



УДК 577.113.5

ФОТСИСТЕМА II РЖИ. НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ГЕНОВ *psbB* И *psbH*, КОДИРУЮЩИХ 47-кДа
ХЛОРОФИЛЛ(а)-СВЯЗЫВАЮЩУЮ И 10-кДа
ФОСФОРИЛИРУЮЩУЮСЯ СУБЪЕДИНИЦЫ

Бухаров А. А., Голосов В. Л., Золотарев А. С.,
Абдулаев Н. Г.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Клонирование фрагмента хлоропластной ДНК ржи, выделенной с использованием безводного метода очистки хлоропластов, позволило установить структуру генов *psbB* и *psbH*, которые кодируют белковые субъединицы фотосистемы II — 47-кДа хлорофиллсвязывающий белок (СР_а-1) и 10-кДа фосфобелок, а также двух открытых рамок считывания — ОРС38 и ОРС43, расположенных на противоположных цепях ДНК между генами *psbB* и *psbH* и кодирующих гидрофобные пептиды с сильно заряженными С-концевыми сегментами. Сравнение выведенных из структуры ДНК аминокислотных последовательностей продуктов этих генов с соответствующими структурами различных видов растений (а в случае продукта гена *psbB* — и со структурой цианобактерии *Synechocystis*) позволило обнаружить консервативные аминокислотные остатки и участки полипептидных цепей, которые, вероятно, участвуют во взаимодействии с другими субъединицами фотосистемы II и в связывании молекул хлорофилла. Обсуждается структура пептидов, кодируемых двумя ОРС, и их возможная функция в тилакоидной мембране.

Фотосистема II (ФС II) растений является пигмент-белковым комплексом тилакоидных мембран хлоропластов и функционирует в качестве Н₂О₂: пластохинон-оксидоредуктазы. Часть белковых компонентов этого комплекса кодируется генами клеточного ядра. Структуры остальных компонентов закодированы в генах, содержащихся в кольцевой хромосоме хлоропластов.

Процесс окисления воды осуществляется при участии по меньшей мере трех периферических мембранных белков ФС II, кодируемых в клеточном ядре [1]. Поглощение квантов света, первичное разделение зарядов и восстановление пластохинона осуществляют интегральные мембранные белки, образующие «ядро» ФС II. Препараты «ядра» ФС II, полученные из кислородвыделяющих фотосинтезирующих организмов различных групп (цианобактерии, зеленые водоросли, высшие растения) и способные эффективно осуществлять фотовосстановление при добавлении экзогенных доноров и акцепторов электронов, содержат практически идентичный набор полипептидов, указывая на то, что этот надмолекулярный комплекс является стабильной структурной и функциональной единицей [2, 3]. В его состав входит не менее шести полипептидов, кодируемых ДНК хлоропластов (хлДНК).

Ген *psbA* кодирует гербицидсвязывающий 32-кДа белок, известный также как белок D1, ген *psbB* — 47-кДа белок, содержащий хлорофилл а (Chl_a), ген *psbC* — 43-кДа Chl_a-содержащий белок, ген *psbD* — 32-кДа белок, обозначаемый D2, и два гена — *psbE* и *psbF* — кодируют 10-кДа и 4-кДа полипептиды цитохрома *b*₅₅₉.

Недавно было показано, что в состав ФС II входит также 10-кДа фосфобелок, который при мягкой обработке тилакоидов детергентами относительно легко отделяется от белков «ядра» [4, 5]. Ген этого белка —

Сокращения: ФС II — фотосистема II, хлДНК — хлоропластная ДНК, Chl_a — хлорофилл а, ОРС — открытая, рамка считывания, НК — нуклеиновая кислота.

psbH — расположен на хлДНК рядом с геном *psbB* [6] и транскрибируется вместе с ним и двумя генами полипептидов *cyt b₆/f*-комплекса в виде длинного полицистронного транскрипта [7, 8].

На основании ряда работ считалось, что продукт гена *psbB* — 47-кДа белок — является местом, где протекают первичные фотохимические реакции [9—11]. Однако в последнее время появились данные, что фотореакционный центр локализуется на комплексе белков D1, D2 [12—14]. Таким образом, вопрос о функции, которую выполняет в ФС II белок 47-кДа, остается пока невыясненным. Модификация гена *psbB* путем встраивания в его кодирующую последовательность чужеродного фрагмента ДНК приводит к полной потере активности ФС II [15]. На основании экспериментов с кросс-сшивающими реагентами сделан вывод, что 47-кДа белок служит местом прикрепления 33-кДа белка кислородвыделяющего комплекса [16]. Кроме того, предполагается, что наряду с 43-кДа Chl_a-содержащим белком 47-кДа белок является внутренней светособирающей антенной ФС II и, возможно, участвует в связывании пластохинона [17].

Известно, что ряд интегральных мембранных белков хлоропластов, наименьший из которых имеет вес 10 кДа [5], фосфорилируется *in vivo* тилакоидсвязанной АТР-зависимой киназой (киназами). 10-кДа полипептид выделен в гомогенном виде, что позволило установить его N-концевую аминокислотную последовательность [4, 18] и локализовать ген этого фосфобелка на хлДНК [6, 19]. Предполагается, что возможная функция этого белка заключается в АТР-зависимом ингибировании фотосинтетического электронного транспорта [20].

В ходе работы по изучению белков фотосинтетических реакционных центров нами были проклонированы гены всех полипептидов «ядра» ФС II ржи и определены их нуклеотидные последовательности [21—23]. В данной работе описано определение нуклеотидной последовательности кластера генов *psbB* и *psbH*. Результаты изучения структур остальных генов будут опубликованы позже.

Традиционные методы получения хлДНК основаны на выделении из растительного материала фракции чистых интактных хлоропластов [24]. Для эффективной гомогенизации листьев с прочными клеточными стенками, в частности листьев злаков, приходится применять достаточно жесткие условия, при которых неизбежно повреждается большая часть хлоропластов. Поэтому для выделения хлДНК пшеницы был предложен метод растирания и фракционирования растительного материала в безводной среде [25]. Этот метод был использован нами для выделения хлДНК ржи.

После лиофилизации измельченных в жидком азоте листьев получали порошок, содержание хлорофилла в котором составляло 8—9 мг/г, а масса — приблизительно $\frac{1}{10}$ исходной массы листьев.

