

Н. Ю Таран, О. А. Оканенко, І. П. Ожерєдова, І. А. Козерецька,
Н. Б. Світлова

Особливості складу компонентів ліпідного та пігмент-білкових комплексів фотосинтетичних мембран *Deschampsia antarctica* Desv.

(Представлено членом-кореспондентом НАН України І. П. Григорюком)

Наведено результати молекулярного аналізу пігмент-білкових комплексів і розглянуто особливості ліпідного складу фотосинтетичних мембран *Deschampsia antarctica* — одного з представників флори Антарктики. Здійснено біоінформаційний пошук в доступних базах даних продуктів геному *Deschampsia antarctica*, які структурно та функціонально пов'язані з пластидами. Також проведено пошук їх гомологів у протеомах *Arabidopsis thaliana* та *Oryza sativa japonica*. Наведено результати порівняльного аналізу первинних послідовностей потенційних та відомих продуктів.

Застосування молекулярних технологій дає можливість поглибити розуміння реакцій-відповідей адаптаційних механізмів рослинного організму на геномному та протеомному рівнях. З'ясування відповідей на зміни на всіх рівнях у межах екосистеми та вміння спрямовано керувати ними є одним з пріоритетних завдань сучасності щодо збереження біологічного різноманіття.

Полярні екосистеми забезпечують можливість ідентифікувати ключові елементи, які можливо відтворити в контрольованих модельних умовах, порівняно з екосистемами помірних і тропічних регіонів, які складаються із значно більшого комплексу елементів та факторів, у тому числі антропогенного [1]. У зв'язку з цим дослідження представника флори Антарктики — дешампсії антарктичної (*Deschampsia antarctica* Desv.) як модельного об'єкту становить особливий інтерес.

Основою адаптаційного механізму організмів до екстремальних умов зовнішнього середовища є їх фенотипна та генотипна мінливість, взаємопов'язане функціонування яких забезпечує компроміс між вимогами максимальної онтогенетичної пристосованості та збереженням філогенетичної гнучкості популяцій [2, 3]. Характерними абіотичними чинниками в умовах Антарктики є надмірна освітленість та підвищений рівень УФ-В радіації. Тому формування адаптаційних механізмів для підтримання фотосинтетичної діяльності здійснюється як на рівні ультраструктурної організації органел [4], що забезпечує ефективний механізм розсіяння надмірної енергії, так і на біохімічному рівні фотосинтетичних реакцій.

Первинні процеси фотосинтезу відбуваються в системі тилакоїдних мембран хлоропластів у процесі редокс-перетворень компонентів електрон-транспортного ланцюга. Вони задіяні в адаптивних трансформаціях фотохімічних процесів. Тилакоїдні мембрани містять п'ять типів білкових комплексів, що здійснюють розподіл заряду та перенесення електрона через мембрану: фотосистему I (ФС I), фотосистему II (ФС II), їх світлозбиральні комплекси, комплекси цитохромний b_6/f і протонної АТФ-синтази (CF₀-CF₁).

Наша мета — виділення і дослідження ліпідного та пігмент-білкових комплексів тилакоїдних мембран хлоропластів, а також пошук у доступних базах даних їх амінокислотних

послідовностей *D. antarctica* та проведення порівняльного аналізу з послідовностями *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh та *Oryza sativa* L. ssp. japonica cv. Nipponbare для з'ясування особливостей формування адаптивних реакцій у рослин *D. antarctica* на рівні первинних процесів фотосинтезу.

Ліпіди екстрагували за методом Г. М. Яковенко та А. І. Міхно [5], розділяли методом тонкошарової хроматографії, ідентифікували за допомогою свідків та специфічних проявників.

Пігмент-білкові комплекси тилакоїдних мембран аналізували методом неденатуруючого “зеленого” електрофорезу в поліакриламідному гелі із застосуванням додецилсульфату натрію (ДДС-Na) для дезінтеграції мембран [6]. Відносний вміст пігмент-білків оцінювали по хлорофілу, концентрацію якого визначали в 80% ацетоні [7].

Хроматограми та електрофореграми сканували (сканер Mustek Be@rPaw 4800-TA-Pro, Китай) та аналізували за допомогою програми TotalLab V1.10 (version 1.10).

