

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ДИКОГО ТИПА И ДВОЙНОГО МУТАНТА Н(L173)Л/I(L177)Н ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ *Cereibacter sphaeroides*

© 2024 Т.Ю. Фуфина, А.А. Забелин, Р.А. Хатыпов, А.М. Христин, А.Я. Шкуропатов, Л.Г. Васильева*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: vsyuyla@mail.ru

Поступила в редакцию 07.06.2024

После доработки 01.08.2024

Принята к публикации 22.08.2024

Ранее мы обнаружили, что в реакционном центре (РЦ) пурпурной бактерии *Cereibacter sphaeroides* образование гетеродимерного первичного донора электрона (Р), вызываемое замещением His-L173 на Leu, компенсируется второй мутацией Leu-L177 – His. Существенные изменения спектральных свойств, состава пигментов и редокс-потенциала Р, наблюдаемые в РЦ Н(L173)Л, в РЦ Н(L173)Л/I(L177)Н восстанавливаются до соответствующих характеристик нативного РЦ с той разницей, что энергия длинноволнового Q_Y оптического перехода Р значительно (на ~75 мэВ) увеличивается. В данной работе с помощью фотоиндуцированной дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии нами показано, что в РЦ Н(L173)Л/I(L177)Н сохраняется гомодимерная структура Р с частично измененными электронными свойствами: ослабевает электронное сопряжение в катион-радикале димера P^+ и увеличивается локализация положительного заряда на одной из его половин. Результаты исследования свойств РЦ тройного мутанта Н(L173)Л/I(L177)Н/F(M197)Н согласуются с предположением о том, что наблюдаемые изменения электронной структуры P^+ , а также значительное смещение полосы Q_Y Р в РЦ Н(L173)Л/I(L177)Н связаны с модификацией пространственного положения и/или геометрии Р. Методом фемтосекундной абсорбционной дифференциальной спектроскопии показано, что в РЦ Н(L173)Л/I(L177)Н сохраняется последовательность реакций $P^* \rightarrow P^+B_A \rightarrow P^+H_A \rightarrow P^+Q_A$ со скоростями переноса электрона и квантовым выходом состояния P^+Q_A , близкими наблюдаемым в РЦ дикого типа (P^* – синглетно-возбужденное состояние Р; B_A , H_A и Q_A – молекулы бактериохлорофилла, бактериофеофитина и убихинона в активной А-ветви кофакторов соответственно). Полученные результаты в совокупности с ранее опубликованными данными для РЦ с симметричной двойной мутацией Н(M202)Л/I(M206)Н демонстрируют, что с помощью введения дополнительных точечных аминокислотных замен фотохимическая активность изолированного РЦ из *C. sphaeroides* может быть сохранена на высоком уровне даже при отсутствии важных структурных элементов – аксиальных гистидиновых лигандов к первичному донору электрона Р.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реакционный центр фотосинтеза, *Cereibacter sphaeroides*, лигандирование бактериохлорофилла, первичный донор электрона, редокс-потенциал, термостабильность белка, ИК-Фурье-спектроскопия, фемтосекундная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972524100078 EDN: IPJFXW

ВВЕДЕНИЕ

В процессе фотосинтеза энергия света поглощается пигментами светособирающих антенн и передается на реакционный центр (РЦ), где преобразуется в электрохимическую энергию разделенных зарядов. Фотосинтетический аппарат пурпурной бактерии *Cereibacter sphaeroides*

(до 2020 г. – *Rhodobacter sphaeroides* [1]) состоит из РЦ и двух светособирающих антенных комплексов ССК-1 и ССК-2. Пигменты светособирающих комплексов поглощают кванты света и передают энергию возбуждения от ССК-2 на ССК-1 и затем – на РЦ [2]. В состав РЦ входят три белковые субъединицы (L, M и H), а также десять кофакторов, организованных в две ветви переноса электрона, А и В (рис. 1, а). Кофакторы представлены четырьмя молекулами бактериохлорофилла (БХл) а,

* Адресат для корреспонденции.

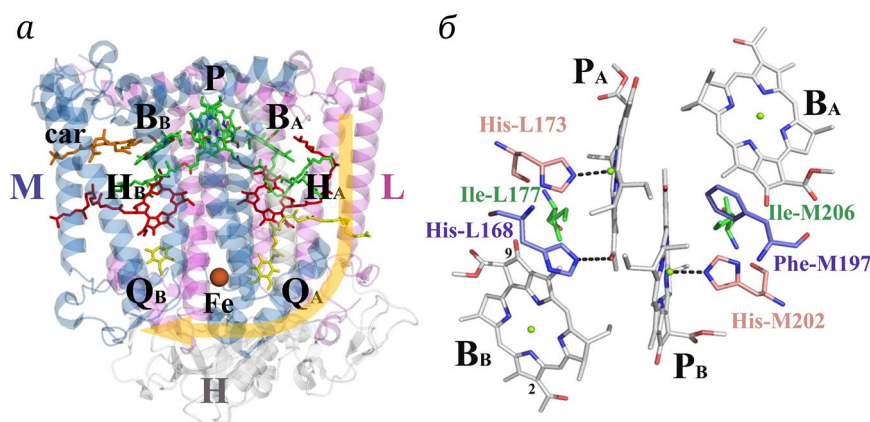


Рис. 1. Структура реакционного центра *C. sphaeroides* (PDB ID: 3v3y) (a). L – L-субъединица; M – M-субъединица; H – H-субъединица; P – димер молекул БХл; B_A и B_B – мономерные молекулы БХл; H_A и H_B – мономерные молекулы БФео; Q_A и Q_B – убихиноны; car – каротиноид. Желтой стрелкой показан путь переноса электрона в РЦ. Белковое окружение бактериохлорофиллов в структуре РЦ дикого типа (б). Показано расположение симметричных остатков His-L173 и -M202, Ile-M206 и -L177, His-L168 и Phe-M197. В структуре мономерного БХл B_B номерами отмечены 2-ацетильная и 9-кето-группы макроцикла. Пунктиром показаны координационные и Н-связи между молекулами БХл и белком

двумя молекулами бактериофеофитина (БФео) *a*, двумя молекулами убихинона (Q), атомом негемового железа и молекулой каротиноида [3]. Две экситонно сопряженные молекулы БХл (P_A и P_B) образуют димер, так называемую специальную пару P [4]. На специальную пару поступает энергия, поглощенная пигментными ансамблями светособирающих антенн и РЦ, и затем синглетно-возбужденное состояние P* служит первичным донором электрона в фотохимической реакции. Индуцированный светом перенос электрона от P* осуществляется через кофакторы активной А-ветви (БХл B_A и БФео H_A) на первичный хинон Q_A и затем – на вторичный хинон Q_B, сопровождаемая переносом протона из цитоплазмы и протонированием хинона Q_B [5]. Процесс первичного разделения зарядов с образованием состояния P⁺Q_B⁻ в РЦ происходит с квантовой эффективностью, близкой к 100% [6, 7].

Важными характеристиками P являются средноточечный потенциал (E_m) пары P/P⁺ и стабильность димерной структуры, которые обеспечиваются за счет сопряжения молекул P_A и P_B и взаимодействия P с окружающим белком. В частности, в РЦ *C. sphaeroides* 2-ацетильная группа БХл P_A, входящая в π-электронную систему макроцикла, образует водородную связь (Н-связь) с His-L168, и разрушение этой связи в результате мутаций существенно снижает величину E_m P/P⁺ [8].

Важным фактором, влияющим на спектральные и редокс-свойства первичного донора электрона, является также координирование атомов магния бактериохлорофиллов P [9]. В РЦ пурпурных бактерий атомы магния БХл координированы четырьмя атомами азота пирролов и коаксиально лигандированы остатком His [3]. Направленный мутагенез является широко применяемым подходом для исследований роли белкового окружения кофакторов РЦ в обеспечении высокой квантовой эффективности первичного разделения зарядов [10–14]. В том числе показано, что в мутантных РЦ пурпурных бактерий без ущерба для редокс-свойств P и квантового выхода фотохимического процесса лигандами БХл могут служить не только His, но и другие аминокислотные остатки, способные образовывать координационную связь с Mg²⁺, а также молекулы воды [10, 15, 16]. Также показано, что замещение гистидиновых лигандов БХл P_A или P_B на остатки лейцина приводит к появлению БФео в сайте связывания соответствующего БХл [17–19]. Подобные замещения лигандов специальной пары позволили получить так называемые гетеродимерные РЦ, в которых P представлен парой БХл/БФео [20–22]. РЦ H(M202)L с гетеродимером, в котором БФео расположен в сайте связывания P_B, и РЦ H(L173)L с «обратным» гетеродимером, в котором P_A представлен БФео, характеризуются значительным

Принятые сокращения: БФео – бактериофеофитин; БХл – бактериохлорофилл; ИК-Фурье-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием; РЦ – реакционный центр; B_A и B_B – мономерные молекулы БХл; DADS – дифференциальные спектры, связанные с экспоненциальным затуханием кинетических компонентов; E_m – средноточечный потенциал; H_A и H_B – мономерные молекулы БФео; P – димер молекул БХл, первичный донор электрона; P_A и P_B – бактериохлорофиллы димера P; Q – убихинон; SADS – дифференциальные спектры вовлеченных состояний.

повышением E_m P/P⁺, существенным изменением спектральных свойств и падением квантового выхода разделения зарядов на 60% и 50% соответственно [20]. Исследования таких мутантных РЦ внесли существенный вклад в понимание роли гомодимерной природы первичного донора электрона в обеспечении высокого квантового выхода фотохимической реакции.

