
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

КАРОТИНОИДЫ В КОМПЛЕКСАХ LH2 ИЗ *ALLOCHROMATIUM VINOSUM* СПОСОБНЫ ПРИ ОСВЕЩЕНИИ ГЕНЕРИРОВАТЬ СИНГЛЕТНЫЙ КИСЛОРОД, КОТОРЫЙ ОКИСЛЯЕТ БХл850

© 2022 г. З. К. Махнева^a, А. А. Москаленко^a, *

^aИнститут фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

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

Поступила в редакцию 04.02.2022 г.

После доработки 21.02.2022 г.

Принята к публикации 22.02.2022 г.

Исследовали взаимодействие синглетного кислорода с бактериохлорофиллом (БХл) в мембранах, светособирающих комплексах LH2 и экстрактах пигментов из штамма *Allochrochromatium (Alc.) vinosum* МГУ (старое название *Alc. minutissimum*). Подтверждена способность каротиноидов при освещении светом в пределах их области поглощения генерировать синглетный кислород, который окисляет БХл, при этом сам БХл в данном процессе не активен и является мишенью для синглетного кислорода. Резкое снижение количества окисленного БХл в комплексе LH2 при освещении в каротиноидной области отмечено только при соотношении каротиноид/комплекс около 0.1, то есть когда на 10 комплексов LH2 приходится менее 1 молекулы каротиноида. Предполагается, что каротиноиды из ранних этапов биосинтеза (нейроспорин, ζ-каротин) более активны в выделении синглетного кислорода под действием света, чем более зрелые каротиноиды. Процесс фотоокисления БХл в комплексах LH2 происходит только в присутствии кислорода. Уменьшение концентрации кислорода в 7 и более раз приводит к замедлению процесса или полной его остановке. В модельных системах (экстракт пигментов комплекса LH2, сохраняющий соотношение БХл/каротиноиды) БХл при освещении становится и основным генератором синглетного кислорода, и мишенью для действия последнего. Каротиноиды в этих условиях не защищают БХл от окисления. Способность БХл850 в комплексе LH2 окисляться синглетным кислородом предполагает, что он может быть использован как природный сенсор этого агента.

Ключевые слова: фотосинтезирующие бактерии, фотосинтез, каротиноиды, комплекс LH2, синглетный кислород, 3-ацетил-хлорофилл

DOI: 10.31857/S0026365622300218

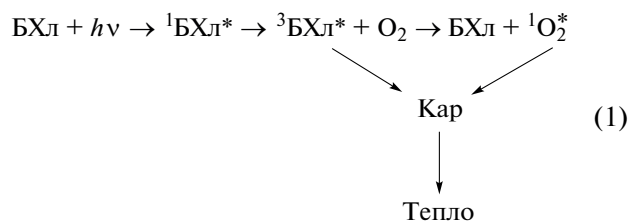
У фотосинтезирующих бактерий процессы поглощения солнечной энергии и ее передача с помощью энергии электронных возбужденных состояний протекают при участии пигментов в бактериальных пигмент-белковых комплексах. Обычно выделяют три типа комплексов: периферийный светособирающий комплекс LH2, светособирающий прицентровый комплекс LH1, образующий с реакционным центром (РЦ) ансамбль LH1-RC, и РЦ, в котором происходит первичное разделение зарядов. Основным из этих комплексов (по количеству копий в клетке и содержанию пигментов) является комплекс LH2. Схематично он представляет собой полый внутри цилиндр,

который построен из двух типов гидрофобных полипептидов (α и β), с которыми нековалентно связаны молекулы бактериохлорофилла (БХл) и каротиноидов. Обычно в этом комплексе в каждой субъединице на два полипептида приходится 3 молекулы БХл и один каротиноид. БХл в комплексе LH2 имеет полосы поглощения с максимумами при ~385 нм (полоса Core), ~590 нм (Q_x переход), а также при ~800 и ~850 нм в ближней ИК-области (Q_y переходы БХл), а каротиноиды – в области ~400–550 нм. Молекула каротиноида расположена между α - и β -полипептидами в так называемом “каротиноидном кармане”, так что его полиеновая цепь приобретает S-образную форму, проходит перпендикулярно мембране и взаимодействует как с молекулами БХл в соответствующих агрегатах (БХл800, БХл850), так и с аминокислотными остатками обоих полипептидов (Freer et al., 1996;

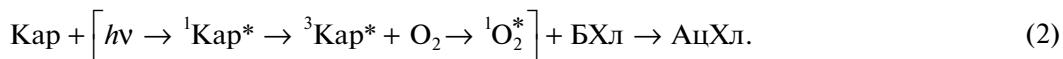
Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл, LH – светособирающий, РЦ – реакционный центр, *Alc.* – *Allochrochromatium*, АцХл – 3-ацетил-хлорофилл, ДФА – дифениламин.

Prince et al., 1997, 2003; Papiz et al., 2003; Gabrielsen et al., 2009; Löhner et al., 2015). Таким образом, пигменты пурпурных фотосинтезирующих бактерий (БХл и каротиноиды) имеют свои обособленные области поглощения, что делает возможным исследовать некоторые характеристики этих пигментов *in vivo* простыми спектральными методами.

Каротиноиды фотосинтезирующих пурпурных бактерий называются дополнительными пигментами и выполняют ряд функций *in vivo*, из которых, в данном случае, выделим защитную функцию. Она заключается в том, что система сопряженных двойных связей молекулы пигмента способна тушить триплеты БХл и рассеивать полученную энергию в виде тепла, препятствуя, таким образом, его взаимодействию с кислородом и образованию синглетного кислорода. Если при взаимодействии кислорода с триплетами БХл синглетный кислород все-таки образуется, то каротиноиды тушат и его (схема 1). Впервые гипотеза о подобной функции каротиноидов *in vivo* была предложена в работе (Griffiths et al., 1955) и в настоящее время является общепринятой (Cogdell, Frank, 1987; Frank, Cogdell, 1996; Cogdell et al., 2000; Britton, 2008; Polivka, Frank, 2010; Uragami et al., 2020).



