

УДК 541.14

ОСОБЕННОСТИ АКСИАЛЬНОГО ЛИГАНДИРОВАНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛОВ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ РЕАКЦИОННОМ ЦЕНТРЕ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ

Обзор

© 2019 Т.Ю. Фуфина, М.М. Леонова, Р.А. Хатыпов,
А.М. Христин, В.А. Шувалов, Л.Г. Васильева

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

Поступила в редакцию 07.11.2018

После доработки 07.11.2018

Принята к публикации 30.11.2018

В обзоре представлены недавние экспериментальные данные, полученные с помощью направленного мутагенеза реакционного центра пурпурных бактерий. Обсуждаются вопросы, касающиеся роли аксиального лигандирования (бактерио)хлорофиллов в регуляции их спектральных и окислительно-восстановительных свойств, связи между структурой хромофоров и природой их аксиальных лигандов. Проведены сравнение лигандирования кофакторов в разных типах РЦ и анализ причины имеющихся различий в свете современных представлений об эволюции фотосинтеза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лигандирование бактериохлорофилла, реакционный центр фотосинтеза, пигмент-белковые взаимодействия, пурпурные бактерии, направленный мутагенез, *Rhodobacter sphaeroides*.

DOI: 10.1134/S0320972519040043

ХЛОРОФИЛЛЫ И ИХ ЛИГАНДЫ

Хлорофиллы (Хл) и бактериохлорофиллы (БХл), самые распространенные пигменты фотосинтеза, они являются неотъемлемыми составляющими фотосинтетических комплексов бактерий, водорослей и растений. Эти пигменты отвечают за поглощение и перенос солнечной энергии в светособирающих антеннах, а также выполняют роль переносчиков электрона в реакционных центрах (РЦ) фотосинтеза. Интерес к изучению свойств, разнообразию форм и распространенности (Б)Хл в природе связан не только с фундаментальными исследованиями, но также с возможностями практического использования этих пигментов и (Б)Хл-содержащих комплексов в качестве фотосенсибилизаторов и искусственных преобразователей световой энергии [1, 2].

Принятые сокращения: Хл – хлорофилл; БХл – бактериохлорофилл; БФео – бактериофеофитин; Фео – феофитин; пб-РЦ – реакционный центр пурпурных бактерий; ФС1 и ФС2 – фотосистемы 1 и 2, Р – специальная пара бактериохлорофиллов; Р* – возбужденное состояние Р; Р_А и Р_В – бактериохлорофиллы специальной пары; В_А и В_В – мономерные бактериохлорофиллы.

* Адресат для корреспонденции.

Природные (Б)Хл в подавляющем большинстве являются Mg-порфиринами (рис. 1), но в ряде пурпурных бактерий и в реакционных центрах хлороацидобактерий также обнаружены и Zn-содержащие БХл [3]. Считается, что включение этих двух металлов в (Б)Хл обусловлено тем, что Mg- и Zn-содержащие порфирины имеют наибольшее время жизни возбужденного состояния. Более широкая распространенность Mg-порфиринов, по-видимому, объясняется большей доступностью ионов Mg в природе [1, 3]. Центральный атом магния (Б)Хл образует четыре координационные связи с азотами пирролов. Кроме того, по крайней мере еще одно аксиальное положение атома магния всегда заполнено электрон-донорной группой со стороны растворителя или белка. Максимальное координационное число Mg – 6, однако в составе природных пигмент-белковых комплексов атом магния (бактерио)хлорофиллов чаще всего пяти-координирован, случаи его полного координационного насыщения встречаются достаточно редко [4, 5]. π-Электронная система (Б)Хл чувствительна к изменениям парциальной плотности заряда центрального металла, поэтому природа и расположение нуклеофильных групп в аксиальных положениях магния во многом опреде-

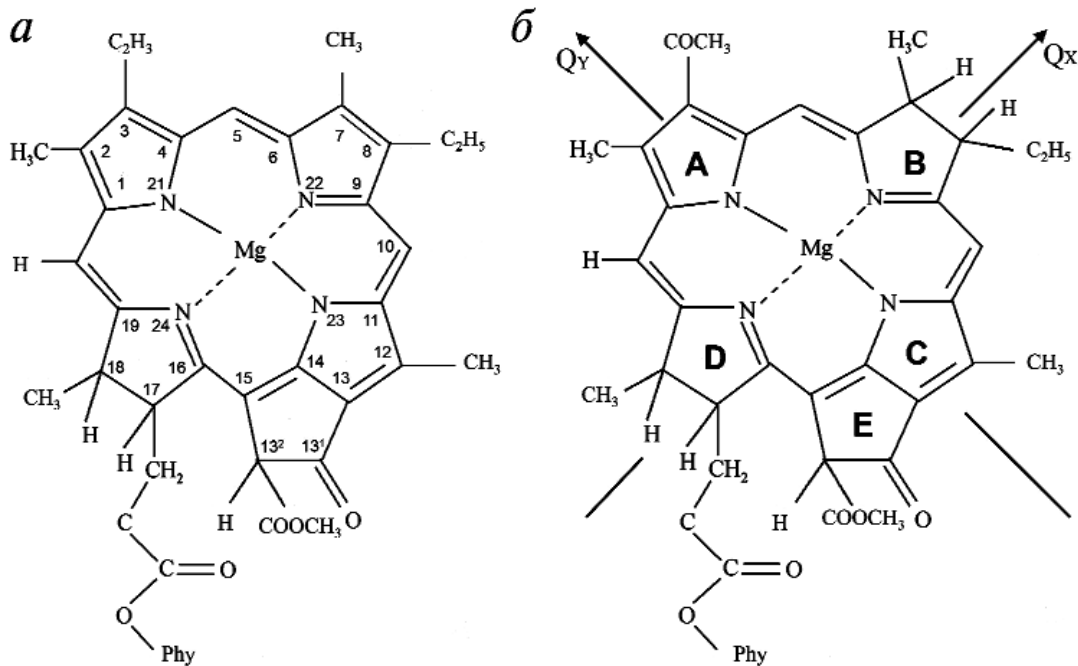


Рис. 1. Структура хлорофилла *a* (*a*) и (бактерио)хлорофилла *a* (*б*). Показаны Q_Y и Q_X оси макроцикла. Обозначения пиррольных колец и номера C -атомов соответствуют номенклатуре Фишера [1]. Различающиеся боковые группы в разных Хл: $C^3 -CHO$ (Хл *d*), $C^7 -CHO$ (Хл *b*); различающиеся боковые группы в разных БХл: $C^3 -CH=CH_2$ (БХл *g*), $C^8 =CH-CH_3$ (БХл *b* и *g*)

ляют спектральные и окислительно-восстановительные свойства этого пигмента [6–8]. В (Б)Хл-содержащих комплексах аксиальными лигандами со стороны белка чаще всего выступает имидазольная группа остатков His. В образовании координационной связи с атомом Mg также могут участвовать молекулы воды, боковые группы аминокислот (Asn, Gln, Asp, Glu, Met и Tyr), атомы кислорода карбонильных групп аминокислотных остатков и фосфоэфирных связей липидов [9–11]. Аксиальные лиганды (Б)Хл могут располагаться либо с β -стороны макроцикла (сторона, по направлению к которой развернут остаток фитола (Б)Хл), либо с противоположной, α -стороны. Известно, что α -лигандирование на ~ 4 кДж/моль стабильнее, чем β -лигандирование [12–14]. В фотосинтетических РЦ бактерий и растений атомы Mg (бактерио)хлорофиллов всегда координированы с α -стороны, тогда как в светособирающих комплексах встречаются оба типа лигандирования [4, 18, 11, 12, 14].

