на этот вектор, так как ранее проводилось успешное клонирование и экспрессия в указанном векторе пяти других бактериальных 2д-лакказ. Известны случаи агрегации 2д-лакказ при гетерологичной продукции [44], однако рекомбинантная лакказа ScaSL была идентифицирована во фракции супернатанта. Эффект агрегации был минимальным при продукции фермента при 37 °С и отсутствовал при продукции при 20 °С. Культивирование индуцированных клеток в микроаэробных условиях в присутствии ионов меди было необходимо для получения фермента, максимально насыщенного ионами меди [45].

Лакказа ScaSL, как и большинство 2д-лакказ, проявляла активность в форме гомотримера, однако также она могла олигомеризоваться с образованием мультимерных форм. Эффект олигомеризации ранее наблюдался у 2д-лакказы SaSL из *Streptomyces anulatus* [44] и у 2д-лакказы CjSL из *Catenuloplanes japonicus* [20]. Молекулярная масса мономерной формы ScaSL составила 37 кДа. Другие известные 2д-лакказы в форме мономера имели схожие молекулярные массы (33–39 кДа). Физико-химические свойства полученной лакказы были типичны для представителей этого семейства: лакказа была термостабильна, окисляла нефенольное соединение АБТС в кислой среде (pH 4,7), а фенольное соединение 2,6-ДМФ – в нейтральной среде (pH 7,5). Как и большинство бактериальных 2д-лакказ, фермент ScaSL был более

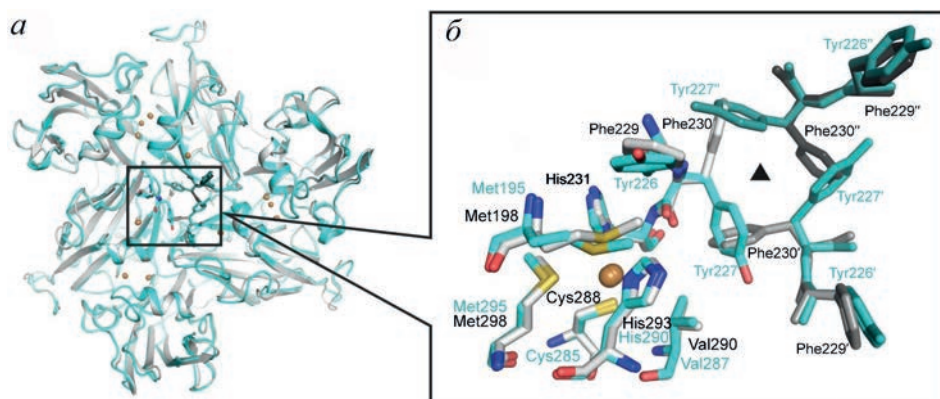


Рис. 6. Структура лакказы ScaSL и SLAC из *S. sviceps*. *а* – Наложение структур ScaSL (серый) и SLAC *S. sviceps* (Ssl1) (голубой). *б* – Увеличение областей вблизи Т1-центра и оси третьего порядка тримера. Ион меди Т1 показан оранжевой сферой, треугольником показана ось 3-го порядка. Остатки тирозина Tyr226 и Tyr227, принадлежащие трём разным мономерам, помечены соответствующим образом (например, Tyr227, Tyr227' и Tyr227'')

стабилен в щелочной среде [13, 17, 18, 44]. Исследуемая лакказа характеризовалась самыми низкими значениями K_m у 2д-лакказ для АБТС и 2,6-ДМФ, они составляли 0,10 мМ и 0,84 мМ соответственно. Так, ранее наименьшая K_m по АБТС была обнаружена у 2д-лакказы SaSL из *S. anulatus* и составила 0,17 мМ [44]; наименьшая K_m для субстрата 2,6-ДМФ была показана для 2д-лакказы Ssl1 из *Streptomyces sviceps* и составила 0,89 мМ [17].

Лакказы принято классифицировать по величине ОВП на ферменты с низким (< 460 мВ), средним (> 460 мВ и < 710 мВ) и высоким (> 710 мВ) потенциалом [31]. Известно, что 2д-лакказы являются низкопотенциальными ферментами. Так, значение ОВП Т1-центра лакказы SLAC из *Streptomyces coelicolor* составило 0,43 В [46], лакказы SvSL из *Streptomyces viridochromogenes* – 0,35 В [14], лакказы Ssl1 из *S. sviceps* – 0,37 В [32], лакказы SilA из *Streptomyces ipomoea* – 0,33 В [47]. Величина ОВП определяет окислительную активность 2д-лакказ [48]. С учётом повышенной окислительной активности лакказы был измерен ОВП фермента. Он составил $0,472 \pm 0,008$ В. Таким образом, полученная 2д-лакказа являлась первым изученным ферментом со средним ОВП.

Как и ранее описанные 2д-лакказы, ScaSL катализировала полимеризацию гуминовых кислот [13]. Лигнин также мог полимеризоваться под действием 2д-лакказ [12]. Грибная 3д-лакказа способна как деполимеризовать лигнин и гуминовые кислоты, так и полимеризовать их [11, 49, 50]. Возможно, полимеризующая способность ScaSL связана с её ОВП: хотя он выше, чем у других 2д-лакказ, но ниже, чем у 3д-лакказ. Таким образом, ОВП белка ещё недостаточен для деполимеризации используемых веществ.

Несмотря на то что аминокислотное окружение активных центров 2д-лакказ в основном практически идентично, некоторые различия всё же наблюдаются, в частности, вблизи Т1-центра. В области Т1-центра происходит связывание и окисление субстрата; в 2д-лакказах он расположен на стыке трёх мономеров (рис. 6).

При наложении участков вблизи Т1-центра ScaSL и Ssl1 видны конформационные различия в расположении двух аминокислотных остатков, принадлежащих второй координационной сфере иона меди CuI (рис. 6). В ScaSL в положениях 229 и 230 находятся фенилаланиновые остатки, тогда как в Ssl1 в соответствующих положениях находятся Tyr226 и Tyr227 (рис. 6). В результате таких замен может измениться не только геометрия субстрат-связывающего кармана, но также гидрофобность и заряд этого участка. Известно, что замены аминокислотных остатков второй координационной сферы иона меди CuI могут существенно влиять на изменение геометрии субстрат-связывающего кармана и, соответственно, на активность 2д-лакказ [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лакказа ScaSL из штамма *S. carpinensis* ВКМ Ас-1300 – новая исследованная двухдоменная лакказа. Фермент был продуцирован в штамме *E. coli* и очищен до гомогенного состояния. Проведено исследование физико-химических свойств фермента. Было установлено, что лакказа является первой изученной двухдоменной лакказой со средним окислительно-восстановительным потенциалом. ScaSL эффективно полимеризовала гуминовые кис-

лоты и лигносульфокислоту. В дальнейшем планируется изучить способность лакказы разлагать красители различной природы, а также выявить детерминанты, определяющие повышенный окислительно-восстановительный потенциал лакказы ScaSL.

Вклад авторов. Л.И. Трубицина – планирование и проведение экспериментов, обсуждение результатов, написание и редактирование текста; И.В. Трубицин – проведение экспериментов и написание текста; А.В. Лисов – планирование экспериментов, обсуждение результатов и написание текста; А.Г. Габдулхаков – проведение экспериментов и редак-

тирование текста; А.Г. Заварзина – проведение экспериментов; О.В. Белова – проведение экспериментов; А.П. Ларионова – проведение экспериментов; С.В. Тищенко – проведение экспериментов и написание текста; А.А. Леонтьевский – руководство работой.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (проект № МК-5025.2021.1.4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baldrian, P. (2006) Fungal laccases – occurrence and properties, *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**, 215-242, doi: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x.
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., et al., (2020) Laccase properties, physiological functions, and evolution, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 996, doi: 10.3390/ijms21030966.
- Asada, N., Namba, M., Kodama, T., and Kyogoku, Y. (2004) Circular dichroism of prophenol oxidase in relation to the structural stability in *Drosophila melanogaster*, *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **56**, 1-6, doi: 10.1002/arch.10137.
- Lisov, A. V., Zavarzina, A. G., Zavarzin, A. A., and Leontievsky, A. A. (2007) Laccases produced by lichens of the order Peltigerales, *FEMS Microbiol. Lett.*, **275**, 46-52, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00858.x.
- Otto, B., Beuchel, C., Liers, C., Reisser, W., Harms, H., and Schlosser, D. (2015) Laccase-like enzyme activities from chlorophycean green algae with potential for bioconversion of phenolic pollutants, *FEMS Microbiol. Lett.*, **362**, fnv072, doi: 10.1093/femsle/fnv072.
- Nakamura, K., and Go, N. (2005) Function and molecular evolution of multicopper blue proteins, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 2050-2066, doi: 10.1007/s00018-004-5076-x.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., et al. (2019) Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation, *Microb. Cell. Fact.*, **18**, 200, doi: 10.1186/s12934-019-1248-0.
- Munk, L., Sitarz, A. K., Kalyani, D. C., Mikkelsen, J. D., and Meyer, A. S. (2015) Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnol. Adv.*, **33**, 13-24, doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.008.
- Perna, V., Meyer, A. S., Holck, J., Eltis, L. D., Eijsink, V. G. H., and Agger, J. W. (2020) Laccase-catalyzed oxidation of lignin induces production of H₂O₂, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **8**, 831-841, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b04912.
- Zahmatkesh, M., Spanjers, H., Toran, M. J., Blánquez, P., and van Lier, J. B. (2016) Bioremoval of humic acid from water by white rot fungi: exploring the removal mechanisms, *AMB Express*, **6**, 118, doi: 10.1186/s13568-016-0293-x.
- Zavarzina, A. G., Leontievsky, A. A., Golovleva, L. A., and Trofimov, S. Ya. (2004) Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an in vitro study, *Soil Biol. Biochem.*, **36**, 359-369, doi: 10.1016/j.soilbio.2003.10.010.
- Majumdar, S., Lukk, T., Solbiati, J. O., Bauer, S., Nair, S. K., et al. (2014) Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation, *Biochemistry*, **53**, 4047-4058, doi: 10.1021/bi500285t.
- Trubitsina, L. I., Lisov, A. V., Belova, O. V., Trubitsin, I. V., Demin, V. V., Konstantinov, A. I., Zavarzina, A. G., and Leontievsky, A. A. (2020) Transformation of low molecular compounds and soil humic acid by two domain laccase of *Streptomyces puniceus* in the presence of ferulic and caffeic acids, *PLoS One*, **15**, e0239005, doi: 10.1371/journal.pone.0239005.
- Trubitsina, L. I., Tishchenko, S. V., Gabdulkhakov, A. G., Lisov, A. V., Zakharova, M. V., and Leontievsky, A. A. (2015) Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*, *Biochimie*, **112**, 151-159, doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.005.
- Góralczyk-Bińkowska, A., Jasińska, A., Długoński, A., Płociński, P., and Długoński, J. (2020) Laccase activity of the ascomycete fungus *Nectriella pironii* and innovative strategies for its production on leaf litter of an urban park, *PLoS One*, **15**, e0231453, doi: 10.1371/journal.pone.0231453.

16. Sun, Y., Liu, Z. L., Hu, B. Y., Chen, Q. J., Yang, A. Z., et al. (2021) Purification and characterization of a thermo- and pH-stable laccase from the litter-decomposing fungus *Gymnopus luxurians* and laccase mediator systems for dye decolorization, *Front Microbiol.*, **12**, 672620, doi: 10.3389/fmicb.2021.672620.
17. Gunne, M., and Urlacher, V. B. (2012) Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with unusual properties discovered by genome mining, *PLoS One*, **7**, e52360, doi: 10.1371/journal.pone.0052360.
18. Feng, H., Zhang, D., Sun, Y., Zhi, Y., Mao, L., et al. (2015) Expression and characterization of a recombinant laccase with alkalistable and thermostable properties from *Streptomyces griseorubens* JSD-1, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **176**, 547-562, doi: 10.1007/s12010-015-1594-2.
19. Molina-Guijarro, J. M., Perez, J., Muñoz-Dorado, J., Guillen, F., Moya, R., et al. (2009) Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*, *Int. Microbiol.*, **12**, 13-21, doi: 10.2436/20.1501.01.77.
20. Trubitsina, L. I., Abdullatypov, A. V., Larionova, A. P., Trubitsin, I. V., Alferov, S. V., Ponamoreva, O. N., and Leontievsky, A. A. (2021) Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes, *PeerJ*, **9**, e11646, doi: 10.7717/peerj.11646.
21. Kaneko, S., Cheng, M., Murai, H., Takenaka, S., Murakami, S., et al. (2009) Purification and characterization of an extracellular laccase from *Phlebia radiata* strain BP-11-2 that decolorizes fungal melanin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 939-942, doi: 10.1271/bbb.80740.
22. More, S. S., Renuka, P. S., Pruthvi, K., Swetha, M., Malini, S. S., et al. (2011) Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp., *Enzyme Res.*, **2011**, 248735, doi: 10.4061/2011/248735.
23. Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., and Gupte, A. (2014) Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1, *3 Biotech*, **4**, 77-84, doi: 10.1007/s13205-013-0129-1.
24. Kolyadenko, I., Scherbakova, A., Kovalev, K., Gabdulkhakov, A., and Tishchenko, S. (2021) Engineering the catalytic properties of two-domain laccase from *Streptomyces griseoflavus* Ac-993, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 65, doi: 10.3390/ijms23010065.
25. Couto, S. R., and Herrera, J. L. T. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review, *Biotechn. Adv.*, **24**, 500-513, doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003.
26. Upadhyay, P., Shrivastava, R., and Agrawal, P. K. (2016) Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase, *3 Biotech*, **6**, 15, doi: 10.1007/s13205-015-0316-3.
27. Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., et al. (2008) Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis, *Microb. Cell Fact*, **7**, 32, doi: 10.1186/1475-2859-7-32.
28. Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., and Rodríguez-Couto, S. (2010) Uses of laccases in the food industry, *Enzyme Res.*, **2010**, 1-8, doi: 10.4061/2010/918761.
29. Coelho, J. H., Eisele, A. P. P., Valezi, C. F., Mattos, G. J., Schirmann, J. G., et al. (2019) Exploring the exocellular fungal biopolymer botryospheran for laccase-biosensor architecture and application to determine dopamine and spironolactone, *Talanta*, **204**, 475-483, doi: 10.1016/j.talanta.2019.06.033.
30. Wang, F., Xu, L., Zhao, L., Ding, Z., Ma, H., et al. (2019) Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: a review, *Microorganisms*, **7**, 665, doi: 10.3390/microorganisms7120665.
31. Mot, A. C., and Silaghi-Dumitrescu, R. (2012) Laccases: complex architectures for one electron oxidations, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1395-1407, doi: 10.1134/S0006297912120085.
32. Gunne, M., Hoppner, A., Hagedoorn, P. L., and Urlacher, V. B. (2014) Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus*, *FEBS J.*, **281**, 4307-4318, doi: 10.1111/febs.12755.
33. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
34. Heinfling, A., Martinez, A. T., Martinez, M. J., Bergbauer, M., and Szwed, U. (1998) Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **165**, 43-50, doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13125.x.
35. Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M. H. (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators, *J. Biol. Chem.*, **267**, 23688-23695, doi: 10.1016/S0021-9258(18)35893-9.
36. Britton, H. T. K., and Robinson, R. A. (1931) Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal, *J. Chem. Soc.*, **10**, 1456-1462, doi: 10.1039/jr9310001456.
37. Olbrich, A. C., Schild, J. N., and Urlacher, V. B. (2019) Correlation between the T1 copper reduction potential and catalytic activity of a small laccase, *J. Inorg. Biochem.*, **201**, 110843, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110843.
38. Zavarzina, A. G., Kravchenko, E. G., Konstantinov, A. I., Perminova, I. V., Chukov, S. N., and Demin, V. V.

