

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.32

ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ СВЕТОСОБИРАЮЩЕГО ПИГМЕНТ-БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА LH2 ИЗ ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2023 г. А. Д. Бурцева^{1,*}, Т. Н. Баймухаметов², И. О. Илясов¹, М. А. Большаков³,
А. А. Москаленко³, К. М. Бойко¹, А. А. Ашихмин³

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований” РАН, Пушкино, Россия

*E-mail: kmb@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 15.06.2023 г.

Принята к публикации 29.06.2023 г.

Первичные процессы фотосинтеза у пурпурных фотосинтезирующих бактерий происходят в светособирающих комплексах (Light-Harvesting, LH). В состав комплекса LH2 входят полипептиды, бактериохлорофилл и в большинстве случаев каротиноиды. Известны три пространственные структуры комплексов LH2 из пурпурных несерных бактерий, однако для пурпурных серных бактерий структуры с высоким разрешением не установлены. Описываются структурные исследования двух светособирающих комплексов LH2 из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*, проведенные методом криоэлектронной микроскопии. Получены изображения каротиноидсодержащего (LH2+) и бескаротиноидного (LH2–) вариантов комплекса, демонстрирующие характерную архитектуру объектов данного типа. Проведена трехмерная реконструкция LH2+ с разрешением 4.5 Å, совпадающая с ранее установленной кристаллической структурой. Для LH2– показано наличие частиц различной морфологии.

DOI: 10.31857/S0023476123600829, EDN: GBGIUU

ВВЕДЕНИЕ

Ключевым процессом биосферы, обеспечивающим поддержание жизни на Земле, является фотосинтез, при котором происходит преобразование энергии солнечного света в энергию химических связей. Пурпурные фотосинтезирующие бактерии обладают одной из наиболее простых и стабильных систем для сбора и трансформации солнечной энергии, изучение свойств которых представляет актуальное направление современной биологии. Начальным этапом процесса фотосинтеза в таких бактериях является поглощение фотона светособирающими (Light-Harvesting, LH) комплексами, за которым следует быстрая и эффективная передача энергии на реакционный центр (RC), где происходит ее первичное преобразование [1]. Фотосинтетический аппарат пурпурных бактерий расположен во внутренней цитоплазматической мембране и, как правило, включает в себя два светособирающих комплекса, LH1 и LH2, а также RC. RC распо-

жен внутри комплекса LH1 и образует с ним “ядерный” (core) комплекс LH1–RC [2], вокруг которого в мембране располагаются комплексы LH2 [3]. Комплекс LH2 обычно преобладает в мембране, однако у некоторых пурпурных бактерий он вообще не обнаружен [4, 5]. LH2 представляет собой высокосимметричный пигмент-белковый комплекс с молекулярной массой 150 кДа, построенный по модульному принципу из одинаковых белковых субъединиц, содержащих низкомолекулярные полипептиды (α и β), бактериохлорофилл (БХл) и в большинстве случаев каротиноиды, выполняющие светособирающую, защитную и структурную функции [4, 6–11].

Установлены три пространственные структуры LH2 комплексов из пурпурных несерных бактерий [1, 12, 13], однако для пурпурных серных бактерий подобные структуры с высоким разрешением до сих пор не получены [14]. Отметим, что для пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* была получена кристалличе-

Таблица 1. Основные параметры крио-ЭМ-эксперимента для каротиноидсодержащих светособирающих комплексов LH2+ и LH2– из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*

	LH2+	LH2–
Ускоряющее напряжение, кВ	300	
Номинальное увеличение	×120000	
Размер пикселя, Å	0.55	
Суммарная доза облучения на стек изображений, э [–] /Å ²	100	
Изображений в стеке	40	
Доза облучения на одно изображение в стеке, э [–] /Å ²	2.5	
Время экспозиции, с	2	
Номинальный диапазон дефокусировки, мкм	[–2.0, –1.0]	
Шаг дефокусировки, мкм	0.1	
Сферическая аберрация, мм	0.01	
Суммарно стеков изображений	1005	2150

ская структура LH2 с разрешением 3.7 Å, а также показана возможность получения уникального бескаротиноидного комплекса (LH2–) [15, 16].

