

УДК 577.355.3

РОДОПИН, ВСТРОЕННЫЙ В КОМПЛЕКС LH2 ИЗ *ALLOCHROMATIUM VINOSUM*, СПОСОБЕН К ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

© 2024 г. З. К. Махнева^а, М. А. Большаков^а, А. А. Ашихмин^а, А. А. Москаленко^{а, *}

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

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

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После исправления 24.10.2023 г.

Принята к опубликованию 26.10.2023 г.

Из клеток *Allochrochromatium vinosum* с ингибированным с помощью дифениламина (ДФА) синтезом каротиноидов были получены ДФА мембраны, в которые был встроен родопин. Выделен комплекс LH2 с содержанием родопина 85%. С помощью теста на термостабильность комплексов LH2 (ДФА и со встроенным родопином) установлено, что каротиноиды ранних стадий биосинтеза (≤ 1 молекулы на комплекс) не мешают встраиванию родопина. Установлено, что при облучении комплекса LH2 со встроенным родопином светом с длиной волны 502 нм происходит выцветание БХл850 со скоростью, близкой к скорости в контрольном комплексе LH2. Это указывает на то, что родопин после встраивания в ДФА комплекс LH2 способен к генерации синглетного кислорода под действием света. Подтверждены полученные ранее данные о гетерогенности каротиноидного состава в ДФА комплексах LH2 (варьирование количества отдельных каротиноидов на один комплекс в общей популяции) и выдвинутая нами ранее гипотеза о структурной роли каротиноидов, а именно, их способности стабилизировать комплексы LH2. На основании анализа полученных результатов, а также литературных данных обсуждается взаимодействие синглетного кислорода и каротиноидов.

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

DOI: 10.31857/S0026365624030057

Светособирающая антенна пурпурных фотосинтезирующих бактерий состоит, как правило, из двух типов пигмент-белковых комплексов: периферийного LH2 (В800–850) и прицентрального LH1 (В870–890). Последний образует с реакционным центром (RC) ансамбль LH1-RC. Основным из этих комплексов (по количеству копий в клетке и содержанию пигментов) является комплекс LH2. Схематично он представляет собой полый цилиндр, построенный из двух типов (α и β) гидрофобных полипептидов. С одним α/β -гетеродимером нековалентно связаны три молекулы бактериохлорофилла (БХл) и один каротиноид. БХл в комплексе LH2 поглощает 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.

Молекулы каротиноидов располагаются между α - и β -полипептидами в так называемых “каротиноидных карманах” таким образом, что их 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; Prince et al., 1997; Papiz et al., 2003; Prince et al., 2003; Gabrielsen et al., 2009, Löhner et al., 2015). Согласно модели, предложенной в работе (Löhner et al., 2015), комплекс LH2 из пурпурной серной бактерии *Allochrochromatium (Alc.) vinosum* может состоять из 12 пар α/β -гетеродимеров, 36 молекул БХл и 12 молекул каротиноидов.

Каротиноиды являются дополнительными пигментами фотосинтезирующих пурпурных бактерий и выполняют ряд функций *in vivo*, из которых можно выделить светособирающую, структурную и защитную (Cogdell, Frank, 1987; Britton, 2008): во-первых, они расширяют спектральный

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

диапазон солнечного света, используемого в бактериальном фотосинтезе; во-вторых, их центральное положение в структуре комплекса позволяет им стабилизировать эту структуру, и без каротиноидов комплексы теряют свою термостабильность и устойчивость к действию некоторых детергентов (Москаленко и соавт., 1983; Moskalenko, Karapetyan, 1996; Moskalenko et al., 2005); в-третьих, они способны дезактивировать (тушить) химически активную форму кислорода – синглетный кислород ($^1O_2^*$), а также нейтрализовать его, если он все же образовался, защищая, таким образом, БХл в комплексах от фотоокисления (Cogdell, Frank, 1987; Polivka, Frank, 2010). Ранее одному из авторов данной работы удалось обнаружить, что при освещении сине-зеленым светом (полоса поглощения каротиноидов) в мембранах или комплексах LH2 *Alc. vinosum* (старое название *Alc. minutissimum*) происходило выцветание длинноволновой полосы поглощения БХл850 комплекса LH2 (Москаленко, 1974). Такой же эффект был обнаружен позднее у некоторых других серных бактерий (Большаков, 2012; Ашихмин, 2014; Leiger et al., 2019). При прямом возбуждении самого БХл в образце фотовыцветание полосы БХл850 практически отсутствовало (Москаленко, 1974, Махнева и соавт., 2007). В работе (Махнева и соавт., 2016) показано, что похожие спектральные изменения происходят в мембранах и в изолированных комплексах LH2 при их окислении феррицианидом калия. Продукт окисления с максимумом поглощения в районе 700 нм был идентифицирован как 3-ацетил-хлорофилл (АцХл). Прямое действие синглетного кислорода на мембраны и комплексы LH2 из ряда бактерий, которое изучалось при добавлении к образцу бенгальского розового, известного генератора $^1O_2^*$, показало, что возбуждение последнего вызывает в спектре поглощения образцов изменения, аналогичные наблюдаемым при возбуждении каротиноидов (Махнева и соавт., 2019а, 2019b; Makhneva et al., 2021). Фотовыцветание БХл прекращалось при добавке тушителей синглетного кислорода. На основе указанных данных мы пришли к выводу, что возбуждение каротиноидов в комплексах LH2 из *Alc. vinosum* приводит к генерации синглетного кислорода, который затем окисляет БХл850 с образованием АцХл (Махнева и Москаленко, 2022; Кленина и соавт., 2022). Таким образом, была выявлена принципиально новая функция каротиноидов в бактериальном фотосинтезе.