- (2019) Comparison of the properties of humic acids extracted from soils by alkali in the presence and absence of oxygen, *Eur. Soil Sci.*, **52**, 880-891, doi: 10.1134/S1064229319080167.
39. McCoy, J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., et al. (2007) Phaser crystallographic software Airlie, *J. Appl. Crystallogr.*, **40**, 658-674, doi: 10.1107/S0021889807021206.
 40. Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., et al. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with *phenix.refine*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **68**, 352-367, doi: 10.1107/S0907444912001308.
 41. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of *Coot*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 486-501, doi: 10.1107/S0907444910007493.
 42. Chen, V. B., Wedell, J. R., Wenger, R. K., Ulrich, E. L., Markley, J. L. (2015) MolProbity for the masses-of data, *J. Biomol. NMR*, **63**, 77-83, doi: 10.1007/s10858-015-9969-9.
 43. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, Delano Scientific, San Carlos.
 44. Lisov, A. V., Trubitsina, L. I., Lisova, Z. A., Trubitsin, I. V., Zavarzina, A. G., and Leontievsky, A. A. (2019) Transformation of humic acids by two-domain laccase from *Streptomyces anulatus*, *Process Biochemistry*, **76**, 128-135, doi: 10.1016/j.procbio.2018.11.001.
 45. Durao, P., Chen, Z., Fernandes, A. T., Hildebrandt, P., Murgida, D. H., et al. (2008) Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 183-193, doi: 10.1007/s00775-007-0312-0.
 46. Gallaway, J., Wheeldon, I., Rincon, R., Atanassov, P., Banta, S., Calabrese, S., et al. (2008) Oxygen-reducing enzyme cathodes produced from SLAC, a small laccase from *Streptomyces coelicolor*, *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 1229-1235, doi: 10.1016/j.bios.2007.11.004.
 47. Blázquez, A., Rodríguez, J., Brissos, V., Mendes, S., Martins, L. O., et al. (2019) Decolorization and detoxification of textile dyes using a versatile *Streptomyces* laccase-natural mediator system, *Saudi J. Biol. Sci.*, **26**, 913-920, doi: 10.1016/j.sjbs.2018.05.020.
 48. Xu, F. (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition, *Biochemistry*, **35**, 7608-7614, doi: 10.1021/bi952971a.
 49. Kumar, V. P., Sridhar, M., and Rao, R. G. (2022) Biological depolymerization of lignin using laccase harvested from the autochthonous fungus *Schizophyllum commune* employing various production methods and its efficacy in augmenting in vitro digestibility in ruminants, *Sci. Rep.*, **12**, 11170, doi: 10.1038/s41598-022-15211-9.
 50. Agustin, M. B., de Carvalho, D. M., Lahtinen, M. H., Hilden, K., Lundell, T., et al. (2021) Laccase as a tool in building advanced lignin-based materials, *ChemSusChem*, **14**, 4615-4635, doi: 10.1002/cssc.202101169.

A NOVEL TWO-DOMAIN LACCASE WITH A MIDDLE REDOX POTENTIAL: PHYSICOCHEMICAL AND STRUCTURAL PROPERTIES

L. I. Trubitsina^{1*}, I. V. Trubitsin¹, A. V. Lisov¹, A. G. Gabdulkhakov², A. G. Zavarzina³,
O. V. Belova¹, A. P. Larionova¹, S. V. Tishchenko², and A. A. Leontievsky¹

¹ Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research
of the Russian Academy of Sciences", G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology
of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow region, Russia; e-mail: lyubov_yurevich@mail.ru

² Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow region, Russia

³ Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

The gene for a previously unexplored two-domain laccase was identified in the genome of the actinobacterium *Streptomyces carpinensis* VKM Ac-1300. A two-domain laccase, named ScaSL, was produced in a heterologous expression system (*Escherichia coli* strain M15 [pREP4]). The enzyme was purified to homogeneity using affinity chromatography. ScaSL laccase, like most two-domain laccases, exhibited activity in the homotrimer form. However, unlike most two-domain laccases, it was also active in multimeric forms. The enzyme exhibited maximum activity at 80°C and was thermally stable. The half-inactivation time of ScaSL at 80°C was 40 min. Laccase oxidized the non-phenolic organic compound ABTS at a maximum rate at pH 4.7; oxidized the phenolic compound 2,6-dimethoxyphenol at a maximum rate at pH 7.5. Laccase stability was observed in the pH range 9-11. At pH 7.5, laccase was weakly inhibited by sodium azide, sodium fluoride, and sodium chloride; at pH 4.5, laccase was completely inhibited by 100 mM sodium azide.

K_m and k_{cat} of the enzyme for ABTS are 0.1 mM and 20 s⁻¹, respectively. K_m and k_{cat} for 2,6-dimethoxyphenol are 0.84 mM and 0.36 s⁻¹, respectively. ScaSL catalyzed the polymerization of humic acids and lignin. The redox potential of laccase was 0.472 ± 0.007 V. Thus, ScaSL laccase is the first characterized two-domain laccase with a middle redox potential. The crystal structure of ScaSL was determined with a resolution of 2.35 Å. A comparative analysis of the structures of ScaSL and other two-domain laccases suggested that the middle potential of ScaSL may be associated with conformational differences in the position of the side groups of amino acids at position 230 (in ScaSL numbering), which belong to the second coordination sphere of the copper atom of the T1 center.

Keywords: two-domain laccase, *Streptomyces carpinensis*, gene cloning, crystal structure, thermal stability, redox potential

ПРОТЕОМНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ, ЛОКАЛИЗАЦИИ И ФУНКЦИЙ БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА ГЕНА *SOWAHD* В ПРОЦЕССЕ ГРАНУЛОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

© 2023 С.Е. Новикова*, Т.В. Толстова, Н.А. Соловьева*, Т.Е. Фарафонова,
О.В. Тихонова, Л.К. Курбатов, А.Л. Русанов, В.Г. Згода*

НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: novikova.s.e3101@gmail.com, victor.zgoda@gmail.com

Поступила в редакцию 22.06.2023

После доработки 23.08.2023

Принята к публикации 26.08.2023

Каталогизация белков человека, определение уровня их содержания, клеточной локализации, выполняемой функции и потенциальной медицинской значимости являются важными задачами, стоящими перед мировым протеомным сообществом. В настоящее время локализация и функции белковых продуктов для почти половины белок-кодирующих генов неизвестны или слабо изучены. Исследование протеома органелл является многообещающим подходом для выявления локализации и функций белков человека. Протеом клеточного ядра представляет особый интерес, поскольку многие белки с ядерной локализацией, например, транскрипционные факторы, выполняют регуляторные функции, определяющие судьбу клеток. По результатам метаанализа ядерного протеома, или нуклеома, клеток линии HL-60 под действием полностью-*транс*-ретиноевой кислоты (ATRA) выявили, что функция и локализация белкового продукта гена *SOWAHD* слабо изучена, кроме того, отсутствует исчерпывающая информация об экспрессии *SOWAHD* на уровне белка. В клетках линии HL-60 для белок-кодирующего гена *SOWAHD* определили экспрессию мРНК на уровне $6,4 \pm 0,7$ транскриптов на миллион молекул. С помощью направленной масс-спектрометрии измерили содержание белка *SOWAHD* (белок 58, содержащий домен анкириновых повторов) в диапазоне 0,27–1,25 фмоль/мкг общего белка. С применением пульсового мечения стабильными изотопами определили, что время полураспада для белкового продукта гена *SOWAHD* составляет приблизительно 19 ч. Протеомное профилирование ядерной фракции клеток линии HL-60 показало, что содержание белка *SOWAHD* увеличивалось в процессе ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки, с пиком в 9 ч после добавления индуктора и с последующим снижением в более поздние временные точки. Результаты исследования впервые указывают на ядерную локализацию и вовлечённость белкового продукта гена *SOWAHD* в индуцированную гранулоцитарную дифференцировку.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белковый продукт гена *SOWAHD*, транскриптом, протеом, ATRA, ядро клетки, масс-спектрометрия, пульсовое мечение стабильными изотопами, динамика синтеза и деградации белка.

DOI: 10.31857/S0320972523100196, EDN: OYBYUU

ВВЕДЕНИЕ

Белки представляют собой конечные продукты экспрессии генов. Именно они выполняют различные функции в живых клетках, опосредуя их жизнедеятельность. Каталогизация, оценка уровня экспрессии, определение

клеточной локализации и выполняемой функции, а также выявление потенциальной биологической и медицинской значимости белков являются основными задачами международного проекта «Протеом человека», запущенного в 2010 г. В рамках проекта для регистрации экспрессии белков и определения её уровня,

Принятые сокращения: клетки линии HL-60 – клетки острого миелоидного лейкоза; ATRA – полностью-*транс*-ретиноевая кислота; SILAC – стабильное изотопное мечение клеток аминокислотами в культуре; SIS – меченные стабильными изотопами пептидные стандарты; *SOWAHD* – белок 58, содержащий домен анкириновых повторов; SRM – мониторинг выбранных реакций; TMT – изобарные тандемные метки.

* Адресат для корреспонденции.

т.е. для каталогизации, применяют масс-спектрометрию и используют моноклональные антитела, а одним из практических результатов является создание баз знаний, таких как Uniprot [1], NextProt [2], Human Protein Atlas [3] и т.д., содержащих исчерпывающую информацию о протеоме человека [4, 5].

По разным источникам, у человека на сегодняшний день насчитывается от 19 379 до 21 306 белок-кодирующих генов [6]. С точки зрения экспрессии, согласно критериям международной организации «Протеом человека» (Human Proteome Organization (HUPO)), продукты потенциальных белок-кодирующих генов в зависимости от доказанности их существования на уровне протеома (protein existence, PE) можно разделить на 5 групп (PE1–PE5) [5]. Наиболее надёжно подтверждённые белковые продукты получают статус PE1, в то время как остальные (PE 2, 3, 4, 5) представляют собой так называемые «недостающие/упущенные» (missing) белки. Для их белок-кодирующих генов ранее могли быть обнаружены транскрипты у человека (PE2) или могли быть предсказаны ортологи белков, подтверждённых у других биологических видов (PE3), или белковый продукт был предсказан с помощью биоинформатических моделей (PE4), при этом подтверждённые данные об экспрессии белка у человека отсутствуют. Согласно промежуточным итогам проекта «Протеом человека», подведённым в 2020 г., именно за счёт обнаружения «недостающих/

упущенных» белков покрытие протеома увеличилось с 69,8 до 90,4% от числа всех белок-кодирующих генов [5].

Масс-спектрометрический анализ благодаря высокой производительности и возможности своего рода «секвенирования» участков аминокислотной последовательности хорошо зарекомендовал себя для обнаружения «недостающих/упущенных» белков [2, 7, 8]. Успешное детектирование таких белков было, с одной стороны, продиктовано развитием масс-спектрометрического метода, в том числе совершенствованием масс-анализаторов, применением улучшенных способов пробоподготовки, использованием фракционирования и изобарных меток. С другой стороны, привлечение специфических типов биологического материала, таких как плаценты, репродуктивные и эмбриональные ткани, позволило зарегистрировать «недостающие/упущенные» белки [9]. Исследование белкового состава отдельных органелл в качестве потенциального источника «недостающих/упущенных» белков также заслуживает внимания как один из подходов для углубления знания о протеоме человека. Особый интерес представляет протеомный состав клеточного ядра.

