

УДК 577.355.2

ПЕРИФЕРИЙНЫЙ СВЕТОСОБИРАЮЩИЙ КОМПЛЕКС LH2 МОЖЕТ СОБИРАТЬСЯ В КЛЕТКАХ ПУРПУРНОЙ НЕСЕРНОЙ БАКТЕРИИ *Rhodoblastus acidophilus* БЕЗ КАРОТИНОИДОВ

© 2015 М.А. Большаков, А.А. Ашихмин,
З.К. Махнева, А.А. Москаленко*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино Московской обл.; факс: +7(4967)330-532,
электронная почта: andrey-moskalenko@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.11.14
После доработки 01.04.15

Исследовано влияние каротиноидов на сборку комплекса LH2 в клетках пурпурной несерной бактерии *Rhodoblastus acidophilus*. Для этого культуру бактерий выращивали с ингибитором биосинтеза каротиноидов – дифениламино (ДФА) (в концентрации 71 мМ). Ингибитор снижал уровень биосинтеза окрашенных каротиноидов в мембранах на ~58%. Показано, что в них накапливалось большое количество фитоина. Установлено, что этот предшественник каротиноидов неспецифически связывается с комплексом LH2 и не стабилизирует его структуру. Тест на термостабильность выделенного комплекса LH2 в совокупности с анализом каротиноидного состава показал, что популяция этого комплекса является гетерогенной по составу каротиноидов. Часть комплексов LH2 с содержанием каротиноидов ~90% остается стабильной и не разрушается при нагревании в течение 15 мин при 50°. Другая часть комплексов LH2, содержащих, в среднем, менее одной молекулы каротиноидов на комплекс, разрушалась при нагревании, образуя зону свободных пигментов (и полипептидов). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что некоторая часть комплексов LH2 собирается без каротиноидов в клетках несерной бактерии *Rhodoblastus acidophilus*, выращенных с ДФА. Эти данные противоречат тому факту, что комплекс LH2 из несерных бактерий не может собираться без каротиноидов, но хорошо согласуются с результатами, полученными нами ранее для серных бактерий *Allochro-matium minutissimum* и *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*. Из клеток этих бактерий с использованием ДФА был получен бескаротиноидный комплекс LH2 (Москаленко и соавт., 2012; Ашихмин и соавт., 2014).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосинтезирующие бактерии, фотосинтез, комплекс LH2, сборка, каротиноиды, ингибитор.

Комплекс LH2 является основным комплексом в фотосинтетических мембранах пурпурных бактерий, в спектре поглощения которых в ближней ИК-области преобладают его полосы с максимумами при 800 и 855 нм. Функция этого комплекса заключается в поглощении энергии квантов света, преобразовании этой энергии в энергию электронного возбуждения и ее передаче через комплекс LH1 к RC [1]. Эти процессы происходят в комплексе LH2 с участием хромофоров БХл и каротиноидов, которые некова-

лентно связаны с полипептидами. Комплексы LH2 серных и несерных бактерий являются кольцевыми структурами, построенными из двух низкомолекулярных α - и β -полипептидов. Впервые это было показано в работах [2, 3]. Каждый комплекс LH2 состоит из 8–9 α/β -пар полипептидов (гетеродимеров) в зависимости от вида бактерий. Одним из наиболее изученных является комплекс LH2 из *Rbl. acidophilus*, для которого установлена структура с разрешением 2 Å [4, 5]. Показано, что α/β -гетеродимер комплекса LH2 связывает три молекулы БХл. Две из них (БХл850, поглощение ~855 нм) расположены рядом с периплазматической поверхностью мембраны, а молекула БХл800 (поглощение ~800 нм) находится на цитоплазматической стороне [4–6]. Каждый α/β -гетеродимер нековалентно связывает также одну молекулу каротиноида (родопин-глюкозид в *Rbl. acidophilus*). Его

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл, ДМ – додецил β -D-мальтопиранозид, ДФА – дифениламин, LH – светособирающий, RC – реакционный центр, ДФА-образец (мембрана, комплекс) – образец, полученный из клеток, выращенных с 71 мМ ДФА, Alc. – *Allochro-matium*, Rb. – *Rhodobacter*, Rbl. – *Rhodoblastus*, Ect. – *Ectothiorhodospira*, Trs. – *Thiorhodospira*.

* Адресат для корреспонденции.

глюкозидная группа располагается на цитоплазматической стороне комплекса. Полиеновая цепь каротиноида находится между α - и β -полипептидами (гидрофобный «каротиноидный карман») и имеет изогнутую (twist) конформацию. Эта цепь каротиноида контактирует, как минимум, с 15 а.о. α/β -гетеродимера. Таким образом, каротиноид, который занимает центральную позицию в структуре комплекса LH2, в соответствии с общепринятой точкой зрения, играет важную роль, как в сборке, так и в стабилизации структуры этого комплекса из *Rbl. acidophilus* [4, 6, 7].

Бактериальные каротиноиды – это, как правило, C40 молекулы, которые состоят из восьми единиц изопрена. Их биосинтез в пурпурных бактериях, как было установлено, контролируется, по крайней мере, семью генами [8]. В настоящее время выделяют два основных пути биосинтеза каротиноидов у пурпурных бактерий: 1) спириллоксантиновый путь, который объединяет нормальный и необычный спириллоксантиновый пути, сфероиденовый и каротинальный пути; 2) океноновый путь, который включает океноновый и Rg-кетокаротиноидный пути [9]. Большинство пурпурных бактерий принадлежат к спириллоксантиновой группе. Все пути каротиноидгенеза начинаются с синтеза фитона. Фитоиндесатураза катализирует процесс десатурации последнего, объединяя три стадии биосинтеза каротиноидов (фитоин→фитофлуин→ ζ -каротин→нейроспорин), в результате чего происходит образование нейроспорина [10]. Затем следует ряд реакций десатурации, насыщения, циклизации и введения в молекулу окси-/метокси- и глюкозидных групп.

Поскольку комплексы LH2 из серных и несерных бактерий построены по общему принципу (два низкомолекулярных α - и β -полипептида, три молекулы БХл и одна молекула каротиноида на один гетеродимер) и имеют похожие спектры поглощения в ближней ИК-области, то принципы их сборки в мембранах должны быть сходными. Тем не менее, существует некое противоречие при исследовании вопросов взаимодействия биосинтеза каротиноидов и сборки комплексов LH2 в клетках пурпурных бактерий. С одной стороны, установлено, что комплексы LH2 не собираются в клетках бескаротиноидных мутантов несерных бактерий [11–15]. В указанных мутантах выключены гены фитоинсинтетазы или фитоиндесатуразы. Во втором случае в клетках мутантов накапливается большее количество фитона, что, тем не менее, не приводит к сборке комплекса LH2 [8, 14, 15]. Эти данные интерпретированы таким образом, что комплексы LH2 требуют для сборки и под-

держания стабильности их структуры присутствия молекул окрашенных каротиноидов [16]. С другой стороны, показано, что биосинтез каротиноидов можно практически полностью ($\geq 99\%$) подавить в клетках серных бактерий, однако, комплекс LH2 собирается в их отсутствие [17–25]. Наиболее часто для подавления биосинтеза каротиноидов в клетках фотосинтезирующих бактерий применялся ДФА [17, 23–25]. Он является ингибитором широкого спектра действия, который токсичен при высоких концентрациях. Поэтому иногда ДФА останавливает рост клеток на этапе, когда биосинтез каротиноидов подавлен только на 40–60%.

