

УДК 576.809.514:541.147

## НОВЫЙ ТИП СВЕТОСОБИРАЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ОБНАРУЖЕН ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ *Rhodospseudomonas palustris* В УСЛОВИЯХ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА

© 2020 г. О. П. Сердюк<sup>1,\*</sup>, Л. Д. Смолыгина<sup>1</sup>, А. А. Ашихмин<sup>1</sup>

Поступило 16.12.2019 г.

После доработки 16.12.2019 г.

Принято к публикации 16.12.2019 г.

Преобладание максимума при 800 нм у светособирающего комплекса LH4 (B800) и при 850 нм у LH2 (B800-850) из *Rps. palustris* определяется составом  $\alpha\beta$ -полипептидов и пигментов. При низкой освещенности (LL) у *Rps. palustris*, штамм КМ 286 (1e5), наряду с LH4, синтезировался комплекс LL LH2 с одинаковым поглощением при 800 и 850 нм. Он отличался от LH4 и LH2 комплекса, который синтезируется при высокой освещенности, составом и содержанием каротиноидов (Car) и бактериохлорофилла *a* (BChl *a*). LH4 отличался от LL LH2 и LH2 дополнительным максимумом эмиссии при 766 нм в спектрах флуоресценции BChl *a*. Все три комплекса имели приблизительно одинаковый уровень (около 45%) эффективности переноса энергии от Car к BChl *a*. Выделение комплекса LL LH2 из *Rps. palustris* подтверждает гипотезу о синтезе у этих бактерий в условиях низкой освещенности других типов комплексов, кроме LH4, что обусловлено множественными генами биосинтеза  $\alpha\beta$ -полипептидов и возможностью их различных комбинаций.

**Ключевые слова:** фототрофные несерные бактерии, светособирающие комплексы, каротиноиды, низкая интенсивность света, *Rhodospseudomonas palustris*

**DOI:** 10.31857/S2686738920020237

### ВВЕДЕНИЕ

У фототрофной пурпурной бактерии *Rhodospseudomonas (Rps.) palustris* передачу солнечной энергии на реакционные центры (RC), в которых происходит первичное разделение зарядов и последующий перенос электронов по электрон-транспортной цепи, осуществляет светособирающий (LH) комплекс LH1 (B870), который, в свою очередь, получает энергию от хорошо изученного периферического комплекса LH2 (B800-850) [1, 2]. Пигмент-пигментные и пигмент-белковые взаимодействия определяют спектральные свойства комплексов, что создает градиент энергии и передачу ее в строго определенном направлении от комплекса к комплексу [3–5].

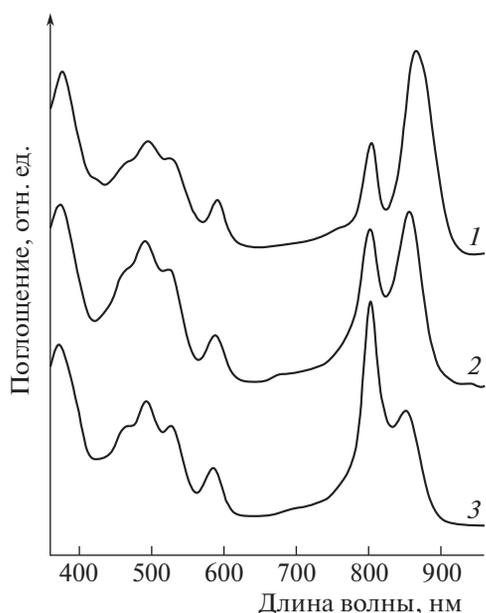
Считается, что у *Rps. palustris* комплекс LH2 с основным максимумом поглощения при 850 нм [1, 2] функционирует преимущественно в условиях высокой освещенности (HL), а комплекс LH4,

обозначенный как B800 по основному и единственному максимуму в спектре поглощения, синтезируется в условиях низкой освещенности (LL) [6, 7]. Известно, что у *Rps. palustris* комплексы LH2 и LH4 являются нонамерами и октамерами [7], состоящими из  $\alpha_{ab}\beta_{ab}$ - и  $\alpha_d\beta_d$ -полипептидов, соответственно, с нековалентно связанными бактериохлорофиллом *a* (BChl *a*) и каротиноидами (Car) [2, 6]. Однако недавно было показано [8, 9], что в LL условиях у комплекса LH4 помимо основного максимума при 800 нм обязательно присутствует минорный максимум при 850 нм, что обусловлено наличием в структуре LH4 комплекса не только  $\alpha_d\beta_d$ -полипептидов, но и отдельных цепей полипептидов LH2 комплекса.