Ранее мы показали, что специальная пара Р в РЦ *C. sphaeroides* остается гомодимером молекул БХл, если, наряду с замещениями Н(L173)Л и Н(M202)Л, внести в белковую структуру РЦ остатки гистидинов в симметричные позиции L177 и M206 соответственно [23, 24]. Потенциально, исследования этого эффекта могут помочь более детальному пониманию особенностей и роли аксиального лигандирования молекул БХл в РЦ пурпурных бактерий. Было найдено, что электронные спектры поглощения РЦ с двойными мутациями Н(L173)Л/И(L177)Н и Н(M202)Л/И(M206)Н характеризуются значительными коротковолновыми сдвигами полосы, принадлежащей низкоэнергетическому экситонному переходу Р [23, 24]. В то же время недавние фемтосекундные измерения показали, что, несмотря на выявленные спектральные изменения, время жизни Р* в РЦ двойного мутанта Н(M202)Л/И(M206)Н существенно не изменилось и последовательность реакций переноса электрона по А-ветви и осталась такой же, как в РЦ дикого типа, хотя отмечалось незначительное (на ~10%) снижение квантового выхода образования состояния Р⁺Q_A⁻ [24]. С целью дальнейшего развития исследований в этом направлении настоящая работа посвящена оценке влияния симметричного двойного замещения Н(L173)Л/И(L177)Н на первичную фотохимию в РЦ *C. sphaeroides* с использованием фемтосекундной абсорбционной дифференциальной спектроскопии и глобального анализа данных. Для того чтобы получить информацию о природе Р и электронных свойствах Р⁺ в РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н, был также исследован фотоиндуцированный дифференциальный ИК-Фурье-спектр для фотоокисления Р и сопряженного восстановления хинонных акцепторов электронов.

Ранее отмечалось, что двойное замещение Н(L173)Л/И(L177)Н приводит к уменьшению выхода РЦ при очистке из мембран на ~30% по сравнению с РЦ дикого типа [23]. Эти данные указывают на дестабилизирующее влияние мутаций на структуру комплекса и позволяют предположить структурные изменения в РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н. В настоящей работе с помощью дополнительной аминокислотной замены Phe-M197 на His предпринята попытка выявить признаки таких изменений в РЦ с двойной мутацией. Известно, что в РЦ дикого типа и ряда мутантов замещение F(M197)Н приводит к образованию Н-связи

между 2-ацетильной группой БХл Р_в и внесенным His-M197, что сопровождается увеличением среднеточечного потенциала Р/P⁺ на 125 мВ и заметно повышает стабильность РЦ [25–29]. Ожидается, что появление таких свойств в РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н/F(M197)Н будет указывать на образование Н-связи между БХл Р_в и His-M197, подтверждая тем самым, что положение и геометрия Р относительно аминокислотного остатка в положении M197 в РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н не изменились. Обратный результат, то есть отсутствие увеличения E_m Р/P⁺ и термостабильности РЦ тройного мутанта, по сравнению с РЦ Н(L173)Л/И(L177)Н, может быть интерпретирован как указание на наличие структурных изменений, вызванных двойной мутацией и создающих препятствия для образования этой Н-связи. На основании совокупности полученных данных в работе обсуждается влияние белкового окружения димера Р на его функцию как первичного донора электрона в фотохимической реакции и как акцептора световой энергии от пигментов светособирающих антенн.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фрагменты ДНК с ранее полученными мутациями Н(L173)Л/И(L177)Н в гене *puf-L* [30] и F(M197)Н в гене *puf-M* [29] были объединены в составе *puf*-оперона и клонированы в шаттл-вектор pRK-415 [31], как описано в работе Хатыпов и др. [32]. Полученная плаزمида с помощью конъюгации была перенесена в штамм *C. sphaeroides* DD13 [33]. В качестве реакционного центра дикого (псевдо-дикого) типа использовали реакционные центры, выделенные из штамма *C. sphaeroides* DD13, который содержал производную pRK-415, несущую немодифицированные копии генов *puf-LMX* [32]. Рекомбинантные штаммы *C. sphaeroides* выращивали на среде Хатнера [34] в темноте, в полуаэробных условиях в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл) и канамицина (5 мкг/мл). Реакционные центры выделяли методами ионообменной и аффинной хроматографии, как описано ранее [35, 36]. Для солюбилизации комплексов из мембран использовали детергент лаурилдиметиламинооксид (ЛДАО). Смену детергента после очистки РЦ осуществляли, как описано ранее [37]. Очищенные РЦ растворяли в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 0,2% холата натрия. Термостабильность РЦ исследовали при их нагревании при 48 °С в течение 60 мин путем регистрации термозависимых изменений амплитуды полосы Q_Y мономерных бактериохлорофиллов, как описано ранее [37]. Измерение электронных спектров поглощения производили на спектрофотометре Shimadzu UV1800 («Shimadzu»,

Япония). К образцам добавляли аскорбат натрия (1 mM) для поддержания первичного донора электрона в восстановленном состоянии. Пигментный анализ проводили методом, описанным ранее [30], ошибку измерений определяли методом стандартного отклонения. Величину среднеточечного потенциала P/P^+ определяли в буфере Tris-HCl (pH 8,0), содержащем холат натрия, путем потенциометрического титрования изолированных РЦ, используя феррицианид калия в качестве окислителя и аскорбат натрия в качестве восстановителя, как описано ранее [30].

Для визуализации структуры реакционного центра и приготовления рис. 1 использовали программу PyMol [38].

Фотоиндуцированные дифференциальные ИК-спектры P^+Q/PQ измеряли на инфракрасном вакуумируемом спектрометре с Фурье-преобразованием IFS66v/S с MCT (D313/6) детектором и светоделителем из KBr («Bruker», Германия). Для приготовления образцов несколько микролитров концентрированной суспензии РЦ в 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 0,2% холата натрия, наносили на подложку из CaF_2 , частично дегидратировали под струей газообразного аргона и накрывали второй подложкой из CaF_2 [24]. Дифференциальные ИК-спектры измеряли при освещении образцов постоянным светом ($1000\text{ нм} > \lambda > 720\text{ нм}$). Спектральное разрешение составляло 4 см^{-1} . Циклы освещения повторяли сотни раз для достижения приемлемого соотношения сигнал/шум.

Дифференциальные спектры поглощения с фемтосекундным временным разрешением измеряли методом возбуждения-зондирования на установке, описанной ранее [39]. Импульсы света длительностью $\sim 35\text{ фс}$ и частотой повторения 20 Гц получали с помощью титан-сапфирового лазера MaiTai SP («Spectra-Physics», США) и регенеративного усилителя Spitfire Ace («Spectra-Physics»). Энергию выходного импульса из регенеративного усилителя ослабляли до $\sim 700\text{ мкДж}$ и использовали для накачки параметрического усилителя OPA800CF («Spectra-Physics») с целью получения импульсов возбуждения на длине волны $\sim 870\text{ нм}$ для дикого типа и $\sim 850\text{ нм}$ – для двойного мутанта (рис. П1 в Приложении). Величину энергии возбуждающего импульса ослабляли так, чтобы выцветание первичного донора электрона не превышало $\sim 10\%$. Небольшую часть (1–2%) энергии импульса из регенеративного усилителя использовали для генерации суперконтинуума в кювете с водой толщиной 5 мм. Спектрально широкие импульсы континуума использовали для зондирования образца. Спектры излучения зондирующих импульсов измеряли с помощью CCD-камеры Pixis 400BR и спектрографа SpectraPro 2300i («Princeton Instruments», США)

в области длин волн 450–750 нм и 750–1100 нм. Поляризацию импульса возбуждения ориентировали под магическим углом ($54,7^\circ$) к импульсу зондирования. Для повышения соотношения сигнал/шум на каждой задержке времени производили усреднение 500 дифференциальных спектров поглощения. В диапазоне задержек времени от $-2,1\text{ пс}$ до 1700 пс проводили измерения с переменным шагом от 20 фс до 40 пс. Полный набор разностных спектров анализировали методом глобального анализа в программе Glotaran [40]. Программа включает математическое описание дисперсии групповой скорости измерительного импульса с помощью полинома третьего порядка. С использованием полученных полиномов была скорректирована дисперсия в полных наборах экспериментально измеренных разностных спектров в видимой (500–720 нм) и ближней ИК (750–1050 нм) областях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектральные свойства, редокс-потенциал Р, пигментный состав и термостабильность РЦ.

На рис. 2 приведены электронные спектры поглощения РЦ *C. sphaeroides* дикого типа и РЦ с двойным H(L173)L/I(L177)H и тройным H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H замещением, измеренные при комнатной температуре (рис. 2, а) и 100 К (рис. 2, б). Спектр поглощения РЦ дикого типа (рис. 2, кривые 1) хорошо соответствует литературным данным, показывая в Q_y спектральной области полосы низкоэнергетического экситонного перехода димерного первичного донора электрона ($Q_y P$) (865 нм при комнатной температуре и 888 нм при 100 К), мономерных молекул БХл ($Q_y B$) (804 нм) и молекул БФео ($Q_y H$) (758 нм при комнатной температуре и 763 нм при 100 К). Полоса вблизи 600 нм отражает Q_x -переходы четырех молекул БХл. В Q_x -области спектра при 533 и 545 нм расположены максимумы полос поглощения молекул БФео неактивной и активной ветвей переноса электрона соответственно, а также плечо в районе 500 нм, отражающее поглощение молекулы каротиноида. Основным отличием электронного спектра поглощения РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)H (рис. 2, кривые 2) от спектра РЦ дикого типа является увеличение энергии $Q_y P$ -перехода на $\sim 75\text{ мэВ}$ (коротковолновый сдвиг полосы на $\sim 46\text{ нм}$, отчетливо наблюдаемый при криогенной температуре; рис. 2, б). Детальное обсуждение спектров поглощения РЦ двойного мутанта приведено в работах Fufina et al. [23] и Vasilieva et al. [30].

