

## КОМПЛЕКС LH2 ИЗ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *Allochrodatum vinosum* — ПРИРОДНЫЙ СЕНСОР СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

© 2022 З.К. Махнева, Т.Н. Смолова, М.А. Большаков\*, А.А. Москаленко

ФИЦ ПНЦБИ, Институт фундаментальных проблем биологии РАН,  
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: lfbv22@gmail.com

Поступила в редакцию 01.06.2022

После доработки 19.08.2022

Принята к публикации 19.08.2022

Установлено, что в гетерогенной модельной системе, которая состояла из двух типов комплексов: реакционного центра или кор-комплекса фотосистемы 2 высших растений и комплекса LH2 серной бактерии *Allochrodatum vinosum*, при освещении в красную полосу поглощения хлорофилла светом с длиной волны 662 нм регистрируется окисление бактериохлорофилла (БХл) 850 комплекса LH2. Показано, что этот процесс вызывает синглетный кислород, который генерируется в комплексах фотосистемы 2, а затем частично диффундирует в комплекс LH2, где окисляет БХл850. Методом ВЭЖХ установлено, что при этом образуется продукт окисления БХл — 3-ацетил-хлорофилл. Процесс окисления БХл850 ингибируется тушителями синглетного кислорода (тролокс и аскорбат натрия). Предполагается, что комплекс LH2 из серной бактерии *Alc. vinosum* можно использовать для определения генерации синглетного кислорода хлорофилл-содержащими образцами.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** серные фотосинтезирующие бактерии, комплекс LH2, комплексы фотосистемы 2, синглетный кислород, свет 662 нм, окисление БХл850.

**DOI:** 10.31857/S0320972522100116, **EDN:** BDH1NQ

### ВВЕДЕНИЕ

Пурпурные фотосинтезирующие бактерии имеют один из самых простых фотосинтетических аппаратов, который состоит, как правило, из двух светособирающих комплексов (LH1 и LH2), а также реакционного центра (RC). Их интенсивное исследование началось во второй половине прошлого века с изучения возможности получения этих комплексов в чистом виде. Впервые такой результат (комплекс LH2 и смесь комплексов LH2–LH1–RC) был получен на мембранах фотосинтезирующей несерной бактерии *Cereibacter* (ранее *Rhodobacter sphaeroides* при использовании центрифугирования [1]. Позднее один из авторов данной работы, используя электрофорез в ПААГ, разделил комплексы LH2 и LH1–RC из мембран *Allochrodatum vinosum* (старое название *Allochrodatum minutissimum*), обработанных неионным детергентом Triton X-100 (неопубликованные данные). На основе этих данных

был создан аппарат и разработана методика для выделения комплексов LH2 и LH1–RC из мембран *Alc. vinosum* в препаративных количествах [2, 3]. Выделенные этим методом комплексы LH1–RC позволили коллективу авторов, в котором ведущую роль играл В.А. Шувалов, впервые получить «экспериментальные доказательства фотосенсибилизированного бактериохлорофиллом (БХл) переноса электрона с цитохрома *c* на пигментный комплекс P-760 (с участием бактериофеофитина-760, а также бактериохлорофилла-800) в реакционных центрах *Chromatium minutissimum*» и впервые высказать предположение о том, что бактериофеофитин является первичным акцептором электрона в RC фотосинтезирующих бактерий [4, 5].

Основным комплексом (по количеству пигментов и копий в клетке) фотосинтезирующих бактерий является комплекс LH2, который поглощает энергию квантов света, переводит её в энергию электронного возбуждения и передаёт последнюю к комплексам LH1, а далее — к RC.

Принятые сокращения: АцХл — 3-ацетил-хлорофилл; БХл — бактериохлорофилл; Хл — хлорофилл; LH1 и LH2 — светособирающие комплексы; RC — реакционный центр; ФС II — фотосистема 2; кор-комплексы — кислород-выделяющие комплексы.

\* Адресат для корреспонденции.

Этот комплекс построен из двух типов гидрофобных полипептидов ( $\alpha$  и  $\beta$ ), количество которых варьирует в пределах 8–12 пар у разных бактерий. С полипептидами нековалентно связаны БХл и каротиноиды в соотношении: 2 полипептида/3 БХл/1 каротиноид. Таким образом, один комплекс содержит 24–36 молекул БХл и 8–12 молекул каротиноидов. Существенно, что эти пигменты поглощают в разных областях спектра. Полосы поглощения БХл локализованы при  $\sim 385$  нм (полоса Core),  $\sim 590$  нм ( $Q_x$ -переход), при  $\sim 800$  и  $\sim 850$  нм (в ближней ИК-области,  $Q_y$ -переходы БХл), а каротиноидов – в области  $\sim 400$ – $550$  нм [6–9].

Известно, что каротиноиды являются вспомогательными пигментами бактериального фотосинтеза и выполняют *in vivo* несколько функций, в частности, светособирающую, структурную, защитную и т.д. ([10–12] и представленные там ссылки). Например, общепринято, что защитные свойства каротиноидов *in vivo* основаны на их способности эффективно дезактивировать триплетные состояния БХл, а также тушить синглетный кислород, который образуется при взаимодействии кислорода с указанными триплетными состояниями БХл ([12–14] и представленные там ссылки). Занимаясь изучением свойств комплексов LH2 из серных фотосинтезирующих бактерий и вхо-

дящих в их состав пигментов, мы обнаружили принципиально иную функцию каротиноидов у некоторых серных бактерий, а именно их способность генерировать синглетный кислород при освещении комплексов LH2 (или мембран) в сине-зелёную область спектра, в которой поглощают эти пигменты [15–17]. Данная функция была выявлена благодаря необычным свойствам молекул БХл850 комплекса LH2, у которых во втором пиррольном кольце в положении 7' и 8' присутствуют два свободных протона. При действии любого окисляющего агента на комплекс LH2 из *Alc. vinosum* эти протоны отрываются с образованием двойной связи, что, в свою очередь, приводит к образованию в молекуле БХл хлорофилл-подобной системы сопряжённых двойных связей, и она переходит в 3-ацетил-хлорофилл (АцХл), который, в принципе, может быть промежуточным продуктом окисления. На спектре поглощения этот эффект проявляется как уменьшение длинноволновой полосы поглощения БХл850 комплекса LH2 в ближней ИК-области и появление небольшого максимума АцХл при 700 нм [18]. Ранее мы предположили, что способность БХл850 в комплексе LH2 окисляться синглетным кислородом означает, что он может быть использован как природный сенсор этого агента [19]. Данное предположение про-