Разные аспекты взаимодействия БХл с каротиноидами изучены достаточно хорошо, однако данных о генерации и дезактивации синглетного кислорода недостаточно. Согласно схеме 1 синглетный кислород должен образовываться при взаимодействии триплетов БХл и кислорода. Пока единственным прямым доказательством этого является способность бактериальных РЦ к выделению синглетного кислорода с квантовым выходом 0.03 ± 0.005 (Arellano et al., 2007; Uchoa et al., 2008). Для светособирающих комплексов таких измерений до сих пор не проведено, хотя, согласно общепринятой теории, синглетный кислород должен выделяться в бескаротиноидных образцах. Отметим, что существует и альтернативная гипотеза выделения синглетного кислорода, которая противоречит общепринятому мнению. Согласно этой гипотезе, каротиноиды в комплексах LH2 способны к генерации синглетного кислорода (схема 2) с последующим окислением БХл до 3-ацетил-хлорофилла (АцХл).



Эта гипотеза выдвинута нами на основании сравнительных данных по действию внешнего синглетного кислорода на БХл светособирающих комплексов LH2, по фотоокислению БХл850 в этих же комплексах при освещении светом, поглощаемым каротиноидами, а также по ингибированию указанных процессов ловушками синглетного кислорода (Махнева и соавт., 2019а, 2020; Makhneva et al., 2021).

В данной работе проведено дополнительное изучение взаимодействия синглетного кислорода с БХл как в светособирающих комплексах LH2 из *Allochrodatum (Alc.) vinosum* штамм МГУ, так и в экстрактах пигментов. Полученные данные подтверждают нашу гипотезу о возможности выделения синглетного кислорода каротиноидами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В качестве объекта исследования использовали мембраны и комплексы LH2, выделенные из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. vinosum* штамм МГУ (старое название *Alc. minutissimum*, получен из коллекции кафедры микробиологии МГУ, выделен проф. Е.Н. Кондра-

тьевой). Методы выделения мембран и комплексов подробно описаны ранее (Moskalenko et al., 2005; Makhneva et al., 2008; Moskalenko, Makhneva, 2012). Для получения комплексов со сниженным содержанием каротиноидов использовали выращивание клеток в присутствии дифениламина (ДФА), как указано в работах (Moskalenko et al., 2005; Makhneva et al., 2008; Moskalenko, Makhneva, 2012; Ashikhmin et al., 2014).

Освещение образцов. Все эксперименты с освещением образцов проводились при температуре 24°C в термостатируемой ячейке и осветителем ЛЭТИ с лампой КГМ 500 (500 Вт). Освещение комплексов во всей каротиноидной области проводили сине-зеленым светом (425–580 нм, комбинация светофильтров СЗС-22 + ЖС-12), а в более узких диапазонах с помощью интерференционных фильтров (рис. 1). Источником внешнего синглетного кислорода был бенгальский розовый (БР). Образцы с БР освещали желто-зеленым светом с помощью комбинации светофильтров (СЗС-23 + ОС-13), которые выделяли узкую область ~545–590 нм на длинноволновом склоне полосы поглощения БР и практически не затрагивали область поглощения каротиноидов (рис. 2). Интенсивность света измеряли с помощью пиро-

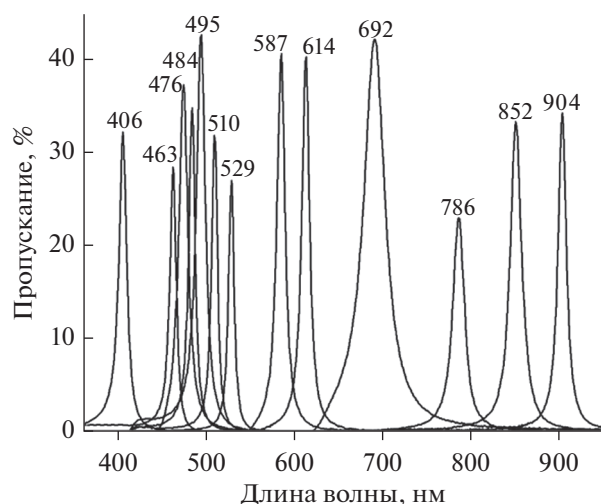


Рис. 1. Спектры пропускания интерференционных светофильтров. Цифрами указаны максимумы полос пропускания.

метра, которая составляла для сине-зеленого света – 50 Вт/м², желто-зеленого света – 7 Вт/м², а при использовании интерференционных светофильтров варьировала в пределах 2–6 Вт/м², Ошибка измерения во всех опытах не превышала 5–10%.

