

УДК 577.355.2

СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛЕНОК РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА *Rhodobacter sphaeroides* R-26 В УСЛОВИЯХ ВАКУУМА

© 2019 А.А. Забелин*, В.А. Шкуропатова, В.А. Шувалов, А.Я. Шкуропатов

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: zabelin.bio@gmail.com

Поступила в редакцию 03.04.2019

После доработки 05.06.2019

Принята к публикации 05.06.2019

Методами абсорбционной спектроскопии в видимой/ближней-ИК и средней-ИК областях исследованы спектральные и фотохимические свойства изолированных реакционных центров (РЦ) из *Rhodobacter sphaeroides* R-26 в сухих пленках на поверхности неорганических подложек (кварц или CaF_2) в условиях вакуумной дегидратации (10^{-2} или $7 \cdot 10^{-5}$ мм. рт. ст.). Три детергента, *N,N*-диметилдодециламино-*N*-оксид (ЛДАО), Triton X-100 (ТХ100) и *n*-додецил- β -*D*-мальтозид (ДМ) тестировались в отношении их способности стабилизировать РЦ–детергент комплексы в вакуум-сухом состоянии. Показано, что в присутствии ЛДАО РЦ–комплексы подвергаются разрушению в вакууме. Напротив, ДМ обеспечивает среду, позволяющую минимизировать необратимые деструктивные изменения в РЦ в условиях вакуума. Эффекты вакуумной дегидратации пленок РЦ–ДМ включали в себя небольшое увеличение содержания α -спиралей в белке РЦ, коротковолновый обратимый сдвиг оптических переходов пигментов и минорные изменения в электронной структуре димера P^+ . Пленки сохраняли фотохимическую активность при возбуждении светом высокой интенсивности (200 мВт/см²). ТХ100 также способствует поддержанию спектральных и функциональных свойств РЦ в вакууме, однако, в этом случае стабилизирующий эффект выражен в меньшей степени, чем в присутствии ДМ, особенно при высоких концентрациях детергента. Результаты обсуждаются в рамках модели, предполагающей, что при вакуумной дегидратации РЦ–комплексов взаимодействие детергент–белок и свойства мицелл детергента играют доминирующую роль в поддержании структуры РЦ. Полученные данные могут быть полезными при разработке гибридных фотопреобразующих систем, содержащих бактериальные РЦ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реакционный центр, абсорбционная спектроскопия, вакуумная дегидратация, детергент, мицеллы, *Rhodobacter sphaeroides* R-26.

DOI: 10.1134/S0320972519090136

Фотохимические реакционные центры (РЦ) фотосинтезирующих бактерий – интегральные мембранные пигмент–белковые комплексы, осуществляющие в природных условиях функцию преобразования энергии световых квантов в электрохимическую энергию разделенных зарядов посредством серии быстрых реакций пе-

реноса электрона [1]. РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* содержат три белковые субъединицы (L, M и H), две из которых (L и M) связывают кофакторы, образующие две квази-симметричные ветви переноса электрона [2, 3] (часто обозначаемые А и В). Кофакторные ветви делят между собой димер экситонно-сопряженных молекул бактериохлорофилла (БХл), служащий первичным донором электрона (Р), и далее каждая из них включает в себя молекулу мономерного БХл (V_A или V_B), молекулу бактериофеофитина (БФео) (H_A или H_B) и молекулу убихинона (Q_A или Q_B). Только ветвь А активна в первичном разделении зарядов [1]. Рентгенографические исследования выявили, что кристаллы РЦ содержат также большое количество связанных молекул воды, некоторые из которых играют функциональную роль [3, 4]. Бактериальные РЦ, как природные наноразмер-

Принятые сокращения: ΔA – изменение поглощения; БХл – бактериохлорофилл; V_A и V_B – мономерные молекулы БХл в А и В ветвях соответственно; БФео – бактериофеофитин; H_A и H_B – молекулы БФео в А и В ветвях соответственно; ДМ – *n*-додецил- β -*D*-мальтозид; ИК-Фурье-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием; ЛДАО – *N,N*-диметилдодециламино-*N*-оксид; Р – первичный донор электрона, димер молекул БХл; P_A и P_B – молекулы БХл, составляющие Р; РЦ – реакционный центр; ТХ100 – Triton X-100; Q_A – первичный хинонный акцептор; Q_B – вторичный хинонный акцептор; *Rba.* – *Rhodobacter*.

* Адресат для корреспонденции.

ные энергопреобразующие структуры, характеризуются предельно высоким (практически 100%) квантовым выходом разделения зарядов, достигаемым в результате быстрого (~200 пс) «каскадного» переноса электрона от синглетно-возбужденного первичного донора электрона P^* к первичному хинонному акцептору Q_A (через промежуточные короткоживущие ионные пары $P^+B_A^-$ и $P^+H_A^-$) с образованием относительно долгоживущего (~0,1 с) состояния $P^+Q_A^-$. Этот факт стимулирует разнообразные попытки использования РЦ в качестве фоточувствительного элемента в искусственных фотопреобразующих системах [5], включая интегрирование их в твердотельные фотоэлектронные устройства [6]. Одной из необходимых предпосылок для создания гибридных устройств такого рода является стабилизация структуры РЦ в иммобилизованном состоянии [6–8]. В частности, при изготовлении твердотельных устройств на основе РЦ важной задачей является максимальное сохранение структуры и функциональной активности РЦ при помещении их в вакуум, который представляет собой неприродную, эффективно гидрофобную среду, потенциально склонную к нарушению нативной структуры белков [9–11].

В настоящее время один из распространенных подходов к стабилизации изолированных мембранных белков [12, 13], включая их перенос из раствора в вакуум при масс-спектрометрическом анализе [10, 11], основан на использовании подходящего детергента. Однако, результаты систематических исследований влияния детергентов на стабильность РЦ в агрегированном состоянии в вакууме в литературе, по-видимому, отсутствуют.

Цель данной работы — исследование методами оптической спектроскопии роли детергентов в поддержании структуры и функциональной активности изолированных РЦ пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* R-26 в дегидратированных пленках на поверхности твердых неорганических подложек в условиях вакуума.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение бактериальных РЦ. РЦ *Rhodobacter sphaeroides* R-26 были выделены при обработке мембран детергентом *N,N*-диметилдодециламино-*N*-оксидом (ЛДАО) с последующей очисткой методом ионообменной хроматографии на колонках с ДЭАЭ целлюлозой [14]. Очищенные препараты содержали ~50% функционально активного вторичного хинона Q_B . Замену ЛДАО на детергенты Triton X-100 (ТХ100) или *n*-додецил- β -D-мальтозид (ДМ) проводили на мем-

бране с отсекаемой массой 30 кДа («Millipore», США) в ячейке для ультраконцентрирования под давлением газообразного аргона. При необходимости образцы концентрировали, используя ячейки для ультрафильтрации Ultrafree-МС с отсекаемой массой 50 кДа («Millipore», США).