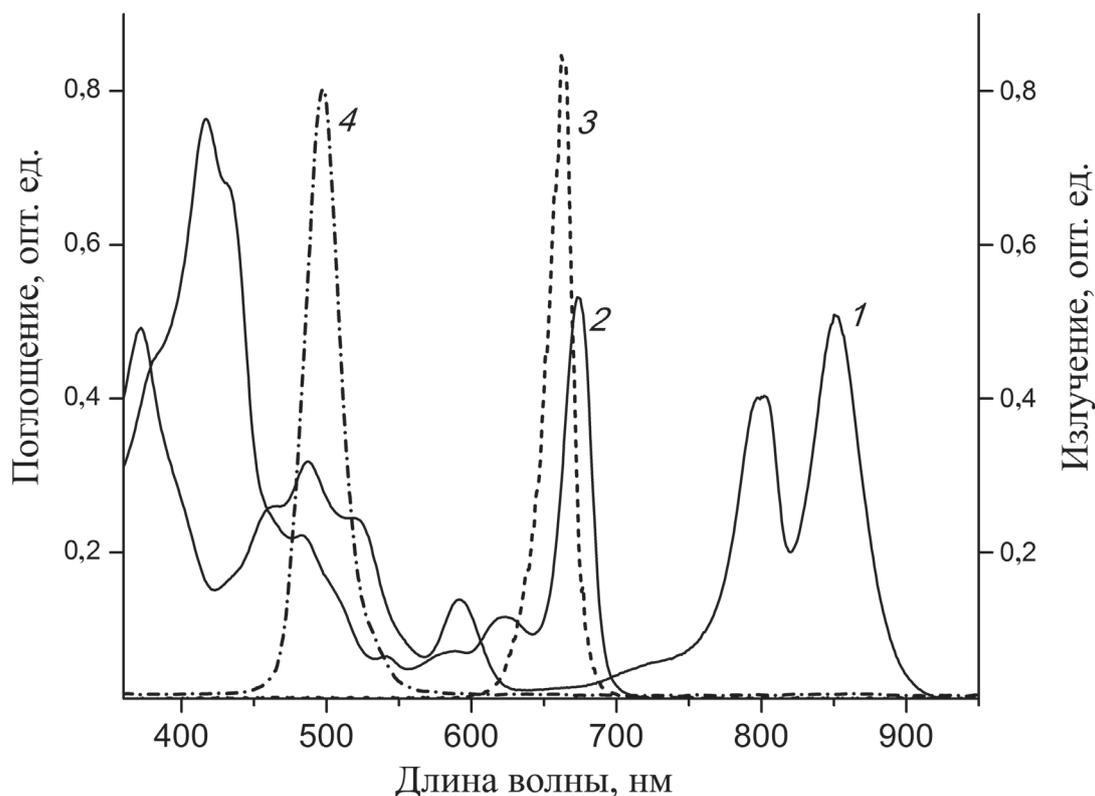


Рис. 1. Спектры поглощения комплекса LH2 из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. vinosum* (1) и RC ФС II из шпината (2). Спектры излучения светодиодов с максимумами при 662 нм (3) и 498 нм (4)

стимулировало нас изучить возможность использования комплекса LH2 для определения возможности генерации синглетного кислорода в системах, которые бы включали образцы, способные к выделению последнего. В качестве подобных препаратов были использованы комплексы фотосистемы 2 (ФС II) высших растений. Полученные результаты, которые позволили положительно ответить на данное предположение, представлены в настоящей работе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были образцы из бактерий и растений. Комплекс LH2 выделен из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. vinosum*, штамм МГУ (старое название *Alc. minutissimum*), получен из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Методики выращивания бактерии, выделения мембран и комплексов LH2 подробно описаны ранее [20, 21]. Фрагменты мембран, обогащённых ФС II, получали из листьев шпината [22], из которых выделяли кислород-выделяющие комплексы – кор-комплексы [23]. Изолированные RC ФС II выделяли на колонке Toyopearl DEAE 650S («Toyo Soda», Япония) [24], с модификациями [25].

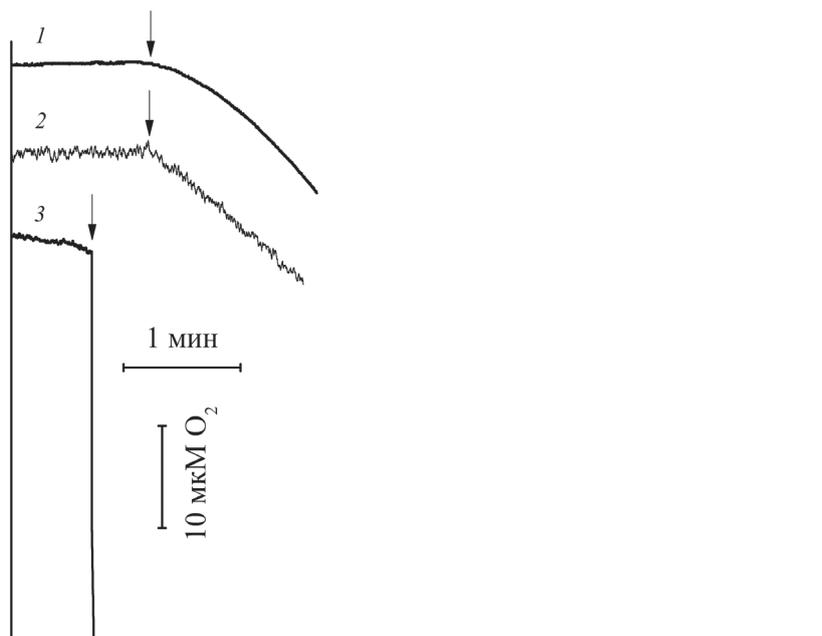
Спектры поглощения используемых препаратов (комплекс LH2 и RC ФС II) показаны на рис. 1. Известно, что спектр поглощения комплекса RC ФС II отличается от кор-комплекса только соотношением полос в области 410–435 нм благодаря обогащению первого феофитином, поэтому спектр поглощения кор-комплекса ФС II на рис. 1 не показан.

В опытах использованы как отдельные образцы, так и их смесь. Во втором случае поглощение каждого комплекса в длинноволновом максимуме составляло около 1 оптической единицы. В качестве источника света были использованы светодиоды мощностью 30 Вт с максимумом длины излучения при 662 и 498 нм («Lcfocus green», Китай). Длина излучения светодиодов подбиралась таким образом, чтобы они излучали в области, где поглощает Хл и практически не поглощает БХл (светодиод 662 нм) или в области поглощения бактериальных каротиноидов (светодиод 498 нм), которые обозначены как свет 662 и 498 соответственно. Спектры излучения указанных светодиодов представлены на рис. 1. Для экспериментов были применены специальные держатели светодиодов, включающие металлическую пластину, на одной стороне которой был закреплён большой радиатор с вентилятором, а на другой

имелись отверстия для крепления светодиода. Для лучшего отведения тепла от светодиода была использована термопаста. Сам светодиод сверху был прикрыт стеклянной линзой, которая обеспечивала более равномерное световое поле и дополнительную защиту образца от возможного перегрева. Эксперименты с освещением образцов проводились непосредственно в кюветном отделении спектрофотометра Cary 50 («Agilent Technology», США) при комнатной температуре (~24 °С). Для этого была изготовлена фальш-крышка с отверстием, которая закреплялась на спектрофотометре с открытой собственной крышкой так, чтобы центр её отверстия совпадал с центром кюветы. Указанное отверстие накрывали пластиной со светодиодом и радиатором. Расстояние от светодиода до центра кюветы составляло 6 см. Такая конструкция позволяла и проводить освещение образца, и регистрировать его спектр поглощения после выключения светодиода. Интенсивность светового потока светодиода была около 80 Вт/м<sup>2</sup>. Ошибка измерения во всех опытах не превышала 5–10%.