Биохимические и спектральные методы. Для удаления кислорода воздуха из образца использовали модификацию трубки Тунберга с 1-см кюветой, которую подключали к водоструйному насосу. Измерение концентрации кислорода в образце проводили с помощью электрода Кларка сразу после освещения и регистрации спектров поглощения. Получение пигментных экстрактов и ВЭЖХ-анализ описаны ранее (Ashikhmin et al., 2014). Пигментный анализ мембран, пигмент-белковых комплексов и изолированных каротиноидов проводили с помощью ВЭЖХ системы Shimadzu (“Shimadzu”, Япония), используя колонку с обращенной фазой Agilent Zorbax SB-C18 5 мкм 4.6 × 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”). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary 50 (“Agilent Technology”, США) (Ashikhmin et al., 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения в спектре поглощения мембран *Alc. vinosum* при освещении с помощью интерференционных светофильтров, пропускающих в области основных полос поглощения каротиноидов (485 нм) и БХл (852 нм) показаны на рис. 3а. При освещении в каротиноидную область происходит уменьшение (окисление) полосы БХл850, а поло-

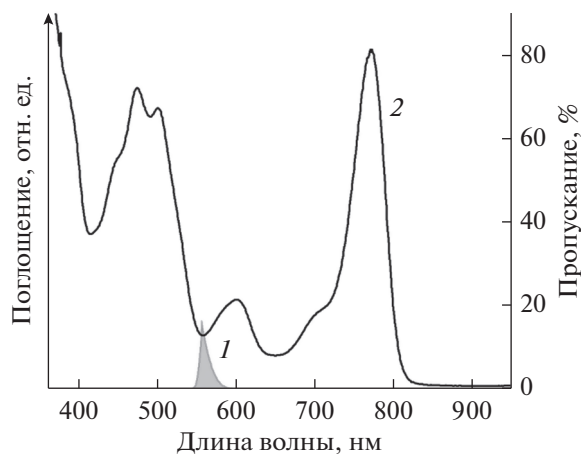


Рис. 2. Суммарный спектр пропускания светофильтров СЗС-23 и ОС13 (1) и спектр поглощения общего экстракта пигментов из комплекса LH2 *Alc. vinosum* МГУ (2).

са БХл800 несколько увеличивается за счет смещения первой полосы в коротковолновую область. Одновременно появляется полоса в районе 700 нм, которая принадлежит продукту окисления БХл – АцХл (рис. 3а). Такие же изменения в спектре поглощения комплекса LH2 были ранее обнаружены при освещении сине-зеленым светом (СЗС22-ЖС12), зеленым светом (лазер 532 нм) или с помощью полосовых светофильтров, а также при химическом окислении БХл (Махнева и соавт., 2016, 2020; Leiger et al., 2019; Makhneva et al., 2021). На свету с максимумом излучения при 852 нм зафиксировано только небольшое уменьшение полосы БХл850. Общая картина выцветания (окисления) БХл850 в контрольных мембранах *Alc. vinosum* при освещении светом с разной длиной волны (интерференционные светофильтры) представлена на рис. 3б. Хорошо видна активность каротиноидов (область 406–530 нм) в окислении БХл850, а БХл в этом процессе не участвует. Отметим, что подобные изменения отражают цепочку событий, которая указана на схеме 2. Ранее мы показали, что данный эффект ингибируется ловушками синглетного кислорода типа троллокса и аскорбата Na и предположили, что он связан с генерацией синглетного кислорода каротиноидами (Махнева и соавт., 2019б, 2020). Полученные результаты подтверждают это предположение. Основными каротиноидами в комплексе LH2 являются родопин (~66%), спириллоксантин (~17%) и 3,4-дидегидрородопин (~14%), а также в небольших количествах присутствуют ликопин и родовин (~2–3%). Понятно, что при таком гетерогенном составе оценить, какой из каротиноидов является наиболее активным в окислении БХл850 (выделении синглетного кислорода), не представляется возможным, и требуется проведе-

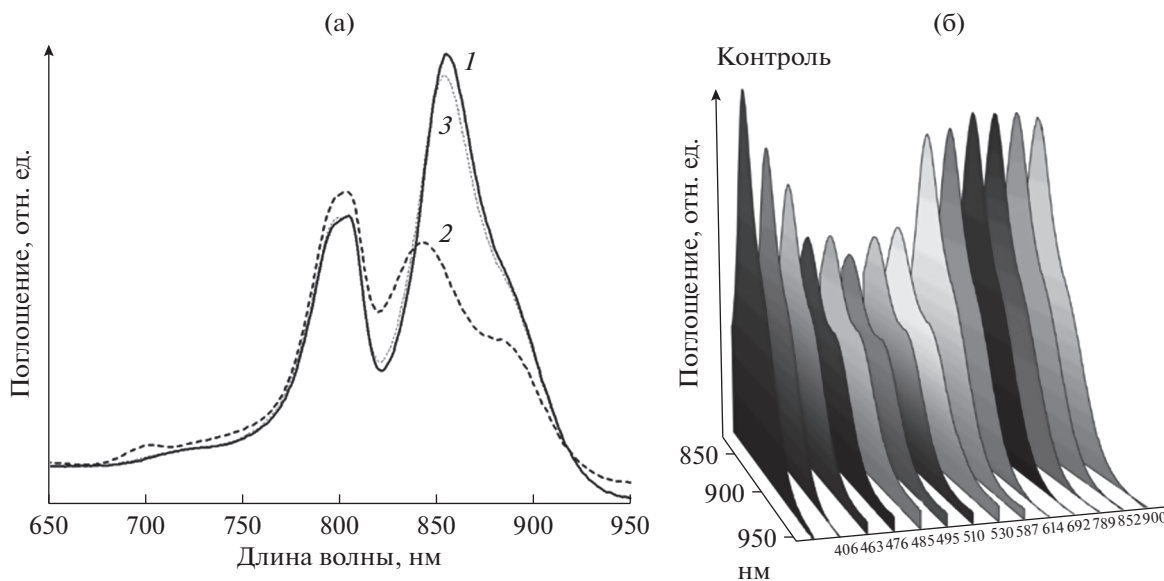


Рис. 3. а – Спектр поглощения контрольных мембран из *Alc. vinosum* до (1) и после освещения 30 мин с помощью интерференционных фильтров 485 нм (2) и 852 нм (3); б – трехмерный спектр поглощения контрольных мембран из *Alc. vinosum* до (контроль) и после освещения 30 мин с помощью соответствующих интерференционных фильтров. Максимум пропускания используемого фильтра указан в основании соответствующего спектра поглощения.