В настоящей работе проведено исследование методом криоэлектронной микроскопии (**крио-ЭМ**) структур светособирающих комплексов из пурпурной серной бактерии *E. haloalkaliphila*, содержащих и не содержащих каротиноиды – LH2+ и LH2– соответственно. Для LH2+ получены двумерные классы проекций в виде цилиндра с ожидаемой симметрией *c*8. Проведена трехмерная реконструкция крио-ЭМ-карты комплекса низкого разрешения. Для комплекса LH2– двумерные классы продемонстрировали существенно различную морфологию частиц, что предположительно является следствием высокой гидрофобности бескаротиноидного комплекса, приводящей к слипанию объектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание клеток и выделение мембран. Клетки *E. haloalkaliphila* выращивали на модифицированной среде Пфеннинга [17] при температуре 26 ± 2°С на свету интенсивностью ~10 Вт/м². Для получения бескаротиноидных клеток в среду для выращивания добавляли дифениламин в концентрации 12 мл/л [16]. Мембраны получали после разрушения клеток на ультразвуковом дезинтеграторе УЗГ13-0,1-0,063 (УЗВД, Россия) во льду по 45 с трижды с последующим охлаждением в течение 1 мин для предотвращения перегрева клеток. Неповрежденные клетки и фрагменты клеточных стенок удаляли центрифугированием на

центрифуге К24 (“Janetzki”, Германия) в течение 10 мин при 4500 об./мин.

Выделение и очистка белка. Для солюбилизации мембран использовали додецилмальтозид в концентрации 2.0–2.5%. Комплексы LH2 были выделены методом колоночной хроматографии с DEAE-TOYOPEARL 650 S в градиенте NaCl с использованием установки для высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**) Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) в режиме низкого давления. Полученные комплексы дважды промывали 0.05М Трис-НСl-буфером (pH = 8) и концентрировали с помощью центрифугирования в пробирках Amicon Ultra 50K (Millipore, США).

Витрификация. Подготовку образцов для крио-ЭМ провели с помощью оборудования Ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии “Нанозонд” (НИЦ “Курчатовский институт”, Россия). Сетки Quantifoil R 1.2/1.3 300 mesh были гидрофилизированы в системе очистки тлеющим разрядом PELCO easiGlow (TedPella, США) в течение 30 с при 15 мА. Затем 3 мкл препарата каротиноидсодержащего комплекса LH2+ были нанесены на сетки при температуре 4°С и 100%-ной влажности. Сетки промакивали в течение 3 с, затем быстро погружали в жидкий этан с помощью автоматизированной установки для витрификации Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США). Экспериментальные данные были получены с помощью просвечивающего криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного устройством прямого детектирования электронов Falcon 2 (Thermo Fisher Scientific, США). Основные параметры крио-ЭМ-эксперимента приведены в табл. 1. Аналогичным образом проведена витрификация бескаротиноидного варианта комплекса LH2 (LH2–). Основные параметры съемки приведены в табл. 1.

Обработка данных крио-ЭМ для LH2+. Обработку стеков изображений проводили с помощью программного обеспечения CryoSPARC (v3.3.2) [18]. Для 1005 стеков изображений провели коррекцию дрейфа [19] и оценку параметров функции передачи контраста (**CTF**) со стандартными параметрами. В результате предварительной обработки данных отобрали 938 стеков изображений с уровнем CTF fit < 9 Å, на которых было обнаружено 546 000 частиц с диаметром в диапазоне 60–120 Å. По результатам визуального анализа отобрали 442 000 частиц со следующими параметрами: NCC Score > 0 и –1612 < Local Power < 22979. Далее выбранные частицы экстрагировали в боксе размером 165 × 165 Å и подвергли 2D-классификации со стандартными параметрами. Из 20 полученных двумерных классов отобрали девять классов, содержащих 110 000 проекций частиц, с характерными изображениями проек-



Рис 1. Основные этапы обработки крио-ЭМ-данных каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2+ из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*.

ций комплекса в различных ориентациях. На основе этих классов, выбранных в качестве шаблонов, провели поиск частиц с диаметром 120 Å. После двух повторов двумерной классификации отобрали 57000 частиц для трехмерной *ab initio*-реконструкции крио-ЭМ-карты. Полученную карту использовали для создания шаблонов, на основе которых в результате повторного поиска было найдено 602000 проекций. Далее полученные частицы экстрагировали в боксе размером 165×165 Å и подвергли пяти последовательным



Рис. 2. Основные этапы обработки крио-ЭМ-данных бескаротиноидного светособирающего комплекса LH2– из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*.