СТРУКТУРЫ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИНТЕЗА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПА

Реакционные центры фотосинтеза делят на два типа на основе сходства их структур и природы конечного акцептора электрона, которым

является либо [4Fe-4S]-кластер (первый тип) либо хинон (второй тип). К РЦ первого типа относят РЦ зеленых серных бактерий, гелиобактерий и ацидобактерий, а также фотосистему (ФС)1 цианобактерий и растений. К РЦ второго типа относятся РЦ пурпурных и нитчатых зеленых несерных бактерий и ФС2. Центральные части РЦ фотосинтеза содержат шесть (бактерио)хлороиновых кофакторов в двух симметричных цепях переноса электрона (рис. 2). В РЦ первого типа эти цепи начинаются от димера (Б)Хл, и далее в каждой из цепей следуют еще два мономерных (Б)Хл, называемых А и A_0 (рис. 2, *a* и *б*) [15]. В РЦ второго типа наряду с димером (Б)Хл цепи переноса электрона содержат мономер (Б)Хл и мономер (бактерио)феофитина ((Б)Фео) (рис. 2, *в* и *г*). Фотохимическая реакция в РЦ начинается с того, что молекула димера (Б)Хл поглощает квант света, переходит в электронно-возбужденное состояние, становится сильным восстановителем и отдает электрон, инициируя его перенос с внешней стороны мембраны на внутреннюю по активным цепям кофакторов. Разделение зарядов в РЦ на первых этапах происходит за время в диапазоне от пс до мкс и сопровождается понижением уровня свободной энергии каждого последующего состояния с разделенными зарядами, что способствует прямому переносу электрона и предотвращает обратный процесс [16]. Квантовый выход фото-

химического разделения зарядов в РЦ близок к 100%. Восстановительные потенциалы кофакторов переноса электрона в РЦ зависят от их химической структуры и белкового окружения [17].

В настоящее время известны пространственные структуры целого ряда фотосинтетических комплексов, что дает возможность анализировать закономерности и сравнивать особенности лигандирования (Б)Хл в РЦ разных типов. Наиболее просто устроен РЦ гелиобактерии *Helio-*

bacterium modesticaldum, относящийся к РЦ первого типа. Этот комплекс является гомодимером, он состоит из двух идентичных полипептидов PshA и короткой антенны, представленной двумя одинаковыми трансмембранными спиралями [18]. Две электрон-транспортные цепи РЦ гелиобактерий начинаются от первичного донора электрона, специальной пары БХл g' (лигандированы остатками His), и заканчиваются конечным акцептором электрона, [4Fe-4S]-клас-

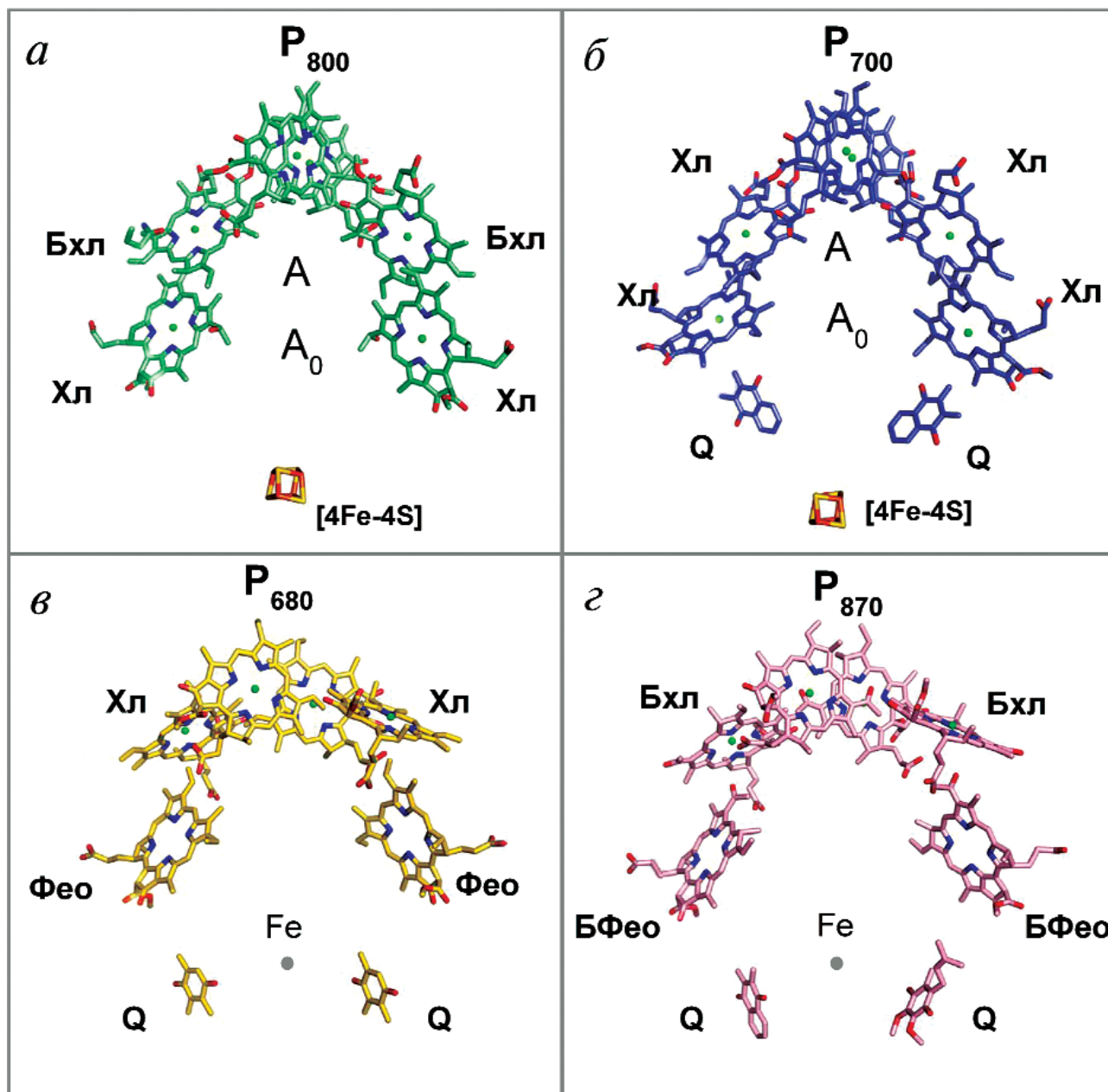


Рис. 2. Расположение редокс-кофакторов в структуре reaction center гелиобактерий (а), ФС1 (б), ФС2 (в) и РЦ пурпурных бактерий (з). Номера структур в PDB банке: 5V8K, 1JB0, 3WU2 и 1PRC соответственно. Рисунок выполнен с помощью программы PyMol [35]. [4Fe-4S] – железо-серный кластер, Fe – атом негемового железа, Q – хинон. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

тером (рис. 2, а). Между ними последовательно расположены кофакторы А (БХл *g*, предположительно лигандирован молекулой воды) и А₀ (8¹-ОН Хл *a*, лигандирован молекулой воды) [18]. Одновременное присутствие в РЦ как БХл, так и Хл, отмечено также у зеленых серных бактерий [19] и является особенностью бактериальных РЦ первого типа.

В более сложно организованной ФС1 цианобактерии *Synechococcus elongatus* (РЦ первого типа) электрон-транспортные цепи не полностью симметричны. Димер Хл Р₇₀₀ в ФС1 состоит из молекулы Хл *a* и С13²-эпимера Хл *a*. Характерной чертой Р₇₀₀ является асимметричность Н-связей с белковым окружением. В то время как половина димера, представленная Хл, не образует таких взаимодействий, вторая половина, эпимер Хл, образует три Н-связи с полипептидом PsaA. Далее в обеих цепях следуют два мономерных Хл *a* в качестве кофакторов А и А₀ (рис. 2, б) [15, 19]. Аксиальными лигандами хлорофиллов специальной пары Р₇₀₀ выступают остатки His, кофакторы А лигандированы со стороны белка через молекулы воды, а кофакторы А₀ — через атомы серы Met [9]. Считается, что такое распределение лигандов обеспечивает необходимый градиент редокс-потенциалов Хл для эффективного протекания фотохимической реакции. Роль ФС1 состоит в восстановлении ферредоксина, редокс-потенциал которого довольно низок (–0,42 В). Использование такого слабого лиганда как сера Met, очевидно, обеспечивает создание чрезвычайно низкого потенциала акцептора электрона Хл А₀ (~–1,2 В) [12, 19, 20].

ФС2 цианобактерий относится ко второму типу РЦ и является вода-пластохинон фото-оксидоредуктазой (рис. 2, в). Благодаря необычайно высокому окислительно-восстановительному потенциалу первичного донора электрона, димера Хл (1,2–1,4 В), ФС2 обладает способностью акцептировать электроны непосредственно от воды [21]. Эта способность обеспечивается рядом факторов, среди которых определяющая роль принадлежит особенностям структуры димера Хл ФС2 и его белковому окружению [22]. Схема аксиального лигандирования четырех Хл в центральной части РЦ ФС2 выглядит так: два Хл *a* специальной пары Р_{D1} и Р_{D2} лигандированы His, а мономерные Хл_{D1} и Хл_{D2} лигандированы молекулами воды. Вода-лиганд хлорофилла D1 связана двумя Н-связями с кислородом метокси-карбонильной группы кольца E этого Хл и с остатком Thr D1-179. В свою очередь, вода-лиганд мономерного Хл неактивной цепи образует только одну Н-связь с кислородом метокси-карбонильной группы кольца E Хл_{D2}. Н-связи, образуемые молекулами во-

ды, лигандами Хл_{D1} и Хл_{D2}, не только стабилизируют хлороиновый макроцикл, но также влияют на редокс-потенциал хромофора [11]. Предполагается, что различие во взаимодействии лигандов мономерных Хл с белковым окружением лежит в основе функциональных различий двух цепей кофакторов в ФС2 [23].

Фотосинтетический реакционный центр пурпурных бактерий (пб-РЦ), также относящийся ко второму типу, состоит из трех или четырех белковых субъединиц и десяти кофакторов, организованных в две цепи переноса электрона [17]. На периплазматической стороне мембраны обе цепи начинаются со специальной пары Р, состоящей из молекул БХл *a*, Р_А и Р_В. Далее симметрично расположены два мономерных БХл *a*, В_А и В_В, БФео *a*, Н_А и Н_В, два хинона Q_А и Q_В, и атом негемового железа (рис. 2, г). Атомы магния всех четырех молекул БХл образуют координационные связи с азотом имидазольной группы His, расположенного с α-стороны макроцикла (рис. 3, а).

Суммируя приведенные структурные данные, можно отметить следующее: 1) независимо от типа РЦ и редокс-потенциала Р лигандами димера (Б)Хл всегда выступают остатки His; 2) первичным акцептором электрона, кофактором А, всегда является мономер той же природы, что и Р [15]. Этот кофактор лигандирован His в пб-РЦ или молекулами воды в ФС2 и РЦ первого типа; 3) мономерный кофактор А₀ в РЦ второго типа представлен (Б)Фео, а в РЦ первого типа — хлорофиллом *a* или его производным. В гелиобактериях А₀ лигандирован водой, а в ФС1 — остатком Met. Примечательно, что среди рассмотренных РЦ фотосинтеза только в пб-РЦ His является исключительным аксиальным лигандом БХл [14, 24, 25].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ АКСИАЛЬНЫХ ЛИГАНДОВ БХл в пб-РЦ

В литературе последних лет описан целый ряд мутантных пб-РЦ с модифицированным положением, природой или количеством аксиальных лигандов каждого из четырех БХл. В частности, известны т.н. гетеродимерные РЦ, в которых специальная пара представлена парой БХл: БФео. Такая модификация Р происходит в результате замены гистидинового лиганда одного из бактериохлорофиллов Р на аминокислотный остаток, не способный координировать атом Mg. В гетеродимерных комплексах существенно снижается скорость первичного разделения зарядов [17]. В то же время показано, что в РЦ *Rba. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* природные

гистидиновые лиганды димера БХл, His M202 и His L173, могут быть замещены на Gln или молекулу воды без ущерба для фотохимической активности РЦ [26, 27]. Авторами этих работ был сделан вывод, позже нашедший подтверждение и для специальной пары Хл в ФС2 [28]: что изменение природы аксиальных лигандов первичного донора электрона не оказывает влияния на функциональные свойства Р.

