

УДК 577.355.2:577.2

**КОМПЛЕКСЫ LH2 (B800-850 И B800-830) СОБИРАЮТСЯ  
В КЛЕТКАХ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *Thiorhodospira sibirica*,  
ШТАММ Kir-3, БЕЗ КАРОТИНОИДОВ**

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

Представлено академиком РАН В.А. Шуваловым 08.11.2018 г.

Поступило 28.03.2019 г.

Изучен результат сборки светособирающих комплексов в клетках пурпурной серной бактерии *Thiorhodospira (T.) sibirica*, штамм Kir-3, при подавлении биосинтеза каротиноидов дифениламином (ДФА). Из полученных клеток были выделены комплексы LH2 (B800-850 и B800-830) с разным составом каротиноидов. Максимального ингибирования биосинтеза каротиноидов (~90% от контроля) удалось добиться при концентрации ингибитора 53,25 мкМ (9 мг/л). Установлено, что изменения в качественном и количественном составе каротиноидов не влияют на сборку комплексов B800-830 и B800-850. Предполагается, что в популяции ДФА-комплексов LH2 из *T. sibirica*, штамм Kir-3, могут собираться как бескаротиноидные комплексы, так и комплексы, содержащие одну-две молекулы каротиноидов. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что каротиноиды не требуются для сборки комплексов B800-850 и B800-830.

*Ключевые слова:* каротиноиды, подавление биосинтеза, каротиноидов, HPLC, пигмент-белковые комплексы, пигмент-содержащие мембраны, дифениламин.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524876701-705>

Фотосинтез — один из фундаментальных процессов на Земле. Изучение этого процесса и структур, в которых он протекает, — одна из важнейших задач фотобиологии. Удобным объектом для таких исследований является фотосинтетический аппарат пурпурных бактерий, поскольку он организован максимально просто и состоит из периферического антенного комплекса LH2, прицентрового антенного комплекса LH1 и реакционного центра RC [1]. Показано, что сборка светособирающих комплексов проходит в периферийной цитоплазматической мембране бактерий. Затем путём инвагинации этой мембраны комплексы переносятся внутрь клетки с образованием внутрицитоплазматических мембран (хроматофор) [2].

Механизмы сборки светособирающих комплексов *in vivo* до сих пор не установлены, однако понятно, что для осуществления этого процесса должны совмещаться биосинтезы  $\alpha$ - и  $\beta$ -полипептидов, бактериохлорофилла БХл и каротиноидов [1, 3, 4]. Установлено, что бескаротиноидные мутанты несерных бактерий лишены комплекса LH2. Например, у мутанта *Rba. sphaeroides* R26 комплекс LH2 отсутствует. Известна модификация такого

мутанта — *Rba. sphaeroides* R26.1, в котором комплекс LH1 заменяется на псевдо-LH2-комплекс, который теряет место связывания БХл800, а длинноволновый максимум БХл850 смещается на 10–15 нм в длинноволновую область. Этот комплекс по спектральным характеристикам становится больше похож на комплекс LH1, чем на LH2 [5]. Аналогичные результаты были получены для транспозоновых мутантов *Rba. sphaeroides* по генам *crtE* (геранилгеранил-пирофосфат синтетаза), *crtI* (фитоиндесатураза) и *crtB* (фитоинсинтетаза), кодирующим начальные стадии биосинтеза каротиноидов [6]. Поэтому предполагается, что каротиноиды являются обязательным компонентом для сборки светособирающих комплексов LH2 у пурпурных несерных бактерий [1–5].

Ранее в нашей лаборатории было показано, что у некоторых серных бактерий возможна сборка комплексов LH2 без участия каротиноидов [7, 8]. В этих работах был использован метод ингибирования биосинтеза каротиноидов с помощью дифениламина (ДФА). С его помощью удаётся подавить биосинтез каротиноидов при сохранении в клетках полного набора светособирающих комплексов LH1 и LH2 с нативными спектральными характеристиками. Однако такие результаты были получены только для двух видов пурпурных серных бактерий: *Allochroa-tium (Alc.) vinosum*, штамм МГУ (старое название *Alc.*

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

\*E-mail: [lfbv22@gmail.com](mailto:lfbv22@gmail.com)

