



УДК 577.143.5

© 1990 г.

М. А. Кутузов, Б. Е. Шмуклер, А. А. Заргаров,  
Н. Н. Тележинская, Н. Б. Левина, А. С. Золотарев,  
Н. Г. Абдулаев

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО РЕАКЦИОННОГО  
ЦЕНТРА ЗЕЛЕННОЙ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ  
*CHLOROFLEXUS AURANTIACUS*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Настоящая статья представляет собой детальное изложение исследований, которые позволили выяснить полипептидный состав комплекса реакционного центра (РЦ) *Chloroflexus aurantiacus* и сочетанием методов химии белка и геной инженерии установить первичные структуры обеих составляющих его субъединиц. На основании обнаруженной гомологии субъединиц РЦ *C. aurantiacus* с L- и M-субъединицами РЦ пурпурных бактерий, сравнения их профилей гидрофобности, данных по третичной структуре РЦ пурпурных бактерий предложена модель упаковки этой молекулы в мембране. Обсуждается функциональная роль некоторых аминокислотных остатков. Для изучения вклада N-концевых участков в обеспечение термостабильности РЦ использован ограниченный протеолиз РЦ в неденатурирующих условиях.

Ключевой этап фотосинтеза — разделение зарядов на специализированных фотосинтетических мембранах бактерий и хлоропластов растений при поглощении кванта света. Этот процесс происходит в хлорофилл-белковых интегральных мембранных комплексах, называемых реакционными центрами (РЦ). Успешная кристаллизация и расшифровка третичной структуры РЦ пурпурных бактерий [1—3] предоставляют новые возможности для установления связей между структурой и функцией фотосинтетического аппарата. Исследование структуры РЦ других фотосинтезирующих бактерий является важным подходом для изучения как молекулярных механизмов, так и эволюции фотосинтеза.

Термофильная нитчатая скользящая бактерия *Chloroflexus aurantiacus* [4], как свидетельствует каталог 16 S рРНК [5], — одна из древнейших ветвей эволюции эубактерий, обладающая рядом уникальных свойств. Строение фотосинтетического аппарата этой бактерии сочетает в себе черты таких эволюционно далеких групп, как зеленые серные (*Chlorobiaceae*) и пурпурные (*Rhodospirillaceae*, *Chromatiaceae*) бактерии. С зелеными бактериями *C. aurantiacus* сближают пигментный состав и организация светособирающего комплекса в виде хлоросом [6]. В то же время, согласно спектральным данным, РЦ *C. aurantiacus* больше напоминает РЦ пурпурных бактерий и фотосистемы II, тогда как РЦ представителей *Chlorobiaceae* сходны с РЦ фотосистемы I [6]. Очевидно, что расшифровка первичной структуры белков комплекса РЦ *C. aurantiacus* представляет существенный интерес, тем более что в отличие от уже изученных РЦ пурпурных бактерий РЦ *C. aurantiacus* состоит не из трех, а лишь из двух субъединиц и является наиболее просто устроенным РЦ из известных в настоящее время. Кроме того, поскольку РЦ *C. aurantiacus* обладает повышенной термостабильностью по сравнению с РЦ пурпурных бактерий [7], сравнение их структур может дать ценную информацию о механизмах стабилизации пространственной структуры мембранных белков термофильных организмов.

Сокращения: РЦ — реакционный центр, SDS — додецилсульфат натрия, LDAO — лаурилдиметиламинооксид.

Настоящая статья — детальное изложение исследований РЦ *C. aurantiacus*, результаты которых были частично опубликованы в кратких сообщениях [8, 9].

В основу выделения РЦ *C. aurantiacus* был положен метод, описанный ранее в работе [10], который модифицирован для получения препаративных количеств белка. Отличия от оригинальной методики заключались в следующем: а) клетки разрушали не ультразвуком, а на прессе Френча; б) перед первой анионообменной хроматографией образец центрифугировали для удаления каротиноидов и несольбилизованного материала; в) проводили повторную очистку препарата РЦ на хроматографе (FPLC-System, Pharmacia, Швеция). И использованный метод выделения позволил получать из 200 г биомассы до 30 мг электрофоретически гомогенного препарата РЦ.

Очищенный согласно описанной процедуре препарат РЦ *C. aurantiacus* ( $A_{280}/A_{806} \leq 1,5$ ) имеет характерный спектр поглощения (рис. 1). Отсутствие поглощения в районе 400—500 нм свидетельствует о полной очистке препарата РЦ от примесей каротиноидов. Полностью окисленный добавлением феррицианида препарат РЦ характеризуется отсутствием полосы поглощения при 866 нм (поглощение специальной пары бактериохлорофиллов *a* [6]) и сдвигом полосы поглощения мономерного бактериохлорофилла *a* с 812 до 806 нм. Эти изменения обратимы при добавлении избытка аскорбата. Сравнение результатов спектральных измерений и аминокислотных анализов препаратов РЦ *C. aurantiacus* позволило оценить молярный коэффициент экстинкции  $\epsilon_{806} = 130\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Наилучшее отношение  $A_{280}/A_{806}$ , достигнутое за всю серию проведенных выделений, составило 1,41.

В мягких денатурирующих условиях (инкубация не более 1 ч в 1—3% SDS при 25° С) препарат РЦ в различных вариантах SDS-электрофореза характеризуется единственной полосой в районе 43 кДа (рис. 2, дорожка 6). В более жестких условиях инкубации (прогревание или длительная инкубация при 25° С в 1—3% SDS) картины электрофоретического разделения препарата РЦ могут существенно различаться в зависимости от условий электрофореза. При проведении электрофореза согласно стандартной процедуре Лэммли (рис. 2, дорожки 2—4) картина разделения зависит от условий инкубации образцов. Дорожка 3 на этом рисунке полностью воспроизводит результаты, приведенные в работе [11]; на ней видна полоса димера (47 кДа) и единственная полоса в районе 30 кДа. На основании этого результата авторами работы [11] было сделано заключение об организации РЦ *C. aurantiacus* в виде димера одинаковых субъединиц с молекулярной массой 30 кДа. При увеличении концентрации SDS в электродном буфере до 0,3—0,4% наблюдаются две хорошо разрешенные полосы с относительными молекулярными массами 28 и 32 кДа как в трис-боратной системе (рис. 2, дорожка 5), так и в системе Лэммли (данные не приведены).

Поскольку для интегральных мембранных белков характерна аномальная электрофоретическая подвижность, точная оценка их молекулярной массы методом электрофореза обычно затруднена. В случае РЦ *C. aurantiacus*, несмотря на то что подвижность димера РЦ соответствовала 47 кДа, для расчета аминокислотного состава его молекулярная масса была оценена как 60 кДа, что приблизительно соответствует удвоенной относительной молекулярной массе мономерной полосы.

Для дальнейшей химической характеристики РЦ *C. aurantiacus* необходимо было эффективно удалить его хромофорные группы. Обычно

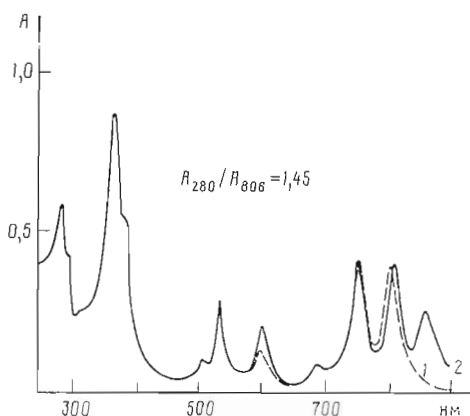


Рис. 1. Спектры поглощения полностью восстановленного (1) и полностью окисленного (2) препаратов РЦ *C. aurantiacus*

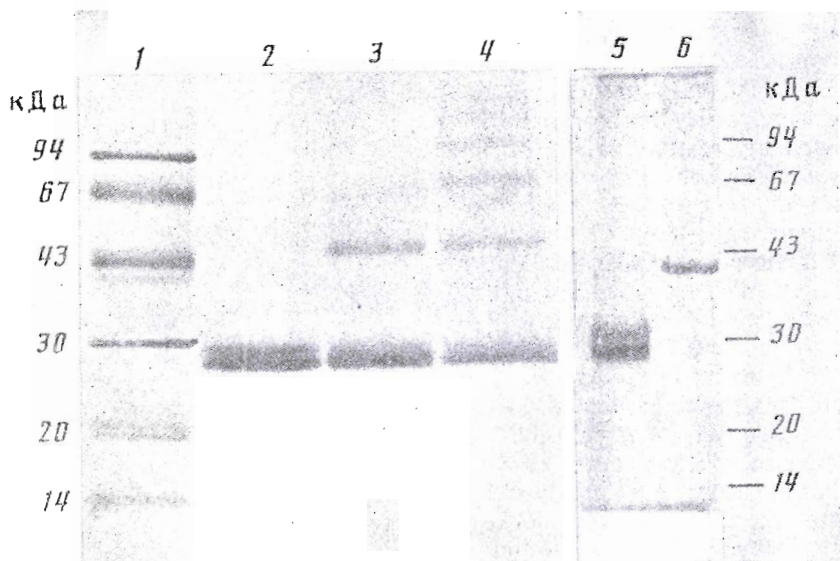


Рис. 2. Электрофорез препарата РЦ *C. aurantiacus* в ПААГ: в системе Лэммли с 0,1% SDS (1—4) и в трис-боратной системе с 0,3% SDS (5, 6). 1 — смесь белков-маркеров; 2—6 — препарат РЦ. Инкубация образцов: 0,125 М трис-НCl (рН 6,8), 3% SDS, 5% β-меркаптоэтанол, 18 ч, 20° С (2), 30 мин, 65° С (3), 2 мин, 100° С (4); 0,45 М трис-Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub> (рН 8,4), 2% SDS, 15 мМ EDTA, 5% β-меркаптоэтанол, 1 мин, 100° С (5), 20° С (6)

используемое в таких случаях осаждение белка из раствора детергента 80% этанолом приводило к образованию окрашенного осадка. Поиск альтернативных подходов показал, что наиболее полное экстрагирование хромофорных групп достигается обработкой высушенного после спиртового осаждения осадка смесью ацетон — метанол в объемном отношении 3 : 7. После 2—3-кратной экстракции хромофорные группы удаляются практически полностью.

