

ГЕНЕРАЦИЯ РАЗНОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ ХРОМАТОФОРАМИ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПРИСУТСТВИИ ТРЕГАЛОЗЫ В ОТВЕТ НА СТАЦИОНАРНОЕ ОСВЕЩЕНИЕ

© 2023 Л.А. Витухновская^{1,2}, А.А. Заспа¹, М.Д. Мамедов^{1*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: mahirmamedov@yandex.ru

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.06.2023

После доработки 20.07.2023

Принята к публикации 26.08.2023

Измерение разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в мембранных везикулах (хроматофорах) из пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, ассоциированных с поверхностью нитроцеллюлозного мембранного фильтра (МФ), пропитанного раствором фосфолипидов в декане, а также погруженных внутрь него, в присутствии экзогенных медиаторов и дисахарида трегалозы продемонстрировало увеличение амплитуды и стабилизацию сигнала при стационарном освещении. В качестве медиаторов (донора и акцептора электронов) были использованы пара аскорбат/ N,N,N',N' -тетраметил- p -фенилендиамин и убихинон-0 соответственно. Хотя стабилизация фотоэлектрических ответов при длительном стационарном освещении наблюдалась в обоих случаях иммобилизации хроматофоров, только при погружении образцов внутрь МФ сохранялась функциональная активность работы реакционного центра в течение месяца при их хранении в темноте при комнатной температуре. Стабильные фотоответы, вероятно, связаны с сохранением интактности белков хроматофоров внутри пор МФ. Стабилизирующее действие биопротектора трегалозы может быть обусловлено как его влиянием на белки РЦ, так и на фосфолипидную бислойную мембрану. Полученные результаты позволят расширить современные представления об использовании полусинтетических структур на основе различных интактных фотосинтетических систем, способных преобразовывать солнечную энергию в электрохимическую форму.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроматофоры, реакционный центр, цитохромный bc_1 -комплекс, мембранный фильтр, полупроводник, постоянное освещение, электрический потенциал.

DOI: 10.31857/S0320972523100020, EDN: OSMUJE

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий усилия многих исследователей были сосредоточены на разработке высокоэффективных искусственных систем на основе различных красителей и полупроводников, способных преобразовывать энергию света в электричество (см. обзоры Bella et al. и Calió et al. [1, 2]). Однако использование этих конструкций связано с некоторыми недостатками, такими как

высокая стоимость, применение дорогостоящих компонентов, необходимость их технического обслуживания и утилизации через определённое время. В связи с этим одним из перспективных подходов к созданию фотоэлектрохимических преобразователей энергии является использование природных фотосинтетических систем (см. обзоры Najafpour et al. и Teodor et al. [3, 4]).

Везикулы, образующиеся при выпячивании внутрицитоплазматической мембраны

Принятые сокращения: Аск – аскорбат; БХл – бактериохлорофилл; МФ – мембранный фильтр; РЦ – реакционный центр; ТМФД – N,N,N',N' -тетраметил- p -фенилендиамин; Хром – хроматофоры; цит – цитохром; bc_1 – цитохромный bc_1 -комплекс; ИТО – полупроводник на основе оксида индия-олова; P_{870} – димер хлорофилла; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хинонные акцепторы; УQ – убихинон; UQ_0 – 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон; $\Delta\psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов.

* Адресат для корреспонденции.

(хроматофоры, Хром) в клетках несерных пурпурных бактерий, содержат фотосинтетический аппарат, идеально подходящий для таких исследований. В отличие от тилакоидных мембран цианобактерий и хлоропластов, Хром фотосинтезирующих бактерий представляют собой минимальную структурно-функциональную единицу, способную преобразовывать энергию поглощённых фотонов для синтеза АТФ [5]. Светозависимый циклический перенос электронов в них, например, в *Rhodospira rubra*, осуществляется между реакционным центром (РЦ) и цитохромным bc_1 -комплексом (bc_1) с участием мобильного мембранного пула убихинонов (UQ) и эндогенного растворимого цитохрома (цит) c_2 .

После возбуждения РЦ квантом света фотоактивированный электрон переносится от димера бактериохлорофилла P_{870} (P) к первичному (Q_A), а затем ко вторичному хинонному акцептору (Q_B). Восстановление фотоокисленного P_{870} происходит в результате переноса электрона от периферического белка — донора электронов для РЦ — цит c_2 . Согласно модифицированной концепции Q-цикла (см. обзор Crofts et al. [6]), окисление молекулы убихинола, образовавшейся в РЦ и перенесённой в убихинол-оксидазный центр « Q_o » bc_1 , организовано таким образом, что один электрон возвращается через железо-серный белок Риска (Fe_2S_2) и цит c_1 и c_2 (высокопотенциальная цепь) к фотоокисленному P_{870} , а другой передаётся через двухгемовый цитохром b (низкопотенциальная цепь) в убихинон-редуктазный центр « Q_i » для восстановления молекулы UQ из пула убихинонов. Повторный запуск вышеописанных реакций приводит к образованию «дополнительного» убигидрохинона в сайте « Q_i » и к увеличению выхода протонов в люмен Хром на каждый поглощённый фотон. Здесь же следует отметить, что светоиндуцированное векторное перемещение зарядов в РЦ и bc_1 в мембранных везикулах сопряжено с генерацией трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) [7–11], являющейся первичной формой запасаения энергии.

Таким образом, относительно простое preparativное получение Хром из бактериальных клеток, расположение энергопреобразующих ферментов в интактном липидном окружении, способность РЦ преобразовывать энергию света с высокой квантовой эффективностью и детально исследованный механизм генерации $\Delta\psi$ на отдельных участках электрон-транспортной цепи делают Хром привлекательными объектами для фотоэлектрохимических исследований. При использовании Хром в гибридных

системах *in vitro* одним из важных этапов является их эффективная иммобилизация на носителях (проводники, полупроводники, полимеры, фосфолипидные мембраны) и измерение стационарного электрического потенциала [12–14] и/или тока [12, 15–19]. Однако в приведённых выше работах [12–14] не изучалась генерация $\Delta\psi$ при длительном стационарном освещении. Что касается измерений стационарного тока в Хром [15–19], то они проводились в основном с помощью трёхэлектродной системы при подаче внешнего электрического поля, где амплитуда фототока зависела от величины этого поля.

В настоящей работе мы изучали генерацию разности электрических потенциалов в ответ на стационарное освещение в Хром *Rba. sphaeroides*, иммобилизованных на поверхности нитроцеллюлозного мембранного фильтра (МФ), пропитанного раствором фосфолипидов, с помощью прямого электрометрического метода [13]. Суть этого метода заключается в регистрации $\Delta\psi$ с помощью пары хлорсеребряных (Ag/AgCl) макроэлектродов, погружённых в раствор электролита и соединённых с операционным усилителем. В представленной нами работе полученные результаты сопоставлялись с электрометрическими данными для Хром, погружённых внутрь МФ, зажатого с двух сторон полупроводниковыми стеклянными пластинами на основе оксида индия-олова (англ. indium tin oxide или сокращённо ИТО) [20]. Полученные данные наглядно демонстрируют долговременную и стабильную фотоэлектрическую активность Хром в этих системах в присутствии дисахарида трегалозы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание клеток и получение Хром.