\*\*E-mail: [AshikhminAA@gmail.com](mailto:AshikhminAA@gmail.com)

*minutissimum*), и *Ectothiorhodospira (Ect.) haloalkaliphila*) [8, 9]. Поэтому представляло интерес провести поиск других бактерий, у которых ДФА способен полностью подавлять биосинтез каротиноидов. В данной работе было изучено следующее: 1) возможность получения бескаротиноидных комплексов из клеток пурпурной серной бактерии *Thiorhodospira (T.) sibirica*, Kir-3, которая содержит два типа комплексов LH2: В800-850 и В800-830; 2) как изменение состава каротиноидов влияет на сборку этих комплексов.

Работа проведена на культуре *T. sibirica*, штамм Kir-3. Клетки выращивали на модифицированной среде Ормерода при температуре 27–30 °С [10]. Для ингибирования биосинтеза каротиноидов в среду культивирования добавляли 18; 36; 53 и 71 мкМ (3; 6; 9 и 12 мг/л) ДФА. Мембраны и комплексы, выделенные из клеток, выращенных в присутствии ДФА, в дальнейшем обозначены как ДФА-мембраны и ДФА-комплексы. Методики выделения пигмент-белковых комплексов описаны в [11]. Поскольку комплексы В800-830 и В800-850 имеют близкую электрофоретическую подвижность, то для их разделения использовали хроматографию на колонке с DEAE-TOYOPEARL 650 S [12]. Выделенные мембраны и комплексы хранили при температуре –18 °С. Анализ каротиноидов проводили методом ВЭЖХ [8, 9, 12]. Спектры поглощения регистрировали при комнатной температуре на спектрофотометре Cary 50, а спектры флуоресценции (800–870 нм) и возбуждения флуоресценции — на спектрофлуориметре Cary Eclips.

Из мембраны *T. sibirica*, штамм Kir-3, были выделены три комплекса: В800-830, В800-850 и LH1-RC. Спектры поглощения первых двух комплексов приведены на рис. 1.  $Q_y$ -переходы БХл комплекса В800-830 локализованы при 793 и 827 нм, а в комплексе В800-850 при 790 и 852 нм. В рассматриваемых комплексах LH2 не наблюдается расщепление полосы БХл на два компонента при 800 нм, как у *Alc. minutissimum* [13]. По спектральным характеристикам в ближней ИК-области они больше похожи на комплексы LH2 из *Rhodospirillum (Rs.) molishianum* и *Ect. haloalkaliphila* [1, 3, 9]. Сходство спектральных характеристик позволяет предположить, что основу структуры в исследуемых комплексах, как и в указанных бактериях, составляют 8 пар  $\alpha/\beta$ -гетеродимеров.

В каротиноидной области спектры поглощения комплексов В800-850 и В800-830 практически идентичны (рис. 1), что связано с близким каротиноидным составом (табл. 1). В обоих комплексах содер-

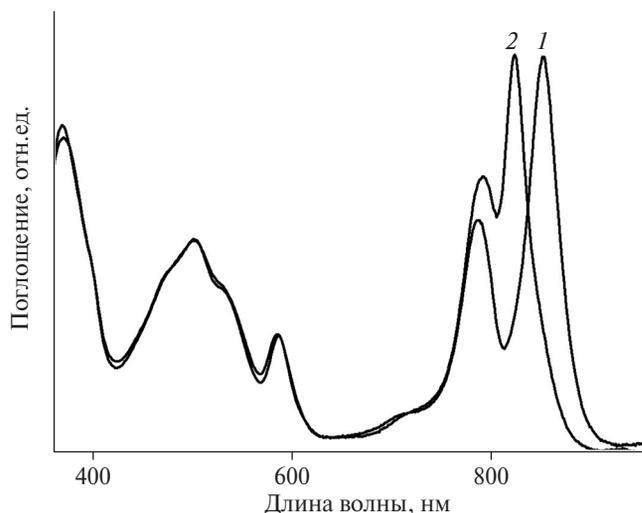


Рис. 1. Спектры поглощения комплексов, выделенных из мембран *T. sibirica*, штамм KIR-3: В800-850 (1) и В800-830 (2). Спектры нормированы по  $Q_y$ -полосе БХл (590 нм).