N-Концевой анализ препарата показал, что единственный N-концевой остаток апобелка РЦ *C. aurantiacus* — серин. Автоматическая деградация апобелка по методу Эдмана [12] выявила единственную аминокислотную последовательность длиной 18 аминокислотных остатков, которая совпала с опубликованной в работе [13]: SRAKAKDPRFPDFSFVTVV. Однако не исключалось, что приведенная последовательность принадлежит лишь одной из субъединиц, а N-концевой остаток парной субъединицы блокирован. В пользу этого свидетельствовал тот факт, что выход первых аминокислотных остатков при секвенировании соответствовал менее чем половине исходного количества апобелка, рассчитанного по данным аминокислотного анализа.

Методом гидразинолиза на препарате апобелка РЦ *C. aurantiacus* удалось идентифицировать два С-концевых аминокислотных остатка: валин и пролин. Метод с использованием карбоксипептидазы А на препарате апобелка, ковалентно иммобилизованного на тиол-стекле, выявил единственный остаток валина, что согласуется с данными гидразинолиза, так как карбоксипептидаза А не отщепляет С-концевой остаток пролина. Таким образом, данные С-концевого анализа также свидетельствовали о различии двух полипептидных цепей РЦ *C. aurantiacus*.

Было замечено, что после длительной обработки 80% муравьиной кислотой апобелка РЦ *C. aurantiacus*, иммобилизованного на тиол-стекле, и последующей отмывки сорбента той же кислотой вместо N-концевого остатка серина при N-концевом анализе иммобилизованного белка обнаруживается остаток пролина. Это свидетельствовало о вероятном наличии в аминокислотной последовательности РЦ *C. aurantiacus* связей Asp-Pro. Проведенная деградация по методу Эдмана фрагмента, полученного после расщепления связи Asp-Pro, выявила преобладающую последовательность PPPPELGLGFAAPGEPGF...

В результате расщепления полипептидов РЦ *C. aurantiacus* бромцианом, протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8 и трипсином было выделено свыше 50 индивидуальных пептидов. Для 33 из них были установлены частичные или полные аминокислотные последовательности, которые, с учетом перекрывающихся последовательностей, а также определенных N-концевых последовательностей целого апобелка и его фрагмента после расщепления связи Asp-Pro, позволили вывести частичные аминокислотные последовательности обеих субъединиц РЦ *C. aurantiacus* общей длиной 252 аминокислотных остатка.

Из гидролизатов, полученных при расщеплении РЦ *C. aurantiacus* протеиназой *St. aureus* V8 и трипсином, были выделены пептиды длиной соответственно 11 и 14 аминокислотных остатков, не имевшие свободных N-концевых аминогрупп. На основании сравнения их аминокислотного состава и первичной структуры M-субъединицы (см. ниже) они были идентифицированы как N-концевые пептиды M-субъединицы. При сравнении данных ФАВ-масс-спектрометрии\* и результатов аминокислотных анализов этих пептидов обнаружилось, что разница молекулярных масс, определенных этими методами, составила 60 Да. Это позволило заключить, что при посттрансляционной модификации заблокированного полипептида РЦ *C. aurantiacus* происходит отщепление N-концевого остатка метионина. Выяснение химической природы N-концевой блокирующей группы — предмет дальнейших исследований.

Для получения геномной библиотеки из ДНК *C. aurantiacus* был использован метод, основанный на частичном гидролизе геномной ДНК рестриктазой с четырехнуклеотидным сайтом узнавания. Теоретическая вероятность встречаемости таких сайтов в геноме составляет  $1/4^4 = 1/256$ , т. е. один сайт на 256 оснований, а практически эти сайты могут встречаться как с большей, так и с меньшей частотой. Так как сайт узнавания выбранной рестриктазы может на определенном коротком участке генома встретиться слишком часто, было решено сконструировать параллельно две геномные библиотеки на основе одного и того же принципа, но используя различные рестриктазы.

Для получения первой библиотеки геномная ДНК из *C. aurantiacus* подвергалась частичному гидролизу рестриктазой *Sau* 3A1. Условия расщепления подбирались таким образом, чтобы основная масса образующейся статистически расщепленной ДНК приходилась на фрагменты длиной от 1000 до 5000 п. о. [14]. Минимальная длина фрагментов составила около 300 п. о., максимальная — до 10 000 п. о. Во избежание артефактов лигирования в виде образования сшитых между собой фрагментов был применен прием, описанный в работе [15]. Липкие концы фрагментов, полученных после обработки геномной ДНК рестриктазой *Sau* 3A1, подвергались частичной достройке при помощи dGTP, dATP и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Аналогичным образом при помощи dCTP и dTTP подвергались частичной достройке липкие концы векторной ДНК-плазмиды *pUC* 8, предварительно линеаризованной рестриктазой *Sal* GI. В результате векторная ДНК теряла способность к рециркуляризации, фрагменты ДНК — к лигированию между собой, а образующиеся укороченные липкие концы вектора и клонируемых фрагментов становились комплементарны друг другу. После лигирования вектора и фрагментов в молярном отношении 10 : 1 была получена первая библиотека в виде химерных плазмид.

Вторая геномная библиотека была сконструирована лигированием плазмиды *pUC8*, расщепленной рестриктазой *Sma* I и дефосфорилированной бактериальной щелочной фосфатазой, и фрагментов, образующихся при частичном гидролизе ДНК *C. aurantiacus* эндонуклеазной рестрикции *Alu* I.

При выборе последовательностей для синтеза олигонуклеотидных зондов нами был использован подход, позволяющий уменьшить степень их вырожденности. Если в кодирующем триплете аминокислоты в поло-

\* Масс-спектрометрия с бомбардировкой ускоренными атомами.

жении З находится А или G, то в зонде синтезируется G; если С или Т — то T; если любой из четырех нуклеотидов — то G + T.

Такая возможность основана на том свойстве комплементарного взаимодействия нуклеотидов, что образование неканонической пары G·T, хотя и не вносит вклад в прочность комплементарного связывания олигонуклеотидного зонда с соответствующей ему структурой ДНК, не является помехой для гибридизации [16]. Другими словами, в случае образования при гибридизации G·T-пары возникает комплементарное взаимодействие по типу I·N, где I — инозин, а N — любой другой нуклеотид (такой подход для уменьшения вырожденности синтезируемого олигонуклеотидного зонда описан в [17]). Но в отличие от инозинового метода при удачном стечении обстоятельств вместо G·T-пар образуются нормальные G·C- или A·T-пары, что увеличивает специфичность гибридизации.

При использовании такого подхода G·T-пары могут образовываться столько раз, сколько в структуре олигонуклеотидного зонда имеется вырожденных третьих позиций в кодирующих триплетах. Если к такому «неудачному» зонду по вышеописанному принципу синтезировать комплементарный олигонуклеотидный зонд, то у наиболее часто используемых в практической работе 14—20-звенных зондов либо будет иметься по 2—3 несоответствия с искомой структурой в виде G·T-пар (у каждого из зондов), либо последовательность одного из зондов будет предельно близка к структуре искомого фрагмента ДНК.

На основании структуры одного из бромциановых пептидов (M)FAQVNY... были синтезированы зонд (1а), комплементарный мРНК, (5') TAGTT<sup>G</sup>ACTTG<sup>T</sup>GCGAATCAT, и зонд (1б), гомологичный мРНК, (5') ATGTTTGC<sup>G</sup>CAGGT<sup>T</sup>AAATTA.

После трансформации *E. coli* (штамм МН-1) химерными плазмидами из первой геномной библиотеки было получено около 30 000 рекомбинантных клонов. В результате скрининга при помощи <sup>32</sup>P-меченого олигонуклеотидного зонда (1а) было отобрано 42 клон, дававших положительные сигналы гибридизации различной интенсивности. Эти клоны далее гибридизовали с <sup>32</sup>P-меченым зондом (1б). В результате было получено только два положительных сигнала гибридизации. Соответствующие им клоны были названы pRCa9 и pRCG10.

Нуклеотидные последовательности проклонированных в этих плазмидах вставок определялись по методу Максама — Гилберта [18] с модификациями, описанными в работе [19]. Длина большей из этих вставок из клонa pRCa9 составила 1178 п. о. Анализ установленной нуклеотидной последовательности позволил вывести две частичные аминокислотные последовательности. Их сравнение с первичными структурами L- и M-субъединиц РЦ трех видов пурпурных бактерий [20—23] и сопоставление с уже определенными аминокислотными последовательностями пептидов РЦ *S. aurantiacus* показали, что установлены первичные структуры большей части одной из субъединиц (середина и С-концевая область) и приблизительно 1/3 второй субъединицы РЦ *S. aurantiacus* (N-концевая область). N-Концевая последовательность второй субъединицы отличалась от последовательности, определенной автоматическим секвенированием препарата апобелка РЦ *S. aurantiacus*, что подтверждало вывод о том, что N-конец этой субъединицы блокирован.

Для поиска участка ДНК, кодирующего недостающую N-концевую область первой субъединицы, на основании аминокислотной последовательности IEEIEP... были синтезированы зонд (2а), комплементарный мРНК, (5') GGTTC<sup>G</sup>ATTTCTTC<sup>G</sup>AT, и зонд (2б), гомологичный мРНК, (5') AT<sup>G</sup>GAGGAGAT<sup>G</sup>GAGCC.

<sup>32</sup>P-Меченый олигонуклеотидный зонд (2а) был использован для скрининга 30 000 рекомбинантных клонов, полученных трансформацией клеток *E. coli* (штамм МН-1) химерными плазмидами из второй библиотеки. Было найдено пять клонов, гибридизовавшихся с этим зондом. С зондом (2б) ни один из них не гибридизовался. Один из этих клонов, названный pRCII-9, был отобран гибридизацией с <sup>32</sup>P-меченой ник-транслированной

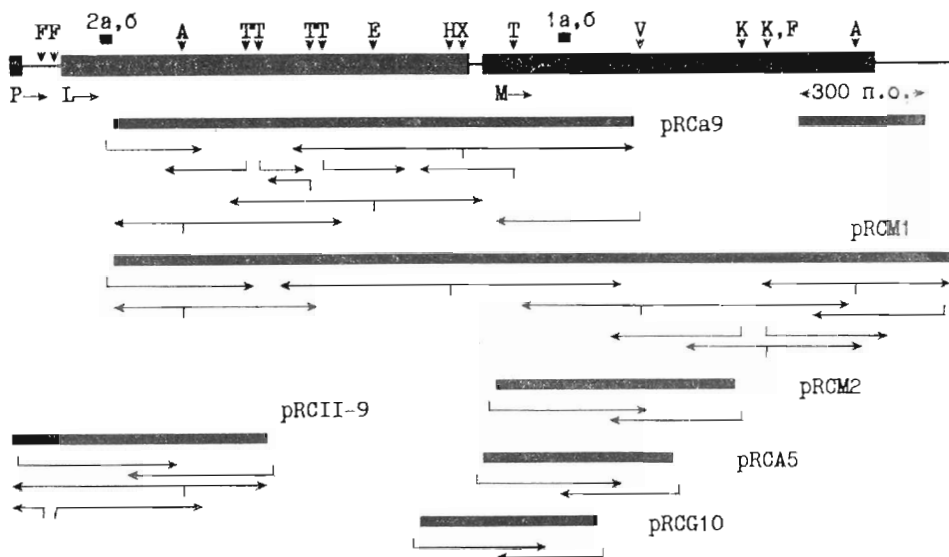


Рис. 3. Стратегия определения нуклеотидной последовательности *puf*-оперона *C. aurantiacus*. Показано расположение клонированных фрагментов и указаны рестриктные сайты, использованные для секвенирования по методу Максама — Гилберта. Обозначения: A — *Ava*II; E — *Hae*II; F — *Hin*I; H — *Hind*III; K — *Kpn*I; T — *Taq*I; V — *Ava*I; X — *Xba*I; P → — промотор *puf*-оперона; L →, M → — гены субъединиц РЦ; 1a, б и 2a, б — места расположения соответствующих олигонуклеотидных зондов

вставкой из клона pRCa9. Было найдено, что плаزمид из клона pRCII-9 несет вставку длиной 593 п. о. Определение и анализ нуклеотидной последовательности этой вставки показали, что в клонированном фрагменте 450 п. о. кодируют часть структурного гена первой субъединицы (N-концевая область), а 143 п. о. примыкают к 5'-концу первого гена.

Для поиска участков ДНК, кодирующих недостающую С-концевую область второй субъединицы РЦ *C. aurantiacus*, проводили скрининг 20 000 новых трансформантов из первой библиотеки при помощи  $^{32}\text{P}$ -меченого олигонуклеотидного зонда (1б), структура которого полностью совпала с последовательностью, кодирующей пептид, положенный в основу зондов (1а, б). В результате был получен единственный клон pRCA5, содержащий фрагмент ДНК длиной 423 п. о., кодирующий центральную часть гена второй субъединицы. Вставка из этого клона была выделена, ник-транслирована радиоактивным  $^{32}\text{P}$  и использовалась для скрининга еще 30 000 рекомбинантных клонов из этой же библиотеки. Было выявлено семь гибридизирующихся клонов, два из которых, pRCM1 и pRCM2, содержащие наибольшие вставки, были использованы для определения нуклеотидной последовательности. В результате была определена нуклеотидная последовательность, кодирующая С-концевую область второй субъединицы, а также еще 302 п. о. после терминирующего кодона этой субъединицы. Стратегия определения нуклеотидной последовательности изображена на рис. 3.

Таким образом, было установлено, что РЦ *C. aurantiacus* состоит из двух различных субъединиц, которые кодируются двумя последовательно расположенными генами (рис. 4). По аналогии с РЦ пурпурных бактерий две субъединицы РЦ *C. aurantiacus* были нами обозначены как L- и M-субъединицы, хотя в данном случае вычисленная молекулярная масса L-(light) субъединицы РЦ *C. aurantiacus* (35 014 Да) оказалась несколько выше, чем у M-(medium) субъединицы (34 982 Да, включая молекулярную массу блокирующей группы).

Гены L- и M-субъединиц РЦ *C. aurantiacus* начинаются с АТГ-иницирующих кодонов, которым предшествуют последовательности Шайн — Далгарно [24] (рис. 4). На расстоянии 119 и 142 п. о. от иницирующего АТГ-кодона L-субъединицы обнаружены последовательности ТАТАСТ и ТТGАСА, которые хорошо совпадают с известными каноническими по-



1 AGCTAACAGATCGGCCCGGTTGTAGTTG

29 AGGATAACAACGGCAAGACTACTCATTATCGACATGCCCGGCTCGCACTGGTAGACAACC

89 CTGCTTCAGTATACCACAGGTTATTCTGTTTTATATGCAAGAAGCGAATGGTAATCGAT

149 TAGACGTTGCAAAATCAATTTAAGGCTTGATAATGCAAAATTAATATCGATACCTATA

209 GCTTGACAATGTGTATCAGGCGTATTTACTGGCCGAAAAAGCGGTTAAATTTTGCTTAT

269 CATTACACGTTATCCGAGTCAGGGCAACCGTAAGGCGCGATGTCAGAACGGTCGCGCGGC

329 ACACCGTCAGCAGAGGGAGTCCGCTATGAGCAGAGCAAAAGCGAAAGACCCCGGTTTTCCG

1 (M) S R A K A K D P R F P

389 GACTTTTCGTTTCACCGTCGTTTCAGGGTGGCGGGGCCACACGAGTACCGGGAGGGGGCAGG

12 D F S F T V V E G A R A T R V P G G R T

449 ATTGAAGAAATCCAGCGCGAATCAAGATCAAAGGGCGCACAACTTAGTGCGGATCTTC

32 I E E I E P E Y K I K G R T T F S A I F

509 CGTTACGATCCCTTTGATTTCTGGGTAGGGCCGTTCTACGTTGGCTTTTGGGGCTTTGTC

52 R Y D P F D F W V G P F Y V G F W G F V

569 TCGGTCATCGGGATCATCTTCGGTTCGTTATTTCTACATCAACGAGACAATCCTCAAAGGT

72 S V I G I I F G S Y F Y I N E T I L K G

629 CCCTATTCAATACCGCAAAACTTCTTTGCGGGACGAATTCATCGCCCGCCACCCGAACTT

92 P Y S I P Q N F F A G R I D P P P P E L

689 GGGTTGGGCTTTGCGGCACCGGGTCAACCGGGCTTTGCGCTGGCAGATGACCGTCTCTTTT

112 G L G F A A P G E P G F A W Q M T V L F

749 GCGACGATGCTTTCTTCGGCTGGATGATCGGCCAGGTGGATATTAGTATGAAGCTCGAT

132 A T I A F F G W M M R Q V D I S M K L D

809 ATGGGCTATCAGGTTCCGATTTCGATTTCGGGCTTGCATTTTCGGCCTGGTTAGTCTCCAG

152 M G Y H V P I A F G V A F S A W L V L Q

869 GTTATTCCGCCGATAGCCCTCGGTATGTGGCACGAAGGCTTCGTCCTGGCATTATGCCC

172 V I R P I A L G M W H E G F V L G I M P

929 CACCTCGATTGGCTGTGCAATTTTGGCTATCGCTACAATAATTTCTTCTACAAACCGTTC

192 H L D W V S N F G Y R Y N N F F Y N P F

989 CAGCCTATCGGCATCACCGCACTGTTCCGATCAACCTGGCTGCTGGCCTGCCACGGCTCG

212 H A I G I T G L F A S T W L L A C H G S

1049 CTCATTCTCAGCGCTGCGCAGTACCGTGGCCCGGAAGCTGGCGGATATGAGAACGTTCTTC

232 L I L S A A Q Y R G P E C G D I E N V F

1109 TTCGGTCAGCTGCAGTACTATTTCAGTGGGCGAGTCCGGTCTGCACCGATTAGGCTACATC

252 F R D V Q Y Y S V G E S G V H R L G Y I

1169 TTCGGGATTGGCGGCATCCCTCGGCTCATCTGTGCATTTTCCTGCTGGGCTGGCGGCTG

272 F A I G G I L S A D L C I L L S G W P V

1229 CAGGATTCGCTAAGCTTCTGCAATTTCTGGAATAATCTGCCCTTCTGGAGCGCGCTAG

292 Q D W V S F W N F W N N L P F W S G V \*\*\*

Рис. 4. Нуклеотидная последовательность *puf*-оперона *C. aurantiacus* и выведенные аминокислотные последовательности L- и M-субъединиц РЦ. Предполагаемые регуляторные генетические элементы подчеркнуты и выделены жирным шрифтом: промоторные последовательности -35 и -10, последовательности Шайн - Далгарно,

следовательностями прокариотических промоторных областей -10 и -35: TATAAT и TGGACA [25]. Это дает основание полагать, что участок генома, прилегающий к 5'-концу гена L-субъединицы, — промоторная область полицистронного оперона, в котором ген L-субъединицы является первым геном. Через 31 п. о. после терминирующего кодона гена M-субъединицы обнаружена характерная для р-независимой терминации транскрипции прокариот шпилечная структура (рис. 4), к которой непосредственно примыкает Т-богатая последовательность [25].