Представляло интерес исследовать, как ограниченный пул окрашенных каротиноидов может распределяться между комплексами LH2. В настоящей работе изучено влияние ДФА на сборку комплекса LH2 в клетках пурпурной несерной фотосинтезирующей бактерии *Rbl. acidophilus*. Проведена оценка реального распределения каротиноидов между ДФА-комплексами LH2 в одном пуле и сделан вывод, что этот комплекс может собираться *in vivo* без каротиноидов, подобно тому, как это происходит у пурпурных серных бактерий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки *Rbl. acidophilus* 10050 выращивали при $28 \pm 2^\circ$ в стеклянных бутылках и средней интенсивности освещения около 10 Вт м^{-2} . Питательная среда [26] содержала 71 мМ ДФА. Это стандартная концентрация ингибитора, соответствующая 12 мг/л , которая, как правило, используется для ингибирования биосинтеза каротиноидов [17, 20, 21, 23–25]. Более высокие концентрации ДФА (75 и 100 мМ) были использованы только в работе [7]. При выращивании культуры *Rbl. acidophilus* не защищали красным светофильтром для предотвращения разрушения ДФА (как в работах [17–19, 23–25]), так как ранее мы не наблюдали значительной фотодеструкции ДФА при выращивании бактерий на белом свете [20, 21].

Хроматофоры получали из клеток *Rbl. acidophilus* как описано ранее [20, 21]. Комплексы LH2 и LH1-RC выделяли с помощью электрофореза [27] из ДФА-мембран, обработанных ДМ. Для изучения гетерогенности ДФА-комплексов LH2 их нагревали при 50° в течение 15 мин в присутствии 2%-ного Triton X-100. Детергент использовали для предотвращения возможной необратимой агрегации части образца при нагревании. Фракции термостабильных и разрушенных (зона свободных пигментов) комплек-

сов LH2 разделяли на колонке с DEAE-Toyopearl 650S (1,0 × 3,5 см), уравновешенной 0,05 M Tris-HCl-буфером, pH 8,0, с 0,1%-ным Triton X-100. Фракцию термостабильных комплексов LH2 элюировали 0,05 M Tris-HCl-буфером с 0,04 M NaCl, а фракцию свободных пигментов – с 0,14 M NaCl.

Количественное определение содержания каротиноидов проводили как описано ранее [20, 21, 28]. Пигменты экстрагировали с использованием смеси ацетон/метанол (7 : 2, V/V) с последующим их переводом в петролейный эфир. Смесь пигментов сушили выпариванием на роторном испарителе или под током аргона. Пигментные экстракты анализировали с помощью ВЭЖХ, используя колонку Spherisorb ODS2 C18 (4 × 250 мм, «Waters», США). ВЭЖХ система состояла из насоса LC 10ADvp с клапаном FCV 10Alvp и детектором SPD-M20A («Shimadzu», Япония), работающих под программным обеспечением LC-solution. После инъекции образца в течение первых 3 мин через колонку прокачивали раствор «А» (73%-ный ацетонитрил/вода (9 : 1) и 27%-ный этилацетат), который сменяли линейным градиентом 0–100% раствора «В» (этилацетат) в течение 35 мин при скорости потока 1,0 мл/мин. В конце эксперимента через колонку пропускали раствор «В» в течение 5 мин. Каротиноиды идентифицировали сравнением с известными образцами из различных штаммов бактерий в соответствии с их спектрами поглощения и временем выхода с колонки. Молярный коэффициент экстинкции для каждого каротиноида, в соответствии с данными работы [7], составлял 132 мМ⁻¹ см⁻¹, а для фитоина – 50 мМ⁻¹ см⁻¹ [23, 24].

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary 50 («Varian», Австралия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки *Rbl. acidophilus*, выращенные в анаэробных условиях в присутствии 71 мМ ДФА, изменяли свой цвет с ярко-красного на желто-зеленый. Спектр поглощения мембран, выделенных из этих клеток, показан на рис. 1. Максимумы поглощения, расположенные при 379, 591, 803, 864 нм принадлежат полосе Core, Q_x и Q_y (БХл590, БХл800 и БХл850) переходам молекул БХл соответственно. Полосы поглощения каротиноидов в этом образце локализованы при 428, 454, 484 и 525 нм. В мембранах из клеток дикого типа полосы поглощения каротиноидов расположены при 462, 490 и 525 нм (не показано). По нашим оценкам, в ДФА-мембранах сохранялось

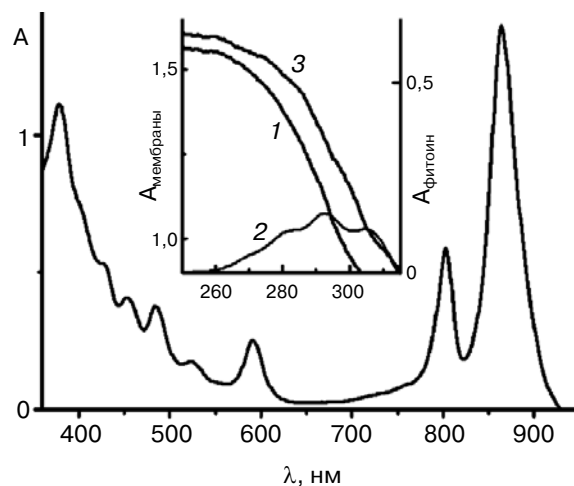


Рис. 1. Спектры поглощения ДФА-мембран, выделенных из клеток *Rbl. acidophilus*, выращенных с ДФА (71 мМ). Вставка: спектры поглощения: 1 – ДФА-мембраны; 2 – фитоин; 3 – суммарный спектр «контрольные мембраны + фитоин»

~42% каротиноидов по сравнению с контролем. Основными каротиноидами в ДФА-мембранах являются нейроспорин и его производные (табл. 1, рис. 2).