ние дополнительных экспериментов с отдельными каротиноидами, что является целью дальнейшей работы.

До настоящего времени было не совсем ясно, какое минимальное количество каротиноидов в комплексе LH2 из *Alc. vinosum* способно инициировать процесс окисления БХл850. Точные принципы организации этого комплекса были установлены относительно недавно, и было показано, что он состоит не из 8–9 пар α/β полипептидов (гетеродимеров), как у несерных бактерий, а из 12 гетерогенных пар α/β полипептидов (Löhner, 2015). Это означает, что контрольный комплекс содержит 12 каротиноидов. Известно, что получить мутанты с пониженным содержанием каротиноидов в комплексе LH2 (1–5% от контроля) методами генетики на сегодняшний день не представляется возможным. Известны только мутанты из несерных бактерий с измененным составом каротиноидов, при этом мутация прерывает синтез каротиноидов. Последний каротиноид в цепочке биосинтеза, ген которого не затронут мутацией, накапливается в клетках в полном объеме и его содержание составляет 100%. В бескаротиноидных мутантах пурпурных несерных бактерий (мутация по генам *CrtI* и *CrtA*) комплекс LH2 не собирается (Hunter, 1995). Наш подход с использованием ингибитора ДФА позволяет получить клетки (мембраны) серных фотосинтезирующих бактерий с разным содержанием каротиноидов (в пределах ≈ 0.05 –0.5% и более), но с сохранением обоих светособирающих комплексов (Makhneva et al., 2008;

Moskalenko, Makhneva, 2012). В данной работе были использованы комплексы LH2 из *Alc. vinosum*, которые содержали 12 (100%), ≈ 0.4 (≈ 3 –5%) и ≈ 0.1 (≤ 1 –0.5%) молекулы каротиноида на 1 комплекс (по нашим примерным оценкам). Они обозначены, соответственно, как контроль, ДФА1 и ДФА2. Это означает, что из расчета на 10 комплексов LH2 в образце ДФА1 на 6 комплексов без каротиноидов приходится 4 с одной молекулой пигмента, а в образце ДФА2 – это отношение равно 9/1. Спектр поглощения образцов ДФА2 представлен на рис. 4а (спектр 1), а спектры поглощения образцов ДФА1 и ДФА2 в каротиноидной области – на рис. 4а (вставка). Следует отметить, что при ингибировании биосинтеза каротиноидов в клетках *Alc. vinosum* очень легко можно получить образцы типа ДФА1 (содержание каротиноидов около 3–8%), а полного ингибирования каротиноидов ($\leq 0.5\%$) добиться достаточно сложно. По качественному составу каротиноидов указанные образцы (ДФА1 и ДФА2) достаточно близки: в них содержатся нейроспорин и ζ -каротин, а также их гидрокси-производные и в небольшом количестве – родопин, фитофлуин и фитоин (рис. 5). Два последних, которые иногда называют предшественниками каротиноидов, поглощают в ближней УФ-области. В данной работе мы использовали освещение в видимой и ближней ИК-области, и поэтому их участие в исследуемом процессе не принималось во внимание. В образцах в небольшом количестве также обнаружен АцХл (окисленный БХл). Он также присутствует в мембранах и его наличие может быть связано с окис-

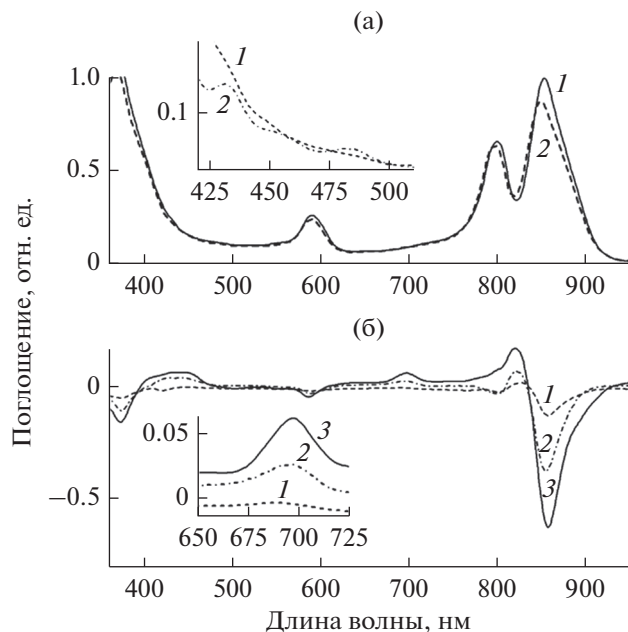


Рис. 4. а – Спектр поглощения бескаротиноидного комплекса LH2 ДФА2 из *Alc. vinosum* до (1) и после освещения 30 мин (2) синие-зеленым светом. Вставка: спектры поглощения бескаротиноидного комплекса LH2 ДФА2 (1) и комплекса LH2 ДФА1 с содержанием каротиноидов около 5% (2) в области 420–520 нм, характерной для каротиноидов ранних этапов биосинтеза. б – Разностные спектры поглощения “30 мин синие-зеленым светом минус контроль” комплекса LH2 из *Alc. vinosum*: (1) – бескаротиноидный комплекс LH2 ДФА2; (2) – комплекс LH2 ДФА1 с содержанием каротиноидов около 5%; (3) – контрольный комплекс LH2. Вставка: спектры поглощения продукта окисления БХл – АцХл, обозначения спектров такие же, как на рис. 4б.

лением небольшой части БХл в процессе разрушения клеток или естественными причинами. В любом случае его количество крайне незначительно и не определяется спектрально.

