

УДК 577.355.2:577.2

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА С СИНГЛЕТНЫМ КИСЛОРОДОМ В МЕМБРАНАХ ПУРПУРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ: СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ЗАЩИТНАЯ ФУНКЦИЯ КАРОТИНОИДОВ?

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

Представлено академиком РАН В.А. Шуваловым 08.11.2018 г.

Поступило 08.11.2018 г.

Изучено прямое действие синглетного кислорода на бактериохлорофилл (БХл) светособирающих комплексов в мембранах четырех видов пурпурных несерных и серных фотосинтезирующих бактерий с каротиноидами и без каротиноидов. Установлено, что БХл в образцах без каротиноидов, как правило, более устойчив к действию синглетного кислорода по сравнению с контролем. Предполагается, что каротиноиды не нужны для защиты БХл светособирающих комплексов бактерий от синглетного кислорода, а в классической работе *Griffith et al.* [1] процесс апоптоза клеток бескаротиноидных мутантов, который включает разрушение комплексов, появление мономерного БХл и генерацию последним синглетного кислорода с последующим окислением самого БХл, был ошибочно приписан защитной функции каротиноидов.

Ключевые слова: бактериохлорофилл, каротиноиды, синглетный кислород, светособирающие комплексы, бенгальский розовый

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524864504-508>

Защитная функция каротиноидов впервые была предложена в работе [1]. В настоящее время предполагается, что этот процесс начинается с поглощения энергии кванта света бактериохлорофиллом (БХл) и перехода пигмента в долгоживущее триплетное состояние с последующим взаимодействием с кислородом и образованием синглетного кислорода. Последний, в свою очередь, способен окислять различные компоненты клетки, включая БХл, что вызывает гибель клетки. Поэтому защитная функция каротиноидов сводится к тушению триплетов БХл или синглетного кислорода и рассеиванию полученной энергии в виде тепла [2].

Выделение синглетного кислорода с квантовым выходом $0,03 \pm 0,005$ было показано только для изолированных реакционных центров [3, 4]. Аналогичные данные для светособирающих (LH) комплексов LH1 и LH2 отсутствуют. Возможно, этот процесс имеет место быть *in vivo*, так как клетки дикого типа *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* 2.4.1 в условиях высокой освещённости генерировали в небольшом количестве синглетный кислород. Остаётся неясным,

насколько эффективно каротиноиды способны тушить синглетный кислород *in vivo*, защищая таким образом БХл. Для этого необходимо сравнить влияние синглетного кислорода на контрольные образцы и образцы без каротиноидов, в которых кольцевые агрегаты БХл в светособирающих бактериальных комплексах служат мишенью для синглетного кислорода. Работа подобного рода ранее не проводилась.

В данной работе представлены результаты по прямому воздействию синглетного кислорода на БХл LH-комплексов. Было установлено, что комплексы без каротиноидов в мембранах (комплексах) у четырёх видов пурпурных фотосинтезирующих бактерий, как правило, более устойчивы к действию синглетного кислорода по сравнению с контролем.

В качестве объекта исследования использовали мембраны серных (*Allochromatium (Alc.) vinosum* штамм МГУ и *Ectothiorhodospira (Ect.) haloalkaliphila*) и несерных (дикий тип *Rba. sphaeroides*, бескаротиноидный мутант *Rba. sphaeroides* R26.1, *Rhodospirillum (Rsp.) rubrum* и бескаротиноидный мутант *Rsp. rubrum* G9). Для получения бескаротиноидных клеток серных бактерий их выращивали в присутствии дифениламина (ДФА-образцы) [5]. В качестве источника синглетного кислорода использовали бенгальский

Институт фундаментальных проблем биологии
Российской Академии наук, Пушкино Московской обл.