Получение твердых сухих пленок. В качестве объектов исследования использовали твердые сухие пленки РЦ на поверхности подложек из кварца или фторида кальция. Аликвоту суспензии РЦ объемом 3–3,5 мкл ($A_{867} = 45$ в кювете с длиной оптического пути 1 см) в 10 мМ Tris-HCl (рН 8,0), буферном растворе, содержащем 0,025% (v/v) ЛДАО или 0,05% (v/v) ТХ100 или 0,03% (v/v) ДМ, помещали на кварцевую пластинку (1 × 5 см) для измерения электронных спектров поглощения в видимой/ближней-ИК областях или на пластинку из CaF_2 (19 мм в диаметре) для ИК-Фурье-измерений. Суспензию высушивали в токе аргона до образования твердого состояния («воздушно-сухая» пленка). Молярное отношение (детергент/РЦ), n , рассчитывали по формуле $(C_0 \cdot C_{РЦ} + C_{det})/C_{РЦ}$, где C_0 — молярная связывающая способность детергента (моль/моль); $C_{РЦ}$ — концентрация РЦ (моль/л); C_{det} — концентрация добавленного детергента (моль/л). Значения C_0 для комплексов РЦ *Rba. sphaeroides* с ЛДАО, ТХ100 и ДМ были получены ранее [15]. Для того чтобы получить воздушно-сухие пленки с более высокими значениями n , небольшое количество 10 мМ Tris-HCl (рН 8,0) буферного раствора, содержащего 3% (v/v) ЛДАО, 3% (w/v) ТХ100 или 3% (w/v) ДМ добавляли к суспензии РЦ перед ее высушиванием на подложке. Вакуум-сухие пленки получали выдерживанием воздушно-сухих пленок в вакууме (10^{-2} или $7 \cdot 10^{-5}$ мм. рт. ст.) в течение 2–3 ч перед оптическими измерениями и далее в течение всего эксперимента. Гидратированные пленки (только для ИК-Фурье-измерений) получали аналогично тому, как описано выше для воздушно-сухих пленок, однако, суспензия РЦ–детергент на пластинке из CaF_2 лишь слегка подсушивалась в токе аргона, и полученный пастообразный образец накрывался другой пластинкой из CaF_2 , образуя вакуум-плотную ячейку.

Электронные спектры поглощения. Электронные спектры поглощения в видимом и ближнем-ИК диапазонах (450–1000 нм) записывали на спектрофотометрах Shimadzu UV1800 («Shimadzu», Япония) или Agilent 8530 («Agilent», США). Кварцевую пластину с нанесенной пленкой РЦ помещали под углом 45° относительно измерительного и возбуждающего света в кварцевую кювету, которая являлась частью герметичной ячейки, подключенной к вакуумной линии (10^{-2} или $7 \cdot 10^{-5}$ мм. рт. ст.).

Фотоиндуцированные дифференциальные (свет минус темнота) электронные спектры P^+Q^-/PQ в области 650–1000 нм были получены с использованием спектрофотометра Agilent 8530 путем вычитания спектров поглощения, измеренных в темноте, из спектров, измеренных при освещении образцов в течение 7 с постоянным действующим светом (340–600 нм; 200 мВт/см²).

ИК-Фурье-спектроскопия. ИК-Фурье-спектры поглощения и фотоиндуцированные дифференциальные ИК-Фурье-спектры записывали на инфракрасном Фурье-спектрометре IFS66v/s («Bruker», Германия) с детектором МСТ (D313/6) и светоделителем из КВг. Спектральное разрешение составляло 2 или 4 см⁻¹. Образцы помещались в держателе оптического криостата («Спесас», Великобритания), который мог быть подсоединен к вакуумной линии (10⁻² мм. рт. ст.). В случае воздушно-сухих пленок предварительно записанный ИК-спектр поглощения водяного пара в криостате вычитали из ИК-спектра поглощения РЦ для минимизации вклада узких колебательно-вращательных пиков воды в области 1700–1600 см⁻¹ в полосу амид I белка. Фотоиндуцированные дифференциальные (свет минус темнота) ИК-Фурье-спектры P^+Q^-/PQ измеряли при освещении образцов постоянным действующим светом (720–1100 нм; ~2 мВт/см²) [16]. Циклы освещения повторяли многократно для достижения приемлемого соотношения сигнал/шум.

Все измерения были выполнены при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Три детергента, ЛДАО, ТХ100 и ДМ, широко используемые при выделении и очистке фотосинтетических комплексов, тестировали оптическими методами в отношении их способности стабилизировать РЦ–комплексы в вакуум-сухих пленках. Для сравнения измерения были выполнены также на воздушно-сухих и гидратированных пленках.

Влияние вакуумной дегидратации на электронные спектры поглощения РЦ–детергент комплексов. Рис. 1 показывает электронные спектры поглощения РЦ *Rba. sphaeroides* R-26, измеренные в области 450–1000 нм, в воздушно-сухих (кривые 1) и в полученных из них вакуум-сухих (кривые 2) пленках, содержащих детергенты ЛДАО (а), ТХ100 (б) и ДМ (в). Для сравнения кривые 3 представляют аналогичные спектры поглощения РЦ в буферных детергентных растворах, из которых были приготовлены пленки. Детергенты были использованы при концентрациях, близких к