жатся практически одинаковые количества родопина, дидегидрородопина и ангидрородовибрина, а небольшое различие заключается только в разном содержании спириллоксантина (табл. 1). В комплексе LH1-RC (спектр поглощения не показан) количество спириллоксантина было в 7–12 раз больше, чем в комплексах LH2 (В800-850 и В800-830), а родопина на 25–30% меньше (табл. 1).

Ранее аналогичное распределение спириллоксантина и родопина между комплексами LH2 и LH1 было показано для *Alc. vinosum*, штамм МГУ: в комплексе LH2 содержание спириллоксантина было 4,6%, а в комплексе LH1-RC — 66,5% [14]. В этой работе на основании состава каротиноидов и результатов по встраиванию каротиноидов в ДФА-комплексы было высказано предположение, что *in vivo* комплексы LH2 и LH1 обслуживаются разными ансамблями ферментов каротиноидгенеза, синтезирующими преимущественно родопин и спириллоксантин. По результатам анализа состава каротиноидов комплексов из *T. sibirica*, штамм Kir-3, можно предположить, что у этой бактерии имеется пространственное разделение двух биосинтезов (родопина и спириллоксантина).

Отметим, что *T. sibirica*, штамм Kir-3, не реагирует изменением спектральных характеристик на модификацию состава среды культивирования или условий освещения, также как и *Alc. vinosum*, штамм МГУ. Однако в клетках последней собирается только комплекс LH2 типа В800-850. У этого комплекса наблюдается смещение полосы БХл850 в “синюю” область (с 855 до 845–815 нм) при действии различных агентов (детергенты, спирты и т.д.), нарушаю-

**Таблица 1.** Каротиноидный состав (мол.%) комплексов B800-830 и B800-850, выделенных из клеток *T. sibirica*, штамм KIR-3, дикого типа и клеток, выращенных в присутствии 18, 36 и 53 мкМ ДФА

Каротиноид	Контроль		18 мкМ ДФА		36 мкМ ДФА		53 мкМ ДФА	
	B850	B830	B850	B830	B850	B830	B850	B830
ζ-каротин	–	–	–	–	3,4	–	3,3	2,9
ОН-ζ-каротин	–	–	–	–	–	–	0,7	0,4
Нейроспорин	–	–	–	–	–	–	0,6	0,5
ОН-нейроспорин	–	–	9,4	14,0	29,2	22,3	4,0	3,1
Ликопин	–	–	2,6	1,1	13,9	13,0	0,1	0,1
Родопин	30,8	30,8	43,3	31,4	6,6	9,1	0,7	1,2
Дидегидрородопин	6,0	5,4	2,6	–	–	–	Следы	Следы
Ангидрородовибрин	58,4	53,5	21,0	21,7	1,9	5,6	0,6	1,8
Спириллоксантин	4,7	10,3	1,1	6,8	–	–	–	–
СКК	0	0	20	25	45	50	90	90

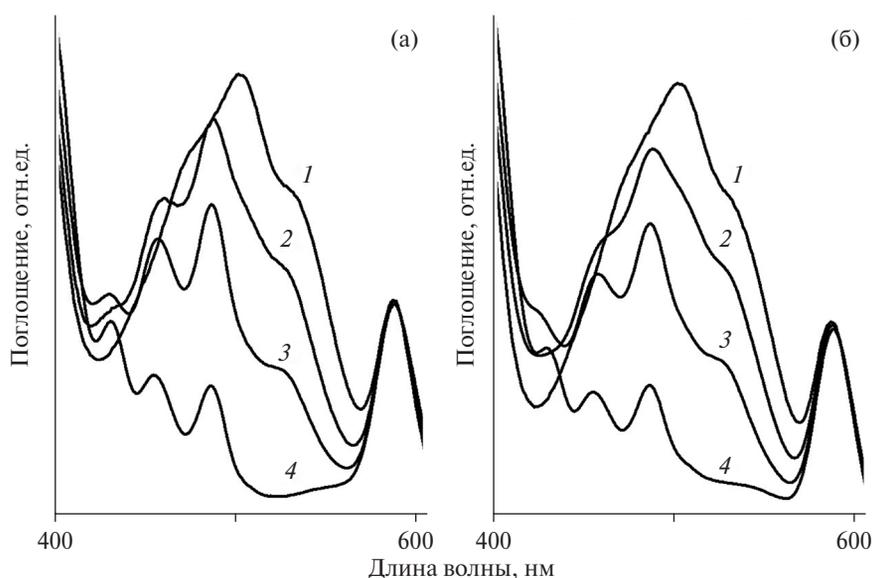
Примечание. СКК — свободные каротиноидные карманы. Прочерк — каротиноиды не обнаружены.

ших электростатические и гидрофобные взаимодействия. В мембранах *T. sibirica*, штамм Kir-3, всегда обнаруживаются два типа комплексов LH2 — коротковолновый (B800-830) и длинноволновый (B800-850). Поэтому можно предположить, что у *Alc. vinosum*, штамм МГУ, in vivo есть только одно место для сборки комплекса LH2, тогда как у *T. sibirica*, штамм Kir-3, вероятно, их два: для B800-850 и B800-830.

При низких концентрациях ДФА (17,75 и 35,5 мкМ или 3 и 6 мг/л) содержание каротиноидов в клетках (мембранах) *T. sibirica*, штамм Kir-3, составляло 20 и 50% соответственно. Максимального ингибирования биосинтеза каротиноидов для данной культуры удалось добиться при концентрации 53 мкМ (9 мг/л) ДФА. В этих условиях клеточная биомасса увеличивалась медленно и стационарная

фаза роста клеток наступала только на 16-е сутки. Содержание каротиноидов в ДФА-мембранах, выделенных из этих клеток, составило по нашим расчётам  $\leq 10\%$ . Эти результаты существенно отличаются от данных, полученных для *Alc. vinosum*, штамм МГУ, и *Ect. haloalkaliphila*, у которых 99%-е ингибирование биосинтеза каротиноидов обычно достигается при концентрации 71 мкМ (12 мг/л) ДФА [8, 9]. Однако при этой концентрации ингибитора клетки *T. sibirica* не росли.

Из всех ДФА-клеток были выделены ДФА-комплексы B800-850 и B800-830, у которых наблюдался сдвиг максимумов полос поглощения каротиноидов в коротковолновую область за счёт изменения каротиноидного состава (рис. 2, табл. 1). В ДФА-комплексах B800-850 и B800-830 с 50%-м содержанием



**Рис. 2.** Спектры поглощения комплексов B800-830 (а) и B800-850 (б), выделенных из клеток *T. sibirica*, штамм KIR-3, дикого типа (1) и клеток, выращенных в присутствии 12 (2), 36 (3) и 53 (4) мкМ ДФА. Спектры нормированы по  $Q_x$ -полосе БХл (590 нм).

каротиноидов в 2–3 раза по сравнению с контролем снижается синтез спириллоксантина и ангидрородовибрина. При этом появляются каротиноиды, которые отсутствуют в контрольных мембранах: ОН-нейроспорин (9,4–14,0%) и ликопин (2,6–1,1%) (табл. 1). В комплексах В800–850 и В800–830 с содержанием каротиноидов 20 и 10% отсутствует спириллоксантин, а количество каротиноидов из поздних или ранних этапов биосинтеза не превышает 1–2%. Основную массу каротиноидов в этих случаях составляют промежуточные продукты работы фитоиндесауразы: ζ-каротин, нейроспорин и их гидроксипроизводные (табл. 1).

Хорошо известно, что в комплексах LH2 пурпурных бактерий один α/β-гетеродимер нековалентно связывает только одну молекулу каротиноида [1–4]. Если комплексы *T. sibirica* состоят из 8 α/β-гетеродимеров, то полностью сформировавшиеся комплексы из *T. sibirica* содержат 8 молекул каротиноидов. Таким образом, 100 контрольных комплексов LH2 должны содержать 800 молекул каротиноидов. В ДФА-комплексах LH2 с максимальным ингибированием каротиноидгенеза на 100 комплексов приходится всего 80 молекул каротиноидов. Следовательно, только 80 ДФА-LH2 комплексов из 100 содержат по одной молекуле каротиноида и 20 ДФА-LH2 комплексов — ни одной. Можно предположить, что существуют два пула комплексов: первый без каротиноидов и второй — с некоторым содержанием каротиноидов, по-видимому, с одной и более молекулами каротиноидов на комплекс. Полученные результаты совпадают с обнаруженной нами ранее гетерогенностью по каротиноидному составу комплексов LH2 в ДФА-мембранах разных бактерий [8, 15]. Например, из ДФА-клеток *Rbl. acidophilus* были выделены комплексы ДФА-В800–850 с ~46%-м содержанием каротиноидов. Опыты по изучению термостабильности комплексов LH2 позволили выделить фракцию этих комплексов со средним содержанием каротиноидов 90%, тогда как фракция комплексов LH2 с содержанием каротиноидов менее одной молекулы на один комплекс была разрушена. Таким образом, мы считаем, что полученные результаты являются доказательством того, что комплексы у *T. sibirica* могут собираться без каротиноидов и что последние не являются ключевой молекулой для сборки комплексов LH2.