В ряде недавних работ были модифицированы количество, положение или природа аксиальных лигандов мономерных БХл пб-РЦ. В частности, показано, что в РЦ *Rba. sphaeroides* координационное число магния мономерного БХл Вв может быть повышено с 5 до 6 в результате замещения Ile L177 на His (рис. 3, в). В спектре мутантного РЦ наблюдается длинноволновый сдвиг полосы Q_x одного из БХл до 638 нм [29] (таблица). Подобные сдвиги, наблюдаемые как в растворе, так и в составе фотосинтетических белков, свидетельствуют о том, что происходит заполнение второго аксиального положения атома магния (Б)Хл [7–8, 30]. В структуре РЦ I(L177)Н с β -стороны макроцикла Вв появляется новая молекула воды, предположительно связанная водородной связью с His L177, и эта вода, очевидно, служит дополнительным лигандом БХл Вв (рис. 3, в) [31]. Замещение I(L177)Н

вызывает значительное изменение пигмент-белковых взаимодействий в РЦ *Rba. sphaeroides*, влияя не только на лигандирование БХл Вв, но также приводя к прочному, возможно, ковалентному связыванию БХл P_A с L-субъединицей (таблица), а также к усилению координационной связи магния БХл P_A с His L173 [29, 31]. Несмотря на это, среднеточечный потенциал пары P/P⁺ в РЦ I(L177)Н уменьшается всего на 50 мВ, время жизни P* увеличивается незначительно и составляет $3,7 \pm 0,1$ пс (P.A. Хатыпов, неопубликованные данные), по сравнению с $3,2 \pm 0,05$ пс для РЦ дикого типа. Квантовый выход разделения зарядов P⁺Q_A⁻ практически не меняется (таблица). Полученные данные согласуются с упомянутыми выше результатами и свидетельствуют о том, что при условии сохранения аксиального лигандирования (бактерио)хлорофиллов димера модификация белкового окружения первичного донора электрона не оказывает значительного влияния на функциональные свойства Р и фотохимическую активность РЦ.

С помощью двойного аминокислотного замещения I(L177)Н + Н(M182)L был получен РЦ *Rba. sphaeroides*, в котором координирование атома магния мономерного БХл Вв осуществляется с β -стороны макроцикла, предположительно, через молекулу воды, связанную Н-связью с

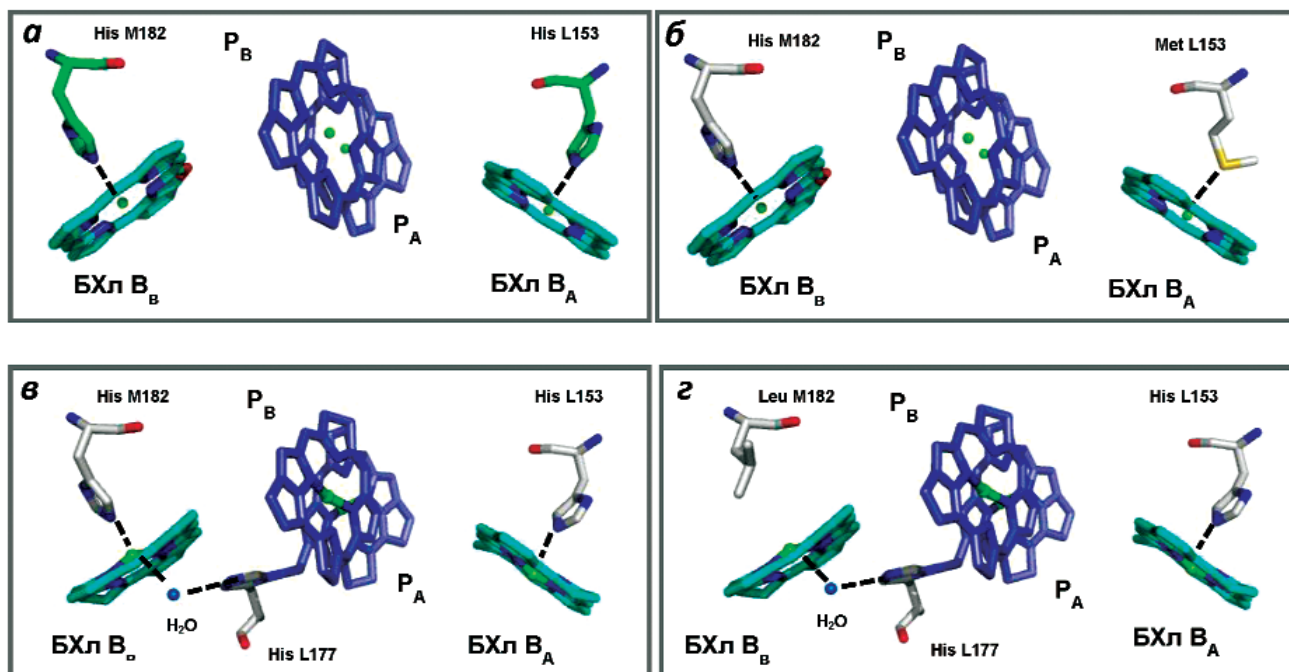


Рис. 3. Модификация положения, природы или количества аксиальных лигандов мономерных БХл в РЦ *Rba. sphaeroides*. а – РЦ дикого типа; б – замена лиганда БХлВ_А HisL153 на Met; в – РЦ I(L177)Н, β -координирование БХл В_В; з – РЦ I(L177)Н + Н(M182)L, β -координирование БХл В_В. Проекция – вид параллельно мембране. Для простоты восприятия боковые группы и остатки фитола БХл, а также His лиганды димера БХл не показаны. Номера структур в PDB банке 3V3Y – РЦ дикого типа и 3V3Z – РЦ I(L177)Н.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии на сайте www.elibrary.ru

Свойства РЦ *Rba. sphaeroides* с генетическими модификациями аксиальных лигандов мономерных БХл

Реакционный центр	Положение полос БХл, нм	БХл : БФео	Квантовый выход образования $P^+Q_A^-$	Ссылки
Дикий тип	90 К, $Q_y P - 888$ $Q_y B - 804$ $Q_x \text{ БХл} - 597$	2 : 1	~1	[17]
I(L177)H	90 К, $Q_y B - 803$ $Q_y P - 873$ $Q_x \text{ БХл} - 596 \text{ и } 638$	1,5 : 1*	~1	[29, 31]
H(M182)L + I(L177)H	90 К, $Q_y V_A - 805$ $Q_y V_B - 819$ $Q_y P - 888$ $Q_x \text{ БХл} - 598$	1,5 : 1*	н.о.	[31, 32]
H(M153)C	90 К, $Q_y V_B - 812$ $Q_y V_A - 800$ $Q_x \text{ БХл} - 591 \text{ и } 602$	2 : 1	~1	[34]
H(M153)M	90 К, $Q_y V_B - 813$ $Q_y V_A - 800$ $Q_x \text{ БХл} - 584 \text{ и } 603$	2 : 1	~1	[34]

Примечание. * Соотношение БХл/БФео = 1,5 объясняется прочным связыванием БХл P_A и His L177, в результате чего этот БХл не экстрагируется из РЦ смесью ацетон-метанол (7 : 2) [29].

