

## Белок фотосистемы 2 PsbS как компонент молекулярного механизма нефотохимического тушения у зелёных водорослей

В. В. Птушенко<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,  
Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

<sup>2</sup>Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН  
Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

(Поступила в редакцию 02.12.2025; подписана в печать 11.12.2025)

Процессы переноса энергии возбуждённого состояния пигментов при фотосинтезе и переноса электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи, будучи центральными процессами преобразования энергии света в химическую энергию органических веществ клетки, в то же время таят в себе большую потенциальную опасность для организма. Нефотохимическое тушение (НФТ) возбуждённых состояний хлорофилла — один из основных механизмов защиты фотосинтетического аппарата от опасного воздействия избыточной световой энергии. Основными компонентами молекулярной организации механизма НФТ являются кислород-содержащие каротиноиды ксантофиллы, а также белки — компонент фотосистемы 2 PsbS и его аналог у водорослей белок LhcSR/LHCX. Ранее считалось, что белок PsbS характерен лишь для высших растений, в то время как у водорослей он, если и экспрессируется, то не играет сколь-либо заметной роли в НФТ. Позже появились данные, которые интерпретировались как свидетельство вспомогательной роли PsbS в переходных процессах. Однако недавно для одного из видов зелёных водорослей нами была показана долговременная стресс-индуцированная экспрессия гена этого белка. В настоящей работе мы предприняли попытку расширить круг анализируемых видов и показать, что долговременная стресс-индуцированная экспрессия этого белка, указывающая на его защитные функции, может быть широко распространена среди зелёных водорослей. Также была изучена вариабельность первичной структуры этого белка у зелёных водорослей, которая, в свою очередь, считается антикоррелирующей с важностью функций белка для организма.

PACS: 33.50.7j, 87.15.Qt, 87.15.ht, 87.16.Tb.

УДК: 577.355, 577.115.3.

Ключевые слова: фотосинтез, фотопроекторные механизмы, нефотохимическое тушение, белок PsbS, зелёные водоросли.

### ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез — один из классических примеров важнейших биологических явлений, предоставляющих широкое поле для изучения физических процессов, лежащих в их основе. С физической точки зрения фотосинтез можно охарактеризовать как преобразование энергии света в энергию, запасённую в химических связях органических соединений, с промежуточным этапом преобразования её в электрохимическую энергию, связанную с генерацией разности электрохимических потенциалов на липидной мембране. Весь этот процесс можно разделить на несколько ключевых стадий:

1. поглощение квантов света фотосинтетическими пигментами, организованными в структурно-функциональные единицы — компоненты фотосинтетической антенны;
2. перенос энергии возбуждения между пигментами различных антенных комплексов к реакционному центру;

3. разделение зарядов в реакционном центре — фотохимическая реакция переноса электрона с так называемого первичного донора электрона (димера (бактерио)хлорофилла) на близ расположенную молекулу первичного акцептора (молекула (бактерио)хлорофилла или (бактерио)феофитина);
4. серия переносов электрона между молекулами (редокс-кофакторами, имеющими различную химическую природу) в так называемой фотосинтетической электрон-транспортной цепи (фЭТЦ) с образованием в конечном итоге сильных восстановителей (молекул, способных к окислительно-восстановительным превращениям и обладающих низким стандартным редокс-потенциалом);
5. сопряжённый с переносом электронов трансмембранный перенос протонов, приводящий к образованию трансмембранной разности электрохимических потенциалов ( $\Delta\mu H^+$ );
6. образование макроэргических соединений (то есть химических соединений, характеризующихся большим по модулю отрицательным изменением свободной энергии при гидролизе) за

\* ptush@belozersky.msu.ru

счёт использования энергии, связанной с транс-мембранной разностью электрохимических потенциалов;

- использование образованных на предыдущих этапах сильных восстановителей и макроэргических соединений для превращения (ассимиляции) неорганического соединения, диоксида углерода, в органические соединения (рис. 1).