Подтверждение экспрессии белковых продуктов или каталогизация, выполненная на данный момент времени для более чем 90% белок-кодирующих генов [5], является лишь одной из задач, поставленных перед проектом «Протеом человека». Более сложным

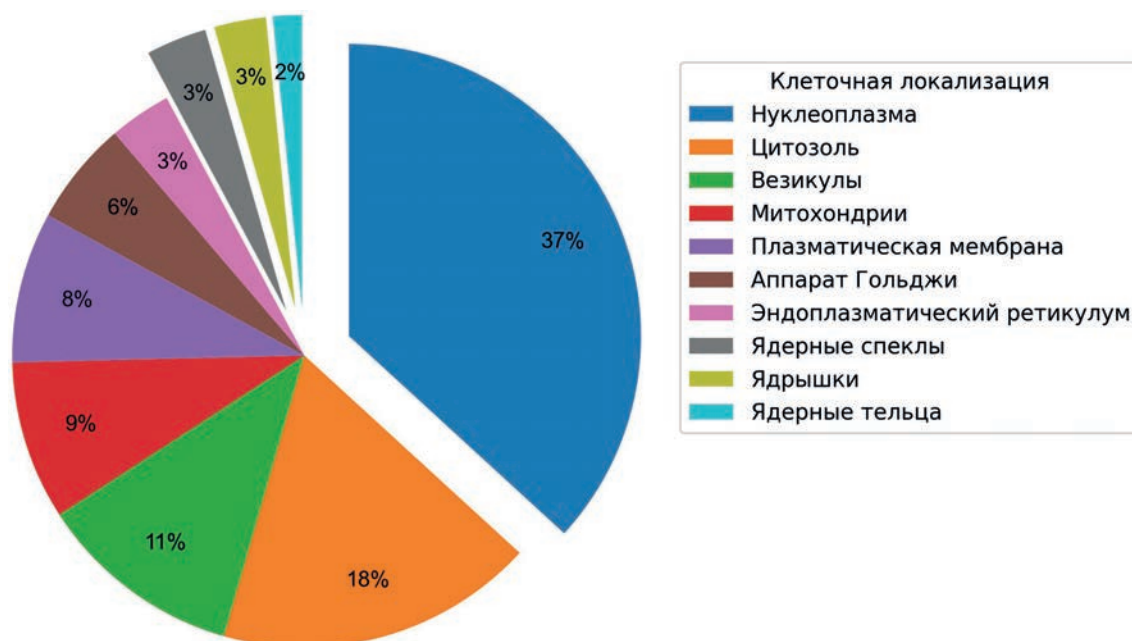


Рис. 1. Круговая диаграмма, демонстрирующая распределение белков с известной клеточной локализацией согласно данным Human Proteome Atlas (версия 22.0). Показаны первые десять групп с наибольшим количеством белков. Стоит отметить, что среди белков с известной клеточной локализацией примерно треть обнаруживается в ядре

представляется определение локализации, функции и медицинской значимости белков с уже установленной экспрессией. Для многих белков такая информация отсутствует в основных протеомных базах данных.

Клеточную локализацию белков можно определить с помощью визуализации их комплексов с флюоресцентно мечеными моноклональными антителами методом микроскопии. Основные результаты, полученные с помощью такого подхода, обобщены в базе данных Human Proteome Atlas [10]. Версия этого ресурса, выпущенная в 2022 г. (версия 22.0), содержит данные для 17 200 белок-кодирующих генов человека, что составляет примерно 86% от их общего числа. При этом только для 13 105 (около 61%) известна информация о клеточной локализации (рис. 1).

Определение функции белка является наиболее сложной задачей. Зачастую роль белка изучают в контексте определённых заболеваний, чаще всего наиболее социально значимых, таких как онкологические и сердечно-сосудистые заболевания, а также болезни центральной нервной системы. В ходе выполнения проекта «Протеом человека» активно используется так называемый хромосома-центричный подход, когда стоит задача в первую очередь доказать экспрессию всех белков, кодируемых каждой хромосомой. В таком случае накопление информации об экспрессии белкового продукта может значительно опережать поступление данных о функциональных особенностях белков и их медицинской значимости.

Белки, входящие в состав ядра, представляют особый интерес, поскольку к ним относятся важные регуляторы — транскрипционные факторы, коактиваторы и корепрессоры транскрипции, ферменты, изменяющие эпигенетический статус клетки, белки, принимающие участие в репликации и репарации ДНК [11]. Исследование протеома ядра в модели индуцированной гранулоцитарной дифференцировки позволило выявить динамическую пертурбацию регуляторных молекул, в том числе и транскрипционных факторов [12, 13].

Мы провели поиск «недостающих/упущенных» белков, а также белков, функция и локализация которых плохо исследованы, используя масс-спектрометрические данные для ядер клеток линии острого миелоидного лейкоза (HL-60) под действием полностью-транс-ретиноевой кислоты (ATRA), опубликованные нами ранее [13]. Для белкового продукта гена *SOWAND* информация об экспрессии в основных базах данных оказалась противоречивой. В базе данных Uniprot указана информация

об экспрессии продукта гена *SOWAND* только на уровне транскрипта (PE2), в то же время, по материалам базы данных NextProt, белок *SOWAND* (белок 58, содержащий домен анкириновых повторов) был зарегистрирован масс-спектрометрическим методом в ряде протеомных экспериментов (PE1), в основном в клетках крови, ткани плаценты и тестикулах. При этом, согласно основным протеомным базам данных, включая наиболее детальную базу знаний NextProt, локализация, функция и медицинская значимость белка *SOWAND* неизвестны. В результате для белкового продукта гена *SOWAND* осуществили всесторонний транскриптомный и протеомный анализ для разьяснения его локализации и вероятной биологической функции, а также времени полураспада белкового продукта в процессе гранулоцитарной дифференцировки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для количественной оценки белка *SOWAND* были использованы данные протеомного профилирования с использованием изобарных тандемных меток (TMT, Tandem Mass Tag), опубликованные ранее [13]. Эксперименты по направленной масс-спектрометрии, пульс-мечению SILAC, транскриптомному анализу проведены непосредственно для данного исследования.

Метаанализ данных по протеомике ядра. Для белков, ранее идентифицированных масс-спектрометрическим методом в ядре клеток линии HL-60 под действием ATRA, получили информацию об аннотационном статусе, биологической функции, клеточной локализации, основных публикациях и об аннотации по категориям базы знаний GeneOntology (GO) из базы данных Uniprot (версия 2023_01).

Культивирование клеток линий HL-60, NB4, K562, HepG2, HEK293 и HeLa. Культуры клеток линий HL-60 и K562 были получены из криобанка «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Линия NB4 была закуплена в компании «CLS Cell Lines Service GmbH» (Германия). Культуры клеток линий HepG2, HEK293 и HeLa были взяты из криобанка НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (ИБМХ, Москва, Россия). Идентичность всех клеточных линий была подтверждена ДНК-профилем (анализ коротких тандемных повторов, STR).

После разморозки клетки 3 раза отмывали от DMSO в ростовой среде RPMI-1640

(«Gibco», США) с добавлением фетальной сыворотки крупного рогатого скота (ФБС) до конечной концентрации 10% (v/v) с помощью центрифугирования. Культуры культивировали в ростовой среде RPMI-1640 с добавлением ФБС до конечной концентрации 10% (v/v) в присутствии 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин (все реактивы – «Gibco») в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂, 80% влажности) в течение 7 суток. При достижении концентрации 1 млн кл./мл культуры рассеивали в соотношении 1 : 3. Подсчёт клеток осуществляли в камере Горяева.

Индукцированная гранулоцитарная дифференцировка клеток линии HL-60. Для дифференцировки клетки линии HL-60 помещали в 15 мл ростовой среды в концентрации 0,3 млн кл./мл и добавляли ATRA («Sigma-Aldrich», США) до конечной концентрации 10 мкМ.

Изучение динамики протеома в процессе индуцированной гранулоцитарной дифференцировки ранее проводилось по различным временным схемам: 0, 12 и 48 ч [14]; 0, 24, 48, 72 и 96 ч [15]; 0, 3, 24 и 96 ч [12]; 0, 3, 24, 48 и 96 ч [16]. Поверхностный маркер гранулоцитарной дифференцировки CD11b в разы увеличивает свою экспрессию уже к 24 ч после обработки ATRA [17], а к 72 ч клетки приобретают фенотип зрелых гранулоцитов (нейтрофилов). При этом изменения в протеоме, которые в том числе ответственны за экспрессию специфических белков нейтрофилов, могут происходить на начальных стадиях гранулоцитарной дифференцировки. Чтобы выявить ранние пертурбации протеома, мы взяли временные точки 0, 3, 6, 9 и 12 ч, а также точку 72 ч как ту, в которой клетки приобретают фенотип зрелых гранулоцитов под воздействием индуктора.

Для протеомного анализа ядерных фракций клетки осаждали с помощью центрифугирования и 2 раза промывали осадок фосфатно-солевым буфером (PBS) («Sigma-Aldrich»). В качестве контроля использовали интактные клетки линии HL-60. Для протеомного эксперимента клетки линии HL-60 были индуцированы ATRA в трёх биологических повторах. Эксперименты по дифференцировке были проведены в пределах 15–20 пассажей от вывода клеток из заморозки.

Культивирование интактных клеток линии HL-60 для введения изотопно-меченных аминокислот лизина и аргинина. Динамику синтеза и деградации белка SOWAND определяли с помощью пульсового мечення стабильными изотопами [18]. В основе лежит технология

стабильного изотопного мечення клеток аминокислотами в культуре (SILAC, Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture). При использовании данного подхода клетки культивируют в присутствии так называемых «тяжёлых» аминокислот, содержащих атомы стабильных изотопов ¹³C и ¹⁵N. В клетках «тяжёлые» аминокислоты используются при синтезе белка вместо нативных, или «лёгких». Масс-спектрометрический анализ позволяет оценить соотношение «лёгких» и «тяжёлых» пептидов в различные моменты времени культивирования. Данное соотношение используют для построения математической модели, описывающей кинетику деградации белка. Такой моделью является кинетическое уравнение реакции первого порядка [19, 20]. В данном исследовании пульсовое мечення SILAC комбинировали с направленным масс-спектрометрическим анализом в режиме мониторинга выбранных реакций (Selected Reaction Monitoring, SRM) вместо панорамной масс-спектрометрии. Такой подход позволяет проводить анализ низкокопийных белков, а также обеспечивает более точное определение времени полураспада белка [21]. Время полураспада белка SOWAND ($t_{1/2}$) вычисляли по уравнению аппроксимирующей функции для зависимости деградации белка SOWAND от времени с учётом времени удвоения клеток линии HL-60 (48 ч).

На основании аппроксимирующей функции зависимости деградации белка SOWAND от времени определяли общее время полураспада, не учитывая деление клеток, по следующей формуле:

$$t_{1/2\text{общ}} = e^{(L0-b)/a},$$

где $L0$ – $\frac{1}{2}$ от значения интенсивности дочернего иона (MS2, фрагмент y10+, –GGPSGP GSSR) пептида AEELGGPSGPGSSR во временной точке 0 ч, а и b – коэффициенты аппроксимирующей функции.

Время полураспада белка корректировали с учётом деления клеток: вычисляли общую константу деградации ($k_{\text{общ}}$) по формуле $k_{\text{общ}} = \ln 2 / t_{1/2\text{общ}}$ и константу деления с учётом времени удвоения ($t_{\text{удв}}$) клеток линии HL-60 (48 ч) по формуле $k_{\text{дел}} = \ln 2 / t_{\text{удв}}$, вычисляли время полураспада белка ($t_{1/2}$) по формуле $t_{1/2} = \ln 2 / (k_{\text{общ}} - k_{\text{дел}})$.

Время полураспада белкового продукта SOWAND ($t_{1/2}$) было рассчитано отдельно для каждого из трёх технических повторов с использованием аппроксимирующей функции для зависимости деградации белка SOWAND

от времени, с последующим вычислением среднего значения. Результаты приведены в таблице 1П Приложения 1 (лист «SRM SILAC»).

После выхода из заморозки клетки линии HL-60 культивировались в условиях, описанных выше. Затем интактные клетки линии HL-60 были помещены в среду культивирования из набора SILAC Protein Quantitation Kit (Trypsin) RPMI 1640 («Thermo Fisher Scientific», США), в которую были добавлены «тяжёлые» аминокислоты 13C6 15N2 L-лизин-2 HCl и 13C6 15N4 L-аргинин HCl («Thermo Fisher Scientific») в количестве, рекомендованном производителем, а также диализованная ФБС («Gibco») до конечной концентрации 10% (v/v). Начальная концентрация клеток в среде составляла 0,15 млн кл./мл. Далее клетки культивировали в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂, 80% влажности). Для протеомного анализа клетки отбирали через 0, 1, 6, 9, 24, 72 и 120 ч, после чего осаждали с помощью центрифугирования и 2 раза промывали PBS («Sigma-Aldrich», США).

Выделение общей РНК и полногеномное транскриптомное секвенирование линий HL-60, NB4, K562, HepG2, HEK293 и HeLa. Общую РНК выделяли при помощи фирменного набора RNeasy Mini Kit («QIAGEN», США) согласно рекомендациям производителя. Качество выделенной РНК определяли на приборе Agilent 2100 Bioanalyser («Agilent Technologies», США) с использованием чипов RNA 6000 Nano LabChip («Agilent Technologies»). Концентрацию общей РНК определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 260 нм на микроспектрофотометре ND-1000 («Thermo Fisher Scientific»). Секвенирование было выполнено на платформе NovaSeq 6000 Illumina с длиной прочтений 100 пар оснований в трёх технических повторах. Исходные данные РНК-секвенирования в процессе обработки претерпевают нормализацию на основании длины гена и глубины секвенирования. В результате экспрессия генов выражена в количестве транскриптов на миллион (TPM). Сумма TPM экспрессии для всех генов оказывается одинаковой для различных образцов, что предоставляет возможность сравнивать между собой экспрессионные данные [22]. Данные экспрессии генов семейства SOWAN приведены в таблице 1П Приложения 1 (лист «Транскриптомные данные»).