В данной работе в LL условиях у *Rps. palustris* был обнаружен комплекс, обозначенный нами как LL LH2, который имел одинаковое поглощение при 800 и 850 нм, что отличало его от LH4 и LH2 комплексов. В задачи входило провести сравнительные исследования LL LH2 с комплексами LH4 и LH2 по спектральным свойствам, качественному и количественному составу Car и BChl *a*, флуоресценции BChl *a*, эффективности переноса энергии от Car к BChl *a*. На индивидуальных LL и HL комплексах из *Rps. palustris*,

<sup>1</sup> Институт фундаментальных проблем биологии  
Российской академии наук — обособленное подразделение  
ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИФПБ РАН), г. Пущино,  
142290 Россия

\*e-mail: serdyuko@rambler.ru



**Рис. 1.** Спектры поглощения LH комплексов, изолированных из хроматофоров бактерии *Rps. palustris* KM 286 (1e5), выращенной в условиях HL и LL освещенности: 1 – HL LH2 комплекс; 2 – LL LH2 комплекс; 3 – LL LH4 комплекс. Спектры нормализованы по полосе BChl *a* при 590 нм.

штамм KM 286 (1e5) такие исследования были выполнены впервые.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явилась фототрофная пурпурная несерная бактерия *Rps. palustris*, штамм KM МГУ 286 (1e5 strain, collection of Lehrstuhl für Mikrobiologie, Freiburg, FRG), предоставленная кафедрой микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова. Бактерии культивировали анаэробно фотогетеротрофно на среде Хатнера с сукцинатом аммония, pH 6.8, при низкой (50 лк) и высокой (2000 лк) освещенностях, при  $T = 30^{\circ}\text{C}$ .

Все LH комплексы выделяли из хроматофоров методом адсорбционной хроматографии на гидроксилapatите (ГА) по методике [10]. После уравнивания колонки 20 mM трис-HCl буфером, pH 7.8, комплекс LL LH4 элюировали этим же буфером. После промывания колонки 20 mM Na-P буфером до бесцветного элюата LL LH2 и HL LH2 комплексы элюировали 20 mM Na-P буфером с добавлением 0.25% Тритона X-100. Элюаты комплексов очищали ионообменной хроматографией на колонке с ДЭАЭ-фрактогелем<sup>(M)</sup> TSK 650 (“Merck”, США). Анализ пигментного состава комплексов LH2 проводили методом ВЭЖХ [11]. Идентификацию пигментов проводили по их спектрам поглощения и времени удержания на колонке. Спектры поглощения регистрировали

на спектрофотометрах Cary 50 (“Agilent Technology”, США) и Hitachi 557 (Япония). Спектры эмиссии и возбуждения флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (“Agilent Technology”). Эффективность передачи энергии от Car к BChl *a* определяли путем сравнения спектров возбуждения флуоресценции со спектрами поглощения, преобразованными в спектры 1-T, где T – это коэффициент пропускания. Спектры нормализовали по пику  $Q_x$ -перехода BChl при 590 нм. Все спектральные измерения проводили при комнатной температуре.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Rps. palustris* является одной из немногих фототрофных пурпурных бактерий, имеющих несколько копий рис генов, кодирующих апопротеины LH комплексов [2, 6, 12, 13]. Благодаря этому при адаптации бактерий к условиям освещенности возможны комбинации различных белков и пигментов в структуре LH комплексов, что и приводит к их спектральному разнообразию [7–9]. В исследованиях влияния освещенности на свойства LH комплексов используется широкий диапазон интенсивностей света от экстремально высоких (7000 лк) до ультранизких (5.5 лк) [2, 3, 8, 9]. Мы использовали освещенности 2000 лк (HL) и 50 лк (LL), при которых разница в уровне биосинтеза комплексов очевидна [6–8]. В этих условиях было получено три типа комплексов из хроматофоров *Rps. palustris*: хорошо изученные комплексы LH2 [1, 2] и LH4 [3, 4, 8, 9, 13] и вновь выделенный LL LH2 комплекс (рис. 1). Спектр поглощения комплекса LH2 (рис. 1, спектр 1) был идентичен для LH2, выделенному ранее из *Rps. palustris*, штамм 1e5 [2]. Комплекс LL LH4 (рис. 1, спектр 3) помимо единственного максимума при 800 нм, как предполагалось ранее по анализу кристаллической структуры с разрешением 7.5 Å [7], имел максимум при 850 нм. Комплекс LL LH2 (рис. 1, спектр 2) с приблизительно равным поглощением в максимумах 800 и 850 нм отличался спектрально от двух других комплексов.

Для описанного ранее комплекса LH4 с минорным максимумом при 850 нм методом масс-спектрометрии было показано, что в этом комплексе, наряду с  $\alpha_d\beta_d$ -полипептидами, присутствуют  $\alpha_a\beta_{ab}$ -полипептиды, характерные для LH2 комплекса [9]. Мы предполагаем, что полученный нами комплекс LL LH2 также может иметь специфический для него набор апопротеинов и будет отличаться от LH2 наличием  $\alpha_d\beta_d$ -полипептидов, а от LH4 комплекса, судя по существенно большей абсорбции при 850 нм, другой комбинацией  $\alpha\beta$ -полипептидов. Подтверждением различия у LL комплексов состава белков и пигментов может служить разница их связывания с ГА на колонке, о чем судили по элюции LL LH2

фосфатным буфером с детергентом, а LH4 трис-НСI буфером без детергента.

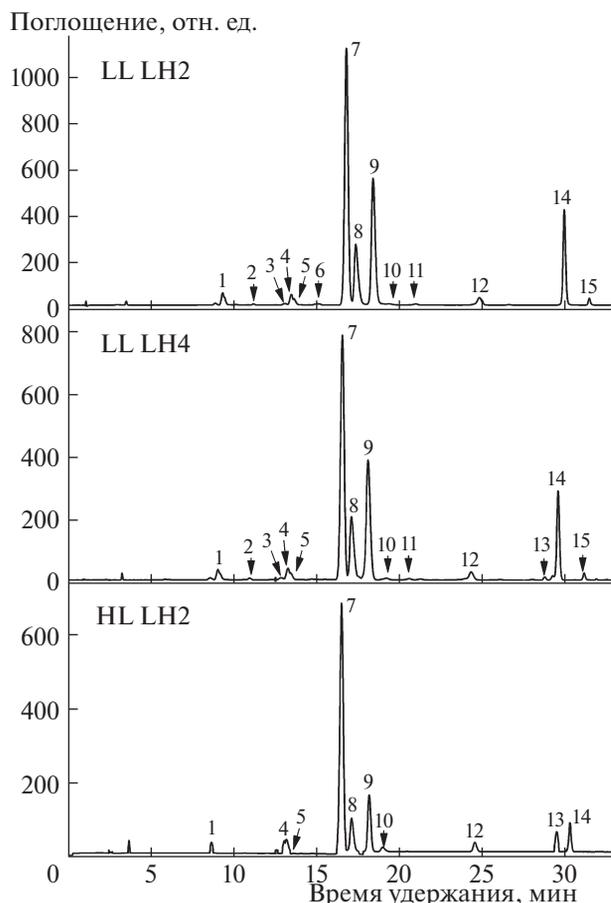
В исследуемом нами штамме *Rps. palustris* KM 286 (1e5) ранее были изучены свойства  $\alpha\beta$ -полипептидов в классическом LH2 комплексе [2] и до настоящего времени не было сведений о пигментном составе индивидуальных LH2 и LH4 комплексов. ВЭЖХ анализ пигментов всех трех типов комплексов показал существенные различия по составу или соотношению BChl *a* и Car (рис. 2). Комплексы LL отличались между собой по содержанию индивидуальных каротиноидов (табл. 1) и наличию у LL LH2 комплекса дополнительного пика BChl *a*. Все три комплекса отличались по соотношению BChl *a*: Car, вычисленному с учетом молярных коэффициентов экстинкции для BChl *a*  $76 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  и Car  $145 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , которое было равно для HL LH2  $75.4 \pm \pm 2:22.2 \pm \pm 0.6$  моль % (3.4), для LL LH2  $62.2 \pm \pm 3.1:37.8 \pm \pm 3.1$  моль % (1.7), для LL LH4  $69.2 \pm \pm 5.8:30.8 \pm \pm 5.8$  моль % (2.2).

Наблюдаемая разница в соотношении фотосинтетических пигментов у этих комплексов отражает гибкую адаптацию *Rps. palustris* к освещенности путем сборки LH комплексов из различных типов пептидов и пигментов.

Известно, что молекула каротиноида расположена между  $\alpha$ - и  $\beta$ -спиралями апопротеинов LH комплексов и, проходя перпендикулярно плоскости мембраны, вместе с фитольными хвостами молекул BChl стабилизирует структуру этих комплексов [1, 5]. В исследуемых нами комплексах во всех световых условиях в количественном отношении преобладал родопин (табл. 1), а в LL условиях почти вдвое увеличивалось содержание ликопина. Такую же тенденцию к накоплению ликопина в LL условиях, а родовибрина в HL условиях наблюдали в клетках *Rps. palustris*, штамм 42OL [14].

Анализ спектров флуоресценции LH комплексов показал присутствие максимума эмиссии флуоресценции при 868 нм, характерного для BChl *a* (рис. 2, пик 7). В спектре флуоресценции LH4 комплекса присутствовал дополнительный максимум при 766 нм, который, по-видимому, можно отнести к одному из BChl *a*, отображенному на ВЭЖХ хроматограмме минорными пиками (рис. 2). LL и HL комплексы, несмотря на различия по составу и соотношению Car и BChl *a*, были приблизительно равны между собой (около 45%) по эффективности переноса энергии от Car к BChl *a*, что предполагает выделение их в нативном состоянии и функциональность *in vivo*.

Таким образом, выделение LL LH2 комплекса подтверждает существующую гипотезу о возможности сборки в LL условиях у бактерий *Rps. palustris* не только LH4, но и других, отличных по



**Рис. 2.** Хроматограммы ВЭЖХ-анализа пигментов LH комплексов. Идентификация пиков: 1, 2, 4, 6, 7 – BChl *a*; 3 – диметилспириллоксантин; 5 – родовибрин; 8 – дидегидрородопин; 9 – родопин; 10 – спириллоксантин; 11 – ОН-нейроспорин; 12 – ангидрородовибрин; 13 – бактериофеофитин *a*; 14 – ликопин; 15 – нейроспорин.

структуре комплексов, благодаря их сборке из различных комбинаций полипептидов и пигментов.

**Таблица 1.** Качественный и количественный (моль %) состав каротиноидов LH и HL комплексов из хроматофоров *Rps. palustris*, выращенной в условиях HL и LL освещенности

Каротиноид	HL LH2	LL LH2	LL LH4
родовибрин	7.9	1.6	1.7
дидегидрородопин	27.2	22.5	24.3
родопин	39.4	46.4	45.4
спириллоксантин	5.8	0.2	следы
ангидрородовибрин	6.4	3.3	3.7
ликопин	13.4	23.5	22.1
диметилспириллоксантин	0	0.5	0.8
ОН-нейроспорин	0	0.5	0.4
нейроспорин	0	1.4	1.5

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ведущему сотруднику ИФПБ РАН М.С. Христину за научные консультации по методике очистки светособирающих комплексов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Представленные результаты получены в рамках госзадания № АААА-А17-117030110141-2. Данные по пигментному анализу и оценке эффективности передачи энергии от Car к BChl *a* получены при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект 18-04-00684\_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cogdell R.J., Gall A., and Köhler J.* The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes // Quarterly Reviews of Biophysics. 2006. V. 39. P. 227–324.
2. *Tadros M.H., Waterkamp K.* Multiple copies of the coding regions for the light-harvesting B800–850  $\alpha$ - and  $\beta$ -polypeptides are present in the *Rhodospseudomonas palustris* genome // EMBO Journal. 1989. V. 8. P. 1303–1308.
3. *He Z., Sundström V., Pullerits T.* Intermolecular hydrogen bonding between carotenoid and bacteriochlorophyll in LH2 // FEBS Lett. 2001. V. 496(1). P. 36–39.
4. *de Ruijter W.P.F., Oellerich S., Segura J.-M., Lawless A.M., et al.* Observation of the Energy-Level Structure of the Low-Light Adapted B800 LH4 Complex by Single-Molecule Spectroscopy // Biophysical Journal. 2004. V. 87. P. 3413–3420.
5. *Taniguchi M., Henry S., Cogdell R.G., Lindsey J.S.* Statistical considerations on the formation of circular photosynthetic light-harvesting complexes from *Rhodospseudomonas palustris* // Photosynth Res. 2014. V. 121. P. 49–60.
6. *Tharia H.A., Nichtingale T.D., Papiz M.Z., et al.* Characterisation of hydrophobic peptides by RP-HPLC from different spectral forms of LH2 isolated from *Rps. palustris* // Photosynthesis Research. 1999. V. 61. P. 157–167.
7. *Hartigan N., Tharia H.A., Sweeney F., M.Z. et al.* The 7.5 Å electron density and spectroscopic properties of a novel low-light B800 LH2 from *Rhodospseudomonas palustris* // Biophysical J. 2002. V. 82. P. 963–977.
8. *Brotosudarmo T.H.P., Kunz R., Bohm P., et al.* Single-Molecule Spectroscopy Reveals that Individual Low-Light LH2 Complexes from *Rhodospseudomonas palustris* 2.1.6. Have a Heterogeneous Polypeptide Composition // Biophysical J. 2009. V. 97 P. 1491–1500.
9. *Brotosudarmo T.H.P., Collins A.M., Gall A., et al.* The light intensity under which cells are grown controls the type of peripheral light-harvesting complexes that are assembled in a purple photosynthetic bacterium // Biochem. J. 2011. V. 440. P. 51–61
10. *Serdyuk O.P., Smolygina L.D., and Khristin M.S.* Membrane-Bound Bacteriophytochrome-Like Complex of Phototrophic Purple Non-Sulfur Bacterium *Rhodospseudomonas palustris* // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2018. V. 482. P. 284–287.
11. *Ashikhmin A., Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A.* Incorporation of spheroidene and spheroidenone into light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2017. V. 170. P. 99–107.
12. *Fixen K.R., Oda Y., Harwood C.S.* Clades of Photosynthetic Bacteria Belonging to the Genus *Rhodospseudomonas* Show Marked Diversity in Light-Harvesting Antenna Complex Gene Composition and Expression // mSystems. 2016. V. 1(1). P. e00006–15.
13. *Southall J., Henry S.L., Gardiner A.T., et al.* Characterisation of a *pucBA* deletion mutant from *Rhodospseudomonas palustris* lacking all but the *pucBA*d genes // Photosynth Res. 2018. V. 135. P. 9–21.
14. *Muzziotti D., Adessi A., Faraloni C., et al.* Acclimation strategy of *Rhodospseudomonas palustris* to high light irradiance // Microbiol Res. 2017. V. 197. P. 49–55.

**A NEW TYPE OF LIGHT-HARVESTING COMPLEX DETECTED WHEN GROWING *Rhodospseudomonas palustris* UNDER LOW LIGHT INTENSITY CONDITIONS**

**O. P. Serdyuk<sup>a, #</sup>, L. D. Smolygina<sup>a</sup>, and A. A. Ashikhmin<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Science (IBBP RAS), Pushchino, Moscow oblast, Russia*  
<sup>#</sup> *e-mail: serdyuko@rambler.ru*

Presented by Academician of the RAS V.A. Shuvalov

The predominance of the maximum at 800 nm for the light-harvesting complex LH4 (B800) and at 850 nm for LH2 (B800–850) from *Rps. palustris* is determined by the composition of  $\alpha\beta$ -polypeptides and pigments. In low light (LL) for *Rps. palustris*, strain KM 286 (1e5), along with LH4, the LL LH2 complex was synthesized with the same absorption at 800 nm and 850 nm. It differed from the LH4 and LH2 complex, which is synthesized under high illumination, in the composition and content of carotenoids (Car) and bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*). LH4 differed from LL LH2 and LH2 by an additional emission maximum at 766 nm in the BChl *a* fluorescence spectra. All three complexes had approximately the same level (about 45%) of the energy transfer efficiency from Car to BChl *a*. Isolation of LL LH2 complex from *Rps. palustris* confirms the hypothesis of the synthesis of these bacteria under low light conditions the other types of complexes, except LH4, which is due to the multiple biosynthesis genes of  $\alpha\beta$ -polypeptides and the possibility of their various combinations.

**Keywords:** phototrophic non-sulfur bacteria, light-harvesting complexes, carotenoids, low intensity of light, *Rhodospseudomonas palustris*