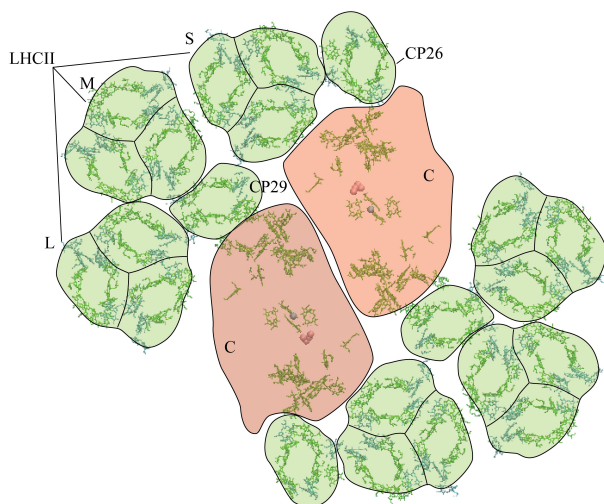


Рис. 1. Схематичное изображение одного из фотосинтетических пигмент-белковых суперкомплексов,  $C_2S_2M_2L_2$ , включающего два комплекса фотосистемы 2 (показаны красным цветом, обозначены буквами С), в которой осуществляется фотохимическая реакция разделения зарядов, и окружающих её антенных комплексов (малые антенны CP26 и CP29, большие антенны LHSP; обозначена только половина из симметрично расположенных комплексов; показаны зеленым цветом). Внутри антенных комплексов и комплексов фотосистемы 2 показаны молекулы хлорофилла (зеленым цветом — хлорофилл а, бирюзовым цветом — хлорофилл b, представляющие собой две несколько различающиеся химические и спектральные формы хлорофилла). За основу схемы взяты данные криоэлектронной микроскопии о структуре суперкомплекса из зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (код pdb: 6KAD [1])

В целом, по мере перехода от предыдущего этапа из описанных выше к последующему, характерная временная шкала процесса становится всё более длительной. Так, если перенос энергии поглощённого кванта света в фотосинтетических антеннах занимает порядка  $10^{-12}$ – $10^{-10}$  с [2–4], а разделение зарядов — порядка  $10^{-13}$ – $10^{-11}$  с [2, 3, 5, 6], то последующие стадии переноса электрона занимают всё более и более длительные времена по мере прохождения электрона по цепи переносчиков — от  $10^{-10}$ – $10^{-9}$  с до  $10^{-3}$ – $10^{-2}$  с [7]. В то же время, биохимические реакции ассимиляции диоксида углерода занимают ещё большее время, порядка  $10^{-1}$ –1 с [8]; если же учесть, что они, в свою очередь, контролируются ещё более медленными процессами диффузии субстратов реакции, то очевидно,

что характерное время конечных стадий всего процесса оказывается на много порядков больше, чем начальных. Это соотношение приводит к тому, что, фактически, эффективность конечных стадий определяет скорость и эффективность всего процесса фотосинтеза. В свою очередь, она определяется условиями среды и зависимыми от них физиологическими процессами, протекающими в растении в целом. Так, условия засухи, проявляющиеся в низком содержании влаги в почве и/или воздухе, приводят, как правило, к закрытию устьиц в листьях высших растений для экономии влаги. Однако это ограничивает поступление в лист из атмосферы диоксида углерода, и стало быть, и скорость реакций его ассимиляции. К подобным же ограничениям может приводить и понижение температуры, при котором падает скорость биохимических реакций, и действие большинства других стрессовых факторов.

### Механизмы защиты фотосинтетического аппарата

В этой ситуации фотосинтетический аппарат растения (ФСА) оказывается исключительно уязвим, поскольку при таких стрессовых условиях, если поглощенные света остаётся на том же уровне, что и в нормальных условиях, возникает дисбаланс между образованием и дезактивацией возбуждённых состояний молекул фотосинтетических пигментов, приводящий к увеличению эффективного времени их жизни. Тот же дисбаланс будет возникать и при увеличении интенсивности света. В свою очередь, увеличение времени жизни электронно-возбуждённого состояния приводит к росту вероятности побочных реакций, в том числе и связанных с генерацией активных форм кислорода (АФК). То же самое можно сказать и про дисбаланс между восстановлением и окислением редокс-кофакторов ФЭТЦ, приводящий к увеличению времени жизни реакционноспособных восстановленных состояний и, в итоге, генерации АФК. Поэтому для безопасного осуществления фотосинтеза в реальных, флуктуирующих условиях окружающей среды растение должно обладать гибкой системой регуляции потока энергии на начальном этапе всего процесса, в фотосинтетической антенне. Для решения этой задачи растение использует различные механизмы, реализуемые на разных уровнях его организации и характеризующиеся разными характерными временами и эффективностью. Так, высшие растения, обладающие сложной листовидной структурой, способны изменять количество поглощаемой ими энергии света за счёт изменения ориентации листьев, а на более длительных временах — за счёт образования экранирующих пигментов и/или опущения [9]. Хлоропласты в растительных клетках обладают подвижностью, и их перемещение в пределах клетки также способно изменять её эффективное оптическое поглощение [10–12]. При длительных изменениях характерной освещённости в хлоропластах меняется состав и содержание пигментов, что также

позволяет адаптировать ФСА к изменившимся условиям [13, 14]. Наконец, одним из самых быстрых механизмов, обеспечивающих защиту ФСА от избытка света, является так называемое нефотохимическое тушение (НФТ) возбуждённых состояний молекул хлорофилла в фотосинтетической антенне [15–17]. Можно сказать, что НФТ — один из главных механизмов защиты фотосинтетического аппарата окисленных фототрофных организмов от опасного действия поглощённой избыточной, то есть не использованной световой энергии, имеющийся у большей части окисленных фототрофных организмов (то есть осуществляющих процесс фотосинтеза с выделением молекулярного кислорода).

В свою очередь, НФТ представляет собой совокупность целого набора защитных механизмов, также действующих на разных временах и с разной эффективностью [18, 19]. Объединяет же эти механизмы то, что все они сокращают время жизни возбуждённого состояния хлорофилла (Хл). Среди них наиболее быстро индуцируемым (и релаксирующим) является энергезависимое тушение (qE), которое активируется образованием  $\Delta\mu H^+$  на мембране субхлоропластных компартментов — тилакоидов, а точнее — закислением внутритилакоидного пространства (люмена), происходящего при образовании  $\Delta\mu H^+$  [20]. К настоящему времени известно, что его основными молекулярными компонентами служат каротиноиды (Кар) из группы деепоксидированных ксантофиллов (зеаксантин и лютеин у растений бурых, зелёных и харовых водорослей и у наземных растений; диатоксантин у диатомовых, гаптофитовых и динофитовых водорослей [21]), включённые в специальные защитные биохимические циклы — виолаксантиновый [22], диатиноксантиновый [23] и некоторые менее распространённые циклы [24, 25].

Участие этих пигментов в процессе НФТ связано с их существенным фотофизическим отличием от основного светособирающего фотосинтетического пигмента — хлорофилла (Хл). В то время как время жизни возбуждённого состояния Хл (имеются в виду его наиболее долгоживущие, низколежащие возбуждённые состояния Qx и Qy) составляет порядка 2–3 нс в растворе [26] и 0.5–1.2 нс в фотосинтетической антенне [27], характерное время жизни возбуждённого состояния Кар варьирует (в зависимости от Кар и от растворителя) в диапазоне от 110 до 180 фс для спектрально-разрешённого второго возбуждённого состояния S2 [28–30] и от 8.5 до 37 пс для спектрально ненаблюдаемого состояния S1 [29, 30]. Это означает, что если есть возможность передавать возбуждение от молекул Хл фотосинтетической антенны к молекулам Кар, то это создаст исключительно эффективный сток энергии электронно-возбуждённых состояний в тепловой резервуар.

Существуют различные представления о конкретном фотофизическом/фотохимическом механизме Кар-зависимого НФТ в фотосинтетической антенне (пред-

полагается, что эти механизмы могут быть различными в разных антенных комплексах). В соответствии с одним из них, происходит перенос энергии возбуждения с Хл на Кар с последующим быстрым безызлучательным переходом Кар\* в основное состояние [31]:



Другой механизм, сопряжённый с переносом заряда, предполагает образование делокализованного возбуждённого состояния димера Хл–Кар, (Хл–Кар)\*, которое в субпикосекундном диапазоне времён (0.1–1 пс) релаксирует в состояние с разделёнными зарядами, (Хл–Кар+), а затем за времена порядка 150 пс переходит в основное состояние путём рекомбинации зарядов [32, 33]:



### Фотопротекторные белки

Очевидно, что для использования любого из этих каналов стока энергии из антенны в защитных целях необходимо уметь регулировать этот канал, включая его лишь при избытке света или в стрессовых условиях и выключая в нормальных условиях, чтобы не снижать эффективность фотосинтеза. Такая регуляция может быть обеспечена участием белков. Поэтому, наряду с молекулами Кар, к молекулярным компонентам НФТ также относятся специальные белки — компоненты антенной системы. У большинства групп водорослей и у мохообразных таким белком является компонент антенны LhcSR, имеющий большое сходство с «настоящими» антенными белками из семейства Lhcb1–Lhcb6, как по аминокислотной последовательности, так и по содержанию пигментов [34, 35]. У харовых водорослей и высших (наземных) растений эту роль выполняет компонент фотосистемы 2 (ФС2), PsbS [36]. В последние годы было показано, что этот белок также работает в ответе на стресс у зелёных водорослей [37–40].

Парадоксальным образом, белок PsbS, будучи постоянным компонентом ФСА и участником НФТ у всех высших растений и зелёных водорослей, и принадлежа, как и LhcSR, к суперсемейству антенных белков, в отличие от него не содержит пигментов [41, 42]. Поэтому в случае PsbS говорят о косвенном НФТ: PsbS не является сам центром стока энергии электронного возбуждения, но переключает другие антенные комплексы в тушащее состояние.

Выше мы упомянули о распространённости PsbS-зависимого тушения в мире растений (включая водоросли). Долгое время PsbS считался специфическим белком высших растений и харовых водорослей. Критериями присутствия белка в клетке и его участия в физиологических процессах являются возможность детектировать сам белок (например, с помощью специфических антител) либо его мРНК, наличие кото-