Клетки дикого типа *Rba. sphaeroides* выращивали при 30 °C в анаэробных условиях на среде Ормерода [21] при интенсивности света 800 Вт м⁻². Для получения мембранных везикул с высоким содержанием эндогенного растворимого цит c_2 мы использовали процедуру экстракции, описанную в работе Woronowicz et al. [22], с небольшими модификациями. Клетки, суспендированные в 25 мМ буфере HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащем несколько кристаллов ДНКазы и ингибиторов протеазы, разрушали с помощью Френч-пресса («Aminco», США). После удаления осадка супернатант наносили на градиент плотности сахарозы (5–35%, *m/m*) и центрифугировали

на вертикальном роторе VTi-50, приобретённом в рамках программы развития МГУ, в течение 2 ч при 27 000 об./мин. Нижнюю полосу Хром собирали, дважды диализовали против 25 мМ буфера HEPES-NaOH (pH 7,5) в течение 2 ч и концентрировали. Суспензию Хром (~2 мг бактериохлорофилла (БХл)/мл) замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Концентрацию БХл в Хром определяли, как описано ранее [23]. Спектры поглощения Хром регистрировали на спектрофотометре Hitachi 3400 («Hitachi», Япония).

Измерение разности электрических потенциалов в Хром, иммобилизованных на поверхности МФ. $\Delta\psi$ измеряли с помощью прямого электрометрического метода, разработанного в нашей лаборатории [13]. В качестве матрикса для иммобилизации Хром были использованы МФ (Millipore GSTF, «Millipore», США) с диаметром пор 0,22 мкм и толщиной 150 мкм. Круг из МФ диаметром 2,0 см, пропитанный декановым раствором азолектина (80 мг/мл) (L- α -lecithin, type II-S, «Sigma»), зажимали между двумя частями разборной тefлоновой кюветы так, чтобы фильтр перекрывал отверстие диаметром 0,4 см в перегородке, разделяющей два отсека. Затем оба отсека заполняли буфером 25 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащим 20 мМ MgCl_2 . Хром добавляли только в один отсек ячейки. После перемешивания в течение 1 ч оба отсека ячейки промывались десятикратным объёмом буфера без MgCl_2 с помощью перистальтического насоса для удаления магния и не связавшихся с фильтром Хром.

Используемые экзогенные медиаторы добавлялись в отсек ячейки с иммобилизованными на поверхности МФ Хром перед измерением.

Фотоэлектрические ответы регистрировались при помощи пары хлорсеребряных ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{ M KCl}$) макроэлектродов, погружённых по обе стороны от МФ в раствор электролита. Электроды были подключены к операционному усилителю («Burr Brown», 3554BM, США), а последний, в свою очередь, к аналого-цифровому преобразователю (АЦП, Gage CS8012) и компьютеру. В качестве источника постоянного света использовалась лампа накаливания с мощностью 90 Вт (12 В).

Измерение разности электрических потенциалов в Хром, погружённых внутрь МФ. Для этого реконструировалась система ИТО|Хром—МФ|ИТО. МФ (Millipore GSTF, диаметр пор 0,22 мкм, толщина 150 мкм) размером $2,5 \times 5$ см помещали на поверхность предметного стекла, покрытого полупроводником ИТО. Затем

на поверхность МФ ($\sim 1,0\text{ см}^2$) каплями наносили 30–40 мкл суспензии Хром с концентрацией БХл ~ 2 мг/мл. После 10-минутной темновой адсорбции поверхность МФ промывалась (2×250 мкл) 25 мМ буфером HEPES-NaOH (pH 7,5), и после этого второй электрод ИТО устанавливался сверху.

Следует отметить, что в системе ИТО|Хром—МФ|ИТО медиаторы добавлялись в суспензию Хром до их иммобилизации внутри МФ.

Регистрация электрических потенциалов в системе ИТО|Хром—МФ|ИТО проводилась с помощью медных проводов, соединённых, с одной стороны, с предметными стёклами, покрытыми ИТО, а другой стороны—с операционным усилителем («Burr Brown», 3554BM). Сигнал от усилителя подавался на АЦП (Gage CS8012), подключённый к компьютеру. Насыщающее непрерывное освещение обеспечивалось лампой накаливания (12 В, 90 Вт).

Каждое фотоэлектрическое измерение повторялось не менее 3 раз. Диапазон погрешности для фотоответов составлял $\sim 5\%$. Все измерения проводились при $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Рисунки подготовлены с помощью пакета программ Origin 7.5 («OriginLab Corporation»).

Оптическая спектроскопия. Фотоиндуцированные изменения поглощения при 603 нм, отражающие редокс-свойства первичного донора электронов P_{870} , регистрировали с помощью однолучевого дифференциального спектрофотометра, сконструированного в нашей лаборатории. Измеряющий свет от лампы КГМ-98, питаемой от источника постоянного тока ТЕС-15, проходил через монохроматор HL-1 («Jobin Ivon», Франция), кювету с образцом, стеклянный светофильтр, второй монохроматор УМ-2, а затем попадал на фотоэлектронный умножитель (ФЭУ). Сигнал с ФЭУ через операционный усилитель («Burr Brown», 3554BM) подавался на АЦП (Gage CS8012), подключённый к компьютеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Целью данной работы было исследование генерации $\Delta\psi$ в интактных бактериальных мембранных везикулах при непрерывном освещении. Ранее было показано [24], что Хром, выделенные из несерной пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* в определённых условиях (разрушение клеток с помощью Френч-пресса при низкой ионной силе), содержат $\sim 70\%$ цит c_2 внутри везикул (см. Материалы и методы). В таких Хром восстановление фотоокисленного P_{870} в РЦ может происходить в результате