В электронном спектре поглощения РЦ с тройным замещением H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H

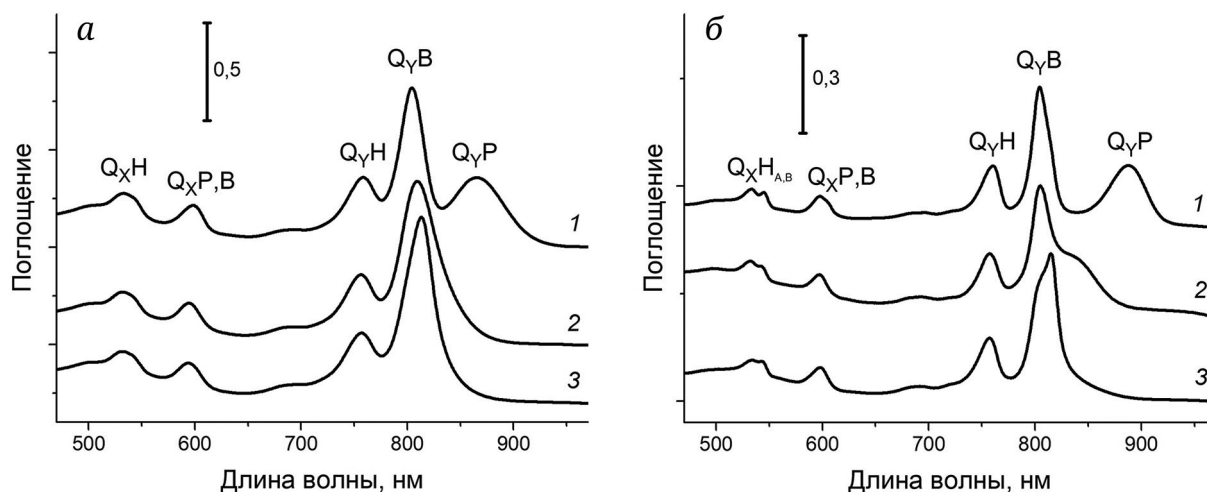


Рис. 2. Электронные спектры поглощения РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (1) и мутантов H(L173)L/I(L177)N (2) и H(L173)L/I(L177)N/F(M197)N (3), измеренные при комнатной температуре (а) и 100 К (б). Спектры нормированы по полосе поглощения Q_y Н при 760 нм

(рис. 2, кривые 3) Q_y Р-полоса поглощения первичного донора электрона не разрешается ни при комнатной, ни при криогенной температуре. Вероятно, эта полоса перекрывается с поглощением мономерных молекул БХл, вследствие чего Q_y В-полоса мутантных РЦ при 100 К заметно отличается от аналогичной полосы РЦ дикого типа, показывая максимум при 814 нм и плечо при ~803 нм. В спектре поглощения РЦ тройного мутанта амплитуда полосы при 597 нм, отражающей Q_x -переход четырех молекул БХл, сходна с амплитудами соответствующих полос в спектрах РЦ дикого типа и РЦ с двойной мутацией. Спектральное положение максимумов Q_y - и Q_x -полос поглощения молекул БФео в спектре поглощения тройного мутанта также мало отличается от такового в спектрах РЦ дикого типа и двойного мутанта. Таким образом, внесение дополнительной мутации F(M197)Н в РЦ с двойным замещением H(L173)L/I(L177)Н, по-видимому, не меняет состав пигментных кофакторов, но приводит к дальнейшему коротковолновому сдвигу Q_y -полосы поглощения Р и к увеличению энергии Q_y Р-перехода.

Результаты пигментного анализа показали, что соотношение БХл/БФео в РЦ тройного мутанта ($1,85 \pm 0,15$) сходно с таковым в РЦ дикого типа и двойного мутанта [30]. Эти данные согласуются с анализом низкотемпературных спектров поглощения (рис. 2, б) и свидетельствуют о том, что внесение тройного замещения не привело к изменению пигментного состава РЦ. Показано также, что величина E_m Р/Р⁺ в РЦ тройного мутанта близка к потенциалу Р в РЦ дикого типа и РЦ H(L173)L/I(L177)Н [30] с небольшим изменением в сторону уменьшения (рис. П2 в Приложении). Результаты редокс-титрования РЦ тройного мутанта позволяют предположить, что мутация F(M197)Н не при-

вела к образованию Н-связи между His-M197 и 2-ацетильной группой БХл Рв.

Изменения в спектре поглощения РЦ, происходящие при повышении температуры, использовали в качестве показателя стабильности структуры комплекса [37]. На рис. 3 приведены кинетики термозависимых изменений амплитуды полосы Q_y В мономерных БХл для РЦ дикого типа, двойного и тройного мутантов при 48 °С. Можно видеть, что внесение мутаций H(L173)L/I(L177)Н вызывает небольшое снижение стабильности по сравнению с РЦ дикого типа. Вопреки ожиданиям (см. раздел «Введение») добавление третьей мутации F(M197)Н в РЦ H(L173)L/I(L177)Н

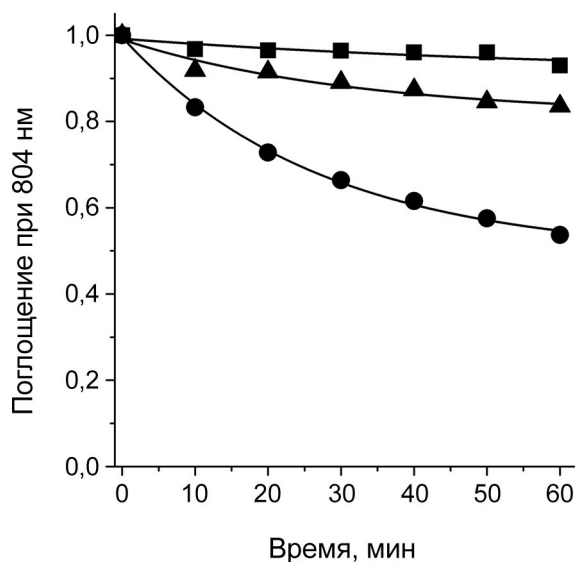


Рис. 3. Термозависимое изменение амплитуды полосы Q_y В в РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (■), РЦ H(L173)L/I(L177)Н (▲) и РЦ H(L173)L/I(L177)Н/F(M197)Н (●) при 48 °С

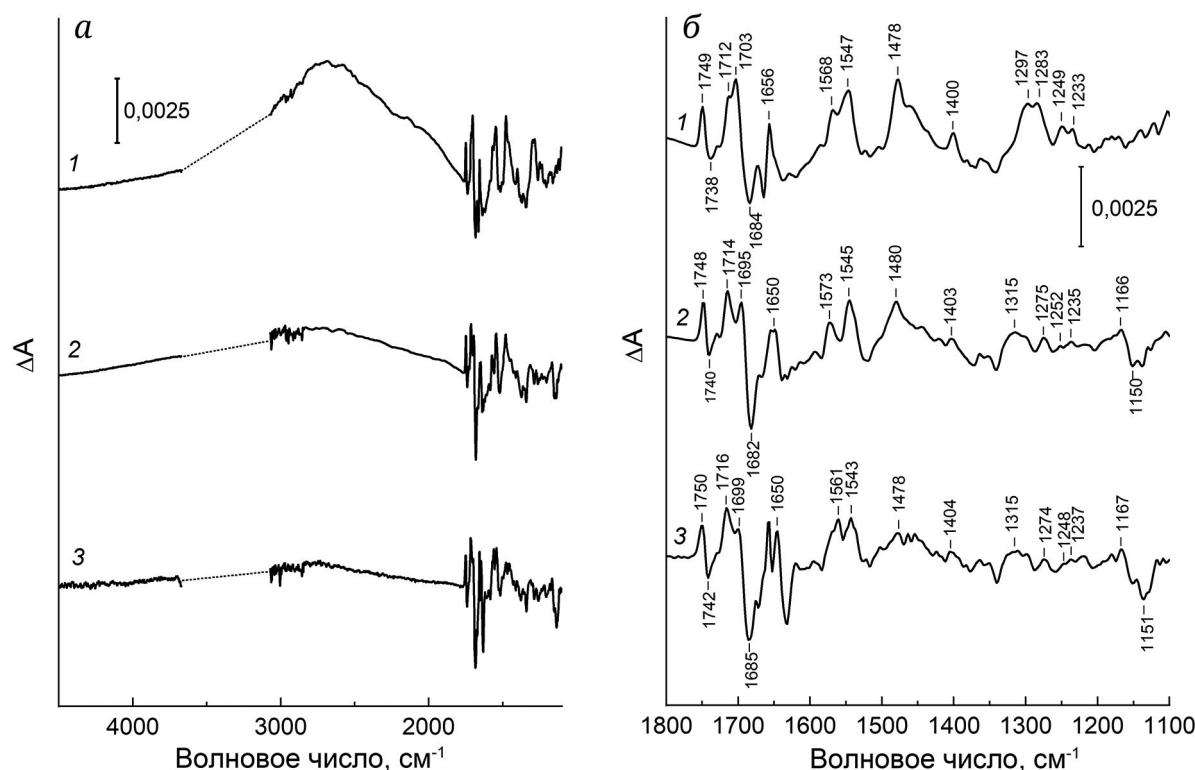


Рис. 4. Фотоиндуцированные дифференциальные (свет-минус-темнота) ИК-Фурье-спектры P^*Q^-/PQ РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (1), мутантных РЦ H(L173)L/I(L177)H (2) и РЦ H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H (3), измеренные при комнатной температуре. а – Спектральный диапазон 4500–1100 см^{-1} . Спектры нормированы по амплитуде дифференциального сигнала при $\sim 1750/\sim 1740 \text{ см}^{-1}$. Область при $\sim 3700\text{--}3070 \text{ см}^{-1}$, насыщенная из-за сильного поглощения образца и воды, исключена из рисунка. б – Низкочастотный спектральный диапазон 1800–1100 см^{-1} из панели (а), показанный в увеличенном масштабе