1289 AGAGGAGCACACTGGT ATGGCGACAATCAATATGACGCCGGCGGATCTGGAACTGGGT  
 1 (M) A T I N M T P G D L E L G

1347 CCTGATCGCGGTGGGATCGGAAAACCAATTCAGATTCCGCTCCTCGAAAACCTCGGCTTC  
 14 R D R G R I G K P I E I P L L E N F G F

1407 GATAGCCAGCTCGGCCCGTCTATCTCGGCTTTTGGAAAGCAGTGGGTTACATCAACGGGT  
 34 D S Q L G P F Y L G F W N A V A Y I T G

1467 GGATCTTTACCTTTATCTCGGCTGATGGTGTATGTTGCTCAGGTGAATTACAATCGCGGTG  
 54 G I F T F I W L M V M F A Q V N Y N P V

1527 GCCTTTGCCAAGTACTTTGCGGTCTTGC AAAATCGATCGCGCTCATCACGCTATCGCCCTG  
 74 A F A K Y F V V L Q I D P P S S R Y G L

1587 AGCTTTCGCGCGCTGAATGAGGGTGGATGGCTGGCTCATCGCGACCTTCTTCGTGACGGTC  
 94 S F P P L N E G G W W L I A T F F L T V

1647 TCGATCTTCGCGTGGTATATGCACATCTATACCCGGCCGAAGGGGCTCGGGATTAAGCCC  
 114 S I F A W Y M H I Y T R A K A L G I K P

1707 TACCTGGCTTACGGCTTCACCGGTGCGATTGGGCTCTACCTGGTGTATCTATATCAATTCGT  
 134 Y L A Y G F T G A I A L Y L V I Y I I R

1767 CCGGTGTGGATGGGTGATTGGTCCGGAAGCGCCGCCACCGCATCAAAGCGGTGCTCGAC  
 154 P V W M G D W S E A P A H G I K A L L D

1827 TGGACGAATAATGTGAGCGTGGCTTACGGCAATTTCTACTACAATCCGTTCCACATGCTC  
 174 W T N N V S V R Y G N F Y Y N P F H M L

1887 TCGATCTTCTTCTTGGCTCGGATCAACGTTGTTGCTGGCGATGCACGCCGGTACCATTGG  
 194 S I F F L L G S T L L L A M H A G T I W

1947 GCACTCGAAAAGTACGCTGCCACGAGGAATGGAATGAGATTCAGGCTCCCGGTACCGGT  
 214 A L E K Y A A H E E W N E I Q A P G T G

2007 ACCGAGCGTGTCTCAGCTCTTCTGGCGTGGTGCATCGGCTTTAACCGGAATGCCTACTCG  
 234 T E R A Q L F W R W C M G F N A N A Y S

2067 ATCCACCTGTGGGCATTCGCTTCCGCTGGTTGTGCGGTATTACCGGTGCATTCGGTCTC  
 254 I H L W A F W P A W L C G I T G A L G V

2127 TTCTTCTCAATGCCCGATTTTGTCAATAACTGCTTCCAATCGGGTATTGAAGCCGGCATC  
 274 F F S M P D F V N N W F Q W G I E A G I

2187 AACTATCGGCAAGGTCCAACGCCACCGGTTTCACTGCCGTAGCGTTCCGTGACACTTCTCT  
 294 N Y P Q G P T P P V S L P \*\*\*

2247 ACCTTCTCCCGGCTCTCGCCCGTCAATCAGACGGGGCAGAGGTTGTTTATTGCACGGGG  
 2307 AGAGGTGACATCTGAAGACTGCTGTATCAAAATCTGGCTTCATAACAGTCATTCGACGCC  
 2367 GTTTTCAGGTGTGCCACCGGCGCGTGGTGGCTTGTGTGGTGGCCGGTACGGGGCAGG  
 2427 GCAATCGCGTGCCTTACGCTCCTGTCTGATACCAGTAGAGACGACCGCATGCGTCCGCCCTA  
 2487 CCAGCGTCCAGCGGTCAATTGTGTAGGTGCTGCATCAGGGGGATC 2531

сигнал р-независимой терминации транскрипции. Подчеркнуты также выделенные пептиды. Стрелками (← →) показаны аминокислотные остатки, определенные методами белковой химии

Из этого следует, что гены L- и M-субъединиц РЦ *C. aurantiacus* составляют самостоятельный оперон. Это отличает его от аналогичных, так называемых *puf*-оперонов у пурпурных фотосинтезирующих бактерий. Известно, что, помимо генов L- и M-субъединиц РЦ, *puf*-опероны пурпурных бактерий содержат также гены, кодирующие другие белки фотосинтетического аппарата: гены цитохрома *c*,  $\alpha$ - и  $\beta$ -полипептидов светособирающего комплекса, белка *Q*, участвующего в регуляции биосинтеза бактериохлорофиллов, а также гены *pufR* и *pufX* (функции соответствующих им



```

1 SEYQNILTCVQVRTAP-HS-APIAKGIFPR--LGKPGF-SYWLGKIG-DAQ I
1 AEYQNFFNQVQVAGAP-EMCLKEDVDTFERTPAG--MFN--ILGWMG-NAQ II
1 AEYQNIFSQVQVVRG-PADLGMTEDVNLANRSCVG-P-F-STLLGWFG-NAQ III
1 ADYQTIYTIQIARG-P-HITVSGEWGDNDR-V-GKP-FYSYWLKIG-DAQ IV
      1 X-ATINMTP---GDLELGRDRGR-I-GKP-IEIPLLENFGFDSQ V
      * * * * *
1 SRAKAKDRFPDFSFSTVVEGARATRVF--CGRTIEEIEPEYKIKGRTPF-SAIRYDPPDFWF V
      1 ALLSFERKYRV--RGG-TL-----IGG-----DLDFWF IV
      1 ALLSFERKYRV--GG-TL-----VGG-----NLDFWF III
      1 ALLSFERKYRV--GG-TL-----IGG-----SLDFWF II
      1 ALLSFERKYRV--RGG-TL-----IGG-----DLDFWF I

46 IGPIYLGSTTVLSLVFGFFAIEIIGFNLLASVNW--SPMEFGRQFFWLGLLEPPAAEYGLG I
46 IGPIYLGIACTVSLAFGAAWFFFTIGVWYQAGF--DPFIFMRDLFFPSLEPPAAEYGLA II
47 LGPIYLGSLGVLSPSGLMWFFFTIGIWFYQAGW--NPVFLRDLFFPSLEPPAPEYGLS III
46 IGPIYLGASGIAAFAGSTAILIIFNMAAEVHF--DPLQFFRQFFWLGLYPPKAQYGMG IV
37 LCPFYLGFWNAVAYITGGIFTFIWLMVMPAQV-NY-NPVAFAKYFVVLQIDPPSSRYGLS V
      * * * * *
60 VGPFFYVGFVGVSVI-CIIPGSGYFYNETILKGPYSIPQNF----FAGRIDPPPPELGLG V
26 VGPFFYVGFVGF--VSAIFFFIFLGVSLIGYA-ASQGPWDP--F-----ATISINPPDLKYGLG IV
26 VGPFFYVGFVGF--VATFFFAALGIIILAWSAVLQG-TWNPQ-----LISVYPPALEYGLG III
26 VGPFFYVGFVGF--VTTFIFATLGLFLILWGAAMQG-TWNPQ-----LISIFPPPVENGLN II
26 VGPFFYVGFVGF--VTTLFLTVLGTALIVWGAAL-GPSWT---F----WQISINPPDVSYGLA I

104 F-APLAEGCWWQIACFFLTSILLWVVRMYRRARALKMCTHTAWAFASAIPLFLSLGPIR I
104 I-APLKQGGVWQIASLFMAISVIAWVVRVYTRADQLGMGKHMAWAFLSAIWLWSVLGFWR II
105 FAAPLKEGGLWLIASFFMFVAVWSWWRGYLRAQALGMCKHTAWAFLSAIWLWMLVGFIR III
104 I-PPLHDCGWWLMAGLFMFTLSLGSWVIRVYSRARALGLCTHIAWNFAAAIFPVLICIGIH IV
95 F-PPLNEGCWWLIATFFLTVSIFAWYMHYTRAKALGKPYLAYGFTGAIYLYLVYIIR V
      * * * * *
115 FAAPGEPGFVWQMTVLFATIAFFGWWMRQVDISMKLDMGYHVPIAFGVAFSAWLVLQVIR V
77 -AAPLLEGGFWQAITVCALGAFISWMLREVEISRKLKIGYHVPFAFCVPIPFMFCVLQVFR IV
77 C-APLAKGGLWQIITICATGAFVSWALREVEICRKLKIGYHIFPAFAFAYLTLVLFIR III
77 V-AALDKGGLWQVITVCATGAFCSWALREVEICRKLKIGYHIFVAFSMAIFAYLTLVVIR II
77 M-APMAKGGGLWQIITFSAIGAFVSWALREVEICRKLKIGYHIFPAFGFAILAYVSLVVIR I

```

Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей L- и M-субъединиц РЦ *C. aurantiacus* между собой (совпадающие аминокислотные остатки отмечены звездочкой), а также с L- и M-субъединицами пурпурных бактерий (совпадающие в L- либо M-субъединицах пяти видов аминокислотные остатки подчеркнуты, совпадающие во

белковых продуктов пока точно не установлены) [23, 26—31]. В связи с этим вопрос о местонахождении указанных генов у *C. aurantiacus* вызывает определенный интерес.

Проведенное сравнение первичных структур обеих субъединиц РЦ *C. aurantiacus* показало их относительно высокую степень сходства (86 совпадающих остатков). Еще более высокая степень подобия структур наблюдается при сравнении каждой из них с L- либо M-субъединицами РЦ пурпурных бактерий. На рис. 5 приведена общая картина расположения сходных участков обеих субъединиц РЦ *C. aurantiacus* в сравнении с соответствующими субъединицами РЦ пурпурных бактерий, первичные структуры которых определены к настоящему моменту. 88 консервативных аминокислотных остатков было выявлено при сравнении L-субъединиц РЦ всех пяти видов и 81 — при сравнении M-субъединиц (рис. 5).