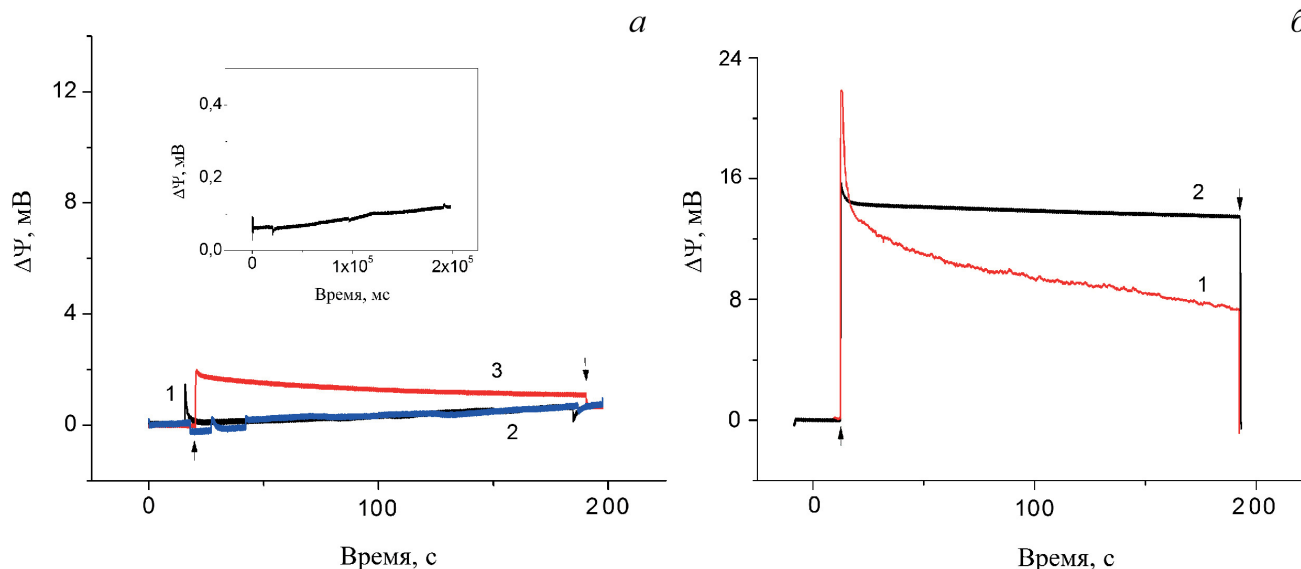


Рис. 1. Генерация электрических потенциалов в Хром. *а* – Генерация разности электрических потенциалов в Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, пропитанного раствором фосфолипидов при стационарном освещении. Размеры пор 0,22 мкм, толщина фильтра 150 мкм. Фильтр пропитывался декановым раствором азолектина (80 мг/мл). Хром без добавок (кривая 1), в присутствии пары 2,5 мМ Аск/150 мкМ ТМФД (кривая 2) и в присутствии только 150 мкМ UQ₀ (кривая 3). Среда инкубации: 25 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5). *б* – Генерация разности электрических потенциалов в среде измерения, содержащей 2,5 мМ Аск/150 мкМ ТМФД и 150 мкМ UQ₀ в отсутствии (кривая 1) и в присутствии (кривая 2) 0,75 М трегалозы. Вставка к рис. 1, *а* – фотоответ в присутствии 5 мМ Аск/150 мкМ ТМФД и 150 мкМ UQ₀, но без Хром. (↑) и (↓) указывают включение и выключение света

прямого переноса электрона от эндогенного цит c_2 [24, 25]. Другими словами, функционально активные Хром должны содержать цит c_2 , который наряду с пулом убихинонов выступает в качестве окислительно-восстановительного переносчика между комплексами РЦ и bc_1 . Содержание цит c_2 было определено нами путём регистрации абсорбционных изменений при 603 нм, отражающих редокс-свойства R_{870} в ответ на одиночные вспышки света в суспензии Хром в отсутствии и в присутствии 2% детергента Triton X-100 (не показано) (см. работу Altamura et al. [26]).

На рис. 1 продемонстрирована генерация $\Delta\psi$ при постоянном освещении Хром *Rba. sphaeroides*, ассоциированных с поверхностью МФ, пропитанного раствором фосфолипида. Видно, что в отсутствии каких-либо добавок (медиаторов) фотоэлектрический ответ не наблюдается (рис. 1, *а*, кривая 1). Следует отметить, что при ассоциации Хром с МФ, пропитанным раствором фосфолипидов в декане, как и в случае с коллоидной плёнкой [9, 10], происходит экстракция UQ как из сайта вторичного хинонного акцептора Q_B в белке РЦ, так и из мембранного пула. Кроме того, происходит окисление цит c_2 и первичного донора электронов – димера БХл R_{870} в РЦ. В этих условиях светоиндуцированный перенос электронов в Хром ограничивается образованием

ион-радикальной пары $R_{870}^+Q_A^-$ внутри белка РЦ. Однако перенос заряда за пределы РЦ в описанной системе может быть реконструирован путём насыщения иммобилизованных Хром экзогенным хиноном и восстановления эндогенного цит c_2 (см. работу Drachev et al. [14]).

В Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, в присутствии только аскорбата (Аск) и N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД) в среде измерения фотоэлектрический ответ также не наблюдался (рис. 1, *а*, кривая 2). Использование пары Аск и ТМФД в концентрациях 2,5 мМ и 150 мкМ соответственно в качестве донора электронов обусловлено необходимостью восстановления растворимого цит c_2 , поскольку он локализован внутри Хром и не взаимодействует с плохо проникающим через мембрану Аск [9].

На рис. 1, *а*, кривая 3 показана генерация $\Delta\psi$ при стационарном освещении в присутствии только акцептора электронов 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинона (UQ₀) в концентрации 150 мкМ. Амплитуда фотоответа в этих условиях составляла ~1,8 мВ. UQ₀ является эффективным экзогенным акцептором электрона от хинонов в РЦ [27, 28] и широко используется в фотоэлектрохимических системах [28].

В качестве контроля на вставке к рис. 1, *а* показана генерация трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в присут-

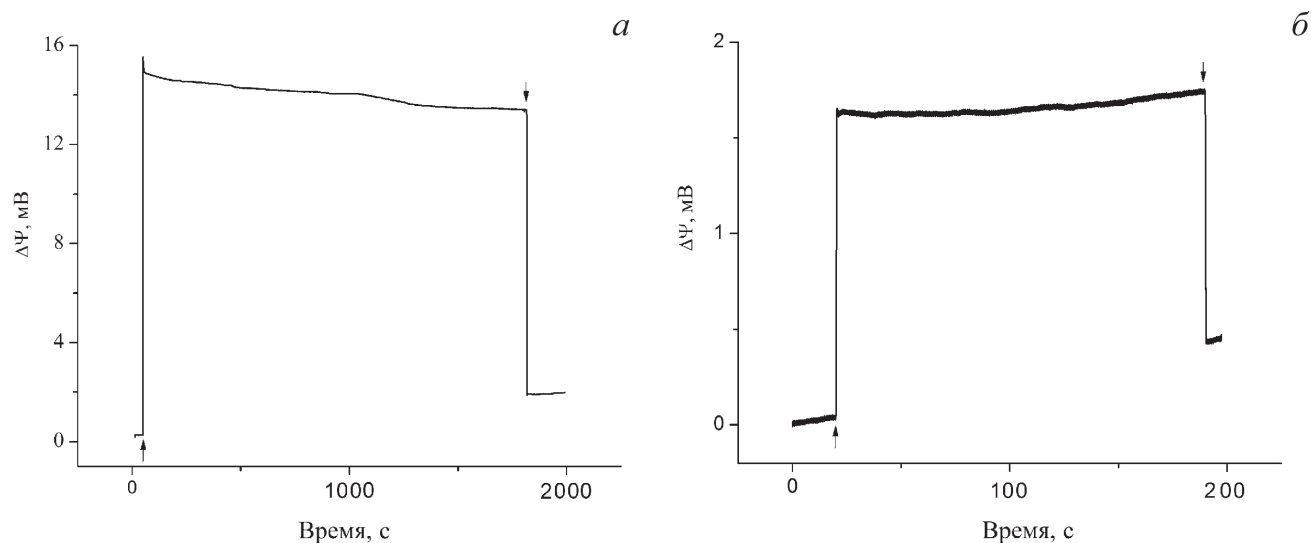


Рис. 2. Генерация электрических потенциалов в Хром в присутствии трегалозы. *а* – Генерация разности электрических потенциалов стандартно выделенными Хром, ассоциированными с поверхностью МФ, при стационарном освещении в присутствии 0,75 М трегалозы. *б* – То же в случае Хром, дефицитных по цит c_2 . Условия эксперимента как на рис. 1, *б*, кривая 2

ствии Аск/ТМФД и UQ_0 , но без Хром. Видно, что в этих условиях ответ не наблюдается.