циклом 2D-классификации. Из полученных классов выбрали 10 классов, содержащих 44000 частиц, которые использовали для *ab initio* 3D-реконструкции крио-ЭМ-карты с учетом симметрии *c8*. Для уточнения крио-ЭМ-карты было применено неравномерное выравнивание [20] с указанием симметрии *c8*. Полученную крио-ЭМ-карту использовали для вписывания в нее известной ранее кристаллической структуры LH2+ (код PDB: 6Q53) в UCSF Chimera [21]. Основные этапы обработки данных представлены на рис. 1.

Обработка данных крио-ЭМ для LH2–. Обработку данных для комплекса LH2– провели аналогично обработке данных для комплекса LH2+. А именно, для 2150 стеков изображений провели коррекцию дрейфа и оценку параметров CTF. Поиск частиц провели в режиме “Circular blob” с диапазоном диаметров частиц 40–120 Å. Визуально инспектировали и отобрали 201000 проекций частиц со следующими параметрами: NCC Score >

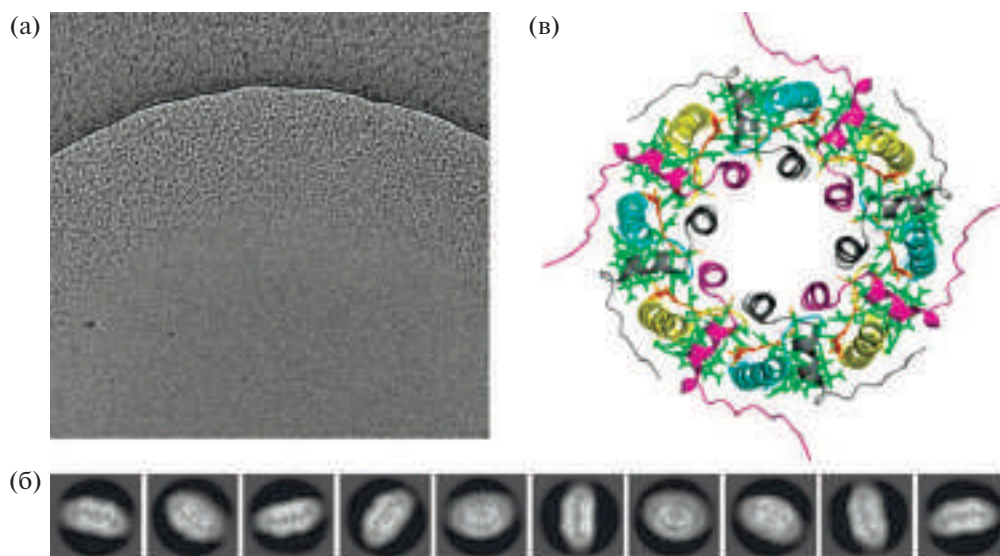


Рис. 3. Крио-ЭМ-данные комплекса LH2+ из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*: а – крио-ЭМ-изображение препарата LH2+ на сетке; б – изображения двумерных классов проекций комплекса LH2+ в различных ориентациях, размер бокса – $165 \times 165 \text{ \AA}$; в – кристаллическая структура комплекса LH2 с разрешением $3.7 \text{ \AA}$ (код PDB – 6Q53), α -пептиды показаны розовым и серым цветом, β -пептиды – желтым и голубым, БХл – зеленым, каротиноиды – оранжевым.

> 1 и $31\,188 < \text{Local Power} < 62\,389$. Далее выбранные частицы экстрагировали в боксе размером $220 \times 220 \text{ \AA}$ и подвергли двумерной классификации. На основе четырех двумерных классов, содержащих 15 000 частиц, с правильными очертаниями комплекса, выбранных в качестве шаблона, был проведен поиск частиц с диаметром $200 \text{ \AA}$. Отобрали 139 000 частиц с $\text{NCC Score} > 0.29$ и $113\,596 < \text{Local Power} < 159\,026$, которые затем экстрагировали в боксе размером $275 \times 275 \text{ \AA}$. Полученные таким образом частицы подвергли двумерной классификации. Далее следовали два аналогичных повтора поиска частиц и двумерной классификации, в результате чего получили 20 классов, содержащих 20 000 проекций комплекса различной морфологии. На основе трех двумерных классов с 5000 проекций с очертаниями длинных мицелл, использованных в качестве шаблонов, провели поиск частиц и 2D-классификацию. Таким образом, было получено 25 000 проекций частиц в 15 классах. Основные этапы обработки данных представлены на рис. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе предварительного крио-ЭМ-эксперимента для каротиноидсодержащего комплекса LH2+ получили 1005 стеков изображений, на которых различимы объекты эллипсовидной и круглой формы, расположенные исключительно у краев отверстий сетки (рис. 3а). Данный факт предположительно является следствием наличия у аморфного льда мениска с более толстым слоем