При сравнении первичных структур РЦ 26 аминокислотных остатков оказались сверхконсервативными, т. е. их расположение сохранено как у L-, так и у M-субъединиц РЦ всех пяти сравниваемых видов (рис. 5). При этом шесть из них представляют собой остатки глицина и еще шесть — остатки пролина. Как известно, эти аминокислотные остатки играют важную роль при переходах типа « $\alpha$ -спираль —  $\beta$ -складчатая структура» во вторичной структуре белка. Наличие в первичных структурах L- и

163 P L L M G N F S E S V P F G I P P H L D W T N S F S L M Y G N F F Y N P P H N L S I A F L Y G S A L L S A M H G A T I L I  
 163 P I L M G S W S V A P P Y G I F S H L D W T N Q F S L D H C N L F Y N P P H C L S I A A L Y G S A L L F A M H G A T I L II  
 165 P I L M G S W S E A V P Y G I F S H L D W T N N F S L V H G N L F Y N P P H C L S I A F L Y G S A L L F A M H G A T I L III  
 163 P T L V G S W S E G V P F G I W P H I D W L T A F S I R Y G N F Y Y C P W H G F S I G F A Y G C G L L F A A H G A T I L IV  
 154 P V W M G D W S E A P A H G I K A L L D W T N N V S V R Y G N F Y N P P H M L S I P F L L G S T L L L A M H A C T I W V  
 \* \* \* \* \*  
 175 P I A L G M W H E G F V L G I M P H L D W V S N F G Y R Y N N F F Y N P P H A I G I T G L F A S T W L L A C H G S L I L V  
 136 P L L L G S W G H A F P Y G I L S H L D W V N N F G Y Q L N W H Y N P C H M S S V S F L F V N A M A L G L H G G L I L IV  
 136 P V M M G A W C Y A F P Y G I W T H L D W V S N T G Y T Y G N F H Y N P A H M I A I S F F F T N A L A L A L H G A L V L III  
 136 P M M G S W G Y A F P Y G I W T H L D W V S N T G Y T Y G N F H Y N P A H M L G I S L F F T A W A L A M H G A L V L II  
 136 P V M M G A W C Y G F P Y G F M T H L D W V S N T G Y Q Y A N F H Y N P A H M L G I T L F F T C L A L A L H G S L I L I  
  
 223 A V S R L C G D R E V E Q I T D R G T A A E R A A L F W R W T M C F N A T M E S I H R W A - W F - A V L C T F T G A I C I  
 223 A V T R F G G E R E L E Q I V D R G T A S E R A A L F W R W T M C F N A T M E G I H R W A I W M - A V M V T L T G G I C II  
 225 A V S R F G G E R E L E Q I A D R G T A A E R A A L F W R W T M C F N A T M E G I H R W A I W M - A V L V T L T G G I C III  
 223 A V A R F G G D R E I E Q I T D R G T A V E R A A L F W R W T I G F N A T I E S V H R W G - W F F S L M V M V S A S G IV  
 214 A L E X A A H E B W N E I Q A P G C T E R A Q L F W R W C M C F N A N A Y S I H L W A F W F A W - L C G I T G A L C V  
 \* \* \* \* \*  
 235 S A A Q Y R G P E ----- G G D I E N V -- F F R D V Q Y Y S V G E S G V H R L G Y I F A - I G G I L S A D L C V  
 196 S V A N --- P G --- D G D K V K T A E H E N - Q Y F - R D V V G Y S I G A L S I H R L G L P L A S N I F L T G A - F G IV  
 196 S A A N --- P E --- K G K E M R T P D H E D - T F F - R D L V G Y S I G T L G I H R L G L L L S I S A V F F S A - L C III  
 196 S A A N --- P V --- K G K T M R T P D H E D - T Y F - R D L M G Y S V G T L G I H R L G L L L A L N A V F W S A - C C II  
 196 S A A N --- P G --- K G E V V K G P E H E N - T Y F - Q D T I G Y S V G T L G I H R V G L L I L A L S A V V W S I - I C I  
  
 282 I L L T G T - V V D N W - P E W G V K H G L A - P A P I  
 282 I L L S G T - V V D N W Y V - W A Q V H G Y A - P V T P 306 II  
 284 I L L S G T - V V D N W Y V - W G Q N H G M A - P L N 307 III  
 282 I L L T G T - F V D N W Y L - W C V K H G A A - P D V P A Y L P A T P D P A S L P G A P K 323 IV  
 273 V F F S M P D F V N N W - P Q W G I E A G I N Y P Q G P T P P V S L P 306 V  
 \* \* \* \* \*  
 284 I L L S G W P V Q D - W V S F W N F W N L -- P F W S G V 310 V  
 248 T I A S G P F W T R G W P E W W G W L D I -- P F W S 273 IV  
 248 M I I T G T I W P D Q W V D W W Q W V K L -- P F W A N I P G G I N G 281 III  
 248 M L V S G T I Y P D L W S D W W Y W V W M -- P F W A D M A G G I N G 281 II  
 248 M I L S G P I T G S W P D W L W Q K L -- P F W - N - H C 275 I

всех субъединицах у всех сравниваемых видов выделены жирным шрифтом и отмечены черным квадратиком). Сокращения: I — *Rhodospirillum rubrum* [27]; II — *Rhodobacter capsulatus* [20]; III — *Rhodobacter sphaeroides* [21, 22]; IV — *Rhodospseudomonas viridis* [23]; V — *Chloroflexus aurantiacus*. Пронумерованы: I—V — M-субъединицы; V—I — L-субъединицы

M-субъединиц РЦ сверхконсервативных остатков, вероятно, отражает единые принципы организации, лежащие в основе функционирования всего комплекса РЦ.

Отмеченный факт гомологии первичных структур субъединиц РЦ *C. aurantiacus* и субъединиц РЦ пурпурных бактерий позволили предположительно локализовать аминокислотные остатки, ответственные за связывание хромофорных групп РЦ *C. aurantiacus*. Высокая консервативность остатков гистидина объясняется их вероятным участием в связывании хромофорных групп РЦ. Известно, что в хромофорном составе РЦ *C. aurantiacus* в отличие от РЦ пурпурных бактерий один из двух дополнительных бактериохлофиллов замещен бактериофеофтином *a* [40, 32]. Вероятно, поэтому в M-субъединице РЦ *C. aurantiacus* Leu<sup>171</sup> замещает в соответствующем положении остаток гистидина. Мономерный бактериохлофилл *a*, так же как и в РЦ пурпурных бактерий, связывается остатком His<sup>192</sup> L-субъединицы. Специальная пара молекул бактериохлофилла *a* (P<sub>866</sub>) в РЦ *C. aurantiacus* связывается двумя остатками гистидина (His<sup>212</sup> и His<sup>191</sup> соответственно в L- и M-субъединицах). Наличие дополнительного отрицательного заряда (Asp<sup>281</sup>) в L-субъединице РЦ *C. aurantiacus* вблизи специальной пары бактериохлофиллов, возможно, способствует более легкому отрыву от нее электрона и объясняет более отрицательный окислительно-восстановительный потенциал РЦ *C. auran-*

*acus* (+386 мВ) по сравнению с потенциалом РЦ пурпурных бактерий (+450 — +500 мВ) [32].

Интересное отличие в структуре РЦ *C. aurantiacus* — замещение в L-субъединице остатка глутаминовой кислоты, расположенного у пурпурных бактерий вблизи бактериофеофитина, на  $\text{Gln}^{143}$ . На основании консервативности этого остатка у пурпурных бактерий высказывалось предположение, что наличие отрицательного заряда вблизи бактериофеофитина существенно для выбора пути переноса электронов [3]. Замена в этом положении у *C. aurantiacus* глутаминовой кислоты на глутамин свидетельствует о том, что взаимодействие этих остатков с бактериофеофитином не является решающим фактором для реализующегося пути транспорта электронов. На основании данных направленного мутагенеза РЦ *Rhodobacter capsulatus* к такому же выводу пришли и авторы в работе [33].

Связывание первичного хинона  $Q_a$  в РЦ *C. aurantiacus* осуществляется, вероятно, аминокислотными остатками M-субъединицы  $\text{Trp}^{241}$  (путем образования между ними  $\pi$ -комплекса), а также  $\text{Ala}^{249}$  и  $\text{His}^{208}$  (через водородные связи). Аналогичным образом вторичный хинон  $Q_b$  связывается остатками L-субъединицы  $\text{Phe}^{252}$ ,  $\text{Ser}^{259}$  и  $\text{His}^{229}$ . Атом марганца, вероятно выполняющий те же функции, что и негемовое железо в РЦ пурпурных бактерий, стабилизирован в молекуле РЦ *C. aurantiacus* координационными связями с четырьмя остатками гистидина ( $\text{His}^{208}$  и  $\text{His}^{255}$  M-субъединицы и  $\text{His}^{229}$  и  $\text{His}^{266}$  L-субъединицы), а также с остатком  $\text{Glu}^{223}$  M-субъединицы. Обнаруженная гомология первичных структур L- и M-субъединиц РЦ *C. aurantiacus* и пурпурных бактерий позволила нам предложить модель укладки полипептидных цепей РЦ *C. aurantiacus* в мембране (рис. 6). Эта модель также согласуется с расчетами профилей гидрофобности (данные не приводятся).

Как видно из рис. 5, N-концевые участки обеих субъединиц РЦ *C. aurantiacus* значительно отличаются по структуре от соответствующих участков РЦ пурпурных бактерий, а N-конец L-субъединицы удлиннен примерно на 30 аминокислотных остатков. Кроме того, в N-концевых участках субъединиц РЦ *C. aurantiacus* по сравнению с пурпурными бактериями в 2—3 раза увеличено содержание заряженных остатков. Это позволяет сделать два предположения о возможной роли этих участков. Во-первых, удлиненная N-концевая область L-субъединицы РЦ *C. aurantiacus* могла бы выполнять функции отсутствующей у *C. aurantiacus* H-субъединицы, которая у пурпурных бактерий стабилизирует РЦ и необходима для нормального функционирования вторичного хинонового акцептора  $Q_b$  [34]. Во-вторых, большее число солевых мостиков могло бы придавать РЦ *C. aurantiacus* свойственную ему большую термостабильность по сравнению с РЦ пурпурных бактерий [7].

Для проверки этих предположений, а также с целью изучения топографии N-концевых участков был использован подход, основанный на ограниченном протеолизе РЦ протеиназами различной специфичности: клострицином, трипсином, протеиназой из *St. aureus* V8, термолизинном, химотрипсином и проназой E. Нативность РЦ по ходу протеолиза контролировали по спектру поглощения. Точки расщепления идентифицировали секвенированием либо смеси остающихся гидрофобных фрагментов, либо индивидуальных фрагментов после их разделения SDS-электрофорезом и переноса на PVDF-мембрану.

Было показано, что ни одна из предполагаемых гидрофильных перетяжек между трансмембранными сегментами в нативном белке не доступна действию протеиназ. Это согласуется с данными рентгеноструктурного анализа РЦ пурпурных бактерий, у которых эти перетяжки образуют  $\alpha$ -спирали [2], лежащие в плоскости мембраны и, вероятно, погруженные в полярную часть липидного бислоя.

N-Концевые участки обеих субъединиц оказались доступными действию протеиназ. Все использовавшиеся протеиназы, за исключением химотрипсина, давали достаточно стабильные продукты расщепления РЦ, разделение которых методом SDS-электрофореза приведено на рис. 7. Времена инкубации с ферментами подбирали по кинетикам расщепления.