На рис. 1, *б*, кривая 1 приведён фотоэлектрический ответ Хром при стационарном освещении в присутствии как донора (Аск/ТМФД), так и акцептора (UQ_0) электронов. Видно, что только в присутствии обоих медиаторов наблюдается значительный рост фотоэлектрического ответа с последующим двухкомпонентным спадом $\Delta\psi$ – в быстрой (~ 3 с) и медленной (~ 180 с) шкалах времени.

Следующие эксперименты были проведены для изучения влияния биопротектора дисахарида трегалозы на светозависимое образование $\Delta\psi$ иммобилизованными на поверхности МФ хроматофорами. В присутствии пары Аск/ТМФД и UQ_0 добавление 0,75 М трегалозы приводило к стабилизации сигнала $\Delta\psi$ при стационарном освещении в течение ~ 190 с (рис. 1, *б*, кривая 2). В этих условиях также удалось наблюдать стабилизацию сигнала $\Delta\psi$ при значительно более длительном освещении (~ 1800 с) (рис. 2, *а*).

На рис. 2, *б* показана генерация $\Delta\psi$ дефицитными по цит c_2 Хром из *Rba. sphaeroides* в присутствии пары Аск/ТМФД, UQ_0 и трегалозы. Освещение таких Хром приводит к генерации разности электрических потенциалов амплитудой $\sim 1,8$ мВ. Этот результат свидетельствует о том, что проникающая через мембрану восстановленная форма ТМФД в концентрации 150 мкМ недостаточно эффективно восстанавливает фотоокисленный P_{870} в стационарных условиях [11].

Перенос зарядов внутри белковых комплексов РЦ и bc_1 в Хром сопряжён с генерацией $\Delta\psi$, измеренной как с помощью электрохромного сдвига полос поглощения каротиноидов, так и прямого электрометрического метода [10]. На рис. 3, *а*, кривая 1 продемонстрирована генерация $\Delta\psi$ при добавлении Аск/ТМФД, UQ_0 и трегалозы при стационарном освещении. Для определения вклада bc_1 в общий фотоответ в среду измерения добавляли антимицин А, ингибитор убухинон-редуктазного сайта (« Q_i ») bc_1 . Видно (рис. 3, *а*, кривая 2), что добавление антимицина уменьшает амплитуду фотоответа на $\sim 12\%$. Наблюдаемый эффект, вероятно, связан с тем, что используемый нами UQ_0 связывается в сайте Q_B в РЦ [28], получает электрон от Q_A^- , а его восстановленная форма (UQ_0H_2) выступает в качестве «субстрата» лишь для небольшой фракции bc_1 .

Для доказательства того, что наблюдаемая фотоэлектрическая активность Хром обусловлена функционированием РЦ, эффективный ингибитор переноса электронов между хинонными акцепторами Q_A^- и Q_B^- атразин был добавлен в среду измерения. Действительно, добавление 10 мкМ атразина практически полностью ингибировало генерацию фотоэлектрического ответа (рис. 3, *а*, кривая 3). Этот результат показывает, что в исследуемой системе перенос электрона на акцепторном участке происходит от первичного хинона Q_A на экзогенный акцептор Q_0 .

Для изучения стабильности фотоответов Хром, ассоциированные с поверхностью МФ,

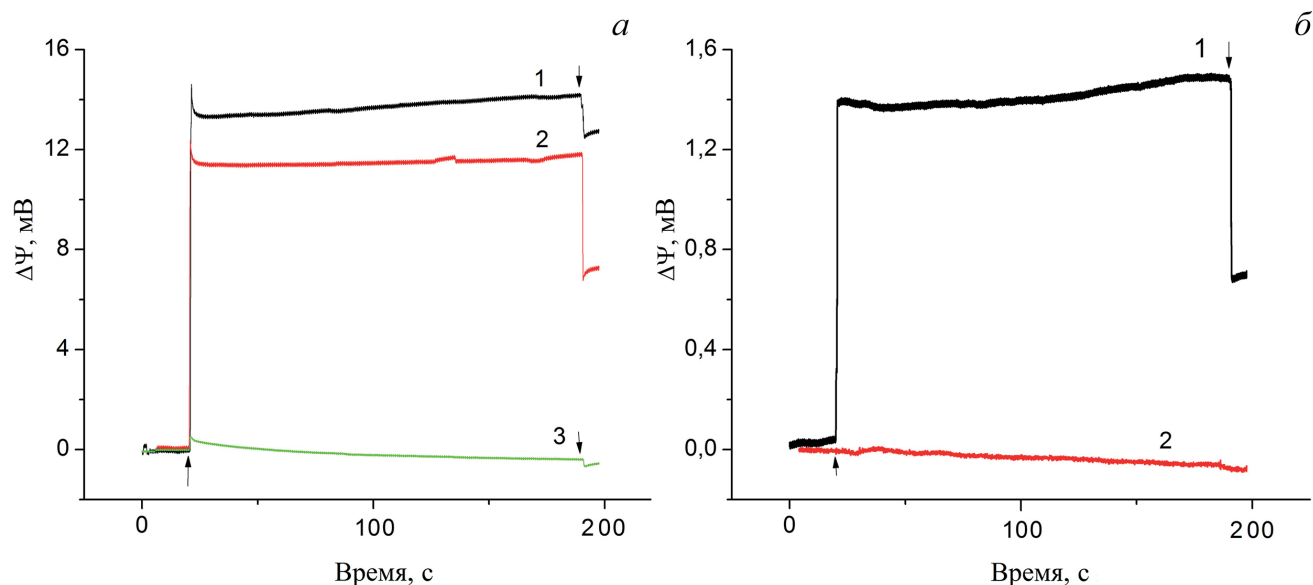


Рис. 3. Генерация электричества в Хром, ассоциированных с поверхностью МФ. *а* – Генерация разности электрических потенциалов в Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, пропитанного раствором фосфолипидов. Условия как на рис. 1, *б*, кривая 2 в отсутствии (кривая 1) и в присутствии 5 мкМ антимицина А (кривая 2); кривая 3 – условия как на рис. 3, *а* (кривая 1), но в присутствии 10 мкМ атразина. *б* – Генерация разности электрических потенциалов хроматофорами после 18 ч (кривая 1) и 40 ч (кривая 2) хранения при комнатной температуре. Условия эксперимента как на рис. 3, *а*, кривая 1

хранились в темноте при комнатной температуре и освещались через определённые промежутки времени. Видно, что амплитуда $\Delta\Psi$, изначально составлявшая ~14 мВ (рис. 3, *а*, кривая 1), через 18 ч хранения уменьшилась до ~1,4 мВ (рис. 3, *б*, кривая 1), а через 40 ч фотоответ не наблюдался (рис. 3, *б*, кривая 2).

