

УДК 577.355.2

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕНЫ ЛЕЙЦИНА M196 НА ГИСТИДИН НА ЭЛЕКТРОННУЮ СТРУКТУРУ ПЕРВИЧНОГО ДОНОРА ЭЛЕКТРОНА И ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ *Rhodobacter sphaeroides**

© 2019 А.А. Забелин, Т.Ю. Фуфина, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов, В.А. Шкуропатова, В.А. Шувалов, Л.Г. Васильева, А.Я. Шкуропатов**

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН, 142290 Пушкино Московской обл., Россия; электронная почта: ashkur@mail.ru

Поступила в редакцию 13.11.2018

После доработки 27.12.2018

Принята к публикации 27.12.2018

Недавние рентгеноструктурные исследования выявили, что замена природного остатка лейцина M196 на гистидин в реакционном центре (РЦ) *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* приводит к образованию близкого контакта между генетически введенным гистидином и первичным донором электрона Р (димером молекул бактериохлорофилла (БХл) P_A и P_B) и формированию нового пигмент-белкового взаимодействия, не наблюдаемого в нативных РЦ. В настоящей работе возможная природа нового взаимодействия и его влияние на электронные свойства Р и фотохимическое разделение зарядов в изолированных мутантных РЦ L(M196)H исследованы методами стационарной абсорбционной спектроскопии, фотоиндуцированной дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии и фемтосекундной абсорбционной спектроскопии при комнатной температуре. Результаты сравниваются с данными, полученными для РЦ *Rba. sphaeroides* псевдодикого типа. Показано, что мутация L(M196)H приводит к уменьшению интенсивности и уширению длинноволновой Q_y -полосы поглощения Р при ~ 865 нм. Следствием мутации является также ослабление электронного сопряжения между молекулами БХл в катион-радикале димера P^+ и увеличение локализации положительного заряда на молекуле P_A . Сравнение полученных результатов с литературными данными позволяет предположить, что имидазольная группа гистидина M196 образует π -водородную связь с π -электронной системой молекулы P_B димера Р. Несмотря на значительные возмущения электронной структуры Р, мутантные РЦ сохраняют высокие скорости переноса электрона и квантовый выход состояния $P^+Q_A^-$ (Q_A^- – первичный хинонный акцептор), близкий к наблюдаемому в нативных РЦ. По-видимому, специфическая (Т-образная) пространственная организация π -водородного взаимодействия и ее потенциальная гетерогенность в отношении энергии связи могли бы быть, по крайней мере частично, причинами того, что взаимодействие такого типа не реализуется между белком и пигментными и хинонными кофакторами в нативных РЦ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериальный реакционный центр, аминокислотные замещения, первичный донор электрона, электронная структура, перенос электрона, *Rhodobacter sphaeroides*.

DOI: 10.1134/S0320972519050063

Реакционные центры (РЦ) бактериального фотосинтеза являются высокоспециализированными кофактор-белковыми комплексами, в которых происходит первичное преобразование энергии световых квантов в электрохимическую энергию разделенных зарядов с помощью серии

быстрых реакций переноса электрона. Уникальной особенностью РЦ как природных фотопреобразующих систем является их способность осуществлять разделение зарядов с предельно высоким квантовым выходом ($\sim 100\%$) и высокой энергетической эффективностью (десятки

Принятые сокращения: ΔA – изменение поглощения; БХл – бактериохлорофилл; БФео – бактериофеофитин; ИК-Фурье-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием; V_A – мономерный БХл в активной ветви кофакторов; EADS – дифференциальные спектры, связанные с эволюцией состояний (evolution-associated decay spectra); H_A и H_B – молекулы БФео в активной и неактивной ветвях кофакторов соответственно; Р – первичный донор электрона, димер молекул БХл; P_A , P_B – молекулы БХл, составляющие Р; РЦ – реакционный центр; psWt – псевдодиккий тип; *Rba. sphaeroides* – *Rhodobacter sphaeroides*; Q_A^- – первичный хинонный акцептор; Q_B^- – вторичный хинонный акцептор.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM18-318, 18.02.2019.

** Адресат для корреспонденции.

процентов) в молекулярной донорно-акцепторной системе, включающей лишь несколько пигментных (бактериохлориновых) молекул, погруженных в специфически организованный белковый матрикс. Ключевое значение для функционирования этой системы имеют, очевидно, как базовые физико-химические свойства индивидуальных пигментных молекул, так и их взаимодействия между собой и с локальным окружением. Одним из подходов к исследованию роли межмолекулярных взаимодействий в структурной и электронной организации пигментных кофакторов и их функциональной активности является введение точечных аминокислотных замен в структуру белка РЦ с целью устранения существующих и(или) создания новых контактов/взаимодействий и детальные исследования их последствий методом рентгеноструктурного анализа в сочетании с методами оптической спектроскопии. В частности, одной из перспективных замен, влияющих на межмолекулярные взаимодействия в РЦ, является замещение природных аминокислотных остатков остатком гистидина. Гистидин в составе белков способен участвовать во взаимодействиях различной природы: координационных связях с катионами металлов, водородных связях, π -катионном, π -водородном и π - π -стэкинг-взаимодействиях [1].

Недавно на основе данных рентгеноструктурного анализа в совокупности с результатами низкотемпературных абсорбционных измерений и редокс-титрования было показано, что замена лейцина на гистидин в позиции M196 в РЦ *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides*, по-видимому, приводит к образованию нового взаимодействия между молекулой бактериохлорофилла (БХл) P_B , входящей в состав димера первичного донора электрона P, и имидазолом вновь введенного гистидина M196 [2]. Было предположено, что такое взаимодействие может иметь характер π - π -стэкинга или π -водородного взаимодействия [2].

С целью дальнейшего выяснения природы обнаруженного взаимодействия и его влияния на электронные свойства P и первичное разделение зарядов в настоящей работе изолированные РЦ L(M196)H исследованы методами стационарной абсорбционной спектроскопии в ближнем и среднем (ИК-Фурье-спектроскопия) ИК-диапазонах и кинетической абсорбционной спектроскопии с фемтосекундным временным разрешением в видимой/ближней ИК-областях. Измерения электронных спектров поглощения интенсивно используются для получения информации о влиянии мутаций на электронные свойства бактериальных РЦ. Фотоиндуцированная дифференциальная ИК-Фурье-спект-

роскопия обладает чрезвычайно высокой чувствительностью к молекулярным изменениям, сопровождающим разделение зарядов, позволяя, в частности, получать сведения об электронной структуре первичного донора электрона P в его функционально важной катион-радикальной форме P^+ [3, 4]. Фемтосекундная абсорбционная спектроскопия является наиболее адекватным методом для изучения быстрых реакций переноса электрона, протекающих в бактериальных РЦ на (суб)пикосекундной временной шкале. Результаты работы обсуждаются на основе анализа ключевых сходств и различий с аналогичными данными, полученными в идентичных экспериментальных условиях для РЦ псевдодикого типа *Rba. sphaeroides* (psWt).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование рекомбинантного штамма *Rba. sphaeroides*, не имеющего светособирающих антенн, но содержащего мутантные РЦ с аминокислотной заменой лейцина на гистидин в положении M196, было описано ранее [5]. В качестве РЦ psWt использовали реакционные центры, выделенные из *puf*-дефицитного штамма, трансформированного плазмидой, содержащей *puf*-оперон дикого типа [5]. РЦ выделяли по стандартной методике путем обработки хроматофоров лаурилдиметиламино-N-оксидом (ЛДАО) с последующей очисткой на ДЭАЭ-целлюлозе [5]. Замену детергента ЛДАО на Triton X-100 проводили на мембране с отсекаемой массой 30 кДа («Millipore», США) в ячейке для ультраконцентрирования под давлением газообразного аргона.

Электронные спектры поглощения РЦ в области 650–1000 нм записывали на спектрофотометре Shimadzu UV1800 («Shimadzu», Япония).

Фотоиндуцированные дифференциальные ИК-спектры P^+Q^-/PQ измеряли на инфракрасном Фурье-спектрометре Equinox 55 («Bruker», Германия) с детектором DTGS и светоделителем из KBr. Для получения образцов несколько микролитров концентрированной суспензии РЦ, солюбилизированных в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0), содержащем 0,1% Triton X-100, наносили на подложку из CaF_2 , частично дегидратировали под струей газообразного аргона и накрывали второй подложкой из CaF_2 [6]. Дифференциальные ИК-спектры измеряли при освещении образцов постоянным светом (1000 нм $> \lambda >$ 620 нм). Спектральное разрешение составляло 4 cm^{-1} . Циклы освещения повторяли сотни раз для достижения приемлемого соотношения сигнал/шум.

Измерение дифференциальных спектров с фемтосекундным временным разрешением про-

водили при помощи лазерного спектрометра, как описано ранее [7], с некоторыми модификациями. Титан-сапфировый лазер MaiTai («Spectra-Physics», США) с оптическим регенеративным усилителем Spitfire Ace («Spectra-Physics», США) использовали для получения фундаментальных (800 нм) импульсов длительностью 35–40 фс с энергией 3 мДж/импульс. Выходящий из усилителя пучок ослабляли и делили на два луча. Первый луч использовали для генерации континуума на пластине из сапфира толщиной ~2 мм. Спектральные компоненты континуума с длиной волны >850 нм выделяли с помощью светофильтра RG850 («Newport», США), полученные импульсы использовали для возбуждения РЦ в длинноволновую полосу поглощения Р. Второй луч проходил через линю задержки M531.DD («Physik Instrumente», Германия), фокусировался в кварцевой кювете с водой толщиной 5 мм для генерации континуума, который затем делился на зондирующий и опорный лучи в процентном соотношении 50 : 50. Спектры зондирующего и опорного импульсов модифицировали при помощи спектральной и пространственной фильтрации для выделения спектрального диапазона в видимой или ближней ИК-области. Поляризацию импульса возбуждения устанавливали параллельно по отношению к зондирующему импульсу. После кюветы с образцом зондирующий и опорный импульс направляли на входную щель спектрографа SpectraPro 2300i («Acton Research Corporation», США). Спектры излучения импульсов регистрировали с помощью CCD камеры Pixis 400BR («Princeton Instruments», США). Образец РЦ ($A_{865} \sim 0,5$) помещали во вращающуюся кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 мм («CDP Systems», Россия). Частота вращения кюветы и частота возбуждения (10 Гц) были подобраны таким образом, чтобы каждый возбуждающий импульс освещал новую порцию РЦ. Дифференциальные спектры регистрировали в видимой (500–720 нм) или ближней (750–1000 нм) ИК-области во временном интервале между 2 пс до фотовозбуждения РЦ и ~2 нс после него, при каждой задержке времени усредняли 500 спектров. Интенсивность возбуждающих импульсов была ослаблена таким образом, чтобы возбуждались <20% реакционных центров в образце.

Все измерения проводили при комнатной температуре.

Фемтосекундные данные анализировали с помощью глобального анализа [8], используя программу Glotaran [9]. Программа включает математическое описание спектральной дисперсии максимума аппаратной функции. Полуширину на полувысоте аппаратной функции

оценивали для обоих исследованных спектральных диапазонов величиной ~35–40 фс.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 показаны электронные спектры поглощения РЦ *Rba. sphaeroides* psWt и L(M196)H, измеренные в области Q_y оптических переходов (650–1000 нм) при комнатной температуре. Спектры нормированы в максимуме полосы бактериофеофитина (БФео) при 759 нм, исходя из предположения, что мутация не вносит значительных возмущений в электронную структуру молекул БФео в РЦ и не оказывает сильного влияния на их оптические свойства, поскольку локус мутации удален от мест связывания как БФео H_A , так и БФео H_B .

Из рис. 1 видно, что полоса поглощения низкоэнергетического экситонного перехода Q_y первичного донора электрона Р при ~865 нм сохраняется в мутантных РЦ, однако она слегка уширяется и значительно уменьшается по интенсивности по отношению к аналогичной полосе в РЦ psWt. Контрольные эксперименты с добавками к образцам мутантных РЦ восстановителей (аскорбата натрия или дитионита натрия) выявили, что наблюдаемое уменьшение интенсивности полосы Р при ~865 нм не связано с окислением Р (данные не приведены). Таким образом, хотя общая димерная природа Р сохраняется в мутантных РЦ, электронная структура димера подвергается, по-видимому, значительной модификации. Для мутанта ха-

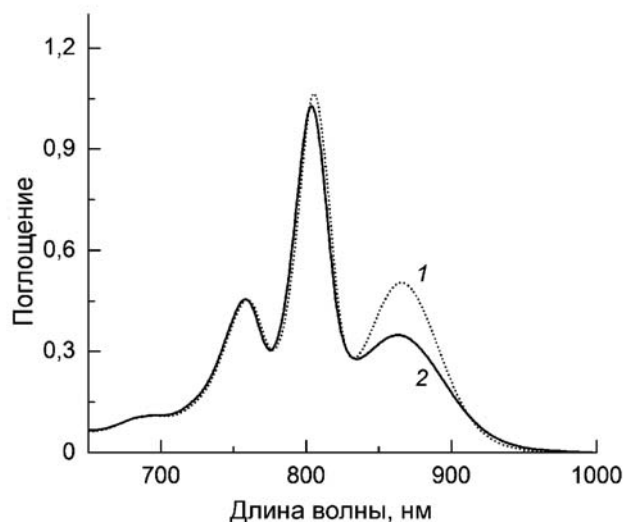


Рис. 1. Электронные спектры поглощения РЦ *Rba. sphaeroides* psWt (1) и L(M196)H (2), измеренные при комнатной температуре. Спектры нормированы в максимуме поглощения молекул бактериофеофитина при 759 нм

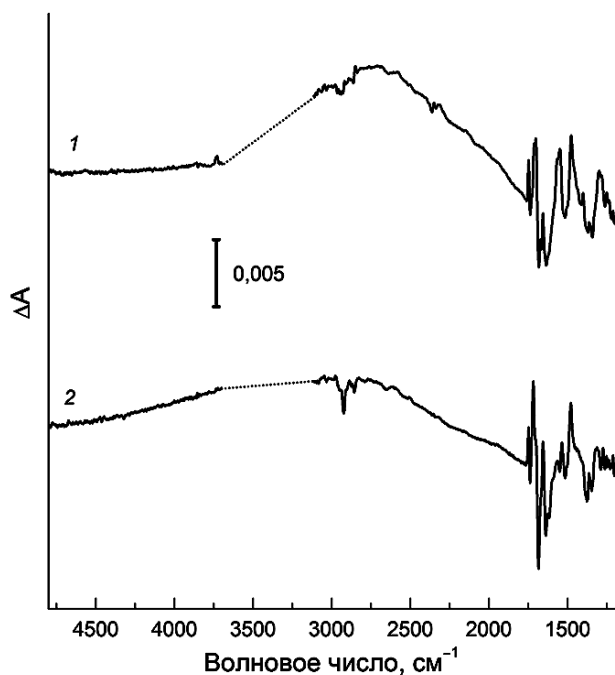


Рис. 2. Фотоиндуцированные дифференциальные (свет минус темнота) ИК-Фурье-спектры P^+Q^-/PQ для РЦ *Rba. sphaeroides* psWt (1) и L(M196)H (2), измеренные при комнатной температуре в области 4800–1200 cm^{-1} . Спектры нормированы по амплитуде дифференциального сигнала в области (+)1750/(–)1740 cm^{-1} . Область при ~3700–3100 cm^{-1} насыщена из-за сильного поглощения образца и воды и исключена из рисунка

рактены также минорные коротковолновые сдвиги полос поглощения молекул мономерного БХл при ~805 нм и молекул БФео при ~760 нм (рис. 1). Уменьшение интенсивности Q_y -полосы Р и ее спектральное уширение в РЦ L(M196)H по сравнению с РЦ psWt наблюдалось ранее также в низкотемпературных (90 К) спектрах поглощения [2]. Интересно, что в этом случае максимум Q_y -полосы поглощения Р в спектре РЦ L(M196)H испытывал более сильное длинноволновое смещение, чем в спектре РЦ psWt (894 против 888 нм). Хорошо известно, что спектральное положение длинноволновой Q_y -полосы Р может зависеть от ряда факторов, включая, в частности, образование водородных связей [10] и изменение энергии состояний с переносом заряда между молекулами P_A и P_B в димере Р [11].

На рис. 2 и 3 представлены фотоиндуцированные дифференциальные ИК-Фурье-спектры P^+Q^-/PQ (Q – хинонный акцептор) реакционных центров psWt и L(M196)H. Положительные и отрицательные пики в спектрах отражают появление состояния P^+Q^- и исчезновение состояния PQ соответственно. ИК-Фурье-спектры psWt и L(M196)H (рис. 2 и 3) были нормированы по амплитуде дифференциального сигнала в

области (+)1750/(–)1740 cm^{-1} , отнесенного к сдвигу валентных колебаний 13^3 -эфирных групп БХл [6, 12]. В соответствии с опубликованными ранее данными [6, 12], ИК-Фурье-спектр P^+Q^-/PQ для РЦ psWt (рис. 2, кривая 1; рис. 3, кривая 1) включает широкую полосу низкоэнергетического электронного перехода при ~2700 cm^{-1} , отражающего перенос положительного заряда («дырки») внутри димерного катион-радикала P^+ , и три фазово-фононные ИК-полосы при ~1550, 1477 и ~1290 cm^{-1} . Полоса при ~2700 cm^{-1} не наблюдается для мономерного катион-радикала БХл⁺ [12], являясь уникальной характеристикой димерной структуры окисленного первичного донора электрона в РЦ пурпурных бактерий [4]. Колебательные моды фазово-фононного типа формально запрещены по симметрии в мономерном БХл, однако они усиливаются благодаря сопряжению с электронным переходом переноса «дырки», также являясь маркерами димерной структуры P^+ [13]. Интенсивность всех указанных полос сильно зависит от степени электронного сопряжения между молекулами P_A и P_B в димере Р [4, 13].

ИК-Фурье-спектр P^+Q^-/PQ для РЦ L(M196)H также содержит полосу переноса «дырки» в области ~2700 cm^{-1} (рис. 2, кривая 2) и фазово-фононные полосы при 1537, 1477 и ~1300 cm^{-1} (рис. 3, кривая 2), что согласуется с сохранением в мутанте димерной структуры первичного донора

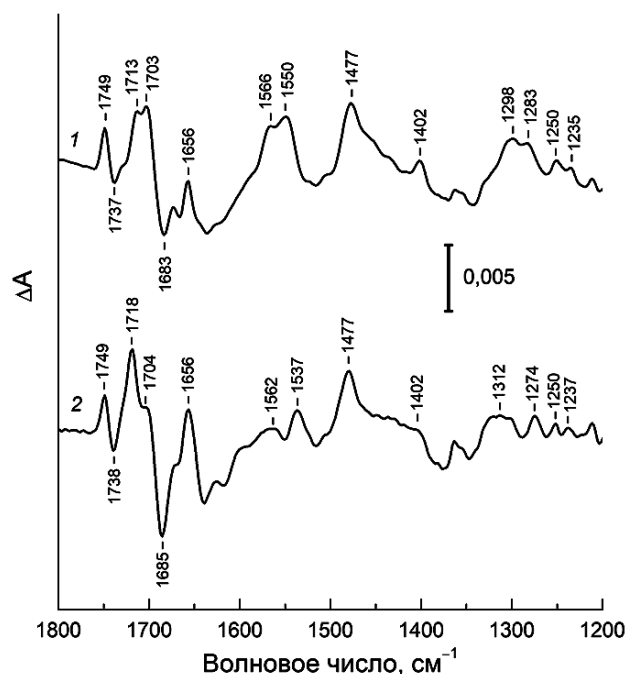


Рис. 3. Низкочастотная (1800–1200 cm^{-1}) область ИК-Фурье-спектров P^+Q^-/PQ для РЦ *Rba. sphaeroides* psWt (1) и L(M196)H (2), взятая из рис. 2

электрона Р [2] (рис. 1). Однако выраженное уменьшение интенсивности полосы переноса «дырки» и сильные изменения интенсивности и частот фазово-фононных полос в спектре мутантных РЦ указывают на ослабление электронного сопряжения и усиление асимметрии распределения положительного заряда между молекулами БХл в катион-радикале димера P^+ [13].

В области $1710\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ в ИК-спектре РЦ psWt (рис. 3, кривая 1) наблюдаются сигналы, преимущественно связанные со сдвигами 13^1 -кето-С=О-групп молекул P_A и P_B при фотоокислении Р [12]. Эти группы находятся в электронном сопряжении с π -электронной системой макроцикла и являются чувствительными к изменениям электронной структуры димера P^+ . Относительное увеличение интенсивности полосы валентных колебаний 13^1 -кето-группы P_A^+ при 1718 см^{-1} по сравнению с аналогичной полосой 13^1 -кето-группы P_B^+ при 1704 см^{-1} в спектре мутантных РЦ L(M196)H (рис. 3, кривая 2) может быть интерпретировано как увеличение локализации положительного заряда на молекуле P_A [14]. Перераспределение положительного заряда в пользу P_A^+ вследствие ослабления электронного сопряжения между молекулами P_A и P_B , вероятно, вызвано взаимодействием введенного гистидина M196 с π -электронной системой Р.

На рис. 4–6 приведены результаты исследований динамики и механизма разделения зарядов

в мутантных РЦ L(M196)H с использованием фемтосекундной дифференциальной абсорбционной спектроскопии. Полученные данные анализировались с помощью глобального анализа [8].

На рис. 4, а сравниваются кинетики затухания стимулированного излучения из возбужденного состояния первичного донора P^* , отражающие перенос электрона с P^* на БФео H_A в РЦ psWt (кривая 1) и мутантных РЦ (кривая 2). Моноэкспоненциальный анализ кинетики показал, что время жизни P^* (т.е. временная константа реакции $P^* \rightarrow P^+H_A^-$) в РЦ psWt составляет 3,2 пс, что хорошо согласуется с данными для РЦ дикого типа, известными в литературе. Время жизни P^* в РЦ L(M196)H увеличивается до 5,7 пс. Исследование кинетики выцветания на коротковолновом склоне полосы поглощения Р при $\sim 830\text{--}840\text{ нм}$ (в области, где вклад стимулированного излучения минимален) позволяет получить информацию о квантовом выходе разделения зарядов в РЦ. Рис. 4, б (кривая 1) показывает, что в РЦ psWt амплитуда выцветания в этой области спектра остается практически неизменной на временной шкале 2 нс. Это означает, что разделение зарядов не сопровождается возвращением P^* и P^+ в основное состояние, и квантовый выход состояния $P^+Q_A^-$ близок к 100%. Из сравнения кинетик 1 и 2 на рис. 4, б следует, что в пределах точности наших измерений аналогичный вывод может быть сделан также в отношении РЦ L(M196)H.

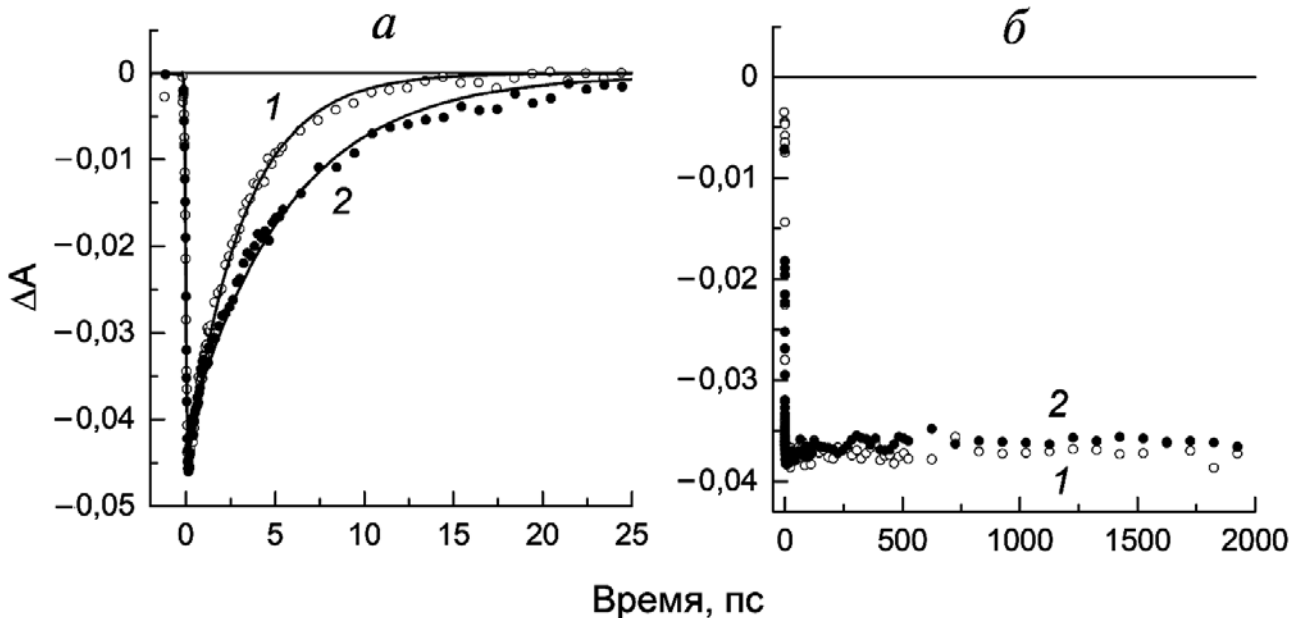


Рис. 4. а – Нормированные кинетики затухания стимулированного излучения из возбужденного состояния P^* при 936 нм для РЦ *Rba. sphaeroides* psWt (1) и при 930 нм для РЦ L(M196)H (2). Сплошными линиями показана моноэкспоненциальная аппроксимация кинетик; б – нормированные кинетики изменения поглощения при 836 нм для РЦ psWt (1) и 830 нм для РЦ L(M196)H (2)

На рис. 5 и 6 приведены дифференциальные спектры, связанные с эволюцией состояний, вовлеченных в перенос электрона с P^* на Q_A (EADS) [8] в РЦ psWt (рис. 5) и РЦ L(M196)H (рис. 6). EADS были получены из глобального анализа полных наборов экспериментальных дифференциальных спектров поглощения, из-

меренных при различных временных задержках между возбуждающим и зондирующим лазерными импульсами, с использованием последовательной кинетической модели с увеличивающимися временами жизни состояний ($1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow \dots$). Из рис. 5 и 6 следует, что спектральные профили EADS и соответствующие времена жизни близ-

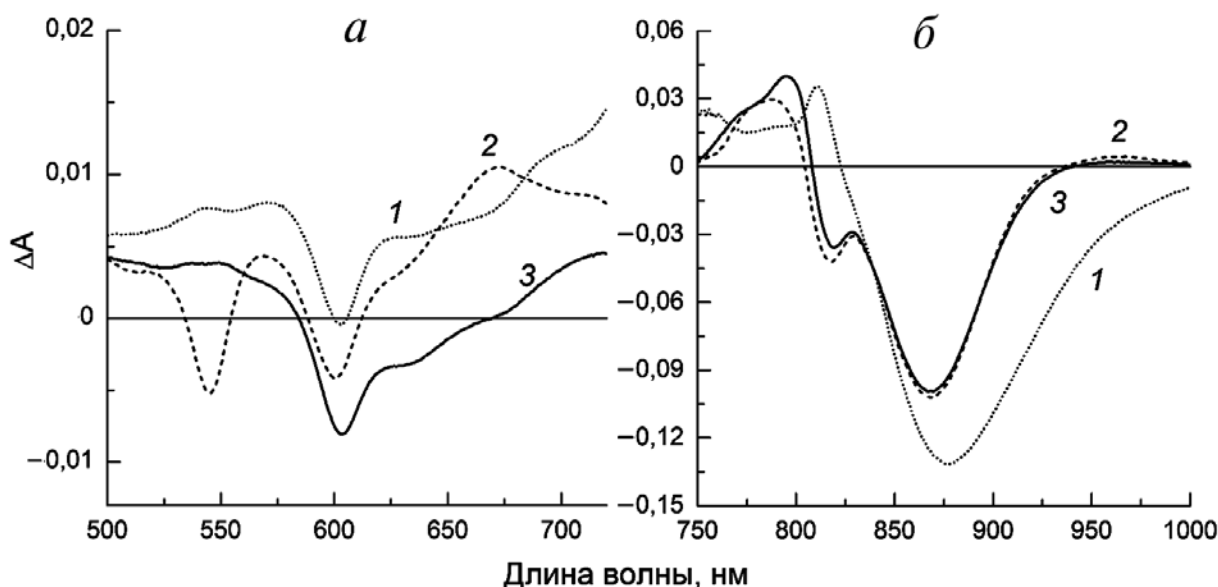


Рис. 5. Дифференциальные спектры, связанные с эволюцией состояний P^* (1), $P^+H_A^-$ (2) и $P^+Q_A^-$ (3), полученные из глобального анализа спектрально-временных данных в областях Q_x (а) и Q_y (б) для РЦ *Rba. sphaeroides* psWt. Времена жизни состояний P^* и $P^+H_A^-$ составляют 3,2 и 190 пс соответственно. Состояние $P^+Q_A^-$ не падает на исследованной временной шкале (2 нс)

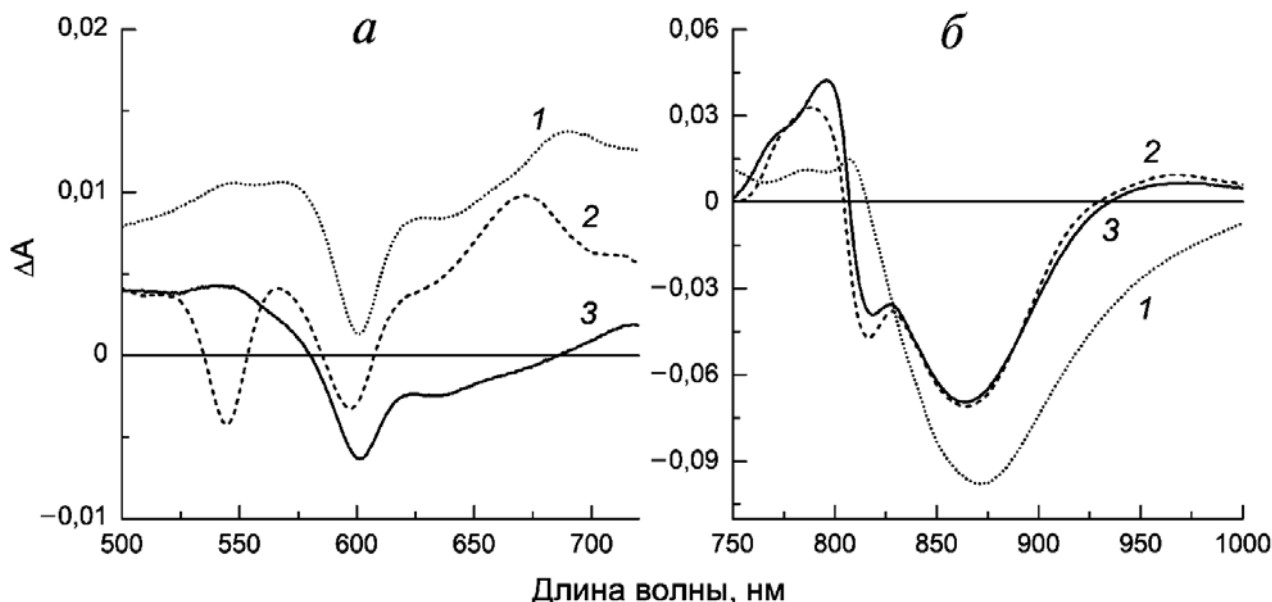


Рис. 6. Дифференциальные спектры, связанные с эволюцией состояний P^* (1), $P^+H_A^-$ (2) и $P^+Q_A^-$ (3), полученные из глобального анализа спектрально-временных данных в областях Q_x (а) и Q_y (б) для РЦ *Rba. sphaeroides* L(M196)H. Времена жизни состояний P^* и $P^+H_A^-$ составляют 5,7 и 219 пс соответственно. Состояние $P^+Q_A^-$ не падает на исследованной временной шкале (2 нс)

ки для двух типов РЦ и согласуются с данными, опубликованными для РЦ дикого типа (см., например, работу Sun et al. [15]). EADS, связанные с временами жизни 3,2 и 5,7 пс, показывают спектральные особенности, типичные для возбужденного состояния P^* (рис. 5 и 6, кривые 1). В Q_y -области обоих спектров наблюдается широкая отрицательная полоса, включающая вклады от выцветающей полосы поглощения P при ~ 865 нм и стимулированного излучения из P^* в области ~ 920 нм, а также характерный положительный пик при 810 нм. В спектральной области Q_x присутствует отрицательная полоса при 600 нм на фоне слабоструктурированного поглощения P^* в интервале 500–720 нм. Состояние P^* эволюционирует в состояние с разделенными зарядами $P^+H_A^-$, для EADS которого характерны сохраняющаяся отрицательная полоса при 600 нм, выцветание Q_x -полосы поглощения БФео H_A при 545 нм и появление полос поглощения анион-радикала H_A^- при ~ 670 и 960 нм. В Q_y -области наблюдаются выцветание полосы поглощения P при ~ 865 нм и электрохромный сдвиг в области ~ 800 нм (рис. 5 и 6, кривые 2). Амплитуда выцветания при ~ 865 нм в EADS для мутантных РЦ уменьшена по отношению к амплитуде в EADS для РЦ psWt в соответствии с различиями, наблюдаемыми в спектрах поглощения РЦ (рис. 1). В течение нескольких сотен пикосекунд ($\tau \sim 200$ пс) состояние $P^+H_A^-$ в обоих типах РЦ переходит в терминальное состояние $P^+Q_A^-$, которое не спадает на временной шкале наших измерений (рис. 5 и 6, кривые 3).

Таким образом, совокупность результатов фемтосекундных измерений позволяет заключить, что последовательность $P^* \rightarrow P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$ и динамика реакций переноса электрона, вовлеченных в разделение зарядов, а также общий выход процесса, наблюдаемые для РЦ psWt, сохраняются практически неизменными в РЦ L(M196)H.

Отметим, что в данной работе в глобальном анализе не учитывалось образование промежуточного состояния $P^+B_A^-$ [16–18], которое в нативных РЦ спадает быстрее, чем образуется, что определяет малую степень его заселения и затрудняет его экспериментальное обнаружение [19]. Однако предварительный анализ дифференциальных спектров для образцов РЦ L(M196)H с восстановленным Q_A выявил присутствие слабой полосы поглощения при ~ 1025 нм, которая может быть отнесена к анион-радикалу B_A^- [16, 18] (данные не приведены). Вероятно, двухступенчатый механизм начального переноса электрона $P^* \rightarrow P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$, характерный для нативных РЦ (см., например, работу Khatyrov et al. [20]), сохраняется также в мутантных препаратах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно данным рентгеноструктурного анализа мутантных РЦ L(M196)H [2], угол между имидазольной группой гистидина M196 и плоскостью макроцикла P_B оценивается величиной $(103 \pm 10)^\circ$, что соответствует T-образной геометрии взаимного расположения остатка гистидина и БХл. Расстояние между атомом азота ND1 гистидина и кольцом C молекулы P_B составляет $(3,8 \pm 0,15)$ Å. Таким образом, введенный гистидин и молекула P_B находятся в достаточно близком контакте друг с другом, чтобы обеспечить их взаимодействие.

Из кристаллографической структуры РЦ L(M196)H видно (рис. 7), что мутация не вызывает глобальных изменений в геометрии димера P. Наблюдаемые незначительные расхождения в структурах РЦ мутанта и psWt, по-видимому, не выходят за пределы их разрешения. Следовательно, можно заключить, что экспериментально наблюдаемые изменения электронной структуры P и P^+ (рис. 1–3) вызваны взаимодействием между гистидином M196 и π -электронной системой молекулы БХл P_B . Согласно литературным данным [1], T-образная ориентация имидазольного кольца по отношению к плоскости ароматической молекулы характерна для π -водородного взаимодействия. Образование π -водородного взаимодействия в мутантных РЦ согласовывалось бы с тем фактом, что мутация L(M196)H повышает редокс-потенциал пары P^+/P на ~ 60 мВ по сравнению с РЦ psWt [2]. Формирование водородной связи между гистидином и сопряженной системой P, очевидно, дестабилизирует состояние P^+ по сравнению с нейтральным состоянием, затрудняя окисление P и смещая редокс-потенциал пары P^+/P в положительную область, как это наблюдалось в мутантных РЦ при образовании водородных связей между карбонильными группами P и гистидинами [23, 24]. В связи с этим отметим, что длинноволновое смещение полосы P в низкотемпературном спектре РЦ L(M196)H [2] согласуется с теоретически рассчитанным влиянием образования водородной связи на энергию Q_y -перехода P [10].

Интересным в этом контексте является тот факт, что сходное влияние на низкотемпературный спектр поглощения РЦ, редокс-потенциал P, электронную структуру P^+ и первичную фотохимию наблюдалось ранее для мутантных РЦ *Rba. sphaeroides* L(M160)H, в которых водородная связь обычного типа была введена между гистидином M160 и 13^1 -кетокрбонильной группой молекулы БХл P_B [12, 25]. В низкотемпературном (20 K) спектре поглощения РЦ мутанта

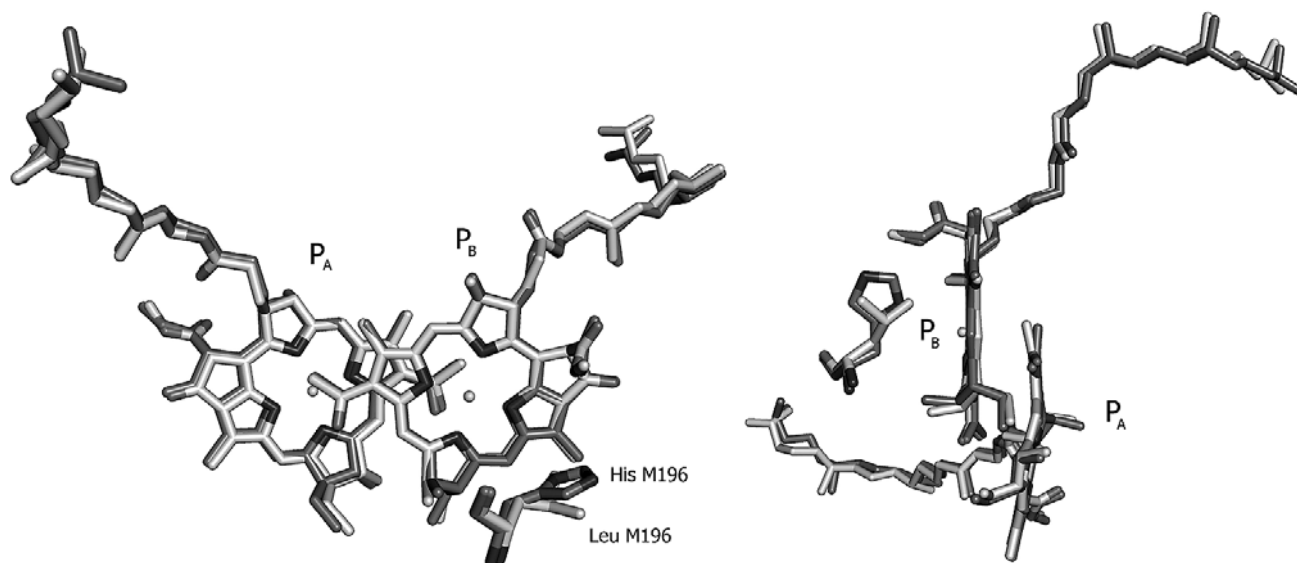


Рис 7. Наложение кристаллографических структур РЦ *Rba. sphaeroides* psWt (PDB: 3V3Y; [21]) и мутанта L(M196)H [2] в области димера первичного донора электрона P в двух проекциях. Отмечены соответствующие аминокислотные остатки в положении M196. Разрешение структур psWt и L(M196)H составляло 2,8 и 2,4 Å соответственно. Рисунок выполнен в программе PyMOL [22]

L(M160)H наблюдалось смещение полосы P в длинноволновую область и уменьшение ее интенсивности [25]. Потенциал пары P⁺/P в мутантных РЦ увеличился на 55 мВ по сравнению с РЦ дикого типа [25]. В ИК-Фурье-спектре P⁺Q_A⁻/PQ_A мутанта L(M160)H полоса переноса «дырки» и одна из фазово-фононных полос смешались в высокочастотную область до ~2800 и ~1300 см⁻¹ соответственно и уменьшались по интенсивности [12]. Существенно, однако, что падение интенсивности ИК-полос в спектре L(M160)H [12] проявлялось в заметно меньшей степени, чем в РЦ L(M196)H (рис. 2, кривая 2; рис. 3, кривая 2), не затрагивая, в частности, фазово-фононную полосу при 1550 см⁻¹. Эти данные могут быть объяснены тем, что при образовании обычной водородной связи в РЦ L(M160)H атом водорода N-H-группы имидазола взаимодействует с электронной плотностью кислорода 13¹-кетокarbонильной группы P_B, в то время как в случае π-водородной связи атом водорода взаимодействует непосредственно с π-электронным облаком макроцикла БХл P_B, вызывая более сильное возмущение электронной структуры P⁺ в РