

УДК 541.14

## ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ И ОСМОЛИТОВ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ НАТИВНЫХ И МУТАНТНЫХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ *Rhodobacter sphaeroides*

© 2021 Т.Ю. Фуфина\*, Л.Г. Васильева

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино,  
Московская область, Россия; электронная почта: tat.fufina@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.12.2020

После доработки 18.02.2021

Принята к публикации 24.02.2021

Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* является одним из наиболее изученных трансмембранных пигмент-белковых комплексов. Он относительно стабилен, известны условия для его выделения из мембран, очистки и хранения. Однако при внесении аминокислотных замен в белковую структуру этого РЦ нередко наблюдается значительное снижение стабильности комплекса. Это выражается в падении выхода РЦ при его выделении и очистке, а также влияет на спектральные свойства РЦ при хранении и может приводить к гетерогенности образцов. С целью оптимизации условий работы с мутантными РЦ было исследовано влияние различных детергентов и осмолитов на устойчивость комплекса к повышенным температурам. Показано, что трегалоза и в меньшей степени сахароза, мальтоза и гидроксиэктоин в концентрации 1 М замедляют термальную денатурацию РЦ. Также продемонстрировано, что холат натрия оказывает значительный стабилизирующий эффект на структуру как нативных, так и генетически модифицированных РЦ. Использование холата натрия в качестве детергента для растворения РЦ имеет ряд преимуществ и может быть рекомендовано для хранения и изучения мутантных мембранных комплексов пурпурных бактерий в длительных экспериментах.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** реакционный центр фотосинтеза, термостабильность мембранных белков, детергенты, осмолиты, трегалоза, холат натрия, *Rhodobacter sphaeroides*.

DOI: 10.31857/S0320972521040126

### ВВЕДЕНИЕ

Мембранные белки играют важную роль во многих клеточных процессах и имеют значительный потенциал в области биотехнологий [1–3]. Для изучения и практического использования этих белков важен не только процесс выделения их из мембран, но также сохранение нативной структуры и биологической активности. Для сольubilизации белковых комплексов из мембран применяются детергенты, способствующие переводу интегральных белков в растворенное состояние. Используемая при сольubilизации концентрация детергентов близка к критической концентрации мицеллообразования, которая индивидуальна для каждого детергента [4]. При растворении и хранении мемб-

ранного белка концентрацию детергента снижают до уровня, достаточного для образования гидрофобного окружения белка, предотвращающего агрегацию и стабилизирующего природную структуру биополимера [5]. На сегодняшний день универсального для всех мембранных белков детергента не найдено, поэтому для каждого белка индивидуально подбираются как сами детергенты, так и соотношение детергент/белок, время и условия сольubilизации [4, 5].

Согласно одной из принятых классификаций, детергенты делятся на ионные, неионные и цвиттерионные [5]. Считается, что в отношении сольubilизации белков из мембран эффективность детергентов уменьшается в следующем порядке: ионные > цвиттерионные > неионные, в то время как эффективность детергентов в поддержании стабильности белков уменьшается в обратном порядке [6]. Отдельно выделяют соли желчных кислот, которые, хотя и являются ионными детергентами, характеризуются более мягким действием на структуру белка [7]. В последние годы опубликовано немало экспериментальных работ и обзоров, посвященных различным подходам, направленным на стабилизацию

Принятые сокращения: БФео – бактериофеофитин; БХл – бактериохлорофилл; ЛДАО – лауридиметиламиноксид; РЦ – реакционный центр; ТДМ – Tris–додецилмальтозид; ТЛ – Tris–ЛДАО; ТОГ – Tris – n-октилглюкозид; ТТ – Tris – Тритон-X100; ТХ – Tris – холат натрия; Р – специальная пара бактериохлорофиллов Р<sub>А</sub> и Р<sub>В</sub>; ФС2 – фотосистема 2.

\* Адресат для корреспонденции.

структуры мембранных белков в растворе [6, 8, 9]. В ряде исследований для этой цели использованы осмолиты – дисахариды, полиолы, некоторые аминокислоты, а также эктоины [10–14]. Известно, что осмолиты вырабатываются различными организмами в ответ на неблагоприятные условия, такие как нехватка воды и высокие температуры.

Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурной бактерии *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* является одним из наиболее изученных трансмембранных пигмент-белковых комплексов. Он состоит из трех белковых субъединиц и десяти кофакторов переноса электрона [15]. Кофакторы представлены четырьмя молекулами бактериохлорофилла (БХл), две из которых образуют специальную пару, представляющую собой первичный донор электрона (Р), двумя молекулами бактериофеофитина (БФео), двумя молекулами убихинона, молекулой каротиноида и атомом негемового железа. Описанный РЦ относительно стабилен, для него подобраны условия солиubilизации из мембран, очистки и хранения, известны детергенты, способствующие сохранению его фотохимической активности [6, 16]. В последние годы в структурно-функциональных исследованиях РЦ активно используется сайт-направленный мутагенез с целью замены определенных аминокислотных остатков белковой цепи [17]. В спектре поглощения бактериальных РЦ хорошо различимы полосы поглощения бактериохлороиновых кофакторов, что позволяет судить об изменении пигмент-белковых взаимодействий, вызванных как внесенными генетическими модификациями, так и воздействием неблагоприятных факторов среды. В ходе изучения мутантных РЦ было показано, что ряд аминокислотных замен вблизи кофакторов влияет на стабильность комплексов. В результате мутантные РЦ легче подвергаются денатурации, что снижает их выход при очистке, затрудняет кристаллизацию и проведение продолжительных экспериментов, а также может приводить к спектральной гетерогенности образцов [18]. Одним из примеров такого дестабилизирующего действия точечной мутации является описанный нами ранее РЦ *Rba. sphaeroides* с заменой изолейцина 177 в L-субъединице на гистидин I(L177)H [19]. В связи с этим оптимизация условий хранения и изучения мутантных РЦ является актуальной задачей.

Существует ряд подходов для определения стабильности мембранных белков, такие как SDS-электрофорез в ПААГ, дифференциальная сканирующая калориметрия, метод кругового дихроизма [5], использование фьюжн-белков с флуоресцентными метками [20]. При изучении

фотосинтетических комплексов в некоторых работах использовали мониторинг спектров поглощения при инкубировании РЦ в течение длительного времени в темноте при 4 °С [8] или при воздействии 25, 48 и 70 °С [7, 19, 21]. Скорость денатурации белка оценивали методом динамического светорассеяния, методом регистрации флуоресценции с использованием фьюжн-белков или по изменению полос бактериохлороиновых кофакторов и появлению полос агрегированных пигментов в спектре поглощения комплексов.

В данной работе была исследована устойчивость фотосинтетических РЦ *Rba. sphaeroides* дикого типа и мутантного комплекса I(L177)H к повышенным температурам в присутствии ряда детергентов и осмолитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе мы изучали изолированные реакционные центры *Rba. sphaeroides*. Бактериальную культуру выращивали на среде Хатнера в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл) («PanReac AppliChem», Испания, Германия) и канамицина (5 мкг/мл) («MP Biomedicals», США), как описано ранее [22]. Реакционные центры выделяли методом ионообменной хроматографии [23]. Полученные РЦ растворяли в 20 мМ Tris-HCl буфере pH 8,0, содержащем 0,1% лаурилдиметиламиноксид (ТЛ-буфер) («Sigma-Aldrich», США), 0,05% Тритон-X100 (ТТ-буфер) («Helicon», Россия), 0,6% н-октил-глюкозид (ТОГ-буфер) («Serva», США) [24], 0,03% додецилмальтозид (ТДМ-буфер) («PanReac AppliChem»), 0,2% хлорид натрия (ТХ-буфер) («Sigma-Aldrich») [24]. Для смены детергента образец в ТЛ-буфере концентрировали, затем разбавляли буферным раствором с необходимым детергентом и снова концентрировали, повторяя эту процедуру дважды. Во всех экспериментах использовали образец РЦ с оптической плотностью, равной единице – при 804 нм для дикого типа и при 807 нм для мутанта I(L177)H. К образцам добавляли аскорбат натрия (1 мМ) («Sigma-Aldrich») для поддержания первичного донора электрона в восстановленном состоянии. Для изучения действия осмолитов образцы РЦ в ТЛ-буфере помещали в 1 М раствор дисахаридов или гидроксиэктоина, как описано ранее [25]. Термостабильность РЦ оценивали при 48, 55 и 70 °С в течение 60 мин согласно описанной нами методике [19]. Измерение спектров поглощения производили на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония). Количество интактных РЦ в образце оценивали по поглощению мономерных БХл при 804 нм для дикого типа и при 807 нм для

I(L177)H), как описано в работе Holden-Dye et al. [21], с учетом светорассеяния образца. Разложение спектров поглощения на гауссианы и построение кривых изменения поглощения проводилось с помощью программы Origin («OriginLab», США). Дифференциальные (свет минус темнота) спектры поглощения измеряли при постоянном освещении с использованием скрещенных светофильтров СЗС-22 и КС-19 на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu»).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В спектре поглощения РЦ дикого типа длинноволновая полоса с максимумом при 865 нм соответствует поглощению первичного донора электрона, полоса с максимумом при 804 нм – поглощению мономерных БХл, а полоса с максимумом при 760 нм – поглощению молекул БФео активной и неактивной цепи переноса электрона (рис. 1, а, спектр 1).

На рисунке 1, а с увеличением времени прогревания при 48 °С заметно уменьшение амплитуды длинноволновой полосы поглощения первичного донора электрона и ее сдвиг в коротковолновую область. Амплитуда полосы поглощения мономерных БХл при 804 нм также уменьшается. В то же время поглощение в области 700–800 нм растет в связи с увеличением светорассеяния и появлением в буферном растворе свободных бактериохлоринов вследствие температурной денатурации белка РЦ. Инкубация образца РЦ в течение 60 мин при температуре 48 °С приводит к практически полному исчезновению полос поглощения димера и мономеров БХл, значительному увеличению поглощения бактериохлоринов при 760 нм, появлению полосы агрегированного БХл при 857 нм, а также к увели-

чению светорассеяния образца, свидетельствующему о денатурации белка (рис. 1, а, спектр 7).

На рисунке 1, б приведены спектры поглощения РЦ дикого типа до нагревания (спектр 1), через 10 и 20 мин прогревания при 48 °С (спектры 2 и 3 соответственно). Спектры поглощения РЦ описаны гауссианами, которые отражают положение полос поглощения БХл и БФео. По изменению амплитуды гауссиан хорошо заметно уменьшение поглощения БХл специальной пары и мономерных БХл и увеличение поглощения свободных бактериохлоринов при 760 нм.