His L177 (рис. 3, *в*) [31]. Фотохимическая активность мутантного РЦ, измеренная по накоплению состояния с разделенными зарядами $P^+Q_A^-$, остается на том же уровне, что и в РЦ дикого типа [32]. Также было показано, что координационная связь магния БХл V_B с молекулой воды является менее стабильной, чем аксиальное лигандирование этого БХл остатком His [33].

Показано, что Met и Cys способны выступать устойчивыми аксиальными лигандами мономерного БХл V_A вместо природного лиганда His L153 [34]. Моделирование с помощью программы PyMol [35] предсказывает, что координирование атома Mg V_A может осуществляться через серу Met (рис. 3, *з*) и Cys (не показано). Было, однако, отмечено появление фракции разрушенных мутантных РЦ при выделении этих комплексов из мембран, указывающее на возможное уменьшение силы координационной связи [36]. В спектрах поглощения РЦ H(L153)C и H(L153)M, измеренных при 90 К, наблюдаются небольшие коротковолновые сдвиги полосы $Q_y V_A$ на 4–5 нм и появление второй коротковолновой полосы $Q_x \text{ БХл}$ в районе 591 нм и 584 нм, соответственно (таблица), указывающие на модификацию электронных переходов в молекуле V_A и, по-видимому, связанные с изменением природы его аксиального лиганда [7, 37, 38]. В то же время фотохимическая активность РЦ H(L153)C и H(L153)M, измеренная по накоплению состояния с разделенными зарядами $P^+Q_A^-$, сравнима с таковой в РЦ дикого типа [36]. Эти

данные свидетельствуют о том, что лигандирование магния БХл V_A метионином, известным, как слабый лиганд, в частности, обеспечивающий низкий редокс-потенциал Хл A_0 в ФС1 [12], не оказывает существенного влияния на фотохимический процесс в РЦ *Rba. sphaeroides* на стадии образования состояния с разделенными зарядами $P^+Q_A^-$.

ПРИЧИНЫ КОНСЕРВАТИВНОСТИ АКСИАЛЬНОГО ЛИГАНДИРОВАНИЯ СПЕЦИАЛЬНОЙ ПАРЫ (Б)Хл

Заслуживает внимания тот факт, что остатки His, расположенные с α -стороны макроциклов, выступают аксиальными лигандами специальной пары (Б)Хл во всех известных к настоящему времени природных РЦ фотосинтеза [39, 40]. В то время как расположение His с α -стороны (Б)Хл выгодно с точки зрения термодинамики связывания лиганда [12, 13, 41], причина консервативности природы лиганда для первичного донора электрона не вполне очевидна, поскольку, как обсуждалось выше, этот фактор не оказывает существенного влияния на эффективность фотохимической реакции в пб-РЦ и ФС2 [26–28].

Важными характеристиками первичного донора электрона являются его окислительно-восстановительные свойства и стабильность димерной структуры, которую обеспечивают взаимодействия P с белковым окружением. Редокс-по-

тенциал Р в разных РЦ варьирует значительно, на его величину влияет ряд факторов, среди которых природа пигмента, расстояние между макроциклами в димере, Н-связи с белком и другие [22]. Согласно расчетам, природа лигандов димера (Б)Хл не оказывает значительного влияния на величину E_m Р/Р⁺ [20]. На стабильность структуры димера влияет сила аксиальной координационной связи атома магния (Б)Хл с лигандом и, в ряде случаев, Н-связи Р с белковым окружением [40]. Сила координационной связи определяется константой диссоциации этой связи. Для гистидиновых лигандов эта величина, рассчитанная для Хл и БХл в окружении белка, является наибольшей и составляет 61,5 кДж/моль для Хл и 60,9 кДж/моль для БХл. Для сравнения, энергия диссоциации связи другого сильного лиганда, Asp, составляет 55,5 кДж/моль для Хл и 59,3 кДж/моль для БХл, а для лиганда-молекулы воды — 35,7 кДж/моль для Хл и 39,2 кДж/моль для БХл [20]. Константы были рассчитаны для мономерных пигментов, однако, необходимо учитывать, что Р — это димер экситонно взаимодействующих (Б)Хл, спектрально и фотохимически проявляющих себя как одна молекула с обобщенной π -электронной плотностью. В макроцикле БХл a насчитывается 18 π -электронов (рис. 1), в димере БХл их количество удвоено. Исходя из того, что каждый из двух атомов Mg связан с общей π -электронной системой Р, можно ожидать, что энергия их координационных связей в димере (Б)Хл будет значительно превышать сумму соответствующих энергий, рассчитанных для двух отдельно взятых молекул (Б)Хл. Соответственно, разница в константах диссоциации для различных лигандов Р будет больше величин, приведенных в работе [20]. Из сказанного следует, что консервативность His лигандов для димера (Б)Хл обусловлена наибольшей силой координационной связи между атомом Mg макроцикла и имидазольной группой His, способствующей стабилизации первичного донора электрона в белковом окружении. Силой координационной связи, по-видимому, объясняется и тот факт, что His является наиболее часто встречающимся лигандом мономерных кофакторов не только в РЦ и других фотосинтетических комплексах, но также во многих мембранных белках, участвующих в процессах переноса энергии [39].

АКСИАЛЬНОЕ ЛИГАНДИРОВАНИЕ МОНОМЕРНЫХ БХл В пб-РЦ

Литературные данные свидетельствуют о том, что аксиальное координирование атома магния мономерных (Б)Хл в РЦ первого типа и

ФС2 через молекулы воды и остатки Met служит цели регулирования спектральных и редокс-свойств (Б)Хл. Остается неясным, почему в пб-РЦ аксиальными лигандами мономерных БХл выступает исключительно His, если, как обсуждалось выше, замещение этого аминокислотного остатка на другие лиганды существенно не влияет на фотохимическую активность комплексов. Анализ кристаллической структуры РЦ *Rba. sphaeroides* позволяет выявить одну из причин преимущества His как лиганда для мономерного БХл B_A . На рис. 4 показано, что N_ϵ атом имидазольной группы His L153 образует координационную связь с атомом магния БХл B_A , а N_δ -атом этой группы располагается на расстоянии водородной связи (2,98 Å) от атома кислорода карбонильной группы пептидной связи Gly L149—Ile L150. Возможно, Н-связь гистидинового лиганда с белковым окружением обеспечивает дополнительную стабильность БХл B_A , являющегося первичным акцептором электрона от Р*. Кроме того, предполагаемая Н-связь может смещать электронную плотность и увеличивать дипольный момент имидазольной группы, усиливая за счет этого координационную связь с магнием БХл [42]. При замене His L153 на другие аминокислотные остатки, способные выступать лигандами, потеря Н-связи может являться одной из причин наблюдаемой частичной дестабилизации комплекса (рис. 4).