На рис. 4 показана генерация $\Delta\Psi$ в Хром, погруженных внутрь МФ и зажатых с двух сторон полупроводниковыми стеклянными пластинами на основе оксида индия-олова (ITO|Хром–МФ|ITO) с добавленными медиаторами (Аск/ТМФД, UQ_0), антимицином А, а также трегалозой. Предполагалось, что используемые редокс-медиаторы свободно перемещаются внутри МФ и могут взаимодействовать как с РЦ, так и электродами ITO. Видно, что при освещении системы в течение ~4000 с генерируется стабильный неспадающий фотоэлектрический ответ амплитудой ~30 мВ [20].

Следует отметить, что 18-часовая темновая адаптация при комнатной температуре системы ITO|Хром–МФ|ITO приводила к значительному уменьшению сигнала $\Delta\Psi$ при освещении в течение 180 с (не показано). На вставке к рис. 4 показана генерация $\Delta\Psi$ при внесении свежего буфера, 25 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5, ~40 мкл), с медиаторами (Аск/ТМФД и UQ_0) непосредственно в систему ITO|Хром–МФ|ITO после хранения её в течение 30 дней в темноте при комнатной температуре. В этих

условиях амплитуда фотоответа составляла ~70% от амплитуды ответа контрольного образца.

На рис. 5 показаны пути переноса электронов в Хром, иммобилизованные двумя разными способами.

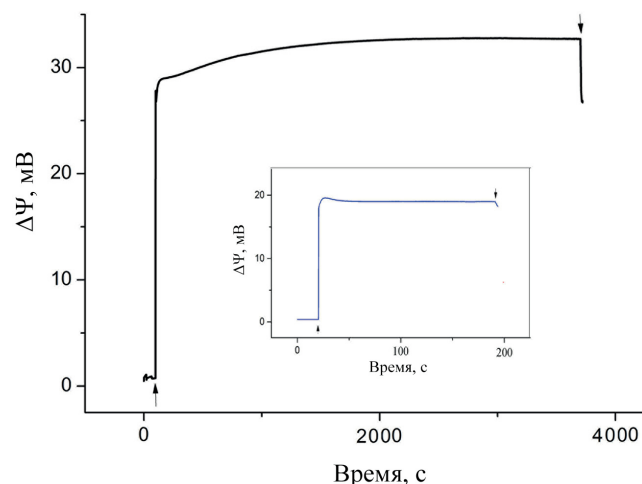


Рис. 4. Генерация электричества в Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, в присутствии трегалозы. Генерация $\Delta\Psi$ в Хром, погруженных внутрь МФ (система ITO|Хром–МФ|ITO), в присутствии 2,5 мМ Аск, 150 мкМ ТМФД, 150 мкМ UQ_0 , 0,75 М трегалозы и 5 мкМ антимицина А при освещении в течение 4000 с (контроль). Вставка: генерация $\Delta\Psi$ после внесения свежего буфера 25 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащего Аск/ТМФД и UQ_0 , непосредственно в систему ITO|Хром–МФ|ITO на 30-й день её хранения при комнатной температуре

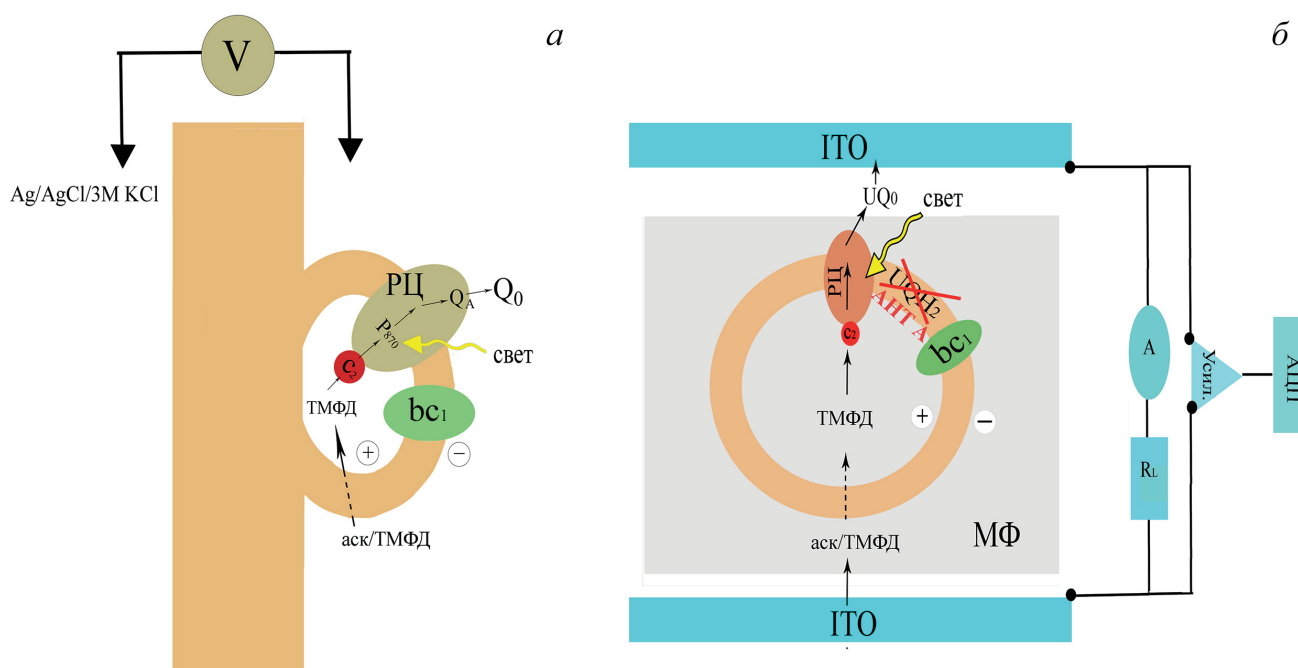


Рис. 5. Предполагаемые пути переноса электронов, индуцированные стационарным освещением в Хром *Rba. sphaeroides*, ассоциированных с поверхностью МФ (а) и погруженных в МФ (б)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования механизма генерации $\Delta\psi$ в Хром, ассоциированных с поверхностью коллоидной плѣнки, пропитанной раствором липидов, в ответ на одиночные вспышки света с помощью прямого электрометрического метода продемонстрировали наличие следующих электрогенных реакций: 1) разделение зарядов между P_{870} и Q_A , 2) ре-восстановление фотоокисленного P_{870} эндогенным цит c_2 , 3) протонирование дважды восстановленной формы вторичного хинонного акцептора Q_B (см. обзор Kaminskaya et al. [11]) и 4) перенос электронов и протонов в bc_1 [10].