На примере трегалозы и гидроксиэктоина мы определили, что стабилизирующее действие осмолитов на РЦ дикого типа проявлялось при концентрации выше 500 мМ (данные не приведены), поэтому для эксперимента была выбрана концентрация 1 М, используемая также и в ряде других работ [13, 25]. При нагревании РЦ в присутствии осмолитов в спектре поглощения образца наблюдались изменения, аналогичные представленным на рис. 1, а, однако денатурация РЦ была замедлена. Так, амплитуда  $Q_Y$  полосы мономерных БХл при 804 нм за 60 мин инкубации при 48 °С в присутствии трегалозы, мальтозы, сахарозы или гидроксиэктоина уменьшилась на 55, 60, 65 и 70% соответственно. В контрольном образце РЦ поглощение при 804 нм уменьшилось в 5 раз (рис. 2).

На рисунке 3, а отражено влияние неионных (Тритон X-100, додецилмальтозид, н-октил-глюкозид), цвиттерионного (лаурилдиметиламин-оксид – ЛДАО) и анионного (холат натрия) детергентов на термостабильность РЦ дикого типа. Показано, что после 60 мин инкубирования РЦ при 48 °С в буфере, содержащем ЛДАО, додецилмальтозид, Тритон X-100, н-октил-глюкозид или холат натрия, амплитуда  $Q_Y$  полосы мономерных БХл при 804 нм уменьшалась на 80, 55, 50, 15 и

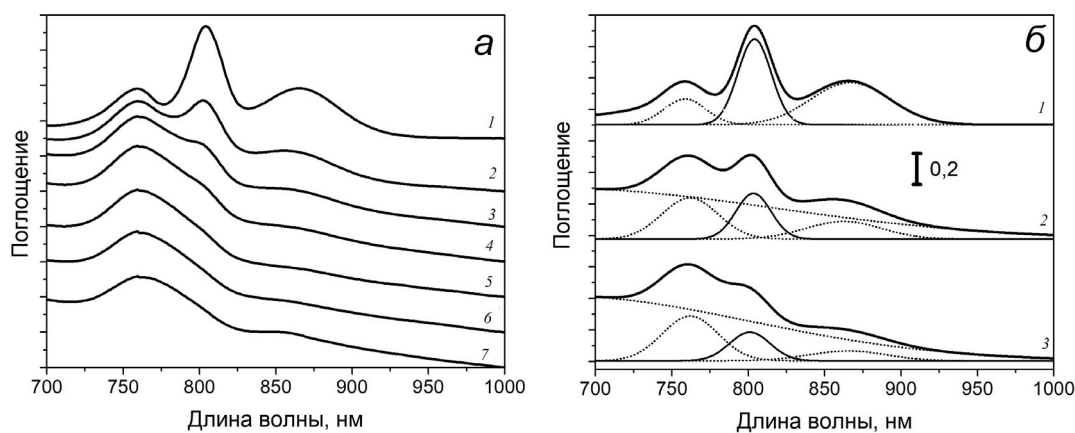


Рис. 1. а – Изменение спектра поглощения РЦ дикого типа в ТЛ-буфере до нагревания и после прогревания при 48 °С в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин (спектры 1–7 соответственно); б – разложение спектра поглощения РЦ дикого типа на гауссианы до нагревания и после прогревания при 48 °С в течение 10 и 20 мин (спектры 1–3 соответственно)

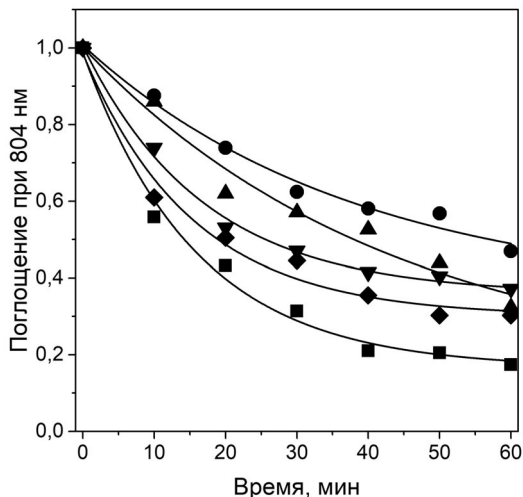


Рис. 2. Изменение поглощения в спектре РЦ дикого типа при 804 нм в условиях инкубирования в ТЛ-буфере в течение 60 мин при 48 °С без добавок (■); в присутствии 1 М раствора трегалозы (●); мальтозы (▲); сахарозы (▼); гидроксизеоина (◆)

5% соответственно. Таким образом, наибольшая устойчивость РЦ к указанной температуре была отмечена в буферных растворах, содержащих холат натрия и *n*-октил-глюкозид (рис. 3, а). На рисунке 3, б представлены спектры поглощения РЦ дикого типа в ТХ-буфере, измеренные в процессе инкубирования при 48 °С в течение 60 мин. При прогревании РЦ дикого типа в ТХ-буфере, в отличие от ТЛ-буфера (рис. 1, а), не происходит заметных изменений в спектре поглощения — соотношение полос пигментов и светорассеяния образца остаются постоянными.