Пробоподготовка клеток линии HL-60 к протеомному профилированию ядерных фракций. Для выделения ядерной фракции мы использовали протокол с участием градиента сахарозы, применённый нами ранее [23]. К осадку кле-

ток (приблизительно 5 млн клеток) добавляли 200 мкл буфера, содержащего 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1 mM ЭДТА, 0,32 M сахарозу, а также коктейль ингибиторов протеаз (все реагенты — «Sigma Aldrich»), и 3–5 раз перемешивали пипетированием. Затем добавляли ещё 200 мкл вышеописанного буфера, содержащего, помимо прочих компонентов, 0,5%-ный (m/v) NP-40 («Pierce», США), 3–5 раз перемешивали и инкубировали 10 мин во льду. Полученную суспензию наслаивали на 800 мкл буфера, содержащего 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1 mM ЭДТА, 1,2 M сахарозу, а также коктейль ингибиторов протеаз, и затем центрифугировали в течение 20 мин со скоростью 16 000 g при температуре 4 °C. К осадку, представляющему собой ядерную фракцию, добавляли 100 мкл лизирующего буфера, содержащего 1%-ный (m/v) SDS и 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) (все реагенты — «Sigma-Aldrich»), после чего подвергали воздействию ультразвука с помощью дезинтегратора со шупом («Bandelin Sonopuls», Германия) с мощностью 50% в течение 2 мин во льду. Затем смесь центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 16 000 g при температуре 4 °C. Супернатант, содержащий белки ядерной фракции, отбирали и сохраняли для дальнейшего анализа. В полученных образцах определяли концентрацию общего белка колориметрическим методом с помощью коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit («Pierce») в соответствии с рекомендациями производителя. При выделении ядерной фракции с помощью центрифугирования целевые белки могут быть контаминированы белками других органелл, например, митохондрий. Аннотация нуклеома клеток линии HL-60, идентифицированного в ходе гранулоцитарной дифференцировки по категориям «Внутриклеточная локализация» базы данных «GeneOntology», показала контаминацию белками митохондрий на уровне 11,5%.

Гидролитическое расщепление белков. Гидролитическое расщепление белков осуществляли согласно протоколу FASP (Filter-Aided Sample Preparation) [24] с некоторыми изменениями. Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей цистеина к образцам лизата клеток, содержащим 100 мкг общего белка, добавляли трис(2-карбоксиэтил)фосфин(ТСЕР) и 2-хлорацетамид (CAA) («Sigma-Aldrich») до конечных концентраций 20 mM и 32 mM соответственно. Затем пробы инкубировали при температуре 80 °C в течение 40 мин, после чего образцы наносили на кон-

центрирующие фильтры с отсечением 30 кДа и 3 раза промывали буфером, содержащим 8 М мочевины в 0,1 М Tris-HCl (pH 8,5), путём центрифугирования при скорости 11 000 g в течение 15 мин при температуре 20 °С. Затем образцы 3 раза промывали буфером, содержащим 0,1 М Tris-HCl (pH 8,5), и 2 раза — буфером для трипсинолиза (50 мМ ТЭАБ, pH 8,5), путём центрифугирования при скорости 11 000 g в течение 15 мин и температуре 20 °С. Затем к каждому образцу добавляли 50 мкл 50 мМ ТЭАБ (pH 8,5), а также раствор трипсина («Promega», США) с концентрацией 0,5 мкг/мкл в соотношении массы трипсина к массе общего белка 1 : 50, после чего пробу инкубировали в течение ночи при температуре 37 °С. По окончании инкубации пептиды элюировали путём центрифугирования при скорости 11 000 g в течение 15 мин при температуре 20 °С и промывали фильтр 100 мкл 5%-ной (v/v) муравьиной кислоты. Общее содержание пептидов определяли с помощью набора Pierce Quantitative Peptide Assays («Pierce») в соответствии с рекомендациями производителя. Половину от общего количества пептидов замораживали и хранили на –80 °С, затем данную аликвоту использовали для SRM-измерений, проведённых в данной работе. Другая половина была использована в экспериментах с TMT-метками, описанных ранее [13].

Панорамный и направленный масс-спектрометрический анализ в режиме SRM с использованием меченных стабильными изотопами пептидных стандартов (SIS). Панорамный масс-спектрометрический анализ был выполнен, как описано ранее [13]. Масс-спектрометрические данные анализировали с помощью программного обеспечения MaxQuant 2.0.3.0 со встроенным поисковым алгоритмом Andromeda. Идентификацию проводили относительно FASTA-файла, содержащего аминокислотные последовательности белков человека (2022/02) и его инвертированного аналога для вычисления частоты ложноположительных identifications (FDR). Для белков и пептидов пороговое значение FDR = 0,01.

Количественный анализ осуществляли на основании интенсивности репортерных ионов, образующихся при фрагментации изобарных TMT-меток, с помощью встроенного в MaxQuant алгоритма. Применяли нормализацию по взвешенной медиане с использованием каналов для всех TMT_i (i = 10) репортерных ионов в качестве референсных. Применяли функцию сопоставления пептидных ионов между ЖХ-МС/МС-экспериментами (Matching between runs, MBR). Дополнительно осуществ-

ляли нормализацию по суммарному сигналу всех белков в каждом TMT_i-канале. Данные панорамного анализа доступны через репозиторий PRIDE (идентификатор PXD035281) и репозиторий MassIVE (идентификатор MSV000092670).

С помощью направленной масс-спектрометрии в режиме SRM с использованием SIS-пептидов (SRM/SIS) было измерено содержание протеотипических пептидов AAPAGWLSEER и AEELGGPSGPGSSR, картируемых на белок SOWAHD. Критериями выбора пептидов для синтеза стандартов были: длина 9–20 аминокислотных остатков; отсутствие в последовательности цистеина (C), метионина (M), N-концевых глутаминовой кислоты (E) и глутамина (Q), а также пропущенных сайтов гидролиза; уникальность была проверена с помощью ресурса Peptide unicity checker — neXtProt. Выбранные для таргетного анализа пептиды также представлены в учётной записи Nextprot (в разделе https://www.nextprot.org/entry/NX_A6NJG2/peptides). Твердофазный пептидный синтез SIS-стандартов осуществляли на автоматическом пептидном синтезаторе Overture («Protein Technologies», Великобритания). При синтезе изотопно-меченных пептидов вместо обычного лизина или аргинина использовали изотопно-меченные аминокислоты Fmoc-Lys-OH-¹³C₆,¹⁵N₂ или Fmoc-Arg-OH-¹³C₆,¹⁵N₂ («Cambridge Isotope Laboratories», США).

Направленный масс-спектрометрический анализ в режиме SRM проводили по следующему протоколу. Каждый экспериментальный образец анализировали в трёх технических повторах. Анализ SRM проводили для тех же образцов, которые использовались в панорамном масс-спектрометрическом эксперименте. Хроматографическое разделение осуществлялось с помощью системы Agilent 1200 series («Agilent Technologies»), соединённой с тройным квадрупольным масс-анализатором TSQ Quantiva («Thermo Fisher Scientific»). Образец объёмом 3,5 мкл, содержащий 15 мкг нативных пептидов и стандарты SIS, разделяли с использованием аналитической колонки ZORBAX SB-C18 (150 × 0,5 мм, диаметр частиц 5 мкм, «Agilent Technologies») в градиенте ацетонитрила со скоростью потока 20 мкл/мин. В начале колонку уравнивали 5%-ным (v/v) раствором В (80%-ный (v/v) ацетонитрил в 0,1%-ной (v/v) муравьиной кислоте) и 95%-ным (v/v) раствором А (0,1%-ная (v/v) муравьиная кислота) в течение 5 мин, затем концентрацию раствора В линейно увеличивали до 60% (v/v) за 30 мин, после чего

концентрацию раствора В увеличивали до 99% (v/v) за 1 мин и в течение 5 мин промывали колонку 99%-ным (v/v) раствором В, затем в течение 1 мин концентрация возвращалась к начальным условиям, в которых колонка уравнивалась в течение 9 мин. Масс-спектрометрический анализ осуществляли в режиме динамического мониторинга выбранных реакций (dSRM), используя следующие настройки МС-детектора: напряжение на капилляре составляло 4000 В, скорость осушающего газа (азот) составляла 7 л/мин, скорость аксиального газа (азот) составляла 5 л/мин, температура капилляра — 350 °С, окно изоляции для первого и третьего квадруполь — 0,7 Да, время цикла сканирования — 1,2 с, давление газа (аргон) в ячейке соударения — 1,5 мТорр. Окно времени удерживания на колонке обращённой фазы составило 3 мин для каждого прекурсорного иона. Для количественной оценки в ПО Skyline (версия 4.1.0) использовались все транзиции, сигнал от которых регистрировался. Для каждой пробы содержание белка определялось как содержание соответствующего ему уникального протеотипического пептида, измеренного в трёх биологических повторах. Калибровочные кри-

вые для стандартных пептидов (STD/SIS) AEELGGPSGPGSSR и AAPAGWLSEER, картируемых на белок SOWAHD, приведены на рис. 1П Приложения 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Метаанализ нуклеома клеток линии HL-60.

На рис. 2 показаны результаты метаанализа для белков, ранее идентифицированных масс-спектрометрическим методом в ядре клеток линии HL-60 (1860 белков) (нуклеом). Используя базу знаний Uniprot (версия 2023_01), протеомные данные фильтровали на основании аннотационного балла Uniprot < 5 (117 белков), затем на каждой последующей стадии оставляли белки с неизвестной биологической функцией (53 белка), с неизвестной клеточной локализацией (26 белков), белки, для которых в Uniprot не представлено релевантных публикаций, и, наконец, белки, для которых отсутствовала аннотация GO (2 белка).

По результатам фильтрации удалось выявить 2 белка, удовлетворяющих всем условиям: ANKRD58 (ankyrin repeat domain 58), кодируемый геном *SOWAHD*, и неохарактери-

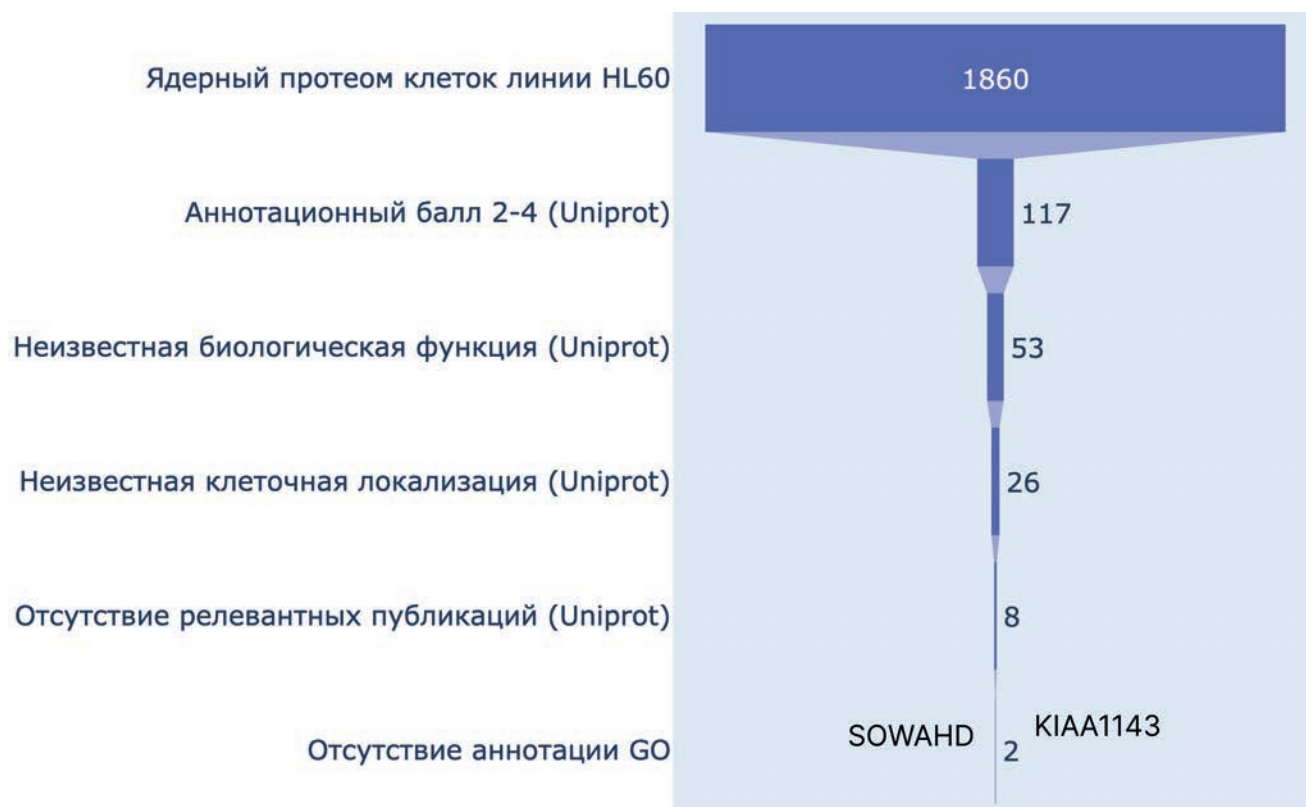


Рис. 2. Схема фильтрации масс-спектрометрических данных, полученных для ядерного протеома клеток линии HL-60 (1860 белков), на основании аннотационного статуса, биологической функции, клеточной локализации, информации об основных публикациях и аннотации по категориям базы знаний GO