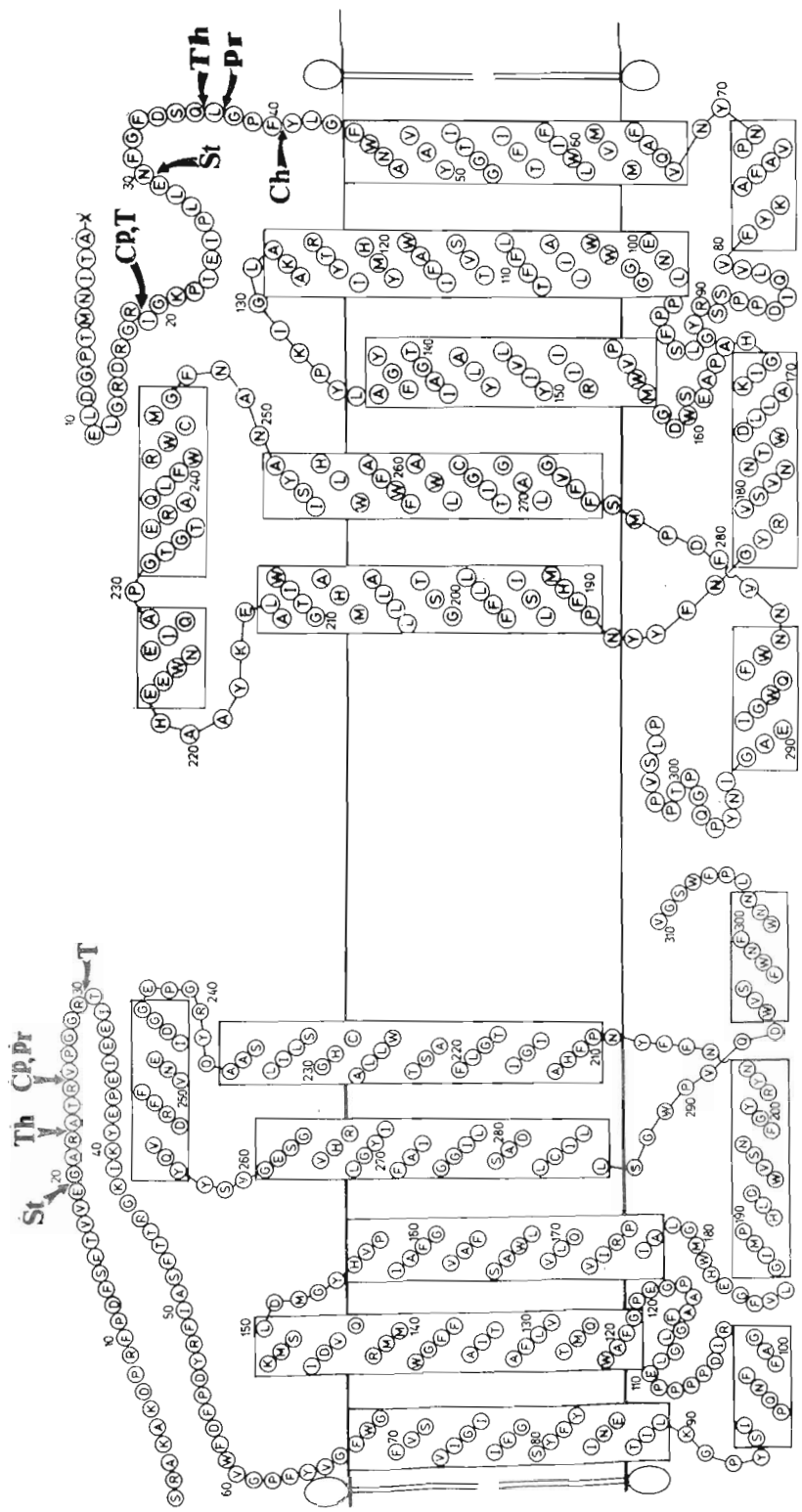


Рис. 6. Модель укладки полипептидных цепей РЦ *S. aureus* в мембране. Слева расположена L-, справа — M-субъединица. Стрелками показаны места наиболее глубокого расщепления протеиназами при ограниченном протоллизе. Ch — химотрипсин; CP — кlostрипин; Pr — протеаза E; St — протеиназа из *St. aureus* V8; T — трипсин; Th — термоллизин

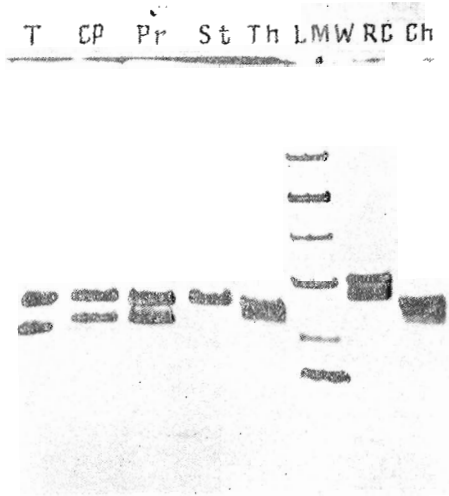


Рис. 7. SDS-электрофорез продуктов ограниченного протеолиза РЦ *C. aurantiacus*. Условия гидролиза: 1,5 ч, 37° С. Обозначения протеиназ как на рис. 6. Фермент-субстратные отношения (по весу): Т — 1 : 5, СР — 1 : 30, Пр — 1 : 40, Ст — 1 : 10, Тh — 1 : 7. Ch — 1 : 2. LMW — маркерные белки, RC — исходный препарат РЦ

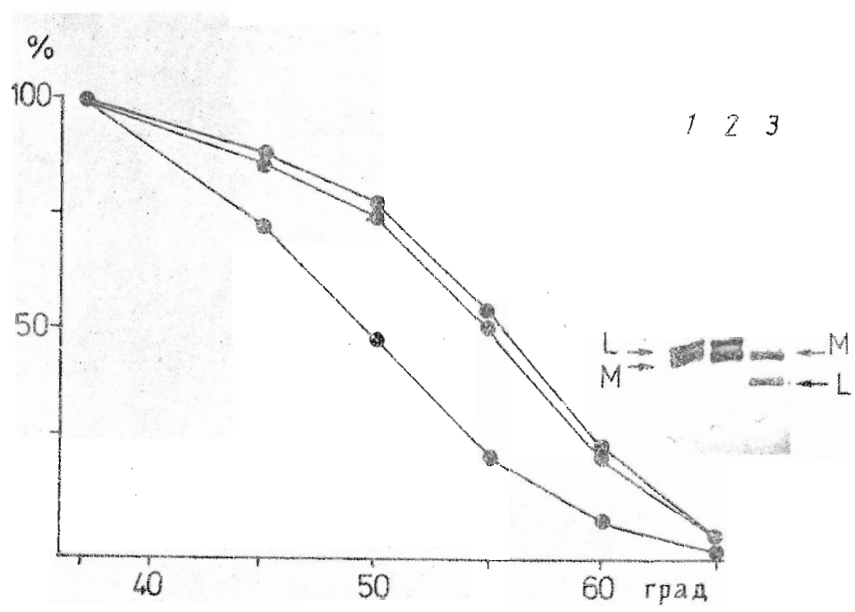


Рис. 8. Влияние обработки клострипианом на термостабильность РЦ *C. aurantiacus* 1 — исходный препарат РЦ; 2 — промежуточный продукт расщепления клострипианом (отщеплены участки Ala<sup>1</sup> - Arg<sup>18</sup> М-субъединицы и Ser<sup>1</sup> - Arg<sup>2</sup> L-субъединицы); 3 — конечный продукт расщепления клострипианом (отщеплены участки Ala<sup>1</sup> - Arg<sup>18</sup> М-субъединицы и Ser<sup>1</sup> - Arg<sup>25</sup> L-субъединицы). Ось ординат — поглощение при 812 нм. На вставке показан SDS-электрофорез соответствующих препаратов (система Лэммли с 0,3% SDS)

Точки наиболее глубокого расщепления показаны на рис. 6. Точку расщепления химотрипсином L-субъединицы идентифицировать не удалось, вероятно, из-за образования смеси нескольких продуктов.

Вся гидрофильная N-концевая часть М-субъединицы оказалась доступной действию протеиназ, что согласуется с предложенной моделью укладки полипептидных цепей РЦ *C. aurantiacus*. В то же время значительный участок N-концевой части L-субъединицы действию протеиназ недоступен (см. рис. 6). Это позволяет предполагать, что он образует погруженную в глубь молекулы структуру, возможно подобную α-спиральным перетяжкам между трансмембранными сегментами.



Ограниченный протеолиз РЦ не приводил к значительным изменениям спектра поглощения (лишь поглощение мономерного бактериохлорофилла уменьшалось на 5—10%), однако стабильность получаемых препаратов была заметно снижена: если исходный препарат может храниться без изменения спектральных свойств при 4° С несколько недель, то препараты после протеолиза — 1—2 сут. Укороченные с N-концов препараты РЦ также быстрее денатурируют под действием света.

Для исследования возможной роли отдельных участков N-концевых областей в функционировании РЦ и обеспечении его термостабильности было выбрано расщепление кlostрипаином, поскольку этот фермент не имеет потенциальных точек расщепления в C-концевых участках РЦ (см. рис. 6). Кроме того, по сравнению с трипсином кlostрипаин дает меньшее число промежуточных продуктов, что облегчает их идентификацию.

Было обнаружено, что промежуточный продукт расщепления РЦ кlostрипаином, у которого отщеплено 18 аминокислотных остатков с N-конца M-субъединицы и 2 остатка с N-конца L-субъединицы, по термостабильности почти не отличается от исходного РЦ, в то время как отщепление от L-субъединицы еще 23 аминокислотных остатков приводит к заметному снижению термостабильности РЦ (рис. 8). Вероятно, вклад участка Ala<sup>3</sup> — Arg<sup>25</sup> L-субъединицы в термостабильность РЦ может объясняться тем, что этот участок, несущий большое число заряженных остатков, способен стабилизировать структуру белка за счет ионных взаимодействий с другими частями молекулы. Интересно, что скорость отщепления протеиназами участка Ala<sup>3</sup> — Arg<sup>25</sup> L-субъединицы примерно на порядок ниже, чем N-концевого участка M-субъединицы, что может отражать большую структурированность первого.