В связи с обнаружением выраженного стабилизирующего эффекта холата натрия и в меньшей степени *n*-октил-глюкозида на структуру РЦ при 48 °С спектры поглощения образца были исследованы и при более высоких температурах, 55 и 70 °С (рис. 4, а и б соответственно). При

55 °С разрушение комплекса происходило в течение первых 10 мин, однако в ТОГ-буфере после 60 мин инкубирования в данных условиях в образце сохранялось 60% нативных комплексов РЦ, в ТХ-буфере — 85% (рис. 4). При повышении температуры до 70 °С в ТЛ и ТОГ буферных растворах происходила быстрая денатурация РЦ с появлением полос агрегированных пигментов в спектре поглощения образца, что затрудняло количественную оценку. В то же время использование ТХ-буфера позволило сохранить 35% интактных РЦ после 60 мин инкубирования при 70 °С (рис. 4, б).

В РЦ дикого типа в ТЛ-буфере на свету регистрируется уменьшение поглощения полосы первичного донора электрона, а также коротковолновый сдвиг полосы поглощения мономерных БХл и длинноволновый сдвиг полосы поглощения БФео в поле зарядов  $P^+Q_A^-$ . В нашей работе показано, что на свету в РЦ дикого типа в ТХ-буфере, как и в ТЛ-буфере, происходят аналогичные спектральные изменения, что указывает на перенос электрона от первичного донора Р к акцептору  $Q_A^-$ . Амплитуды полос в дифференциальном спектре (свет минус темнота) для РЦ в ТЛ- и ТХ-буферах совпадают (рис. 5). Эти данные свидетельствуют о том, что холат натрия не оказывает существенного влияния на процесс фотоиндуцированного переноса электрона в РЦ *Rba. sphaeroides*.

Значительное увеличение устойчивости РЦ к повышенным температурам в присутствии холата натрия было также продемонстрировано на мутантном РЦ с аминокислотной заменой I(L177)N. Ранее было показано, что замена изолейцина в позиции реакционного центра L177 на гистидин привела к снижению термостабильности генетически модифицированного РЦ в ТТ-буфере [19]. После 60 мин инкубирования в ТТ-буфере при 48 °С амплитуда длинноволно-

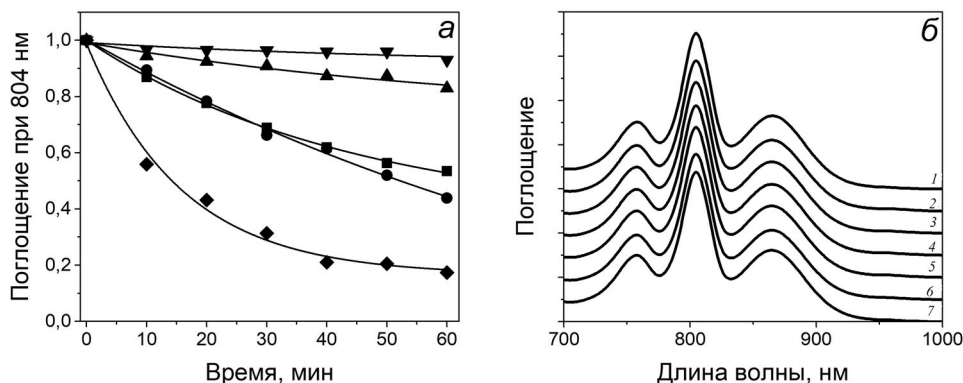
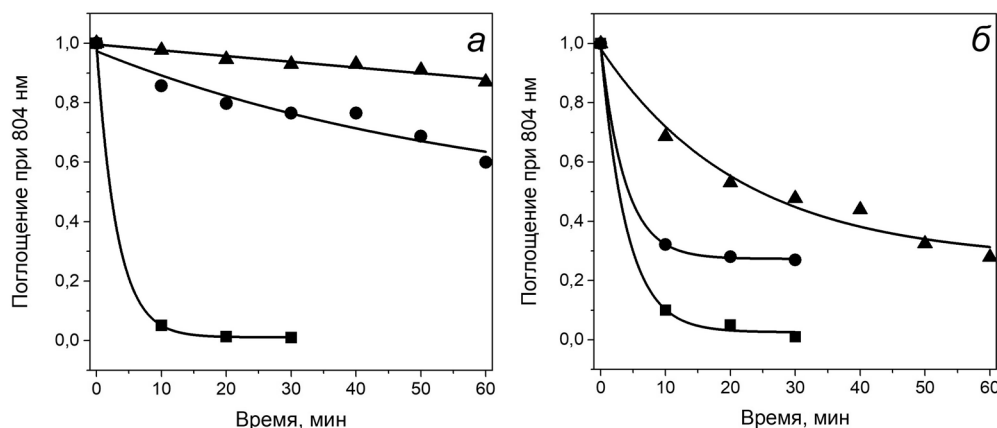


Рис. 3. а — Изменение поглощения при 804 нм в спектре РЦ дикого типа в условиях инкубирования при 48 °С в течение 60 мин в ТЛ-буфере (◆), ТТ-буфере (■), ТДМ-буфере (●), ТОГ-буфере (▲), ТХ-буфере (▼); б — изменение спектра поглощения РЦ дикого типа в ТХ-буфере до нагревания и после прогревания при 48 °С в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин (спектры 1–7 соответственно)



**Рис. 4.** Изменение поглощения при 804 нм в спектре РЦ дикого типа при 55 °С (а) и при 70 °С (б) в ТЛ-буфере (■), ТОГ-буфере (●) и ТХ-буфере (▲)

вой полосы поглощения мономерных БХЛ в РЦ дикого типа снизилась на 45%, а в мутантном РЦ — на 55% [19]. В настоящей работе продемонстрировано, что при инкубировании РЦ дикого типа и мутантного образца I(L177)H при 48 °С в течение 60 мин в ТЛ-буфере амплитуда полосы мономерных БХЛ снижалась на 80 и 85% соответственно, при этом для мутантного РЦ в ТХ-буфере амплитуда снижалась менее чем на 10%, что также близко к термостабильности РЦ дикого типа в аналогичных условиях (рис. 3, а; 6, а). На рисунке 6, б показано изменение поглощения РЦ I(L177)H при 807 нм в условиях инкубирования образца при 55 °С в буфере, содержащем ЛДАО или холат натрия, в присутствии или в отсутствие 1 М трегалозы. Показано, что при 55 °С в ТЛ-буфере денатурация мутантного РЦ происходила в первые 10 мин инкубирования, однако в ТХ-буфере спустя 60 мин инкубирования поглощение при 807 нм оставалось на уровне 80%. Добавление трегалозы в буфер с холатом натрия дополнительно способствовало повышению термостабильности РЦ I(L177)H (рис. 6, б). Таким образом, добавление в буфер холата натрия способствует достижению устойчивости мутантного комплекса к повышенным температурам на уровне РЦ дикого типа.

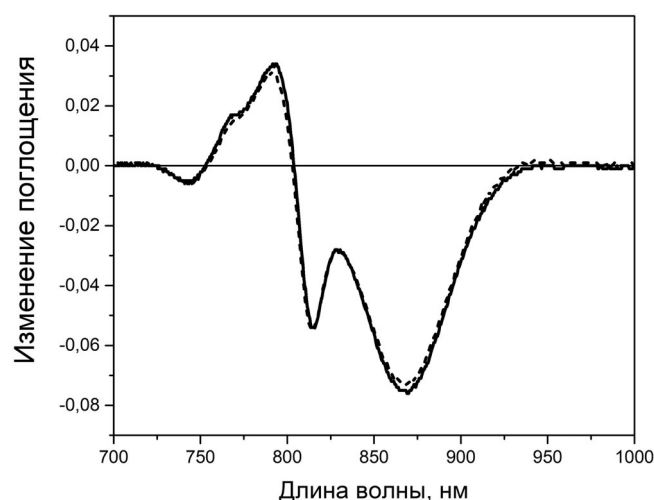
Мы отметили, что хранение РЦ I(L177)H в буфере с холатом натрия при –20 °С не приводит к изменениям спектров поглощения образцов после процедуры оттаивания, в отличие от ТЛ-буфера (Фуфина, неопубликованные данные). Согласно полученным результатам, холат натрия может быть использован для хранения описанных генетически модифицированных РЦ без нарушения их свойств.

Мы также изучили возможность использования холата натрия для кристаллизации РЦ I(L177)H. Было показано, что в течение 4–5 недель при кристаллизации методом *in surfo* в ра-

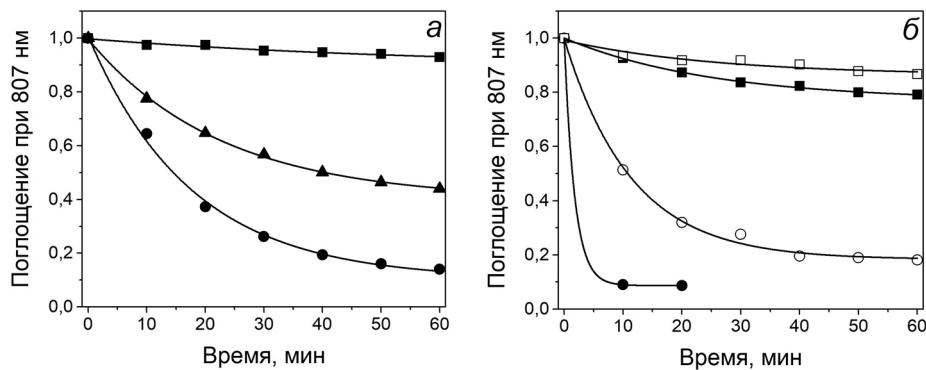
нее описанных условиях [26] в буфере, содержащем холат натрия, кристаллы не образовывались, тогда как в буфере с ЛДАО появились тригональные кристаллы. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что холат натрия не подходит для кристаллизации РЦ *Rba. sphaeroides* в данных условиях.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реакционный центр *Rba. sphaeroides* характеризуется относительной стабильностью и значительной устойчивостью к повышенным температурам [21, 27]. Необходимость стабилизации структуры РЦ возникает при работе с мутантными комплексами, поскольку внесение направленных аминокислотных замен вблизи кофакторов нередко нарушает пигмент-белковые



**Рис. 5.** Дифференциальные (свет минус темнота) спектры поглощения РЦ дикого типа в ТЛ-буфере (пунктирная линия) и ТХ-буфере (сплошная линия), измеренные в диапазоне 700–1000 нм



**Рис. 6.** Изменение поглощения при 807 нм в спектре РЦ I(L177)Н в условиях инкубирования в течение 60 минут при 48 °С (а) и 55 °С (б) в ТЛ-буфере (●), ТХ-буфере (■), ТТ-буфере (▲), а также в ТЛ-буфере в присутствии 1 М трегалозы (○) и в ТХ-буфере буфере в присутствии 1 М трегалозы (□)

взаимодействия. В нашей работе показано, что такие осмолиты, как трегалоза и в меньшей степени сахароза, мальтоза и гидроксизтоин в концентрации 1 М замедляют термальную денатурацию РЦ. Не исключена возможность того, что влияние осмолитов на термостабильность РЦ *Rba. sphaeroides*, продемонстрированное в данной работе, не является специфичным и связано с увеличением плотности буфера за счет высокой концентрации дисахаридов, замедляющей термальную денатурацию белка. Тем не менее полученные результаты согласуются с имеющимися литературными данными о влиянии осмолитов на стабильность других фотосинтетических белков. Так, показано, что гидроксизтоин стабилизирует препараты фотосистемы 2 (ФС2) растений и способствует поддержанию функциональной активности этого комплекса *in vitro* [14]. Сообщается также, что добавление 1 М трегалозы значительно стимулирует фотоиндуцированную активность изолированных комплексов ФС2 [13, 28]. Согласно литературным данным протекторные свойства трегалозы как осмолита предположительно обусловлены такими ее свойствами, как относительная инертность гликозидной связи, высокая температура стеклования, высокая стабильность в широком диапазоне рН и температуры, а также высокая гидрофильность [12, 29]. В отношении действия трегалозы на РЦ пурпурных бактерий следует отметить работы лаборатории проф. Venturoli из университета Болоньи, в которых эти РЦ были исследованы в составе высушенных стеклообразных матриц с трегалозой [10]. В таких образцах при 44 °С спектр поглощения РЦ не изменялся в течение 96 ч [30]. Авторами было продемонстрировано, что в процессе первичного переноса электрона вблизи сайта связывания первичного хинона  $Q_A$  происходят конформационные изменения белка, стабилизирующие состояние с разделенными зарядами  $P^+Q_A^-$  [31].

В нашей работе показано, что выбор подходящего детергента для растворения и хранения РЦ *Rba. sphaeroides* является значительно более важным фактором для стабилизации комплекса по сравнению с добавлением осмолитов. Выявлено, что в присутствии холата натрия устойчивость РЦ к повышенным температурам близка к параметрам, характерным для РЦ в составе мембран [21]. При использовании буфера с холатом натрия при 48 °С термостабильность РЦ I(L177)Н соответствует таковой дикого типа, а при одновременном использовании буфера с холатом натрия и трегалозой термостабильность РЦ мутанта и дикого типа не различаются и при 55 °С. Ранее положительное влияние дезоксихолата на РЦ пурпурных бактерий было отмечено при изучении электронной структуры катионрадикала  $P^{+\bullet}$  в работе Rautter et al. [32]. Заслуживает внимания и работа Gall and Scheer о влиянии детергентов на стабильность изолированных комплексов ФС2 растений, более сложного аналога РЦ пурпурных бактерий [7]. Авторами было отмечено, что среди целого ряда использованных детергентов наиболее выраженное стабилизирующее действие на лабильный комплекс ФС2 проявляли соли желчных кислот – холат, дезоксихолат и 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмонио]-пропан-сульфонат (CHAPS). Авторы предположили, что наблюдаемый эффект обусловлен скорее структурными особенностями молекул солей желчных кислот, чем их ионными свойствами [7]. Отметим, что результаты описанной работы в отношении других детергентов не вполне согласовались с данными нашего исследования. Это несоответствие подтверждает тезис о том, что не существует универсального детергента: для каждого мембранного белка необходимо отдельно подбирать условия для солюбилизации и состав буфера для хранения [4, 5].

Холат натрия, являясь мягким детергентом, не эффективен для изолирования белков из

мембран и при солюбилизации мембранных комплексов обычно используется совместно с другими детергентами [24]. Вместе с тем данная работа показывает, что выбор холата натрия в качестве детергента в буферном растворе для РЦ *Rba. sphaeroides* имеет ряд несомненных преимуществ. Первое, мицеллы холата обладают небольшими размерами, 10–12 Å [33], поэтому при концентрировании РЦ на мембранах с порами 50–100 кДа молекулы детергента проходят сквозь них, и концентрация холата натрия в растворе РЦ не повышается. Это выгодно отличает холат натрия от других часто используемых детергентов, таких как Тритон X-100, ДМ, ОГ и ЛДАО [4]. Второе, РЦ, растворенные в буфере с холатом натрия, при необходимости можно перевести в буфер с другими детергентами, что затруднительно, например, при использовании Тритона X-100. Наконец, третье важное преимущество – холат натрия не только обладает большим стабилизирующим действием на РЦ, но также он значительно дешевле мягких неионных детергентов додецилмальтозида и н-октил-глюкозида. Холат натрия нечасто используется в экспериментах с фотосинтетическими комплексами, что может объясняться потенциальной возможностью влияния этого детергента на фотохимические процессы в связи с его анионной природой. Однако, согласно полученным в нашей работе результатам, холат натрия не оказывает существенного влияния на фотохимическую активность РЦ *Rba. sphaeroides*, что позволяет рекомендовать этот детергент для использования в решении фундаментальных и прикладных задач с привлечением фотосинтетических мембранных белков пурпурных бактерий.

Таким образом, в данной работе показано, что присутствие дисахаридов в растворе оказывает слабый стабилизирующий эффект на структуру РЦ *Rba. sphaeroides* к повышенным температурам, в то время как использование детергента холата натрия значительно повышает устойчивость структуры РЦ, что важно при исследовании мутантных мембранных комплексов в длительных экспериментах. Эта характеристика холата натрия может способствовать его применению при создании искусственных преобразователей световой энергии на основе бактериальных РЦ, поскольку модификации, вносимые в комплекс для адаптации белковой структуры к технологическим требованиям (например, изменение величины редокс-потенциала Р, присоединение к полупроводниковой подложке, улучшение взаимодействия с искусственным донором или акцептором электрона и др.), с большой вероятностью приведут к снижению стабильности структуры РЦ [3].

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А17-117030110140-5 (направленный мутагенез реакционных центров), а также при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 17-00-00207 и № 17-00-00218 (К) (изучение термостабильности реакционных центров).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bayley, H., and Jayasinghe, L. (2004) Functional engineered channels and pores (review), *Mol. Membr. Biol.*, **21**, 209-220, doi: 10.1080/09687680410001716853.
- Reimhult, E., and Kumar, K. (2008) Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports, *Trends Biotechnol.*, **26**, 82-89, doi: 10.1016/j.tibtech.2007.11.004.
- Singh, V. K., Ravi, S. K., Ho, J. W., Wong, J. K. C., Jones, M. R., and Tan, S. C. (2018) Biohybrid photoprotein-semiconductor cells with deep-lying redox shuttles achieve a 0.7 V photovoltage, *Adv. Funct. Mater.*, **28**, 1703689, doi: 10.1002/adfm.201703689.
- Le Maire, M., Champeil, P., and Moller, J. V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochim. Biophys. Acta*, **1508**, 86-111, doi: 10.1016/S0304-4157(00)00010-1.
- Roy, A. (2015) Membrane preparation and solubilization, *Methods Enzymol.*, **557**, 45-56, doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.044.
- Sadaf, A., Cho K. H., Byrne, B., and Chae, P. S. (2015) Amphipathic agents for membrane protein study, *Methods Enzymol.*, **557**, 57-94, doi: 10.1016/bs.mie.2014.12.021.
- 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.
- Odahara, T. (2004) Stability and solubility of integral membrane proteins from photosynthetic bacteria solubilized in different detergents, *Biochim. Biophys. Acta*, **1660**, 80-92, doi: 10.1016/j.bbamem.2003.11.003.
- Breibeck, J., and Rompel, A. (2019) Successful amphiphiles as the key to crystallization of membrane proteins: Bridging theory and practice, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1863**, 437-455, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.11.004.
- Francia, F., Dezi, M., Mallardi, A., Palazzo, G., Cordone, L., and Venturoli, G. (2008) Protein matrix coupling/uncoupling in “dry” systems of photosynthetic reaction center embedded in trehalose/sucrose: the origin of trehalose peculiarity, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 10240-10246, doi: 10.1021/ja801801p.
- Jain, N. K., and Roy, I. (2010) Trehalose and protein stability, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **59**, 4.9.1-4.9.12, doi: 10.1002/0471140864.ps0409s59.
- Ohtake, S., and Wang, Y. J. (2011) Trehalose: current use and future applications, *J. Pharm. Sci.*, **100**, 2020-2053, doi: 10.1002/jps.22458.
- Мамедов М. Д., Петрова И. О., Яныкин Д. В., Заспа А. А., Семенов А. Ю. (2015) Влияние трегалозы на выделение кислорода и перенос электрона в комплексах фотосистемы 2, *Биохимия*, **80**, 79-86, doi: 10.1134/S0006297915010071.