Открытие этой функции стало возможным благодаря уникальности структуры комплекса LH2 из *Alc. vinosum*. Она, вероятно, заключается в том, что у молекул БХл в кластере БХл850 во II пиррольном кольце в положении 7–8 присутствуют два свободных протона, которые при окислении БХл (в данном случае синглетным кислородом) отрываются с образованием двойной связи. Таким образом, у окисленного БХл меняется система сопряженных

двойных связей, что приводит к образованию АцХл. На спектре поглощения этот процесс фиксируется как уменьшение полосы поглощения Q_y БХл850 с коротковолновым смещением и появление пика АцХл около 700 нм. На основании полученных результатов стало понятно, что комплекс LH2 из *Alc. vinosum* является природным сенсором синглетного кислорода. Он был использован в этом качестве в гетерогенной системе (комплекс фотосистемы 2 + комплекс LH2) и установлена возможность регистрации с его помощью генерации синглетного кислорода комплексами фотосистемы 2 (Махнева и соавт., 2022).

В данной работе проведено встраивание родопина в бескаротиноидный комплекс (ДФА-комплекс) LH2 из клеток *Alc. vinosum*, выращенных в присутствии ингибитора каротиноидогенеза дифениламина (ДФА), и показана возможность генерации синглетного кислорода при освещении в области поглощения родопина в такой гомогенной системе (ДФА комплекс LH2 + родопин). Установлено, что процесс окисления БХл протекает с образованием АцХл, который является конечным продуктом окисления в этой системе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактерии *Alc. vinosum* (старое название *Alc. minutissimum*) из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ выращивали при температуре 30°C при непрерывном освещении (интенсивность света 90 Вт/м²) на среде Larsen (Кондратьева, 1972). В качестве источника света использовали лампы накаливания мощностью 75 W. Клетки собирали в стационарной фазе роста на 4–6 сут выращивания. ДФА-клетки *Alc. vinosum* выращивали в присутствии 71 мкМ (12 мг/л среды) ДФА. Полученную биомассу сразу использовали в экспериментах или хранили при температуре –18°C.

Для выделения пигмент-содержащих мембран клетки *Alc. vinosum* ресуспендировали в 10 мМ Трис-НСI-буфере (рН 8.0) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗГ 13–0.1–22 (“Ультразвуковая техника”, Россия). Мембраны получали, как описано в работе (Ашихмин и соавт., 2020). Пигмент-белковые комплексы выделяли методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-TOYOPEARL 650 S (Большаков и соавт., 2016). Для солюбилизации мембран был использован додецилмальтозид (ДМ) в концентрации 2–2.5%. Полученные образцы сразу использовали для анализа или хранили при –18°C.

Родопин выделяли методом ВЭЖХ, как описано в работе (Ашихмин и соавт., 2022). Чистота препарата составляла ≥85%. Спектр поглощения родопина представлен на рис. 1а.

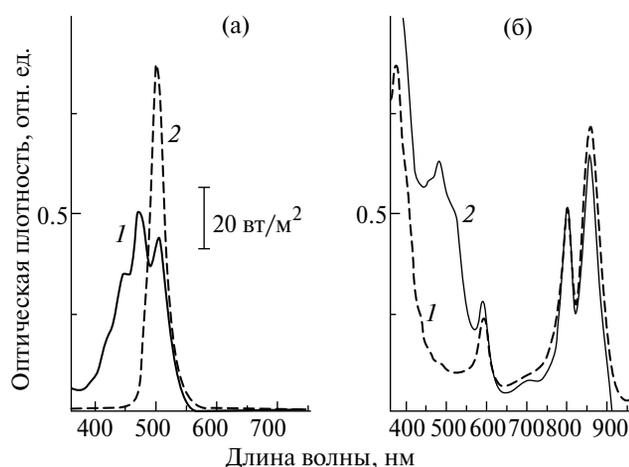


Рис. 1. а – Спектр поглощения родопина, используемого для встраивания (1) и спектр излучения светодиода; б – спектры поглощения ДФА-мембран из клеток *Alc. vinosum* с ингибированным синтезом Кар до (1) и после добавления к ним 3 порций родопина и последующего диализа (2).

Для его встраивания использовали модифицированную методику, описанную в работе (Торопыгина и соавт., 2003а). В качестве образца для встраивания брали 2.7 мл ДФА-мембран *Alc. vinosum* (плотность 20 опт. ед. при 850 нм; рис. 1б), к которым добавляли 0.3 мл ДМ (20%). Родопин (0.43 мМ) растворяли в 1.8 мл смеси ацетон-метанол (7 : 2) и добавляли к ДФА-мембранам дробно по 0.6 мл. Объем родопина в растворителе не превышал 20% от объема образца. После каждого добавления родопина проводили диализ образца против Трис-НСl буфера (50 мМ; рН 8) с 0.1% ДМ для удаления растворителя. В одном опыте добавляли до 3 порций родопина. Спектры поглощения мембран до и после добавления родопина представлены на рис. 1б.

Пигменты анализировали методом ВЭЖХ (Ashikhmin et al., 2017) на колонке Spherisorb ODS2 5 мкм (“Waters”, США). Установка для ВЭЖХ состояла из насоса LC10ADvp с модулем FCV10 Alvp, детектора с диодной матрицей SPD-M20A и термостата СТО-20АС (“Shimadzu”, Япония).