При изучении влияния количества каротиноидов в комплексах LH2 из *Alc. vinosum* на фотоокисление в них БХл при освещении синие-зеленым светом установлено, что в контрольных комплексах LH2 окисление БХл проходило в ≈ 1.7 раза эффективнее, чем в комплексе LH2 ДФА1 (рис. 4б), хотя разница в содержании каротиноидов в образцах отличалась в ≈ 20 раз. Это может свидетельствовать о том, что каротиноиды из ранних стадий биосинтеза (нейроспорин и ζ -каротин) более эффективны в процессе образования синглетного кислорода и, как следствие, в окислении БХл, чем зрелые каротиноиды. Недавно при изучении мутанта *Rb. sphaeroides* с ζ -каротином было высказано предположение, что он способен генерировать синглетный кислород, так как уровень его триплета расположен выше триплета кислорода (Niedzwiedzki et al., 2020). Это

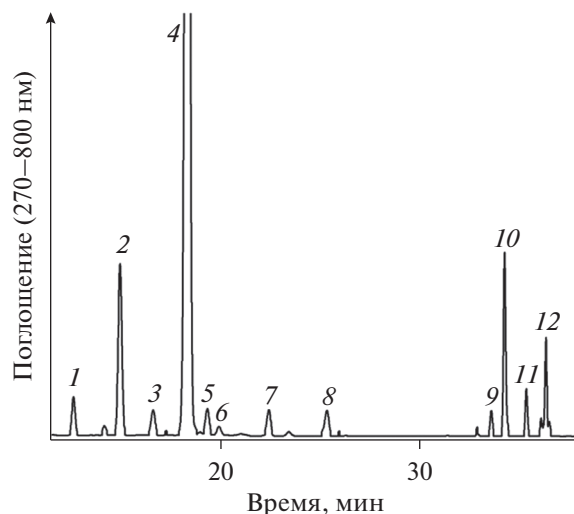


Рис. 5. ВЭЖХ анализ пигментов комплекса LH2 ДФА. Идентификация пиков: (1–4) – БХл и его производные; (5) – АцХл; (6) – родопин; (7) – ОН-нейроспорин; (8) – ОН- ζ -каротин; (9) – нейроспорин; (10) – ζ -каротин; (11) – фитофлуин; (12) – фитоин.

предположение коррелирует с полученными нами результатами. При дальнейшем уменьшении количества каротиноидов в комплексе (образец ДФА2) резко снижается выцветание БХл и практически отсутствует полоса поглощения АцХл (рис. 4б, вставка). Таким образом, каротиноиды типа нейроспорина или ζ -каротина при содержании 1 каротиноид на один или два комплекса LH2 могут достаточно эффективно генерировать синглетный кислород под действием света и, как следствие, вызывать окисление БХл в этом комплексе.

Ранее мы показали, что тушители синглетного кислорода останавливают процесс окисления БХл в комплексах LH2 на синие-зеленом свете (Махнева и соавт., 2019б). Однако было не ясно, как этот процесс зависит от концентрации кислорода в образце. Результаты подобного эксперимента представлены на рис. 6, из которого следует, что окисление БХл уменьшается одновременно со снижением концентрации кислорода. Вопрос о том, почему при полном удалении кислорода из образца появляются положительные максимумы на разностном спектре комплекса LH2, остается открытым. Возможно, что этот эффект связан с разрушением (растворением) небольших агрегатов комплекса (они могли образоваться при его концентрировании) за счет эффекта кавитации при удалении кислорода. Из результатов этого опыта следует, что процесс окисления БХл у фотосинтезирующих бактерий при низких концентрациях кислорода (2–4%) мог стимулировать процесс эволюции бактерий в сторону появления защиты от синглетного кислорода. У несерных фотосинтезирующих бакте-

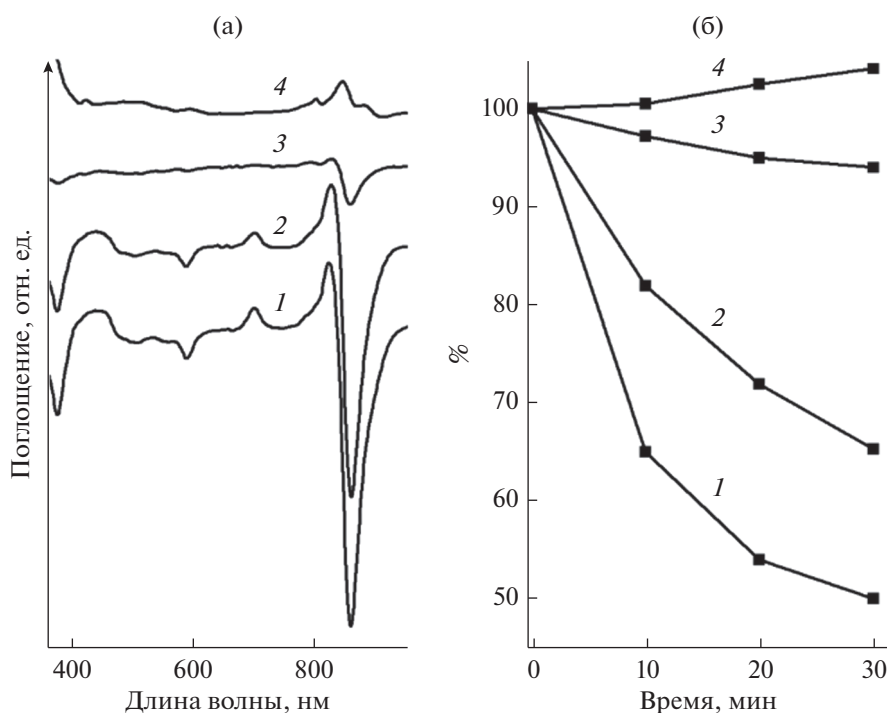


Рис. 6. а – Разностные спектры поглощения “30 мин сине-зеленым светом минус контроль” контрольного комплекса LH2 из *Alc. vinosum* в присутствии 100% атмосферного кислорода (1), ≈50% (2), ≈14% (3) и ≥0% (4). Для лучшего восприятия спектры разнесены по шкале ординат относительно друг друга. б – Кривые выцветания БХл850 в контрольном комплексе LH2 из *Alc. vinosum* в присутствии разных концентраций атмосферного кислорода (см. рис. 6а).

рий эта проблема в ходе эволюции была успешно решена, и они способны к росту в фото/гетеротрофных условиях в присутствии кислорода.

Следует отметить, что способность БХл850 в комплексе LH2 из *Alc. vinosum* к окислению синглетным кислородом делает его природным сенсором этого агента. В качестве подобного сенсора его можно использовать с образцами, которые поглощают в области 650–750 нм, где поглощение БХл очень низкое. Очевидно, что к таким образцам могут быть отнесены все хлорофилл-содержащие объекты из растений и водорослей, которые содержат РЦ фотосистемы 2.

Естественно, что возникает вопрос о механизме взаимодействия каротиноидов и кислорода. Выбор вариантов здесь не очень большой: после поглощения кванта света молекула пигмента переходит на синглетный короткоживущий уровень ($^1\text{Кар}^*$) и потом следует быстрый переход на долгоживущий триплетный уровень ($^3\text{Кар}^*$). Последний является базовым для взаимодействия с другими молекулами. Однако проблема состоит в том, что этот уровень у большинства каротиноидов, за исключением ζ -каротина и, возможно, нейроспорина, ниже, чем у кислорода, и такое взаимодействие весьма проблематично. Однако эффект фотоокисления БХл на свету, поглощаемом

каротиноидами, имеет место быть, и он связан с образованием синглетного кислорода, который окисляет БХл. Квантовый выход этого процесса небольшой, и требуются дополнительные эксперименты для выяснения его точного механизма.

На заключительном этапе работы была проведена проверка действия синглетного кислорода на экстракт пигментов штамма *Alc. vinosum* МГУ. При освещении экстракта желто-зеленым светом наблюдается быстрое выцветание БХл (рис. 7). Также отмечено некоторое увеличение поглощения при 400–550 нм, что связано с появлением продуктов окисления БХл, поглощающих в этой области. Известно, что в модельных системах БХл легко окисляется с образованием десятка окисленных продуктов, основными из которых являются хлорины (Limantara et al., 2006). Интересно отметить, что каротиноиды в этом опыте не выцветают (окисляются). Они, согласно схеме 1, должны тушить триплеты БХл или синглетный кислород и предотвращать окисление БХл, однако в данной ситуации каротиноиды не способны остановить указанный процесс. Возможная генерация каротиноидами синглетного кислорода имеет низкий квантовый выход и не принималась во внимание. Добавление в среду БР, как дополнительного продуцента синглетного кислорода,

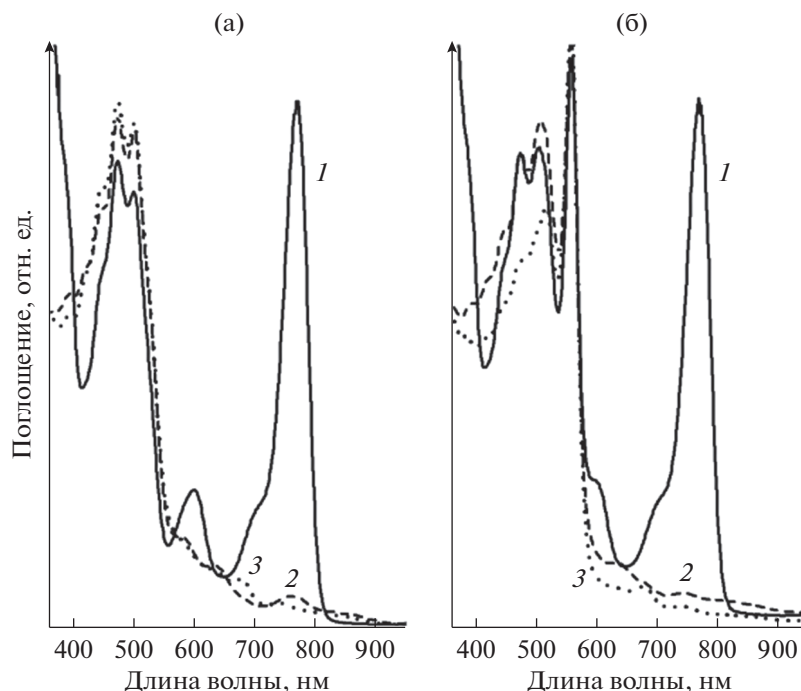


Рис. 7. (а) – Спектр поглощения общего экстракта пигментов из *Alc. vinosum* МГУ в смеси ацетон–метанол (7 : 2) до (1) и после освещения 5 мин (2) или 20 мин (3) желто-зеленым светом. (б) – Спектр поглощения общего экстракта пигментов из *Alc. vinosum* МГУ до (1) и после освещения 5 мин (2) или 20 мин (3) желто-зеленым светом в присутствии БР (конечная концентрация 10 мкМ).

существенно меняет процесс окисления (рис. 7б). Регистрируется уменьшение поглощения в каротиноидной области, которое, с одной стороны, свидетельствует об окислении самих каротиноидов, а с другой – о более глубоком окислении БХл.