После тщательного растирания порошка в смеси гексан/четырёххлористый углерод и фильтрации образовавшейся суспензии в фильтрате получали не более 50% хлорофиллсодержащего материала. Для более полного извлечения хлоропластов из перетираемого материала, а также для того, чтобы исключить существенное изменение плотности смеси растворителей, наблюдавшееся при длительном растирании и связанное с преимущественным испарением из нее гексана, стадию перетирания модифицировали (см. «Экспериментальную часть»). После центрифугирования фильтрата в ступенчатом градиенте плотности смеси гексан/четырёххлористый углерод наблюдались две образованные хлорофиллсодержащими частицами зоны — компактная верхняя (на границе ρ 1,33/1,05 г/см³) и диффузная нижняя (на границе ρ 1,40/1,33 г/см³), кроме того, прозрачная нижняя ступень была обычно окрашена в интенсивно зеленый цвет.

Микроскопическое исследование содержимого различных фракций градиента показало, что верхняя зона была плотной взвесью округлых светло-зеленых частиц одинакового размера (8—10 мкм), очевидно, интактных хлоропластов. Содержание хлорофилла в этой зоне составляло 2—2,5% от исходного.

Рис. 1. Электрофорез в 0,4% агарозном геле *Bam*HI-фрагментов хлоропластной ДНК пшеницы (1), ржи (3), и *Eco*RI-фрагментов фага λ (2) (слева приведены их размеры, т. п. о.). B11, B15 — фрагменты хлДНК ржи, содержащие части гена *psbB*

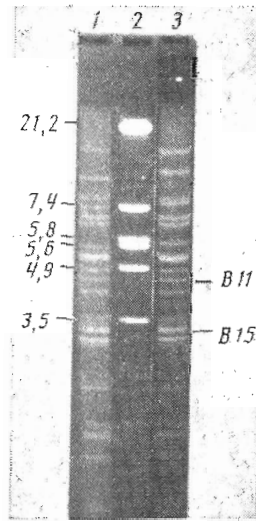


Рис. 1

Рис. 2. Рестриктивная карта *Bam*HI — *Bam*HI-фрагмента (B15 + B11) хлДНК ржи длиной около 7,8 т. п. о. и стратегия секвенирования области, включающей гены *psbB* и *psbH*. Кодированные области генов зачернены, стрелки указывают направление и протяженность индивидуальных синкленсов

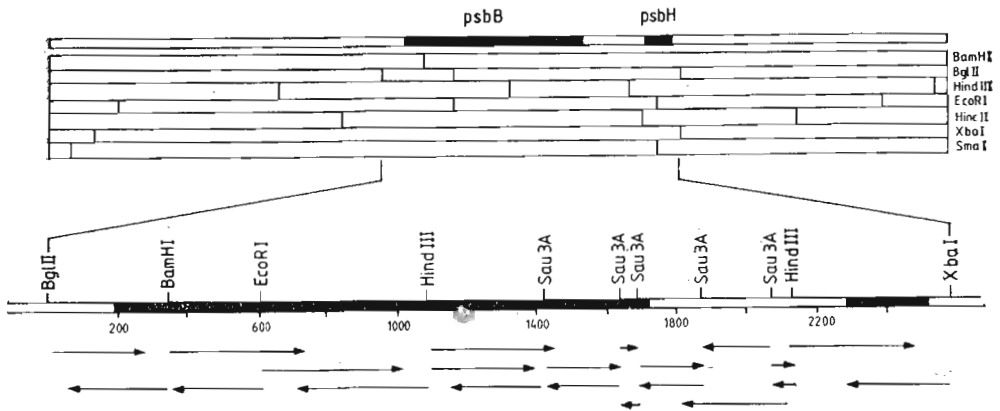


Рис. 2

Содержимое нижней зоны представляло собой гетерогенную взвесь сильно варьирующих по размеру зеленых и бесцветных частиц неправильной формы, являвшихся, очевидно, смесью раздавленных при растирании хлоропластов и небольшого количества фрагментов клеточной стенки. Содержание хлорофилла в этой зоне составляло 7,5—8% от исходного.

Нижняя ступень градиента была раствором экстрагированного из поврежденных хлоропластов хлорофилла. При очень мягком растирании удавалось получить почти неокрашенную нижнюю ступень градиента, но при этом сильно уменьшался выход хлоропластов.

Вообще выход хлоропластов определялся в основном двумя факторами — условиями выращивания растений и техникой перетирания лиофилизованного порошка. Было замечено, что при максимальной оптимизации процедуры перетирания и единообразии ее проведения из растений, выращенных при 25° С и выше, выделяется значительно меньше интактных пластид, чем из растений, выращиваемых при температуре ниже 20° С.

Поскольку содержание хлорофилла в растениях, выращенных при разных температурах, практически одинаково, малый выход «высокотемпературных» пластид связан, видимо, с тем, что большая часть таких хлоропластов не выдерживает условий перетирания и/или центрифугирования и повреждается, давая на градиенте интенсивно окрашенную нижнюю ступень, мощную нижнюю и едва заметную верхнюю зоны.

По сравнению с пшеницей из такого же количества порошка ржи у нас выделялось примерно в 2—2,5 раза меньше интактных хлоропластов. Отчасти это можно объяснить более низким содержанием хлорофилла (8—9 мг/г) и соответственно хлоропластов во ржи по сравнению с пшеницей (12—14 мг/г). Кроме того, хлоропласты ржи в наших экспериментах отличались большей повреждаемостью при растирании.

Средний выход суммарной нуклеиновой кислоты (ДНК + РНК) из 1 г лиофилизированных листьев составлял 200 ± 50 мкг, что соответствует 20—25% от описанного для пшеницы [25]. Доля ДНК в таком препарате составляла у ржи 2—3%.

Электрофоретический анализ материала, обработанного рестриктазами, чувствительными к метилированию ДНК [26], показал, что количество ядерной ДНК в нем не превышало 5—10%.

После проведения блот-переноса в двух направлениях полученные нитроцеллюлозные реплики гибридизовали с олигонуклеотидными зондами, синтезированными на основании известной структуры гена *psbB* шпината [27]. Последовательности зондов соответствовали двум участкам гена длиной 45 п. о. каждый, расположенным по разные стороны внутреннего *Vam*III-сайта (нуклеотиды 258—263 шпинатной последовательности): зонд Б — нуклеотиды 22—66, зонд А — нуклеотиды 814—858. С помощью блот-гибридизации было установлено, что ген *psbB* ржи расположен в двух *Vam*III-фрагментах: 5'-концевая часть гена, гибридизующаяся с зондом Б, во фрагменте В15 (3,25 т. п. о.), а 3'-концевая, гибридизующаяся с зондом А, в В11 (4,55 т. п. о.) (рис. 1).

Вырезанные из легкоплавкой агарозы фрагменты лигировали в векторы pUC8 и pTZ19R. Для полученных рекомбинантных плазмид pUsecB11 и pTsecB15, несущих фрагменты хлДНК В11 и В15, были построены рестриктные карты и намечена стратегия секвенирования области хлДНК, в которой, как показано для ряда растений [8, 28, 29], расположены гены *psbB* и *psbH* (рис. 2).

В ходе секвенирования отдельных фрагментов обнаружилась чрезвычайно высокая гомология нуклеотидной последовательности ржи и опубликованной в это время последовательности соответствующего района хлДНК кукурузы [28], что позволило на первом этапе работы стыковать участки с уже определенной последовательностью, используя нуклеотидную последовательность кукурузы. Затем, при прохождении фрагментов, полученных с помощью других рестриктаз, стыки перекрывались.

Таким образом, была определена нуклеотидная последовательность фрагмента хлоропластной ДНК ржи размером 2579 п. о. (рис. 3).

Анализ последовательности обнаружил четыре открытые рамки считывания (ОРС), три из которых, длиной 1524, 114 и 219 п. о., расположены одна за другой на приведенной на рис. 3 цепи хлДНК, а четвертая, длиной 129 п. о., находится на обратной цепи между двумя последними. Две наиболее протяженные рамки являются генами *psbB* (1524 п. о.) и *psbH* (219 п. о.), а две другие гомологичны недавно обнаруженному в хлДНК печеночного мха *Marchantia polymorpha* транскрибируемому ОРС35 и ОРС43 [30].

Сравнение нуклеотидной последовательности генов *psbB* ржи и кукурузы [28] (не показано) — единственного растения из класса однодольных, для которого была известна структура *psbB*, — демонстрирует высокую консервативность этой структуры. Из 1524 нуклеотидов заменены лишь 54 (гомология — 96,5%), причем только 8 замен являются значащими и ведут к изменению аминокислотных остатков. При сравнении с последовательностью шпината [27] — представителя двудольных растений — количество обнаруживаемых нуклеотидных замен возрастает до 193 (гомология 87,3%), 32 из них — значащие.

Ген *psbB* ржи кодирует полипептид длиной 508 аминокислотных остатков (*M* 56127 Да) выраженной гидрофобной природы (таблица), являющийся апопротеином 47-кДа *Chl_a*-содержащего белка.

Анализ профилей гидрофобности, рассчитанных с помощью двух раз-

1 AGATCTGCTTCTCTTTCTTATGAACAGAATTGGCTTCTTATTTTAAATGGAATGAAATAAATATTCG
71 CGCTTTCTGACACAGAAATCCCTAGAAAGGTTAGGTACATAGGATATGGATAGTCTTTTCAATGCGATA
141 AAATAAAGCGACATCGTGTCTATTTTCTTTGCTAAAGGGTATTTCCATGGCTTGCCTTGGTATCGTG
211 TTCATACTGTCTGATTTGAATGATCCGGGTGATTTGCTTGGGTGCATATAATGCACACAGCTCTAGTTTC
281 TGGTTGGGCTGGTCAATGGCTTTATACGAATTAGCAGTTTTTGATCCCTCTGATCCTGTTCTGGATCCA
351 ATGTGGAGACAAGGTATGTTCTGTAATCCCTTCATGACTCGTTTAGGAATAACGGATTCGTGGGGTGGTT
421 GGAGTATTTCAGGAGGAACTGTAACAAATCCGGGTATTTGGAGTTATGAAGGTGTGCAGGTACGCATAT
491 TGTGTTTTCTGGCTTGTGTTTTCTGGCAGCGATCTGGCATTTGGGTATATTTGGACCTAGAAATATTTCTCT
561 GATGAGCGGACGGGAAAAACCCTCTTTGGATTTGCCAAGATCTTTGGAATTCATTTATTTCTTGCAGGGG
631 TGCCTTGTCTTTCGCTTTGGGGCATTTTCATGTAACGGTTTTGTATGGCCCTGGGATATGGGTATCCGATCC
701 TTATGGACTAACTGGAAAAAGTACAAGCTGTAATCCAGCCTGGGGTGCAGAAAGTTTGTATCCTTTGT
771 CGGGGGGAATAGCTTCTCATATATGCTGCGGGTACATTTGGGTATATTTAGCGGGCTTATTCATCTTA
841 GTGTCCGTCGGCTCAACGTCTATATAAAGGATTACGTATGGGTAATATTTGAAACTGTACTTTCCAGTAG
911 TATCGCTGCTGTTTTTTTTGCGAGCTTTCGTAGTTCGTGGAACTATGTGGTATGGGTGAGCAACGACCCCA
981 ATCGAATATTTGGGCTACTCGTTATCAGTGGGATCAGGGTACTTTTTCAGCAAGAAATATATCGAAGAG
1051 TTAGCAATGGTTAGCCGAAATCTTAGTTTATCAGAAGCTTGGTCTAAATTTCCCGAAAAATTAGCCTT
1121 TTATGATATATTTGGTAATAATCCGGCAAAAGGGGATTTATTCAGAGCAGGCTCAATGGACAATGGGGAT
1191 GGAATAGCTGTGGATGGTTAGGACATCCCGTCTTTAGAGATAAAGAAGGACGTGAGCTTTTTTGTACGCC
1261 GTATGCCTACTTTTTTTGAAACATTTCCGGTCTTTTGGTATAGTAGGAGGGAATGTTTACAGCAGACCT
1331 TCCTTTTAGAAGAGCAGAATCCAAATATAGTGTGAACAAGTAGGCGTAACGGTGGAGTCTATGCTGGC
1401 GAACTTAATGGAGTAAAGTTATCTGTATCCTGCTCTGTGAAAAAATATGCGAGGCGTTCCTCAATTAGGGG
1471 AAATTTTTGAATTAGACCGGGCTACTTTGAAATCTGATGGTGTTTTTTCCGAGCAGTCCAAGGGGTGGTT
1541 CACTTTTGGTCAATGCTACCTTTGCTTTGCTCTTCTTTTTCCGACACATTTGGCATGGCGTAGAACATTG
1611 TTCCGAGATGTTTTTGGCTGGTATTTGATCCAGATTTGGATCCTCAAGTGGAAATTTGGAACATTTCCAAAAAG
1681 TGGGAGATCCAACTACAAGGAAACAGGCAGTCTGATACACATTTGTTATAGTATCTTTCACTCTGCTTTTT
1751 TGATTTGACATGGGAAACATCTCCCATCCTTTCTTTGACTCTTTTTCTTTCTTTATATGGGAAATATCC
1821 CAAATGACAAATGAATAGGCTGGAAGTTATAATTCGTAATAAACCCAGGATCGAATCTATGGAAGCATTG
1891 CTTTATACGTTCTTTTACTTTGACTTTAGGGATAATTTTTTTGCTATCTTCTCCGAGAACCACCTA
1961 AGGTTCCACCCTCAACTCCAACTAAAAGAAATAAAATAATTTCAATTTAAGTAAAGAGTCTCCAGATAGGGGA
2031 CTCTTACTTAAATTAGTCTCCGTGTTCTTCGAATGGATCTCTTAATTCCTGAGAGGGTTGCCCAACGCG
2101 GGTATATAAGGCATACCCAGTAAAGCTTACAAGTAAACCACATATGGAGATGGCGACTAAAGTTGCTGTT
2171 TCCATTTTTATAGAATTTCAAGATTACAATGGATCTACGAAAAGATCGTGTATTTACAACACAAACGGAA
2241 TAGTATACAAAAGTCAACACCAATGATTAATAACAATTTATGGCTACAGAAAACCGTTGAAGATAGTTCTAA
2311 ACCTAGGCCAAAACGAACTGCTGCAGGTAGTTTACTGAAAACCTTGAATTCGGAATATGGGAAAGTCCGC
2381 CCGGGTTGGGGACTACTCCTTTTATGGGGTCCGAATGGCTTTAATTCGTATATTTCTATCTATCATTT
2451 TAGAAATTTATAATCTCTCCGTTTTACTGACGGAAATTTAACCAAATTAAGTTTCTACTAACTAAACCTA
2521 GGAAGTCAGAGTTTTTCCATCCAAAAAGCCTTTCTAGTTAAGATCTACATTTCTAGA