Спектры поглощения мембран и пигмент-белковых комплексов регистрировали при комнатной температуре на спектрофотометре Cary 50 (“Varian”, Австралия).

Комплексы LH2 облучали светом с длиной волны 502 нм, используя светодиод мощностью 30 Вт. Интенсивность света была 118 Вт/м². Термостойкость комплексов проверяли, нагревая образец в течение 1 или 5 мин при 80°C. Электрофорез в ПААГ проводили в 7% геле (Москаленко, Ерохин, 1974).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для встраивания каротиноида использованы ДФА-мембраны *Alc. vinosum*, которые содержали небольшое количество каротиноидов ранних стадий биосинтеза (нейроспорин, ξ -каротин и их производные), а также так называемые неокрашенные предшественники фитонин и фитофлуин (рис. 2).

По нашим оценкам, содержание окрашенных каротиноидов в образце не превышало 5%. На первом этапе было важно добиться эффективного встраивания родопина в комплекс LH2. Поэтому мы увеличили концентрацию родопина и уменьшили количество порций каротиноида, добавляемых к образцу. В результате был получен образец, в котором основной максимум каротиноидов в ≈ 4 раза выше максимума Q_x перехода при 590 нм (рис. 1а). Выделение комплекса LH2 со встроенным родопином показало, что удалось добиться $\approx 85\%$ эффективности встраивания этого каротиноида. Отметим, что в спектре поглощения комплекса LH2 со встроенным родопином, кроме самого родопина (максимум при 497 нм) присутствуют также каротиноиды ранних стадий биосинтеза (максимум при 432 нм) (рис. 1 и 2). Данные ВЭЖХ подтверждают, что родопин – это основной каротиноид в комплексе LH2 (рис. 3).

Примерно такая же эффективность встраивания родопина в ДФА комплекс LH2 из *Alc. vinosum* была получена нами ранее при исследовании влияния количества сопряженных двойных связей в молекулах каротиноидов на эффективность переноса энергии на БХл (Ашихмин и соавт., 2018). Однако в этом случае комплекс находился в более коротковолновой конформации, и поэтому отношение полос БХл850/БХл800 было меньше 0.9. Возникает вопрос, что может мешать 100% встраиванию родопина в комплекс LH2? Возможно, это связано с присутствием небольшого количества

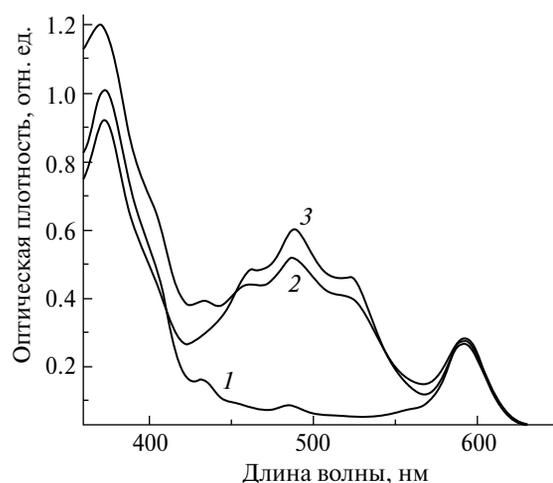


Рис. 2. Спектры поглощения ДФА-комплекса LH2 (1), комплекса LH2 со встроенным родопином (2) и контрольного комплекса LH2 из *Alc. vinosum* (3).

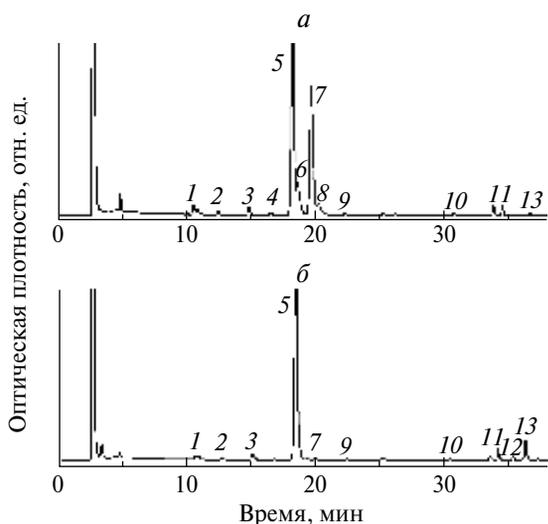


Рис. 3. ВЭЖХ пигментов комплекса LH2 со встроенным родопином (а) и ДФА-комплекса LH2 (б) из *Alc. vinosum*. Идентификация пиков: 1–5 – БХл и его производные; 6 – дидегидрородопин; 7 – родопин; 8 – спирилоксантин; 9 – бактериофеофитин; 10 – неидентифицированный продукт некаротиноидной природы; 11 – ζ -каротин; 12 – фитофлуин; 13 – фитоин.

каротиноидов в образце, используемом для встраивания (рис. 1 и 2), которые локализованы в части комплексов и блокируют процесс встраивания. Чтобы ответить на этот вопрос, был проведен дополнительный эксперимент по изучению термостабильности образцов. Мы основывались на выдвинутой нами теории о том, что каротиноиды способны играть структурную роль, стабилизируя комплексы LH2 против внешних воздействий (температура, детергенты) (Москаленко и соавт., 1983; Moskalenko, Karapetyan, 1996; Moskalenko et al., 2005), и предположили, что среди комплексов со встроенными каротиноидами могли присутствовать комплексы с большим содержанием каротиноидов (80–100%) и комплексы с низким содержанием каротиноидов (1–2 молекулы). Нагревание при 80°C сохранило бы (не полностью) первый тип комплексов и разрушило бы второй тип. Это, в свою очередь, привело бы к тому, что в спектре поглощения комплекса LH2 со встроенным родопином исчез максимум при 432 нм. Результаты эксперимента представлены на рис. 4.