Пошук послідовностей *D. antarctica* проводили у базах даних Swiss-prot / TREMBL (www.expasy.org). Пошук потенційних гомологів здійснювали шляхом порівняння послідовностей *D. antarctica* з протеомами *A. thaliana* та *O. sativa* — рослинних організмів, які найбільш повно представлені в цих базах. Пошук гомологічних послідовностей та визначення рівня гомології виконували за допомогою інструменту BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Відбір гомологічних послідовностей для подальшого аналізу проводили за загальноприйнятою методикою, згідно з якою білки можна вважати гомологічними при ідентичності $\geq 25\%$, а E-value $< 10^{-3}$.

Глобальне вирівнювання білкових послідовностей здійснювали за допомогою локального ресурсу ClustalW з використанням матриці BLOSUM. Доменну архітектуру амінокислотних послідовностей аналізували за допомогою онлайн-ресурсу SMART (<http://smart.embl.de/>).

Зважаючи на важливість ліпідного складу фотосинтетичних мембран для нормального перебігу процесів фотосинтезу в умовах Антарктики та на недостатню дослідженість цього питання для рослин *D. antarctica*, ми вважали за доцільне вивчити більш детально особливості їх ліпідного складу.

Були ідентифіковані такі речовини: моногалактозилдіацилгліцерол (МГДГ), дигалактозилдіацилгліцерол (ДГДГ), сульфохіновозилдіацилгліцерол (СХДГ), фосфатидилгліцерол (ФГ), фосфатидилетаноламін (ФЕ), фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилінозитол (ФІ).

Згідно з результатами дослідження, для складу ліпідів фотосинтетичних мембран *D. antarctica* характерним є дещо зменшене співвідношення галактоліпідів МГДГ/ДГДГ $\approx 1,3$ (зазвичай співвідношення МГДГ/ДГДГ у фотосинтезуючих тканинах $\approx 1,5$) та досить високий вміст СХДГ. Також досить незвичним є низький вміст ФГ порівняно з іншими рослинами (рис. 1, 2).

При електрофоретичному розділенні методом неденатуруючого “зеленого” ДДС-Na електрофорезу було виявлено сім смуг. Зелені електрофоретичні смуги, що відповідають пігмент-білковим комплексам, позначені згідно з номенклатурою Андерсон [6] (рис. 3).

При порівнянні пігмент-білкових комплексів тилакоїдних мембран рослин *D. antarctica* з рослинами *Pisum sativum* L. [8] істотних якісних відмінностей не встановлено. Виявлено кількісні відмінності в загальному вмісті СЗКП (його олігомерній (ЛНСР¹) та мономерній (ЛНСР³) формах), вмісті хлорофілу в зоні СРа, що відповідає пігмент-білковим комплексам ближньої антени. На нашу думку, кількісні відмінності пов'язані з особливостями умов зростання *D. antarctica*, а саме з впливом надмірної освітленості та підвищеним рівнем УФ-В радіації.

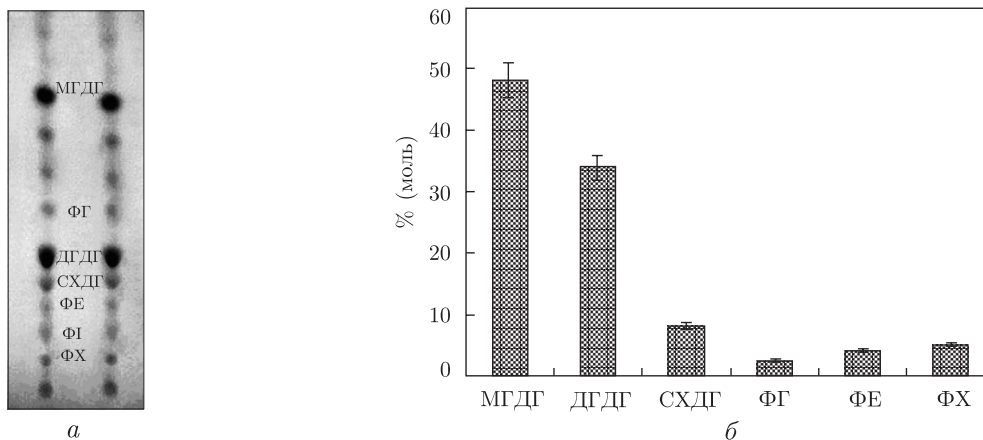


Рис. 1. Якісний (а) та кількісний (б) склад полярних ліпідів фотосинтетичних мембран *D. antarctica*. МГДГ — моногалактозилдіацилгліцерол; ДГДГ — дигалактозилдіацилгліцерол; СХДГ — сульфохіновозилдіацилгліцерол; ФГ — фосфатидилгліцерол; ФЕ — фосфатидилетаноламін; ФХ — фосфатидилхолін; ФІ — фосфатидилінозитол