Скорость выделения синглетного кислорода в препаратах ФС II определяли по светозависимому поглощению кислорода амперометрическим методом в ячейке с электродом Кларка, как описано ранее [26]. Образец освещали красным светом (светофильтр КС-11) интенсивностью 400 Вт/м<sup>2</sup> с помощью диапроектора ЛЭТИ 60М, лампа КГМ 220-500 (Россия) в течение 1–2 мин в термостатируемой ячейке при 25 °С. Измерения проводили при постоянном перемешивании, чтобы не допустить образования зоны с низкой концентрацией кислорода у поверхности электрода. Объем образца составлял 1 мл, а концентрация Хл варьировала в пределах 1,7–2,2 мкМ (RC и кор-комплекс соответственно). В качестве контроля использовали величину сигнала полярографа без освещения пробы светом или освещение красным светом растворов, не содержащих Хл. Электрод калибровали по сигналу при добавлении избытка дитионита в ячейку. Измерение светозависимого поглощения кислорода (выделение синглетного кислорода) изолированными RC и кор-комплексом ФС II в присутствии гистидина проводили, как описано ранее [27]. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Для ВЭЖХ-анализа освещение проводили в 0,2 мм термостатируемой кювете в течение 45 мин, а система со светодиодом была установлена вертикально. Для эксперимента использована смесь «кор-комплекс ФС II/комплекс LH2», плотность которой была увеличена в 5 раз, что позволило исключить лиш-



**Рис. 2.** Светозависимое поглощение кислорода изолированными RC (1) и кор-комплексом ФС II (2) в присутствии гистидина. Изменение концентрации кислорода в ячейке с электродом Кларка при добавлении дитионита (3)

ние манипуляции с образцом. Комплексы LH2 и ФС II разделяли электрофорезом в ПААГ по разработанной нами методике [3]. Комплекс LH2 элюировали из геля и концентрировали центрифугированием в пробирках («Millipore», США). Пигменты экстрагировали смесью ацетон/метанол (7/2, v/v) и переводили в этилацетат. Пигментный анализ комплексов LH2 до и после освещения проводили с помощью ВЭЖХ-системы Shimadzu («Shimadzu», Япония), используя колонку с обращённой фазой Agilent Zorbax SB-C18 5 мкм  $4,6 \times 250$  мм («Agilent», США). Каротиноиды, БХл и его продукты окисления идентифицировали по времени удержания на колонке и по спектру поглощения с помощью программного обеспечения LC solution («Shimadzu») [28].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ранее при изучении процесса фотоокисления БХл850 в комплексах LH2 из серных бактерий мы использовали разные типы светофильтров: стеклянные, широкополосные интерференционные и узкополосные (стандартные) интерференционные [15–17, 29]. Все они имели существенные недостатки, так как могли обеспечить высокую интенсивность освещения только при широкой полосе пропускания (стеклянные фильтры) или более узкую полосу пропускания при существенном снижении интенсивности светового потока (интерферен-

ционные светофильтры). Поэтому для данной работы были применены фотодиоды с узкой полосой излучения, которые по параметрам полуширины (21–32 нм) были близки к стандартным интерференционным светофильтрам (10–15 нм). На первом этапе необходимо было убедиться, что освещение светом с длиной волны 662 нм не вызывает изменений в спектре поглощения комплекса LH2 (рис. 3, а).

На этом рисунке хорошо видно, что даже после 30 мин освещения светом 662 нм изменения в спектре поглощения комплекса LH2 незначительны и не превышают 0,05 ед. оптической плотности. На разностном спектре образца в ближней ИК-области появляется отрицательная полоса с максимумом при 864 нм и положительная – с максимумом при 837 нм (результаты не показаны). Можно предположить, что при освещении светом 662 нм основным процессом в комплексе является смещение небольшой части полос БХл в коротковолновую область. Для сравнения на рис. 3, б приведены результаты изменений в спектре поглощения комплекса LH2 при освещении светом 498 нм, при действии которого на каротиноиды идёт образование синглетного кислорода. В этом случае полоса поглощения уменьшается в 2 раза и смещается на 14 нм в коротковолновую область. Одновременно появляется полоса поглощения окисленного БХл (АцХл) с максимумом при 700 нм. Аналогичные результаты были получены ранее при использовании стеклянных и интерференционных светофиль-

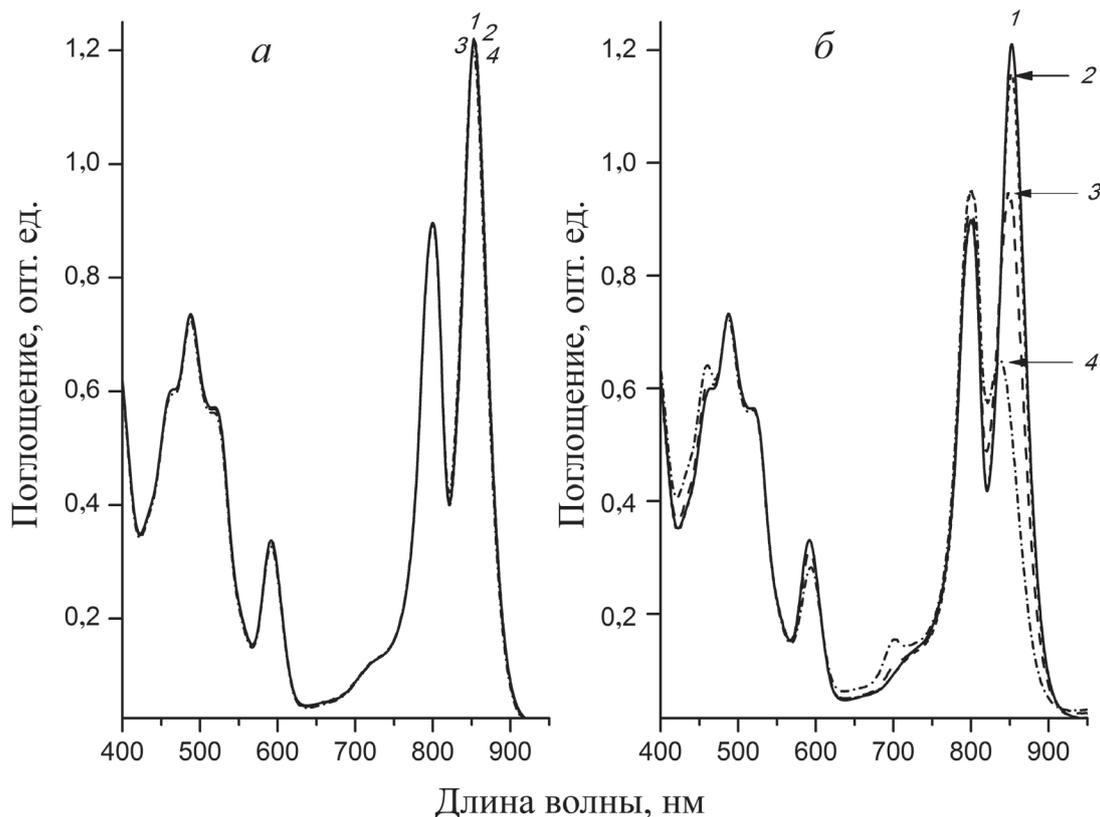


Рис. 3. Изменения в спектре поглощения комплекса LH2 из *Alc. vinosum* при освещении светом 662 нм (а) и светом 498 нм (б): 1 – контроль, 2 – 2 мин, 3 – 10 мин, 4 – 30 мин

тров [15–17, 29]. Отметим, что в нашей работе и цитируемых статьях отмечено монотонное увеличение полосы поглощения АцХл. Это может свидетельствовать о том, что в рассматриваемом процессе и образце АцХл является первичным продуктом окисления. Следует отметить, что окисление БХл в разных типах растворителей происходит иначе: кроме АцХл (до четырёх разных типов), который в модельных системах является промежуточным продуктом окисления, в образцах обнаружено присутствие ещё 6 продуктов окисления БХл (бесцветных или с открытым кольцом) [30].