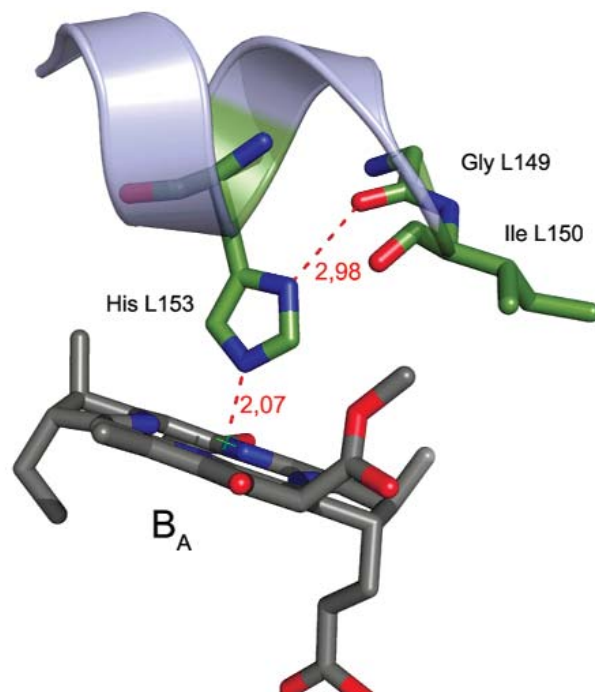


Рис. 4. Белковое окружение мономерного БХл B_A в структуре РЦ *Rba. sphaeroides* (файл PDB 3V3Y). С цветным вариантом рис.4 можно ознакомиться в электронной версии на сайте www.elibrary.ru

Кроме того, на «выбор» лиганда также влияет структура пигмента. Разница между молекулами Хл *a* и БХл *a* состоит в том, что в положении C^3 - у Хл располагается винильная, а у БХл – ацетильная группа, у Хл восстановлено кольцо D, а у БХл – кольца D и В (рис. 1). В результате, по сравнению с Хл, в молекуле БХл π -электронная плотность редуцирована и распределена менее симметрично, преимущественно вдоль Y-оси макроцикла [1]. Эта разница сказывается не только на спектральных и редокс-свойствах, но также на стабильности пигментов и на их взаимодействиях с лигандами. Будучи менее устойчивыми к действию света, кислот и окислителей, бактериохлорофиллы *a* и *b* нуждаются в сильном лиганде, и в белках образуют координационные связи исключительно с имидазольными группами His. Показано, что БХл *a* самопроизвольно связывается с имидазолом в растворах [41]. Исключение составляет БХл *g*, близкий по структуре к Хл, легко превращающийся в хлорин в слабокислой среде и способный связывать воду в качестве лиганда в РЦ гелиобактерий [18, 43]. В отличие от БХл *a*, Хл *a* имеет более широкий круг лигандов и в белковых комплексах образует координационные связи с His, водой и амидными группами аминокислот [42]. По-видимому, именно строгой избирательностью БХл *a* к лиганду объясняется тот факт, что в РЦ зеленых серных бактерий, где необходимость поддержания низкого редокс-потенциала кофактора A_0 требует использования более слабого, чем His, лиганда, в этой позиции вместо БХл *a* встречаются производные Хл *a* [15, 19, 44].

СТРУКТУРНАЯ РОЛЬ ЛИГАНДИРОВАНИЯ КОФАКТОРОВ

Особенности молекулярной организации РЦ фотосинтеза тесно связаны с их функциями. Сравнение структур РЦ первого и второго типа обнаруживает ряд отличий, в частности, касающихся ориентации плоскостей макроциклов кофакторов А относительно плоскости мембраны. В РЦ первого типа взаимная ориентация этих плоскостей ближе к перпендикулярной, а в РЦ второго типа – ближе к параллельной (рис. 2). Различные ориентации кофакторов А обеспечиваются принципиально разными положениями их лигандов в РЦ первого и второго типа. Фотофизическое объяснение этому феномену связывают с оптимизацией электронного транспорта к конечному акцептору электрона в каждом конкретном РЦ [15]. Кроме того, замечено, что только в РЦ первого типа присутствуют C^{12} -эпимеры (Б)Хл, в то время как в подавляющем

большинстве остальных фотосинтетических комплексов наблюдается высокая стереоспецифичность (Б)Хл [41]. Предполагается, что наличие эпимеров вызвано стерическими требованиями, связано с ориентацией кофакторов А и необходимо для оптимальной упаковки РЦ в мембране [1, 15, 41].

ЛИГАНДИРОВАНИЕ (Б)Хл И ЭВОЛЮЦИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЦ

В литературе активно обсуждаются различные аспекты эволюции фотосинтеза, однако вопрос о вариативности аксиального лигандирования магния (Б)Хл и его роли в процессе эволюционного развития фотосинтетических комплексов недостаточно освещен и представляет значительный интерес [12]. Несмотря на низкую степень гомологии аминокислотных последовательностей субъединиц реакционных центров первого и второго типа, все РЦ фотосинтеза, очевидно, имеют отдаленное общее происхождение, поскольку проводящее электрон ядро этих комплексов представлено трансмембранными белками, состоящими из пяти альфа-спиралей, организованных в замыкающуюся C-форму [45, 46]. Согласно современным представлениям, первые РЦ появились более 3 млрд лет назад у аноксигенных фототрофных прокариот, состояли из двух гомологичных мембранных субъединиц и обладали чертами РЦ как первого, так и второго типа. В дальнейшем за счет дупликации генов возникли фотосинтетические РЦ с гетеродимерными субъединицами [3, 47, 48]. То обстоятельство, что Хл и БХл имеют общий путь биосинтеза, в котором производные Хл предшествуют производным БХл, позволило предположить, что первыми могли появиться Хл-, а не БХл-содержащие фотосинтетики [49], хотя эта теория имеет своих оппонентов [50]. Структура РЦ гелиобактерий показывает, что Хл и БХл одновременно могли входить в состав фотосинтетических белковых комплексов древних фототрофов [15]. С помощью современных молекулярно-генетических подходов установлено, что разделение на первый и второй тип РЦ произошло на самых ранних этапах развития хлорофильного фотосинтеза. Отмечается, что в процессе эволюции могло иметь место как приобретение, так и утрата генов, отвечающих за фотосинтез, и что в этих процессах значительную роль мог сыграть горизонтальный перенос генов с помощью фагов [47]. Эволюция фотосинтеза остается предметом активных дискуссий, которым посвящены многочисленные обзоры [3, 15, 47, 48, 51].