Понятно, что при переходе от комплексов к экстрактам у нас нарушается пространственная организация пигментов, но сохраняется их соотношение (БХл/каротиноиды), и, в отдельных случаях, проявляются новые свойства пигментов. В частности, это касается БХл, который *in vitro* является эффективным фотосенсибилизатором синглетного кислорода (Redmond, Gamlin, 1999). Последний, в свою очередь, вызывает быстрое окисление самого БХл и уменьшение его концентрации, так что количество синглетного кислорода тоже падает. В этой связи остается непонятным поведение каротиноидов. Известно, что в модельных системах каротиноиды тушат синглетный кислород с эффективностью 90–100% (Schmidt, 2004; Tamura, Ishikita, 2020). Тушение триплетов БХл это чисто физический процесс, который должен сохраняться *in vitro*. Очевидно, что в данных (модельных) условиях оба эти процесса работают неэффективно, и каротиноиды не способны защитить БХл от окисления синглетным кислородом, который он сам генерирует.

В данной работе, проведенной на мембранах и комплексах LH2 из штамма *Alc. vinosum* МГУ, было установлено, что каротиноиды под действием света могут генерировать синглетный кислород, который окисляет БХл. БХл в указанном процессе не активен и взаимодействует с синглетным кислородом, окисляясь до АцХл. Резкое снижение образования АцХл в образце отмечено только при соотношении каротиноид/комплекс около 0.1 (>1 каротиноида на комплекс). В модельных системах (экстракт пигментов комплекса LH2, сохраняющий соотношение БХл/каротиноиды) БХл при освещении становится и основным генератором синглетного кислорода и мишенью для действия последнего. Каротиноиды в этих условиях не защищают БХл от окисления. Способность БХл850 в комплексе LH2 окисляться синглетным кислородом предполагает, что он может быть использован как природный сенсор этого агента.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность З.А. Журавлевой (ИФПБ РАН) за помощь в выращивании культуры штамма *Alc. vinosum* МГУ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта “Уникальная способность бактериальных каротиноидов генерировать синглетный кислород на свету” по госзаданию ИФПБ РАН FMRM-2022-0013.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Взаимодействие бактериохлорофилла с синглетным кислородом в мембранах пурпурных фотосинтезирующих бактерий: существует ли защитная функция каротиноидов? // ДАН. 2019а. Т. 486. С. 504–508.
<https://doi.org/10.31857/S0869-56524864504-508>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Bacteriochlorophyll interaction with singlet oxygen in membranes of purple photosynthetic bacteria: does the protective function of carotenoids exist? // Proceed. RAS. 2019. V. 486. P. 504–508.
<https://doi.org/10.31857/S0869-56524864504-508>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Защита БХЛ850 от действия синглетного кислорода в мембранах серной фотосинтезирующей бактерии *Allochrochromatium vinosum* с помощью тушителей // Микробиология. 2019б. Т. 88. С. 91–99.
<https://doi.org/10.1134/S0026365619010129>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Quenchers protect BChl850 from action of singlet oxygen in the membranes of a sulfur photosynthetic bacterium *Allochrochromatium vinosum* strain MSU // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 79–86.
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Выделение синглетного кислорода мембранами пурпурных фотосинтезирующих бактерий при облучении светом происходит при возможном участии каротиноидов // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 169–179.
<https://doi.org/10.31857/S0026365620010097>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Carotenoids are probably involved in singlet oxygen generation in the membranes of purple photosynthetic bacteria under light irradiation // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 164–173.
<https://doi.org/10.1134/S0026261720010099>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Образование 3-ацетил-хлорофилла в светособирающих комплексах пурпурных бактерий при химическом окислении // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 282–294.
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. 3-Acetyl-chlorophyll formation in light-harvesting complexes of purple bacteria by chemical oxidation // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 176–186.
- Arellano J.B., Yousef Y.A., Melo 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.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.03.004>
- Ashikhmin A.A., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A. The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis // Phot. Res. 2014. V. 119. P. 291–303.
<https://doi.org/10.1007/s11120-013-9947-6>
- Britton G. Functions of intact carotenoids // Carotenoids. Natural Functions / Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Birkhauser Verlag, Switzerland, 2008. P. 265–308.
- Cogdell R., Frank H. How carotenoids function in photosynthetic bacteria // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 895. P. 63–79.
- Cogdell R.J., Howard T.D., Bittl R., Schlodder E., Geisenheimer I., Lubitz W. How carotenoids protect bacterial photosynthesis // Philosoph. Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci. 2000. V. 355. P. 1345–1349.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0696>
- Frank H., Cogdell R. Carotenoids in photosynthesis // Photochem. Photobiol. 1996. V. 63. P. 257–264.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03022.x>
- Freer A., Prince S., Sauer K., Papiz M., Hawthornthwaite-Lawless A., McDermott G., Cogdell R., Isaacs N. Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila* // Structure. 1996. V. 4. P. 449–462.
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00050-0)
- Gabrielsen M., Gardiner A., Cogdell R. Peripheral complexes of purple bacteria // Advances in Photosynthesis and Respiration. The Purple Phototrophic Bacteria / Eds. Hunter C.N., Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T. Dordrecht: Springer, 2009. V. 28. P. 135–153.
- Griffiths M., Sistrom W., Cohen-Bazire G., Stanier R. Functions of carotenoids in photosynthesis // Nature. 1955. V. 176. P. 1211–1215.
<https://doi.org/10.1038/1761211a0>
- Hunter C.N. Genetic manipulation of antenna complexes of purple bacteria // Anoxygenic Photosynthetic Bacteria / Eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Dordrecht, Netherlands: Kluwer, 1995. P. 473–501.
- Leiger K., Linnanto J.M., Rätsep M., Timpmann K., Ashikhmin A.A., Moskalenko A.A., Fufina T., Gabdulkhakov A., Freiberg A. Controlling photosynthetic excitons by selective pigment photooxidation // J. Phys. Chem. B. 2019. V. 123. P. 29–38.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b08083>
- 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.
<https://doi.org/10.1562/2005-09-07-RA-676>
- Löhner A., Carey A.M., Hacking K., Picken N., Kelly S., Cogdell R., Kohler J. The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochrochromatium vinosum* // Photosynth. Res. 2015. V. 123. P. 23–31.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.07.022>
- 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 // Phot. Res. 2008. V. 98. P. 633–641.
<https://doi.org/10.1007/s11120-008-9384-0>
- Moskalenko A.A., Makhneva Z.K. Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochrochromatium minutissi-*