При освещении светом 662 нм смеси «РС ФС II/комплекс LH2» отмечено два процесса. Во-первых, это выцветание красной полосы РС ФС II на 60% за 30 мин, без смещения основного максимума этой полосы (рис. 4, а). Такой же эффект был отмечен при измерении скорости выделения синглетного кислорода в присутствии гистидина в работе Telfer et al. [27] и наших аналогичных экспериментах (результаты не показаны). Отметим, что все остальные изменения в данной смеси в области 360–650 нм тоже связаны с выцветанием полос поглощения Хл в РС ФС II. Во-вторых, в этих условиях выцветает длинноволновая полоса БХл850 комплекса LH2 на ≈10%, и одно-

временно её максимум смещается на 3–4 нм в коротковолновую область. Косвенно это свидетельствует о том, что происходит окисление БХл850. К сожалению, не удалось зафиксировать на спектре поглощения появления продукта окисления БХл, так как его полоса маскируется красной полосой РС ФС II. Если к комплексу LH2 был добавлен кор-комплекс, в котором присутствуют дополнительные молекулы Хл, локализованные в комплексах CP43 и CP47, то полоса БХл850 при освещении светом 662 нм выцветает на ≈20% (рис. 4, б). Это может свидетельствовать о том, что дополнительные молекулы Хл вносят вклад в генерацию синглетного кислорода и последующее окисление БХл850.

Из сравнения разностных спектров исследуемых образцов следует, что изменения в комплексе LH2 в смеси с препаратами ФС II при освещении светом 662 нм и в таком же индивидуальном комплексе при освещении светом 498 нм однотипны (рис. 5), что подтверждает факт взаимодействия синглетного кислорода, который образуется в комплексах ФС II, с БХл850 комплекса LH2. К сожалению, ни на одном из разностных спектров также не было зафиксировано появления полосы поглощения АцХл. Отметим, что даже при сильном окис-

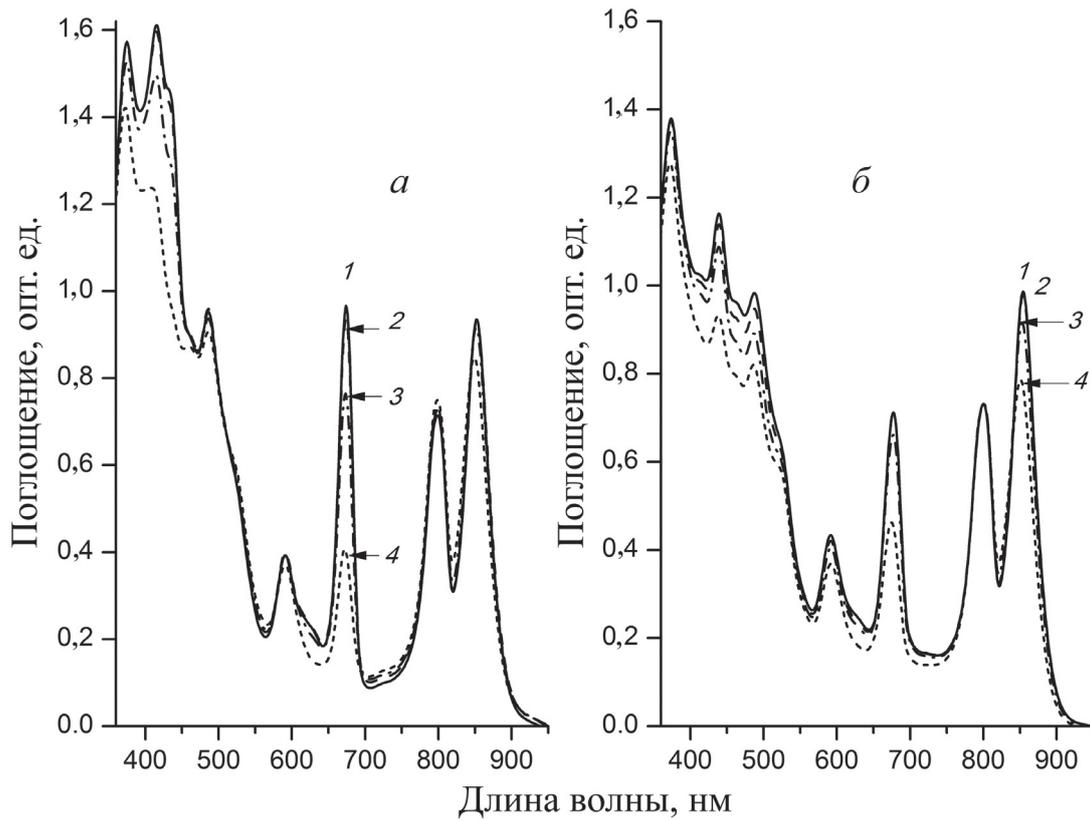


Рис. 4. Изменения в спектре поглощения смеси: «комплекс LH2 из *Alc. vinosum* и RC ФС II» (а) или «комплекс LH2 и кор-комплекс ФС II» (б) при освещении светом 662 нм: 1 – контроль, 2 – 2 мин, 3 – 10 мин, 4 – 30 мин