Целью данной работы была демонстрация и изучение механизма генерации $\Delta\psi$ в Хром, иммобилизованных как на поверхности МФ, так и погруженных в него при стационарном освещении.

Следует отметить, что адсорбция биоматериалов на твѣрдой поверхности (электроды Au, TiO_2 , ITO) может приводить как к структурным изменениям, так и к возникновению электростатического отталкивания между исследуемыми образцами и поверхностью носителя (работа Yaghoubi et al. [29] и ссылки в ней). Принимая во внимание биосовместимость, биоразлагаемость, нетоксичность и низкую стоимость производного природного полимера — пористого нитроцеллюлозного МФ [30, 31], мы использовали его в качестве

матрицы для иммобилизации Хром. Ассоциация образцов с поверхностью МФ достигалась путѣм нейтрализации отрицательных зарядов полярных «головок» фосфолипидов мембран Хром и МФ в присутствии катионов Mg^{2+} или Ca^{2+} [13] (см. «Материалы и методы»).

Для генерации стабильных электрических сигналов использовались функционально-активные Хром, которые характеризуются высоким содержанием эндогенного цит c_2 . Так как редокс-кофакторы в трансмембранных комплексах РЦ и bc_1 погружены глубоко в белковый матрикс, при стационарном освещении *in vitro* (в полусинтетической системе) $\Delta\psi$ регистрировалась в присутствии экзогенных медиаторов. Использование пары Аск/ТМФД было обусловлено проницаемостью мембраны Хром для восстановленной формы ТМФД и её способностью восстанавливать эндогенный цит c_2 [9]. Наличие растворимого UQ_0 , в свою очередь, поддерживало функциональную активность РЦ, акцептируя электроны от первичного хинона Q_A^- в Хром, ассоциированных с поверхностью, и от вторичного хинона Q_B^- в случае Хром, погруженных внутрь МФ [20, 28]. UQ_0 являлся эффективным медиатором между хинон-акцепторным участком РЦ и электродами [28, 32].

В Хром *Rba. sphaeroides*, ассоциированных с поверхностью МФ, происходит вымывание непрочно связанного Q_B и пула UQ н-деканом, используемым в качестве гидрофобного

растворителя фосфолипидов при пропитывании МФ; следствием этого является блокирование циклического переноса зарядов [13]. В этих условиях убигидрохинон (UQ_0H_2), генерируемый при стационарном освещении, вероятно, из-за высокой гидрофильности не может выступать в качестве субстрата для bc_1 (рис. 5, а).

С другой стороны, при погружении Хром внутрь МФ сохраняется функционирование циклической электрон-транспортной цепи с участием комплексов РЦ и bc_1 , а также пула UQ и цит c_2 . Этот факт подтверждается тем, что добавление ингибитора bc_1 — антимицина А — приводит к значительному (почти в 2 раза) увеличению амплитуды стационарной $\Delta\psi$ [20]. Увеличение амплитуды фотоэлектрического ответа в условиях ингибирования bc_1 обусловлено перенаправлением циклического потока электронов, не вносящего вклад в регистрируемый в такой системе мембранный потенциал, в пользу линейного переноса электронов между электродами ИТО и РЦ (рис. 5, б). Такой тип иммобилизации позволяет регистрировать стабильный неспадающий сигнал $\Delta\psi$ при длительном освещении (~ 4000 с) [20].

Таким образом, регистрируемый максимальный фотоэлектрический ответ, вероятно, обусловлен светоиндуцированным прямым переносом электронов по пути цит $c_2 \rightarrow$ РЦ $\rightarrow Q_A \rightarrow Q_0 \rightarrow O_2$ в случае Хром, ассоциированных с поверхностью МФ (рис. 5, а), или ИТО $\rightarrow$ цит $c_2 \rightarrow$ РЦ $\rightarrow Q_A \rightarrow Q_B \rightarrow UQ_0 \rightarrow$ ИТО для Хром, погружённых внутрь МФ (рис. 5, б). Другими словами, в обеих системах генерация стационарной $\Delta\psi$ обусловлена работой самого РЦ. Об этом свидетельствует подавление генерации электрических ответов в присутствии атразина — ингибитора переноса электронов между хинонными акцепторами в РЦ (рис. 3, а, кривая 3).

В работах по исследованию преобразования энергии света важно не только получение значительной амплитуды тока или электричества при стационарном освещении, но и выявление условий сохранения функциональной активности образцов при их длительном хранении при комнатной температуре. В Хром, ассоциированных с поверхностью МФ, через 40 ч наблюдалось практически полное падение амплитуды $\Delta\psi$ (рис. 3, б, кривая 2). Падение амплитуды фотоответа может быть связано или с уменьшением сопротивления МФ, пропитанного раствором липидов [13], или же со временем «деградации» добавленных медиаторов, в частности Аск. Однако, ре-восстановление сопротивления МФ (2×10^8 Ом)

и добавление в среду измерения свежей порции буфера с медиаторами (Аск/ТМФД, UQ_0) не приводило к ре-восстановлению $\Delta\psi$ (не показано). Следовательно, уменьшение амплитуды $\Delta\psi$ с течением времени, скорее всего, связано с конформационно-структурными изменениями РЦ в случае Хром, ассоциированных с поверхностью МФ.

Что касается стабильности фотоэлектрических ответов при погружении Хром внутрь МФ, то следует отметить, что после хранения системы ИТО|Хром — МФ|ИТО при комнатной температуре в аэробных условиях в течение 30 дней при внесении в систему свежего буфера, содержащего донор и акцептор электронов, наблюдалось восстановление амплитуды $\Delta\psi$ до $\sim 70\%$ (вставка к рис. 4) относительно контрольного образца (рис. 4). Последнее свидетельствует о том, что большинство Хром, иммобилизованных на МФ, остаются функционально активными, по крайней мере, в течение 30 дней.

Становится очевидным, что стабильные максимальные фотоотчеты в обеих системах наблюдались только в присутствии уникального по своим физико-химическим свойствам дисахарида трегалозы. Ранее такие же стабильные фотоэлектрические ответы были выявлены в присутствии этого осмолита в изолированных пигмент-белковых комплексах ФС1 и ФС2, погруженных внутрь МФ [33, 34]. Отметим, что трегалоза также влияет на характер электрического ответа (рис. 1, б, кривая 2), а именно — подавляет быстрый «всплеск» и спад сигнала $\Delta\psi$ в начале освещения (рис. 1, б, кривая 1). Это может быть связано с уменьшением ионной проницаемости мембраны Хром [35, 36]. Аналогичное влияние трегалозы на быстрый «всплеск» и спад фотоответа в отсутствии осмолита также наблюдалось при погружении Хром в МФ [20]. Стабилизация фотоответов может быть связана с улучшением эффективности взаимодействия медиатора(ов) с белками фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Сохранение тонкой гидратной оболочки трансмембранных белков в присутствии этого дисахарида может менять их конформацию в пользу более оптимальной для эффективного функционирования [37–39]. Трегалоза, вероятно, также стабилизирует липидные бислои, замещая воду при образовании водородных связей между её собственными ОН-группами и полярными «головками» липидов [40]. При этом взаимодействие осмолита с трансмембранными белками и с фосфолипидами в Хром может осуществляться только вблизи внешней стороны мембраны.