Не углубляясь в эту обширную тему, на основе сказанного выше можно предположить, что использование воды в качестве аксиального лиганда магния мономерных (Б)Хл было изначально характерно для древних РЦ фотосинтеза, о чем свидетельствуют структуры гомодимерных РЦ зеленых серных и гелиобактерий [15, 19]. По-видимому, аксиальное лигандирование БХл остатками Нis в пб-РЦ и других бактериальных РЦ второго типа не является исходной моделью, в дальнейшем претерпевшей изменения в процессе развития фотосинтетических комплексов, как предполагали сторонники теории начала эволюции фотосинтеза от аноксигенных протеобактерий [50], а связано с природой БХл, с особенностями структуры и функции пб-РЦ.

В РЦ гелиобактерий, а также в фотосистемах 1 и 2 аксиальное координирование магния (Б)Хл осуществляется такими лигандами, как Нis, вода и (в ФС1) атом серы Met, и играет важную роль в настройке редокс-свойств кофакторов. Особенностью пб-РЦ является исключительное координирование магния всех БХл *a* (*b*) остатками Нis. С помощью направленного мутагенеза показано, что изменение природы, положения или количества аксиальных лигандов

БХл в пб-РЦ не оказывает значительного влияния на фотохимическую активность комплекса, однако приводит к снижению стабильности РЦ. Консервативность аксиального лигандирования бактериохлорофиллов пб-РЦ, очевидно, связана с химической природой пигмента, а сильная координационная связь атома Mg с остатком Нis служит цели стабилизации БХл в составе фотосинтетических комплексов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А17-117030110140-5 при частичной поддержке РФФИ (проекты 17-00-00218(К) и 17-44-500828).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов между ними.

Благодарности

Авторы выражают признательность Шкурпатову А.Я. и Забелину А.А. за критическое прочтение и обсуждение рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Scheer, H. (2006) In *Chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications: 25 (Advances in photosynthesis and respiration)* (Grimm, B., Porra, R.J., and Scheer, H., eds) Springer, Netherlands, pp. 1–26.
- Зайцев С.Ю., Соловьева Д.О., Набиев И.Р. (2014) Супрамолекулярные пленочные системы на основе фоточувствительных мембранных белков, *Успехи химии*, **83**, 38–81.
- Blankenship, R.E. (2014) *Molecular mechanisms of photosynthesis*, by Robert E. Blankenship, 2nd Edn., Wiley Blackwell, Weinheim.
- Fiedor, L. (2006) Hexacoordination of bacteriochlorophyll in photosynthetic antenna LH1, *Biochemistry*, **45**, 1910–1918, doi: 10.1021/bi0514055.
- Tronrud, D.E., Wen, J., Gay, L., and Blankenship, R.E. (2009) The structural basis for the difference in absorbance spectra for the FMO antenna protein from various green sulfur bacteria, *Photosynth. Res.*, **100**, 79–87, doi: 10.1007/s11120-009-9430-6.
- Evans, T.A., and Katz, J.J. (1975) Evidence for 5- and 6-coordinated magnesium in bacteriochlorophyll *a* from visible absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **396**, 414–426, doi: 10.1016/0005-2728(75)90147-4.
- Callahan, P.M., and Cotton, T.M. (1987) Assignment of bacteriochlorophyll *a* ligation state from absorption and resonance Raman spectra, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7001–7007, doi: 10.1021/ja00257a016.
- Hartwich, G., Fiedor, L., Simonin, I., Cmiel, E., Schafer, W., Noy, D., Scherz, A., and Scheer, H. (1998) Metal-substituted bacteriochlorophylls: I. Preparation and influence of metal and coordination on spectra, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3675–3683, doi: 10.1021/ja970874u.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, **411**, 909–917, doi: 10.1038/35082000.
- Liu, Z.F., Yan, H.C., Wang, K.B., Kuang, T.Y., Zhang, J.P., Gui, L.L., An, X.M., and Chang, W.R. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution, *Nature*, **428**, 287–292, doi: 10.1038/nature02373.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R., and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, **473**, 55–61, doi: 10.1038/nature09913.
- Balaban, T.S., Fromme, P., Holzwarth, A.R., Kraubeta, N., and Prokhorenko, V.I. (2002) Relevance of the diastereotopic ligation of magnesium atoms of chlorophylls in photosystem I., *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**, 197–207, doi: 10.1016/S0005-2728(02)00363-8.
- Oba, T., and Tamiaki, H. (2002) Which side of the p-macrocycle plane of (bacterio)chlorophylls is favored for binding of the fifth ligand? *Photosynth. Res.*, **74**, 1–10, doi: 10.1023/A:1020816128794.
- Oba, T., and Tamiaki, H. (2014) Asymmetry of chlorophylls in photosynthetic proteins: from the viewpoint of coordination chemistry, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **18**, 919–932, doi: 10.1142/S1088424614500710.
- Orf, G.S., Gisriel, C., and Redding, K.E. (2018) Evolution of photosynthetic reaction centers: insights from the structure of the heliobacterial reaction center, *Photosynth. Res.*, doi: 10.1007/s11120-018-0503-2.