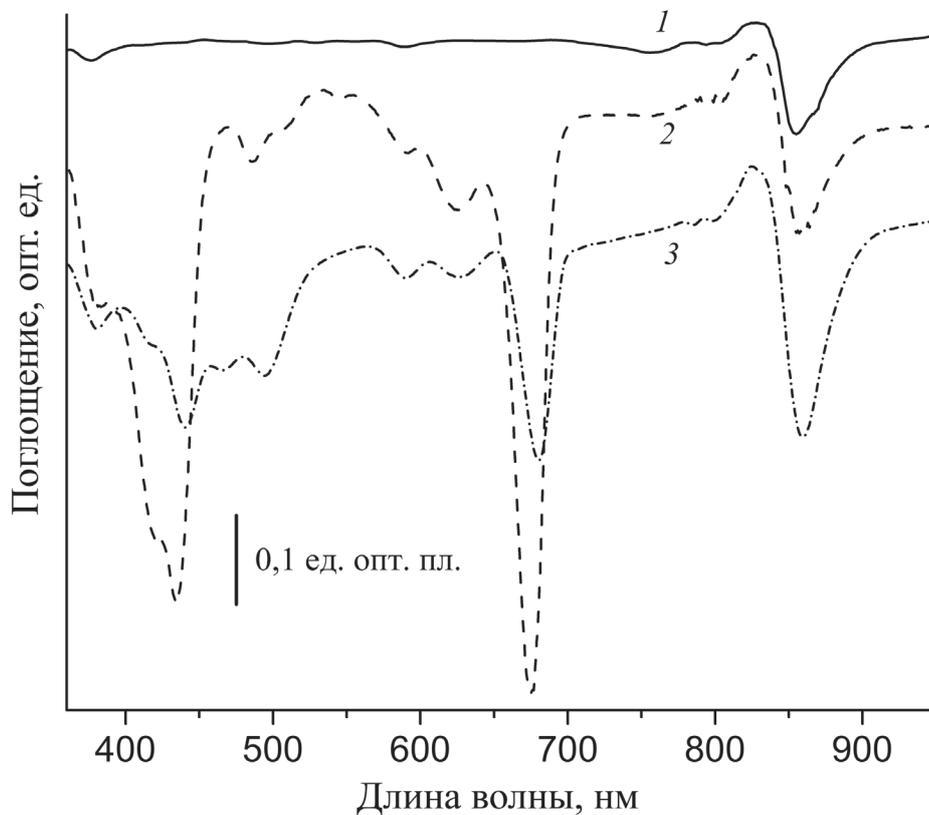
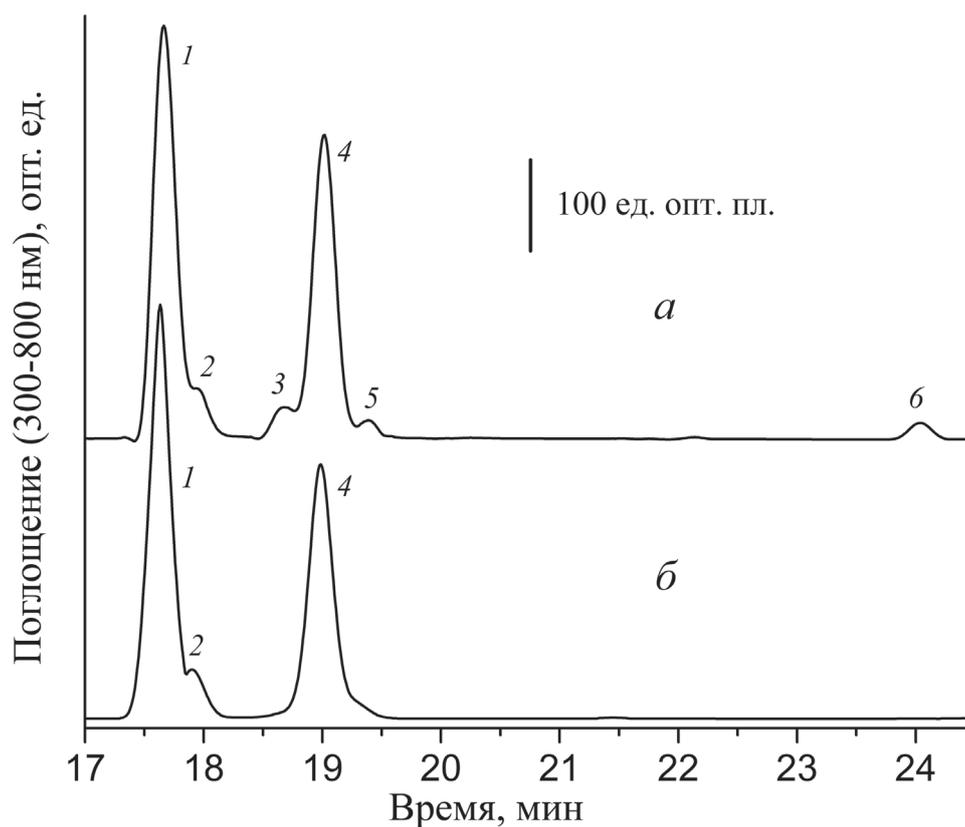
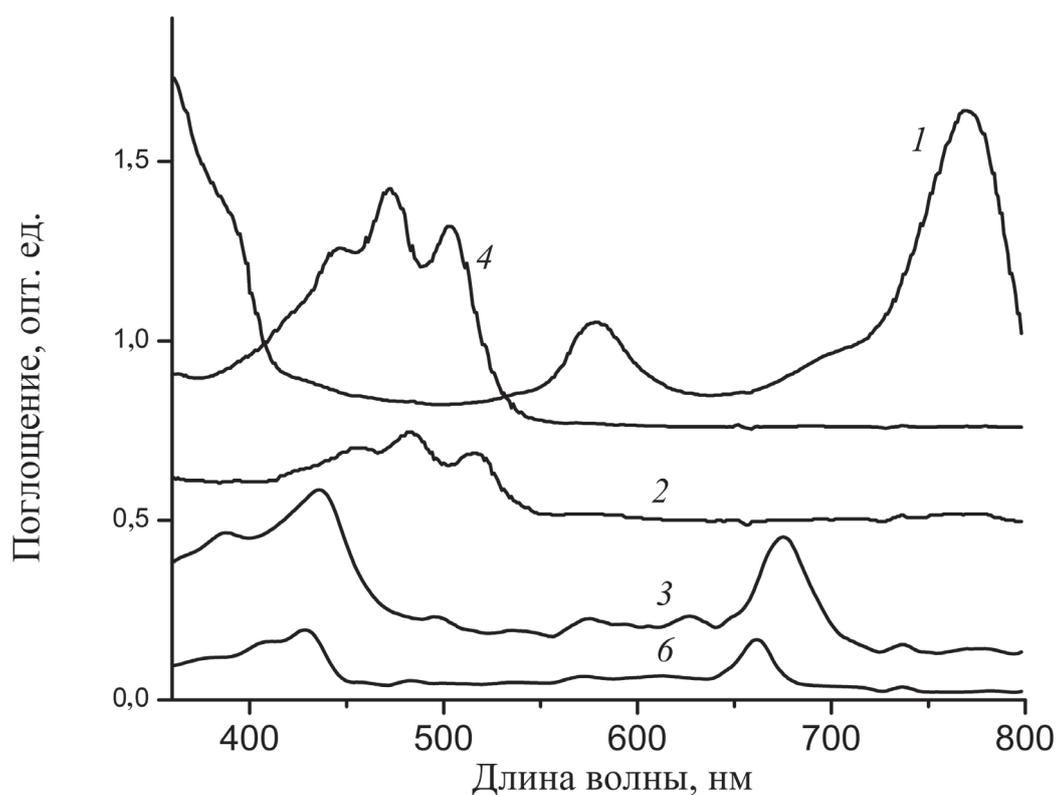


Рис. 5. Разностные спектры поглощения: 1 – «контрольный комплекс LH2 – освещение 5 мин светом 498 нм», 2 – «контрольный комплекс RC ФС II + комплекс LH2» – освещение 30 мин светом 662 нм, 3 – «контрольный кор-комплекс ФС II + комплекс LH2» – освещение 30 мин светом 662 нм



**Рис. 6.** ВЭЖХ-Анализ пигментов комплекса LH2 после освещения светом 662 нм в смеси «кор-комплекс ФС II + комплекс LH2 *Alc. vinosum*» (а), контрольный комплекс LH2 (б). Идентификация пиков: 1 – БХл, 2 – дидегидрородопин, 3 – АцХл, 4 – родопин, 5 – производное Хл, 6 – Хл



**Рис. 7.** Спектры поглощения пигментов: 1 – БХл, 2 – дидегидрородопин, 3 – АцХл, 4 – родопин, 6 – Хл. Номера спектров соответствуют номерам пиков на рис. 6

лении синглетным кислородом БХл850 комплекса LH2 этот продукт появляется только после 10 мин освещения образца светом 498 нм (рис. 3, б). Для того чтобы выявить возможное присутствие АцХл в образце «кор-комплекс ФС II /комплекс LH2» с помощью ВЭЖХ, было увеличено время освещения образца светом 662 нм до 45 мин.