Последнее обстоятельство обусловлено непроницаемостью мембраны Хром для трегалозы.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что трегалоза стабилизирует фотоэлектрические сигналы, генерируемые Хром, в обоих случаях, но наиболее стабильные фотоответы наблюдаются при погружении Хром внутрь МФ. Этот крайне простой способ иммобилизации образцов, вероятно, позволяет сохранить интактность фотосинтетических белков Хром внутри пор МФ при комнатной температуре в течение длительного периода времени.

Полученные результаты позволяют расширить современные представления об использовании полусинтетических структур на основе различных интактных фотосинтетических систем (клетки цианобактерий и пурпурных бактерий [41], тилакоидные мембраны растений),

способных преобразовывать солнечную энергию в электрохимическую форму.

Вклад авторов. М.Д. Мамедов — концепция и руководство работой, анализ электрических измерений, написание и редактирование текста статьи; Л.А. Витухновская, А.А. Заспа — выделение бактериальных мембранных везикул (хроматофоров) и проведение электрических измерений.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ), грант № 23-74-00025.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bella, F., Gerbaldi, C., Barolo, C., and Grätzel, M. (2015) Aqueous dye-sensitized solar cells, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 3431-3473, doi: 10.1039/c4cs00456f.
2. Calió, L., Kazim, S., Grätzel, M., and Ahmad, S. (2016) Hole-transport materials for perovskite solar cells, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **55**, 14522-14545, doi: 10.1002/anie.201601757.
3. Najafpour, M. M., Renger, G., Hołyńska, M., Moghaddam, A. N., Aro, E. M., et al. (2016) Manganese compounds as water-oxidizing catalysts: from the natural water-oxidizing complex to nanosized manganese oxide structures, *Chem. Rev.*, **116**, 2886-2936, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00340.
4. Teodor, A. N., and Bruce, B. D. (2020) Putting photosystem I to work: truly green energy, *Trends Biotechnol.*, **38**, 1329-1342, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.04.004.
5. Singharoy, A., Maffeo, C., Delgado-Magnero, K. H., Swainsbury, D. J. K., Sener, M., et al. (2019) Atoms to phenotypes: molecular design principles of cellular energy metabolism, *Cell*, **179**, 1098-1111, doi: 10.1016/j.cell.2019.10.021.
6. Crofts, A. R. (2021) The modified Q-cycle: a look back at its development and forward to a functional model, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1862**, 148417, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148417.
7. Crofts, A. R., Meinhardt, S. W., Jones, K. R., and Snozzi, M. (1983) The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: a modified Q-cycle mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 202-218, doi: 10.1016/0005-2728(83)90120-2.
8. Glaser, E. C., and Crofts, A. R. (1984) A new electrogenic step in the ubiquinol: cytochrome c_2 oxidoreductase complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **766**, 322-333, doi: 10.1016/0005-2728(84)90248-2.
9. Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Mamedov, M. D., Samuilov, A. Y., et al. (1986) Effects of electron donors and acceptors on the kinetics of the photoelectric responses in *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodospseudomonas sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 1-9, doi: 10.1016/0005-2728(86)90002-2.
10. Drachev, L. A., Kaurov, B. S., Mamedov, M. D., Mulkidjanian, A. Y., Semenov, A. Y., et al. (1989) Flash-induced electrogenic events in the photosynthetic reaction center and bc_1 complexes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 189-197, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80421-9.
11. Kaminskaya, O. P., and Semenov, A. Yu. (2021) The mechanisms of electrogenic reactions in bacterial photosynthetic reaction centers: Studies in collaboration with Alexander Konstantinov, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1-7, doi: 10.1134/S0006297921010016.
12. Ajiki, S., Toyotama, H., Hara, M., and Miyake, J. (1997) Light-induced electrical response of chromatophore film in semi-wet photocell with an agar layer containing an electron mediator, *Bioelectrochem. Bioenergetics*, **43**, 71-75, doi: 10.1016/S0302-4598(96)05177-X.
13. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Semenov, A. Yu., Severina, I. I., and Skulachev, V. P. (1979) Lipid-impregnated filters as a tool for studying the electric current-generating proteins, *Anal. Biochem.*, **96**, 250-262, doi: 10.1016/0003-2697(79)90580-3.