Неожиданным оказалось присутствие в ДФА-мембранах больших количеств фитоина (рис. 2). Его содержание фактически соответствовало количеству ингибированных каротиноидов. Об этом свидетельствуют два факта: 1) уровень ингибирования каротиноидов равен 58%; 2) отношение фитоин/каротиноиды (М/М) составляет 1,45, т.е. фитоина в полтора раза больше, чем окрашенных каротиноидов. Другими словами, под действием ДФА в клетках (мембранах) *Rbl. acidophilus* происходило замещение окрашенных каротиноидов их бесцветным предшественником фитоином. Ранее такие значительные количества фитоина при 40–60% ингибировании биосинтеза окрашенных каротиноидов в клетках пурпурных бактерий не были обнаружены [7, 21, 31]. Отношение каротиноиды/фитоин = 1–2 обычно выявлялось только при глубоком ингибировании (90–95%) синтеза каротиноидов [17–24]. Однако в этом случае в ингибированных клетках присутствует небольшое количество каротиноидов (~5–10%) и, соответственно, небольшое количество фитоина. Полученные данные можно сравнивать только с результатами Галла и соавт. по ингибированию каротиноидов в клетках *Rbl. acidophilus* [7]. В указанной работе также было получено ингибирование каротиноидов на уровне ~50%. Однако полное сравнение результатов затруднено, так как авто-

Таблица 1. Состав окрашенных каротиноидов (моль% от общего числа каротиноидов) в ДФА-образцах из *Rbl. acidophilus*

Каротиноид	ДФА-мембраны	ДФА-комплекс LH2	Термостабильный ДФА-комплекс LH2, выделенный после нагревания	ДФА-комплекс LH2, разрушенный после нагревания
Родопин-глюкозид	0,4	0,6	1,9	—
Метокси-ОН-нейроспорин	0,4	0,7	1,2	—
Родопин	5,8	6,7	20,8	—
ОН-нейроспорин	11,5	15,1	25,7	19,7
ОН-асимметричный ζ -каротин	0,4	0,5	0,6	8,5
Метокси-ОН- ζ -каротин	4,2	4,8	5,1	7,2
Ликопин	1,9	2,0	7,3	—
Нейроспорин	9,8	10,8	20,9	—
Асимметричный ζ -каротин	7,6	4,8	6,5	7,6
Свободные каротиноидные карманы	58	54	10	—

ры цитируемой работы [7], объединив каротиноиды по группам, привели только суммарное содержание каждой группы в образце. Например, отмечено присутствие небольшого количества бесцветных предшественников во фракции, обозначенной как «LNZPфPh» (L – ликопин, N – нейроспорин, Z – асимметричный ζ -каротин, Pф – фитофлуин, Ph – фитоин). Общая доля этих пяти каротиноидов составляет 9% от содержания каротиноидов в образце. Причем бесцветные предшественники (фитоин и фитофлуин) были найдены только в комплексе LH2, выделенном из клеток *Rbl. acidophilus*, которые росли в присутствии 50 μ M ДФА. В работе [7] не обнаружено неокрашенных предшественников ни в комплексе LH1-RC, выделенном из этих же клеток (50 μ M ДФА), ни в обоих комплексах (LH1-RC и LH2), выделенных из клеток, выращенных в присутствии 75 μ M ДФА. Поэтому нельзя говорить ни о каком повышенном содержании фитоина в работе [7], что не согласуется с нашими результатами.

Поскольку в ДФА-мембранах выявлено значительное количество фитоина (максимум поглощения при 285 нм), то мы определяли его присутствие в образце спектральным методом, для чего был зарегистрирован спектр поглощения ДФА-мембран в УФ-области. В нем не были зафиксированы полосы поглощения, которые могли быть отнесены к фитоину (рис. 1, вставка, спектр 1). Поэтому был проведен модельный эксперимент с целью определить, как присутствие фитоина в образце изменяет его спектр поглощения в УФ-области. Был смоделирован спектр поглощения, объединивший спектры поглощения контрольных мембран и фитоина

(рис. 1, вставка, спектр 2). При этом спектр поглощения фитоина был сдвинут на 6 нм в красную область, что характерно для каротиноидов *in vivo*. Поглощение фитоина в модельном спектре соответствовало концентрации пигмента в ДФА-образце. Модельный (комбинированный) спектр поглощения (рис. 1, вставка, спектр 3)

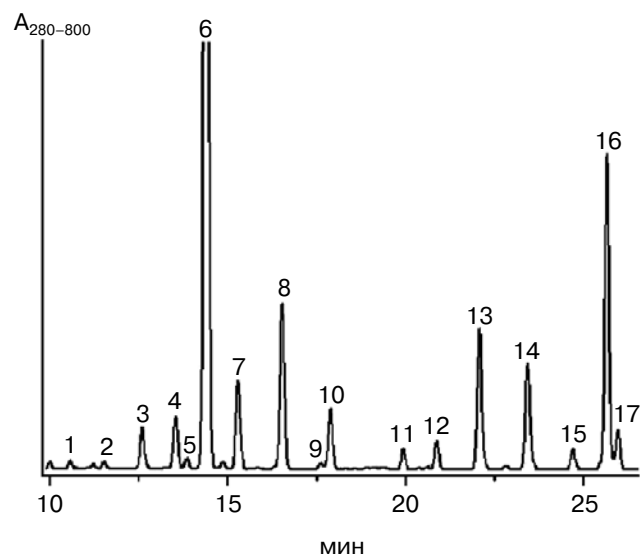


Рис. 2. ВЭЖХ анализ пигментов в ДФА-мембранах *Rbl. acidophilus*. Идентификация пиков: 1 – родопин-глюкозид; 2 – метокси-ОН-нейроспорин; 3, 4, 6 – БХл; 5 – окисленный БХл; 7 – родопин; 8 – ОН-нейроспорин; 9 – ОН-асимметричный ζ -каротин; 10 – метокси-ОН- ζ -каротин; 11 – бактериофеофитин; 12 – ликопин; 13 – нейроспорин; 14 – асимметричный ζ -каротин; 15 – фитофлуин; 16, 17 – фитоин

оказался сходным со спектром ДФА-мембран. Из этого эксперимента следует, что фитонин трудно обнаружить спектральными методами *in vivo*, так как его полосы поглощения маскируются сильным собственным поглощением белкового компонента мембраны в области 250–300 нм. Результаты опыта позволяют понять, почему спектры мембран бескаротиноидных мутантов несерных пурпурных бактерий с повышенным синтезом фитонина никогда не приводятся в литературе: их спектры поглощения в УФ-области практически не отличаются от контрольных образцов [12–15].