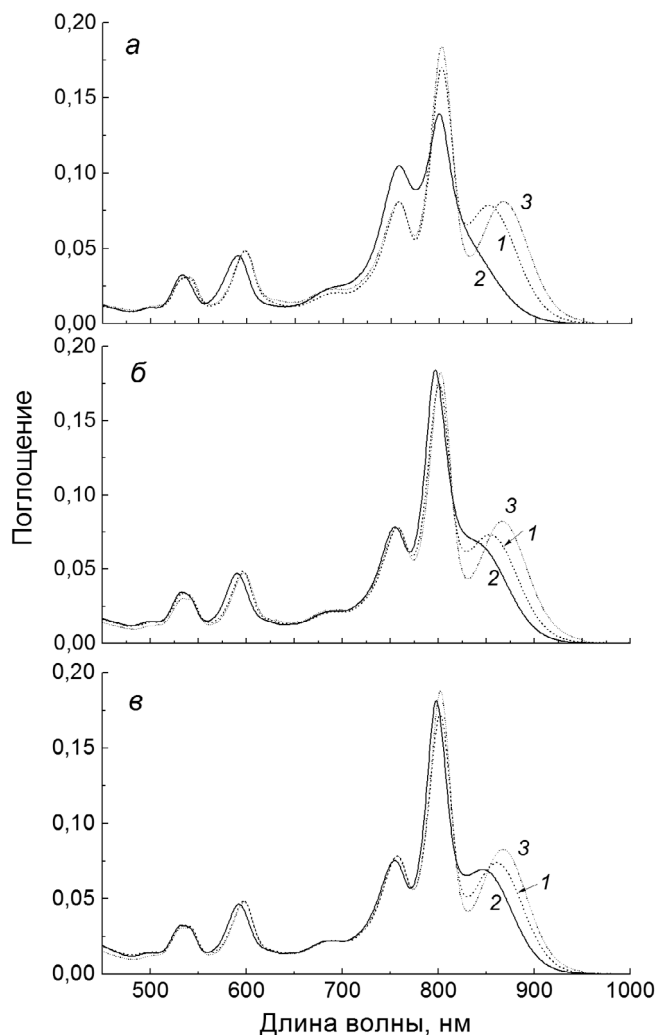


Рис. 1. Электронные спектры поглощения РЦ *Rba. sphaeroides* R-26, измеренные в воздушно-сухих (кривые 1) и вакуум-сухих (10⁻² мм. рт. ст.) пленках (кривые 2), и в водных буферных растворах (кривые 3), содержащих детергенты ЛДАО (а), ТХ100 (б) и ДМ (в). Спектры в растворах нормированы к соответствующим спектрам в воздушно-сухих пленках в полосе БФео при 760 нм; спектры поглощения в вакуум-сухих пленках приведены без нормировки. Значения на оси ординат на панелях а, б и в относятся к спектрам поглощения РЦ в пленках

их критическим концентрациям мицеллообразования (ККМ): 0,025% для ЛДАО, 0,05% для ТХ100 и 0,03% для ДМ, что соответствовало величинам молярного отношения (детергент/РЦ) *n*, равным 291, 106 и 150 соответственно.

Из рис. 1 видно, что электронные спектры поглощения РЦ в растворах с различными детергентами (кривые 3) практически не отличались друг от друга, хорошо соответствуя спектрам известным в литературе. Однако высушивание тех же образцов РЦ на воздухе и затем в вакууме приводило к заметным изменениям спектров.

Абсорбционные изменения, сопровождающие образование воздушно-сухих пленок (кривые 1), были близки, хотя и не идентичны, для трех использованных детергентов. Удаление в этом случае жидкой и, вероятно, слабосвязанной воды сопровождалось спектральными эффектами, связанными, в основном, с димером Р, наиболее отчетливыми из которых являлись небольшое уменьшение интенсивности и коротковолновый сдвиг длинноволновой Q_y полосы Р от 866 нм в растворе до 851, 853 и 861 нм в пленках с ЛДАО, ТХ100 и ДМ соответственно. Ранее коротковолновый сдвиг полосы поглощения Р от ~865 до ~850 нм наблюдали для изолированных РЦ из *Rba. sphaeroides* в различных экспериментальных условиях, включая дегидратацию РЦ в пленках [17, 18]. Высушивание РЦ на воздухе (рис. 1, кривые 1) сопровождалось также небольшим уменьшением интенсивности Q_y полосы поглощения мономерных молекул БХл $V_{A/B}$ при 802 нм. Значительно менее выраженное влияние высушивание оказывало на Q_y и Q_x переходы молекул БФео (при ~760 и ~540 нм соответственно), а также на Q_x переходы всех четырех молекул БХл (~600 нм).

Более интенсивная последующая дегидратация воздушно-сухих пленок РЦ в вакууме (10^{-2} мм. рт. ст.; кривые 2) приводила к дальнейшим изменениям спектров поглощения в видимой и ближней-ИК областях, причем конечный результат зависел от использованного детергента. В спектре вакуум-сухой пленки РЦ–ЛДАО практически не разрешалась длинноволновая Q_y полоса Р, наблюдались сильное уменьшение поглощения в Q_y полосах молекул $V_{A/B}$ при ~800 нм и увеличение поглощения в области 740–780 нм (рис. 1, а, кривая 2), что в совокупности указывает на нарушение структурной целостности РЦ и высвобождение значительной части молекул БХл и БФео из их нативного окружения [19]. Последующий смыв пленок РЦ–ЛДАО в буферный раствор подтвердил, что основная часть РЦ необратимо разрушена при высушивании в вакууме (не показано).

Вакуум-индуцированные изменения в спектрах поглощения пленок РЦ–ДМ были существенно менее критичными (рис. 1, в, кривая 2) и, очевидно, не связаны с необратимыми нарушениями структуры РЦ. В подтверждение этого вывода было найдено, что возвращение вакуум-сухих пленок РЦ–ДМ в атмосферные условия восстанавливало спектр поглощения, наблюдаемый для воздушно-сухих пленок, а их последующее перерастворение в буферном растворе давало спектр, характерный для спектра исходной суспензии РЦ (не показано). Примечательно, что наряду с дальнейшим синим сдви-

гом Q_y полосы Р (до 847 нм) в спектрах вакуум-сухих пленок РЦ–ДМ наблюдали также обратимые коротковолновые сдвиги всех остальных Q_x и Q_y полос РЦ на 2–4 нм, а Q_y полоса поглощения молекул $V_{A/B}$, локализованная в вакуум-сухих пленках при 798 нм, показывала увеличение интенсивности по отношению к воздушно-сухим пленкам (рис. 1, в, кривые 2) [17]. Все описанные спектральные эффекты наблюдали также для пленок РЦ–ДМ, дегидратированных в вакууме $7 \cdot 10^{-5}$ мм. рт. ст. (данные не показаны). Таким образом, удаление прочносвязанных молекул воды, ожидаемое в условиях вакуума, сопровождалось обратимыми изменениями абсорбционных свойств всего гексахромового пигментного комплекса РЦ. Аналогичные данные были получены для вакуум-сухой пленки РЦ–ТХ100 (рис. 1, б, кривая 2), однако, эксперимент с перерастворением пленки выявил небольшие изменения спектров поглощения, близкие по характеру к изменениям, описанным выше для пленок РЦ–ЛДАО, и указывающие на разрушение небольшой доли (~5%) РЦ–ТХ100 комплексов (не показано).

Различие в стабилизирующем действии ДМ и ТХ100 на РЦ в вакууме (10^{-2} мм. рт. ст.) более отчетливо проявлялось при увеличении концентрации детергентов в образцах выше ККМ и, соответственно, при возрастании молярного отношения детергент/РЦ (n). Увеличение n (от 150 до 220) в пленках РЦ–ДМ сопровождалось заметным уменьшением вакуум-индуцированного синего сдвига максимума полосы поглощения Р (847 нм при $n = 150$ (рис. 1, в, кривая 2) и 852 нм при $n = 220$ (не показано)). Дальнейшее увеличение n не оказывало существенного влияния на положение максимума полосы Р, который локализовался при 852–854 нм в диапазоне значений n от 220–600. Напротив, увеличение n (106–470) в пленках РЦ–ТХ100 приводило к небольшому дополнительному коротковолновому сдвигу полосы Р (842 нм при $n = 106$ (рис. 1, б, кривая 2) и 841 нм при $n = 300$ –470 (не показано)). Более того, при высоких концентрациях ТХ100 в спектре поглощения вакуум-сухих пленок РЦ–ТХ100 проявлялись изменения, сходные с теми, которые наблюдали в присутствии ЛДАО (рис. 1, а, кривая 2), то есть имело место значительное (>50%) разрушение структуры РЦ.