В последующих статьях будут описаны работы по выяснению влияния более глубокого расщепления M-субъединицы на термостабильность РЦ *C. aurantiacus*, а также влияния ограниченного протеолиза РЦ на его функционирование.

Авторы выражают благодарность Н. С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов зондов, Ю. В. Смирнову за проведение аминокислотных анализов и В. А. Шувалову за предоставленный штамм и полезное обсуждение результатов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали: биогели P-2 и P-30 (Bio-Rad, США); эндонуклеазы рестрикции *AluI*, *SalGI*, *Sau3AI*, *SmaI*, *HindIII*, *AvaII*, *TaqI*, *HaeII*, *EcoRI*, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК-лигазу фага T4, кlostрипаин, термолизин (Boehringer-Mannheim, Австрия); трис, HCOOH, проназу Е (Merck, ФРГ); H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>·EDTA (Serva, ФРГ); микропористое стекло CPG-Thiol с размером частиц 125—177 мкм и диаметром пор 500 Å (тиол-стекло), бромциан (Pierce, США); протеиназу из *St. aureus* V8 (Miles, Англия); DEAE-целлюлозу (DE-52; Whatman, США); карбоксипептидазу А, химотрипсин, трипсин (Worthington, США); [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dNTP (Amersham, Англия); поливинилдендифторидную (PVDF) мембрану «Immobilon» (Millipore, США); лаурилдиметиламинооксид (LDAO, 30% раствор; НПО «Биолар», СССР). Все остальные реагенты имели квалификацию ос. ч.

**Выращивание биомассы *C. aurantiacus*.** Штамм J10-II термофильной зеленой бактерии *C. aurantiacus* выращивали на среде, содержащей дрожжевой экстракт, согласно работе [35] в условиях постоянного интенсивного освещения при 55° С в микробиологических бутылках емкостью 15 л. Сбор биомассы и перевод ее в буфер выделения осуществляли обычно через неделю после посева ультрафильтрацией на кассетном мембранном фильтре PSVP (Millipore, США). Сконцентрированную суспензию клеток дополнительно осаждали центрифугированием при 12 000 g в течение 15 мин. Осадок замораживали и хранили при —70° С.

**Выделение препарата РЦ *C. aurantiacus*.** 200 г биомассы *C. aurantiacus*, суспендированные в 1 л буфера выделения (50 mM трис-HCl, pH 9,0),

разрушали двукратным пропусканием суспензии через охлаждаемую ячейку пресса Френча. Суспензию разрушенных клеток доводили до конечного объема 2 л буфером экстракции, содержащим неионный детергент лаурилдиметиламинооксид, так, чтобы конечные концентрации компонентов экстракционной среды составили: 1% LDAO, 50 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 9,0. Экстракцию РЦ проводили в течение 1 ч при 40° С и постоянном перемешивании. После охлаждения до 4° С экстракт центрифугировали 2 ч при 30 000 g и супернатант, разбавленный в 2 раза буфером (50 мМ трис-HCl, pH 9,0, 1% LDAO), наносили на колонку (10 × 25 см, Pharmacia, Швеция) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной тем же буфером. После промывки колонки 4 объемами (8 л) буфера следовала промывка 8 л первого буфера элюции: 50 мМ трис-HCl, pH 8,0; 0,2% LDAO. Фракции, содержащие РЦ, элюировали с колонки вторым буфером элюции: 50 мМ трис-HCl, pH 8,0; 0,2% LDAO, 30 мМ NaCl. Затем pH фракции, содержащей РЦ, доводили до 9,0 добавлением раствора 1 М трис, разбавляли дистиллированной водой до двух первоначальных объемов, фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и рехроматографировали на анионообменной колонке Mono-Q HR16/10 на хроматографе FPLC-System (Pharmacia, Швеция) в градиенте концентрации NaCl. Градиент создавался автоматически смешиванием буферов А (50 мМ трис-HCl; pH 9,0; 0,1% LDAO) и В (буфер А + 1 М NaCl). Степень очистки контролировали спектрофотометрически по отношению поглощения при 280 нм ( $A_{280}$ ) к поглощению при 806 нм ( $A_{806}$ ). Фракции с отношением  $A_{280}/A_{806} > 1,5$  рехроматографировали на меньших колонках серии Mono-Q (Mono-Q HR 10/10 или Mono-Q HR 5/5, Pharmacia, Швеция).

*Спектральные измерения препарата РЦ С. aurantiacus.* Спектры поглощения препаратов РЦ *S. aurantiacus*, полученных описанным выше способом, измеряли в диапазоне 250—900 нм на спектрофотометре DU-40 (Beckman Inst., США), используя в качестве раствора сравнения буфер А. При расчете концентрации РЦ по поглощению при 806 нм использовали определенный нами коэффициент экстинкции  $\epsilon_{806} = 130\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

*Электрофорез препарата РЦ С. aurantiacus.* Электрофорез в полиакриламидном геле препаратов РЦ проводили в системе Лэммли [36] с модификациями, описанными в работе [41], а также в трис-боратной системе, согласно [37]. Электрофорез по Лэммли проводили на приборе Midget (ЛКВ, Швеция), а электрофорез в трис-боратной системе — на том же приборе или на приборе SE 2/4 LS (Pharmacia, Швеция). Для калибровки электрофореграмм использовали стандартную смесь белков-маркеров (94, 67, 43, 30, 20 и 14,5 кДа).

*Аминокислотный анализ* осуществляли согласно методике [38] на автоматическом анализаторе D-500 (Durrum, США). Количество остатков триптофана определяли с помощью гидролиза в 4 н. метансульфоновой кислоте, как описано в работе [39], а количество остатков цистеина (в виде цистеиновой кислоты) — после окисления надмуравьиной кислотой [40].

*N-Концевой аминокислотный остаток белка* определяли как описано в работе [41].

*Определение N-концевого аминокислотного остатка пептидов.* К 200 пмоль пептида добавляли 10 мкл смеси, состоящей из 0,1 н.  $\text{NaHCO}_3$  и равного объема 1-диметиламинонафталин-5-сульфохлорида (DNS) в ацетоне (2 мг/мл). Реакционную смесь выдерживали 30 мин при 45° С. По окончании реакции содержимое ампулы высушивали в вакууме и к сухому остатку добавляли 15 мкл 5,7 н. HCl. Гидролиз проводили 12—13 ч (4 ч для N-концевых остатков Thr, Ser и Pro) при 110° С. Гидролизат упаривали при 60° С, к сухому остатку добавляли воду и упаривали досуха. Остаток анализировали согласно [42].

*Определение C-концевого аминокислотного остатка.* а) При помощи карбоксипептидазы А. К 1 нмоль белка, иммобилизованного на тшол-стекле, добавляли 50 мкл 0,1 н.  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8,3) и карбоксипептидазу А (1 мкг) и выдерживали 4 ч при 37° С. Гидролизат анализировали согласно работе [42].

б) Методом гидразинолиза. К 2 нмоль осажденного и отмытого от хромофорных групп белка добавляли 50 мкл безводного гидразина, выдерживали в запаянной под вакуумом ампуле 8 ч при 100° С, затем содержимое ампулы упаривали. Гидразиды экстрагировали из воды (20 мкл) свежеперегнанным бензальдегидом (20 мкл) и упаривали. С-Концевую аминокислоту определяли в виде Dns-производного.

Иммобилизация полипептидов РЦ *S. aurantiacus* на микропористом стекле SPG-Thiol. Препарат нативного РЦ *S. aurantiacus* денатурировали 10-минутной инкубацией при 70° С в буфере выделения с добавлением SDS до 1% и β-меркаптоэтанола до 5%, после чего избыток β-меркаптоэтанола удаляли обессоливанием и проводили иммобилизацию, как описано в работе [43].

Расщепление апобелка РЦ *S. aurantiacus* бромцианом проводили согласно [44]. Расщеплению подвергали 150 нмоль белка.

Гидролиз иммобилизованного на тиол-стекле апобелка РЦ *S. aurantiacus* протеиназой из *St. aureus* V8 и трипсином. Гидролизу подвергали 75—100 нмоль белка. Реакцию проводили 18 ч во вращающемся флаконе при 37° С в 0,1 М (NH<sub>4</sub>)НСО<sub>3</sub> при весовом отношении Е/РЦ 1 : 20 для протеиназы из *St. aureus* V8 и 1 : 15 для трипсина.

Разделение пептидов гель-фильтрацией. Разделение бромциановых пептидов осуществляли на колонке 1,5 × 100 см, а остальных пептидов — на колонке 1,0 × 86 см с фракционированным биогелем Р-30 (—400 меш) в 80% муравьиной кислоте. Биогель фракционировали способом, описанным в работе [45]. Скорость элюции на большей колонке составляла 1,7 мл/ч, а на меньшей — 1,0 мл/ч. Детекцию пептидов осуществляли по поглощению при 280 нм с помощью Uvicord SII (ЛКВ, Швеция).

Разделение пептидов методом ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Altex, модель 322 (Altex, США) с проточным спектрофотометром Hitachi, модель 100-40 (Hitachi, Япония). Пептиды детектировали спектрофотометрически по поглощению при 206 и 280 нм. Хроматографию пептидов проводили на колонке (0,46 × 25 см) с носителем Ultrasphere-ODS C-18 (Beckman Inst., США) с диаметром частиц 5 мкм в градиенте концентрации ацетонитрила в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты (скорость элюирования 1,5 мл/мин), а рехроматографию отдельных пептидов — в 20 mM СН<sub>3</sub>СООН, рН 5,5.

Выделение ДНК из *Chloroflexus aurantiacus*. 500 мл культуры *S. aurantiacus* отбирали из ферментера в начале 3-го дня роста (полный цикл выращивания 6 сут), центрифугировали 20 мин при 4° С при 8000 об/мин. Собранные клетки ресуспендировали в 5 мл раствора, содержащего 50 mM глюкозу, 25 mM трис-НСl (рН 8,0), 10 mM EDTA, 6 мг/мл лизоцима. После 10 мин инкубации при 0° С к суспензии добавляли 5 мл буфера, содержащего 300 mM NaCl, 200 mM трис-НСl (рН 8,0), 100 mM EDTA, после чего добавляли SDS до концентрации 0,5%. Образовавшуюся суспензию 5 мин перемешивали при 20° С, после чего обрабатывали дважды фенолом, дважды смесью фенол — хлороформ — изоамиловый спирт (в объемном соотношении 25 : 24 : 1) и один раз смесью хлороформ — изоамиловый спирт (24 : 1). Водную фазу отбирали и добавляли к ней 20 мл этанола. Выпавшую «медузу» переносили в новую пробирку, последовательно промывали 70 и 96% этанолом, высушивали и растворяли в 1 мл буфера 10 mM трис-НСl (рН 8,0), 1 mM EDTA.