Для оценки влияния ДФА на содержание каротиноидов и спектральные характеристики БХл в ЛН комплексах были зарегистрированы их спектры поглощения (рис. 2). Спектр поглощения комплекса ЛН1-РС показан для сравнения. Из приведенных данных следует, что при комнатной температуре положение максимумов поглощения и относительные интенсивности полос S_{ore} , Q_x^- и Q_y^- (БХл800, БХл850 и БХл875) переходов молекул БХл (расположенных при 378, 590, 800, 850 и 886 нм соответственно), связанных со светособирающими комплексами, практически не изменяются по сравнению с аналогичными показателями в мембранах. Спектр ДФА-комплекса ЛН1-РС в ближней ИК-области тоже не изменился по сравнению с контролем. Похожие комплексы были выделены при ингибировании синтеза каротиноидов из клеток *Rbl. acidophilus* в работе [7]. Таким образом, снижение уровня содержания каротиноидов не влияет на спектральные свойства БХл в светособирающих комплексах несерных бактерий. Аналогичные результаты были получены нами для комплексов из серных бактерий [20–22]. Интересно отметить, что в мутантах несерных бактерий с измененным каротиноидным составом отмечено влияние каротиноидов на спектральные свойства комплекса ЛН1-РС, которое проявляется как коротковолновое смещение (на 4–9 нм) длинноволновой полосы поглощения этого комплекса [8].

В обоих ДФА-комплексах (ЛН1-РС и ЛН2) присутствуют окрашенные каротиноиды (рис. 3) в меньшем количестве, чем в контрольных образцах. Содержание каротиноидов в ДФА-комплексе ЛН2 составляет 46% от контрольного образца, что несколько выше, чем в ДФА-мембранах (рис. 3 и табл. 1). Очевидно, этот факт связан с тем, что какая-то часть нестабильных комплексов ЛН2 с низким содержанием каротиноидов была разрушена в процессе его выделения из мембран, а в основной оставшейся части комплекса ЛН2 произошло небольшое увеличение содержания каротиноидов.

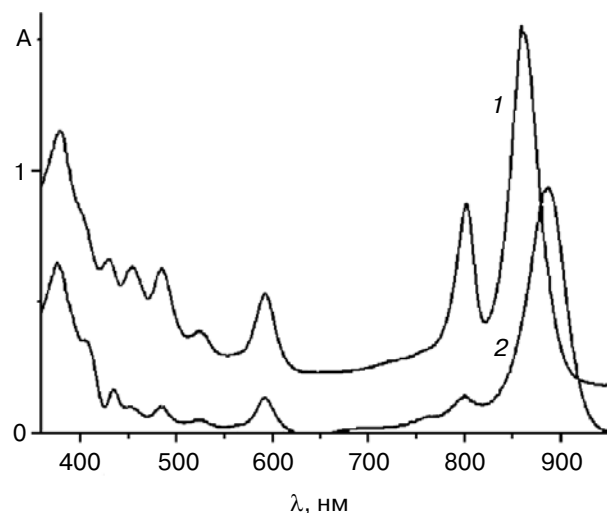


Рис. 3. Спектры поглощения ДФА-комплексов ЛН2 (1) и ЛН1-РС (2) из *Rbl. acidophilus*. Полосы поглощения каротиноидов расположены в области 400–540 нм, а полосы S_{ore} , Q_x^- и Q_y^- переходы (БХл800, БХл850 и БХл880) молекул БХл расположены при 378, 591, 802 и 886 нм соответственно

Состав каротиноидов в ДФА-комплексе ЛН2 приведен в табл. 1 и 2. Доля родопина и родопин-глюкозида составляет 7,3%, а доля ликопина, нейроспорина, ζ -каротина и их производных – 38,7%. Указанные данные не согласуются с результатами Галла и соавторов [7]. В цитируемой работе авторы объединили каротиноиды в ДФА-комплексе ЛН2 в 4 группы, и поэтому сопоставление концентраций отдельных каротиноидов затруднено. По отдельным группам каротиноидов их содержание в комплексе ЛН2 в цитируемой работе [7] и по нашим данным отличается в три раза. Необходимо также отметить, что в работе [7] авторы считают, что соотношение между БХл и каротиноидами как в контроле, так и в ДФА-образце, полученном с использованием ингибитора, не изменяется и остается одинаковым. Понятно, что во втором случае это отношение должно быть выше в два раза, так как количество окрашенных каротиноидов уменьшается тоже приблизительно вдвое.

Таким образом, проведенные эксперименты с ингибитором позволили выделить ДФА-комплекс ЛН2 из клеток *Rbl. acidophilus*, в котором содержалось 46% каротиноидов от контроля. Рассмотрим более подробно этот комплекс. Известно, что один контрольный комплекс ЛН2 содержит 9 молекул каротиноидов, и, следовательно, один ДФА-комплекс ЛН2 должен содержать в среднем 4–5 молекул каротиноидов (46%). Для упрощения расчетов пересчитаем эти результаты на 100 комплексов, что удобнее

Таблица 2. Расчет количества окрашенных каротиноидов в контрольном и ДФА-комплексах LH2 из *Rbl. acidophilus*

	Комплекс LH2	ДФА-комплекс LH2	Термостабильный ДФА-комплекс LH2, выделенный после нагревания	ДФА-комплекс LH2, разрушенный после нагревания
Количество каротиноидов в образце (%)	100	46	90	
Количество комплексов LH2	100	100	45	55
Количество каротиноидов в данном количестве комплексов LH2	900	414	364	50
Количество каротиноидов в одном комплексе LH2	~9	~4	~8	~0,9

для последующих оценок (табл. 2). Понятно, что в этом случае в образце должен присутствовать пул ДФА-комплексов LH2, в котором на каждые 100 комплексов приходится в среднем 414 молекул каротиноидов, а не 900, как в контроле. Возникает вопрос, как эти каротиноиды распределяются между отдельными комплексами? Возможны два варианта ответа на этот вопрос: 1) каждый комплекс в пуле содержит одинаковое количество каротиноидов; 2) комплексы в данном пуле гетерогенны по каротиноидному составу, т.е. количество каротиноидов в них может колебаться от 0 до 9 на комплекс. В настоящее время не существует методов биохимии или молекулярной биологии, которые позволили бы разделить на фракции пигмент-белковые комплексы одного типа, различающиеся только по количеству каротиноидов. Единственный подход, который можно использовать в данном случае, это изучение термостабильности комплексов. Он основан на полученных нами данных, свидетельствующих о структурной роли каротиноидов в бактериальном фотосинтезе и связанной с этим термостабильностью комплексов [29, 30]. Согласно этой гипотезе, при нагревании комплексов быстрее всего будут разрушаться те комплексы, в состав которых входит меньше всего каротиноидов, а комплексы с высоким содержанием каротиноидов будут сохранять свою нативную структуру. Сравнив содержание каротиноидов во фракции термостабильных комплексов с фракцией разрушенных комплексов (зона свободных пигментов/и полипептидов), можно сделать вывод о гомогенности или гетерогенности каротиноидного состава в исследуемом пуле комплексов. В первом случае комплексы LH2 будут иметь одинаковый каротиноидный состав, а во втором – разный. Недавно мы успешно применили этот подход и показали, что ДФА-комплексы LH2 из *Alc. minutissimum*