Таким образом, ни один из тестируемых детергентов не позволил получить вакуум-сухие пленки РЦ со спектрами поглощения идентичными спектру в растворе, что, очевидно, отражает появление локальных изменений в нативных пигмент–пигментных и/или пигмент–белковых взаимодействиях в РЦ в твердом состоянии. Это может указывать на то, что связанные

молекулы воды, присутствующие в РЦ–комплексах [3, 4], играют некоторую структурную роль, и их удаление влияет на свойства РЦ. Вместе с тем для минимизации необратимых деструктивных изменений, вызываемых в РЦ дегидратацией в вакууме, существенное значение имеет присутствие подходящего детергента. Очевидно ДМ представляет среду, наиболее благоприятную в этом отношении.

Изменения вторичной структуры белка при вакуумной дегидратации РЦ. Для того чтобы получить информацию о влиянии вакуумной дегидратации на вторичную структуру белка в пленках РЦ–ДМ и РЦ–ТХ100, была использована ИК–Фурье–спектроскопия в частотной области полосы амид I [20].

На примере воздушно-сухой пленки РЦ–ДМ рис. 2, *а* демонстрирует типичный ИК–Фурье–спектр поглощения РЦ, измеренный в области 1800–1480 см⁻¹, в которой преобладает полоса амид I с максимумом при 1657 см⁻¹ (в спектре присутствует также полоса амид II с максимумом при 1547 см⁻¹). Поскольку полоса амид I включает в себя несколько перекрывающихся пиков, представляющих α-спирали, β-листы, повороты и агрегированные и нерегулярные структуры [21], для выявления качественной картины изменений вторичной структуры при вакуумной дегидратации РЦ были получены разностные спектры «вакуум-сухая минус воздушно-сухая пленка» (рис. 2, *б*) для пленок РЦ, содержащих ТХ100 (кривая 1) и ДМ (кривая 2). Видно, что оба разностных спектра содержат отрицательную полосу в области ~1630 см⁻¹, что свидетельствует о структурных изменениях и/или уменьшении количества β-структуры. Положительные сигналы при 1692 и 1674 см⁻¹, по-видимому, отражают увеличение количества поворотов и/или антипараллельных β-структур [21]. Согласно рентгеноструктурным данным [2, 3], β-структурные компоненты расположены преимущественно в цитоплазматической и периплазматической областях РЦ, которые находятся в контакте с молекулами воды. Возможно, эффект, который вакуумная дегидратация оказывает на β-структуры (рис. 2, *б*), связан с частичным удалением этих молекул воды.

Наиболее интересное отличие между разностными спектрами на рис. 2, *б* состоит в том, что вакуумная дегидратация пленок РЦ–ДМ привела к заметному увеличению поглощения при 1657 см⁻¹ (кривая 2), что свидетельствует об увеличении количества α-спиральных структур [21, 22]. В случае пленок РЦ–ТХ100 наблюдался лишь слабый отрицательный сигнал в этой области спектра (рис. 2, *б*, кривая 1). Ранее увели-

чение содержания регулярных (преимущественно α-спиральных) элементов вторичной структуры было обнаружено при дегидратации внутренне неупорядоченных белков [23, 24]. Предполагается, что в этом случае дегидратация белка приводит к замене межмолекулярных водородных связей между пептидными группами и молекулами воды новыми внутрибелковыми водородными связями [24]. Возможно, индуцированное дегидратацией образование α-спиралей в вакуум-сухих пленках РЦ–ДМ могло происходить внутри Н-субъединицы белка, которая содержит значительный нерегулярный домен [2] со связанными молекулами воды [3].

В целом, вакуумная дегидратация оказывает, по-видимому, минорное влияние на вторичную структуру белка в комплексах РЦ–ДМ и РЦ–ТХ100, однако, небольшое увеличение содержания α-спирального компонента может вносить дополнительный вклад в способность ДМ стабилизировать белок РЦ в вакуум-сухом

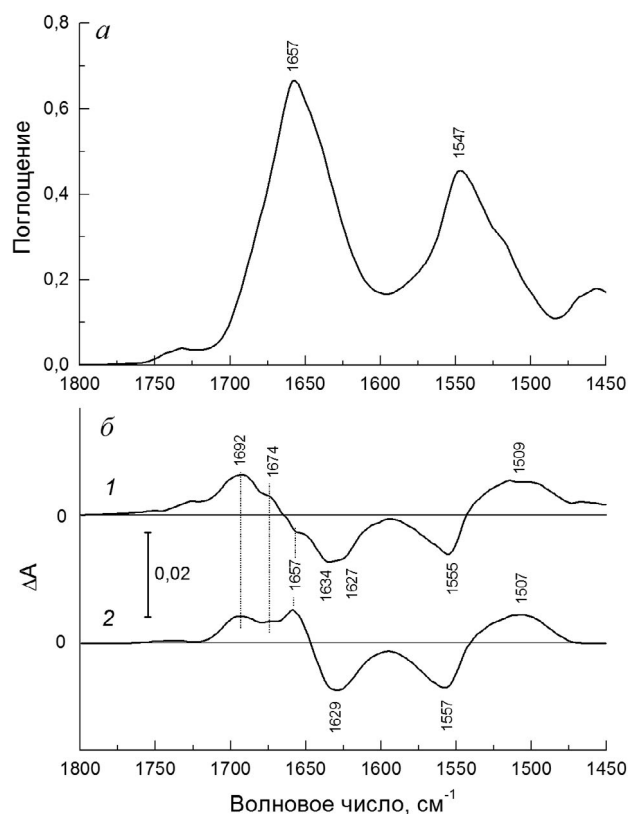


Рис. 2. *а* – ИК–Фурье–спектр поглощения воздушно-сухой пленки РЦ–ДМ в области полос амид I и амид II. *б* – Разностные ИК–Фурье–спектры «вакуум-сухая минус воздушно-сухая пленка», полученные для пленок, содержащих ТХ100 ($n = 106$) (1) и ДМ ($n = 220$) (2). Вакуум-сухие пленки получены при остаточном давлении 10⁻² мм. рт. ст. Для удобства сравнения разностные спектры нормированы по амплитуде дифференциального сигнала при 1555–1557/1507–1509 см⁻¹

состоянии, в то время как подобный стабилизирующий фактор отсутствует в пленках с TX100.

Вакуумная дегидратация РЦ и электронная структура первичного донора электронов. С целью выяснения влияния вакуумной дегидратации на электронную структуру окисленного димера P^+ в составе функционального состояния P^+Q^- использовали фотоиндуцированную дифференциальную ИК-Фурье-спектроскопию, позволяющую выявлять тонкие изменения, происходящие в структуре и молекулярных взаимодействиях кофакторов переноса электрона в ответ на разделение зарядов в РЦ [25].