заметно уменьшило термостабильность комплекса. В совокупности с данными редокс-титрования это позволяет сделать вывод, что внесение замещения F(M197)H как минимум не привело к образованию Н-связи между His-M197 и БХЛ P_B вследствие изменений пространственного положения или геометрии Р, создавших препятствия для образования этой Н-связи. Можно предположить, что эти изменения наблюдаются уже в РЦ двойного мутанта. Возможными структурными модификациями, согласующимися с полученными нами результатами, могут быть изменение положения 2-ацетильных групп БХЛ P_A/P_B относительно плоскости макроцикла [8, 41, 42] или искривление плоскостей макроциклов Р [43].

Фотоиндуцированная дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия РЦ. На рис. 4 представлены фотоиндуцированные дифференциальные ИК-Фурье-спектры для фотоокисления первичного донора электрона и сопряженного восстановления хинонных акцепторов электрона с образованием состояния P^*Q^- в РЦ мутантов H(L173)L/I(L177)H (рис. 4, кривые 2) и H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H (рис. 4, кривые 3). С целью выявления особенностей электронной структуры первичного донора электрона в катион-радикальной форме P^+

в мутантных РЦ эти спектры сравниваются между собой, а также с ИК-Фурье-спектром P^*Q^-/PQ для РЦ дикого типа (рис. 4, кривые 1), измеренным в идентичных экспериментальных условиях. Отрицательные и положительные пики в ИК-Фурье-спектрах отражают, соответственно, исчезновение нейтральных форм первичных донора и акцептора электрона и появление их ион-радикальных форм.

Фотоиндуцированный дифференциальный ИК-Фурье-спектр P^*Q^-/PQ РЦ дикого типа (рис. 4, а; кривая 1) хорошо согласуется со спектрами, описанными в литературе [44], и включает широкую полосу низкоэнергетического электронного перехода при 2680 см^{-1} , отражающего перенос положительной вакансии («дырки») внутри димерного катион-радикала P^+ . В спектре имеется также набор интенсивных ИК-полос поглощения (~ 1550 , ~ 1480 и $\sim 1290 \text{ см}^{-1}$) (рис. 4, б; кривая 1), охарактеризованных как фазово-фононные полосы [45]. Ранее было показано, что полоса при 2680 см^{-1} и фазово-фононные полосы не наблюдаются для мономерного катион-радикала БХЛ $^+$ в органических растворителях [46], являясь маркерными характеристиками димерной структуры окисленного первичного донора электрона в РЦ пурпурных

бактерий [44]. Интенсивность этих маркерных полос сильно зависит от степени электронного сопряжения между молекулами бактериохлорофилла P_A и P_B , составляющими димер P^+ [44, 45].

Присутствие полосы переноса «дырки» в области $\sim 2700\text{ см}^{-1}$ и фазово-фононных полос в ИК-Фурье-спектрах обоих мутантов (рис. 4, кривые 2 и 3) позволяет заключить, что, несмотря на замену гистидина L173 на неполярный лейцин, в этих РЦ не образуется гетеродимер БХл/БФео, но сохраняется гомодимерная структура первичного донора электрона P из двух молекул БХл. Однако введение двойной мутации H(L173)L/I(L177)N вызывает значительное уменьшение интенсивности полосы переноса «дырки» при $\sim 2700\text{ см}^{-1}$ и фазово-фононных полос (рис. 4, кривые 2), а дополнительная замена F(M197)N в тройном мутанте приводит к дальнейшему падению интенсивности маркерных полос (рис. 4, кривые 3). Эти наблюдения указывают на заметное ослабление электронного сопряжения между молекулами БХл в катион-радикале P^+ в мутантных РЦ.

Дифференциальный сигнал при $\sim 1750\text{--}1740\text{ см}^{-1}$ в ИК-Фурье-спектре РЦ дикого типа (рис. 4, б; кривая 1) приписан высокочастотному сдвигу полос валентных колебаний 10а-эфирных C=O-групп молекул бактериохлорофилла P при образовании P^+ [46]. Этот сигнал сохраняется по форме в мутантных РЦ (рис. 4, б; кривые 2 и 3) и был использован нами для нормировки ИК-Фурье-спектров всех трех образцов. В области $1710\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ в ИК-спектре РЦ дикого типа (рис. 4, б; кривая 1) присутствуют сигналы, отражающие высокочастотные сдвиги полос валентных колебаний 9-кето-C=O-групп молекул P_A [$1712(+)/\sim 1690(-)\text{ см}^{-1}$] и P_B [$1703(+)/1684(-)\text{ см}^{-1}$] [46]. Отрицательная полоса при 1690 см^{-1} не видна при комнатной температуре, но хорошо разрешается при криогенных температурах [46]. Введение двойной мутации H(L173)L/I(L177)N приводит к изменению частотного положения полос 9-кето-C=O-групп: полоса P_A смещается от 1712 до 1714 см^{-1} , а полоса P_B – от 1703 до 1695 см^{-1} (рис. 4, б; кривая 2). В спектре тройного мутанта (рис. 4, б; кривая 3), в целом, наблюдаются схожие изменения в области валентных колебаний карбонильных групп с небольшими отличиями в деталях. Изменение соотношения интенсивностей полос валентных колебаний 9-кето-групп P_A при $1714\text{--}1716\text{ см}^{-1}$ и P_B при $1695\text{--}1699\text{ см}^{-1}$, наблюдаемое при введении мутаций (рис. 4, б), по-видимому, отражает увеличение локализации положительного заряда на молекуле P_A в димерном катион-радикале P^+ [47]. Интересно, что ИК-Фурье-спектры мутантных РЦ содержат дифференциальный сигнал при $1160(+)/1150(-)\text{ см}^{-1}$, который отсутствует в спектре РЦ дикого типа (рис. 4, б). Очевидно, этот сигнал

является следствием введенных мутаций, однако природа его на данный момент не ясна.

Таким образом, результаты ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием свидетельствуют о значительном нарушении сопряжения между молекулами БХл, составляющими специальную пару в РЦ с двойной и тройной мутациями. Присутствие в спектрах мутантных РЦ полосы при $\sim 2700\text{ см}^{-1}$ дает основание полагать, что первичный донор электрона является гомодимером молекул БХл даже при отсутствии природного лиганда атома магния – остатка гистидина L173, что согласуется с электронными спектрами поглощения и данными пигментного анализа. Выраженное уменьшение интенсивности полосы переноса «дырки» при $\sim 2700\text{ см}^{-1}$ в спектрах мутантных РЦ указывает на то, что введение мутаций приводит к ослаблению электронного сопряжения в катион-радикале димера P^+ и увеличению локализации положительного заряда на одной из его половин [45].

Сравнительное исследование процессов фотохимического разделения зарядов в РЦ дикого типа и двойного мутанта H(L173)L/I(L177)N. Для исследования первичных процессов разделения зарядов в РЦ использовали метод возбуждения-зондирования. С целью минимизации вклада процессов миграции энергии возбуждения первичный донор электрона P селективно возбуждали фемтосекундными импульсами света (длительность – $\sim 35\text{ фс}$) с максимумом при $\sim 870\text{ нм}$ для дикого типа и $\sim 850\text{ нм}$ – для двойного мутанта.

Абсорбционные изменения, измеренные для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа и РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)N в спектральных областях $500\text{--}720\text{ нм}$ и $750\text{--}1050\text{ нм}$, показаны на рис. ПЗ в Приложении. Для того чтобы получить информацию о константах скорости переноса электрона и связанных с ними спектров, экспериментальные 3D-массивы данных подвергали глобальному анализу, разлагая на сумму экспонент с характерными амплитудами и временами жизни [48]. В результате были получены дифференциальные спектры, связанные с экспоненциальным затуханием кинетических компонентов (decay-associated difference spectra, DADS) (рис. 5).