Процесс сборки комплексов LH2 *in vivo* практически не изучен, однако известно, что при мутациях в генах *crtE*, *crtI* и *crtB* подобные комплексы в клетках не собираются [6]. Следует отметить, что в мутантах биосинтез каротиноидов работает по принципу “всё или ничего”: мутанты, сохраняющие

каротиноиды более ранних стадий биосинтеза, сохраняют 100%-й синтез этих каротиноидов. У клеток, выращенных в присутствии ингибитора, изменяется состав каротиноидов и их количество в расчёте на один комплекс (до 0–1 молекулы). Поэтому возникает резонный вопрос: сколько каротиноидов нужно для сборки одного комплекса LH2? Данные с ингибиторами показывают, что сборка комплекса LH2 происходит в присутствии 3–4 молекул каротиноидов на один комплекс у несерных бактерий и 0–1 молекулы пигмента у серных бактерий. Фактически это может означать, что каротиноиды являются вторичным компонентом при сборке комплексов и не требуются для его сборки *in vivo*. Разница в конечном результате мутации биосинтеза каротиноидов и действия ингибитора может быть связана с тем, что в первом случае выключается цепочка: ген (*crtC*, *crtA*, *crtD*) — фермент биосинтеза каротиноида — ансамбль ферментов этого биосинтеза — каротиноид. Во втором случае выключается только последнее звено этой цепочки. Это позволяет нам сделать вполне обоснованное предположение о том, что ансамбль ферментов биосинтеза каротиноидов может участвовать в формировании места сборки комплексов типа LH2.

Вопрос о механизме сборки комплексов LH2 *in vivo* в настоящее время остаётся открытым и требует дальнейших исследований. Однако уже сейчас ясно, что каротиноиды не являются обязательным компонентом для корректной сборки этих комплексов.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность за предоставленную культуру проф. В.М. Горленко (ИНМИ РАН) и З.А. Журавлёвой (ИФПБ РАН) за помощь в выращивании бактерий.

**Источники финансирования.** Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проекты 18–34–00416\_мол\_а; 18–04–00684\_а; 17–04–00929\_а). Представленные в таблице результаты получены в рамках госзадания № АААА-А17–117030110140–5.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cogdell R.J., Gall A., Köhler J. The Architecture and Function of the Light-Harvesting Apparatus of Purple Bacteria: from Single Molecules to *in vivo* Membranes // Q. Rev. Biophys. 2006. V. 39. № 3. P. 227–324.
2. Niederman R.A. Structure, Function and Formation of Bacterial Intracytoplasmic Membranes. In: J.M. Shively. Complex Intracellular Structures in Prokaryotes // Microbiology Monographs. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. V. 2. P. 193–227.
3. Cogdell R.J., Fyfe P.K., Barrett S.J., Prince S.M., Freer A.A., Isaacs N.W., McGlynn P., Hunter C.N. The

- Purple Bacterial Photosynthetic Unit // *Photosynth. Res.* 1996. V. 48. P. 55–63.
4. *Gabrielsen M., Gardiner A.T., Cogdell R.J.* Eripheral Complexes of Purple Bacteria. In: F. Daldal., M.S. Thurnauer, J.T. Beatty, C.N. Hunter (Eds). *The purple phototrophic bacteria.* N.Y.: Springer, 2009. P. 135–153.
  5. *Davidson E., Cogdell R.J.* Reconstitution of Carotenoids into the Light-Harvesting Pigment-Protein Complex from the Carotenoidless Mutant of *Rhodospseudomonas sphaeroides* R26 // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. V. 635. P. 295–303.
  6. *Lang H.P., Cogdell R.G., Takaichi S., Hunter C.N.* Complete DNA Sequence, Specific Tn5 Insertion Map, and Gene Assignment of the Carotenoid Biosynthesis Pathway of *Rhodobacter sphaeroides* // *J. Bacteriology.* 1995. V. 177. P. 2064–2073.
  7. *Москаленко А., Бриттон Г., Коннор А., Йанг А., Торопыгина О.* Состав каротиноидов в хроматофорах и пигмент-белковых комплексах, выделенных из клеток *Chromatium minutissimum*, выращенных в присутствии дифениламина // *Биол. мембраны.* 1991. Т. 8. С. 249–260.
  8. *Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A.* Heterogeneity of Carotenoid Content and Composition in LH2 of the Purple Sulphur Bacterium *Allochro-matium minutissimum* Grown under Carotenoid-Biosynthesis Inhibition // *Photosynth. Res.* 2008. V. 98. P. 633–641.
  9. *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.
  10. *Ormerod J.G., Ormerod K.S., Gest H.* Light-Dependent Utilization of Organic Compounds and Photoproduction of Molecular Hydrogen by Photosynthetic Bacteria; Relationships with Nitrogen Metabolism // *Arch. of Biochemistry and Biophysics.* 1961. V. 94. P. 449–463.
  11. *Москаленко А.А., Ерохин Ю.Е.* Выделение пигмент-липопротеиновых комплексов из пурпурных бактерий методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле // *Микробиология.* 1974. Т. 43. С. 654–657.
  12. *Большаков М.А., Ашихмин А.А., Махнева З.К., Москаленко А.А.* Влияние света разного спектрального состава на рост клеток и пигментный состав мембран пурпурных серных бактерий *Allochro-matium minutissimum* и *Allochro-matium vinosum* // *Микробиология.* 2018. Т. 87. № 2. С. 136–145.
  13. *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 *Allochro-matium vinosum* // *Photosynth. Res.* 2015. V. 123. № 1. P. 23–31.
  14. *Большаков М.А., Ашихмин А.А., Махнева З.К., Москаленко А.А.* Встраивание спириллоксантина в пигмент-белковые комплексы LH2 и LH1-RC пурпурной серной бактерии *Allochro-matium minutissimum* // *Микробиология.* 2017. Т. 86. № 5. С. 538–550.
  15. *Большаков М.А., Ашихмин А.А., Махнева З.К., Москаленко А.А.* Периферийный светособирающий комплекс LH2 может собираться в клетках пурпурной несерной бактерии *Rhodoblastus acidophilus* без каротиноидов // *Биохимия.* 2015. Т. 80. № 9. С. 1420–1430.

## LH2 COMPLEXES (B800-850 AND B800-830) ARE ASSEMBLED IN THE CELLS OF SULFUR BACTERIUM *Thiorhodospira sibirica*, STRAIN Kir-3, WITHOUT ANY CAROTENOIDS

**M. A. Bolshakov, A. A. Ashikhmin, Z. K. Makhneva, 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 March 28, 2018

It has been studied the result of assembling the light-harvesting complexes in the cells of purple sulfuric bacterium *Thiorhodospira (T.) sibirica*, strain Kir-3, while suppressing biosynthesis of carotenoids by diphenylamine (DPA). LH2 complexes (B800-850 and B800-830) with different carotenoids' composition were isolated from the cells obtained. Maximal inhibition of carotenoid biosynthesis (~90% of the control) was achieved at the inhibitor concentration of 53,25 μM (9 mg/l). It has been established that changes in qualitative and quantitative composition of carotenoids do not affect the assembling of B800-830 and B800-850 complexes. It is assumed that in the population of DPA-LH2 complexes from *T. sibirica*, strain Kir-3, both carotenoidless complexes and the complexes, containing one or two carotenoid molecules, can be assembled. These results support a hypothesis that carotenoids are not required for assembling B800-850 and B800-830 complexes.

**Keywords:** carotenoids, inhibitor of carotenoid biosynthesis, HPLC, pigment-protein complexes, pigment-containing membranes, diphenylamine.