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность фрагмента хлДНК ржи, содержащего гены *psbB* (189—1712), *psbH* (2279—2497), *ОРС38* (1879—1992) и *ОРС43* (2175—2047). Подчеркнуты иницирующие и стоп-кодны, а также потенциальные участки связывания рибосом. Встречными стрелками обозначены инвертированные повторы

Основные характеристики генов фрагмента хлДНК ржи и кодируемых ими полипептидов

Характеристика	Ген			
	<i>psbB</i>	<i>psbH</i>	<i>ОРС38</i>	<i>ОРС43</i>
Ген:				
длина (п. о.)	1524	219	114	129
GC (%)	43,2	40,6	35,0	42,4
Полипептид:				
длина (а. о.)	508	73	38	43
M_r	56127	7787	4382	4662
pI	6,34	8,58	10,02	4,01
Заряд (pH 7)	-4,78	0,92	2,91	-3,92
Аминокислоты*:				
основные (K, R)	41 (8,1)	6 (8,2)	5 (13,2)	1 (2,3)
кислые (D, E)	48 (9,4)	5 (6,8)	2 (5,3)	5 (11,6)
полярные (C, N, Q, S, T, Y)	98 (19,3)	19 (26)	6 (15,8)	13 (30,2)
гидрофобные (A, F, I, L, V, W)	208 (40,9)	28 (38,4)	18 (47,4)	16 (37,2)
другие (G, H, M, P)	113 (22,2)	15 (20,6)	7 (18,4)	8 (18,6)

* Приведено число аминокислотных остатков, в скобках — их процентное содержание.

личных алгоритмов [31, 32], позволяет выделить 6 участков полипептидной цепи, являющихся потенциальными трансмембранными α -спиральными сегментами (рис. 4). На рис. 4 приведены аминокислотные последовательности продуктов *psbB* гена нескольких видов цветковых растений, печеночного мха и цианобактерии, расположенных в порядке убывания гомологии с последовательностью ржи. Отчетливо выражена высокая консервативность структуры 47-кДа полипептида. Степень структурной гомологии, обнаруживаемая при сравнении даже с таким эволюционно далеким от ржи организмом, как цианобактерия *Synechocystis* 6803, достигает 75,8%, причем большинство аминокислотных замен консервативно.

Все 14 остатков His полипептидной цепи продукта *psbB*-гена ржи абсолютно консервативны, причем 12 входят в состав предполагаемых трансмембранных сегментов, а 10 организованы в группы с одинаковой структурой: His-(13 а. о.)-His. Существует предположение, что такая структура, возможно, участвует в связывании молекул хлорофилла с 47-кДа полипептидом [33].

Кроме гистидинов абсолютно консервативны также остатки Met и Thr, что указывает на их функциональную значимость в рассматриваемой структуре. Поскольку известно, что с «ядром» ФС II связано около 50 молекул Chl_a [33, 34], а общее количество остатков His в двух Chl_a -связывающих полипептидных цепях (белки 47 и 43 кДа) лишь 27, можно предположить, что консервативность остатков Thr обусловлена их участием наряду с His в связывании молекул хлорофилла.

Сравнение степени гомологичности аминокислотных последовательностей продуктов гена *psbB* из различных организмов и анализ замен в некоторых позициях полипептидной цепи (позиции 20, 31, 81, 87, 146, 180, 374, 471 (рис. 4)) позволяют заключить, что хлоропласты двудольных растений в эволюционном отношении находятся относительно ближе к цианобактериям, чем хлоропласты однодольных.