содержат разное количество каротиноидов в расчете на один комплекс [31]. Для сольубилизации комплекса LH2 из *Alc. minutissimum* ранее использовали неионный детергент ДМ. К сожалению, фракции термостабильных и разрушенных ДФА-комплексов LH2 из *Rbl. acidophilus* не удалось разделить ни с помощью электрофореза, ни с помощью ионообменной хроматографии в присутствии этого детергента (результаты не показаны). Поэтому ДМ был заменен 2%-ным Triton X-100. Важно отметить, что сразу же после добавления указанного детергента к образцу наблюдается некоторое уменьшение интенсивности полосы поглощения при 850 нм, что соответствует разрушению небольшой части комплекса LH2 (рис. 4, вставка). После нагревания в

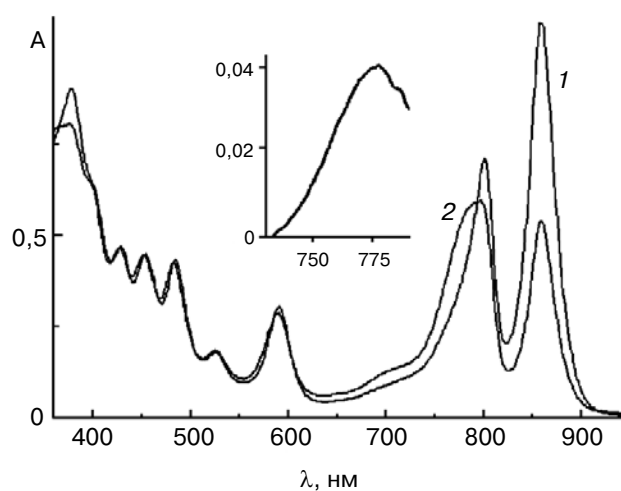


Рис. 4. Спектры поглощения ДФА-комплекса LH2 из *Rbl. acidophilus*: 1 – после обработки 1 мин с 2%-ным Triton X-100; 2 – тот же комплекс, прогретый 15 мин при 50°. Вставка: разностный спектр «Спектр 1 минус контрольный спектр ДФА-комплекса LH2»

течение 15 мин при 50° длинноволновая полоса поглощения ДФА-комплекса LH2 при 850 нм уменьшается на 55% и одновременно появляется полоса мономерного БХЛ с поглощением при 780 нм (рис. 4, спектр 2). Это свидетельствует о разрушении около 55% комплексов LH2 в образце. Контрольный комплекс LH2 с полным набором каротиноидов был более термостабилен и разрушался на 42% при нагревании в течение вдвое большего времени (30 мин при 50°, результаты не показаны). Таким образом, ДФА-комплекс LH2 имеет более низкую термостабильность по сравнению с контролем.

Прогретый в течение 15 мин при 50° ДФА-комплекс LH2 был разделен методом ДЕАЕ хроматографии на две фракции, которые соответствовали фракции термостабильных комплексов LH2 и фракции свободных пигментов (разрушенный комплекс LH2). Их спектры поглощения показаны на рис. 5. Спектр поглощения фракции термостабильных комплексов LH2 не изменялся в ближней ИК-области, однако в нем существенно возросла интенсивность полос, принадлежащих каротиноидам (рис. 5). Отметим, что поглощение при 524 нм, соответствующее родопину, возросло в ~3 раза. Эти результаты хорошо согласуются с данными ВЭЖХ: после нагревания содержание родопина и нейроспорина в указанном комплексе LH2 увеличилось в 3 и 2 раза соответственно. Фракция свободных пигментов оказалась обогащенной ОН-нейроспорином, асимметричным ζ-каротином и их производными (табл. 1). Аналогичные результаты были получены ранее при изучении комплексов LH2 из клеток *Alc. minutissimum*, выращенных в присутствии различных концентраций ДФА [20]. Очевидно, что варьирование количества молекул каротиноидов в расчете на один комплекс является типичным для комплексов LH2, выделенных из бактериальных ДФА-клеток.

Количество термостабильных комплексов LH2 из *Rbl. acidophilus* после 15 мин нагревания при 50° является равным ~46% (по результатам спектральных данных, рис. 5) от общего количества ДФА-комплексов LH2. Как показала вышеприведенная оценка, 100 ДФА-комплексов LH2 содержат, в среднем, 414 молекул каротиноидов. Эти пигменты, очевидно, должны быть распределены между фракцией свободных пигментов и термостабильным комплексом LH2. Последний содержит ~90% каротиноидов, что соответствует 364 молекулам этих пигментов в 45 термостабильных комплексах LH2 (расчет приведен для 100 исходных ДФА-комплексов, табл. 2), в то время как 45 контрольных комплексов LH2 содержат $45 \times 9 = 405$ молекул каро-

тиноидов. Таким образом, на долю фракции свободных пигментов, которая образовалась при разрушении 55 комплексов LH2, приходится ~50 молекул каротиноидов. Очевидно, что один разрушенный комплекс LH2 содержит, в среднем, менее одной молекулы каротиноида (табл. 2). Учитывая неоднородность содержания каротиноидов в комплексах LH2, а также следующие факты: 1) часть этих (бескаротиноидных) комплексов разрушается в процессе выделения комплексов из ДФА-мембран; 2) небольшая фракция выделенных комплексов разрушается в присутствии Triton X-100 еще до нагревания, — можно с достаточным основанием предположить, что некоторая часть комплексов LH2 в ДФА-клетках *Rbl. acidophilus* была собрана без каротиноидов.

Рассмотрим результаты, связанные с фитонином, который является первым звеном в цепи биосинтеза каротиноидов. Он похож на молекулу окрашенного каротиноида за одним исключением: его хромофор представляет систему из трех сопряженных двойных связей, как, например, у молекулы бензола и поэтому полоса поглощения фитина расположена в УФ-области

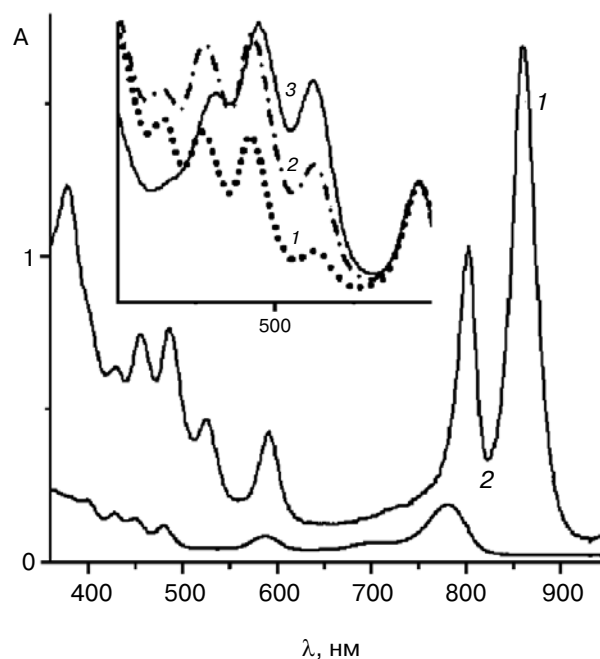


Рис. 5. Спектры поглощения: 1 — термостабильный ДФА-комплекс LH2, выделенный после нагревания 15 мин при 50°; 2 — ДФА-комплекс LH2, разрушенный после нагревания (зона свободных пигментов). Вставка: спектры поглощения в каротиноидной области: 1 — ДФА-комплекс LH2 (см. рис. 2); 2 — термостабильный ДФА-комплекс LH2, выделенный после нагревания (рис. 4, спектр 1); 3 — комплекс LH2 с нормальным содержанием каротиноидов

при 285 нм, где у всех исследованных образцов (мембраны, комплексы) она маскируется поглощением белкового компонента. Поэтому выявление фитоина с помощью спектральных методов является затруднительным. Поскольку в данной работе зафиксирована достаточно большая концентрация фитоина в исследуемых ДФА-образцах, то возникает вопрос: может ли фитоин встраиваться в комплекс LH2 вместо окрашенных каротиноидов? В ДФА-мембранах содержание фитоина в 1,45 раза выше, чем содержание каротиноидов, а в выделенном ДФА-комплексе LH2 это соотношение уменьшилось до 0,67. Это можно объяснить тем фактом, что фитоин, по-видимому, неспецифически связан с комплексом LH2 и легко удаляется при его выделении. При корректном встраивании каротиноидов *in vivo* в комплексы LH2 их содержание в мембранах и указанных комплексах практически совпадает [20]. Данные по меньшей термостойкости ДФА-комплекса LH2 по сравнению с контролем, несмотря на высокое содержание в нем фитоина, также являются подтверждением неспецифического связывания фитоина, так как при его корректном встраивании в каротиноидные карманы он повысил бы термостабильность комплекса. Наконец, термостабильная фракция ДФА-комплекса LH2 содержит окрашенные каротиноиды на уровне контроля. Тем не менее, в этом комплексе также обнаружено значительное количество фитоина (35 молекул фитоина на 100 молекул каротиноидов). Обычно в комплексах LH2 (или LH1) с таким содержанием каротиноидов фитоин отсутствует [20, 31]. На основании указанных данных можно сделать предположение о том, что: 1) фитоин не заменяет собой окрашенные каротиноиды в структуре данного ДФА-комплекса LH2; 2) фитоин связывается неспецифически с ДФА-комплексом LH2. Похожий вывод был сделан при изучении комплексов LH2 из клеток *Ect. haloalkaliphila*, которые росли при разных концентрациях ДФА [22]. Согласующиеся результаты были получены на ДФА-комплексе LH1-RC из *Trs. sibirica*. Комплексы этого типа могут диссоциировать на субкомплексы B820 только в образцах с полностью экстрагированными каротиноидами. Указанный комплекс при обработке октилглюкозидом легко диссоциировал на субкомплексы [28], т.е. поведение ДФА-комплекса совпадало с поведением комплексов из образцов с экстрагированными каротиноидами. При наличии фитоина в данном образце никак не влияло на процесс диссоциации. Необходимо отметить, что комплексы LH2 не собираются в транспозоновых мутантах со 100%-ным уровнем биосинтеза фитоина [8, 14]. Таким образом, ста-

дия образования фитоина представляет собой первый важный шаг в биосинтезе каротиноидов, но сам фитоин не имеет существенного значения для сборки и стабилизации структуры комплексов LH2.

Возникает вопрос, как появляется гетерогенность каротиноидного состава в пуле одинаковых комплексов LH2 у пурпурных бактерий? Светособирающие комплексы с полным набором каротиноидов представлены во внутрицитоплазматической мембране или хроматофорах этих бактерий. Все комплексы собираются в цитоплазматической мембране путем точного позиционирования четырех взаимосогласованных путей биосинтеза (α - и β -полипептидов, БХл и каротиноидов). Схематично этот процесс представлен на рис. 6. После сборки «зрелые» светособирающие комплексы (вместе с RC) путем инвагинации цитоплазматической мембраны перемещаются вовнутрь цитоплазмы клетки (рис. 6, а, этап 1), образуя либо систему везикул (ламелл), либо отдельные хроматофоры. При добавлении ингибитора каротиноидгенеза в среду выращивания клеток бактерий биосинтез каротиноидов начинает замедляться, смещаясь в сторону образования более ранних продуктов. Следовательно, ингибитор приводит к сборке комплексов, как с пониженным содержанием, так и другим составом каротиноидов, которые затем тоже перемещаются в цитоплазму (рис. 6, а, этап 2). Пул из комплексов LH2 с нормальным содержанием каротиноидов «разбавляется» в клетке такими же комплексами, но с меньшим количеством каротиноидов и другим составом этих пигментов. Общая концентрация кароти-

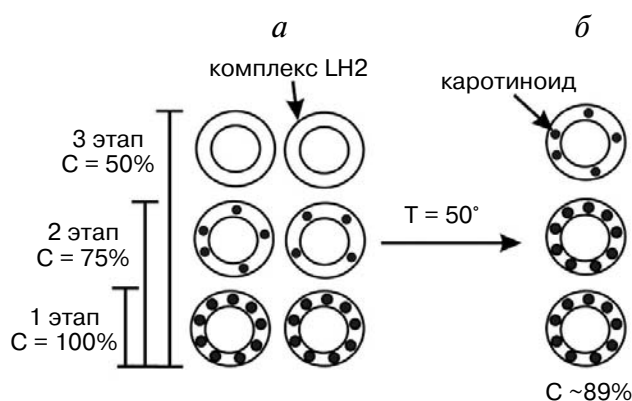


Рис. 6. Упрощенная схема сборки комплексов LH2 в клетках *Rbl. acidophilus* в условиях ингибирования биосинтеза каротиноидов (а) и влияние нагревания на популяцию этих комплексов (б). Средняя концентрация каротиноидов в популяции комплексов LH2 на каждом этапе обозначена как «С»

ноидов в таком пуле комплексов LH2 будет 75% (рис. 6, а, этап 2). Таким образом, если представить систему упрощенно, то на первом этапе в клетку поступило N комплексов LH2 со 100%-ным содержанием каротиноидов, на втором, под действием ингибитора – N комплексов с 50%-ным содержанием пигментов от контроля, а на третьем (заключительная стадия ингибирования) – N комплексов без каротиноидов. Общее среднее содержание каротиноидов в этом пуле комплексов LH2 будет составлять 50% (рис. 6, а, этап 3). Понятно, что ВЭЖХ анализ каротиноидов общего пула комплексов LH2 такого образца, особенно без учета степени воздействия ДФА на биосинтез каротиноидов, позволяет установить различия только в качественном составе каротиноидов по сравнению с контролем. При нагревании ДФА-комплексов LH2 разрушается часть комплексов с низким содержанием указанных пигментов (или совсем без каротиноидов), но сохраняются комплексы с повышенным содержанием каротиноидов (на уровне контроля) (рис. 6, б), так как эти комплексы LH2 являются термостабильными. Следовательно, используя тест на термостабильность ДФА-комплексов LH2, можно оценить распределение каротиноидов между двумя группами ДФА-комплексов LH2: термостабильной (высокое содержание каротиноидов) и лабильной (низкое содержание каротиноидов).

К сожалению, до сих пор при выращивании многих, особенно несерных, пурпурных бактерий не удается достичь высокого уровня (90–99%) ингибирования биосинтеза каротиноидов. Используемый в данной работе ДФА является соединением широкого спектра действия. Он способен замедлять процессы метаболизма в клетке, что может в конечном итоге приводить к ее гибели. Установлено, что кроме биосинтеза каротиноидов, ДФА оказывает влияние на клеточное содержание хинонов, БХл и цитохромов [21, 22, 25]. Можно предположить, что в данном случае в клетках *Rbl. acidophilus* происходит одновременно несколько процессов: 1) подавление биосинтеза каротиноидов; 2) сборка комплексов LH2 с пониженным содержанием каротиноидов; 3) снижение доли комплексов LH2 с нормальным содержанием каротиноидов из-за увеличения содержания модифицированных

комплексов; 4) остановка развития клетки и ее смерть под действием ингибитора. Гибель клетки, очевидно, наступает быстрее, чем происходит полная замена комплексов LH2 на бескаротиноидные комплексы. В результате не удается получить клетки с высоким содержанием комплексов LH2 без каротиноидов. В исследованном случае в клетках *Rbl. acidophilus* образуется только смесь комплексов LH2 с разным содержанием каротиноидов. В этом пуле комплексов LH2 бескаротиноидные ДФА-комплексы составляют лишь небольшую часть. Наши результаты находятся в хорошем согласии с аналогичными данными, полученными для комплексов LH2 из серных бактерий, которые, как было хорошо установлено, могут собираться *in vivo* без каротиноидов [21, 22]. Возможно, в дальнейшем удастся найти узкоспецифические ингибиторы, которые действуют только на биосинтез каротиноидов, и в этом случае бескаротиноидные комплексы LH2 могут быть выделены из разных фотосинтетических бактерий.

Таким образом, примененный в данном исследовании подход, сочетающий использование ингибитора биосинтеза каротиноидов при выращивании клеток пурпурной несерной бактерии *Rbl. acidophilus* с последующим выделением ДФА-комплексов LH2, определением их каротиноидного состава и проведением теста на термостабильность этих комплексов, позволил впервые показать, что они могут собираться *in vivo* без участия каротиноидов. Полученные данные служат важным контраргументом к общепринятому мнению о том, что для сборки комплекса LH2 у несерных бактерий требуются каротиноиды, но полностью соответствуют нашим результатам по выделению бескаротиноидных комплексов LH2 из серных бактерий [21, 22, 31].