16. Шувалов В.А. (1990) *Первичное преобразование световой энергии при фотосинтезе*, Наука, Москва.
17. Леонова М.М., Фуфина Т.Ю., Шувалов В.А., Васильева Л.Г. (2014) Исследование пигмент-белковых взаимодействий в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий. Глава в кн.: *Современные проблемы фотосинтеза. Том 1* (под ред. Аллахвердиева С.И., Рубина А.Б., Шувалова В.А.) Москва-Ижевск, Ижевский Институт компьютерных исследований, с. 157–196.
18. Gisriel, C., Sarrou, I., Ferlez, B., Golbeck, J.H., Redding, K.E., and Fromme, R. (2017) Structure of a symmetric photosynthetic reaction center—photosystem, *Science*, **357**, 1021–1025, doi: 10.1126/science.aan5611.
19. Heathcote, P., Jones, M.R., and Fyfe, P.K. (2003) Type I photosynthetic reaction centres: structure and function, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **358**, 231–243.
20. 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, doi: 10.1007/s00775-006-0164-z.
21. Семенов А.Ю., Мамедов М.Д. (2014) Механизмы трансмембранного переноса зарядов в фотосинтетических реакционных центрах. Глава 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. 295–324.
22. 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, doi: 10.1007/s11120-010-9552-x.
23. Shen, J.R. (2015) The structure of the photosystem II and the mechanism of water oxidation in photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 23–48, doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120129.
24. Imhoff, J.F. (2017) Diversity of anaerobic anoxygenic phototrophic purple bacteria, in *Modern topics in the phototrophic prokaryotes. Environmental and applied aspects* (Hallenbeck, P.C., ed.) Springer, Cham, Switzerland, pp. 47–86, doi: 10.1007/978-3-319-46261-5_2.
25. Yurkov, V., and Hughes, E. (2017) Aerobic anoxygenic phototrophs: four decades of mystery, in *Modern topics in the phototrophic prokaryotes. Environmental and applied aspects* (Hallenbeck P.C., ed.) Springer, Cham, Switzerland, pp. 193–216, doi: 10.1007/978-3-319-46261-5_2.
26. Bylina, E.J., and Youvan, D.C. (1988) Directed mutations affecting spectroscopic and electron-transfer properties of the primary donor in the photosynthetic reaction center, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7226–7230, doi: 10.1073/pnas.85.19.7226.
27. 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, doi: 10.1021/bi9523365.
28. Saito, K., Shen, J.R., and Ishikita, H. (2012) Influence of the axial ligand on the cationic properties of the chlorophyll pair in photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus*, *Biophys. J.*, **102**, 2634–2640, doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.016.
29. Fufina, T.Y., Vasilieva, L.G., Khatypov, R.A., Shkuropatov, A.Y., and Shuvalov, V.A. (2007) Substitution of isoleucine L177 by histidine in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center results in the covalent binding of PA bacteriochlorophyll to the L subunit, *FEBS Lett.*, **581**, 5769–5773, doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.032.
30. Frolov, D., Marsh, M., Crouch, L.I., Fyfe, P.K., Robert, B., van Grondelle, R., Hadfield, A., and Jones, M.R. (2010) Structural and spectroscopic consequences of hexacoordination of a bacteriochlorophyll cofactor in the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center, *Biochemistry*, **49**, 1882–1892, doi: 10.1021/bi901922t.
31. 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 *Rba. sphaeroides* reaction center affects coordination of P_A and P_B bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407–1417, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.008.
32. Фуфина Т.Ю. (2010) Влияние аминокислотных заместителей вблизи молекул бактериохлорофиллов P_A и P_B на свойства реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides*. Дисс. канд. биол. наук, Пушкино, с. 153
33. Fufina, T.Y., Vasilieva, L.G., Khatypov, R.A., and Shuvalov, V.A. (2011) Properties of *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center with double amino acid substitution I(L177)H+H(M182)L, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 450–454.
34. Leonova, M.M., Vasilieva, L.G., Khatypov, R.A., Boichenko, V.A., and Shuvalov, V.A. (2009) Properties of mutant reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* with substitutions of histidine L153, the axial Mg²⁺ ligand of bacteriochlorophyll B(A), *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 452–460.
35. DeLano (2002) The PyMOL molecular graphics system, *DeLano Scientific, San Carlos*, <http://pymol.sourceforge.net/>.
36. Леонова М.М. (2013) Изучение свойств реакционных центров пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* с измененным белковым окружением мономерного бактериохлорофилла В_A. Дисс. канд. биол. наук, Пушкино, с. 117.
37. Vylina, E.J., Kolaczowski, S.V., Norris, S.V., and Youvan, C.Y. (1990) EPR characterization of genetically modified reaction centers of *Rhodobacter capsulatus*, *Biochemistry*, **29**, 6203–6210, doi: 10.1021/bi00478a013.
38. 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.
39. Mulikidjanian, A.Y., and Junge, W. (1997) On the origin of photosynthesis as inferred from sequence analysis, *Photosynth. Res.*, **51**, 27–42, doi: 10.1023/A:1005726-809084.
40. Holden-Dye, K., Crouch, L.I., Williams, C.M., Bone, R.A., Cheng, J., Bohles, 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, doi: 10.1016/j.abb.2010.09.029.
41. Kania, A., and Fiedor, L. (2006) Steric control of bacteriochlorophyll ligation, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 454–458, doi: 10.1021/ja055537x.
42. Hooper, J.K., Eggink, L.L., and Chen, M. (2007) Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **94**, 387–400, doi: 10.1007/s11120-007-9181-1.
43. Kobayashi, M., Hamano, T., Akiyama, M., Watanabe, T., Inoue, K., Oh-oka, H., Ames, J., Yamamura M., and Kise, H. (1998) Light-independent isomerization of bacteriochlorophyll g to chlorophyll a catalyzed by weak acid *in vitro*, *Anal. Chim. Acta*, **365**, 199–203, doi: 10.1016/S0003-2670(98)00088-9.
44. Hauska, G., Schoedl, T., Remigy, H., and Tsiotis, G. (2001) The reaction center of green sulfur bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 260–277, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00200-6.

45. Sadekar, S., Raymond, J., and Blankenship, R.E. (2006) Conservation of distantly related membrane proteins: photosynthetic reaction centers share a common structural core, *Mol. Biol. Evol.*, **23**, 2001–2007, doi:10.1093/molbev/msl079.
46. Schubert, W.D., Klukas, O., Saenger, W., Witt, H.T., Fromme, P., and Krauss, N. (1998) A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: a comparison based on the structural model of photosystem I, *J. Mol. Biol.*, **280**, 297–314, doi: 10.1006/jmbi.1998.1824.
47. Mulikidjanian, A.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Mekhedov, S.L., Sorokin, A., Wolf, Y.I., Dufresne, A., Partensky, F., Burd, H., Kaznadzey, D., Haselkorn, R., and Galperin, M.Y. (2006) The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13126–13131, doi: 10.1073/pnas.0605709103.
48. Nelson, N. (2011) Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 856–863, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.10.011.
49. Granick, S. (1965) In *Evolving genes and proteins* (Bryson, V., and Vogel, H.J., eds) Academic Press, New York, pp. 67–68.
50. Xiong, J. (2007) Photosynthesis: what color was its origin? *Genome Biol.*, **7**, 245, doi: 10.1186/gb-2006-7-12-245.
51. Cardona, T. (2015) A fresh look at the evolution and diversification of photochemical reaction centers, *Photosynth. Res.*, **126**, 111–134, doi: 10.1016/j.heliyon.2018.

FEATURES OF AXIAL BACTERIOCHLOROPHYLL LIGATION IN PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTER OF PURPLE BACTERIA

T. Yu. Fufina, M. M. Leonova, R. A. Khatypov,
A. M. Khristin, V. A. Shuvalov, and L. G. Vasilieva*

*Institute of Basic Biological Problems, 142290 Pushchino,
Moscow Region, Russia; E-mail: vsyulya@mail.ru*

Received November 7, 2018

Revised November 30, 2018

Accepted November 30, 2018

This review is focused on recent experimental data obtained by site-directed mutagenesis of the purple nonsulfur bacterial reaction center (RC). The role of (bacterio)chlorophylls' axial ligation in regulation of spectral and redox properties of these pigments as well as the correlation between chromophores' structure and nature of their axial ligands are discussed. Cofactor ligation in various types of RCs is compared and possible reasons for observed differences are examined in the light of modern ideas on the evolution of photosynthesis.

Keywords: bacteriochlorophyll ligation, photosynthetic reaction center, pigment–protein interactions, purple bacteria, site-directed mutagenesis, *Rhodobacter sphaeroides*