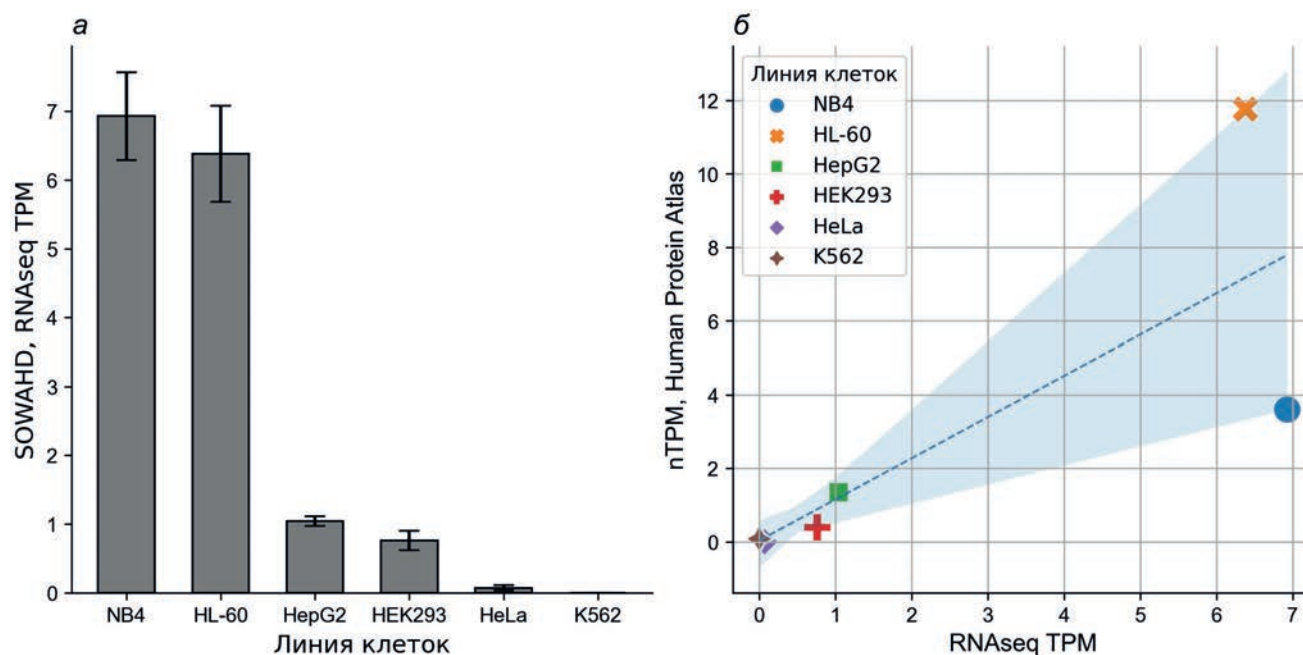


Рис. 3. Результаты транскриптного анализа. *а* – Уровень экспрессии мРНК *SOWAHD*, измеренный с помощью полногеномного РНК-секвенирования (RNAseq) в клетках линий NB4, HL-60, HepG2, HEK293, HeLa и K562. По оси у отложено количество транскриптов на миллион, TPM (transcripts per million). *б* – Корреляция наших экспериментальных данных и материалов базы знаний Protein Atlas (версия 22.0) для уровня экспрессии мРНК *SOWAHD* в клетках линий NB4, HL-60, HepG2, HEK293, HeLa и K562. По оси у отложено нормализованное количество транскриптов на миллион, nTPM, материалы ProteinAtlas (версия 22.0); по оси *х* – количество TPM, определённое в нашем эксперименте

зованный белок KIAA1143 (ген *KIAA1143*, код Uniprot Q96AT1). Для белка *SOWAHD* в базе данных Uniprot экспрессия указана только на уровне мРНК (PE2). В то же время для гена *KIAA1143* экспрессия на белковом уровне подтверждена во всех основных протеомных базах данных (PE1). В структуре белка *SOWAHD* имеются анкириновые повторы, за счёт которых осуществляются белок-белковые взаимодействия, что может указывать на регуляторную роль *SOWAHD*. Дальнейшие исследования проводили для данного белка.

Экспрессия транскрипта *SOWAHD* в линиях клеток гемопоэтического и эпителиального происхождения. Для оценки экспрессии мРНК *SOWAHD* мы использовали экспериментальные данные полногеномного РНК-секвенирования (RNAseq), полученные для гемопоэтических клеток линий HL-60, NB4 и K562, а также линий клеток эпителиального происхождения HeLa, HepG2 и HEK293. Кроме того, сравнивали результаты нашего транскриптного эксперимента с данными базы знаний ProteinAtlas (версия 22.0). Результаты показаны на рис. 3.

Как видно из рис. 3, *а*, наибольшую экспрессию мРНК *SOWAHD* на уровне $6,9 \pm 0,6$ и $6,4 \pm 0,7$ TPM наблюдали в клетках острого миелоидного лейкоза линий NB4 и HL-60 со-

ответственно. В клетках хронического миелоидного лейкоза линии K562 экспрессия мРНК *SOWAHD* оказалась ниже порога детекции. Умеренная экспрессия мРНК *SOWAHD* на уровне $1,1 \pm 0,1$ и $0,8 \pm 0,1$ TPM была зарегистрирована в клетках эпителиального происхождения линий HepG2 (ткань печени) и HEK293 (эмбриональные почки). Экспрессию мРНК *SOWAHD* на уровне $0,07 \pm 0,03$ TPM наблюдали в клетках эпителиального происхождения линии HeLa (ткань шейки матки).

Рисунок 3, *б* показывает корреляцию ($R^2 = 0,63$) наших экспериментальных результатов с данными базы знаний Human Protein Atlas (версия 22.0) для экспрессии мРНК *SOWAHD* в линиях клеток NB4, HL-60, HepG2, HEK293, HeLa и K562.

Согласно транскриптным данным, можно предположить, что мРНК *SOWAHD* экспрессируется преимущественно в клетках миелоидного происхождения. Экспрессия наблюдается в клетках острого миелоидного лейкоза, но отсутствует в клетках хронического миелоидного лейкоза. Однако с учётом ограничений для количественной оценки экспрессии транскриптов на основании величин TPM [25], а также известных на сегодняшний день фактов вариативности омиксных данных даже в пределах одной клеточной линии [26],

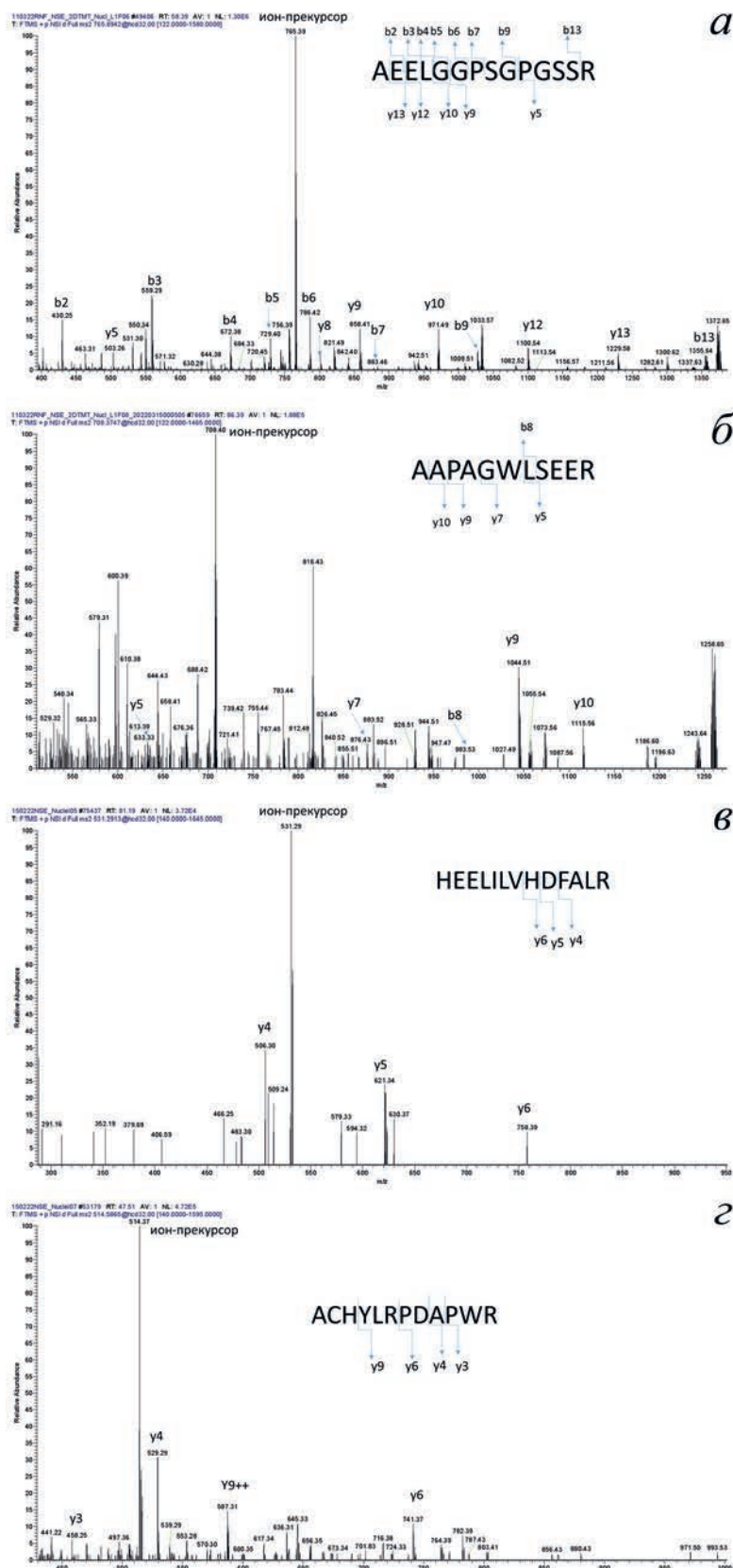


Рис. 4. MS2-спектры высокого разрешения, полученные для уникальных пептидов AEELGGPSGPGSSR (а), AAPAGWLSEER (б), HEELILVHDFALR (в) и ACHYLRPDAPWR (г), картируемых на белок SOWAHD. Спектры были визуализированы в программном обеспечении Thermo Xcalibur Qual Browser (Thermo Xcalibur 3.0.63), экспортированы в виде рисунка, после чего у- и b-фрагментарные ионы были аннотированы в ручном режиме. Пептиды были идентифицированы в автоматическом режиме в ПО MaxQuant. Номер MS2-спектра высокого разрешения с наилучшим качеством и соответствующий исходный файл с данными были указаны в файле «evidence.txt» выдачи MaxQuant

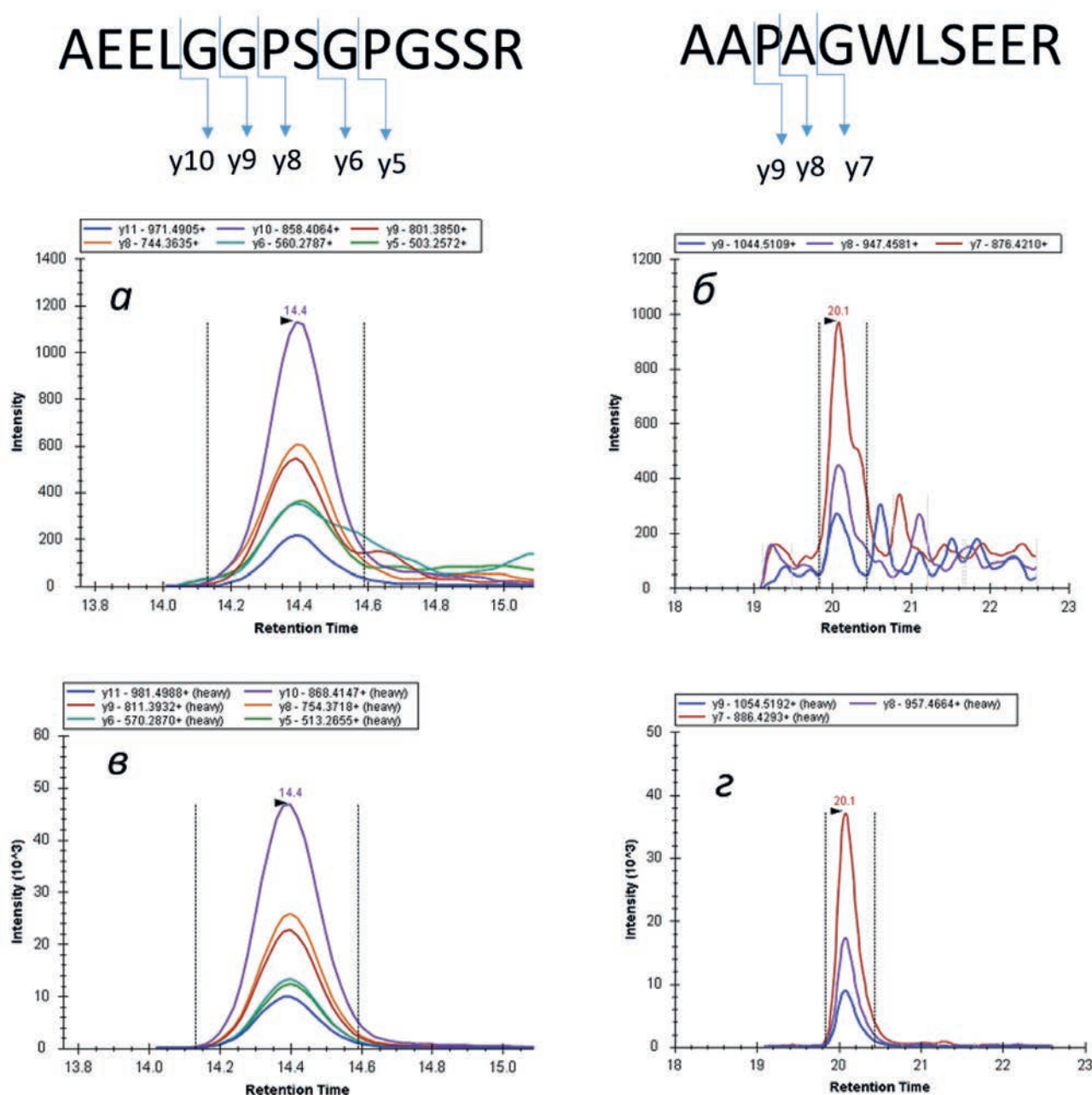


Рис. 5. Результат направленного масс-спектрометрического анализа в режиме SRM с использованием SIS AEELGGPSGPGSSR и AAPAGWLSEER. Приведены хроматограммы экстрагированного ионного тока для фрагментарных ионов нативных пептидов (а и б) и их синтетических аналогов (в и г)

тканеспецифичность экспрессии *SOWAHD* требует дальнейшей валидации с помощью ортогональных методов.