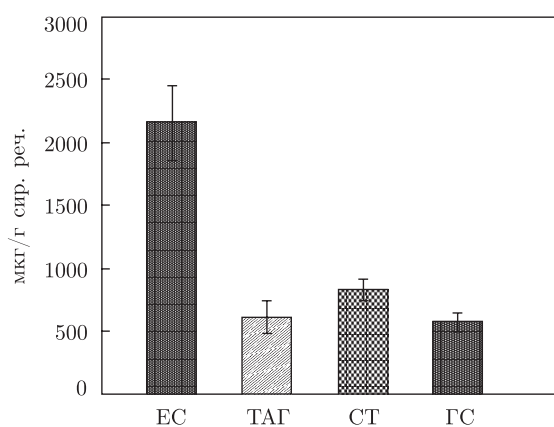


Рис. 2. Вміст нейтральних ліпідів фотосинтетичних мембран *D. antarctica*. ЕС — етери стеролів; ТАГ — триацилгліцероли; СТ — стероли; ГС — глікозиди стеролів

Відносний вміст пігмент-білкових комплексів тилакоїдних мембран рослин *D. antarctica* такий: вміст CP1a та CP1 становить $(8,97 \pm 0,38)$ і $(12,34 \pm 0,26)\%$ відповідно, олігомерної форми (LHCP¹) СЗКІІ — $(27,02 \pm 0,53)\%$, мономерної форми (LHCP³) — $(20,16 \pm 0,61)\%$. Співвідношення між формами (LHCP¹/LHCP³) дорівнює $1,34 \pm 0,02$, загальний вміст СЗКІІ (LHCP¹ + LHCP³) — $(47,17 \pm 1,11)\%$.

Сканування баз даних показало, що на сьогодні у вільному доступі нараховується 37 амінокислотних послідовностей, які належать до протеому *D. antarctica*. З них 20 послідовностей є потенційними білками або фрагментами білків з передбаченою функцією і 17 — з не визначеною функцією. Виходячи з проведеного аналізу, можна стверджувати, що анотування геному та протеому *D. antarctica* знаходиться на початковому етапі, а функції практично всіх відомих потенційних білків остаточно не визначені.

Відповідно до поставленої мети особлива увага приділялась білкам пластид. Нами було відібрано з баз даних 15 білків, які мали хлоропластне походження і належали до родин PsbG та PsbC [9, 10].

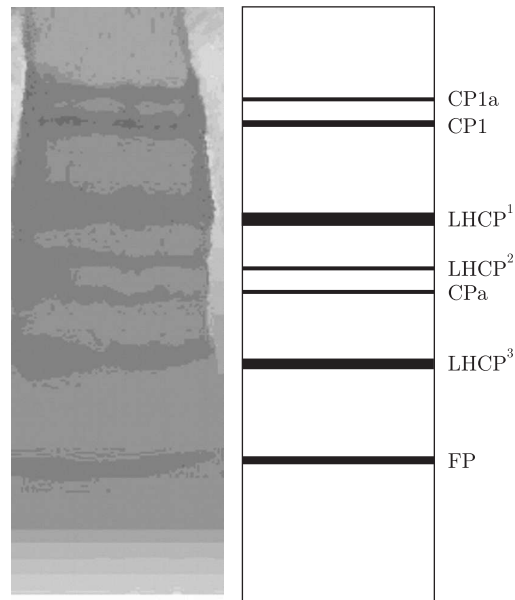


Рис. 3. Електрофореграма пігмент-білкових комплексів тилакоїдних мембран:
 CP1a — комплекс реакційного центру (РЦ) ФСІ, який частково зберігає власний світлозбиральний комплекс (СЗКІ); CP¹ — комплекс РЦ ФСІ без СЗКІ; LHCP¹ — олігомерна форма СЗКІІ; LHCP² — СЗКІ; CPa — найближчий до РЦ ФСІІ світлозбиральний пігмент-білковий комплекс; LHCP³ — мономерна форма СЗКІІ; FP — вільний хлорофіл

При порівнянні отриманих з баз даних послідовностей *D. antarctica*, які належать до родини PsbC (ABS30954; ABS30955; ABS30956; ABS30957; ABS30958), за допомогою програми ClustalW було встановлено, що вони ідентичні і є сиквенсом одного потенційного продукту. Аналіз доменної архітектури даного фрагмента за допомогою онлайн-ресурсу SMART підтвердив його належність до родини PsbC. Для послідовностей *D. antarctica*, які показані в статтях баз даних як фрагменти білка родини PsbG, визначити доменну архітектуру не було можливим, що пов'язано з їх малим розміром (30 амінокислотних залишків).