*E-mail: AshikhminAA@gmail.com

**E-mail: andrey-moskalenko@rambler.ru

розовый (БР). Облучение образцов с БР проводили в области ~ 550–580 нм (фильтры СЗС22+ОС13), где БХл и каротиноиды имеют небольшое поглощение. Скорость выделения синглетного кислорода БР составляла около 110 мкМ/мин. Контрольные образцы (без БР) облучали в таких же условиях и выцветание пигментов в них, за исключением *Alc. vinosum*, не превышало 3–5% от общей плотности образца, а для *Alc. vinosum* — 9–17%. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary 50 (“Agilent Technology”, США). Высокоэффективный жидкостной хроматографический (ВЭЖХ)-анализ пигментных экстрактов проводили, как описано в [5].

На первом этапе было изучено действие синглетного кислорода на БХл в мембранах (комплексах) *Rba. sphaeroides* — культуры, которая использовалась в классической работе [1]. Результаты эксперимента показаны на рис. 1. Под действием синглетного кислорода уменьшаются три основных полосы в ближней ИК-области, соответствующие Qu-переходам БХл800, БХл850 и БХл870 обоих LH-комплексов, и появляется максимум продукта окисления БХл (3-ацетил-хлорофилл) при 700 нм. Очевидно, что синглетный кислород в используемой системе способен диффундировать до кольцевых агрегатов, где происходит его взаимодействие с БХл. Совершенно неожиданным явился тот факт, что БХл в бескаротиноидном мутанте *Rba. sphaeroides* R26.1 был более устойчив к действию синглетного кислорода, чем БХл из дикого штамма (рис. 1б). Эти данные вступают в противоречие с общепринятой гипотезой

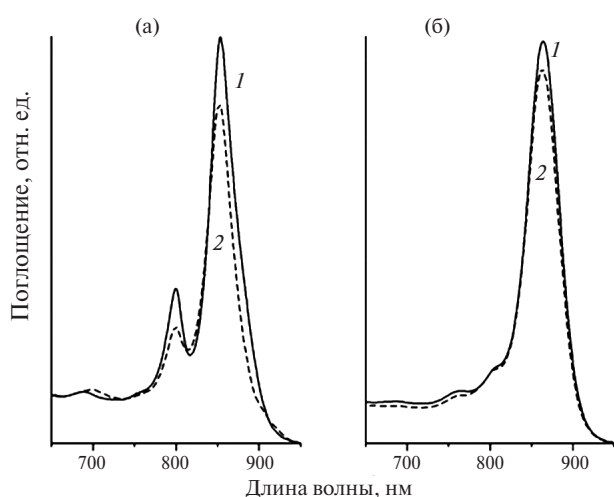


Рис. 1. Спектры поглощения контрольных мембран *Rba. sphaeroides* (а) и мембран бескаротиноидного мутанта *Rba. sphaeroides* R-26.1 (б) до (1) и после (2) облучения в течение 30 мин в присутствии 50 мкМ БР.

о защитной функции каротиноидов от действия синглетного кислорода. Поэтому мы проверили влияние последнего еще на трёх видах бактерий, чтобы понять, имеют ли наши результаты общебиологическое значение. Полученные данные суммированы на рис. 2. Из него следует, что поведение БХл под действием синглетного кислорода у трёх видов бактерий (*Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum* и *Ect. haloalkaliphila*) однотипно:

- 1) контрольный свет без БР практически не действует на БХл в мембранах с каротиноидами или на БХл в аналогичных образцах без каротиноидов;
- 2) БХл в образцах с каротиноидами более подвержен окислению синглетным кислородом, чем в бескаротиноидных образцах.

Из этого ряда выпадают результаты с мембранами *Alc. vinosum* МГУ, у которых повышена чувствительность к действию используемого света без БР и БХл бескаротиноидных (ДФА-) образцов легче окисляется синглетным кислородом, чем в контроле. Во всех случаях появление продуктов окисления БХл (хлорины) можно зарегистрировать не только спектрально, но и методом ВЭЖХ (рис. 3). Основным окисленным продуктом является 3-ацетил-хлорофил, но могут обнаруживаться и другие продукты, которые похожи по спектру поглощения (рис. 3, врезка), но отличаются по времени выхода с колонки.