Затем комплексы разделяли методом электрофореза в ПААГ, но получить чистый комплекс LH2 не удалось, в нём всегда присутствовала в небольшом количестве примесь кор-комплекса ФС II. Однако уменьшение длинноволновой полосы Хл в комплексе LH2, в отличие от смеси «кор-комплекс ФС II + комплекс LH2», позволило зафиксировать небольшое увеличение поглощения в области 690–710 нм, где поглощает АцХл (результаты не показаны).

Анализ пигментов методом ВЭЖХ подтвердил присутствие в таком комплексе продукта окисления БХл850 – АцХл (рис. 6).

Из спектров поглощения, полученных в процессе разделения пигментов ВЭЖХ, следует, что АцХл отличается от Хл по положению длинноволновой полосы: 675 и 661 нм соответственно (рис. 7). Поэтому идентифицировать их методом ВЭЖХ достаточно просто.

На последнем этапе работы была проведена оценка влияния тушителей синглетного кислорода – аскорбата натрия и тролокса, которые ранее успешно применялись при исследовании процесса окисления БХл850 в комплексе LH2 [28], на окисление Хл и БХл850 в смеси «препарат ФС II + комплекс LH2». Эти препараты по-разному взаимодействовали с РС и кор-комплексом ФС II. Тролокс эффективно предотвращал окисление Хл в РС ФС II, а аскорбат натрия – в кор-комплексе. Причины наблюдаемых различий неясны. Оба этих реагента подавляли окисление БХл850 в комплексе LH2 (рис. 8).

Отметим, что при таких концентрациях аскорбата натрия и тролокса аналогичный про-

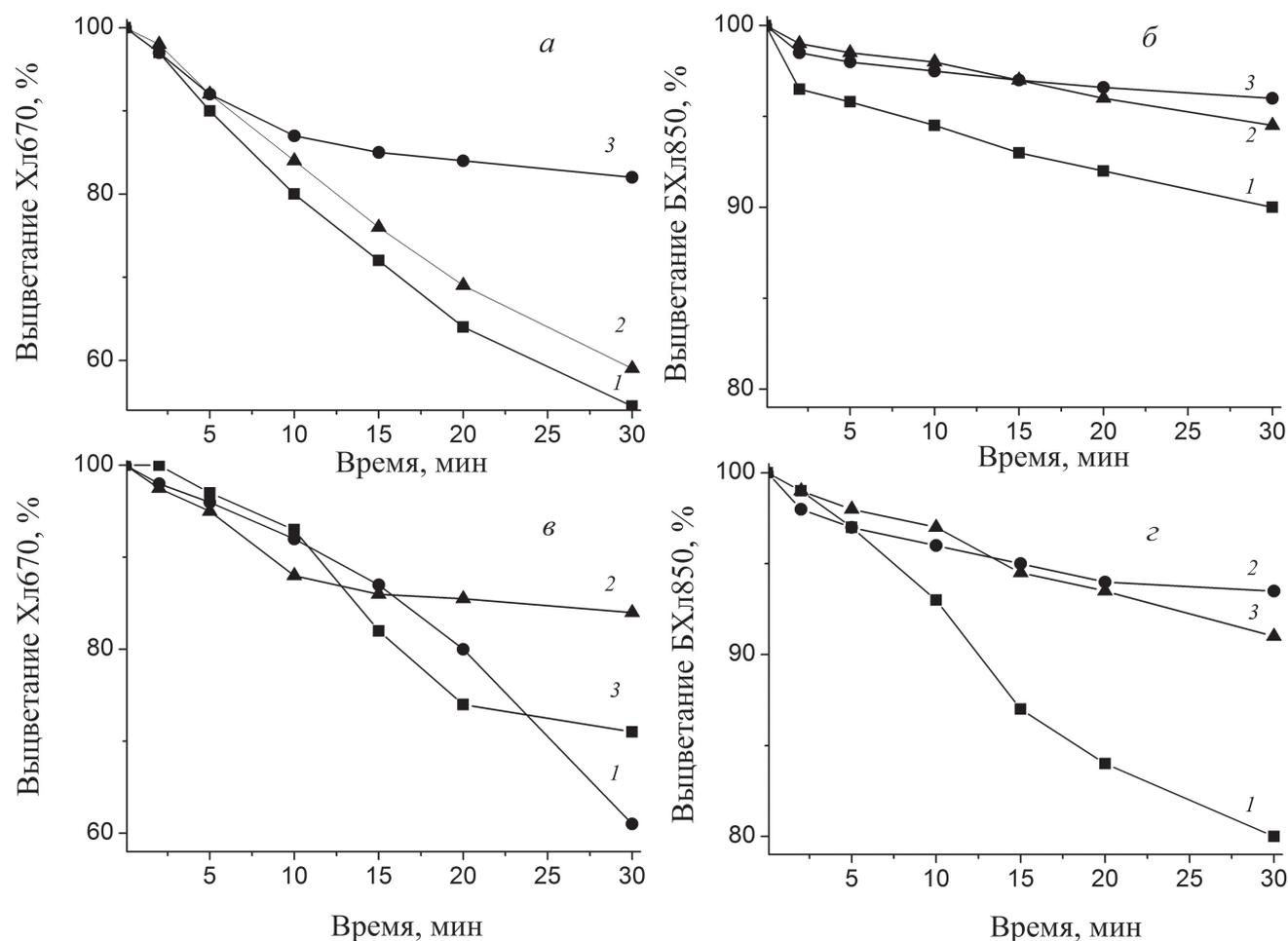


Рис. 8. Кривые выцветания длинноволновых форм пигментов Хл670 (а и в) и БХл850 (б и г) при освещении светом 662 нм в смеси «РС ФС II + комплекс LH2 *Alc. vinosum*» (а и б) и «кор-комплекс ФС II + комплекс LH2 *Alc. vinosum*» (в и г): 1 – контроль, 2 – +1 мМ аскорбата натрия, 3 – +100 мкМ тролокса

цесс в индивидуальном комплексе LH2 подавлялся на 90–95% [28]. Можно предположить, что комплекс ФС II и бактериальный комплекс, контактируя друг с другом, образуют зоны, которые ограничивают доступ тушителей к синглетному кислороду и, таким образом, снижают эффективность их действия.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе проведено изучение взаимодействия фотосинтетических комплексов из разных организмов: высших растений и серных фотосинтезирующих бактерий. Комплексы ФС II растений способны к генерации синглетного кислорода под действием света 662 нм, а БХл850 бактериального комплекса LH2 является мишенью для синглетного кислорода и окисляется с образованием АцХл. Совокупность полученных результатов позволяет с достаточной долей уверенности утверждать, что в изученных системах подобный процесс имеет место. Можно предположить следующую упрощённую схему последовательности событий. Хл при возбуждении светом 662 нм взаимодействует с кислородом с образованием синглетного кислорода. Очевидно, что существенная часть последнего расходуется в комплексах ФС II (тушение синглетного кислорода, окисление Хл и т.д., см. рис. 4 и 5). Оставшийся синглетный кислород диффундирует из комплексов ФС II и затем или тушится в водной среде, или проникает в комплекс LH2, где окисляет БХл850 (рис. 6) с образованием АцХл (рис. 7 и 8). Понятно, что эффективность последнего процесса невелика.