льда у краев и более тонким слоем по центру отверстий сетки, в результате чего образец “стягивается” к краям. Варьирование времени промывки (блоттинга) при витрификации, добавление 0.05% детергента DDM не привели к существенным изменениям распределения образца в слое аморфного льда. Аналогичная ситуация наблюдалась у комплекса LH2–.

При начальной обработке крио-ЭМ-данных для LH2+ провели коррекцию дрейфа стеков изображений с последующей оценкой параметров CTF и выбором изображений по значению параметра $\text{CTF fit} < 9 \text{ \AA}$ для достижения более высокого разрешения. Основные этапы обработки данных представлены на рис. 2. Поиск частиц проводили с заданными значениями минимального и максимального диаметра – 60 и $120 \text{ \AA}$ соответственно согласно данным предыдущих исследований комплекса LH2 из пурпурной бактерии *Marichromatium purpuratum* [22]. С помощью гистограммы (NCC Score , Power Score) и визуальной оценки найденных частиц отобрали 546 тысяч проекций для дальнейшей обработки. В результате нескольких повторов поиска частиц и 2D-классификации выявили 10 двумерных классов проекций LH2+, имеющих 44 тысячи частиц, с характерными очертаниями комплекса, заключенного в оболочку из детергента, в различных ориентациях (рис. 3б).

На основе проекций из упомянутых выше двумерных классов была проведена трехмерная *ab initio*-реконструкция комплекса с учетом симметрии $c8$ (рис. 4а). Карта крио-ЭМ обладает

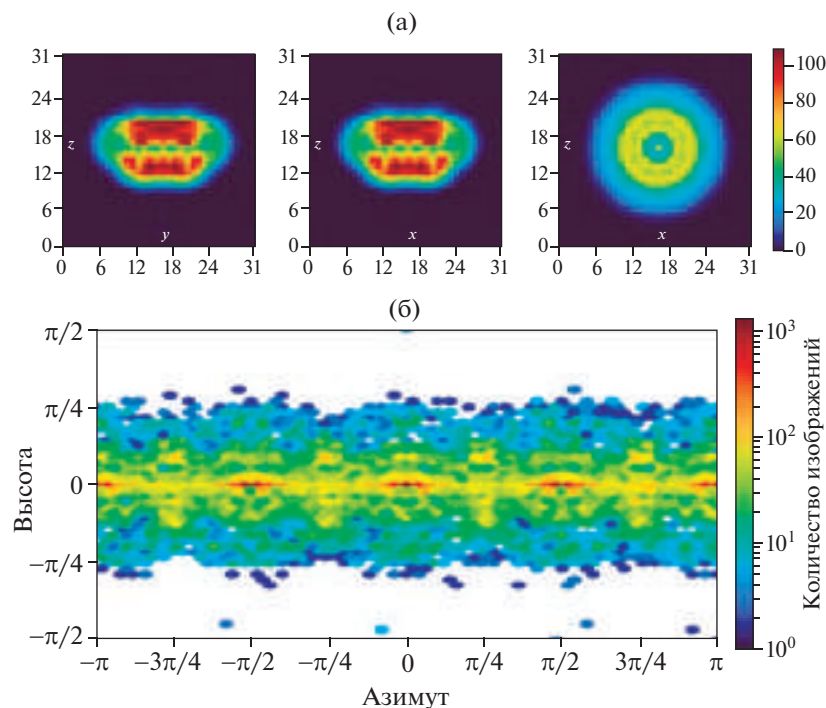


Рис. 4. Трехмерная реконструкция каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2 из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*: а – проекции трехмерной *ab initio*-реконструкции крио-ЭМ-карты комплекса в различных плоскостях; б – угловое распределение ориентаций комплекса.

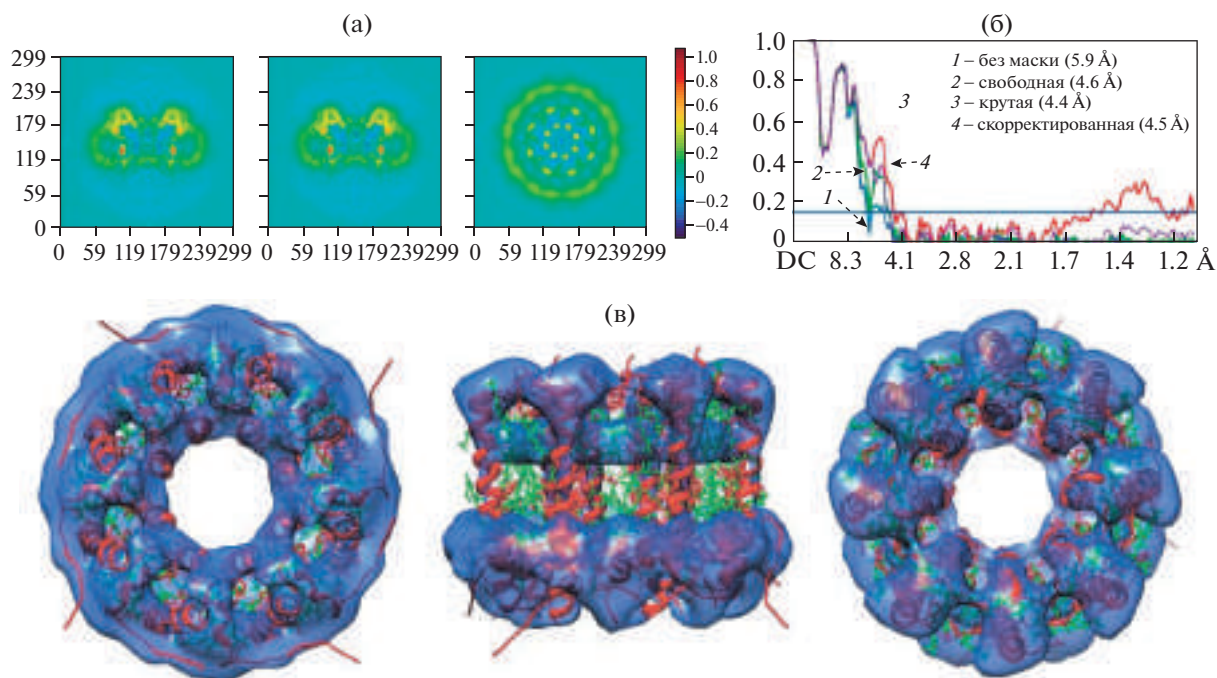


Рис. 5. Трехмерная реконструкция крио-ЭМ-карты каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2+ из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* с учетом $c8$ -симметрии: а – проекции крио-ЭМ-плотности комплекса после неравномерного уточнения в различных плоскостях; б – кривые FSC; в – кристаллическая структура LH2 (код PDB – 6Q53), вписанная в полученную крио-ЭМ-карту, α - и β -пептиды показаны красным цветом, молекулы БХл и каротиноидов – зеленым, крио-ЭМ-карта LH2+ – синим цветом, полупрозрачная.