Хорошо видно, что при нагревании разрушается только небольшая часть ($\approx 10\%$) комплекса LH2 со встроенным родопином. Отметим, что такой же процесс наблюдается для контрольных комплексов. Из спектров поглощения в каротиноидной области исследуемого комплекса видно, что каротиноиды из ранних стадий биосинтеза сохранились в его структуре после нагревания (рис. 4в). Аналогичный опыт, проведенный с ДФА комплексом LH2, подтвердил, что через 5 мин нагревания при 80°C разрушается основная часть, а выживает только $\approx 10\text{--}12\%$ комплекса LH2, которые обогащены

каротиноидами в ≈ 3.5 раза по сравнению с исходным комплексом (рис. 4г). Из этих данных следует, что присутствие небольшого количества каротиноидов (≈ 1 молекула на комплекс) не препятствуют их встраиванию в комплексы LH2, и высказанное выше предположение о возможной блокировке такого процесса каротиноидами из ранних стадий биосинтеза не соответствует действительности. Полученные результаты являются также прямым доказательством структурной функции каротиноидов и подтверждают гетерогенность каротиноидного состава в популяции ДФА-комплексов LH2 (Москаленко и соавт., 1983; Makhneva et al., 2008; Moskalenko, Karapetyan, 1996).

Перед оценкой возможности генерации синглетного кислорода родопином, встроенным в комплекс LH2, необходимо было оценить способность образцов, используемых для встраивания, к участию в подобном процессе. Дело в том, что в отличие от мутантов, которые имеют достаточно стандартные характеристики, в ДФА образцах количество и состав каротиноидов варьирует от опыта к опыту, а, следовательно, и эффективность генерации синглетного кислорода тоже будет разной. Для подобных опытов в данной работе был использован светодиод, который обладал узким диапазоном излучения (спектр его излучения был похож на спектр пропускания интерференционного светофильтра) и высокой мощностью светового потока (рис. 1а) по сравнению со стеклянными

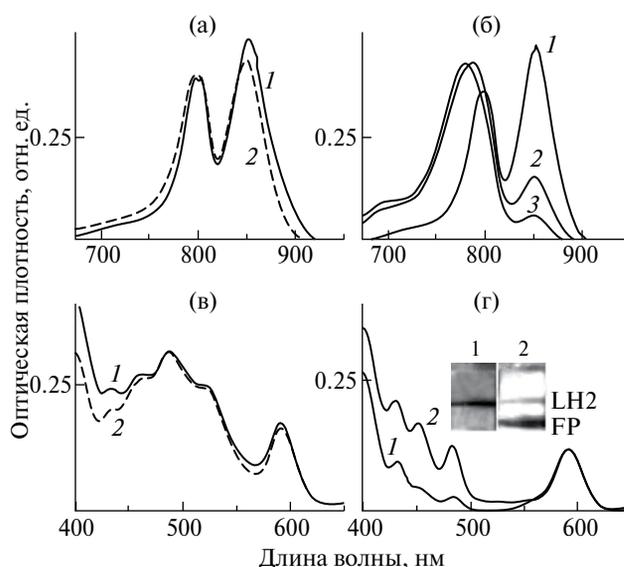


Рис. 4. Изменения в спектре поглощения комплекса LH2 со встроенным родопином (а) до (1) и после нагревания 5 мин при 80°C (2) и ДФА-комплекса LH2 (б) до (1) и после нагревания 2 мин (2) и 5 мин (3) при 80°C. Спектры (в, г) нормированы: по максимуму при 486 нм (в, 1) и при 590 нм (г, 1). Вставка: ПАГЭ ДФА-комплекса LH2 до (1) и после нагревания 5 мин (2) при 80°C (LH2 – комплекс LH2; FP – зона свободных пигментов).

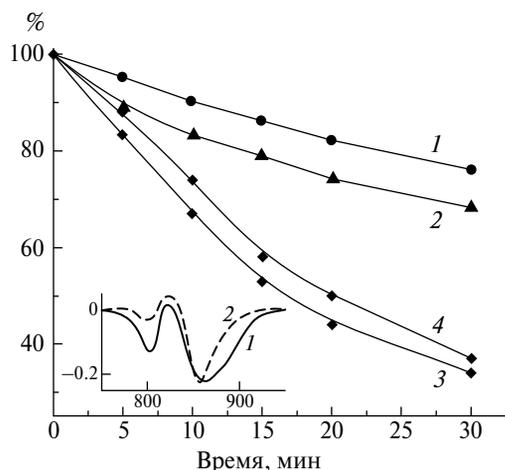


Рис. 5. Кривые выцветания БХл850 в ДФА-мембранах (1), ДФА-комплексе LH2 (2), контрольном комплексе LH2 (3) и комплексе LH2 со встроенным родопином (4) при освещении светодионом с максимумом излучения 502 нм. Вставка: разностные спектры “контроль – 30 мин освещения светом 502 нм” ДФА-мембран (1) и ДФА-комплекса LH2 (2). Спектры нормированы по максимуму БХл850.

светофильтрами разных типов, которые мы использовали ранее (Махнева и соавт., 2019а, 2019б; Махнева и соавт., 2020). Показано, что ДФА комплекс LH2 в выделенном состоянии менее устойчив к облучению светом с максимумом 502 нм по сравнению с ДФА мембранами (рис. 5).

Этот результат совпадает с общими представлениями о том, что подобный комплекс более устойчив *in vivo*, чем *in vitro*. Отметим, что в ДФА мембранах выцветают обе полосы Q_y комплекса LH2 (БХл850 и БХл800), а также Q_y комплекса LH1 (БХл880) (рис. 5, вставка). Выцветания полосы Q_y комплекса LH2 (БХл800) мы ни разу не зафиксировали при облучении контрольных образцов с помощью светофильтров (Москаленко, 1974; Махнева и соавт., 2019а, 2019б; Махнева и соавт., 2020). Ранее было показано, что действующим фактором этого процесса может являться синглетный кислород, который образуется при облучении комплексов LH2 из *Alc. vinosum* в область каротиноидов (Махнева и соавт., 2019б, 2020). Наличие этого эффекта в ДФА комплексах LH2 связано с частичным перекрытием области поглощения каротиноидов из ранних стадий биосинтеза со спектром излучения используемого светодиода. В контрольных комплексах LH2 этот процесс идет с более высокой скоростью (рис. 5).

Сравнивая процесс выцветания БХл в комплексах LH2 со встроенным родопином и контрольных комплексах LH2, можно отметить, что они практически идентичны. В обоих случаях происходит выцветание полосы БХл850, ее коротковолновое смещение до 830 нм и одновременное появление

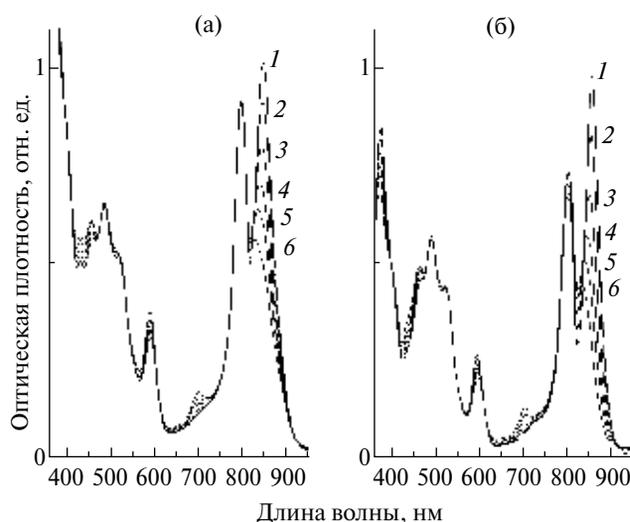


Рис. 6. Изменения в спектре поглощения комплекса LH2 со встроенным родопином (а) и контрольного комплекса LH2 (б) при освещении светодионом с максимумом излучения 502 нм: 1 – 0; 2 – 5; 3 – 10; 4 – 15; 5 – 20; 6 – 30 мин.

полосы поглощения окисленного продукта – АцХл (рис. 6).

Скорости окисления БХл850 в обоих комплексах были близки (рис. 5). Установлено, что понижение температуры с 24 до 0°C уменьшало выцветание БХл850 в контрольном комплексе LH2 с ~85% до ~47%, однако реакция окисления не останавливалась (результаты не показаны). Следует подчеркнуть, что АцХл является конечным продуктом окисления БХл в рассматриваемом процессе, так как его концентрация в образце увеличивается при увеличении времени освещения, а не выходит на плато или уменьшается, что характерно для промежуточных продуктов (рис. 7). Таким образом,

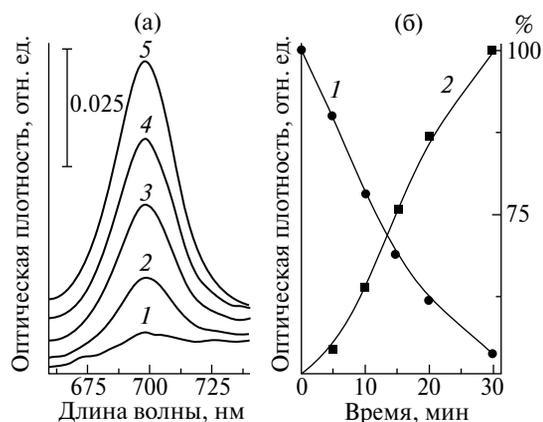


Рис. 7. Влияние освещения светодионом с максимумом излучения 502 нм на комплекс LH2 со встроенным родопином: а – увеличение поглощения АцХл (1 – 5; 2 – 10; 3 – 15; 4 – 20; 5 – 30 мин освещения); б – кривые изменения поглощения Q_y БХл850 (1) и АцХл (2).

родопин, встроенный в комплекс LH2, способен генерировать синглетный кислород под действием света, и он окисляет БХл850.