Авторы выражают благодарность проф. Проскуракову И.И. (ИФПБ РАН, Россия) за оказание помощи в приобретении культуры *Rbl. acidophilus* из коллекции DSMZ (Германия) и Журавлевой З.А. за помощь в выращивании бактерий.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты 13-04-01184а, 15-04-02660а) и Программы Президента РФ (грант НШ-4771.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hu, X.C., Ritz, T., Damjanovic, A., Autenrieth, F., and Schulten, K. (2002) Photosynthetic apparatus of purple bacteria, *Q. Rev. Biophys.*, **35**, 1–62.
- Moskalenko, A.A., and Erokhin, Yu.E. (1978) Investigation of light-harvesting complex *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *FEBS Lett.*, **87**, 122–124.
- Ерохин Ю.Е., Москаленко А.А. (1973) Характеристика белков (количество цепей и молекулярный вес) в пигмент-липопротеиновых комплексах *Chromatium*, Доклады АН СССР, **212**, 495–498.
- Prince, S.M., Papiz, M.Z., Freer, A.A., McDermott, G., Hawthornthwaite-Lawless, A.M., Cogdell, R.J., and Isaacs, N.W. (1997) Apoprotein structure in the LH2 complex from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050: modular assembly and protein pigment interactions, *J. Mol. Biol.*, **268**, 412–423.
- Papiz, M.Z., Prince, S.M., Howard, T., Cogdell, R.J., and Isaacs, N.W. (2003) The structure and thermal motion of the B800-850 LH2 complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å resolution and 100 K: new structural features and functionally relevant motions, *J. Mol. Biol.*, **326**, 1523–1538.
- Prince, S.M., Howard, T.D., Myles, D.A., Wilkinson, C., Papiz M.Z., Freer, A.A., Cogdell, R.J., and Isaacs, N.W. (2003) Detergent structure in crystals of the integral membrane light-harvesting complex LH2 from *Rhodospseudomonas acidophila* Strain 10050, *J. Mol. Biol.*, **326**, 307–315.
- Gall, A., Henry, S., Takaichi, S., Bruno, R., and Cogdell, R.J. (2005) Preferential incorporation of colored-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions, *Photosynth. Res.*, **86**, 25–35.
- Hunter, C.N. (1995) in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R.E., Madigan, M.T., and Bauer, C.E., eds) Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 473–501.
- Takaichi, S. (2008) in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., and Beatty, J.T., eds) Springer, Dordrecht, pp. 97–117.
- Garcia-Asua, G., Cogdell, R.J., and Hunter, C.N. (2002) Functional assembly of the foreign carotenoid lycopene into the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*, achieved by replacement of the native 3-step, phytoene desaturase with its 4-step counterpart from *Erwinia herbicola*, *Mol. Microbiol.*, **44**, 233–244.
- Davidson, E., and Cogdell, R.J. (1981) The polypeptide composition of the B850 light-harvesting pigment-protein complex from *Rhodospseudomonas sphaeroides* R 26.1, *FEBS Lett.*, **132**, 81–84.
- Bartley, G.E., and Scolnik, P.A. (1989) Carotenoid biosynthesis in photosynthetic bacteria. Gene characterization of the *Rhodobacter capsulatus* CrtI protein, *J. Biol. Chem.*, **264**, 13109–13113.
- Jones, M.R., Fowler, G.J., Gibson, L.C., Grief, G.G., Olsen, J.D., Crielgaard, W., and Hunter, C.N. (1992) Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* lacking one or more pigment-protein complexes and complementation with reaction-centre, LH1, and LH2 genes, *Mol. Microbiol.*, **6**, 1173–1184.
- Lang, H.P., Cogdell, R.J., Gardiner, A.T., and Hunter, C.N. (1994) Early steps in carotenoid biosynthesis: sequences and transcriptional analysis of the crtI and crtB genes of *Rhodobacter sphaeroides* and overexpression and reactivation of crtI in *Escherichia coli* and *R. sphaeroides*, *J. Bacteriol.*, **176**, 3859–3869.
- Lang, H.P., and Hunter, C.N. (1994) The relationship between carotenoid biosynthesis and the assembly of the light-harvesting LH2 complex in *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochem. J.*, **298**, 197–205.
- McDermot, G., Prince, S.M., Freer, A.A., Hawthornthwaite-Lawless, A.M., Papiz, M.Z., Cogdell, R.J., and Isaacs, N.W. (1995) Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria, *Nature*, **374**, 517–521.
- Cohen-Bazire, G., and Stanier, R.Y. (1958) Inhibition of carotenoid synthesis in photosynthetic bacteria: Specific inhibition of carotenoid synthesis in a photosynthetic bacterium and its physiological consequences, *Nature*, **181**, 250–252.
- Fuller, R.C., and Anderson, L.C. (1958) Suppression of carotenoid synthesis, *Nature*, **181**, 252–254.
- Brill, C. (1963) Studies on bacterial chromatophores. II. Energy transfer and photooxidative bleaching of bacteriochlorophyll in relation to structure in normal and carotenoid-depleted *Chromatium*, *Biochim. Biophys. Acta*, **66**, 50–60.
- Москаленко А.А., Бриттон Г., Коннор А., Йанг А., Торопыгина О.А. (1991) Содержание каротиноидов в хроматофорах и пигмент-белковых комплексах, выделенных из клеток *Chromatium minutissimum*, *Биол. мембр.*, **8**, 249–260.
- Moskalenko, A.A., and Makhneva, Z.K. (2012) Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochromatium minutissimum* assembled without carotenoids, *J. Photochem. Photobiol.*, **108**, 1–7.
- Ashikhmin, A., Makhneva, Z., and Moskalenko, A. (2014) The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis, *Photosynth. Res.*, **2014**, **119**, 291–303.
- Goodwin, T.W., and Osman, H.G. (1953) Studies in carotenogenesis. General cultural conditions controlling carotenoid (spirilloxanthin) synthesis in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *Biochem. J.*, **53**, 541–546.
- Britton, G., Singh, R.K., Goodwin, T.W., and Ben-Aziz, A. (1975) The carotenoids of *Rhodospirillum rubrum* and the effect of diphenylamine on the carotenoid composition, *Phytochem.*, **14**, 2427–2433.
- Bramley, P.M. (1993) in *Carotenoids in Photosynthesis* (Young A., and Britton, G., eds) Chapman and Hall, London, pp. 127–159.
- Pfenning, N. (1969) *Rhodospseudomonas acidophila*, sp. n., a new species of budding purple nonsulfur bacteria, *J. Bacteriol.*, **99**, 597–602.
- Москаленко А.А., Ерохин Ю.Е. (1974) Выделение пигмент-липопротеиновых комплексов из пурпурных фотосинтезирующих бактерий методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, *Микробиол.*, **43**, 654–658.
- Moskalenko, A.A., Makhneva, Z.K., Fiedor, L., and Scheer, H. (2005) Effects of carotenoid inhibition on the photosynthetic RC–LH1 complex in purple sulphur bacterium *Thiorhodospira sibirica*, *Photosynth. Res.*, **86**, 71–80.
- Москаленко А.А., Ерохин Ю.Е. (1981) Структурная роль каротиноидов в организации пигмент-белковых комплексов из пурпурных фотосинтезирующих бактерий, ОНТИ, Пушкино.
- Moskalenko, A.A., and Karapetyan, N.V. (1996) Structural role of carotenoids in photosynthetic membranes, *Z. Naturforsch.*, **51C**, 763–771.
- Makhneva, Z., Bolshakov, M., and Moskalenko, A. (2008) Heterogeneity of carotenoid content and composition in LH2 of the sulphur purple bacterium *Allochromatium minutissimum* grown under carotenoid-biosynthesis inhibition, *Photosynth. Res.*, **98**, 633–641.

**PERIPHERAL LIGHT-HARVESTING LH2
COMPLEX CAN BE ASSEMBLED IN CELLS
OF THE NON-SULFUR PURPLE BACTERIUM
Rhodoblastus acidophilus WITHOUT
CAROTENOIDS**

**M. A. Bolshakov, A. A. Ashikhmin,
Z. K. Makhneva, A. A. Moskalenko***

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy
of Science, ul. Institutskaya 2, Pushchino 142290,
Moscow region, Russia; fax: +7(4967)330-532,
E-mail: andrey-moskalenko@rambler.ru*

Received November 28, 2014
Revision received April 1, 2015

The effect of carotenoids on assembly of the LH2 complex in cells of the purple non-sulfur bacterium *Rhodoblastus acidophilus* has been studied. For this purpose, the culture of this bacterium was grown with an inhibitor of carotenoid biosynthesis (71 μ M diphenylamine, DPA). The inhibitor reduced the level of carotenoid biosynthesis in the membranes by ~58%. Simultaneously, they accumulate large amounts of phytoene. It was established that this carotenoid precursor binds nonspecifically to the LH2 complex and does not stabilize its structure. The thermostability test combined with HPLC analysis of carotenoid composition showed that LH2 complexes were heterogeneous in carotenoid composition. Part of the LH2 complex with ~90% of the carotenoid content remained stable and maintained the native characteristics after heating at 50°C for 15 min. Another part of the LH2 complex containing less than 1 carotenoid molecule was destroyed by heating and formed free pigment (and polypeptide) band. The results indicate that some LH2 complexes can be assembled in *Rhodoblastus acidophilus* cells without colored carotenoids. The data contradict the common point of view that the LH2 complex from non-sulfur bacteria cannot be assembled without carotenoids, but it is in good agreement with our results obtained earlier for the sulfur bacteria *Allochrocatium minutissimum* and *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*. Carotenoidless complex LH2 was isolated from the cells of these bacteria using DPA.

Key words: photosynthetic bacteria, photosynthesis, LH2 complex, assembly, carotenoids, inhibitor