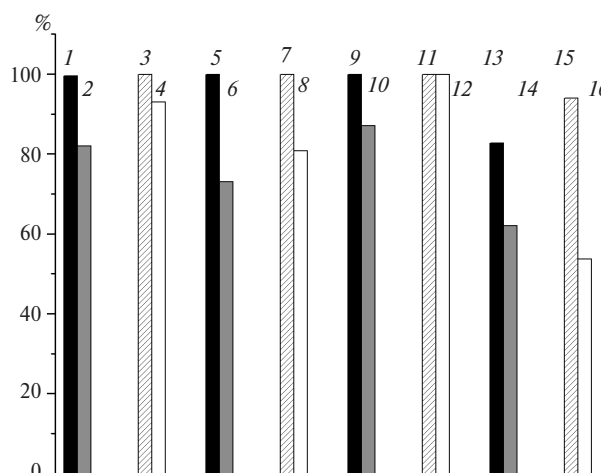


Рис. 2. Выцветание БХл850 в мембранах серных бактерий при облучении 30 мин. Контроль (без БР): 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15; в присутствии 50 мкМ БР: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16. Бактерии: дикий тип *Rba. sphaeroides* (1, 2); бескаротиноидный мутант *Rba. sphaeroides* R26.1; (3, 4) дикий тип *Rsp. rubrum* (5, 6); бескаротиноидный мутант *Rsp. rubrum* G9 (7, 8); *Ect. haloalkaliphila* (9, 10); ДФА-*Ect. haloalkaliphila* (11, 12); дикий тип *Alc. vinosum* МГУ (13, 14), ДФА-*Alc. vinosum* МГУ (15, 16).

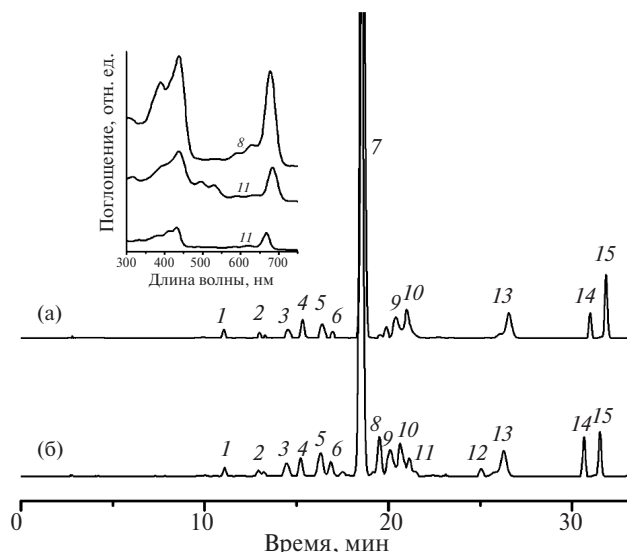


Рис. 3. ВЭЖХ анализ пигментов в контрольных мембранах *Ect. haloalkaliphila* до (а) и после 30 мин облучения в присутствии 50 мкМ БР (б). Идентификация пиков: 1–7 — БХл и его производные; 8 — 3-ацетил-хлорофилл; 9 — родопин; 10 — спириллоксантин; 11 и 12 — производные 3-ацетил-хлорофилла; 13 — ангидрородовибрин; 14 — бактериофеофитин; 15 — ликопин. Врезка: Спектры поглощения 3-ацетил-хлорофилла и его производных (номера спектров соответствуют номерам пиков на хроматограммах).

В данной работе мы смоделировали условия, которые могут наблюдаться в клетках пурпурных бактерий, особенно у бескаротиноидных мутантов, при кислородном стрессе, связанные с образованием синглетного кислорода и окислением БХл, как в классической работе [1]. Применённая нами система состояла из трёх компонентов: мембран с пигмент-белковыми комплексами, кислорода и БР — фотосенсибилизатора синглетного кислорода. Последний имеет короткое время жизни в водных растворах, которое существенно возрастает в липидной фазе (мембранах). В подобных условиях синглетный кислород может выходить из клетки или даже передаваться из клетки в клетку [6]. Понятно, что в используемой нами системе путь синглетного кислорода от БР до БХл существенно короче, чем в цитируемых работах. Следует отметить на примере мембран с каротиноидами из *Rba. sphaeroides* и *Alc. vinosum* МГУ (рис. 1 и 2), что синглетный кислород способен окислять БХл в этих образцах.