Сравнение структур продуктов гена *psbB* ржи и *Synechocystis*, наиболее информативное в смысле выявления самых консервативных и, следовательно, функционально значимых участков полипептидной цепи, обнаруживает три такие области: 1) N-концевая последовательность, включающая первый предполагаемый трансмембранный сегмент (всего около 50 а. о.), в которой 19-членный внемембранный участок абсолютно консервативен, а 4 замены в трансмембранной области представляют собой замены Leu \rightarrow Ile, Ile \rightarrow Leu и Ala \rightarrow Ser, Ser \rightarrow Ala; 2) последовательность пятого предполагаемого трансмембранного участка с примыкаю-

		70.
1	MGLPWYRVHTVVLNDPGRLLAVHIMHTALVSGWAGSMALYELAVFDPSDPVLDPMWRQGMFVIPPMTRLG	
2S.....	
3S.....A.....	
4IS.....A.....	
5I.....L.....	
6IS.....L.....A.....I.....S.....A.....N.....L.....A.....	
	----- -----	
		140.
1	ITDSWGGWSISGGTVTNPPIGWSYEGVAGTHIVFSGLCFLAAIWHWVYVDLEIFSDERTGKPSLDLPKIFG	
2	..N.....A.....C.....	
3	..N.....T.....A.....C.....	
4	..N.....T.....I.....D.....S.....A.....M.....	
5	..K.....T.....E.....A.....AV.....L.....L.....L.....R.....	
6	V.S..N...VT.E.GLD..F..F...AA..L..L...V...F...L.V.P...ESA...M..	
	----- -----	
		210.
1	IHLFLAGVACFGFGAFHVTGLYGPGIWVSDPYGLTGKVAQVNPAAWGAEGFDPFVPGGIASHHIAAGTIGI	
2P.....V.....	
3S.....P.....CS.....V.....R.....	
4S.....L.....A.....F.....I.....P.....A.....I.....	
5S.....L.....L.....L.....VW.....M.....H.....P.....A.....E.....PA.....N.....N.....VVA.....IV..	
6S.....L.....L.....L.....VW.....M.....H.....P.....A.....E.....PA.....N.....N.....VVA.....IV..	
	----- -----	
		280.
1	LAGLFHLSVRPPQRLYKGLRMGNIEVLISSIAAVFFAFAFVAVAGTMWYGSATTPIELFGPTRYQWDQGYF	
2	
3	
4S.....	
5T.....E.....A.....V.....A.....F.....	
6	I.....T.....E.....A.....V.....A.....N.....K.....	
	----- -----	
		350.
1	QQEIYRRVSNGLAENLSISEAWSKIPEKLAFYDYIGNNPAKGGLFRAGSMDNGDGIAVGWLGHVPFRDKE	
2D.....	
3A.....Q.....I.....	
4A.....Q.....F.....I.....	
5D.....IRSSK.....A.....K.....	
6	..E..Q...DSQ..GA...T...AA...V..S...T.A.NS...QE.I..I.K..	
	----- -----	
		420.
1	GRELFVRRMPTFFETFPVVLVDEEGIVRADVPFRRAESKYSVEQVGVTVFVYGGELNGVSYSDPATVVKKY	
2GD.....	
3I.....GD.....	
4	..N.....Q.....D.....F.....	
5	..E.....N.....IMT.AD.V...I...S...F...T...S...A.D.QTF.N.SD...F	
6	..E.....N.....IMT.AD.V...I...S...F...T...S...A.D.QTF.N.SD...F	
	----- -----	
		490.
1	ARRSQLGEIFELDRATLKSDGVFRSSPRGWFTFGHATFALLFFFGHIWHGARTLFRDVFAGIDPDLDAQV	
2A.....	
3A.....	
4A.....S.....S.....V.....	
5A.....F.....	
6	..KA...G.DF.TE.FN...T...V...S...V.G.EE..	
	----- -----	
		500.
1	EFGTFFQKVGDPTRKQAV*	
2R..A*	
3	..A...L...KR..A*	
4	..A...I...R.G.*	
5	..A...L...KR.VI*	
6	..V.A...IS...E.*	

Рис. 4. Сравнение аминокислотной последовательности продукта гена *psbB* ржи (*Secale cereale*) (1) с последовательностями кукурузы (*Zea mais*) [28] (2), табака (*Nicotiana tabacum*) [29] (3), шпината (*Spinacia oleracea*) [27] (4), мха (*Marchantia polymorpha*) [30] (5) и цианобактерии (*Synechocystis* 6803) [15] (6). Вертикальными штрихами указаны остатки His. Предполагаемые трансмембранные сегменты подчеркнуты

щими к нему районами (в целом около 60 остатков) и 3) около 40 аминокислотных остатков, включающих шестой трансмембранный сегмент.

Гораздо менее консервативна аминокислотная последовательность продуктов гена *psbH* (рис. 5). Этот полипептид длиной 73 аминокислотных остатка (у *M. polymorpha* — 74) (таблица) наиболее изучен из нескольких белков ФС II, которые в условиях, способствующих восстановлению тилакоидного пластохинона, фосфорилируются мембраносвязанной протеинкиназой. Показано, что кодируемый геном *psbH* фосфобелок

					40.
	1	MATQTVEDSSKPRPKRTGAGSLLKPLNSEYGVAPGWGTT			
	2R.K.....			
	3N.RSG.R.AV.D.....			
	4S.RS...P.TV.A.....K.....R....			
	5IID.TP.TKG.KS.I.DI.....			
					70.
	1	PFMGVAMALFAIFLSIILEIYNSSVLLDGILTN*			
	2*			
	3L.....V.....SM.*			
	4L.....V.....SM.*			
	5L..IM.....V..VV...L.....VSVSW*			
					40.
б	1	METATLVAISISGLLVSTFGYALYTAFGQPSQLRDPFEEHGD*			
	2*			
	3F.....*			
	4F.....*			
	5P...F..C..I.....NE.....E.*			
					30.
в	1	MEALVYTFLLVSTLGIIFFAIFFREPPKVPPTPTKRIK*			
	2K*			
	3KN*			
	4IS.....K*			
	5G.....S.GK.*			

Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей продуктов гена *psbH* (а), OPC43 (б), OPC38 (в) с соответствующими последовательностями других видов растений (обозначения — как на рис. 4).

Дефисами обозначены делеции. Подчеркнуты предполагаемые трансмембранные сегменты

подвергается процессингу, в результате которого удаляется N-концевой Met, и что фосфорилируемым остатком является Thr₃ [18].

Анализ аминокислотной последовательности выявляет единственный вероятный трансмембранный сегмент — остатки 37—58. Отличающийся значительной вариабельностью структуры 36-членный N-концевой участок, экспонированный предположительно на стромальной поверхности тилакоидной мембраны [6, 35], несет большое количество заряженных групп. Определенная недавно структура N-концевой области 9-кДа фосфобелка из *Chlamidomonas reinhardii* [36] при значительных отличиях от структур растений (протяженные вставка и делеция) демонстрирует полное сохранение количества и знака заряженных групп, а также непосредственного окружения фосфорилируемого остатка Thr. Интересно, что последовательность фосфобелка шпината отличается от всех прочих увеличением числа положительно заряженных и уменьшением числа отрицательно заряженных групп в N-концевой области полипептидной цепи [27]. Заряд N-концевого района фосфобелка шпината составляет +6, а общий заряд всей цепи — около +4, в то время как у продуктов гена *psbH* остальных изученных растений суммарный заряд цепи близок к нулю, а заряд N-концевого участка варьирует в пределах +2 — +3.