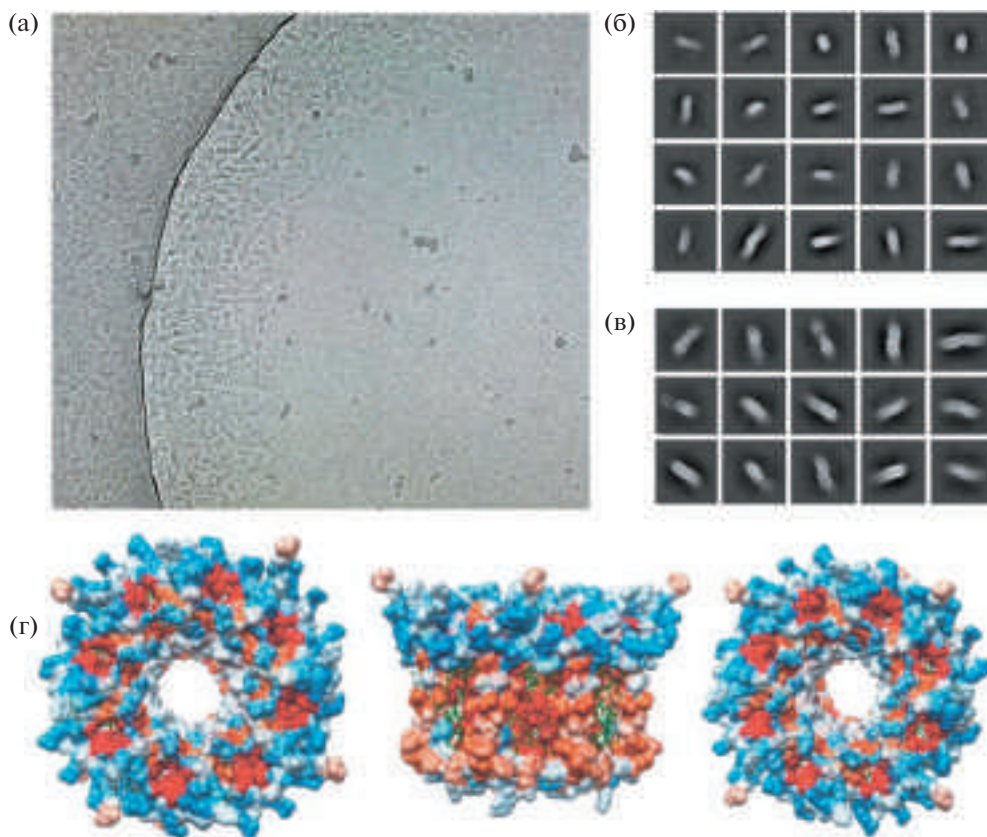


Рис. 6. Крио-ЭМ-данные бескаротиноидного светособирающего комплекса LH2— из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*: а — крио-ЭМ-изображение препарата LH2— на сетке; б — двумерные классы комплекса, демонстрирующие различную морфологию проекций частиц; в — двумерные классы, полученные в результате поиска частиц с заданным шаблоном из “длинных” частиц, размер бокса — 275×275 Å; г — проекции кристаллической структуры комплекса LH2 (код PDB — 6Q53) с удаленными каротиноидами. Структура показана в виде поверхности, гидрофобные участки показаны оранжевым цветом, гидрофильные — синим, БХл — зеленым. Красным цветом показаны гидрофобные участки, возникающие при удалении каротиноидов.

архитектурой, сходной с ранее установленной кристаллической структурой комплекса LH2, обладающей симметрией $c8$ [14] и организованной в два кольца: наружное большое кольцо из восьми β -пептидов и восьми молекул БХл, а также внутреннее малое кольцо из восьми α -пептидов и 16 молекул БХл (рис. 3в). Диаметр обнаруженных частиц в оболочке из детергента составляет ~ 120 Å, большого кольца комплекса ~ 70 Å, меньшего кольца — 60 Å, высота комплекса — 60 Å. На боковых проекциях крио-ЭМ-карты прослеживаются два кольца комплекса с очертаниями α - и β -пептидов (рис. 4а). Слабая крио-ЭМ-карта на виде сверху обусловлена наличием преимущественной боковой ориентации комплекса на изображениях (рис. 4б).

С использованием полученной 3D-карты крио-ЭМ было проведено неравномерное уточнение (Non-uniform refinement) [20] с учетом установленной симметрии $c8$, предназначенное для мембранных белков и белков с небольшой массой (рис. 5а). Таким образом получена крио-

ЭМ-карта для комплекса LH2+ с разрешением 4.5 Å (рис 5б). Результат вписывания ранее установленной кристаллической структуры LH2+ (код PDB — 6Q53) в полученную карту крио-ЭМ показан на рис 5в. Как видно, плотность крио-ЭМ-карты наиболее выражена в области двух колец комплекса, при этом область между кольцами имеет относительно слабую плотность. Тем не менее отчетливо прослеживаются α -спирали полипептидов с правильной взаимной ориентацией.