рой в клетке отражает экспрессию гена этого белка. В случае белков, участвующих в той или иной защитной реакции организма, наблюдается так называемая дифференциальная экспрессия, проявляющаяся в возрастании содержания мРНК в ответ на действие стрессовых факторов. В случае с белком PsbS, в зелёных водорослях (*Chlorophyta*) обнаруживали гомологичные ему гены ещё с момента появления первых данных о геномах этих организмов в начале 2000-х годов [43, 44]; однако не удавалось ни наблюдать дифференциальную экспрессию этих генов в ответ на стрессовые условия, ни обнаружить сам белок с использованием специфических антител. Поэтому полагали, что в механизме НФТ у зелёных водорослей этот белок не участвует, или же его роль несущественна [36, 44]. Лишь в 2016 г. впервые была зарегистрирована стресс-индуцированная экспрессия гена этого белка и обнаружен сам белок в клетках одноклеточной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [38]. Однако эта экспрессия (как и существование самого белка) были очень кратковременны, порядка нескольких часов, в связи с чем авторы этих работ делали вывод о вспомогательной роли этого белка в переходный период в самом начале «включения» стрессовых условий. В 2022 г. нам удалось зарегистрировать долговременную стресс-индуцированную дифференциальную экспрессию гена PsbS у другой одноклеточной зелёной водоросли *Lobosphaera incisa* в ответ на воздействие низкой положительной температуры [40]. Так, мы показали, что холодовой стресс вызывает значительное (до  $10^3$ – $10^4$  раз) возрастание экспрессии PsbS, продолжающееся в течение нескольких (четырёх-пяти) суток, что сравнимо с динамикой изменений экспрессии белка основного ответственного за НФТ белка зелёных водорослей, LhcSR, и при этом значительно превосходит их по абсолютной величине (для LhcSR характерные изменения уровня экспрессии на два-три порядка меньше, т.е. находятся в районе 10). Это позволяет пересмотреть роль PsbS в стресс-индуцированном НФТ у зелёных водорослей и предположить, что этот белок стал основным, а не вспомогательным, участником защитной реакции ФСА в ответ на стрессовое воздействие намного раньше в эволюционной истории растений, чем считалось ранее.

Однако существенным препятствием для такого обобщения является экологическая особенность водоросли *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047: это психротолерантный организм (т.е. способный переносить низкие температуры), и нельзя исключить, что наблюдаемая нами динамика экспрессии PsbS при действии низкой температуры связана лишь с этой её экологической особенностью и не характерна для всего отдела *Chlorophyta* в целом. В связи с этим мы провели поиск долговременной экспрессии PsbS у нескольких других видов зелёных водорослей, а также проанализировали имеющиеся на сегодняшний день данные о структуре гомологов PsbS у представителей отдела *Chlorophyta*.

## 1. МЕТОДЫ

### Условия культивации

Суспензионные культуры одноклеточных зелёных водорослей *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047 и *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 были культивированы в стеклянных колоннах объёмом 0,7 л при 25–26°C и непрерывной аэрации фильтрованным атмосферным воздухом; поток пузырьков воздуха, подаваемый со дна колонны, обеспечивал одновременно перемешивание суспензии. Освещение обеспечивалось светодиодными панелями на основе светодиодов SMD 2835 (Arlight, Россия), дающих нейтральный белый свет интенсивностью 50 мкмоль фотонов  $m^{-2}s^{-1}$ . Когда оптическая плотность суспензии достигла 0.4–0.5, суспензия была охлаждена до 0°C. Система охлаждения представляла собой змеевик, погружённый в суспензию и подключённый к циркуляционному термостату. Далее клетки были инкубированы при температуре 0°C в течение следующих 5 суток.

### Написание праймеров к гену psbs

Были выбраны кодирующие последовательности гена psbs из трёх модельных видов зелёных водорослей: *C. reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Volvox carteri* (номера в базе данных phytozome.org: Cre01.g016750\_4532.1, Dusal.0048s00033.1, Vocar.0007s0069.1). Был проведён поиск локального выравнивания каждой из этих трёх последовательностей с последовательностью генома водоросли, принадлежащей к тому же роду, что исследуемый объект, *Desmodesmus armatus* (GenBank ID: VIIQ02000737.1). Все три гена обнаружили схожие участки в одной и той же области (LOCUS VIIQ02000737, 80000-81000). Этот участок вместе с окружающими его участками по 4500 нукл. был вырезан из последовательности генома *Desmodesmus armatus* и был в дальнейшем использован для процедуры гибридной сборки генома с помощью программы POLCA в качестве неточного длинного чтения с короткими чтениями генома *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014. Для полученной в результате этого последовательности было проведено предсказание содержащихся в ней генов с помощью онлайн сервиса Augustus (<https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>). Предсказанный ген, обнаруживающий сходство с кодирующими последовательностями трёх указанных выше модельных видов, рассматривался как ген psbs *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 и был использован для подбора праймеров. Были выбраны две пары праймеров: в одной из них праймеры были расположены в разных (соседних) экзонах, в другой — один из праймеров пересекал границу двух экзонов.

### Выделение РНК и количественная ПЦР

Общая РНК была выделена из клеток с помощью набора HiPure Total RNA (Magen Biotech, Китай) и использована для синтеза кДНК с помощью ревертазы Mint (Evrogen, Россия) в соответствии с протоколами производителей. Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием разработанных праймеров и набора qPCRMix-HS SYBR (Evrogen) в соответствии с рекомендациями производителя на термоблокере LightCycler 96 (Roche, Швейцария/Германия). Экспрессию гена-мишени рассчитывали относительно той, которая была зафиксирована в клетках перед охлаждением; в качестве эндогенного контроля использовали транскрипты гена актина, являющегося так называемым «геном домашнего хозяйства».