Для уточнення функції гіпотетичного продукту *D. antarctica*, до якого належить знайдений фрагмент, за допомогою інструменту BLASTp був проведений пошук гомологічних послідовностей у протеомах *A. thaliana* та *O. sativa*. У результаті були виділені амінокислотні послідовності NP051055 *A. thaliana* (ідентичність 97%, E-value 0,00) та NP039367 *O. sativa* (ідентичність 98, E-value 0,00). У статтях баз даних вони представлені як білки родини PsbC, що входять до складу антени ФСІІ і беруть участь у зв'язуванні хлорофілу та β -каротину і перенесенні енергії збудження до реакційного центру [11].

Множинне глобальне вирівнювання знайдених послідовностей *A. thaliana* та *O. sativa* з фрагментом виявило значний рівень консервативності даних білків (рис. 4). Структурована область цих білків включає в себе з 31 по 473 амінокислотні залишки. Досліджуваний фрагмент послідовності *D. antarctica* практично повністю збігається з послідовністю білків починаючи з 45 по 473 амінокислотний залишок. Винятком є позиції 106, 170, 177, 185, 245, 264, 427, 437, 463, де спостерігаються сильні заміни, на позиціях 207, 277, 470 була слаба заміна, на позиціях 242, 282, 468 збіг був відсутній. Можливо, саме сильні заміни спричиняють певні модифікації в структурі цього білка, що забезпечує ефективний механізм розсіяння надлишкової енергії для підтримання нормального перебігу фотосинтетичних процесів.

```

O. sativa      MKILYSLRRFYHVETLFGNFTLALAGRQDETTFPAWWAGNARLINLSGKLLGAHVAHAGLIVFWAGAMNLFVAHFVPEKPMYEQGLILLPHLATLGGVGPGEVDTFPYFVSGVLRHLISSAVLGFGG
D. antarctica -----LSGKLLGAHVAHAGLIVFWAGAMNLFVAHFVPEKPMYEQGLILLPHLATLGGVGPGEVDTFPYFVSGVLRHLISSAVLGFGG
A. thaliana    MKTLYSLRRFYHVETLFGNFTLALAGRQDETTFPAWWAGNARLINLSGKLLGAHVAHAGLIVFWAGAMNLFVAHFVPEKPMYEQGLILLPHLATLGGVGPGEVDTFPYFVSGVLRHLISSAVLGFGG
*****
O. sativa      TYHALIGPETLEESFPFFGYWKRDRNRMTTILGIHLILLGGAFLLVKALYFGGYDTWAPGGGDVRKITNLTLSRQVIFGYLLKSPFGEQWIVSVDLLEDTIGGHVWLGKICFGGIWHILTKPPA
D. antarctica TYHALIGPETLEESFPFFGYWKRDRNRMTTILGIHLILLGGAFLLVKALYFGGYDTWAPGGGDVRKITNLTLSRQVIFGYLLKSPFGEQWIVSVDLLEDTIGGHVWLGKICFGGIWHILTKPPA
A. thaliana    TYHALIGPETLEESFPFFGYWKRDRNRMTTILGIHLILLGGAFLLVKALYFGGYDTWAPGGGDVRKITNLTLSRQVIFGYLLKSPFGEQWIVSVDLLEDTIGGHVWLGKICFGGIWHILTKPPA
*****
O. sativa      WARRAIVWSGEAYLSYSLAALSVEFTACCFVWFNNTAYPSEFYGPTGPEASQAQAFTELVRDQRLGANVGSAGQPTGLGKYLMSRPTGVEVTPGGETMRFWDLRAPWLEPLRGNGLDLRLKDDIQPW
D. antarctica WARRAIVWSGEAYLSYSLAALSVEFTACCFVWFNNTAYPSEFYGPTGPEASQAQAFTELVRDQRLGANVGSAGQPTGLGKYLMSRPTGVEVTPGGETMRFWDLRAPWLEPLRGNGLDLRLKDDIQPW
A. thaliana    WARRAIVWSGEAYLSYSLAALSVEFTACCFVWFNNTAYPSEFYGPTGPEASQAQAFTELVRDQRLGANVGSAGQPTGLGKYLMSRPTGVEVTPGGETMRFWDLRAPWLEPLRGNGLDLRLKDDIQPW
*****
O. sativa      QBRRSAEYMTTHAPLGLSLSVGGVATEINAVNYVSPRSWLTSHFVLGFFVGHILWHAGRARAAAAAGFEKGI DRLDFVLSKPLN
D. antarctica QBRRSAEYMTTHAPLGLSLSVGGVATEINAVNYVSPRSWLTSHFVLGFFVGHILWHAGRARAAAAAGFEKGI DRLDFVLSKPLN
A. thaliana    QBRRSAEYMTTHAPLGLSLSVGGVATEINAVNYVSPRSWLTSHFVLGFFVGHILWHAGRARAAAAAGFEKGI DRLDFVLSKPLN
*****