Нуклеотидная последовательность гена *psbH* представляет пока единственную возможность провести сравнение нуклеотидных структур хлДНК ржи и пшеницы. Сравнение известной последовательности *psbH*-гена и фланкирующих участков хлДНК пшеницы [6] с соответствующей последовательностью хлДНК ржи демонстрирует чрезвычайно высокую степень гомологии двух структур. Из 322 нуклеотидных остатков района, кодирующего достаточно вариабельную, как было отмечено выше, аминокислотную последовательность 10-кДа фосфобелка, заменен лишь один. В результате этой замены стоп-кодоном *psbH*-гена ржи служит триплет TAA в отличие от TAG у пшеницы.

Полипептиды, кодируемые двумя небольшими ОРС, находящимися на противоположных цепях хлДНК в промежутке между *psbB*- и *psbH*-генами, демонстрируют значительную консервативность первичной структуры в разных группах растений (рис. 5).

Оба полипептида построены по одинаковой схеме: короткий (2—4 аминокислотных остатка), несущий один отрицательный заряд N-концевой участок; обогащенный гидрофобными остатками трансмембранный сегмент (21—25 остатков) и обогащенный заряженными аминокислотными остатками 12—15-членный С-концевой участок. При этом структуры предполагаемых трансмембранных сегментов гомологичны, а знаки зарядов С-концевых участков противоположны. В целом полипептидные продукты двух ОРС представляют собой своеобразные пронизывающие мембрану булавоподобные структуры с сильно, притом противоположным образом заряженными головками.

Полипептид ОРС38 ржи отличается от соответствующих полипептидов других растений трипептидной вставкой Pro-Thr-Pro в С-концевой области. То, что определяющая это отличие 9-нуклеотидная вставка не привела к изменению общей схемы построения продукта ОРС (в частности, почти не изменились его длина и количество одноименных зарядов в С-концевом участке), свидетельствует о функциональной значимости такой структуры.

Консервативность структур расматриваемых пептидов, расположенные кодирующих их ОРС вблизи генов *psbB* и *psbH* ФС II, а также характер транскрипции этих ОРС, согласованный с транскрипцией *psbB*- и *psbH*-генов [30], служат косвенным указанием на то, что эти пептиды, возможно, являются компонентами ФС II. В связи с этим возникает вопрос об их функции.

Можно предположить, что полипептидные продукты двух ОРС являются регуляторным элементом ФС II, модулирующим протекающий в ней светоиндуцируемый процесс трансмембранного переноса электронов.

Анализ распределения заряженных аминокислотных остатков в гидрофильных сегментах полипептидных цепей, образующих ФС II (продукты генов *psbB*, *psbC*, *psbH*, *psbE*, *psbF*, *psbA* и *psbD*), проведенный на основании их предсказанных (по гену) аминокислотных последовательностей и предполагаемой (на основании расчета профилей гидрофобности) укладки в мембране, обнаруживает, что внемембранная часть ФС II, обращенная в строму, заряжена положительно, а обращенная в люмен — отрицательно. Возможный смысл такого неоднородного распределения зарядов заключается в фиксации трансмембранной разности потенциалов, облегчающей перенос электронов от внутренней поверхности тилакоидной мембраны к внешней.

Пептиды, кодируемые двумя ОРС, с их обращенными в люмен С-концевыми сегментами, несущими одноименно заряженные аминокислотные остатки, могли бы, встраиваясь в мембрану в непосредственной близости от реакционного центра ФС II, увеличивать (продукт ОРС43) или уменьшать (продукт ОРС38) фиксированную на ФС II разность потенциалов, влияя тем самым на электронный транспорт.

Гомология трансмембранных сегментов двух полипептидов наряду с указанием на общность происхождения двух ОРС (дубликация предковой ОРС с последующей инверсией одной из копий и дивергенцией) может отражать специфичность этой последовательности, необходимую для ассоциации с ФС II.

Допустив, что заряженные головки двух полипептидов быстро удаляются специфической протеиназой, мы получаем регуляторную систему, функционирующую благодаря эффективной экспрессии в каждый момент времени одной из двух ОРС. Фактором, вызывающим переключение биосинтеза с одного полипептида на другой, является, возможно, освещение (для ОРС43 показана светозависимая индукция транскрипции [30]).

Также можно предположить, что расматриваемые пептиды участвуют в процессе ассоциации отдельных субъединиц ФС II в функционирующий комплекс. Так, продукт ОРС38 служит, вероятно, своеобразным адаптером, который, будучи интегрирован в тилакоидную мембрану

между белковыми компонентами ФС II, предотвращает благодаря положительному заряду своего С-концевого сегмента взаимное отталкивание выступающих в люмен отрицательно заряженных сегментов этих белков.

Анализ участка нуклеотидной последовательности хлДНК ржи, разделяющего гены *psbB* и *psbH*, обнаруживает две пары протяженных инвертированных повторов, способных к образованию структур типа «петля — шпилька» (рис. 3). Комплементарность последовательностей сегментов первой пары (нуклеотиды 1783—1812 и 1818—1847), находящейся между геном *psbB* и ОРС38, в нескольких местах нарушается. У шпината и табака подобная структура вообще отсутствует. Таким образом, функциональная значимость этой пары повторов сомнительна.

Сегменты второй пары повторов (нуклеотиды 2000—2019 и 2025—2044) обладают полной комплементарностью на протяжении 19 нуклеотидов. Место расположения этой структуры (непосредственно за ОРС43) сохраняется у всех изученных видов, хотя сами нуклеотидные последовательности сегментов, например у ржи и шпината, совершенно негомологичны. Весьма вероятно, что эта структура является функциональным аналогом р-независимых терминаторов транскрипции *E. coli*, причем с ее помощью могут терминироваться как транскрипты, начинающиеся с *psbB*-промотора и идущие вправо, так и транскрипты, начинающиеся с промотора ОРС43 [30] и идущие влево.