Мембраны бактерий, используемых в данной работе, содержали стандартные комплексы LH2 (8 гетеродимеров) из *Ect. haloalkaliphila* и *Rba. sphaeroides*, псевдо-LH2-комплекс типа В860 из *Rba. sphaeroides* R26.1, а также стандартные комплексы LH1 у всех этих бактерий, включая *Rsp. rubrum* и её

бескаротиноидный штамм G9. Бактерия *Alc. vinosum* МГУ содержала нестандартный LH2-комплекс (гетерогенная полоса при 800 нм, 12 гетеродимеров) [7, 8]. У серных бактерий бескаротиноидные образцы были получены их выращиванием с ингибитором каротиноидгенеза ДФА. Это самый полный набор образцов с каротиноидами и без каротиноидов из фотосинтезирующих бактерий, которые доступны в настоящее время. Все LH-комплексы вели себя одинаково при действии синглетного кислорода: полоса поглощения в ближней ИК-области выцветала, и появлялись продукты окисления БХл. Только у *Rba. sphaeroides* одновременно выцветала полоса при 800 нм. Комплексы без каротиноидов в мембранах трёх штаммов серных и несерных бактерий (*Ect. haloalkaliphila*, *Rba. sphaeroides* и *Rsp. rubrum*) более устойчивы к действию синглетного кислорода по сравнению с комплексами, выделенными из клеток дикого типа с каротиноидами. Аналогичные результаты были получены нами ранее при освещении красным светом ($\lambda > 700$ нм, интенсивностью 2000 Вт/м²) аналогичных образцов: различия в выцветании длинноволновой полосы поглощения комплексов с/без каротиноидов составили 0–1% для комплексов LH1-RC и 1–8% для комплексов LH2 соответственно [9]. Окисление БХл850 в комплексе LH2 было на 10% быстрее в ДФА-мембранах *Alc. vinosum* МГУ, чем в контроле. Данный эффект может быть связан с потерей стабильности структуры комплекса LH2 в отсутствие каротиноидов [10]. Таким образом, мы получили результаты, которые свидетельствуют о том, что БХл в бескаротиноидных образцах у трёх видов бактерий был более устойчив к действию синглетного кислорода по сравнению с БХл контрольных образцов. Они противоречат современной теории о защитной функции каротиноидов, связанной с их взаимодействием с синглетным кислородом и его тушением.

В качестве источника синглетного кислорода у фотосинтезирующих бактерий рассматривается БХл. Он, как и другие компоненты LH-комплексов (каротиноиды, полипептиды), уложен в достаточно жёсткую структуру комплексов, которая сбалансирована для передачи энергии возбуждения или её тушения. Кислород в эту систему попадает за счёт диффузии. Мы не знаем пространственной организации реакции БХл–кислород. Однако если синглетный кислород образовался в комплексе в результате взаимодействия с БХл, то его основной мишенью является сам БХл. Объективные факторы для направленного движения синглетного кислорода к молекуле каротиноида с последующим его туше-

нием отсутствуют. Он легко может выйти за пределы комплекса или даже клетки. Поэтому синглетный кислород рассматривается в последнее время как сигнальная молекула [11]. Если же он снова диффундирует в комплекс, то фактически его можно рассматривать как внешний синглетный кислород. Этот случай совпадает с используемой нами системой подачи синглетного кислорода к комплексам.