### Фотохимическая активность фотосистемы 2

Фотохимическую активность фотосистемы 2 измеряли с помощью флуориметра хлорофилла с амплитудно-импульсной модуляцией FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments, Чехия). Перед измерениями клеточную суспензию помещали в кварцевую кювету и выдерживали в темном месте в течение 5 мин при температуре 25 или 0°C (для образцов до начала охлаждения или инкубированных при низкой температуре, соответственно). Затем проводили так называемый JIP-тест, то есть измеряли изменения интегральной флуоресценции суспензии в секундном диапазоне времени в ответ на непрерывное освещение узкополосным синим светом ( $\lambda_{\max} = 470$  нм,  $\Delta\lambda_{1/2} \approx 20$  нм) интенсивностью 1000 мкмоль фотонов  $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ . В качестве оценки фотохимической активности фотосистемы 2 использовали характеристику полученной кривой флуоресценции  $F_v/F_m$  (см. рис. 2) [45].

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Низкая консервативность первичной структуры белка PsbS

Вопрос о консервативности первичной структуры белка (т.е. о степени её различия у разных организмов) связан с вопросом о функции белка и её важности для организма. Как правило, белки, выполняющие критические для клетки функции, высоко консервативны. Существенная роль НФТ в защите организма от вызванного интенсивным освещением или другими стрессовыми факторами повреждения даёт основания предполагать высокий уровень консервативности белков, участвующих в НФТ, в том числе PsbS. Однако ранее нами было показано [46], что различие первичной структуры этого белка у представителей зелёных

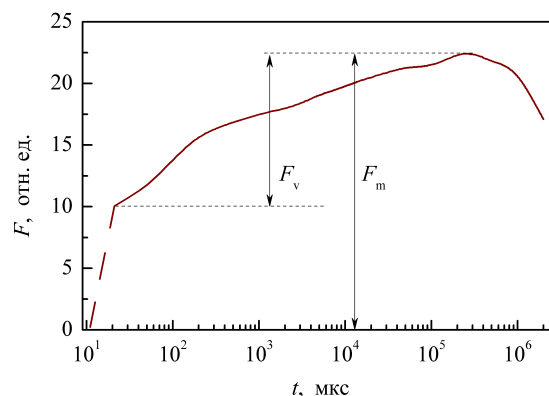


Рис. 2. Характерная зависимость величины флуоресценции ( $F$ ) хлорофилла при непрерывном освещении суспензии водорослей, адаптированных к темноте, от времени ( $t$ ). Отмечены величины максимальной ( $F_m$ ) и переменной флуоресценции ( $F_v$ ); их отношение,  $F_v/F_m$ , равно квантовой эффективности фотосистемы 2 [45]

водорослей (*Lobosphaera incisa*) и высших растений (шпинат, *Spinacia oleracea*) очень существенно (идентичность двух последовательностей составляет менее 33%). В связи с этим возникает вопрос о консервативности белка хотя бы в эволюционно более близких друг к другу группах фотосинтетических организмов — среди отдельных классов зелёных водорослей (*Chlorophyta*) и между ними.

Среди опубликованных аннотированных геномов зелёных водорослей ген белка PsbS описан у 20 видов, присутствующих в базах данных GenBank и Phytozome. Эти виды относятся к пяти классам: *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Ulvophyceae*, *Mamiellophyceae* и *Chloropicophyceae*. Как нуклеотидная последовательность гена, так и аминокислотная последовательность самого белка PsbS оказались чрезвычайно вариабельны: множественное выравнивание всех обнаруженных белков PsbS по аминокислотной последовательности обнаруживает единичные совпадения, составляющие не более 2% всех аминокислотных остатков. Даже в пределах отдельных классов доля совпадающих аминокислотных остатков составляет всего 22% у *Trebouxiophyceae* и не более 10% у *Chlorophyceae*. (Для сравнения заметим, что сходство актина для тех же видов составляет 78% при множественном выравнивании всех последовательностей белка для того же набора видов класса *Chlorophyceae* и до 96% при попарном сравнении видов). При попарном сравнении *Lobosphaera incisa* с главной модельной водорослью *Chlamydomonas reinhardtii* показывает примерно 50%-ное сходство (рис. 3).

Такая вариабельность белка, в последовательности которого отсутствуют консервативные в пределах даже класса достаточно длинные консервативные участки практически исключает возможность исследования его дифференциальной экспрессии у видов, полный геном которых неизвестен.