Геномные библиотеки конструировали с использованием методик, описанных в работах [14, 15].

Гибридизацию лигированных на нитроцеллюлозных фильтрах колоний с <sup>32</sup>P-мечеными олигонуклеотидными зондами проводили следующим образом. Нитроцеллюлозные фильтры предварительно выдерживали 1 ч при 68° С в буфере, содержащем 6 × SSC [14], 5-кратный раствор Денхарта [14], 0,1% SDS, 100 мкг/мл суммарной тРНК *E. coli*. Далее добавляли радиоактивный олигонуклеотидный зонд из расчета 10<sup>6</sup> расп/мин на один фильтр, инкубировали 1 ч при 68° С и затем смеси давали плавно остыть до 20° С в течение ночи. После этого фильтры отмывали несколькими сменами отмывочного буфера (4 × SSC, 0,1% SDS) при постепенном повыше-

нии температуры шагами по 2—3° С. Отмывку прекращали, когда радиоактивность фильтра уменьшалась до 100 расп/мин/см<sup>2</sup>. Фильтры высушивали 30 мин при 80° С и автордиографировали в течение ночи.

*Нуклеотидные последовательности* проклонированных фрагментов определяли по модифицированному [19] методу Максама — Гилберта [18].

*Сравнение термостабильности нативного РЦ и препаратов, полученных ограниченным протеолизом*, проводили в основном согласно работе [7]. Препараты РЦ в буфере 50 мМ трис-НСl (рН 9,0), 0,1% LDAO прогревали 10 мин при 37, 45, 50, 55, 60 и 65° С. О степени тепловой денатурации судили по снижению поглощения в максимуме мономерного бактериохлорофилла (812 нм).

*Ограниченный протеолиз и идентификация точек расщепления*. Ограниченный протеолиз осуществляли в темноте при 23 или 37° С в буфере 50 мМ трис-НСl (рН 9,0), 0,1% LDAO при концентрации РЦ 3,5 — 4,0 мг/мл и следующих весовых фермент-субстратных соотношениях: для клострипаина и проназы Е —  $1/_{20}$  —  $1/_{40}$ ; для трипсина, протеиназы из *St. aureus* V8 и термолитина —  $1/_{5}$  —  $1/_{10}$ ; для химотрипсина —  $1/_{2}$  —  $1/_{5}$ . Расщепление клострипаином и термолитином проводили соответственно в присутствии 1 мМ дитиотреита и 1 мМ СаСl<sub>2</sub>; реакцию останавливали добавлением иоацетамида до 1,5 мМ и Na<sub>2</sub>·EDTA до 10 мМ соответственно. Точки расщепления идентифицировали с помощью секвенирования либо смеси остающихся мембранных фрагментов РЦ, либо индивидуальных субъединиц после разделения их SDS-электрофорезом и переноса на PVDF-мембрану. В первом случае препарат осаждали 90% этанолом в течение 14—18 ч при —15° С, центрифугировали 15 мин (16 000 g), осадок промывали водой и растворяли в 70% трифторуксусной кислоте. Во втором случае препарат разделяли электрофорезом в трис-боратной системе, как описано выше, при этом в электродный буфер добавляли тиогликолевую кислоту. Перенос на PVDF-мембрану и секвенирование полипептидов осуществляли согласно работе [46].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H.* // J. Mol. Biol. 1984. V. 180. № 2. P. 385—398.
2. *Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H.* // Nature. 1985. V. 318. № 6047. P. 618—624.
3. *Michel H., Epp O., Deisenhofer J.* // EMBO J. 1986. V. 5. № 10. P. 2445—2451.
4. *Pierson B. K., Castenholz R. W.* // Arch. Microbiol. 1974. V. 100. № 1. P. 5—24.
5. *Stackebrandt E., Woese C. R.* // Soc. Gen. Microbiol. Symp. 1981. V. 32. P. 1—31.
6. *Blankenship R. E., Fuller R. C.* // Encycl. Plant Physiol. 1986. V. 19. P. 390—399.
7. *Pierson B. K., Thornber J. P., Seftor R. E. B.* // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 723. № 3. P. 322—326.
8. *Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Zolotarev A. S., Shmukler B. E., Zargarov A. A., Kutuzov M. A., Telezhinskaya I. N., Levina N. B.* // FEBS Lett. 1988. V. 231. № 1. P. 237—242.
9. *Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Shmukler B. E., Zargarov A. A., Kutuzov M. A., Telezhinskaya I. N., Levina N. B., Zolotarev A. S.* // FEBS Lett. 1988. V. 232. № 2. P. 364—368.
10. *Pierson B. K., Thornber J. P.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 1. P. 80—84.
11. *Feick R. G., Fuller R. C.* // Biochemistry. 1984. V. 23. № 16. P. 3693—3700.
12. *Groy W. R.* // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 139—147.
13. *Shiozawa J. A., Lottspeich F., Feick R.* // Eur. J. Biochem. 1987. V. 167. № 3. P. 595—600.
14. *Маннатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
15. *Забаровский Е. Р., Алликметс Р. Л.* // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 849—852.
16. *Льюин Б.* Гены. М.: Мир, 1987. С. 95—96.
17. *Ohtsuka E., Matsuki S., Ikehara M., Takahashi Y., Matsubara K.* // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 5. P. 2605—2608.
18. *Maxam A., Gilbert W.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
19. *Chwipilo S. A., Kravchenko V. V.* // FEBS Lett. 1984. V. 179. № 1. P. 34—36.
20. *Yowan D. C., Bylina E. J., Alberti M., Begush H., Hearst J. E.* // Cell. 1984. V. 37. № 3. P. 949—957.
21. *Williams J. C., Steiner L. A., Ogden R. C., Simon M. I., Feher G.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 12. P. 6505—6509.

22. Williams J. C., Steiner L. A., Feher G., Simon M. I. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 21. P. 7303—7307.
23. Michel H., Weyer K. A., Gruenberg H., Dunger I., Oesterhelt D., Lottspeich F. // EMBO J. 1986. V. 5. № 6. P. 1149—1158.
24. Shine J., Dalgarno L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. № 4. P. 1342—1346.
25. Rozenberg M., Court D. // Annu. Rev. Genet. 1979. V. 13. P. 319—353.
26. Weyer K. A., Lottspeich F., Gruenberg H., Lang F., Oesterhelt D., Michel H. // EMBO J. 1987. V. 6. № 8. P. 2197—2202.
27. Belanger G., Berard J., Corriveau P., Gingras G. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 16. P. 7632—7638.
28. Belanger G., Gingras G. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 16. P. 7639—7645.
29. Bauer C. E., Marrs B. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 20. P. 7074—7078.
30. Youvan D. C., Ismail S., Bylina E. J. // Gene. 1985. V. 38. № 1. P. 19—30.
31. Kiley P. J., Kaplan S. // Microbiol. Revs. 1988. V. 52. № 1. P. 50—69.
32. Blankenship R. E., Feick R., Bruce B. D., Kirmaier C., Holten D., Fuller R. C. // J. Cell Biochem. 1983. V. 22. № 4. P. 251—261.
33. Bylina E. J., Kirmaier C., McDowell L., Holten D., Youvan D. C. // Nature. 1988. V. 336. № 6195. P. 182—184.
34. Debus R. J., Feher G., Okamura M. Y. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 10. P. 2488—2500.
35. Pierson B. K., Castenholz R. W. // The Photosynthetic Bacteria. N. Y.: Plenum Press, 1978. P. 179—197.
36. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
37. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Laboratory techniques / Pharmacia Fine Chemicals — Uppsala, Sweden, 1984.
38. Moore S., Stein W. H. // Meth. Enzymol. 1963. V. 6. P. 819—831.
39. Inglis A. S., McMahon D. T. W., Roxburgh C. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1—2. P. 86—94.
40. Moore S. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. № 1. P. 235—237.
41. Weiner A. M., Platt T., Weber K. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 10. P. 3242—3251.
42. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. // Докл. АН СССР. 1967. Т. 172. № 1. С. 91—100.
43. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Bogachuk A. S., Morris C. A. // Methods in Protein Sequence Analysis. N. Y., 1986. P. 189—209.
44. Kasper C. B. // Protein Sequence Determination. N. Y., 1975. P. 114—161.
45. Золотарев А. С., Миталева С. И., Шемякин В. В., Костина М. Б., Фейгина М. Ю., Абдулаев Н. Г. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 10. С. 1317—1330.
46. Левина Н. Б., Слепак В. З., Руселев О. Г., Шемякин В. В., Хозлачев А. А. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 24—31.

Поступила в редакцию  
4.XI.1989

M. A. KUTUZOV, B. E. SHMUKLER, A. A. ZARGAROV, I. N. TELEZHINSKAYA,  
N. B. LEVINA, A. S. ZOLOTAREV, N. G. ABDULAEV

STUDIES ON THE STRUCTURE OF THE PHOTOSYNTHETIC REACTION  
CENTRE OF GREEN THERMOPHILIC BACTERIUM  
*CHLOROFLEXUS AURANTIACUS*

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow

Analysis of the *Chloroflexus aurantiacus* reaction centre (RC) using both protein and recombinant DNA techniques resulted in determination of its polypeptide composition and the primary structures of its two subunits. A model of the polypeptide chains' folding in the membrane is suggested based on: i) homology between L- and M-subunits of *Chloroflexus aurantiacus* RC and their counterparts in purple bacteria; ii) comparison of their hydropathy plots, and iii) data on the tertiary structures of purple bacteria RCs. The role of a number of functionally important amino acid residues in the RC electron transport activity is discussed. Limited proteolysis of the RC under non-denaturing conditions was used to determine the contribution of the N-terminal regions to its thermal stability.