Впервые защитная функция каротиноидов (от действия синглетного кислорода) была предложена [1]. В настоящее время эта гипотеза общепринята и широко цитируется [2, 12, 13]. Обычно рассматриваются два аспекта проблемы: тушение триплетных состояний БХл каротиноидами *in vivo* или тушение синглетного кислорода каротиноидами. Тем не менее прямых доказательств второй части этой гипотезы для бактериальных LH-комплексов в литературе не представлено. Анализ литературных данных позволил выявить работу [14], которая не анализировалась в рамках рассматриваемой гипотезы. Она была проведена в той же лаборатории, что и [1]. В ней представлены результаты двух экспериментов, которые опровергают выводы о защитной функции каротиноидов [1]. Первый эксперимент с “десенсибилизированными” клетками сине-зелёного мутанта, при котором через культуру в темноте пропускали смесь 95% воздуха + 5% CO₂. После 5 мин аэрации культура помещалась на свет. Процесс разрушения клеток в такой культуре имел временную задержку около 45 мин. Ясно, что процессы генерации ¹O₂ и окисления БХл должны начинаться сразу после включения света и не требуют лаг-фазы. Второй эксперимент связан с зависимостью процесса разрушения клеток от температуры. Разрушение клеток мутанта в аэробных условиях замедляется на ~25% при понижении температуры от 30 до 20 °С, а дальнейшее снижение температуры до 6 °С вызывает его остановку. Процессы поглощения света, генерации синглетного кислорода и окисления БХл не зависят от температуры в указанном интервале. Следует подчеркнуть, что защитная функция каротиноидов в цитируемой статье не рассматривалась [14].

Оставался неясным один вопрос: за счёт чего происходило уменьшение (окисление) количества БХл в клетках сине-зелёного мутанта *Rba. sphaeroides* в анаэробных условиях в работе [1]. Известно, что БХл в модельных системах легко окисляется под действием света в присутствии кислорода [15]. Мы предположили, что в мутантах пурпурных бактерий в аэробных условиях на свету происходит разрушение комплексов и появление мономерного БХл,

который затем окисляется. Чтобы проверить это предположение, мы провели дополнительный эксперимент на мембранах, в которых комплексы были на 60–70% разрушены с образованием мономерного БХл (поглощение при 780 нм). Затем образец подвергался облучению белым светом или светом ~550–580 нм в присутствии БР. В обоих случаях отмечено быстрое окисление мономерного БХл, а БХл, принадлежащий к сохранившейся части комплексов, практически не окислялся (результаты не показаны). Появление мономерного БХл в комплексе (мембране, клетке) может происходить только вследствие разрушения его структуры после включения клеткой программы апоптоза. Очевидно, что в работе [1] наблюдался именно такой процесс. Согласно нашим данным, БХл у бескаротиноидных мутантов более устойчив к действию синглетного кислорода, чем у контрольных образцов. По-видимому, утверждение, что каротиноиды необходимы для защиты БХл от синглетного кислорода в бактериальных светособирающих комплексах требует как минимум получения новых прямых доказательств этого феномена.

Источники финансирования. Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ (18–04–00684–а, 18–34–00416–мол_а, 17–04–00929–а). Представленные на рис. 3 результаты получены в рамках Государственного задания № АААА–А17–117030110140–5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Griffith M., Sstrom W.R., Cohen-Bazire G., Stanier R.Y. Functions of Carotenoids in Photosynthesis // Nature. 1955. V. 176. P. 1211–1215.
2. Cogdell R.J. and Frank H.A. How Carotenoids Function in Photosynthetic Bacteria // Biochem Biophys Acta. 1987. V. 895. P. 63–79.
3. Arellano J.B., Yousef Y.A., Melø T.B., Mahamad S.B.B., Cogdell R.J., Naqvi K.R. Formation and Geminate Quenching of Singlet Oxygen in Purple Bacterial Reaction Center // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 2007. V. 87. P. 105–112.
4. Uchoa A.F., Knox P.P., Turchielle R., Seifullina N.Kh., Baptista S.M. Singlet Oxygen Generation in the Reaction Centers of *Rhodobacter sphaeroides* // Eur. Biophys. J. 2008. V. 37. P. 843–850.
5. Ashikhmin A., Makhneva Z., Moskalenko A. The LH2 Complexes are Assembled in the Cells of Purple Sulfur Bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with Inhibition of Carotenoid Biosynthesis // Photosynth. Res. 2014. V. 119. P. 291–303.