В соответствии с изменениями в электронных спектрах поглощения (рис. 1, а, кривая 3), которые указывают на почти полное разрушение РЦ в вакууме в присутствии ЛДАО, лишь остаточный фотоиндуцированный ИК-Фурье сигнал P^+Q^-/PQ был различим для вакуум-сухой пленки РЦ–ЛДАО (не показано). Ранее Morita et al. [26] сообщили об отсутствии фотоиндуцированных ИК-изменений в вакуум-сухих ($<10^{-3}$ мм. рт. ст.) пленках РЦ *Rba. sphaeroides* дикого типа, полученных в отсутствие детергента.

Напротив, РЦ в пленках с ДМ и TX100 сохраняли способность к разделению зарядов в условиях вакуума, показывая интенсивные фотоиндуцированные сигналы в средней ИК-области спектра, отражающие преимущественно образование состояния $P^+Q_A^-$, поскольку перенос электрона с Q_A^- на Q_B^- в РЦ при удалении прочно

связанной воды значительно затрудняется [27, 28]. На рис. 3 показаны дифференциальные «свет минус темнота» ИК-Фурье-спектры $P^+Q_A^-/PQ_A$ для вакуум-сухих (10^{-2} мм. рт. ст.) пленок РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 в присутствии TX100 ($n = 106$) (кривая 3) и ДМ ($n = 220$) (кривая 2). Для сравнения показан также ИК-спектр P^+Q^-/PQ (Q^- – смесь анионов Q_A^- и Q_B^-) для гидратированной пленки РЦ–ДМ (кривая 1). Все спектры нормированы друг к другу [17] на количество фотогенерированного P^+ по амплитуде дифференциального сигнала $1750/1738\text{ см}^{-1}$, отнесенного к высокочастотному сдвигу валентных колебаний ^{13}C -эфирных $\text{C}=\text{O}$ групп молекул БХл [29]. Отрицательные и положительные пики в ИК-Фурье-спектрах соответствуют исчезновению нейтральных форм Р и Q и появлению ион-радикальных форм P^+ и Q^- соответственно. Отметим, что спектры на рис. 3 отражают, главным образом, переход $P \rightarrow P^+$, поскольку интенсивность ИК-полос, связанных с восстановлением хинонных акцепторов, относительно мала [29].

ИК-Фурье-спектр P^+Q^-/PQ гидратированных пленок РЦ–ДМ (рис. 3, кривая 1) содержит широкую полосу низкоэнергетического электронного перехода при $\sim 2650\text{ см}^{-1}$, связанного с переносом положительного заряда (дырки) внутри димерного катион-радикала P^+ [30], и три интенсивные полосы при 1545, 1479 и $\sim 1285\text{ см}^{-1}$, отнесенные колебательным фазово-фононным модам P^+ [31]. Нормированный ИК-спектр P^+Q^-/PQ для гидратированной пленки РЦ–TX100 был сравним по форме и амплитуде со спектром, представленным кривой 1 (не показано). Полоса переноса дырки и фазово-фононные полосы являются индикаторами гомодимерной природы катион-радикала P^+ , и их интенсивность зависит от степени электронного сопряжения между молекулами P_A и P_B в P^+ [30, 31]. Сравнение спектров 2 и 3 со спектром 1 (рис. 3) показывает, что высушивание пленок РЦ в вакууме не влияет на положение максимумов полосы переноса дырки при $\sim 2650\text{ см}^{-1}$ и фазово-фононных полос, но приводит к заметному уменьшению их интенсивности по сравнению с гидратированной пленкой, особенно в случае РЦ–TX100 комплексов. Это свидетельствует [30, 31] об ослаблении электронного сопряжения между молекулами БХл в катион-радикале P^+ в вакуум-сухих пленках РЦ, вероятно, более выраженное в пленках РЦ–TX100.

В частотной области $1760\text{--}1620\text{ см}^{-1}$ ИК-Фурье-спектр P^+Q^-/PQ гидратированной пленки РЦ (рис. 4) показывает сигналы, преимущественно связанные с высокочастотными сдвига-

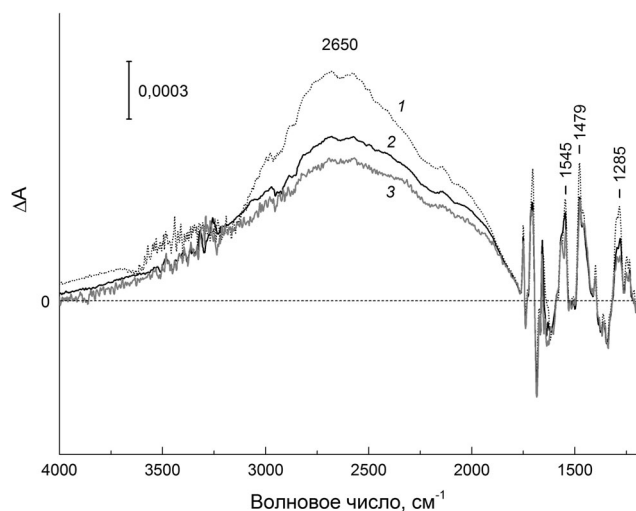


Рис. 3. Сравнение фотоиндуцированных дифференциальных «свет минус темнота» ИК-Фурье-спектров P^+Q^-/PQ реакционных центров в гидратированной РЦ–ДМ пленке (1) и вакуум-сухих (10^{-2} мм. рт. ст.) пленках, содержащих ДМ ($n = 220$) (2) и TX100 ($n = 106$) (3) в области $4000\text{--}1200\text{ см}^{-1}$. Спектры нормированы по амплитуде дифференциального сигнала (+)1750/(–)1738 см^{-1}

ми карбонильных мод молекул P_A и P_B при фотоокислении P [29]. В спектре вакуум-сухой пленки РЦ–ТХ100 (кривая 3) наблюдается относительное увеличение интенсивности полосы валентных колебаний 13^1 -кето-группы P_A^+ при 1713 см^{-1} по сравнению с аналогичной полосой 13^1 -кето-группы P_B^+ при 1704 см^{-1} . Соотношение интенсивностей полос при 1713 и 1704 см^{-1} в спектре вакуум-сухой пленки РЦ–ДМ (кривая 2) является промежуточным между соотношениями, наблюдаемыми для гидратированной пленки и вакуум-сухой пленки РЦ–ТХ100.

Недавно Malferrari et al. [18], анализируя качественно сходные изменения ИК-Фурье-спектров $P^+Q_A^-/PQ_A$, наблюдавшиеся при дегидратации пленок РЦ–ЛДАО из *Rba. sphaeroides* дикого типа (штамм 2.4.1.), уравновешенных при различной относительной влажности, пришли к выводу, что дегидратация РЦ индуцирует перераспределение заряда в катион-радикале P^+ в пользу P_A^+ . В рамках этой интерпретации наблюдаемые нами изменения в ИК-спектрах (рис. 3 и 4) согласуются с предположением о том, что вакуумное высушивание приводит к более значительным изменениям в электронной структуре димера P^+ в пленках РЦ–ТХ100, чем в пленках РЦ–ДМ, вызывая более сильную локализацию заряда на одной из половин P^+ в случае ТХ100.