Способность бактериальных каротиноидов генерировать синглетный кислород является неожиданной и поэтому, фактически, в литературе не рассматривалась, так как перекрывалась их защитной функцией (Griffiths et al., 1955; Calvin, 1955; Cogdell, Frank, 1987; Frank, Cogdell, 1993, 1996; Britton, 2008; Polivka, Frank, 2010; Uragami et al., 2020). Ранее в наших работах мы показали, что каротиноиды в комплексах LH2 некоторых пурпурных серных бактерий могут при освещении вызывать окисление БХл, и этот процесс связан с генерацией синглетного кислорода каротиноидами (Махнева и соавт., 2007, 2019а, 2019б, 2020, 2022; Makhneva et al., 2021; Кленина и соавт., 2022). В недавнем исследовании было установлено, что фотоокисление БХл у *Alc. vinosum* происходит именно при возбуждении каротиноидов, а не самих молекул БХл. Однако этот процесс протекает с очень низким квантовым выходом около 0.0003 (Кленина и соавт., 2022). Дополнительное подтверждение возможности генерации синглетного кислорода бактериальными каротиноидами было получено при исследовании их аэрированных растворов (Ашихмин и соавт., 2020, 2022) с использованием нового спектрометра флуоресценции синглетного кислорода, недавно собранного группой А. А. Красновского (Красновский и соавт., 2019). Изучение фотосенсибилизированной флуоресценции синглетного кислорода при 1270 нм в растворах фитоина, фитофлуина и ζ -каротина показало, что квантовый выход генерации синглетного кислорода у ζ -каротина и фитофлуина может достигать 0.015 и 0.4 соответственно (Ашихмин и соавт., 2022). Следует отметить, что ранее о высоком квантовом выходе генерации синглетного кислорода среди фотосинтетических пигментов впервые сообщалось только для хлорофиллов, БХл и феофитинов (Krasnovskii, 1977; Krasnovsky, 1979; Borland et al., 1987; Егоров и соавт., 1990).

Биологический смысл генерации синглетного кислорода изолированными каротиноидами и каротиноидами в бактериальных комплексах LH2 на данный момент до конца не ясен. Возможно, что синглетный кислород может выступать в роли сигнальной молекулы, которая позволяет регулировать работу отдельных генов и сопутствующие биохимические процессы или запускать процессы апоптоза клетки в условиях избытка освещения.

ВКЛАД АВТОРОВ

ААМ — концепция, руководство работой; написание текста статьи и подготовка рисунков; ЗКМ — проведение экспериментов, редактирование текста статьи, обсуждение результатов исследования;

ААА — выделение родопина, редактирование текста статьи, МАБ — выделение комплексов LH2, подготовка статьи к печати.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ашихмин А. А. Каротиноиды светособирающих комплексов пурпурной серной бактерии *Ect. haloalkaliphila*. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 17.07.2014. Пушкино: Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 2014. 22 с.
- Ашихмин А. А., Бендикис А. С., Москаленко А. А., Красновский А. А. мл. Фитофлуин – эффективный фотосенсибилизатор образования синглетного кислорода под действием УФ-А излучения // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 907–915.
<https://doi.org/10.31857/S0320972520070052>
- Ashikhmin A., Benditkis A., Moskalenko A., Krasnovsky Jr A. A. Phytofluene as a highly efficient UV-A photosensitizer of singlet oxygen generation // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 773–780.
<https://doi.org/10.1134/S0006297920070056>
- Ашихмин А., Махнева З., Большаков М., Москаленко А. Влияние количества сопряженных двойных связей в молекулах каротиноидов на эффективность переноса энергии на бактериохлорофилл в светособирающих комплексах LH2 из *Allochrochromatium vinosum*, штамм МГУ // ДАН. 2018. Т. 483. С. 332–336.
- Ashikhmin A. A., Makhneva Z. K., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A. The influence of the number of conjugated double bonds in carotenoid molecules on the energy transfer efficiency to bacteriochlorophyll in light-harvesting complexes LH2 from *Allochrochromatium vinosum* strain MSU // Dokl. Biochem. Biophys. 2018. V. 483. P. 321–325.
- Ашихмин А. А., Бендикис А. С., Москаленко А. А., Красновский (мл.) А. А. ζ -Каротин: генерация и тушение синглетного кислорода, сравнение с фитофлуином // Биохимия. 2022. V. 87. P. 1471–1482.
<https://doi.org/10.31857/S0320972522100128>
- Ashikhmin A. A., Benditkis A. S., Moskalenko A. A., Krasnovsky Jr A. A. ζ -Carotene: generation and quenching of singlet oxygen, comparison with phytofluene //

- Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. P. 1169–1178. <https://doi.org/10.1134/S0006297922100108>
- Большаков М. А.* Роль каротиноидов в процессе фотоокисления бактериохлорофилла *in vivo*. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 20.12.2012. Пушкино: Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 2012. 22 с.
- Bolshakov M. A.* The role of carotenoids in the photooxidation of bacteriochlorophyll *in vivo*. PhD thesis. 20.12.2012. Pushchino: Institute of Fundamental Problems of Biology Russian Academy of Sciences. P. 22.
- Большаков М. А., Ашихмин А. А., Махнева З. К., Москаленко А. А.* Влияние интенсивности освещения и ингибирования биосинтеза каротиноидов на сборку периферийных светособирающих комплексов пурпурной серной бактерии *Allochrochromatium vinosum* ATCC17899 // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 403–414.
- Bolshakov M. A., Ashikhmin A. A., Makhneva Z. K., Moskalenko A. A.* Effect of illumination intensity and inhibition of carotenoid biosynthesis on assembly of peripheral light-harvesting complexes in purple sulfur bacteria *Allochrochromatium vinosum* ATCC17899 // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 420–429.
- Егоров С. Ю., Красновский А. А., Вычегжанина И. В., Дроздова Н. Н.* Фотосенсибилизированное образование и тушение синглетного молекулярного кислорода мономерными и агрегированными молекулами пигментов фотосинтезирующих бактерий // Доклады Академии наук. 1990. Т. 310. С. 471–474.
- Egorov S. Y., Krasnovskii, Jr. A. A., Vychezhnina I. V., Drozdova N. N., Krasnovskii A. A.* Generation and quenching of molecular single oxygen by pigment molecules in photosynthetic bacteria // Doklady Biophysics. 1990. V. 310. № 2. P. 6–10.
- Кленина И. Б., Махнева З. К., Москаленко А. А., Проксураков И. И.* Селективное возбуждение каротиноидов светособирающих комплексов LH2 *Allochrochromatium vinosum* приводит к окислению бактериохлорофилла // Биохимия. 2022. Т. 87. С. 1425–1433. <https://doi.org/10.31857/S0320972522100086>
- Klenina I. B., Makhneva Z. K., Moskalenko A. A., Proskuryakov I. I.* Selective excitation of carotenoids of the *Allochrochromatium vinosum* Light-Harvesting LH2 complexes leads to oxidation of bacteriochlorophyll // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. P. 1130–1137. <https://doi.org/10.1134/S0006297922100066>
- Кондратьева Е. Н.* Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез. М.: Изд-во МГУ, 1972. 75 с.
- Красновский А. А., Бендиткис А. С., Козлов А. С.* Кинетические измерения фосфоресценции синглетного кислорода методом разрешенного во времени счета фотонов в растворителях, не содержащих водородных атомов // Биохимия. 2019. Т. 84. С. 240–251.
- Krasnovsky A. A., Jr., Benditkis A. S., Kozlov A. S.* Kinetic measurements of singlet oxygen phosphorescence in the solvents lacking hydrogen atoms using the method of time resolved photon counting // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. 153–163.
- 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.
- Makhneva Z. K., Ashikhmin A. A., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* 3-Acetyl-chlorophyll formation in light-harvesting complexes of purple bacteria by chemical oxidation // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 176–86.
- 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>
- Makhneva Z. K., Ashikhmin A. A., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* Bacteriochlorophyll interaction with singlet oxygen in membranes of purple photosynthetic bacteria: does the protective function of carotenoids exist? // Dokl. Biochem. Biophys. 2019a. V. 486. P. 216–219. <https://doi.org/10.1134/S1607672919030141>
- 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>
- Makhneva Z. K., Ashikhmin A. A., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* 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.
- Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А.* Защита BChl850 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>
- Makhneva Z. K., Ashikhmin A. A., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* Quenchers protect BChl850 from action of singlet oxygen in the membranes of a sulfur photosynthetic bacterium *Allochrochromatium vinosum* strain MSU // Microbiology. 2019b. V. 88. P. 79–86.
- Махнева З. К., Ерохин Ю. Е., Москаленко А. А.* Фотосенсибилизированное каротиноидами окисление димеров бактериохлорофилла светособирающих комплексов B800–850 в клетках *Allochrochromatium minutissimum* // ДАН. 2007. Т. 416. С. 408–411.
- Makhneva Z. K., Erokhin Yu. E., Moskalenko A. A.* Carotenoid-photosensitized oxidation of bacteriochlorophyll dimers in light-harvesting complexes B800–850 in *Allochrochromatium minutissimum* cells // Dokl. Biochem. Biophys. 2007. V. 416. № 1–6. P. 256–259. <https://doi.org/10.1134/S1607672907050080>
- Махнева З. К., Москаленко А. А.* Каротиноиды в комплексах LH2 из *Allochrochromatium vinosum* способны при