14. Drachev, L. A., Mamedov, M. D., and Semenov, A. Y. (1987) The antimycin-sensitive electrogenesis in *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores, *FEBS Lett.*, **213**, 128-132, doi: 10.1016/0014-5793(87)81477-1.
15. Seibert, M., and Kendall-Tobias, M. W. (1982) Photoelectrochemical properties of electrodes coated with photoactive-membrane vesicles isolated from photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **681**, 504-511, doi: 10.1016/0005-2728(82)90193-1.
16. Hara, M., Ajiki, S., and Miyake, J. (1998) Topological characterization and immobilization of a chromatophore membrane from *Rhodospseudomonas viridis* for application as a photoelectrical device, *Science*, **5**, 717-721, doi: 10.1016/S0968-5677(98)00111-4.
17. Magis, G. J., Hollander, M.-J., Onderwaater, W. G., Olsen, J. D., Hunter, C. N., et al. (2010) Light harvesting, energy transfer and electron cycling of a native photosynthetic membrane adsorbed onto a gold surface, *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**, 637-645, doi: 10.1016/j.bbamem.2009.12.018.
18. Woronowicz, K., Ahmed, S., Biradar, A. A., Biradar, A. V., Birnie, D. P., et al. (2012) Near-IR absorbing solar cell sensitized with bacterial photosynthetic membranes, *Photochem. Photobiol.*, **88**, 1467-1472, doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01190.x.
19. Harrold, J. W., Woronowicz, K., Lamptey, J., Baird, J., Moshar, A., et al. (2013) Functional interfacing of *Rhodospirillum rubrum* chromatophores to a conducting support for capture and conversion of solar energy, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 11249-11259, doi: 10.1021/jp402108s.
20. Vitukhnovskaya, L. A., Zaspas, A. A., Semenov, A. Yu., and Mamedov, M. D. (2023) Conversion of light into electricity in a semi-synthetic system based on photosynthetic bacterial chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1864**, 148975, doi: 10.1016/j.bbabi.2023.148975.
21. Ormerod, J. G., Ormerod, K. S., and Gest, H. (1961) Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; Relationships with nitrogen metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 449-463, doi: 10.1016/0003-9861(61)90073-x.
22. Woronowicz, K., Sha, D., Frese, R. N., and Niederman, R. A. (2011) The accumulation of the light-harvesting 2 complex during remodeling of the *Rhodobacter sphaeroides* intracytoplasmic membrane results in a slowing of the electron transfer turnover rate of photochemical reaction centers, *Biochemistry*, **50**, 4819-4829, doi: 10.1021/bi101667e.
23. Clayton, R. K. (1966) Spectroscopic analysis of bacteriochlorophylls *in vitro* and *in vivo*, *Photochem. Photobiol.*, **5**, 669-677, doi: 10.1111/j.1751-1097.1966.tb05813.x.
24. Garcia, A. F., Venturoli, G., Gad'on, N., Fernandez-Velasco, J. G., Melandri, B. A., and Drews, G. (1987) The adaptation of the electron transfer of *Rhodospseudomonas capsulata* to different light intensities, *Biochim. Biophys. Acta*, **890**, 335-345, doi: 10.1016/0005-2728(87)90161-7.
25. Dutton, P. L., Petty, K. M., Bonner, H. S., and Morse, S. D. (1975) Cytochrome c_2 and reaction center of *Rhodospseudomonas sphaeroides* Ga. membranes. Extinction coefficients, content, half-reduction potentials, kinetics and electric field alterations, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 536-556, doi: 10.1016/0005-2728(75)90092-4.
26. Altamura, E., Albanese, P., Marotta, R., Milano, F., Fiore, M., et al. (2021) Chromatophores efficiently promote light-driven ATP synthesis and DNA transcription inside hybrid multicompartiment artificial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2012170118, doi: 10.1073/pnas.2012170118.
27. Palazzo, G., Mallardi, A., Giustini, M., Monica, M. D., and Venturoli, G. (2000) Interactions of photosynthetic reaction center with 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone in reverse micelles, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 4624-4629, doi: 10.1039/b003905p.
28. Friebe, V. M., Swainsbury, D. J. K., Fyfe, P. K., Heijden, W. V. D., Jones, M. R., and Frese, R. N. (2016) On the mechanism of ubiquinone mediated photocurrent generation by a reaction center based photocathode, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 1925-1934, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.09.011.
29. Yaghoubi, H., Li, Z., Jun, D., Saer, R., and Slota, J. E. (2012) The role of gold-adsorbed photosynthetic reaction centers and redox mediators in the charge transfer and photocurrent generation in a bio-photoelectrochemical cell, *J. Phys. Chem. C*, **116**, 24868-24877, doi: 10.1021/jp306798p.
30. Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., and Pinelo, M. (2018) A general overview of support materials for enzyme immobilization. Characteristics, properties, practical utility, *Catalysts*, **8**, 92, doi: 10.3390/catal8020092.
31. Imam, H. T., Marr, P. C., and Marr, A. C. (2021) Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment, *Green Chem.*, **23**, 4980-5005, doi: 10.1039/D1GC01852C.
32. Grattieri, M., Rhodes, Z., Hickey, D. P., Beaver, K., and Minter, S. D. (2019) Understanding bio-photocurrent generation in photosynthetic purple bacteria, *ACS Catal.*, **9**, 867-873, doi: 10.1021/acscatal.8b04464.
33. Zaspas, A. A., Vitukhnovskaya, L. A., Mamedova, A. M., Semenov, A. Y., and Mamedov, M. D. (2020) Photovoltage generation by photosystem II core complexes immobilized onto a Millipore filter on an indium tin oxide electrode, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **52**, 495-504, doi: 10.1007/s10863-020-09857-1.
34. Zaspas, A., Vitukhnovskaya, L., Mamedova, A., Allakhverdiev, S. I., Semenov, A., and Mamedov, M. D. (2022) Voltage generation by photosystem I

- complexes immobilized onto a millipore filter under continuous illumination, *Int. J. Hydrogen Energy*, **47**, 11528–11538, doi: 10.1016/j.ijhydene.2022.01.175.
35. Jackson, J. B., and Crofts, A. R. (1971) The kinetics of light induced carotenoid changes in rhodopseudomonas spheroides and their relation to electrical field generation across the chromatophore membrane, *Eur. J. Biochem.*, **18**, 120–130, doi: 10.1111/j.1432-1033.1971.tb01222.x.
 36. Michels, P., Hellingwerf, K. J., Lolkema, J. S., Friedberg, I., Konings, W. N. (1981) Effects of the medium composition on the components of the electrochemical proton gradient in *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Arch. Microbiol.*, **130**, 357–361, doi: 10.1007/BF00414600.
 37. Mamedov, M. D., Nosikova, E. S., Vitukhnovskaya, L. A., Zaspas, A. A., and Semenov, A. Yu. (2018) Influence of the disaccharide trehalose on the oxidizing side of photosystem II, *Photosynthetica*, **56**, 236–243, doi: 10.1007/s11099-017-0750-z.
 38. Mobius, K., Savitsky, A., Malferrari, M., Francia, F., Mamedov, M., et al. (2020) Soft dynamic confinement of membrane proteins by dehydrated trehalose matrices: high-field EPR and fast-laser studies, *Appl. Magn. Reson.*, **50**, 773–850, doi: 10.1007/s00723-020-01240-y.
 39. Simongini, M., Puglisi, A., Genovese, F., and Hochkoeppler, H. (2023) Trehalose counteracts the dissociation of tetrameric rabbit lactate dehydrogenase induced by acidic pH conditions, *Arch. Biochem. Biophys.*, **740**, 109584, doi: 10.1016/j.abb.2023.109584.
 40. Tang, M., Waring, A. J., and Hong, M. (2007) Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion, *J. Magn. Reson.*, **184**, 222–227, doi: 10.1016/j.jmr.2006.10.006.
 41. De Moura Torquato, L. D., and Grattieri, M. (2022) Photobioelectrochemistry of intact photosynthetic bacteria: advances and future outlook, *Curr. Opin. Electrochem.*, **34**, 101018, doi: 10.1016/j.coelec.2022.101018.

GENERATION OF ELECTRIC POTENTIAL DIFFERENCE BY CHROMATOPHORES FROM PHOTOSYNTHETIC BACTERIA IN THE PRESENCE OF TREHALOSE UNDER CONTINUOUS ILLUMINATION

L. A. Vitukhnovskaya^{1,2}, A. A. Zaspas¹, and M. D. Mamedov^{1*}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: mahirmamedov@yandex.ru

² Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia

Measurement of the electrical potential difference ($\Delta\psi$) in membrane vesicles (chromatophores) from the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, associated with the surface of a nitrocellulose membrane filter (MF), impregnated with phospholipid solution in decane, as well as immersed inside it, in the presence of exogenous mediators and disaccharide trehalose, demonstrated an increase in the amplitude and stabilization of the signal under continuous illumination. The ascorbate/N,N,N'-tetramethyl-p-phenylenediamine pair and ubiquinone-0 were used as mediators (electron donor and acceptor), respectively. Although the stabilization of photoelectric responses under long-term continuous illumination was observed in both cases of immobilization of chromatophores, only when the samples were immersed inside the MF, the functional activity of the reaction centers was maintained for a month when they were stored in the dark at room temperature. Stable photoresponses are probably associated with the preservation of the integrity of chromatophore proteins inside MF pores. The stabilizing effect of the bioprotector trehalose may be due to both its effect on RC proteins and on the phospholipid bilayer membrane. The results obtained will expand modern ideas about the use of semi-synthetic structures based on various intact photosynthetic systems capable of converting solar energy into an electrochemical form.

Keywords: chromatophores, reaction center, cytochrome *bc_L* complex, membrane filter, semiconductor, continuous illumination, electrical potential