- mum* assembled without carotenoids // J. Photochem. Photobiol. 2012. V. 108. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.11.006>
- Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Carotenoids do not protect bacteriochlorophylls in isolated light-harvesting LH2 complexes of photosynthetic bacteria from destructive interactions with singlet oxygen // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 5120.
<https://doi.org/10.3390/molecules26175120>
- 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 // *Phot. Res.* 2008. V. 98. P. 633–641.
<https://doi.org/10.1007/s11120-008-9384-0>
- Moskalenko A.A., Makhneva Z.K., Fiedor L., Scheer H. Effects of carotenoid inhibition on the photosynthetic RC–LH1 complex in purple sulphur bacterium *Thiorhodospira sibirica* // *Phot. Res.* 2005. V. 86. P. 71–80.
<https://doi.org/10.1007/s11120-005-4473-9>
- Niedzwiedzki D.M., Swainsbury D.J.K., Canniffe D.P., Hunter C.N., Hitchcock A.A. Photosynthetic antenna complex foregoes unity carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer efficiency to ensure photoprotection // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. P. 6502–6508.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1920923117>
- Papiz M., Prince S., Howard T., Cogdell R., Isaacs N. The structure and thermal motion of the B800–850 LH2 complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å resolution and 100 K: new structural features and functionally relevant motions // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. P. 1523–1538.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00024-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00024-x)
- Polivka T., Frank H. Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids // *Acc. Chem. Res.* 2010. V. 43. P. 1125–1134.
<https://doi.org/10.1021/ar100030m>
- Prince S., Howard T., Myles D., Wilkinson C., Papiz M., Freer A., Cogdell R., Isaacs N. Detergent structure in crystals of the integral membrane light-harvesting complex LH2 from *Rhodospseudomonas acidophila* Strain 10050 // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. P. 307–315.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01361-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01361-x)
- Prince S., Papiz M., Freer A., McDermott G., Hawthornthwaite-Lawless A., Cogdell R., Isaacs N. Apoprotein structure in the LH2 complex from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050: modular assembly and protein pigment interactions // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 268. P. 412–423.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0966>
- Redmond R.W., Gamlin J.N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules // *Photochem. Photobiol.* 1999. V. 70. P. 391–475.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb08240.x>
- Schmidt R. Deactivation of $O_2(^1\Delta_g)$ singlet oxygen by carotenoids: internal conversion of excited encounter complexes // *J. Phys. Chem. A*. 2004. V. 108. P. 5509–5513.
<https://doi.org/10.1021/jp048958u>
- Tamura H., Ishikita H. Quenching of singlet oxygen by carotenoids via ultrafast super-exchange dynamics // *J. Phys. Chem. A*. 2020. V. 124. P. 5081–5088.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c02228>
- Uchoa A.F., Knox P.P., Turchielle R., Seifullina N.Kh., Baptistista S.M. Singlet oxygen generation in the reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* // *Eur. Biophys. J.* 2008. V. 37. P. 843–850.
<https://doi.org/10.1007/s00249-008-0287-y>
- Uragami C., Sato H., Yukihira N., Fujiwara M., Kosumi D., Gardiner A., Cogdell R., Hashimoto H. Photoprotective mechanisms in the core LH1 antenna pigment-protein complex from the purple photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* // *J. Photoch. Photobiol. A: Chemistry*. 2020. V. 400. Art. 112628.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112628>

Carotenoids in LH2 Complexes from *Allochrochromatium vinosum* under Illumination Are Able to Generate Singlet Oxygen Which Oxidizes BChl850

Z. K. Makhneva¹ and A. A. Moskalenko^{1, *}

¹Pushchino Scientific Center for Biological Research of Russian Academy of Sciences, Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

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

Received February 4, 2022; revised February 21, 2022; accepted February 22, 2022

Abstract—The interaction of singlet oxygen with bacteriochlorophyll (BChl) in the membranes, LH2 light-harvesting complexes, and pigment extracts from *Allochrochromatium* (*Alc.*) *vinosum* strain MSU (previously *Alc. minutissimum*) was studied. The ability of carotenoids illuminated with light within their absorption region to generate singlet oxygen, which oxidizes BChl, was confirmed; BChl itself was not active in this process and acted a target for singlet oxygen. A sharp decrease in the amount of oxidized BChl in the LH2 complex under illumination in the carotenoid region was noted only at the carotenoid/complex ratio of about 0.1, i.e., when there is less than 1 carotenoid molecule per 10 LH2 complexes. It is assumed that carotenoids from the early stages of biosynthesis (neurosporene, ζ-carotene) are more active in the generation of singlet oxygen under illumination than more mature carotenoids. BChl photooxidation in LH2 complexes occurred only in the presence of oxygen. A decrease in oxygen concentration by 7 or more times resulted in a slowdown of the process or its complete stop. In model systems (pigment extract of the LH2 complex retaining the BChl/carotenoids ratio), BChl under illumination becomes both the main generator of singlet oxygen and a target for the action of the latter. Under these conditions, carotenoids do not protect BChl from oxidation. The ability of BChl850 in the LH2 complex to be oxidized by singlet oxygen suggests that it can be used as a natural sensor for this agent.

Keywords: photosynthetic bacteria, photosynthesis, carotenoids, LH2 complex, singlet oxygen, 3-acetylchlorophyll