Экспериментальная часть

Для выделения хлоропластной ДНК использовали свежеперегнанные гексан и четыреххлористый углерод, протеиназу К (Serva, ФРГ), РНКазу А (Boehringer — Mannheim, ФРГ). Среда для микробиологической работы готовили из компонентов фирмы Difco (США). В операциях по клонированию применяли рестриктазы, Т4 ДНК-лигазу, ДНК векторов М13mp18 М13mp19 и pUC8, рTZ19R фирмы Pharmacia (Швеция). В работе по секвенированию использовали [γ - 32 P]АТФ (Amersham, США).

Хлоропластную ДНК выделяли из листьев 7-дневных проростков ржи (*Secale cereale*), выращенных на влажной марлевой подстилке в условиях 14-часового светового (источник света — две люминесцентные лампы мощностью 40 Вт; уровень освещенности не измерялся) и 10-часового темного периода при 20—25° С. Для уменьшения содержания крахмала в хлоропластах растения перед срезанием выдерживали 24—48 ч в темноте.

Срезанные листья взвешивали и в нескольких из них определяли содержание хлорофилла [37]. Затем небольшими порциями листья растирали в жидком азоте. Получаемый при этом порошок переносили в охлажденный стакан и высушивали на лиофилизаторе фирмы Virtis (США) при Р 200 мм рт. ст. не менее 48 ч.

Лиофилизованную пылеобразную массу взвешивали, определяли в ней содержание хлорофилла и расфасовывали в бюксы по ~3 г, которые затем хранили в вакуумированном эксикаторе над Р₂О₅ при 4° С в течение многих месяцев, используя по мере необходимости для выделения хлоропластов.

Хлоропласты выделяли центрифугированием суспензии порошка листьев в ступенчатом градиенте плотности смесей гексана и четыреххлористого углерода по методу, предложенному для пшеницы [25] с некоторыми модификациями.

Суспензию, образовавшуюся при растирании навески (0,3 г) порошка лиофилизированных листьев со стеклянными шариками (*d* 0,2 мм) в смеси С₆Н₁₄/ССl₄ (плотность ρ 1,4 г/см³), высушивали до порошкообразного состояния, поместив ступку в вакуумируемый эксикатор. Порошок суспендировали в 6 мл смеси и фильтровали через четыре слоя ткани Mircloth (Calbiochem, США). Осадок с фильтра переносили в ступку, суспендировали в 4,5 мл смеси и вновь фильтровали. Такую промывку повторяли 2—3 раза. Объединенный фильтрат (50—54 мл), полученный при

обработке 1,2 г порошка листьев, разливали в 4 стеклянные центрифужные пробирки (50 мл), охлаждали на льду, наслаивали по 30 мл смеси с плотностью 1,33 г/см³ и 2 мл смеси с плотностью 1,05 г/см³ и после медленного, в течение 15—20 мин, охлаждения до 0° С центрифугировали 7 мин при 2000g.

Компактные зеленые зоны, появившиеся на границе между средней и верхней ступенями градиента, переносили с помощью пастеровской пипетки в стеклянные силиконированные центрифужные пробирки (15 мл) — в каждую пробирку не более 7 мл. В пробирки доливали равный объем гексана, растворы смешивали и центрифугировали 10 мин при 3500g. Надосадочную жидкость светло-зеленого цвета сливали, а плотный темно-зеленый осадок хлоропластов высушивали под вакуумом, получая при этом 10—12 мг порошка, и либо сразу же использовали для выделения хлДНК, либо хранили в вакуумированном эксикаторе при 4° С 1—2 сут до выделения.

Выделение суммарной НК из хлоропластов. В помещенную в лед пробирку с осадком хлоропластов, выделенных из 1,2 г лиофилизированных листьев, приливали 1 мл лизирующего буфера R [25]. Растирая осадок тефлоновым пестиком и гомогенизируя раствор (очень осторожно, используя обрезанный носик к автоматической пипетке (1 мл) с оплавленными краями отверстия), осадок растворяли. Объем полученного раствора доводили до 3 мл буфером R и добавляли 150 мкл раствора протеиназы K (2 мг) в этом же буфере. Смесь инкубировали 1 ч при 37° С, после чего раствор последовательно обрабатывали равными объемами фенола (2—3 раза, до полного исчезновения интерфазы) и смеси фенол/хлороформ (1 : 1). Смешивания фаз при такой обработке добивались медленным переворачиванием пробирки. Водную фазу отбирали автоматической пипеткой, используя обрезанный носик с оплавленными краями отверстия.

Суммарную НК (ДНК + РНК) осаждали из водной фазы 2,5 объемами этанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия (рН 5,4) при —20° С в течение 1 ч.

Обработку хлДНК рестриктазами вели в соответствии с работой [38]. В реакцию брали 35—45 мкг суммарной НК. Для разрушения РНК, мешающей визуализации мелких фрагментов, в реакционную смесь добавляли 1 мкл раствора РНКазы А (0,25 мг/мл, прогретого 10 мин при 90° С). Разрезанную ДНК анализировали электрофорезом в 0,4% агарозном геле. Двухнаправленный блот-перенос и гибридизацию нитроцеллюлозных блот-реплик с олигонуклеотидными зондами проводили как описано в работе [39].

Векторы для клонирования готовили из плазмид pUC8 и pTZ19R. Плазмидную ДНК выделяли по методам [40—42]. Получение компетентных клеток, гибридизационный отбор необходимых рекомбинантных клонов, электроэлюция фрагментов ДНК из геля осуществляли по методикам [43, 44]. Лигирование фрагментов ДНК в расплаве легкоплавкой агарозы проводили согласно [45].

Переклонирование фрагментов ДНК в фаговые векторы M13mp18, M13mp19 и наработку однонитевой матрицы осуществляли по методикам [46, 47]. Крупные фрагменты клонировали, вырезая их из геля и лигируя с вектором в расплаве, мелкие клонировали в виде соответствующей рестрикционной смеси с последующим гибридизационным анализом полученных рекомбинантных клонов и Т-скринингом [46]. В клонировании и при наработке однонитевой ДНК-матрицы использовали клетки JM109 (Rec⁻) [48]. Секвенирование вели по Сэнгеру [49] с модификациями [50]. Олигонуклеотидные зонды синтезировали фосфорамидитным методом на синтезаторе Applied Biosystems.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murata N., Miyao M. // Trends Biochem. Sci. 1985. V. 10. № 3. P. 122—124.
2. Satoh K. // Photochem. and Photobiol. 1985. V. 42. № 6. P. 845—853.
3. Arntzen C. J., Pakrasi H. B. // Encyclopedia of plant physiology. New Series. V. 19. / Eds Staehelin L. A., Arntzen C. J. Berlin: Springer, 1986. P. 457—467.
4. Farchaus J., Dilley R. A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1986. V. 244. № 1. P. 94—101.
5. Millner P. A., Marder J. B., Gounaris K., Barber J. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 852. № 1. P. 30—37.
6. Hird S. M., Dyer T. A., Gray J. C. // FEBS Lett. 1986. V. 209. № 2. P. 181—185.
7. Barkan A. // EMBO J. 1988. V. 7. № 9. P. 2637—2644.
8. Westhoff P., Herrmann R. G. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 171. № 3. P. 551—564.
9. Nakatani N. Y., Ke B., Dolan E., Arntzen C. J. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 765. № 2. P. 590—595.
10. Camm E. L., Green B. R. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 724. № 2. P. 291—293.
11. Leto K. J. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 766. № 1. P. 98—108.
12. Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H. // Nature. 1985. V. 318. № 6046. P. 618—624.
13. Nanba O., Saton K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 1. P. 109—112.
14. Barber J., Chapman D. J., Tefler A. // FEBS Lett. 1987. V. 220. № 1. P. 67—73.
15. Vermaas W. F. J., Williams J. G. K., Arntzen C. J. // Plant Mol. Biol. 1987. V. 8. № 4. P. 317—326.
16. Bricker T. M., Odom W. R., Queirolo C. B. // FEBS Lett. 1988. V. 231. № 1. P. 111—117.
17. Akabory K., Tsukamoto H., Tsukihara J., Nagatsuka T., Motokawa O., Toyoshima Y. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 932. № 3. P. 345—347.
18. Michel H. P., Bennett J. // FEBS Lett. 1987. V. 212. № 1. P. 103—108.
19. Shinozaki K., Ohme N. // EMBO J. 1986. V. 5. № 9. P. 2043—2049.
20. Packham N. K. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 893. № 2. P. 259—266.
21. Бузаров А. А., Колосов В. Л., Золотарев А. С. // Материалы 5-й конференции молодых ученых социалистических стран по биоорганической химии. Тез. докл. Пуццино-на-Оке, 1988. С. 81.
22. Bukharov A. A., Kolosov V. L., Zolotarev A. S. // Nucl. Acid. Res. 1988. V. 16. № 17. P. 8737.
23. Bukharov A. A., Kolosov V. L., Klezovich O. N., Zolotarev A. S. // Nucl. Acid. Res. 1989. V. 17. № 2. P. 798.
24. Herrmann R. G. // Methods in chloroplast molecular biology. Elsevier Biomedical Press, 1982. P. 259—280.
25. Bowman C. M., Dyer T. A. // Anal. Biochem. 1982. V. 122. № 1. P. 108—118.
26. Bowman C. M. // Planta. 1986. V. 167. № 2. P. 264—274.
27. Morris J., Herrmann R. G. // Nucl. Acid. Res. 1984. V. 12. № 6. P. 2837—2850.
28. Rock C. D., Barkan A., Taylor W. C. // Curr. Genet. 1987. V. 12. № 1. P. 69—77.
29. Tanaka M., Obokata J., Chunwongse J., Shinozaki K., Sugiura M. // Mol. Gen. Genet. 1987. V. 209. № 3. P. 427—431.
30. Kohchi T., Yoshida T., Komano T., Ohyama K. // EMBO J. 1988. V. 7. № 4. P. 885—891.
31. Kyte J., Doolittle R. R. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. № 1. P. 105—132.
32. Hopp T. P., Woods K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3824—3828.
33. Chisholm D., Williams J. G. K. // Plant. Mol. Biol. 1988. V. 10. № 4. P. 293—301.
34. Zuber H. // Photochem. and Photobiol. 1985. V. 42. № 6. P. 821—844.
35. Westhoff P., Farchaus J., Herrmann R. G. // Curr. Genet. 1986. V. 11. № 3. P. 165—169.
36. Dedner N., Meyer H. E., Ashton C., Wildner G. F. // FEBS Lett. 1988. V. 236. № 1. P. 77—82.
37. Arnon D. I. // Plant Physiol. 1949. V. 24. № 1. P. 1—5.
38. Fuchs R., Blakesley R. // Meth. Enzymol. 1983. V. 100. P. 3—38.
39. Meinkoth J., Wahl G. // Anal. Biochem. 1984. V. 138. № 2. P. 267—284.
40. Monstein H.-J., Geijer T. // Biochem. Inter. 1986. V. 12. № 6. P. 889—896.
41. Birnboim H. C. // Meth. Enzymol. 1983. V. 100. P. 243—255.
42. Holmes D. S., Quigley M. // Anal. Biochem. 1981. V. 114. № 1. P. 193—197.
43. Манциатис Т., Фриш Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
44. Yang R. C.-A., Lis J., Wu R. // Meth. Enzymol. 1979. V. 68. P. 176—182.
45. Murray J. A. H. // Nucl. Acid. Res. 1986. V. 14. № 24. P. 10118.
46. Messing J. // Meth. Enzymol. 1983. V. 101. P. 20—78.
47. Eperon I. C. // Anal. Biochem. 1986. V. 156. № 2. P. 406—412.
48. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 103—119.
49. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
50. McGraw III R. A. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298—303.

Поступила в редакцию
6.XII.1988

RYE PHOTOSYSTEM II: NUCLEOTIDE SEQUENCE OF *psbB*
AND *psbH* GENES CODING FOR 47 kD CHLOROPHYLL *a*-BINDING
AND 10 kD PHOSPHORYLATED SUBUNITS

BUKHAROV A. A., KOLOSOV V. L., ZOLOTAREV A. S., ABDULAEV N. G.

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

Chloroplast DNA was isolated from rye seedlings by the non-aqueous method. The region of rye ctDNA which comprises two genes *psbB* and *psbH* encoding polypeptide subunits of photosystem II (47 kD Chl_a-binding protein (CP_a-1) and 10 kD phosphoprotein, respectively) and two ORFs in the opposite strands in the *psbB*—*psbH* spacer region encoding hydrophobic peptides with strongly charged C-terminal segments was sequenced. The deduced amino acid sequences of polypeptide products of the genes were compared with those of different plant species (in case of the *psbB* product also with sequence of a cyanobacterium *Synechocystis*) and revealed some highly conservative amino acid residues and regions of polypeptide chains, which apparently play essential role in the interaction with other PS II subunits and in the binding of chlorophyll molecules. Some speculations are made on the possible function of the peptides encoded by the two ORFs.