Для комплекса LH2— методом крио-ЭМ получено 2150 стеков изображений, демонстрирующих объекты различной морфологии: короткие частицы с характерной эллипсовидной формой LH2 и более вытянутые частицы разной длины (рис. 6а). Аналогично обработке данных LH2+ было получено 20 двумерных классов с 208000 проекций комплекса LH2— (рис. 6б) в боксах размером 275×275 Å. Среди проекций наблюдаются как длинные структуры с изгибами, так и короткие, имеющие характерные очертания комплекса LH2+. В состав LH2+ из пурпурной серной бак-

терии *E. haloalkaliphila* входит высокогидрофобный каротиноидный пигмент – ликопин. Анализ гидрофобности поверхности молекулы LH2+ показал, что удаление ликопина приводит к увеличению площади гидрофобной поверхности комплекса (рис. 6г). Вероятно, молекулы бескаротиноидного LH2– стремятся закрыть образовавшиеся гидрофобные участки и по этой причине собираются в нефизиологичные агрегаты в единой оболочке из детергента. Действительно, поиск частиц по заданному шаблону из “длинных” частиц с последующей 2D-классификацией выявил 25 000 частиц с морфологией, отличной от каротиноидсодержащего варианта комплекса (рис. 6в). Увеличение концентрации детергента DDM с 1.0 до 2.0% для увеличения растворимости комплекса не продемонстрировало значимых различий в морфологии частиц. Таким образом, гетерогенность препарата LH2– и наличие преимущественных ориентаций не позволили провести реконструкцию структуры.

В результате получена крио-ЭМ-плотность для каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2+ из пурпурной серной бактерии *E. haloalkaliphila* с разрешением 4.5 Å, согласующаяся с установленной ранее кристаллической структурой данного комплекса низкого разрешения. Получены крио-ЭМ-изображения для бескаротиноидного комплекса LH2–, демонстрирующие гетерогенность объекта. Двумерные классы проекций комплекса имеют различную морфологию, как сходную с пространственной организацией каротиноидсодержащего светособирающего комплекса LH2+, так и характерную для более крупных агрегатов, формирующихся, по-видимому, за счет слипания частиц в отсутствие молекул каротиноида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00062).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McDermott G. et al. // Nature. 1995. V. 374. P. 517. <https://doi.org/10.1038/374517a0>
2. Zuber H., Cogdell R.J. // Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 315. https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_16
3. Bahatyrova S. et al. // Nature. 2004. V. 430. P. 1058. <https://doi.org/10.1038/nature02823>
4. Cogdell R.J. et al. // Quart. Rev. Biophys. 2006. V. 39. P. 227. <https://doi.org/10.1017/S0033583506004434>
5. Gabrielsen M. et al. // The Purple Phototrophic Bacteria. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. V. 28. P. 135. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_8
6. Moskalenko A.A., Karapetyan N.V. // Z. Naturforsch. C. 1996. B. 51. S. 763. <https://doi.org/10.1515/znc-1996-11-1201>
7. Scheer H. // Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. V. 25. P. 1–26. https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6_1
8. Polyakov N.E., Leshina T.V. // Russ. Chem. Rev. 2006. V. 75. P. 1049. <https://doi.org/10.1070/RC2006v075n12ABEH003640>
9. Theiss C. et al. // Biophys. J. 2008. V. 94. P. 4808. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.121681>
10. Telfer A. et al. // Carotenoids. Basel: Birkhäuser Basel, 2008. V. 4. P. 265. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7499-0_14
11. Frank H.A., Polívka T. // The Purple Phototrophic Bacteria. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. V. 28. P. 213. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_12
12. Koepke J. et al. // Structure. 1996. V. 4. P. 581. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00063-9)
13. Papiz M.Z. et al. // J. Mol. Biol. 2003. V. 326. P. 1523. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00024-X)
14. Leiger K. et al. // J. Phys. Chem. B. 2019. V. 123. P. 29. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b08083>
15. Ашихмин А.А. и др. // Докл. РАН. 2013. Т. 453. С. 563. <https://doi.org/10.7868/S0869565213350235>
16. Ashikhmin A. et al. // Photosynth. Res. 2014. V. 119. P. 291. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9947-6>
17. Imhoff J.F. // Anoxygenic phototrophic bacteria, in: B. Austin (Ed.), Methods in Aquatic Bacteriology. Chichester: Wiley, 1988. 1988. P. 425. <https://doi.org/10.1017/S0025315400043393>
18. Punjani A. et al. // Nat Methods. 2017. V. 14. P. 290. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>
19. Zheng S.Q. et al. // Nat Methods. 2017. V. 14. P. 331. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4193>
20. Punjani A. et al. // Nat Methods. 2020. V. 17. P. 1214. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00990-8>
21. Pettersen E.F. et al. // J. Comput. Chem. 2004. V. 25. P. 1605. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
22. Gardiner A.T. et al. // Sci. Adv. 2021. V. 7. P. eabe4650. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe4650>