В согласии с литературными данными [49, 50], три экспоненты с константами времени $0,9\text{ пс}$, $3,1\text{ пс}$ и 223 пс и компонент ($>2\text{ нс}$), незатухающий на временной шкале измерений, были достаточны для описания данных для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа; соответствующие DADS представлены на рис. 5 (панели а и б). Аналогичные экспоненциальные кинетические компоненты с близкими временными константами ($1,1\text{ пс}$, $6,4\text{ пс}$ и 228 пс) и незатухающий компонент ($>2\text{ нс}$) были найдены для РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)N (DADS показаны на рис. 5, в и г). Наиболее характерной

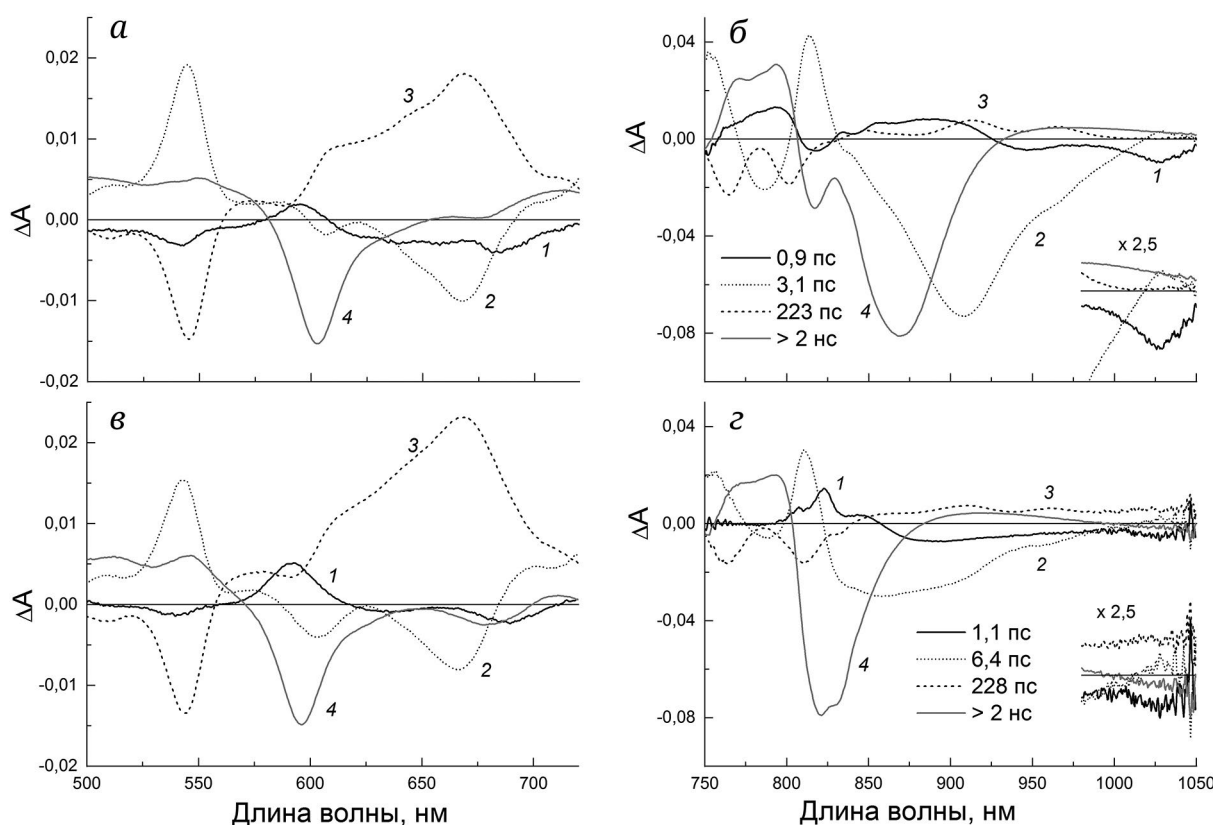


Рис. 5. DADS для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (а, б) и РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)H (в, з) в видимой (500–720 нм) и ближней ИК (750–1050 нм) спектральных областях. Вставки на панелях (б) и (з) показывают спектральные особенности в интервале 980–1050 нм на шкале ΔA , увеличенной в 2,5 раза

особенностью DADS (рис. 5, кривые 1) с временными константами 0,9 и 1,1 пс является отрицательная полоса при ~ 1030 нм, которая, по всей вероятности, отражает формирование маркерной полосы поглощения анион-радикала B_A^- в составе короткоживущего состояния $P^+B_A^-$, спадающего в течение ~ 1 пс [50–52]. DADS (рис. 5, кривые 2) с временными константами 3,1 и 6,4 пс отражают спад возбужденного состояния P^* и образование радикальной пары $P^+H_A^-$, включая широкую отрицательную полосу при ~ 912 нм (затухание стимулированного излучения из P^*), положительную полосу при 545 нм (выцветание Q_x -полосы поглощения H_A в основном состоянии) и отрицательную полосу при ~ 670 нм (развитие поглощения H_A^- в составе $P^+H_A^-$). Присутствие в обоих DADS практически симметричного коротковолнового сдвига полосы поглощения при ~ 600 нм, принадлежащей молекулам БХл $P_{A/B}$ и $B_{A/B}$, может свидетельствовать об отсутствии релаксации возбужденного первичного донора P^* в основное состояние, что является признаком высокого квантового выхода образования состояния $P^+H_A^-$ как в РЦ дикого типа, так и мутанта. Существенно, что оба DADS (рис. 5, вставки на панелях б и з) включают небольшую, но отчетливую положительную особенность при ~ 1030 нм, принадлежащую B_A^- , что

вместе с присутствием сигнала в этой области в DADS с временными константами 0,9 и 1,1 пс и с учетом литературных данных [50, 52] согласуется с моделью первичного разделения зарядов по механизму двухшагового переноса электрона $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$. В модели состояние $P^+B_A^-$ спадает с образованием $P^+H_A^-$ быстрее (за 0,9/1,1 пс), чем оно образуется из P^* (за 3,1/6,4 пс), в результате чего экспериментально обнаруживаемое заселение $P^+B_A^-$ (и, соответственно, величина сигнала при ~ 1030 нм) значительно меньше, чем реальное. По-видимому, несколько меньшая амплитуда и больший шум сигнала при ~ 1030 нм для мутантных РЦ, по сравнению с РЦ дикого типа (рис. 5, вставки на панелях б и з), могут быть связаны по крайней мере частично с увеличением разницы между константами времени первого и второго шага электронного переноса (3,1/0,9 против 6,4/1,1). Отметим также, что при измерениях на мутантных РЦ в этой спектральной области использовался пробный лазерный импульс меньшей интенсивности. DADS с константой времени ~ 200 пс для обоих РЦ показывают спектральные изменения, связанные с реакцией переноса электрона $P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$, включающие восстановление Q_x -полосы поглощения БФео H_A при 545 нм и уход полос поглощения анион-радикала H_A^- при 670, 910

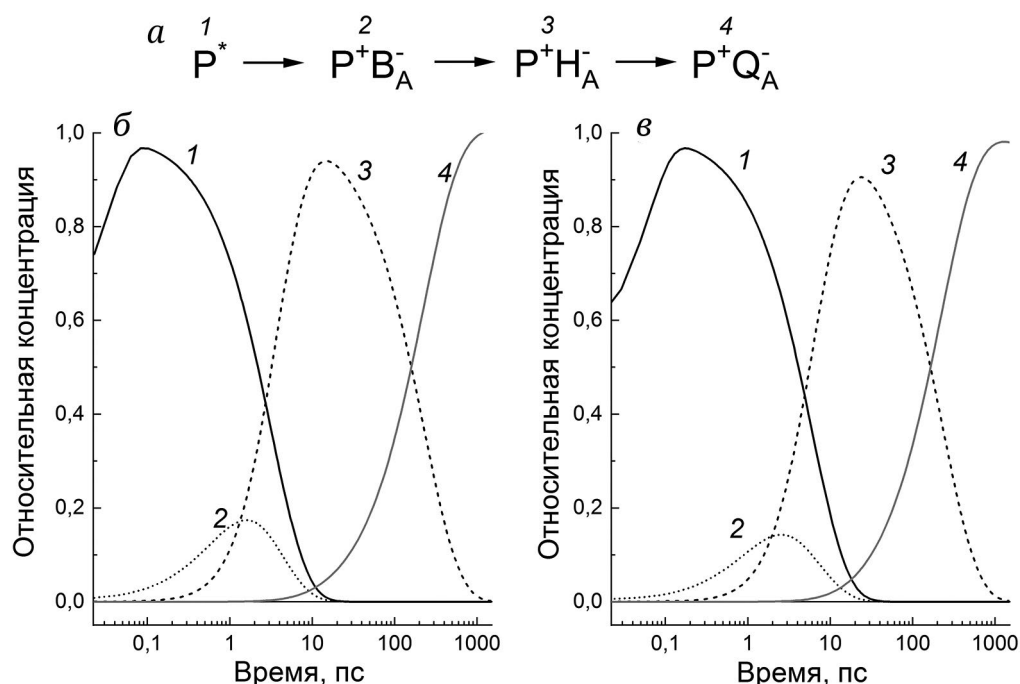


Рис. 6. Таргет-анализ спектрально-временных данных для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа и РЦ двойного мутанта H(L173)/I(L177)H. *a* – Кинетическая модель, использованная в анализе. *б* и *в* – Концентрационные профили состояний для РЦ дикого типа и H(L173)/I(L177)H соответственно. Шкала времени представлена в логарифмическом масштабе

и 965 нм (рис. 5, кривые 3). Следует отметить, что в ~200 пс DADS для мутантных РЦ в дополнение к изменениям, связанным с переносом электрона от H_A^- на Q_A , наблюдается небольшой отрицательный сигнал при ~840 нм (рис. 5, г; кривая 3), указывающий на переход первичного донора электрона в основное состояние. Это означает, что, в отличие от РЦ дикого типа, в РЦ H(L173)/I(L177)H рекомбинация ион-радикальной пары $P^+H_A^-$ в основное состояние частично конкурирует с прямым переносом электрона от H_A^- на Q_A , что приводит к незначительному уменьшению квантового выхода состояния $P^+Q_A^-$ (не более 10%). DADS с константой времени более 2 нс соответствуют финальному состоянию с разделенными зарядами $P^+Q_A^-$, которое в обоих РЦ не спадает до основного состояния на временной шкале измерений (рис. 5, кривые 4).

Используя результаты глобального анализа, с помощью таргет-анализа [48] для обоих РЦ была протестирована линейная четырехкомпонентная модель переноса электрона $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$ (рис. 6, *a*), известная для РЦ дикого типа [49, 50, 52]. Полученные временные зависимости концентраций вовлеченных состояний и их дифференциальные спектры (SADS, species associated difference spectra) показаны на рис. 6 (*б* и *в*) и на рис. 7 соответственно.

SADS, полученные для РЦ дикого типа, хорошо соответствуют аналогичным спектрам, приведенным в литературе [50]. Из рис. 7 можно видеть,

что спектры состояний для РЦ дикого типа и мутантных РЦ, в целом, близки по форме, отличаясь лишь в деталях. Наиболее выраженные различия между спектрами видны в области Q_X - и Q_Y -полос поглощения первичного донора электрона Р: выцветающие полосы при 602 и 865 нм, наблюдаемые для РЦ дикого типа, в SADS для мутантных РЦ смещены в коротковолновую область до 597 и 830 нм соответственно. Спектр возбужденного состояния P^* со временем жизни 3,1/6 пс характеризуется выцветанием Q_X -полосы поглощения при 597–602 нм на фоне неструктурированного поглощения в этой области спектра, выцветанием Q_Y -полосы Р при 830–870 нм и стимулированным излучением из P^* на длинноволновом склоне выцветающей Q_Y -полосы Р. SADS со временем жизни 0,9/1,3 пс показывают особенности, характерные для состояния $P^+B_A^-$, включая выцветание Q_X (594–596 нм) и Q_Y (830–870 нм) полос поглощения Р и появление маркерной полосы поглощения анион-радикала B_A^- при ~1030 нм. SADS со временем жизни 223–226 пс соответствуют состоянию $P^+H_A^-$, показывая выцветание полос поглощения Р (595–600 нм и 830–870 нм) и H_A (545 нм), а также развитие полос поглощения анион-радикала H_A^- при 670 нм и 965 нм. В SADS для состояния $P^+Q_A^-$, затухающего на шкале измерений, доминируют особенности, связанные с образованием P^+ : выцветание полос поглощения Р при 595–603 нм и 830–870 нм и коротковолновый электрохромный

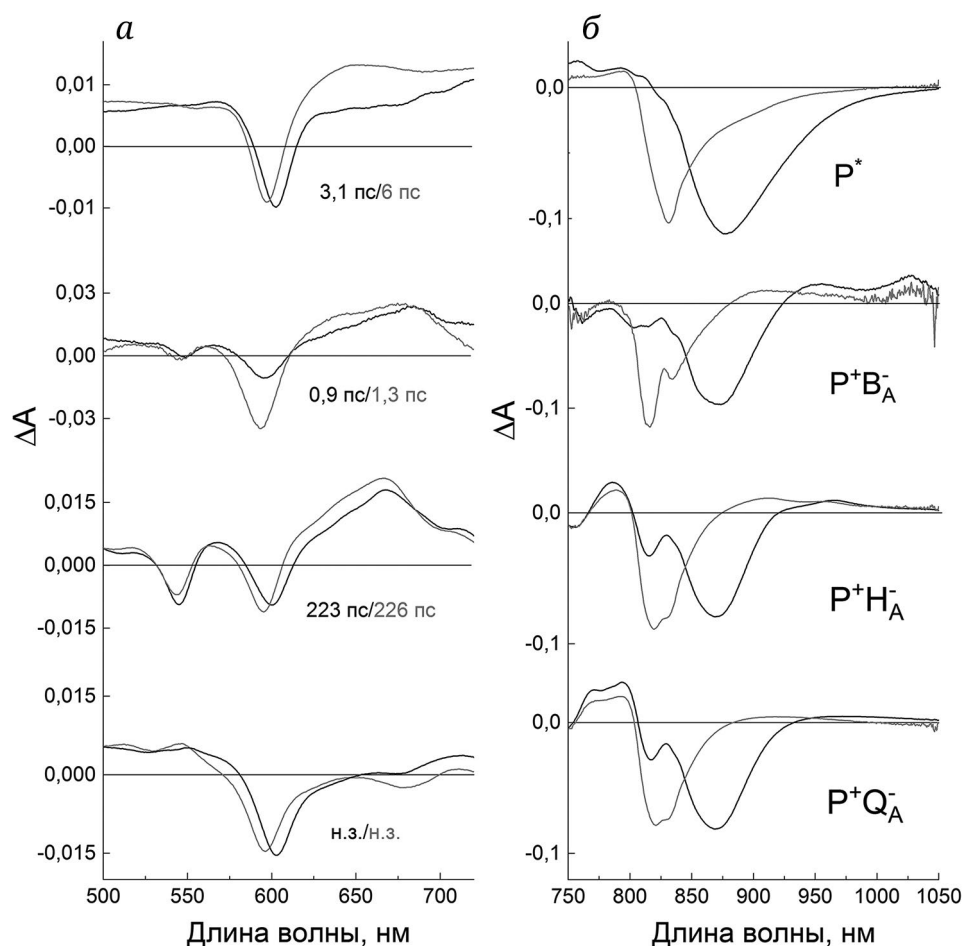


Рис. 7. SADS (species associated difference spectra) для РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (черный) и РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)H (серый), полученные в результате таргет-анализа с использованием модели, показанной на рис. 6. *а* – Приведены времена жизни состояний; *б* – обозначены состояния; н.з. – незатухающий

сдвиг полосы мономерного БХл при 800 нм на фоне небольшого неструктурированного поглощения P^+ . Представленные данные позволяют заключить, что динамика и механизм первичного разделения зарядов, наблюдаемые для РЦ дикого типа, в значительной степени сохраняются в РЦ двойного мутанта H(L173)L/I(L177)H. Однако из рис. 6 (*б* и *в*) можно видеть, что, по отношению к РЦ дикого типа, максимальная степень заселения состояния $P^+B_A^-$ в РЦ двойного мутанта незначительно уменьшается и выход состояния $P^+Q_A^-$ падает на несколько процентов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, представленные в настоящей работе в совокупности с данными, опубликованными нами ранее [24], показывают, что в РЦ пурпурной бактерии *C. sphaeroides* можно предотвратить образование гетеродимеров, к которым приводят мутации H(M202)L и H(L173)L, путем внесения остатков His в симметричные позиции

M206 и L177, смещенные на один виток соответствующих α -спиралей относительно природных гистидиновых лигандов. Из литературных данных известно, что средноточечный потенциал P/P^+ и спектр поглощения гетеродимерных РЦ значительно отличаются от таковых для нативных РЦ, а также существенно снижается квантовая эффективность первичного разделения зарядов [20–22]. Внесение второй мутации как в РЦ H(M202)L/I(M206)H, так и в РЦ H(L173)L/I(L177)H приводит к формированию гомодимерного Р и сопровождается восстановлением величины потенциала P/P^+ .

Результаты фемтосекундных измерений показывают, что динамика и механизм фотоиндуцированного переноса электрона в значительной степени сохраняются при введении двойной мутации H(L173)L/I(L177)H. Как и в случае РЦ дикого типа, в мутантных РЦ первичное разделение зарядов происходит по безактивационному двухшаговому механизму $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$, при котором промежуточное короткоживущее состояние $P^+B_A^-$ спадает быстрее с образованием $P^+H_A^-$,

чем оно генерируется из P^* . По отношению к РЦ дикого типа константа времени заселения состояния $P^*B_A^-$ в мутантных РЦ увеличивается с ~ 3 пс до ~ 6 пс, а квантовый выход конечного состояния $P^*Q_A^-$ уменьшается на несколько процентов. Отметим, что в текущей литературе активно развивается представление о том, что образованию $P^*B_A^-$ в нативных бактериальных РЦ предшествует формирование промежуточного внутридимерного состояния с частичным переносом заряда $P_A^*P_B^-$ [53, 54]. Тот факт, что двойное аминокислотное замещение $H(L173)L/I(L177)H$ в РЦ *C. sphaeroides* практически не влияет на эффективность фотохимического разделения зарядов, указывает на отсутствие существенной модификации свойств состояния $P_A^*P_B^-$ в мутантных РЦ.

В то же время по ряду свойств гомодимерная специальная пара в РЦ с двойной мутацией $H(L173)L/I(L177)H$ отличается от таковой для димера P в РЦ дикого типа. Так, согласно результатам фотоиндуцированной дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии, в мутантных РЦ обнаруживается уменьшение степени электронного сопряжения между молекулами БХл в катион-радикале P^* , что, по-видимому, является следствием изменения пространственного положения и/или геометрии P . Кроме того, внесение двойных мутаций приводит к дестабилизации комплексов РЦ, выражающейся в заметном снижении устойчивости структуры димера P (или РЦ в целом) к повышенной температуре. С учетом возможных структурных изменений, вызванных аминокислотными замещениями, вновь введенные гистидиновые остатки могут, предположительно, использоваться в качестве лигандов к P в мутантных РЦ. Другим гипотетическим кандидатом на эту роль является молекула воды, внедряемая в модифицированную структуру белка мутантных РЦ [24]. Особенно важным в этом отношении является тот факт, что в РЦ с двойными мутациями вторая функция нативного P как акцептора энергии от светособирающих антенных комплексов, по-видимому, не восстанавливается в полной мере, поскольку экспериментально наблюдаемое увеличение энергии функционально активного Q_Y P -перехода в таких РЦ может привести к замедлению скорости переноса энергии электронного возбуждения от ССК-1 [55]. Включение гистидинов M202 и L173 в структуру природных РЦ *C. sphaeroides* в качестве аксиальных лигандов бактериохлофиллов димера P является, вероятно, одним из факторов, способствующих стабильности РЦ, а также оптимальному сочетанию функций P как терминального акцептора энергии от светособирающих антенн и первичного донора электрона для фотохимической реакции [4].