Результаты представленной работы показывают, что каротиноиды не защищают БХл850 от окисления синглетным кислородом. Необходимо также отметить, что сам БХл способен эффективно тушить синглетный кислород [31]. По современным представлениям каротиноиды должны тушить синглетный кислород, переводя полученную от него энергию в тепло. Процессу тушения триплетов БХл каротиноидами посвящено достаточно много работ, и его обычно связывают с защитной функцией каротинов ([32–34] и представленные там ссылки). Однако работы, в которых этот процесс исследовался бы на бескаротиноидных мутантах и было бы показано, что БХл в них легко окисляется под действием света в присутствии кислорода с образованием АцХл, не проводились. Ранее мы установили, что отсутствие каротиноидов не влияет существенно на фотостабильность БХл у пурпурных фотосинтезирующих бакте-

рий [17]. Нам кажется, что защитная функция каротиноидов у этих бактерий несколько преувеличена, а тушение триплетов БХл связано не с защитой его от фотоокисления, а с удалением излишков энергии из системы, чтобы она была готова для приёма энергии новых квантов света. Фактически пигментная система комплекса LH2, состоящая из двух кольцевых кластеров БХл (БХл800 и БХл850), которые имеют контакт с молекулой каротиноида (3 БХл/1 каротиноид), способна решать именно такую задачу. Возникает вопрос, почему она не способна потушить синглетный кислород и предотвратить окисление БХл850 в указанном комплексе. Очевидно, что здесь важную роль играет как геометрия пигментной системы комплекса, так и пространственная организация процесса взаимодействия БХл850 и синглетного кислорода. В настоящее время неизвестно, какая часть молекулы каротиноида или БХл может наиболее эффективно взаимодействовать с синглетным кислородом. Однако не вызывает сомнений тот факт, что если синглетный кислород подходит к комплексу, например, с внешней стороны, в области, где расположен БХл850, то он начинает взаимодействовать с этим пигментом, а не с каротиноидом. Это взаимодействие, в свою очередь, приводит к окислению БХл850. Вопрос о том, почему БХл850 сам не тушит синглетный кислород, а окисляется этим агентом, остаётся открытым.

Другой важный аспект рассматриваемой проблемы связан с тем фактом, что окисление БХл850 регистрируется только у некоторых серных бактерий, а у несерных – нет. Подобная разница в поведении указанных бактерий в присутствии окислителя связана, возможно, с особенностями эволюции данных групп бактерий в разных условиях роста. Если взять за исходную точку бескислородную атмосферу Земли, то изначально у обеих групп бактерий отсутствовал механизм или особенности структуры комплексов для защиты пигментов от окисления кислородом, так как в них не было необходимости. Процесс накопления кислорода на Земле был медленным и постепенным, поэтому несерные бактерии смогли с помощью мутаций повысить устойчивость пигментов в светособирающих комплексах к фотоокислению в присутствии кислорода. В частности, произошло образование водородных и других типов связей у свободных протонов в молекулах БХл, что изменяло их редокс-потенциал и повысило устойчивость к окислению синглетным кислородом. Серные бактерии постоянно развивались в бескислородной среде. Если они попадали в кислородную среду, то кислород выступал в роли стрессового

фактора и ингибитора роста, что приводило к смерти клеток. Каждый такой переход происходил при всё более высоких концентрациях кислорода, и никакой эволюции защитных изменений пигментной системы в таких условиях не происходило. Поэтому фактически благодаря отсутствию эволюции в этом направлении организации комплексов LH2 серные бактерии смогли сохранить способность БХл850 к окислению синглетным кислородом.

Таким образом, комплекс LH2 из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. vinosum* представляет уникальную структуру, в которой кольцевой кластер молекул БХл850 упакован так, что его два протона во втором пиррольном кольце молекулы БХл остаются свободными. Это даёт возможность легко окислять БХл850, отрывая указанные протоны, с образованием новой системы сопряжённых двойных связей хлоринового типа. Мы полагаем, что этот процесс приводит к образованию АцХл. Он протекает, как показано в данной работе, при использовании комплекса LH2 в паре с комплексами

ФС II, которые способны к генерации синглетного кислорода под действием света.

**Вклад авторов.** А.А. Москаленко – концепция и руководство работой; З.К. Махнева, Т.Н. Смолова, М.А. Большаков – проведение экспериментов; З.К. Махнева, Т.Н. Смолова, М.А. Большаков, А.А. Москаленко – обсуждение результатов исследования; А.А. Москаленко – написание текста; М.А. Большаков – редактирование текста статьи.

**Благодарности.** Авторы благодарят Журавлеву З.А. (ИФПБ РАН) за помощь в выращивании бактериальных культур.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН (№ 122041100204-3).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bril, C. (1958) Action of a non-ionic detergent on chromatophores of *Rhodospseudomonas spheroids*, *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 458, doi: 10.1016/0006-3002(58)90223-3.
2. Москаленко А. А., Ерохин Ю. Е. (1971) в сб.: Электрофорез в полиакриламидном геле и его применение в биологии, сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности, Москва, с. 154-156.
3. Москаленко А. А., Ерохин Ю. Е. (1974) Выделение пигмент-липопротеиновых комплексов из пурпурных бактерий методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, *Микробиология*, **43**, 654-657.
4. Шувалов В. А., Климов В. В., Крахмалева Н. Н., Москаленко А. А., Красновский А. А. (1976) Фотопревращение феофитина в реакционных центрах *Rhodospirillum rubrum* и *Chromatium minutissimum*, *ДАН СССР*, **227**, 984-987.
5. Shuvalov, V. A., Klimov, V. V. (1976). The primary photoreactions in the complex cytochrome-P-890 P-760 (bacteriopheophytin<sub>760</sub>) of *Chromatium minutissimum* at low redox potentials, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **440**, 587-599, doi: 10.1016/0005-2728(76)90044-x.
6. Freer, A., Prince, S., Sauer, K., Papiz, M., Hawthornthwaite-Lawless, A., et al. (1996) Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*, *Structure*, **4**, 449-462, doi: 10.1016/S0969-2126(96)00050-0.
7. Gabrielsen, M., Gardiner, A., and Cogdell, R. (2009) *In the Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., and Beatty, J. T., eds) Springer, Dordrecht, **28**, 135-153, doi: 10.1007/978-1-4020-8815-5\_8.
8. Moskalenko, A. A., and Makhneva, Z. K. (2012) Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochrochromatium minutissimum* assembled without carotenoids, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **108**, 1-7, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.11.006.
9. Löhner A., Carey, A. M., Hacking, K., Picken, N., Kelly, S., et al. (2015) The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochrochromatium vinosum*, *Photosynth. Res.*, **123**, 23-31, doi: 10.1007/s11120-014-0036-2.
10. Cogdell, R., and Frank, H. (1987) How carotenoids function in photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **895**, 63-79, doi: 10.1016/S0304-4173(87)80008-3.
11. Frank, H., and Cogdell, R. (1996) Carotenoids in photosynthesis, *Photochem. Photobiol.*, **63**, 257-264, doi: 10.1111/j.1751-1097.1996.tb03022.x.
12. Cogdell, R. J., Howard, T. D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I., et al. (2000) How carotenoids protect bacterial photosynthesis, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **355**, 1345-1349, doi: 10.1098/rstb.2000.0696.
13. Britton, G. (2008) in *Carotenoids. Natural Functions* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., eds) Birkhauser Verlag, Switzerland, pp. 265-308, doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0.