Фотохимическая активность РЦ–ДМ комплексов в вакуум-сухом состоянии. Для того, чтобы качественно сопоставить протекторный эффект ДМ с фотохимической активностью РЦ в вакууме, на рис. 5 представлены результаты измерений кинетики абсорбционных изменений при 850 нм , связанных с фотоокислением P в вакуум-сухих ($7 \cdot 10^{-5}\text{ мм. рт. ст.}$) пленках РЦ–ДМ при стационарном освещении светом видимого диапазона при комнатной температуре. На вставке (а) показан спектр фотоиндуцированных абсорбционных изменений, измеренный для РЦ–ДМ пленок в области Q_y переходов пигментов. Спектр отражает образование состояния $P^+Q_A^-$ [32], включая выцветание длинноволновой полосы поглощения P с максимумом при 850 нм и электрохромные сдвиги полос поглощения мономерных молекул БХл и молекул БФео. Световая зависимость фотоиндуцированных изменений поглощения вакуум-сухой пленки РЦ при 850 нм , представленная на вставке (б), показывает, что насыщение фотосигнала наблюдалось при $\sim 200\text{ мВт/см}^2$. Не менее 60% РЦ в пленке сохраняли фотохимическую активность в вакууме, исходя из степени выцветания полосы P при 850 нм в условиях насыщающего освещения (данные не показаны).

Из рис. 5 можно заключить, что пленки РЦ–ДМ характеризуются достаточно высоким

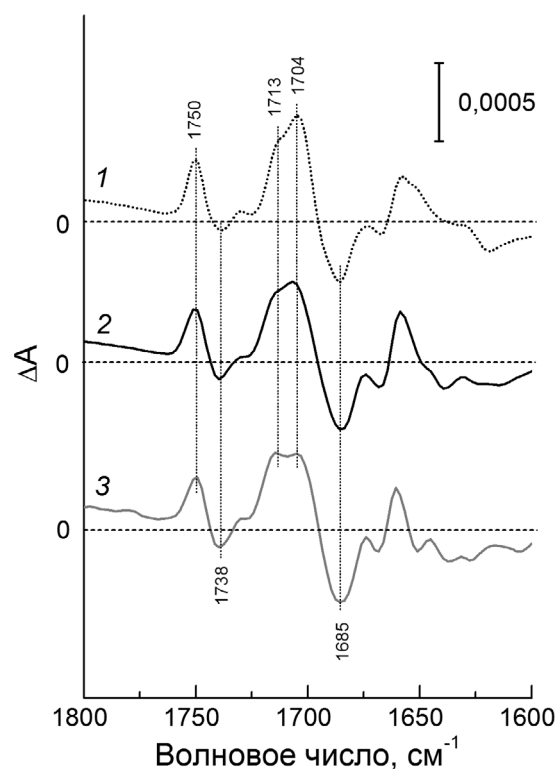


Рис. 4. Область валентных колебаний С=О-групп ($1800\text{--}1600\text{ см}^{-1}$) дифференциальных ИК-Фурье-спектров P^+Q^-/PQ , представленных на рис. 3. Для удобства сравнения спектры смещены друг относительно друга по оси ординат

уровнем фотохимической активности в вакууме и способны выдерживать возбуждение светом высокой интенсивности (200 мВт/см^2) без заметных изменений в амплитуде и кинетике фотосигнала.

На примере трех различных детергентов мы показали, что устойчивость изолированных РЦ из *Rba. sphaeroides* R-26 к деструктивным эффектам вакуумного высушивания в большой степени зависит от типа и концентрации детергента, используемого для солиubilизации белка РЦ и получения пленок. Причины различного поведения в этом отношении ДМ, ТХ100 и ЛДАО следует, по-видимому, искать в особенностях их взаимодействий с белком РЦ. Согласно данным, полученным методом дифракции нейтронов на кристаллах РЦ из пурпурных бактерий [33, 34], молекулы детергента образуют непрерывный мицеллярный пояс вокруг гидрофобных трансмембранных спиралей белка РЦ. Было отмечено, что кристаллы РЦ представляют собой трехфазную систему, в которой взаимодействия между фазами детергент–белок, детергент–растворитель, белок–растворитель вносят важный вклад в энергию системы [33]. В условиях вакуума, когда растворитель (вода) ин-

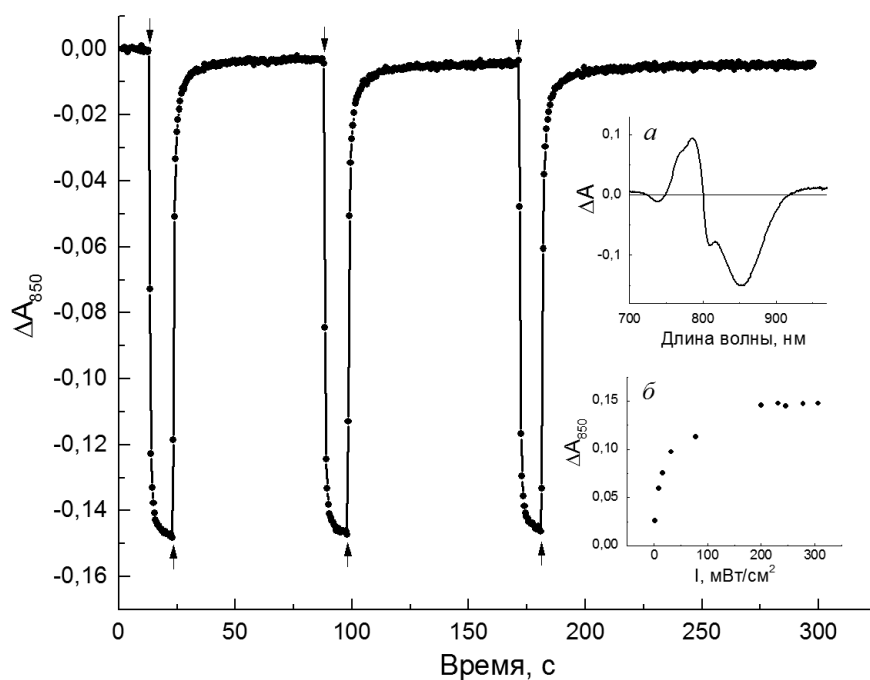


Рис. 5. Кинетика фотоиндуцированных изменений поглощения в полосе Р при 850 нм. Вставка (а): разностный спектр «свет минус темнота» в области 700–1000 нм, полученный при стационарном освещении (340–600 нм; 200 мВт/см²) вакуум-сухой ($7 \cdot 10^{-5}$ мм. рт. ст.) пленки РЦ-ДМ ($n = 220$). Вставка (б): кривая насыщения фотосигнала, полученная при стационарном освещении (340–600 нм) в диапазоне интенсивностей 2–300 мВт/см². Стрелки ↓ и ↑ указывают моменты включения и выключения возбуждающего света соответственно