- освещении генерировать синглетный кислород, который окисляет BChl850 // *Микробиология*. 2022. Т. 91. С. 466–474.
<https://doi.org/10.31857/S0026365622300218>
- Makhneva Z. K., Moskalenko A. A.* Carotenoids in LH2 complexes from *Allochrochromatium vinosum* under illumination are able to generate singlet oxygen which oxidizes BChl850 // *Microbiology (Moscow)*. 2022. V. 91. P. 409–416.
<https://doi.org/10.1134/S002626172230021X>
- Махнева З. К., Смолова Т. Н., Большаков М. А., Москаленко А. А.* Комплекс LH2 из серной бактерии *Allochrochromatium vinosum* – природный сенсор синглетного кислорода // *Биохимия*. 2022. Т. 87. С. 1459–1470.
<https://doi.org/10.31857/S0320972522100116>
- Makhneva Z. K., Smolova T. N., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* LH2 complex from sulfur bacteria *Allochrochromatium vinosum* – natural singlet oxygen sensor // *Biochemistry (Moscow)*. 2022. V. 87. P. 1159–1168.
<https://doi.org/10.1134/S0006297922100091>
- Москаленко А. А., Ерохин Ю. Е.* Выделение пигмент-липопротеиновых комплексов из пурпурных бактерий методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле // *Микробиология*. 1974. V. 43. С. 654–657.
- Москаленко А. А.* Изучение пигмент-липопротеиновых комплексов из *Chromatium minutissimum*. Дисс. ... канд. биол. наук. Пушино, 1974. 189 с.
- Москаленко А. А., Кузнецова Н. Ю., Ерохин Ю. Е.* Выделение, спектральные и фотохимические характеристики трех типов пигмент-белковых комплексов из *Chromatium* с подавленным синтезом каротиноидов // *ДАН СССР*. 1983. Т. 269. С. 1248–1251.
- Торопыгина О. А., Махнева З. К., Москаленко А. А.* Встраивание каротиноидов в светособирающий комплекс B800–850 из *Chromatium minutissimum* // *Биохимия*. 2003а. Т. 68. С. 1101–1112.
- Торопыгина О. А., Мakhneva Z. K., Moskalenko A. A.* Reconstitution of carotenoids into the light-harvesting complex B800–850 of *Chromatium minutissimum* // *Biochemistry (Moscow)*. 2003а. V. 68. P. 901–911.
<https://doi.org/10.1023/A:1025755116593>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.020>
- Borland C. F., McGarvey D.J., Truscott T. G., Cogdell R. J., Land E. J.* Photophysical studies of bacteriochlorophyll *a* and bacteriopheophytin *a* – singlet oxygen generation // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 1987. V. 1. P. 93–101.
[https://doi.org/10.1016/1011-1344\(87\)80009-X](https://doi.org/10.1016/1011-1344(87)80009-X)
- Britton G.* Functions of intact carotenoids // *Carotenoids. Natural Functions* / Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfanger H. Birkhauser Verlag, Switzerland, 2008. P. 265–308.
- Calvin M.* Function of carotenoids in photosynthesis // *Nature*. 1955. V. 176. P. 1215.
- Cogdell R. J., Frank H. A.* How carotenoids function in photosynthetic bacteria // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. V. 895. P. 63–79.
- Frank H. A., Cogdell R. J.* Photochemistry and function of carotenoids in bacteria // *The photochemistry of carotenoids* / Eds. Frank H. A., Young A. J., Britton G., Cogdell R. J. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. P. 36–69.
- Frank H. A., Cogdell R. J.* 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. W.* Pigment–pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila* // *Structure*. 1996. V. 4. P. 449–462.
- Gabrielsen M., Gardiner A. T., Cogdell R. J.* Peripheral complexes of purple bacteria // *The purple phototrophic bacteria*. 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.
- Krasnovskii A. A.* Photoluminescence of singlet oxygen in solutions of the chlorophylls and pheophytins // *Biophysics*. 1977. V. 22. P. 960–962.
- Krasnovsky Jr. A. A.* Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions // *Photochem. Photobiol.* 1979. V. 29. P. 960–962.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb09255.x>
- Leiger K., Linnanto J. M., Rätsep M., Timpmann K., Ashikhmin A. A., Moskalenko A. A., Fufina T. Y., Gabdulkhakov A. G., Freiberg A.* Controlling photosynthetic excitons by selective pigment photooxidation // *J. Phys. Chem. B*. 2019. V. 123. P. 29–38.
- Löhner A., Carey A. M., Hacking K., Picken N., Kelly S., Cogdell R., Köhler J.* The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochrochromatium vinosum* // *Photosynth. Res.* 2015. V. 123. P. 23–31.
- Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A.* Heterogeneity of carotenoid content and composition in LH2 of the purple sulphur bacterium *Allochrochromatium minutissimum* grown under carotenoid-biosynthesis inhibition // *Photosynth. Res.* 2008. V. 98. P. 633–641.
- Makhneva Z. K., Bolshakov M. A., Moskalenko A. 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. Art. 5120.
<https://doi.org/10.3390/molecules26175120>
- Moskalenko A. A., Karapetyan N. V.* Structural role of carotenoids in photosynthetic membranes // *Z. Naturforsch.* 1996. V. 51. P. 763–771.
- Papiz M. Z., Prince S. M., Howard T., Cogdell R. J., Isaacs N. W.* The structure and thermal motion of the B800–850 LH2 complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å resolution and 100K: New structural features and functionally relevant motions // *Mol. Biol.* 2003. V. 326. P. 1523–1538.

- 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* // *Photosynth. Res.* 2005. V. 86. P. 71–80. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-4473-9>
- Polívka T., Frank H. A.* 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. M., Howard T. D., Myles D. A., Wilkinson C., Papiz M. Z., Freer A. A., Cogdell R. J., Isaacs N. W.* 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.
- Prince S. M., Papiz M. Z., Freer A. A., McDermott G., Hawthornthwaite-Lawless A. M., Cogdell R. J., Isaacs N. W.* 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.
- Uragami C., Sato H., Yukihiro N., Fujiwara M., Kosumi D.* 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>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Rhodopin Incorporated into the *Allochrochromatium vinosum* LH2 Complex Is Able to Generate Singlet Oxygen under Illumination

Z. K. Makhneva¹, M. A. Bolshakov¹, A. A. Ashikhmin¹, and A. A. Moskalenko^{1, *}

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

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

Received July 6, 2023; revised October 24, 2023; accepted October 26, 2023

Abstract—DPA membranes from *Allochrochromatium vinosum* cells, in which carotenoid biosynthesis was inhibited using diphenylamine (DPA) were obtained, into which rhodopin was incorporated. The LH2 complex with rhodopin content of 85% was isolated. Using a test for the thermal stability of LH2 complexes (DPA and with incorporated rhodopin), it was established that carotenoids of the early stages of biosynthesis (≤ 1 molecules per complex) did not interfere with rhodopin incorporation. It was found that when the LH2 complex with incorporated rhodopin was irradiated with light at the wavelength of 502 nm, BChl850 was photobleached at a rate close to that in the control LH2 complex. This indicates that rhodopin, after being incorporated into the DPA LH2 complex, is capable of generating singlet oxygen under illumination. Previously obtained data on heterogeneity of the carotenoid composition in DPA LH2 complexes (variation in the number of individual carotenoids molecules per complex in the general population) and our earlier suggestion about the structural role of carotenoids, namely, their ability to stabilize the LH2 complexes, were confirmed. Based on analysis of our results, as well as of the literature data, the interaction of singlet oxygen and carotenoids is discussed.

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