В данной работе фокус был направлен на исследование белкового продукта гена *SOWAHD*, а транскриптомные данные выступали как дополнительное доказательство экспрессии гена.

Динамическая экспрессия белка *SOWAHD* в ядрах клеток линии HL-60 в ходе ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки. По результатам масс-спектрометри-

ческого анализа высокого разрешения ядер клеток линии HL-60 под действием ATRA белок *SOWAHD* был идентифицирован по 4-м уникальным пептидам (ACHYLRPDAPWR, HEELILVHDFALR, AAPAGWLSEER и AEELGGPSGPGSSR). Спектры высокого разрешения показаны на рис. 4.

Рис. 4 показывает, что масс-спектрометрический анализ высокого разрешения позволил идентифицировать уникальные пептиды (FDR < 0,01), соответствующие 15,6% аминокислотной последовательности белка *SOWAHD*.

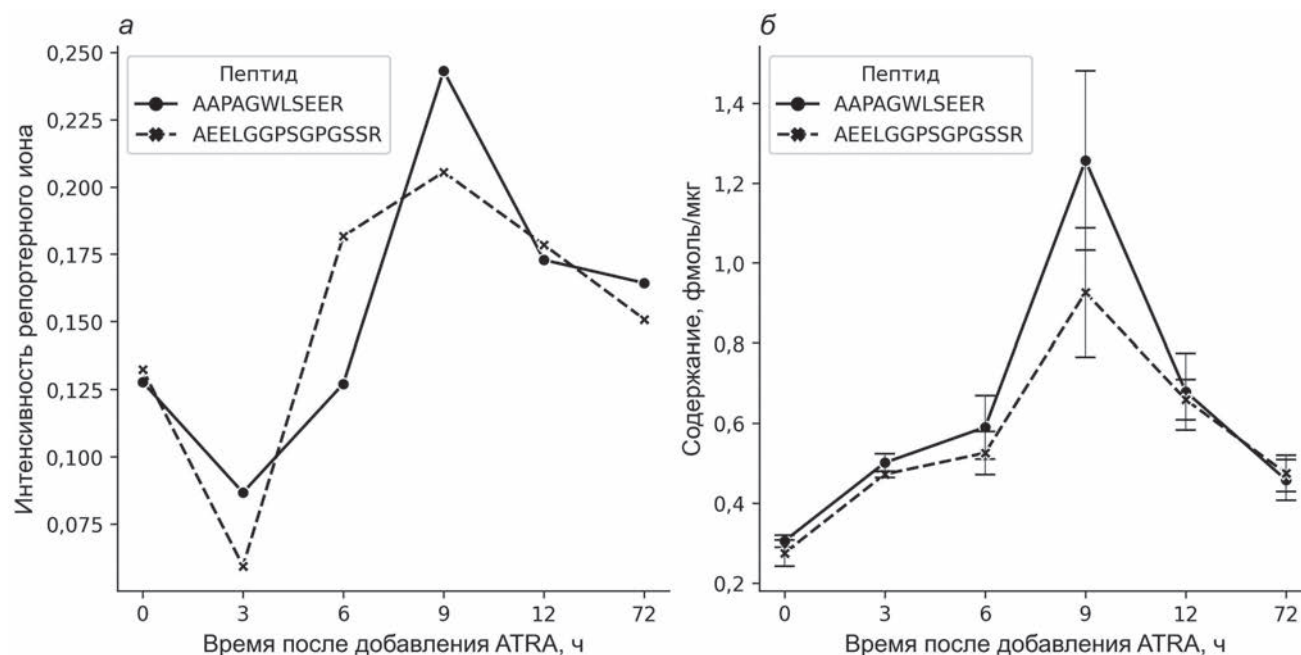


Рис. 6. Динамика экспрессии белка SOWAND в ядерной фракции клеток линии HL-60 через 0, 3, 6, 9, 12 и 24 ч после добавления ATRA, индуцирующей гранулоцитарную дифференцировку. *а* — Результаты относительного количественного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения с использованием TMT-меток, по оси *x* отложены временные точки после добавления ATRA, по оси *y* показана интенсивность репортерного TMT-иона. Интенсивность репортерного TMT-иона (MS2-спектр, спектр ионов-фрагментов) для пептидов AAPAGWLSEER и AEELGGPSGPGSSR была рассчитана в одном техническом повторе. *б* — Результаты количественного направленного масс-спектрометрического анализа с использованием изотопно-меченных пептидных стандартов (SRM/SIS), по оси *x* отложены временные точки после добавления ATRA, по оси *y* показано содержание протеотипических пептидов белка SOWAND в фмоль/мкг общего белка. Данные получены для уникальных протеотипических пептидов AAPAGWLSEER и AEELGGPSGPGSSR. SRM/SIS-измерения были осуществлены в 3-х технических повторах в образцах ядер клеток HL60, индуцированных к дифференцировке ATRA в 3-х биологических повторах; всего на каждую временную точку приходится 9 LC/SRM-измерений

Для подтверждения идентификации белка SOWAND были синтезированы SIS с последовательностями AAPAGWLSEER и AEELGGPSGPGSSR. Изотопно-меченные и соответствующие нативные пептиды были зарегистрированы методом направленного масс-спектрометрического анализа в режиме мониторинга выбранных реакций в клетках линии HL-60 (рис. 5).

Рис. 5, *б* показывает более высокий уровень шума для сигнала от пептида AAPAGWLSEER по сравнению с пептидом AEELGGPSGPGSSR. Низкая концентрация целевого белка, а также тот факт, что в этой области градиента может элюировать больше интерферирующих пептидов, может объяснять высокий уровень шума. С другой стороны, время элюирования и паттерн фрагментации полностью совпадают для нативного пептида и его синтетического аналога, за счёт чего мы считаем его измерение достоверным. Кроме того, профили экспрессии, а также абсолютное содержание в различные временные точки после добавления ATRA сходны для двух целевых пептидов, картируемых на белок SOWAND.

Уникальные пептиды AAPAGWLSEER и AEELGGPSGPGSSR позволили осуществить количественный анализ белка SOWAND с использованием TMT-меток (рис. 6, *а*), а также с использованием направленного масс-спектрометрического метода SRM/SIS (рис. 6, *б*) в ядерной фракции клеток линии HL-60 через 3, 6, 9, 12 и 72 ч после добавления ATRA.

Масс-спектрометрический анализ высокого разрешения с TMT-метками показал увеличение содержания белка SOWAND в ядерной фракции в 1,9 раз через 9 ч после добавления ATRA в среду культивирования клеток. По результатам SRM/SIS-анализа содержание белка SOWAND было определено на уровне $0,3 \pm 0,06$, $0,5 \pm 0,06$, $0,59 \pm 0,2$, $1,25 \pm 0,63$, $0,67 \pm 0,28$ и $0,45 \pm 0,15$ фмоль/мкг по пептиду AAPAGWLSEER, а также на уровне $0,27 \pm 0,07$, $0,47 \pm 0,02$, $0,52 \pm 0,16$, $0,92 \pm 0,45$, $0,63 \pm 0,17$ и $0,47 \pm 0,13$ фмоль/мкг по пептиду AEELGGPSGPGSSR через 0, 3, 6, 9, 12 и 72 ч после добавления ATRA соответственно. Содержание белка SOWAND в ядерной фракции значимо (p -value < 0,01) увеличивалось в 1,6, 1,9, 3,7, 2,3 и 1,5 раза через 3, 6, 9, 12 и 72 ч

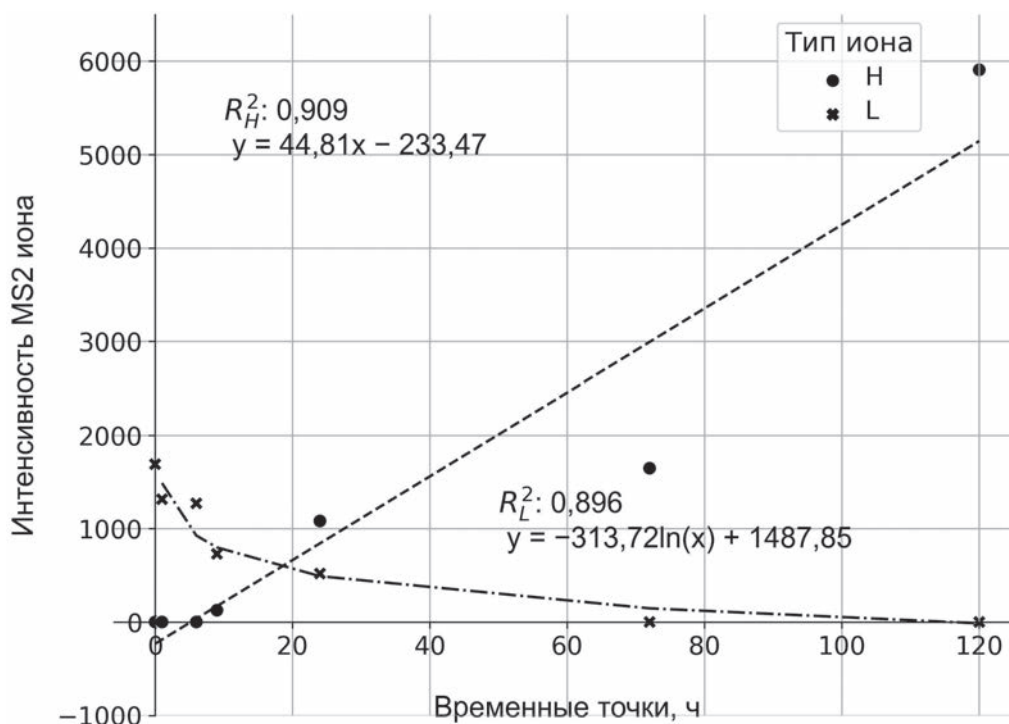


Рис. 7. Динамика синтеза и деградации белкового продукта гена *SOWAHD*, определённая с использованием пульсового SILAC-мечения в комбинации с направленным масс-спектрометрическим анализом SRM. Графики зависимости площади под пиком от времени культивирования в среде SILAC для «лёгкой» (L) и «тяжёлой» (H) формы пептида *SOWAHD*. По оси *x* отложены временные точки (0, 1, 6, 9, 24, 72 и 120 ч), по оси *y* — площадь под пиком для наиболее интенсивного дочернего иона (MS2, фрагмент y_{10}^{+} , -GGPSGPGSSR) «лёгкой» (L) и «тяжёлой» (H) формы пептида *SOWAHD* (AEELGGPSGPGSSR). Графики аппроксимирующих функций показаны штриховой (---) линией (линейная зависимость) и штрихпунктирной (-.) линией (логарифмическая зависимость) для «тяжёлой» (H) и «лёгкой» (L) формы пептида *SOWAHD* соответственно. Представлены результаты для первого технического повтора, для второго и третьего технического повтора графики приведены на рис. 2–3 П Приложения 2

после добавления индуктора гранулоцитарной дифференцировки соответственно. Рис. 6 показывает, что профили экспрессии, полученные для пептидов AAPAGWLSEER и AEELGGPSGPGSSR, оказались похожими между собой.

В силу низкого содержания белка *SOWAHD*, а также вероятностного характера фрагментации в ходе панорамного масс-спектрометрического анализа спектры фрагментации (MS2) в качестве, достаточном для вычисления интенсивности репортерных TMT-ионов, были получены только в одном техническом повторе для пептидов AAPAGWLSEER и AEELGGPSGPGSSR. Тем не менее наблюдалась сходимость результатов, полученных с помощью различных методов количественной оценки — масс-спектрометрии высокого разрешения с TMT-метками и направленной масс-спектрометрии в режиме SRM.

Динамика синтеза и деградации белкового продукта *SOWAHD*. Время полураспада белкового продукта *SOWAHD*. Для определения динамики синтеза и деградации белкового продукта *SOWAHD* применили комбинацию пульсового

SILAC-мечения и направленного масс-спектрометрического анализа SRM. Принцип пульсового мечения SILAC описан в разделе «Материалы и методы». Динамику встраивания ^{13}C -меченного лизина или аргинина из среды культивирования в белок *SOWAHD* определяли по результатам SRM-измерений «лёгкой» (L) и «тяжёлой» (H) формы пептида *SOWAHD* (AEELGGPSGPGSSR), как показано на рис. 7.

Как показывает рис. 7, направленный масс-спектрометрический анализ позволил определить аппроксимирующие функции, описывающие динамику синтеза и деградации *SOWAHD*, на основании площади под пиком для наиболее интенсивного дочернего иона пептида AEELGGPSGPGSSR (MS2, фрагмент y_{10}^{+} , -GGPSGPGSSR). Измерения осуществлялись для пептида AEELGGPSGPGSSR, поскольку для него было зарегистрировано больше фрагментов, как по данным масс-спектрометрии высокого разрешения (рис. 4, а), так и по результатам направленного анализа (рис. 5). Время полураспада белкового продукта *SOWAHD* ($t_{1/2}$) было рассчитано в трёх технических повторах и составило 19 ± 7 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ген *SOWAHD* относится к семейству *SOWAH*, в которое входят ещё 3 гена: *SOWAHA*, *SOWAHB* и *SOWAHC*. Согласно нашим панорамным протеомным данным, только продукт гена *SOWAHD* был зарегистрирован на уровне белка в клетках линии HL-60. В то же время наши экспериментальные транскриптомные данные показали, что в линиях эпителиального происхождения (HeLa, HepG2 и HEK293) наибольшая экспрессия мРНК, на порядок превышающая таковую для остальных генов семейства, наблюдалась для гена *SOWAHC*, в то время как в миелоидных линиях (HL-60 и NB4) превалировала экспрессия *SOWAHD* на фоне пониженной экспрессии других генов семейства.

Данные об экспрессии белкового продукта *SOWAHD* отличаются в основных протеомных базах знаний Uniprot, NextProt и Human Protein Atlas. Так, в базе знаний Uniprot указана информация об экспрессии продукта гена *SOWAHD* на уровне транскрипта (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A6NJG2/entry>) (PE2). В базе знаний Human Protein Atlas, опирающейся на анализ белковых продуктов с помощью моноклональных антител, указано, что экспрессия гена *SOWAHD* на уровне белка подтверждена (PE1), но внутриклеточная локализация неизвестна, а информация об уровне экспрессии продукта этого гена приведена только на уровне мРНК (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000187808-SOWAHD>). Наконец, база знаний NextProt, компилирующая масс-спектрометрические данные, категоризирует продукт гена *SOWAHD* как экспрессирующийся на уровне белка (PE1), однако информация о его внутриклеточной локализации, биологической функции и медицинской значимости отсутствует.

По материалам базы данных NextProt, в семействе *SOWAH* наиболее исследованным является белок *SOWAHC*, для которого была установлена цитозольная локализация, а также функциональная вовлечённость в сигнальный путь цикла RHOV GTPазы. Для всех генов семейства, кроме *SOWAHD*, также приведены значимые мутации, которые могут определять медицинскую значимость. В контексте онкологических заболеваний было показано, что гипометилирование гена *SOWAHC* ассоциировано с неблагоприятным прогнозом для пациентов с раком лёгких [27]. Высокая экспрессия гена *SOWAHB* на уровне мРНК является благоприятным прогностическим фактором для пациентов с почечной светло-

клеточной карциномой [28]. Экспрессия гена *SOWAHA* представляет собой благоприятный прогностический фактор в случае рака поджелудочной железы [29]. Исследования были выполнены на основе биоинформатического метаанализа данных, полученных из ресурса The Cancer Genome Atlas, и только в случае с геном *SOWAHA* была проведена валидация результатов с помощью транскриптомного анализа.

Как показали наши протеомные данные, экспрессия белка *SOWAHD*, измеренная в ядре клеток HL-60, увеличивалась в процессе ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки, что позволяет предположить ядерную локализацию белка и его значимость для созревания нейтрофилов. Пик увеличения экспрессии белка приходился на 9 ч после добавления индуктора с последующим снижением в более поздние временные точки, что может указывать на функциональную значимость белка *SOWAHD* для ранних стадий индуцированной гранулоцитарной дифференцировки.

Ранее с помощью направленной масс-спектрометрии в ядрах клеток линии HL-60 были зарегистрированы транскрипционные факторы (ТФ) HIC1, STAT1 и RBPJ на уровне ~0,5–1 фмоль/мкг общего белка [13]. Количество белка *SOWAHD*, измеренное в ядерной фракции в данной работе, схоже с содержанием вышеупомянутых ТФ.

В данной работе, исследуя динамику белка *SOWAHD* в процессе ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки, выявили дугообразный профиль экспрессии с увеличением содержания в ранние временные точки и возвращением уровня экспрессии к базовой линии через 72 ч после обработки ATRA. На основании данных направленной масс-спектрометрии похожий профиль был получен для белков, вовлечённых в регуляцию апоптоза и репарации ДНК (STAT1, CASP3, PARP1, PRKDC и UBE2I) [13]. Анализ данных панорамной масс-спектрометрии, полученных нами ранее [13], также выявил «дугообразный» профиль экспрессии для белков, вовлечённых в альтернативный сплайсинг и репликацию ДНК (рис. 8). Кроме того, данные белки, согласно анализу относительно базы данных TRRUST, могут регулироваться транскрипционными факторами MYCN и SF1 (рис. 8).

Скорость полураспада белка *SOWAHD* (~19 ч) сходна с таковой для сигнальных и регуляторных белков [34]. Нужно отметить, что в данном исследовании пульсовое мечение SILAC применяли совместно с направленным масс-спектрометрическим анализом в режиме

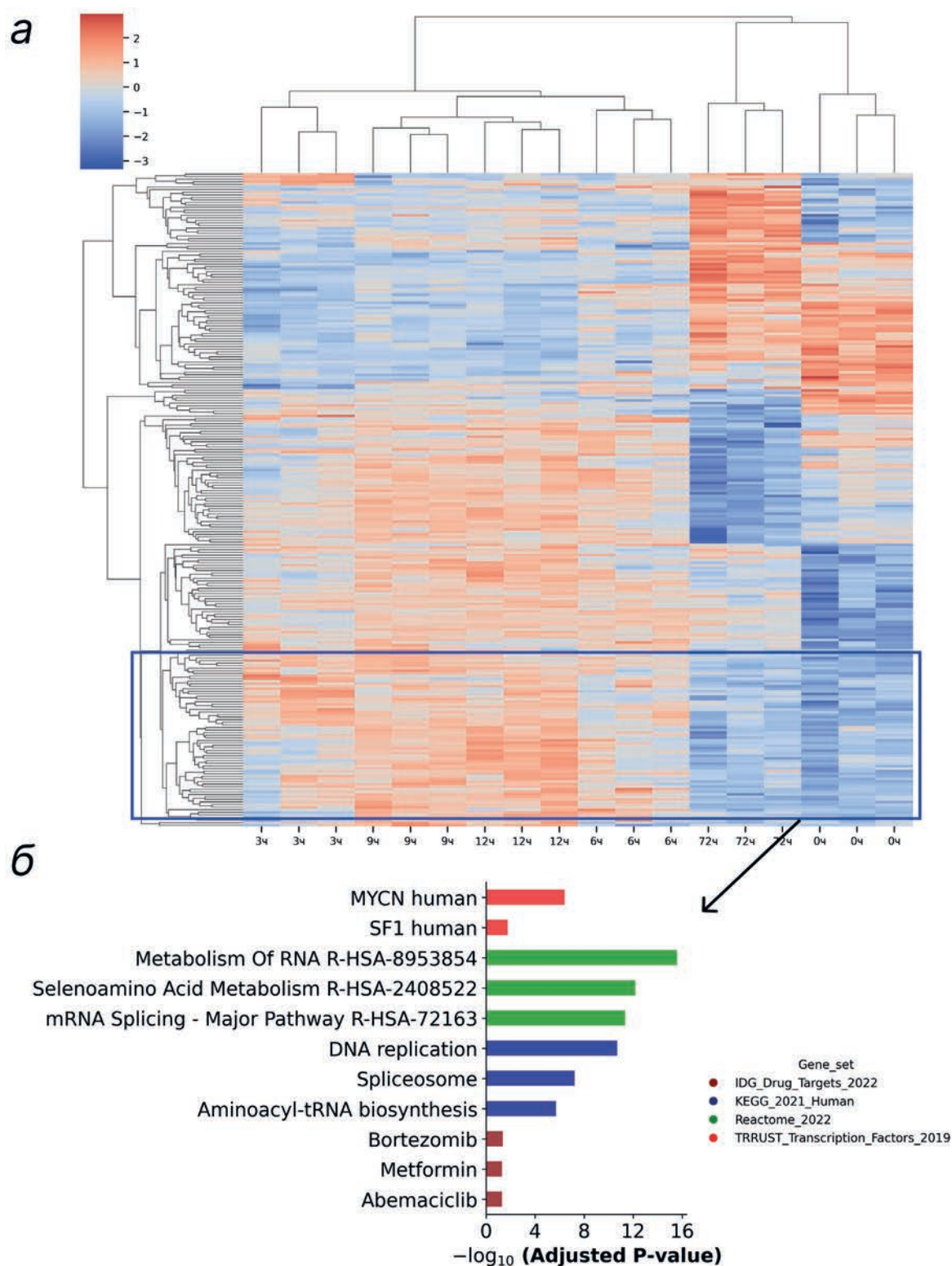


Рис. 8. Результаты анализа данных панорамной масс-спектрометрии. *a* — «Тепловая» карта, демонстрирующая профиль экспрессии 254 белков, содержание которых в ядерной фракции клеток линии HL-60 значимо ($S_0 = 0,1$, $FDR = 0,01$) изменялось в процессе ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки. Для анализа были использованы масс-спектрометрические данные, полученные ранее [13]. Для оценки дифференциальной экспрессии применили дисперсионный анализ ANOVA с поправкой на множественность сравнений с помощью пермутационного теста. *б* — Для кластера, компоненты которого демонстрировали сходную с SOWAHD экспрессию (выделен синим), выполнена аннотация относительно сигнальных путей (Reactome [30] и KEGG [31]), наличия потенциальной транскрипционной регуляции (TRRUST [32]), возможной чувствительности к фармакологическим препаратам (IDG [33]). Можно предположить, что белок SOWAHD может быть вовлечён в один или несколько из вышеупомянутых биологических процессов, однако эта гипотеза нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке

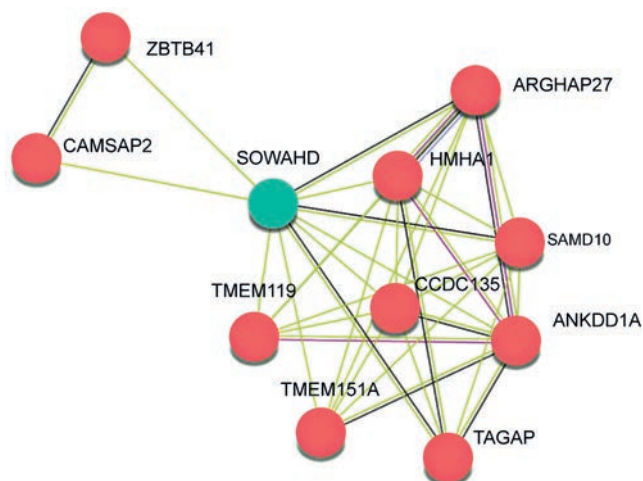


Рис. 9. Схема белок-белковых взаимодействий, вовлеченных в васкуляризацию и гемопоэз у рыб вида *Danio rerio* (по материалам базы данных STRING [36]), включающая белок-ортолог SOWAND

SRM. Панорамный анализ, обычно применяемый в пульсовом мечении SILAC, не всегда позволяет вычислить величину площади под пиком для прекурсорных ионов, что приводит к наличию пропущенных значений (missing value) в количественных SILAC-данных. Особенно остро эта проблема стоит для низкокопийных белков. Использование направленной масс-спектрометрии позволяет улучшить точность и чувствительность определения скорости полураспада [21].

Существуют гипотезы о выполняемой функции для ортологов гена *SOWAND* у других видов позвоночных. В экспериментах на рыбах вида *Danio rerio* было показано, что ортолог гена *SOWAND* (*ankrd58*) вовлечен в процесс васкуляризации и гемопоэз [35] (рис. 9).

С учётом экспрессии мРНК и белка SOWAND в миелоидных клетках он может также быть задействован в гемопоэзе у человека.

На основании сходства белковой последовательности можно заключить, что в структуре белка SOWAND должны присутствовать анкириновые повторы (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A6NJG2/entry>). Анкириновые повторы являются наиболее распространёнными мотивами, вовлечёнными в белок-белковые взаимодействия. Белки, содержащие анкириновые повторы, такие как опухолевый супрессор p16, рецептор Nank сигнального пути Notch, ингибитор IκBα ядерного фактора каппа В и т. д., вовлечены в регуляцию клеточного цикла, активацию транскрипции, апоптоза и пролиферации у различных биологических видов, в том числе и у человека [37, 38].

Настоящее исследование было посвящено всестороннему протеомному анализу бел-

ка SOWAND, при этом белковый продукт гена *KIAA1143* также может быть потенциальным регулятором гранулоцитарной дифференцировки. В будущем планируется провести протеомный анализ белка KIAA1143 для углублённого представления о процессах индуцированного созревания лейкозных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные протеомного анализа указывают, что SOWAND вовлечён в процесс ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки. Планируемые эксперименты по нокдауну SOWAND будут призваны проверить эту теорию. В протеомной базе данных NextProt хранится информация об экспрессии белка SOWAND, собранная на основании множества экспериментов, однако систематическое исследование экспрессии продукта белок-кодирующего гена SOWAND на уровне мРНК и белка на одном и том же материале проводилось впервые. Также уникальными являются данные по времени полураспада ($t_{1/2}$) белкового продукта SOWAND. Для определения величины $t_{1/2}$ был применён направленный масс-спектрометрический метод, который позволяет анализировать белки с низким содержанием.

Вклад авторов. С.Е. Новикова, А.Л. Русанов, В.Г. Згода — концепция и руководство работой; С.Е. Новикова, Т.В. Толстова, Н.А. Соловьева, Т.Е. Фарафонова, О.В. Тихонова, Л.К. Курбатов — проведение экспериментов; С.Е. Новикова, О.В. Тихонова, Л.К. Курбатов, А.Л. Русанов, В.Г. Згода — обсуждение результатов исследования; С.Е. Новикова — написание текста; В.Г. Згода — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20122).

Благодарности. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Протеом человека» в ИБМХ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Consortium UniProt (2023) UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Res.*, **51**, D523-D531, doi: 10.1093/nar/gkac1052.
2. Lane, L., Argoud-Puy, G., Britan, A., Cusin, I., Duek, P. D., Evalet, O., Gateau, A., Gaudet, P., Gleizes, A., Masselot, A., et al. (2012) NeXtProt: a knowledge platform for human proteins, *Nucleic Acids Res.*, **40**, D76-83, doi: 10.1093/nar/gkr1179.
3. Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., et al. (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome, *Science*, **347**, 1260419, doi: 10.1126/science.1260419.
4. Kim, M. S., Pinto, S. M., Getnet, D., Nirujogi, R. S., Manda, S. S., Chaerkady, R., Madugundu, A. K., Kelkar, D. S., Isserlin, R., Jain, S., et al. (2014) A draft map of the human proteome, *Nature*, **509**, 575-581, doi: 10.1038/nature13302.
5. Adhikari, S., Nice, E. C., Deutsch, E. W., Lane, L., Omenn, G. S., Pennington, S. R., Paik, Y. K., Overall, C. M., Corrales, F. J., Cristea, I. M., et al. (2020) A high-stringency blueprint of the human proteome, *Nat. Commun.*, **11**, 5301, doi: 10.1038/s41467-020-19045-9.
6. Salzberg, S. L. (2018) Open questions: how many genes do we have? *BMC Biol.*, **16**, 94, doi: 10.1186/s12915-018-0564-x.
7. Kopylov, A. T., Ponomarenko, E. A., Ilgisonis, E. V., Pyatnitskiy, M. A., Lisitsa, A. V., Poverennaya, E. V., Kiseleva, O. I., Farafonova, T. E., Tikhonova, O. V., Zavialova, M. G., et al. (2019) 200+ protein concentrations in healthy human blood plasma: targeted quantitative SRM SIS screening of chromosomes 18, 13, Y, and the mitochondrial chromosome encoded proteome, *J. Proteome Res.*, **18**, 120-129, doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00391.
8. Poverennaya, E., Kiseleva, O., Ilgisonis, E., Novikova, S., Kopylov, A., Ivanov, Y., Kononikhin, A., Gorshkov, M., Kushlinskii, N., Archakov, A., et al. (2020) Is it possible to find needles in a haystack? Meta-analysis of 1000+ MS/MS files provided by the Russian proteomic consortium for mining missing proteins, *Proteomes*, **8**, 12, doi: 10.3390/PROTEOMES8020012.
9. Paik, Y. K., Overall, C. M., Corrales, F., Deutsch, E. W., Lane, L., and Omenn, G. S. (2018) toward completion of the human proteome parts list: progress uncovering proteins that are missing or have unknown function and developing analytical methods, *J. Proteome Res.*, **17**, 4023-4030, doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00885.
10. Thul, P. J., and Lindskog, C. (2018) The human protein atlas: a spatial map of the human proteome, *Protein Sci.*, **27**, 233-244, doi: 10.1002/pro.3307.
11. Van Bortle, K., and Corces, V. G. (2012) Nuclear organization and genome function, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 163-187, doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155824.
12. Vakhrushev, I. V., Novikova, S. E., Tsvetkova, A. V., Karalkin, P. A., Pyatnitskii, M. A., Zgoda, V. G., and Yarygin, K. N. (2018) Proteomic profiling of HL-60 cells during ATRA-induced differentiation, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **165**, 530-543, doi: 10.1007/s10517-018-4210-y.
13. Novikova, S., Tolstova, T., Kurbatov, L., Farafonova, T., Tikhonova, O., Soloveva, N., Rusanov, A., Archakov, A., and Zgoda, V. (2022) Nuclear proteomics of induced leukemia cell differentiation, *Cells*, **11**, 3221, doi: 10.3390/cells11203221.
14. Zheng, P. Z., Wang, K. K., Zhang, Q. Y., Huang, Q. H., Du, Y. Z., Zhang, Q. H., Xiao, D. K., Shen, S. H., Imbeaud, S., Eveno, E., et al. (2005) Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation apoptosis of promyelocytic leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7653-7658, doi: 10.1073/pnas.0502825102.
15. Wang, W.-J., Tang, W., and Qiu, Z.-Y. (2009) Comparative proteomics analysis on differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells into granulocyte and monocyte lineages, *Chinese J. Cancer*, **28**, 117-121.
16. Novikova, S., Tikhonova, O., Kurbatov, L., Farafonova, T., Vakhrushev, I., Lupatov, A., Yarygin, K., and Zgoda, V. (2021) Omics technologies to decipher regulatory networks in granulocytic cell differentiation, *Biomolecules*, **11**, 907, doi: 10.3390/biom11060907.
17. Jian, P., Li, Z. W., Fang, T. Y., Jian, W., Zhuan, Z., Mei, L. X., Yan, W. S., and Jian, N. (2011) Retinoic acid induces HL-60 cell differentiation via the upregulation of MiR-663, *J. Hematol. Oncol.*, **4**, 20, doi: 10.1186/1756-8722-4-20.
18. Schwanhäusser, B., Gossen, M., Dittmar, G., and Selbach, M. (2009) Global analysis of cellular protein translation by pulsed SILAC, *Proteomics*, **9**, 205-209, doi: 10.1002/pmic.200800275.
19. Claydon, A. J., and Beynon, R. (2012) Proteome dynamics: revisiting turnover with a global perspective, *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 1551-1565, doi: 10.1074/mcp.O112.022186.
20. Ross, A. B., Langer, J. D., and Jovanovic, M. (2021) Proteome turnover in the spotlight: approaches, applications, and perspectives, *Mol. Cell. Proteomics*, **20**, doi: 10.1074/mcp.R120.002190.
21. Holman, S. W., Hammond, D. E., Simpson, D. M., Waters, J., Hurst, J. L., and Beynon, R. J. (2016) Protein turnover measurement using selected reaction monitoring-mass spectrometry (SRM-MS), *Philos.*

- Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, **374**, 20150362, doi: 10.1098/rsta.2015.0362.
22. Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., and Kingsford, C. (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression, *Nat. Methods*, **14**, 417–419, doi: 10.1038/nmeth.4197.
 23. Novikova, S. E., Vakhrushev, I. V., Tsvetkova, A. V., Shushkova, N. A., Farafonova, T. E., Yarygin, K. N., and Zgoda, V. G. (2019) Proteomics of transcription factors: identification of pool of HL-60 cell line-specific regulatory proteins [in Russian], *Biomed. Khim.*, **65**, doi: 10.18097/PBMC20196504294.
 24. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis, *Nat. Methods*, **6**, 359–362, doi: 10.1038/nmeth.1322.
 25. Mohammad, N. S., Nazli, R., Zafar, H., and Fatima, S. (2022) Effects of lipid based multiple micronutrients supplement on the birth outcome of underweight pre-eclamptic women: a randomized clinical trial, *Pak. J. Med. Sci.*, **38**, 219–226, doi: 10.12669/pjms.38.1.4396.
 26. Liu, Y., Mi, Y., Mueller, T., Kreibich, S., Williams, E. G., Van Drogen, A., Borel, C., Frank, M., Germain, P.-L., Bludau, I., et al. (2019) Multi-omic measurements of heterogeneity in HeLa cells across laboratories, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 314–322, doi: 10.1038/s41587-019-0037-y.
 27. Zhu, Q., Wang, J., Zhang, Q., Wang, F., Fang, L., Song, B., Xie, C., and Liu, J. (2020) Methylation-driven Genes PMPCAP1, SOWAHC and ZNF454 as potential prognostic biomarkers in lung squamous cell carcinoma, *Mol. Med. Rep.*, **21**, 1285–1295, doi: 10.3892/mmr.2020.10933.
 28. Ruan, B., Feng, X., Chen, X., Dong, Z., Wang, Q., Xu, K., Tian, J., Liu, J., Chen, Z., Shi, W., et al. (2020) Identification of a set of genes improving survival prediction in kidney renal clear cell carcinoma through integrative reanalysis of transcriptomic data, *Dis. Markers*, **2020**, 8824717, doi: 10.1155/2020/8824717.
 29. Mori, Y., Yokota, H., Hoshino, I., Iwatate, Y., Wakamatsu, K., Uno, T., and Suyari, H. (2021) Deep learning-based gene selection in comprehensive gene analysis in pancreatic cancer, *Sci. Rep.*, **11**, 16521, doi: 10.1038/s41598-021-95969-6.
 30. Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., Senff-Ribeiro, A., Griss, J., Sevilla, C., Matthews, L., Gong, C., et al. (2022) The reactome pathway knowledgebase, *Nucleic Acids Res.*, **50**, D687–D692, doi: 10.1093/nar/gkab1028.
 31. Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M. (2016) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation, *Nucleic Acids Res.*, **44**, D457–62, doi: 10.1093/nar/gkv1070.
 32. Han, H., Shim, H., Shin, D., Shim, J. E., Ko, Y., Shin, J., Kim, H., Cho, A., Kim, E., Lee, T., et al. (2015) TRRUST: a reference database of human transcriptional regulatory interactions, *Sci. Rep.*, **5**, 11432, doi: 10.1038/srep11432.
 33. Lin, Y., Mehta, S., Küçük-McGinty, H., Turner, J. P., Vidovic, D., Forlin, M., Koletti, A., Nguyen, D.-T., Jensen, L. J., Guha, R., et al. (2017) Drug target ontology to classify and integrate drug discovery data, *J. Biomed. Semantics*, **8**, 50, doi: 10.1186/s13326-017-0161-x.
 34. Mathieson, T., Franken, H., Kosinski, J., Kurzawa, N., Zinn, N., Sweetman, G., Poeckel, D., Ratnu, V. S., Schramm, M., Becher, I., et al. (2018) Systematic analysis of protein turnover in primary cells, *Nat. Commun.*, **9**, 689, doi: 10.1038/s41467-018-03106-1.
 35. Gomez, G., Lee, J. H., Veldman, M. B., Lu, J., Xiao, X., and Lin, S. (2012) Identification of vascular and hematopoietic genes downstream of *etsrp* by deep sequencing in zebrafish, *PLoS One*, **7**, e31658, doi: 10.1371/journal.pone.0031658.
 36. Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., et al. (2023) The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional Enrichment analyses for any sequenced genome of interest, *Nucleic Acids Res.*, **51**, D638–D646, doi: 10.1093/nar/gkac1000.
 37. Kang, Y., Xie, H., and Zhao, C. (2019) Ankrd45 is a novel ankyrin repeat protein required for cell proliferation, *Genes (Basel)*, **10**, 462, doi: 10.3390/genes10060462.
 38. Kumar, A., and Balbach, J. (2021) Folding and stability of ankyrin repeats control biological protein function, *Biomolecules*, **11**, 840, doi: 10.3390/biom11060840.

PROTEOMIC APPROACH TO INVESTIGATE THE EXPRESSION, LOCALIZATION, AND FUNCTIONS OF THE PROTEIN PRODUCT OF THE *SOWAHD* GENE DURING GRANULOCYTIC DIFFERENTIATION

S. E. Novikova*, T. V. Tolstova, N. A. Soloveva*, T. E. Farafonova, O. V. Tikhonova,
L. K. Kurbatov, A. L. Rusanov, and V. G. Zgoda*

*Institute of Biomedical Chemistry,
119121 Moscow, Russia; e-mail: novikova.s.e3101@gmail.com, victor.zgoda@gmail.com*

Cataloging human proteins, determining their level of content, cellular localization, function performed, and potential medical significance are important tasks facing the global proteomic community. At present, the localization and functions of protein products for almost half of the protein-coding genes are unknown or poorly understood. The study of the organelle proteome is a promising approach to reveal the localization and functions of human proteins. The nuclear proteome is of particular interest because many nuclear-localized proteins, such as transcription factors, perform regulatory functions that determine cell fate. According to the results of a meta-analysis of the nuclear proteome, or nucleome, of HL-60 cells treated by all-*trans*-retinoic acid (ATRA), it was revealed that the function and localization of the protein product of the *SOWAHD* gene is poorly understood, in addition, there is no comprehensive information on the expression of *SOWAHD* at the protein level. In HL-60 cells for the protein-coding gene *SOWAHD*, mRNA expression was determined at the level of 6.4 ± 0.7 transcripts per million molecules. Using targeted mass spectrometry, the content of SOWAHD protein was measured in the range of 0.27-1.25 fmol/ μ g of total protein. Using stable isotope pulse-chase labeling, the half-life for the protein product of the *SOWAHD* gene was determined to be approximately 19 h. Proteomic profiling of the nuclear fraction of HL-60 cells showed that the SOWAHD protein content increased during ATRA-induced granulocytic differentiation, peaking at 9 h after the addition of the inductor and followed by a decrease at later time points. The results of the study indicate for the first time the nuclear localization and involvement of the protein product of the *SOWAHD* gene in induced granulocytic differentiation.

Keywords: protein product of the *SOWAHD* gene, transcriptome, proteome, ATRA, cell nucleus, mass spectrometry, pulse labeling with stable isotopes, dynamics of protein synthesis and degradation

Уважаемые читатели!

В 2023 году готовятся к печати специальные выпуски «Биохимии»:

Том 88, выпуск 11 (под ред. И.А. Оловникова). Посвящён памяти А.М. Оловникова (1936–2022), геронтолога-теоретика, члена редакционной коллегии журнала. В номере будут представлены экспериментальные и обзорные статьи его коллег из разных стран.

Том 88, выпуск 12. Традиционно посвящён теме фенотоза. В номере будут представлены экспериментальные и обзорные статьи учёных, работающих в области геронтологии, биоэнергетики, окислительного фосфорилирования и др.