14. Edge, R., and Truscott, T. G. (2018) Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids – a review, *Antioxidants*, **7**, 5-16, doi: 10.3390/antiox7010005.
15. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2019) Взаимодействие бактериохлорофилла с синглетным кислородом в мембранах пурпурных фотосинтезирующих бактерий: существует ли защитная функция каротиноидов? *Доклады Академии наук*, **486**, 504-508, doi: 10.31857/S0869-56524864504-508.
16. Makhneva, Z. K., Ashikhmin, A. A., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2020) Carotenoids are probably involved in singlet oxygen generation in the membranes of purple photosynthetic bacteria under light irradiation, *Microbiology*, **89**, 164-173, doi: 10.1134/S0026261720010099.
17. Makhneva, Z. K., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2021) Carotenoids do not protect bacteriochlorophylls in isolated light-harvesting LH2 complexes of photosynthetic bacteria from destructive interactions with singlet oxygen, *Molecules*, **26**, 5120, doi: 10.3390/molecules26175120.
18. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2016) Образование 3-ацетилхлорофилла в светособирающих комплексах пурпурных бактерий при химическом окислении, *Биохимия*, **81**, 282-294.
19. Махнева З. К., Москаленко А. А. (2022) Каротиноиды в комплексах LH2 из *Allochrochromatium vinosum* способны при освещении генерировать синглетный кислород, который окисляет БХл850, *Микробиология*, **91**, 466-474, doi: 10.31857/S0026365622300218.
20. Большаков М. А., Ашихмин А. А., Махнева З. К., Москаленко А. А. (2016) Влияние интенсивности освещения и ингибирования биосинтеза каротиноидов на сборку периферийных светособирающих комплексов пурпурной серной бактерии *Allochrochromatium vinosum* ATCC 17899, *Микробиология*, **85**, 403-414, doi: 10.7868/S0026365616040029.
21. Большаков М. А., Ашихмин А. А., Махнева З. К., Москаленко А. А. (2018) Влияние света разного спектрального состава на рост клеток и пигментный состав мембран пурпурных серных бактерий *Allochrochromatium minutissimum* и *Allochrochromatium vinosum*, *Микробиология*, **87**, 136-145, doi: 10.7868/S0026365618020040.
22. Berthold, D. A., Babcock, G. T., and Yocum, C. F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparations from spinach thylakoids membranes, EPR and electron-transport properties, *FEBS Lett.*, **134**, 231-234, doi: 10.1016/0014-5793(81)80608-4.
23. Enami, I., Kamino, K., Shen, J.-R., Satoh, K., and Katoh, S. (1989) Isolation and characterization of photosystem II complexes which lack light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins but retain three extrinsic proteins related to oxygen evolution from spinach, *Biochem. Biophys. Acta*, **977**, 33-39, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80006-4.
24. Nanba, O., and Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 109-112, doi: 10.1073/pnas.84.1.109.
25. Khristin, M. S., Nikitishena, O. V., Smolova, T. N., and Zastrizhnaya, O. M. (1997) Extraction of functionally active Photosystem II pigment-protein complexes from pea thylakoids and their purification on Sepharose DEAE 6B, *Biol. Membr (Moscow)*, **14**, 133-142.
26. Khorobrykh, S. A., Khorobrykh, A. A., Klimov, V. V., and Ivanov, B. N. (2002) Photoconsumption of oxygen in Photosystem II preparations under impairment of the water oxidizing complex, *Biochemistry*, **67**, 683-688, doi: 10.1023/A:1016154506817.
27. Telfer, A., Bishop, S. M., Phillips, D., and Barber, J. (1994) Isolated photosynthetic reaction-center of photosystem-II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen – Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13244-13253.
28. 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.*, **119**, 291-303, doi: 10.1007/s11120-013-9947-6.
29. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2019) Защита БХл850 от действия синглетного кислорода в мембранах серной фотосинтезирующей бактерии *Allochrochromatium vinosum* с помощью тушителей, *Микробиология*, **88**, 91-99, doi: 10.1134/S0026365619010129.
30. Limantara, L., Koehler, P., Wilhelm, B., Porra, R. J., and Scheer, H. (2006) Photostability of bacteriochlorophyll a and derivatives: potential sensitizers for photodynamic tumor therapy, *Photochem. Photobiol.*, **82**, 770-780, doi: 10.1562/2005-09-07-RA-676.
31. Krasnovsky, A.A., Jr. (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 29-36, doi: 10.1111/j.1751-1097.1979.tb09255.x.
32. Niedzwiedzki, D. M., Swainsbury, D. J. K., Canniffed, D. P., Hunter, C. N., and Hitchcock, A. (2020) A photosynthetic antenna complex foregoes unity carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer efficiency to ensure photoprotection, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **117**, 6502-6508, doi: 10.1073/pnas.1920923117.
33. Tamura, H., and Ishikita, H. (2020) Quenching of Singlet oxygen by carotenoids via ultrafast super-

- exchange dynamics, *J. Phys. Chem. A*, **124**, 5081-5088, doi: 10.1021/acs.jpca.0c02228.
34. Uragami, C., Sato, H., Yukihiro, N., Fujiwara, M., Kosumi, D., et al. (2020) Photoprotective mechanisms in the core LH1 antenna pigment-protein complex from the purple photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*, *J. Photoch. Photobiol. A: Chemistry*, **400**, 112628, doi: 10.1016/j.jphotochem.2020.112628.

## LH2 COMPLEX FROM SULFUR BACTERIA *Allochromatium vinosum* – NATURAL SINGLET OXYGEN SENSOR

Z. K. Makhneva, T. N. Smolova, M. A. Bolshakov\*, and A. A. Moskalenko

*Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: lfbv22@gmail.com*

It was established that in a heterogeneous model system, which consisted of two types of complexes: the reaction center or core complex of photosystem 2 of higher plants and the LH2 complex of the sulfur bacterium *Alc. vinosum*, BChl850 oxidation of the LH2 complex was recorded under illumination in the red Chl band by light at a wavelength of 662 nm. It has been shown that this process induces singlet oxygen, which is generated in photosystem 2 complexes and then partially diffuses into the LH2 complex, where it oxidizes BChl850. It was established by HPLC that this results in the formation of a product of BChl oxidation, 3-acetylchlorophyll. The BChl850 oxidation process is inhibited by singlet oxygen quenchers (Trolox and Na ascorbate). It is assumed that the LH2 complex from the sulfur bacterium *Alc. vinosum* can be used to determine the generation of singlet oxygen by chlorophyll containing samples.

**Keywords:** photosynthetic sulfur bacteria, LH2 complex, photosystem 2 complexes, singlet oxygen, light at 662 nm, BChl850 oxidation