тенсивно удаляется из пленки РЦ, взаимодействие детергент–белок и свойства мицелл детергента играют, по-видимому, доминирующую роль в поддержании структуры РЦ. Исследования влияния детергентов на мембранные белки в сухих пленках в вакууме в литературе, по-видимому, не представлены. Имеются, однако, обширные данные, полученные для комплексов мембранных белков с различными детергентами в вакууме методами масс-спектрометрии [10, 11] и молекулярной динамики [35]. Было найдено, что мицеллы ДМ обладают хорошо выраженной способностью поддерживать целостность мембранных белков в процессе их переноса из раствора в вакуум масс-спектрометра [10]. Недавние молекулярно-динамические расчеты показали, что стабилизирующий эффект ДМ на структуру α -спирального мембранного белка в вакууме, по-видимому, связан с сохранением структуры мицеллы ДМ, характерной для раствора, за счет образования дополнительных водородных связей между остатками мальтозы [35]. В то же время дегидратация в вакууме комплексов цвиттерионных детергентов с α -спиральным мембранным белком приводила к инверсии мицеллы и оголению части поверхности белка в вакууме, что сопровождалось заметными изменениями вторичной и тре-

тичной структуры белка [35]. ЛДАО содержит сильно полярную аминокислотную группу и по свойствам ближе к алкил-ионным, чем к неионным детергентам [36]. Возможно, необратимые изменения структуры РЦ в вакууме, наблюдаемые в присутствии ЛДАО, связаны с нарушением структуры мицелл и возникновением ненативных электростатических контактов между молекулами ЛДАО и белком.

Как и в случае ДМ, умеренный стабилизирующий эффект в вакууме при низкой концентрации ТХ100, возможно, обусловлен неионной природой этого детергента. Однако причины дестабилизирующего действия ТХ100 при высоких концентрациях остаются неясными. Возможно, это связано с особенностями мицеллообразования этого детергента. Интересно, что в отсутствие воды при комнатной температуре ТХ100, в отличие от ДМ, не склонен к сегрегации неполярных и полярных групп и представляет собой изотропную жидкость [37].

Потенциально способность мицелл ДМ обеспечивать достаточно высокий уровень стабилизации структуры и функциональных свойств РЦ, даже в жестких условиях вакуумного высушивания, может оказаться полезной при разработке искусственных гибридных фотопреобразующих систем, содержащих бактериаль-

ные РЦ. Примечательной в этом отношении особенностью вакуум-сухих пленок РЦ–ДМ является их достаточно высокий уровень фотохимической активности при освещении постоянным светом высокой интенсивности (рис. 5).

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания № АААА-А17030110140-5 и при час-

тичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00829).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blankenship, R.E. (2014) *Molecular mechanisms of photosynthesis*, Wiley Blackwell, Chichester.
- Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H., and Rees, D.C. (1987) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the protein subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6162–6166, doi: 10.1073/pnas.84.17.6162.
- Koepke, J., Kramer, E.-M., Klinge, A.R., Sebban, P., Ullmann, G.M., and Fritzsche, G. (2007) pH modulates the quinone position in the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* in the neutral and charge separated states, *J. Mol. Biol.*, **371**, 396–409, doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.082.
- Jones, M. (2009) In *The purple phototrophic bacteria* (Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., and Beatty, J.T., eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 295–321.
- Lu, Y., Xu, J., Liu, B., and Kong, J. (2007) Photosynthetic reaction center functionalized nano-composite films: effective strategies for probing and exploiting the photo-induced electron transfer of photosensitive membrane protein, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1173–1185, doi: 10.1016/j.bios.2006.05.026.
- Das, R., Kiley, P.J., Segal, M., Norville, J., Yu A.A., Wang, L., Trammell, S.A., Reddick, L.E., Kumar, R., Stellacci, F., Lebedev, N., Schnur, J., Bruce, B.D., Zhang, S., and Baldo, M. (2004) Integration of photosynthetic protein molecular complexes in solid-state electronic devices, *Nano Lett.*, **4**, 1079–1083, doi: 10.1021/nl049579f.
- Kiley, P., Zhao, X., Vaughn, M., Baldo, M.A., Bruce, B.D., and Zhang, S. (2005) Self-assembling peptide detergents stabilize isolated photosystem I on a dry surface for an extended time, *PLoS Biol.*, **3**, e230, doi: 10.1371/journal.pbio.0030230.
- Lukashev, E.P., Knox, P.P., Oleinikov, I.P., Seifullina, N.Kh., and Grishanova, N.P. (2016) Investigation of stability of photosynthetic reaction center and quantum dot hybrid films, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 58–63, doi: 10.1134/S0006297916010065.
- Xia, N., May, C.J., McArthur, S.L., and Castner, D.G. (2002) Time-of-flight secondary ion mass spectrometry analysis of conformational changes in adsorbed protein films, *Langmuir*, **18**, 4090–4097, doi: 10.1021/la020022u.
- Barrera, N.P., Di Bartolo, N., Booth P.J., and Robinson, C.V. (2008) Micelles protect membrane complexes from solution to vacuum, *Science*, **321**, 243–246, doi: 10.1126/science.1159292.
- Reading, E., Liko, I., Allison, T.M., Benesch, J.L.P., Laganowsky, A., and Robinson, C.V. (2015) The role of the detergent micelle in preserving the structure of membrane proteins in the gas phase, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 4577–4581, doi: 10.1002/anie.201411622.
- Seibert, M., Picorel, R., Rubin, A.B., and Connolly, J.S. (1988) Spectral, photophysical, and stability properties of isolated photosystem II reaction center, *Plant Physiol.*, **87**, 303–306, doi: 10.1104/pp.87.2.303.
- Gall, B., and Scheer, H. (1998) Stabilization of photosystem II reaction centers: influence of bile salt detergents and low pH, *FEBS Lett.*, **431**, 161–166, doi: 10.1016/S0014-5793(98)00739-X.
- Zabelin, A.A., Shkuropatova, V.A., Shuvalov, V.A., and Shkuropatov, A.Ya. (2011) FTIR spectroscopy of the reaction center of *Chloroflexus aurantiacus*: photoreduction of the bacteriopheophytin electron acceptor, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1013–1021, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.05.018.
- Moller, J.V., and le Maire, M. (1993) Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins, *J. Biol. Chem.*, **268**, 18659–18672.
- Zabelin, A.A., Shkuropatova, V.A., Shuvalov, V.A., and Shkuropatov, A.Ya. (2012) FTIR spectroscopy of the reaction center of *Chloroflexus aurantiacus*: photooxidation of the primary electron donor, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 157–164, doi: 10.1134/S000629791202006X.
- Clayton, R. (1978) Effects of dehydration on reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **504**, 255–264, doi: 10.1016/0005-2728(78)90174-3.
- Malferrari, M., Turina, P., Francia, F., Mezzetti, A., Leibl, W., and Venturoli, G. (2015) Dehydration affects the electronic structure of the primary electron donor in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence from visible-NIR and light-induced difference FTIR spectroscopy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **14**, 238–251, doi: 10.1039/c4pp00245h.
- Hughes, A.V., Rees, P., Heathcote, P., and Jones, M.R. (2006) Kinetic analysis of the thermal stability of the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biophys. J.*, **90**, 4155–4166, doi: 10.1529/biophysj.105.070029.
- Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1073–1101, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
- Arrondo, J.L.R., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F.M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **59**, 26–56, doi: 10.1016/0079-6107(93)90006-6.
- Nabedryk, E., Mantele, W., and Breton, J. (1989) In *Techniques and new developments in photosynthesis research* (Barber, J., Malkin, R., eds.), NATO ASI Ser, Vol. 168, Plenum Press, New York, pp. 17–34.
- Popova, A.V., Hundertmark, M., Seckler, R., and Hinch, D.K. (2011) Structural transitions in the intrinsically disordered plant dehydration stress protein LEA7 upon drying are modulated by the presence of membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1879–1887, doi: 10.1016/j.bbame.2011.03.009.
- Yoneda, J.S., Miles, A.J., Araujo, A.P., and Wallace, B.A. (2017) Differential dehydration effects on globular proteins

- and intrinsically disordered proteins during film formation, *Protein Sci.*, **26**, 718–726, doi: 10.1002/pro.3118.
25. Lutz, M., and Mantele, W. (1991) In *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 855–902.
 26. Morita, E.H., Hayashi, H., and Tasumi, M. (1993) Temperature dependence of the light-induced infrared difference spectra of chromatophores and reaction centers from photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1142**, 146–154, doi: 10.1016/0005-2728(93)90096-X.
 27. Nikolaev, G.M., Knox, P.P., Kononenko, A.A., Grishanova, N.P., and Rubin, A.B. (1980) Photo-induced electron transport and water state in *Rhodospirillum Rubrum* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta*, **590**, 194–201, doi: 10.1016/0005-2728(80)90024-9.
 28. Francia, F., Palazzo, G., Mallardi, A., Cordone, L., and Venturoli, G. (2003) Residual water modulates Q_A -to- Q_B electron transfer in bacterial reaction centers embedded in trehalose amorphous matrices, *Biophys. J.*, **85**, 2760–2775, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74698-0.
 29. Naberdyk, E., Allen, J.P., Taguchi, A.K.W., Williams, J.C., Woodbury, N.W., and Breton, J. (1993) Fourier transform infrared study of the primary electron donor in chromatophores of *Rhodobacter sphaeroides* with reaction centers genetically modified at residues M160 and L131, *Biochemistry*, **32**, 13879–13885, doi: 10.1021/bi00213a017.
 30. Breton, J., Naberdyk, E., and Parson, W.W. (1992) A new infrared electronic transition of the oxidized primary electron donor in bacterial reaction centers: a way to assess resonance interactions between the bacteriochlorophylls, *Biochemistry*, **31**, 7503–7510, doi: 10.1021/bi00148a010.
 31. Reimers, J.R., and Hush, N.S. (2003) Modeling the bacterial photosynthetic reaction center. VII. Full simulation of the intervalence hole-transfer absorption spectrum of the special-pair radical cation, *J. Chem. Phys.*, **119**, 3262–3277, doi: 10.1063/1.1589742.
 32. Shuvalov, V.A., Shkuropatov, A.Ya., Kulakova, S.M., Ismailov, M.A., and Shkuropatova, V.A. (1986) Photoreactions of bacteriopheophytins and bacteriochlorophylls in reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides* and *Chloroflexus aurantiacus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **849**, 337–346, doi: 10.1016/0005-2728(86)90145-3.
 33. Roth, M., Lewit-Bentley, A., Michel, H., Deisenhofer, J., Huber, R., and Oesterhelt, D. (1989) Detergent structure in crystals of a bacterial photosynthetic reaction centre, *Nature*, **340**, 659–662, doi: 10.1038/340659a0.
 34. Roth, M., Arnoux, B., Ducruix, A., and Reiss-Husson F. (1991) Structure of the detergent phase and protein–detergent interactions in crystals of the wild-type (strain Y) *Rhodobacter sphaeroides* photochemical reaction center, *Biochemistry*, **30**, 9403–9413, doi: 10.1021/bi00103a003.
 35. Rouse, S.L., Marcoux, J., Robinson, C.V., and Sansom, M.S.P. (2013) Dodecyl maltoside protects membrane proteins in vacuo, *Biophys. J.*, **105**, 648–656, doi: 10.1016/j.bpj.2013.06.025.
 36. Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E., and Tanford, C. (1979) Properties of detergents, *Methods Enzymol.*, **56**, 734–749, doi: 10.1016/0076-6879(79)56066-2.
 37. Giorgio, G., Colafemmina, G., Mavelli, F., Murgiac, S., and Palazzo, G. (2016) The impact of alkanes on the structure of Triton X100 micelles, *RSC Adv.*, **6**, 825–836, doi: 10.1039/c5ra21691e.

SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF *Rhodobacter sphaeroides* R-26 REACTION CENTER FILMS UNDER VACUUM CONDITIONS

A. A. Zabelin*, V. A. Shkuropatova, V. A. Shuvalov, and A. Ya. Shkuropatov

Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: zabelin.bio@gmail.com

Received April 3, 2019

Revised June 5, 2019

Accepted June 5, 2019

Using absorption spectroscopy in visible/near-IR and mid-IR regions, the spectral and photochemical properties of isolated reaction centers (RCs) from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 are studied in dried films on the surface of inorganic supports (quartz or CaF₂ plates) under vacuum dehydration conditions (10⁻² or 7·10⁻⁵ mm Hg). Three detergents, i.e., *N,N*-dimethyldodecylamino-*N*-oxide (LDAO), Triton X-100 (TX100), and *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DM), were tested for their ability to stabilize RC–detergent complexes in the vacuum-dried state. It is shown that in the presence of LDAO, RC-complexes undergo destruction in vacuum. In contrast, DM provides an environment that minimizes irreversible disruptive changes in RC under vacuum conditions. Vacuum dehydration of RC–DM films caused a small increase in the content of α -helices in the RC protein, a short-wavelength reversible shift in the optical transitions of pigments, and minor changes in the electronic structure of the P⁺ dimer. The films retained photochemical activity upon excitation with high intensity light (200 mW/cm²). TX100 also helps to maintain the spectral and functional properties of RC in vacuum, however, in this case the stabilizing effect is less pronounced than in the presence of DM, especially at high concentrations of the detergent. The results are discussed within the framework of a model suggesting that upon vacuum dehydration of RC-complexes, the detergent–protein interactions and the properties of detergent micelles play a dominant role in maintaining the RC structure. The data obtained can be useful in the development of hybrid photoconverting systems containing bacterial RCs.

Keywords: reaction center, absorption spectroscopy, vacuum dehydration, detergent, micelles, *Rhodobacter sphaeroides* R-26