```

Рис. 4. Порівняння амінокислотних послідовностей білкових фракцій ФСII *D. antarctica*, *A. thaliana* та *O. sativa*

Таким чином, встановлено особливості ліпідного складу фотосинтетичних мембран рослин *D. antarctica*. Виявлено кількісні відмінності в загальному вмісті СЗК II (олігомерній та мономерній формах), вмісті хлорофілу в зоні СРа, що відповідає пігмент-білковим комплексам ближньої антени.

Результати глобального вирівнювання та доменної архітектури показали, що проаналізований фрагмент амінокислотної послідовності білкової фракції ФСII *D. antarctica* має високу схожість до послідовностей *A. thaliana* та *O. sativa*, які належать до родини білків PcbC, а отже, є фрагментом продукту гена родини psbC. Також можна зазначити, що в даному фрагменті відсутня С-кінцева частина послідовності, яка за розміром відповідає одному чи декільком ексонам.

Робота виконана за підтримки Фонду фундаментальних досліджень МОН України, тема № Ф25/136-2008.

1. Convey P. Plants as indicator of environmental change in the Antarctic peninsula region // Intern. Antarctic Conf.: Ukraine in Antarctica. – National priorities and global integration. – Kyiv, 2008. – P. 40.
2. Жученко А. А. Стратегія адаптивної інтенсифікації сільського господарства (концепція). – Пуціно: ОНТИ ПНЦ РАН. – 1994. – 148 с.
3. Кур'яченко С. С., Козарецька І. А., Ракуса-Суцєвські С. *Deschampsia antarctica*: генетичні та молекулярно-біологічні аспекти поширення в Антарктиці // Цитология и генетика. – 2005. – № 4. – С. 75–80.
4. Gielwanowska I., Szczuka E. New ultrastructural features of organelles in leaf cells of *Deschampsia antarctica* Desv. // Polar Biol. – 2005. – 28. – P. 951–955.
5. Яковенко Г. М., Михню А. И. Метод выделения и разделения по классам липидов листьев и хлоропластов растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 1971. – 3, № 6. – С. 651–656.
6. Anderson J. M. P-700 content and polypeptide profile of chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids // Biochim. et biophys. acta. – 1980. – 591. – P. 113–126.
7. Arnon D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* // Plant Physiol. – 1949. – 24, No 1. – P. 1–154.
8. Топчий Н. М., Сиваш О. О. Структурно-функціональні характеристики фотосинтетичного апарату гороху (*Pisum sativum* L.) в умовах варіації спектрального складу світла в червоному діапазоні // Укр. бот. журн. – 2005. – 62, № 4. – С. 581–588.
9. Nixon P. J., Gounaris K., Coomber S. A. et al. psbG is not a photosystem two gene but may be an ndh gene // J. Biol. Chem. – 1989. – 264, No 24. – P. 14129–14135.
10. Lucicski R., Jackowski G. The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II // Acta biochim. pol. – 2006. – 53, No 4. – P. 693–708.
11. Barber J. Photosystem II: a multisubunit membrane protein that oxidises water // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2002. – 12, No 4. – P. 523–530.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 14.07.2008

N. Yu. Taran, O. A. Okanenko, I. P. Ozheredova, I. A. Kozerets'ka,
N. B. Svetlova

**Particularity of the lipid components and pigment-protein complexes of
Deschampsia antarctica Desv. photosynthetic membranes**

The molecular analysis results of pigment-proteins complexes and the lipid composition of photosynthetic membranes of Deschampsia antarctica plants, one of the native representatives of the Antarctic region, are presented. The bioinformatics search of proteins related to the structure and function of plastids is executed. The Arabidopsis thaliana and Oryza sativa japonica homolog search submitted in free databases is also performed. The results of comparative analysis of primary sequences of the known and potential products are presented.