Таким образом, результаты этого исследования, а также данные работы Fufina et al. [24] показывают, что с помощью введения дополнительных точечных аминокислотных замен фотохимическая активность изолированного РЦ из *C. sphaeroides* может быть сохранена на высоком уровне даже при отсутствии важных структурных элементов – аксиальных гистидиновых лигандов к первичному донору электрона P . В более широком аспекте этот факт отражает устойчивую природу бактериальных РЦ, в том числе в отношении поддержания высоких скоростей реакций переноса электрона и достижения практически 100%-ного квантового выхода первичного разделения зарядов [13]. В то же время значительное изменение энергии оптического перехода $P \rightarrow Q_Y$ в мутантных РЦ $H(M202)L/I(M206)H$ [24] и $H(L173)L/I(L177)H$ может представлять интерес в связи с исследованием функции РЦ как эффективного терминального акцептора энергии электронного возбуждения от светособирающей антенны. Потенциально, полученная информация также может быть полезна при поиске возможностей и разработке способов включения фотосинтетических РЦ-комплексов в искусственные гибридные системы преобразования световой энергии [56].

Вклад авторов. Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева – мутагенез, выделение реакционных центров, изучение термостабильности, измерение спектров поглощения; А.А. Забелин, А.Я. Шкуропатов – измерение ИК-Фурье-спектров; Р.А. Хатыпов, А.М. Христин – измерение дифференциальных спектров поглощения с фемтосекундным временным разрешением методом возбуждения-зондирования; Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева, А.А. Забелин, А.Я. Шкуропатов, Р.А. Хатыпов, А.М. Христин – обсуждение результатов; Л.Г. Васильева, А.А. Забелин, А.Я. Шкуропатов, А.М. Христин – написание текста статьи; Л.Г. Васильева, А.А. Забелин, А.Я. Шкуропатов – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 122041100204-3 Минобрнауки.

Благодарности. Авторы выражают благодарность О.А. Третчиковой за участие в начальном этапе работы по изучению свойств РЦ с тройной мутацией. В работе использовались приборы ЦКП ПНЦБИ РАН (№ 670266; <https://www.ckp-rf.ru/ckp/670266/>).

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. Hordt, A., Lopez, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L.-M., Tindall, B. J., Gronow, S., Kyrpides, N. C., Woyke, T., and Göker, M. (2020) Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria, *Front. Microbiol.*, **11**, 468, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>.
2. Cogdell, R. J., Gall, A., and Köhler, J. (2006) The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to *in vivo* membranes, *Q. Rev. Biophys.*, **39**, 227-324, <https://doi.org/10.1017/S0033583506004434>.
3. Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H., and Rees, D. C. (1987) Structure of reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the cofactors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5730-5734, <https://doi.org/10.1073/pnas.84.16.5730>.
4. Gorka, M., Baldansuren, A., Malnati, A., Gruszecki, E., Golbeck, J. H., and Lakshmi, K. V. (2021) Shedding light on primary donors in photosynthetic reaction centers, *Front. Microbiol.*, **12**, 1-31, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735666>.
5. Леонова М. М., Фуфина Т. Ю., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2014) Исследование пигмент-белковых взаимодействий в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий, в кн.: *Современные проблемы фотосинтеза. Том 1* (под ред. Аллахвердиева С. И., Рубина А. Б., Шувалова В. А.) Москва-Ижевск, Ижевский Институт компьютерных исследований, с. 157-196.
6. Woodbury, N. W., and Allen, J. P. (1995) The pathway, kinetics and thermodynamics of electron transfer in wild type and mutant reaction centers of purple nonsulfur bacteria, in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E., eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 527-557, https://doi.org/10.1007/0-306-47954-0_24.
7. Parson, W. W. (2008) Functional patterns of reaction centers in anoxygenic photosynthetic bacteria, in *Primary Processes of Photosynthesis, Part 2 Principles and Apparatus* (Renger, G., ed) RSC Publishing, Cambridge, pp. 57-109, <https://doi.org/10.1039/9781847558169-00057>.
8. Spiedel, D., Roszak, A. W., McKendrick, K., McAuley, K. E., Fyfe, P. K., Navedryk, E., Breton, J., Robert, B., Cogdell, R. J., Isaacs, N. W., and Jones, M. R. (2002) Tuning of the optical and electrochemical properties of the primary donor bacteriochlorophylls in the reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides*: spectroscopy and structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1554**, 75-93, [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00215-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00215-3).
9. Heimdal, J., Jensen, K. P., Devarajan, A., and Ryde, U. (2007) The role of axial ligands for the structure and function of chlorophylls, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**, 49-61, <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0164-z>.
10. Фуфина Т. Ю., Леонова М. М., Хатыпов Р. А., Христин, А. М., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2019) Особенности аксиального лигандирования бактериохлорофиллов в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий, *Биохимия*, **84**, 509-519, <https://doi.org/10.1134/S0006297919040047>.
11. Williams, J. C., Alden, R. G., Murchison, H. A., Peloquin, J. M., Woodbury, N. W., and Allen, J. P. (1992) Effect of mutations near the bacteriochlorophylls in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry*, **31**, 11029-11037, <https://doi.org/10.1021/bi00160a012>.
12. Wakeham, M. C., and Jones, M. R. (2005) Rewiring photosynthesis: engineering wrong-way electron transfer in the purple bacterial reaction centre, *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 851-857, <https://doi.org/10.1042/BST0330851>.
13. Jones, M. R. (2009) Structural plasticity of reaction centers from purple bacteria, In: *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., and Beatty, J. T., eds) Vol. 28 Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 295-321.
14. Allen, J. P., and Williams, J. C. (2011) The evolutionary pathway from anoxygenic to oxygenic photosynthesis examined by comparison of the properties of photosystem II and bacterial reaction centers, *Photosynth. Res.*, **107**, 59-69, <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9552-x>.
15. Goldsmith, J. O., King, B., and Boxer, S. G. (1996) Mg coordination by amino acid side chains is not required for assembly and function of the special pair in bacterial photosynthetic reaction centers, *Biochemistry*, **35**, 2421-2428, <https://doi.org/10.1021/bi9523365>.
16. Navedryk, E., Schulz, C., Müh, F., Lubitz, W., and Breton, J. (2000) Heterodimeric versus homodimeric structure of the primary electron donor in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers genetically modified at position M202, *Photochem. Photobiol.*, **71**, 582-588, [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)071<0582:hvhst>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)071<0582:hvhst>2.0.co;2).
17. Bylina, E. J., Kolaczowski, S. V., Norris, J. R., and Youvan, D. C. (1990) EPR characterization of genetically modified reaction centers of *Rhodobacter capsulatus*, *Biochemistry*, **29**, 6203-6210, <https://doi.org/10.1021/bi00478a013>.
18. Katilius, E., Turanchik, T., Lin, S., Taguchi, A. K. W., and Woodbury, N. W. (1999) B-side electron transfer in a *Rhodobacter sphaeroides* reaction center mutant in which the B-side monomer bacteriochlorophyll is replaced with bacteriopheophytin, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 7386-7389, <https://doi.org/10.1021/jp991670y>.