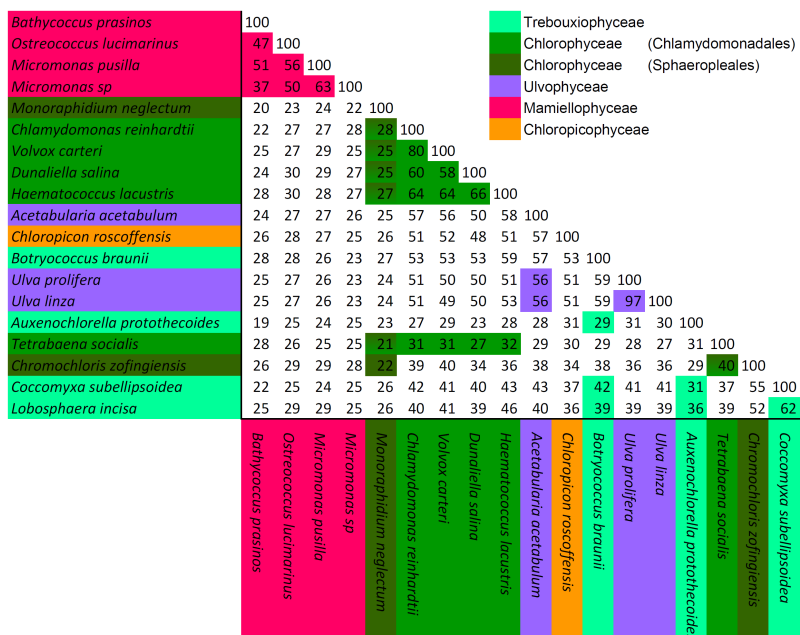


Рис. 3. Матрица попарных сравнений идентичности аминокислотных последовательностей белка PsbS водорослей, принадлежащих к отделу Chlorophyta (в каждой ячейке указан процент идентичности для двух соответствующих видов). Используются последовательности, представленные в базах данных NCBI и phytozome.org. Виды, принадлежащие к одному классу (а также значения идентичности их белков PsbS) обозначены одним и тем же цветом (для водорослей, принадлежащих классу Chlorophyceae, также отдельно выделены два порядка: Chlamydomonadales и Sphaeropleales)

**Стресс-индуцированная экспрессия белка PsbS у *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 и *L. incisa* IPPAS C-2047**

Мы исследовали имеющийся в нашей коллекции штамм зелёной микроводоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (класс Chlorophyceae, порядок Sphaeropleales, семейство Scenedesmaceae), воспользовавшись имеющимися в базе данных GenBank геномными данными для нескольких штаммов рода *Desmodesmus* и проведя секвенирование на небольшую глубину генома данного штамма (см. раздел Методы). Измерения показали, что содержание мРНК белка PsbS возрастает в  $(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^3$  раз через 5 суток инкубации при низкой температуре. У *L. incisa* IPPAS C-2047 происходит рост уровня экспрессии в среднем на близкую величину,  $\sim 1.0 \times 10^3$ , однако в результатах приведённых здесь измерений содержался значительный разброс, от  $0,2 \times 10^3$  до  $5.0 \times 10^3$  (несимметричность диапазона связана с логарифмическим характером ошибки). Однако необходимо отметить, что указанный значительный разброс данных не имеет существенного биологического значения, поскольку столь большое возрастание количества мРНК при стрессе означает фактически пренебрежимо малое её количество до начала стрессового воздействия; относительная ошибка в измеряемом сигнале при этом может быть очень велика, приводя к наблюдаемому большому формальному разбросу.

Одновременно с ростом содержания мРНК PsbS

у обеих водорослей мы наблюдали падение квантовой эффективности фотосистемы 2, оцениваемое по параметру переменной флуоресценции хлорофилла  $F_v/F_m$  (см. раздел «Методы»), что указывает на развитие НФТ в фотосинтетических антеннах водоросли (рис. 4).

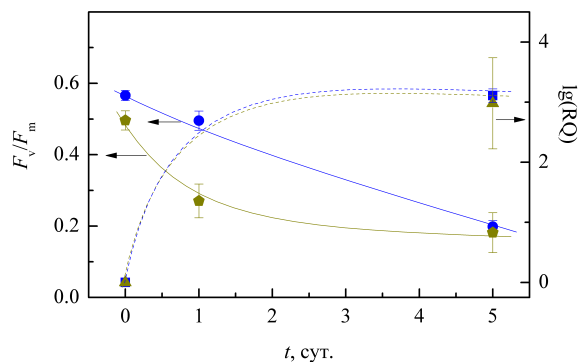


Рис. 4. Изменение квантовой эффективности фотосистемы 2 ( $F_v/F_m$ ; круги и пятиугольники на графике) и относительно количества мРНК белка PsbS (RQ; квадраты и треугольники) у зелёных водорослей *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 (синие символы) и *L. incisa* IPPAS C-2047 (тёмно-жёлтые символы) по мере инкубирования при низкой температуре. Нулевой момент времени соответствует моменту охлаждения суспензии водорослей от нормальной температуры до температуры около  $0^\circ\text{C}$ . Приведены средние ( $n = 3$ )  $\pm$  стандартное отклонение (SD)

Подчеркнём, что род *Lobosphaera* (класс *Trebouxiophyceae*, порядок *Trebouxiales*, семейство *Trebouxiaceae*) и род *Desmodesmus* относятся к разным классам зелёных водорослей, разошедшимся в эволюции около 1 млрд. лет назад [47]. Это означает, что долговременную стресс-индуцированную индукцию экспрессии PsbS можно считать достаточно древним приобретением зелёных водорослей, характерным если и не для всего отдела *Chlorophyta*, то, по крайней мере, для эволюционно достаточно отдалённых друг от друга его представителей. Отметим также, что ранее нами было показано, что акклимация к низкой температуре, в ходе которой мы наблюдаем экспрессию PsbS, сопровождается световым стрессом [40].