6. Maisch T., Baier J., Franz B., Maier M., Landthaler M., Szeimies R.-M., Bäuml W. The Role of Singlet Oxygen and Oxygen Concentration in Photodynamic Inactivation of Bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 7223–7228.
7. Bahatyrova S., Frese R.N., Siebert C.A., Olsen J.D., van der Werf K., van Grondelle O.R., van Niederman R.A., Bullough P.A., Otto C., Hunter C.N. The Native Architecture of a Photosynthetic Membrane // Nature. 2004. V. 430. P. 1058–1062.
8. Löhner A., Carey A.M., Hacking K., Picken N., Kelly S., Cogdell R., Köhler J. The Origin of the Split B800 Absorption Peak in the LH2 Complexes from *Allochrochromatium vinosum* // Photosynth Res. 2015. V. 123. P. 23–31.
9. Торопыгина О.А., Махнева З.К., Москаленко А.А. Кластерам бактериохлорофилла не требуются каротиноиды для защиты от фотоокисления в светособирающих комплексах фотосинтезирующих бактерий // ДАН. 2003. Т. 391. С. 828–831.
10. Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Heterogeneity of Carotenoid Content and Composition in LH2 of the Sulphur Purple Bacterium *Allochrochromatium minutissimum* Grown under Carotenoid-Biosynthesis Inhibition // Photosynth. Res. 2008. V. 98. P. 633–641.
11. Berghoff B.A., Glaeser J., Nuss A.M., Zobawa M., Lottspeich F., Klug G. Anoxygenic Photosynthesis and Photooxidative Stress: a Particular Challenge for *Roseobacter* // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 775–791.
12. Cogdell R.J., Howard T.D., Bittl R., Schlodder E., Geisenheimer I., Lubitz W. How Carotenoids Protect Bacterial Photosynthesis // Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 2000. V. 355. P. 1345–1349.
13. Šlouf V., Cháber P., Olsen J.D., Martin E.C., Qian P., Hunter C.N., Polívka T. Photoprotection in a Purple Phototrophic Bacterium Mediated by Oxygen-Dependent Alteration of Carotenoid Excited-State Properties // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 8570–8575.
14. Dworkin M. Endogenous Photosensitization in a Carotenoidless Mutant of *Rhodospseudomonas spheroides* // J. Gen. Physiol. 1958. V. 41. P. 1099–1112.
15. Limantara L., Koehler P., Wilhelm B., Porra R.J., Scheer H. Photostability of Bacteriochlorophyll a and Derivatives: Potential Sensitizers for Photodynamic Tumor Therapy // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. P. 770–780.

BACTERIOCHLOROPHYLL INTERACTION WITH SINGLET OXYGEN IN MEMBRANES OF PURPLE PHOTOSYNTHETIC BACTERIA: DOES THE PROTECTIVE FUNCTION OF CAROTENOIDS EXIST?

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

Institute of Basic Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS V.A. Shuvalov November 8, 2018

Received November 8, 2018

The direct action of singlet oxygen on the bacteriochlorophyll (BChl) of light-harvesting complexes in the membranes of four types of purple non-sulfur and sulfur photosynthesizing bacteria with and without carotenoids has been studied. It has been found that BChl in carotenoid-less samples is generally more resistant to the action of singlet oxygen compared to the control. It is assumed that carotenoids are not needed to protect BChl of bacterial light-harvesting complexes from singlet oxygen, and in the classic work of Griffith et al. [1] the apoptosis process in carotenoid-less mutant cells, which involves the destruction of complexes, the appearance of monomeric BChl and generation of singlet oxygen caused by BChl, followed by BChl oxidation, was mistakenly attributed to the protective function of carotenoids

Keywords: bacteriochlorophyll, carotenoids, singlet oxygen, light-harvesting complexes, Rose bengal.