19. Katilius, E., Babendure, J. L., Lin, S., and Woodbury, N. W. (2004) Electron transfer dynamics in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center mutants with a modified ligand for the monomer bacteriochlorophyll on the active side, *Photosynth. Res.*, **81**, 165-180, <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000035048.10358.90>.
20. McDowell, L., Gaul, D., Kirmaier, C., Holten, D., and Schenck, C. C. (1991) Investigation into the source of electron transfer asymmetry in bacterial reaction centers, *Biochemistry*, **30**, 8315-8322, <https://doi.org/10.1021/bi00098a006>.
21. Laporte, L. L., Palaniappan, V., Davis, D. G., Kirmaier, C., Schenck, C. C., Holten, D., and Bocian, D. F. (1996) Influence of electronic asymmetry on the spectroscopic and photodynamic properties of the primary electron donor in the photosynthetic reaction center, *J. Phys. Chem.*, **100**, 17696-17707, <https://doi.org/10.1021/jp961658v>.
22. Allen, J. P., Artz, K., Lin, X., Williams, J. C., Ivancich, A., Albouy, D., Mattioli, T. A., Fetsch, A., Kuhn, M., and Lubitz, W. (1996) Effects of hydrogen bonding to a bacteriochlorophyll-bacteriopheophytin dimer in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry*, **35**, 6612-6619, <https://doi.org/10.1021/bi9528311>.
23. Fufina, T. Y., Vasilieva, L. G., Khatypov, R. A., and Shuvalov, V. A. (2013) Spectral properties of the *Rhodobacter sphaeroides* mutant photo-reaction center with double amino acid substitution I(L177)H+H(L173)L, In *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future, Advanced Topics in Science and Technology in China*, 46-49, https://doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7_9.
24. Khristin, A. M., Zabelin, A. A., Fufina, T. Y., Khatypov, R. A., Proskuryakov, I. I., Shuvalov, V. A., Shkuropatov, A. Y., and Vasilieva, L. G. (2020) Mutation H(M202)L does not lead to the formation of heterodimer of the primary electron donor in reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* when combined with mutation I(M206)H, *Photosynth. Res.*, **146**, 109-121, <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00728-9>.
25. Lin, X., Murchison, H. A., Nagarajan, V., Parson, W. W., Allen, J. P., and Williams, J. C. (1994) Specific alteration of the oxidation potential of the electron donor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10265-10269.
26. Fufina, T. Y., Selikhanov, G. K., Gabdulkhakov, A. G., and Vasilieva, L. G. (2023) Properties and crystal structure of the *Cereibacter sphaeroides* photosynthetic reaction center with double amino acid substitution I(L177)H + F(M197)H, *Membranes*, **13**, 157, <https://doi.org/10.3390/membranes13020157>.
27. Holden-Dye, K., Crouch, L. I., Williams, C. M., Bone, R. A., Cheng, J., Böhles, F., Heathcote, P., and Jones, M. R. (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, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.029>.
28. Kangur, L., Jones, M. R., and Freiberg, A. (2017) Hydrogen bonds in the vicinity of the special pair of the bacterial reaction center probed by hydrostatic high-pressure absorption spectroscopy, *Biophys. Chem.*, **231**, 27-33, <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.04.003>.
29. Selikhanov, G., Fufina, T., Guenther, S. Meents, A., Gabdulkhakov, A., and Vasilieva, L. (2022) X-ray structure of the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center with an M197 Phe→His substitution clarifies the properties of the mutant complex, *IUCrJ*, **9**, 261-271, <https://doi.org/10.1107/S2052252521013178>.
30. 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, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.008>.
31. Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trollinger, D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria, *Gene*, **70**, 191-197, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90117-5).
32. 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, <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0256-3>.
33. Jones, M. R., Visschers, R. W., van Grondelle, R., and Hunter, C. N. (1992) Construction and characterization of a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* with the reaction center as the sole pigment-protein complex, *Biochemistry*, **31**, 4458-4465, <https://doi.org/10.1021/bi00133a011>.
34. Cohen-Basile, G., Siström, W. R., and Stanier, R. Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria, *J. Cell Comp. Physiol.*, **49**, 25-68, <https://doi.org/10.1002/jcp.1030490104>.
35. Goldsmith, J. O., and Boxer, S. G. (1996) Rapid isolation of bacterial photosynthetic reaction centers with an engineered poly-histidine tag, *Biochim. Biophys. Acta*, **1276**, 171-175, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00091-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00091-6).
36. 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 P_a bacteriochlorophyll to the L subunit, *FEBS Lett.*, **581**, 5769-5773, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.032>.
37. Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г. (2021) Влияние детергентов и осмолитов на термостабильность нативных и мутантных реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **86**, 607-614, <https://doi.org/10.31857/S0320972521040126>.

38. Delano, W. L. (2022) The PyMOL Molecular Graphics System, URL: <http://www.pymol.org> (accessed on 8 November 2022).
39. Фуфина Т. Ю., Третчикова О. А., Христин А. М., Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г. (2022) Свойства мутантных фотосинтетических реакционных центров пурпурной бактерии *Cereibacter sphaeroides* с замещением M206 Ile → Gln, *Биохимия*, **87**, 1447-1458, <https://doi.org/10.1134/S000629792210008X>.
40. Snellenburg, J. J., Laptanok, S. P., Seger, R., Mullen, K. M., and van Stokkum, I. H. M. (2012) Glotaran: a Java-based graphical user interface for the R package TIMP, *J. Stat. Soft.*, **49**, 1-22, <https://doi.org/10.18637/jss.v049.i03>.
41. Murchison, H. A., Alden, R. G., Allen, J. P., Peloquin, J. M., Taguchi, A. K., Woodbury, N. W., and Williams J. C. (1993) Mutations designed to modify the environment of the primary electron donor of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*: phenylalanine to leucine at L167 and histidine to phenylalanine at L168, *Biochemistry*, **32**, 3498-3505, <https://doi.org/10.1021/bi00064a038>.
42. Fyfe, P. K., and Jones, M. R. (2000) Re-emerging structures: continuing crystallography of the bacterial reaction centre, *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 413-421, [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(00\)00179-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00179-1).
43. Zucchelli, G., Brogioli, D., Casazza, A. P., Garlaschi, F. M., and Jennings, R. C. (2007) Chlorophyll ring deformation modulates Qy electronic energy in chlorophyll-protein complexes and generates spectral forms, *Biophys. J.*, **93**, 2240-2254, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104554>.
44. Breton, J., Nabedryk, 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, <https://doi.org/10.1021/bi00148a010>.
45. 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, <https://doi.org/10.1063/1.1589742>.
46. 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, <https://doi.org/10.1021/bi00213a017>.
47. 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, <https://doi.org/10.1039/c4pp00245h>.
48. Van Stokkum, I. H. M., Larsen, D. S., and van Grondelle, R. (2004) Global and target analysis of time-resolved spectra, *Biochim. Biophys. Acta*, **1657**, 82-104, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.04.011>.
49. Zinth, W., and Wachtveitl, J. (2005) The first picoseconds in bacterial photosynthesis – ultrafast electron transfer for the efficient conversion of light energy, *Chem. Phys. Chem.*, **6**, 871-880, <https://doi.org/10.1002/cphc.200400458>.
50. Dominguez, P. N., Himmelstoss, M., Michelmann, J., Lehner, F. T., Gardiner, A. T., Cogdell, R. J., and Zinth, W. (2014) Primary reactions in photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* – time constants of the initial electron transfer, *Chem. Phys. Lett.*, **601**, 103-109, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.03.085>.
51. Fajer, J., Brune, D. C., Davis, M. S., Forman, A., and Spaulding, L. D. (1975) Primary charge separation in bacterial photosynthesis: oxidized chlorophylls and reduced pheophytin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4956-4960, <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.4956>.
52. Weaver, J. B., Lin, C.-Y., Faries, K. M., Mathews, I. I., Russi, S., Holten, D., Kirmaier, C., and Boxer, S. G. (2021) Photosynthetic reaction center variants made via genetic code expansion show Tyr at M210 tunes the initial electron transfer mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2116439118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2116439118>.
53. Milanovsky, G. E., Shuvalov, V. A., Semenov, A. Y., and Cherepanov, D. A. (2015) Elastic vibrations in the photosynthetic bacterial reaction center coupled to the primary charge separation: implications from molecular dynamics simulations and stochastic Langevin approach, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 13656-13667, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03036>.
54. Ma, F., Romero, E., Jones, M. R., Novoderezhkin, V. I., and van Grondelle, R. (2019) Both electronic and vibrational coherences are involved in primary electron transfer in bacterial reaction center, *Nat. Commun.*, **10**, 933, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08751-8>.
55. Ma, F., Yu, L.-J., Wang-Otomo, Z.-Y., and van Grondelle, R. (2016) Temperature dependent LH1 → RC energy transfer in purple bacteria *Tch. tepidum* with shiftable LH1-Qy band: a natural system to investigate thermally activated energy transfer in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 408-414, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.12.006>.
56. Friebe, V. M., and Frese, R. N. (2017) Photosynthetic reaction center-based biophotovoltaics, *Curr. Opin. Electrochem.*, **5**, 126-134, <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.08.001>.

COMPARATIVE STUDY OF SPECTRAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF REACTION CENTERS OF WILD TYPE AND DOUBLE MUTANT H(L173)L/I(L177)H OF THE PURPLE BACTERIUM *Cereibacter sphaeroides*

T. Yu. Fufina, A. A. Zabelin, R. A. Khatypov, A. M. Khristin,
A. Ya. Shkuropatov, and L. G. Vasilieva*

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: vsyulya@mail.ru*

Previously, we found that in the reaction center (RC) of the purple bacterium *Cereibacter sphaeroides*, the formation of a heterodimeric primary electron donor (P), caused by the substitution of His-L173 by Leu, was compensated by a second mutation Ile-L177 – His. Significant changes in the spectral properties, pigment composition and redox potential of P, observed in the H(L173)L RC, are restored to the corresponding characteristics of the native RC in the RC H(L173)L/I(L177)H, with the difference that the energy of the long-wavelength Q_Y optical transition of P increases significantly (by ~75 meV). In this work, using light-induced FTIR difference spectroscopy, it was shown that in the RC with double mutation, the homodimeric structure of P is preserved with partially altered electronic properties: the electronic coupling in the radical-cation of the P^+ dimer is weakened and the localization of the positive charge on one of its halves increases. The results of the study of the triple mutant H(L173)L/I(L177)H/F(M197)H are consistent with the assumption that the observed changes in the P^+ electronic structure, as well as considerable blue shift of Q_Y P absorption band in the RC H(L173)L/I(L177)H, are associated with a modification of the spatial position and/or geometry of P. Using femtosecond absorption difference spectroscopy, it was shown that the mutant H(L173)L/I(L177)H RC retains a sequence of reactions $P^* \rightarrow P^+B_A \rightarrow P^+H_A \rightarrow P^+Q_A$ with electron transfer rates and the quantum yield of the final state P^+Q_A close to those observed in the wild-type RC (P^* is the singlet-excited state of P; B_A , H_A , and Q_A are molecules of bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, and ubiquinone in the active A-branch of cofactors, respectively). The obtained results, together with previously published data for the RC with a symmetrical double mutation H(M202)L/I(M206)H, demonstrate that by introducing additional point amino acid substitutions, the photochemical activity of the isolated RC from *C. sphaeroides* can be maintained at a high level even in the absence of important structural elements – axial histidine ligands to the primary electron donor P.

Keywords: photosynthetic reaction center, *Cereibacter sphaeroides*, ligation of bacteriochlorophyll, primary electron donor, redox potential, thermal stability of membrane proteins, FTIR spectroscopy, femtosecond spectroscopy