К сожалению, сами по себе данные о стресс-индуцированной экспрессии белка PsbS, даже столь значительной в количественном выражении, ещё не позволяют сделать вывод об эффективности обусловленной им защиты ФСА от избыточного освещения в стрессовых условиях. Разделить вклады в НФТ от PsbS и от второго фотозащитного белка, LhcSR, которые оба активируются снижением pH тилакоидного люмена, не представляется возможным в клетках дикого типа. Единственная возможность такого разделения — получение и исследование мутантов *L. incisa* и *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014, дефицитных по PsbS.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно утверждать, что для разных классов зелёных водорослей характерна долговременная и значительная по величине индукция экспрессии защитного белка PsbS, сопровождающаяся индукцией НФТ и снижением скорости генерации АФК. Это позволяет высказать предположение, что у зелёных водорослей PsbS необходим для выживания клетки в стрессовых условиях и выполняет ту же функцию, что и его гомологи у высших растений, т.е. активации НФТ. Для доказательства этой функции PsbS и оценки её эффективности необходимы работы с мутантами, дефицитными по PsbS.

Автор благодарен коллегам, принимавшим участие в выполнении работ по изучению белка PsbS на разных этапах: Е.С. Глаголевой, Е.С. Лобаковой, О.С. Птушенко, А.Е. Соловченко, К.А. Шибзуховой. Культивирование микроводорослей и анализ квантовой эффективности фотосистемы 2 были выполнены с помощью оборудования ЦКП «Фенотипирование фототрофных организмов» МГУ имени М. В. Ломоносова.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-24-00195.

- 
- [1] Sheng X, Watanabe A, Li A. et al // *Nat. Plants*. **5**. 1320 (2019).
- [2] Miloslavina Y, Szczepaniak M, Muller MG. et al // *Biochemistry*. **45**. 2436 (2006).
- [3] Pawlowicz NP, Groot M-L, Van Stokkum I.H.M. et al // *Biophys. J.* **93**. 2732 (2007).
- [4] Broess K, Trinkunas G, Van Der Weij-De C.D., et al // *Biophys. J.* **91**. 3776 (2006).
- [5] Raszewski G, Renger T. // *J. Am. Chem. Soc.* **130**. 4431 (2008).
- [6] Shelaev I.V., Gostev F.E., Mamedov M.D. et al // *Biochim. Biophys. Acta. (BBA)-Bioenergetics* **1797**. 1410 (2010).
- [7] Govindjee. Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. In: *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer, 2004, pp 1–41.
- [8] Young J.N., Goldman J.A.L., Kranz S.A. et al // *New Phytol.* **205**. 172 (2015).
- [9] Соловченко А.Е., Мерзляк М.Н. Оптическое экранирование как фотозащитный механизм растений. М: 2010.
- [10] Kasahara M., Kagawa T., Oikawa K. et al // *Nature* **420**. 829 (2002).
- [11] Heber U., Azarkovich M., Shuvalov V. // *J. Exp. Bot.* **58**. 2745 (2007).
- [12] Suetsugu N., Higa T., Wada M. // *Plant Cell Environ.* **40**. 2447 (2017).
- [13] Anderson J.M., Andersson B. // *Trends Biochem. Sci.* **13**. 351 (1988).
- [14] Wientjes E., van Amerongen H., Croce R. // *J. Phys. Chem. B* **117**. 11200 (2013).
- [15] Niyogi K.K., Truong T.B. // *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**. 307 (2013).
- [16] Demmig-Adams B., Koh S-C., Cohu C.M. et al. Non-photochemical fluorescence quenching in contrasting plant species and environments. In: *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Springer, 2014, pp 531–552
- [17] Ruban A.V. // *Plant Physiol.* **170**. 1903 (2016).
- [18] Horton P. Developments in research on non-photochemical fluorescence quenching: emergence of key ideas, theories and experimental approaches. In: *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Springer, 2014, pp 73–95
- [19] Zulfugarov I.S. // *J. Life Sci. Biomed.* **4**. 76 (2022).
- [20] Giovagnetti V., Ruban A.V. // *Biochem. Soc. Trans.* **46**. 1263 (2018).
- [21] Goss R., Jakob T. // *Photosynth. Res.* **106**. 103 (2010).
- [22] Сапожников Д., Красовская Т., Маевская А. // *ДАН СССР* **113**. 465 (1957).
- [23] Hager A., Stransky H. // *Arch. Microbiol.* **72**. 68 (1970).
- [24] Esteban R., Garcia-Plazaola J.I. Involvement of a second xanthophyll cycle in non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence: the lutein epoxide story. In: *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Springer, 2014, pp 277–295.
- [25] den Berg T.E., Croce R. // *Front. Plant Sci.* **13**. 797294 (2022).