14. Yanykin, D. V., Malferrari, M., Rapino, S., Venturoli, G., Semenov, A. Yu., and Mamedov, M. D. (2019) Hydroxyectoine protects Mn-depleted photosystem II against photoinhibition acting as a source of electrons, *Photosynth. Res.*, **141**, 165-179, doi: 10.1007/s11120-019-00617-w.
15. Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiyama, H., and Rees, D. S. (1987) Structure of reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the cofactors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5730-5734, doi: 10.1073/pnas.84.16.5730.
16. Jones, M. R. (2008) Structural plasticity of reaction centers from purple bacteria, in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., J. Beatty, N., eds) Springer, pp. 295-321.
17. Леонова М. М., Фуфина Т. Ю., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2014) Исследование пигмент-белковых взаимодействий в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий. Глава в кн. *Современные проблемы фотосинтеза*, том 1 (под ред. Аллахвердиева С.И., Рубина А.Б., Шувалова В.А.), Ижевский Институт компьютерных исследований, Москва—Ижевск, с. 157-196.
18. Васильева Л. Г., Фуфина Т. Ю., Габдулхаков А. Г., Шувалов В. А. (2015) Разные последствия одинаковых симметричных мутаций вблизи димера бактериохлорофилла в реакционном центре *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **80**, 767-774, doi: 10.1134/S0006297915060012.
19. Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г., Шувалов В. А. (2010) Исследование стабильности мутантного фотосинтетического реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)H и установление местоположения бактериохлорофилла, ковалентно связанного с белком, *Биохимия*, **75**, 256-263, doi: 10.1134/s0006297910020112.
20. Kawate, T., and Gouaux, E. (2006) Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins, *Structure*, **14**, 673-681, doi: 10.1016/j.str.2006.01.013.
21. Holden-Dye, K., Crouch, L. I., Williams, C. M., Bone, R. A., Cheng, J., et al. (2011) Opposing structural changes in two symmetrical polypeptides bring about opposing changes to the thermal stability of a complex integral membrane protein, *Arch. Biochem. Biophys.*, **505**, 160-170, doi: 10.1016/j.abb.2010.09.029.
22. Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г., Фуфина Т. Ю., Болгарина Т. И., Шувалов В. А. (2005) Влияние замещения изолейцина L177 гистидином на пигментный состав и свойства реакционных центров пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **70**, 1527-1533, doi: 10.1007/s10541-005-0256-3.
23. Fufina, T. Y., Vasilieva, L. G., Khatypov, R. A., Shkuropatov, A. Y., and Shuvalov, V. A. (2007) Substitution of isoleucine L177 by histidine in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center results in the covalent binding of PA bacteriochlorophyll to the L subunit, *FEBS Lett.*, **581**, 5769-5773, doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.032.
24. Dezi, M., Francia, F., Mallardi, A., Colafemmina, G., Palazzo, G., and Venturoli, G. (2007) Stabilization of charge separation and cardiolipin confinement in antenna-reaction center complexes purified from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1041-56, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.05.006.
25. Lippert, K., and Galinski, E. A. (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 61-65, doi: 10.1007/BF00174204.
26. Vasilieva, L. G., Fufina, T. Y., Gabdulkhakov, A. G., Leonova, M. M., Khatypov, R. A., and Shuvalov, V. A. (2012) The site-directed mutation I(L177)H in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center affects coordination of P(A) and B(B) bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407-1417, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.008.
27. 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.
28. Yanykin, D. V., Khorobrykh, A. A., Mamedov, M. D., and Klimov, V. V. (2015) Trehalose stimulation of photoinduced electron transfer and oxygen photoconsumption in Mn-depleted photosystem 2 membrane fragments, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **152**, 279-285, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.033.
29. Fernandez, O., Bethencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S., and Clement, C. (2010) Trehalose and plant stress responses: friend or foe, *Trends Plant Sci.*, **15**, 409-417, doi: 10.1016/j.tplants.2010.04.004.
30. Malferrari, M., Francia, F., and Venturoli, G. (2015) Retardation of protein dynamics by trehalose in dehydrated systems of photosynthetic reaction centers. Insights from electron transfer and thermal denaturation kinetics, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 13600-13618, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b02986.
31. Francia, E., Malferrari, M., SacquinMora, S., and Venturoli, G. (2009) Charge recombination kinetics and protein dynamics in wild type and carotenoidless bacterial reaction centers: studies in trehalose glasses, *J. Phys. Chem.*, **113**, 10389-10398, doi: 10.1021/jp902287y.
32. Rautter, J., Lenzian, F., Lubitz, W., Wang, S., and Allen, J. P. (1994) Comparative study of reaction centers from photosynthetic purple bacteria: electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopy, *Biochemistry*, **33**, 12077-12084, doi: 10.1021/bi00206a010.
33. Маслова, В. А., Киселев, М. А. (2018) Структура мицелл холата натрия, *Кристаллография*, **63**, 446-450, doi: 10.7868/S0023476118030141.

## EFFECT OF DETERGENTS AND OSMOLYTES ON THERMAL STABILITY OF NATIVE AND MUTANT *Rhodobacter sphaeroides* REACTION CENTERS

T. Yu. Fufina\* and L. G. Vasilieva

*Institute of basic biological problems, Russian Academy of Sciences, PSCBR RAS,  
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: tat-fufina@yandex.ru*

Photosynthetic reaction center (RC) of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* is one of the most well-studied transmembrane pigment-protein complexes. It is a relatively stable protein with established conditions for its isolation from membranes, purification, and storage. However, it has been shown that some amino acid substitutions can affect stability of the RC, which results in a decrease of the RCs yield during its isolation and purification, disturbs spectral properties of the RCs during storage, and can lead to sample heterogeneity. To optimize conditions for studying mutant RCs, the effect of various detergents and osmolytes on thermal stability of the complex was examined. It was shown that trehalose and, to a lesser extent, sucrose, maltose, and hydroxyectoin at 1 M concentration slow down thermal denaturation of RCs. Sodium cholate was found to have significant stabilizing effect on the structure of native and genetically modified RCs. The use of sodium cholate as a detergent has several advantages and can be recommended for the storage and investigation of the unstable mutant membrane complexes of purple bacteria in long-term experiments.

**Keywords:** photosynthetic reaction center, thermal stability of membrane proteins, detergents, osmolytes, trehalose, sodium cholate, *Rhodobacter sphaeroides*