- [26] Sytina O.A., Van Stokkum I.H.M., Heyes D.J. et al // J. Phys. Chem. B **114**. 4335 (2010).
- [27] Lee T-Y., Lam L., Patel-Tupper D. et al // Proc. Natl. Acad. Sci. **121**. e2411620121 (2024).
- [28] Macpherson A.N., Gillbro T. // J. Phys. Chem. A **102**. 5049 (1998).
- [29] Niedzwiedzki D.M., Sullivan J.O., Polivka T. et al // J. Phys. Chem. B **110**. 22872 (2006).
- [30] Kosumi D., Fujiwara M., Fujii R. et al // J. Chem. Phys. **130**. 214506 (2009).
- [31] Frank H.A., Cua A., Chynwat V. et al // Photosynth. Res. **41**. 389 (1994).
- [32] Dreuw A., Fleming G.R., Head-Gordon M. // Phys. Chem. Chem. Phys. **5**. 3247 (2003).
- [33] Holt N.E., Zigmantas D., Valkunas L. et al // Science. **307**. 433 (2005).
- [34] Pinnola A. // J. Exp. Bot. **70**. 5527 (2019).
- [35] Guarneri P.I., Sláma V., Pecorilla C. et al // Commun. Biol. **5**. 1 (2022).
- [36] Gerotto C., Morosinotto T. // Physiol. Plant. **149**. 583 (2013).
- [37] Correa-Galvis V., Redekop P., Guan K. et al // J. Biol. Chem. **291**. 17478 (2016).
- [38] Tibiletti T., Auroy P., Peltier G., Caffarri S. // Plant. Physiol. **171**. 2717 (2016).
- [39] Strenkert D., Schmollinger S., Gallaher S.D. et al // Proc. Natl. Acad. Sci. **116**. 2374 (2019).
- [40] Ptushenko V.V., Bondarenko G.N., Vinogradova E.N. et al // Biochem. **87**. 1699 (2022).
- [41] Bonente G., Howes B.D., Caffarri S. et al // J. Biol. Chem. **283**. 8434 (2008).
- [42] Fan M., Li M., Liu Z. et al // Nat. Struct. Mol. Biol. **22**. 729 (2015).
- [43] Anwaruzzaman M., Chin B.L., Li X-P. et al // Photosynth. Res. **82**. 265 (2004).
- [44] Bonente G., Passarini F., Cazzaniga S. et al // Photochem. Photobiol. **84**. 1359. (2008).
- [45] Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Chlorophyll a Fluorescence. Springer, 2004, pp 321–362.
- [46] Ptushenko V.V., Knorre D.D., Glagoleva E.S. // Int. J. Mol. Sci. **24**. 15060 (2023).
- [47] Lindsey C.R., Knoll A.H., Herron M.D., Rosenzweig F. // BioRxiv **2023**, N 09. 558489 (2023).

## Photosystem 2 protein PsbS is a component of the molecular mechanism of non-photochemical quenching in green algae

V. V. Ptushenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University  
Moscow 119992, Russia

<sup>2</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences  
Moscow, 119334 Russia

E-mail: ptush@belozersky.msu.ru

The energy transfer of chlorophyll excited state during photosynthesis and electron transfer along the photosynthetic electron transport chain are the central processes of light energy conversion into chemical energy while also the sources of potential danger to the organism. Non-photochemical quenching (NPQ) of chlorophyll excited states is one of the key mechanisms for protecting the photosynthetic apparatus from the dangerous effects of excessive light energy. The main molecular components of NPQ are oxygen-containing carotenoids, xanthophylls, as well as proteins: a photosystem 2 component PsbS and its algal analogue, the LhcSR/LHCX protein. Previously, PsbS was believed to be typical only for higher plants, while in algae it should not be expressed or at least play any significant role in NPQ. Later it became clear that its expression is stress-induced, but it took place in a too short timescale. This led to an assumption that its protective role was limited only by an auxiliary role in transients. However, we have recently found long-term stress-induced expression of its gene in one of the green algal species. In this paper, we attempted to expand the range of analyzed species and show that long-term stress-induced expression of PsbS (which could be indicative of its protective function) can be widespread among green algae. The variability of PsbS primary structure in green algae was also studied, which, in turn, is considered to correlate with the importance of protein functions for an organism.

PACS: 33.50.pj. 87.15.Qt. 87.15.ht. 87.16.Tb.

**Keywords:** photosynthesis, photoprotective mechanisms, non-photochemical quenching, PsbS protein, green algae.

Received 02 December 2025.

### Сведения об авторе

Птушенко Василий Витальевич — доктор биол. наук; e-mail: ptush@belozersky.msu.ru.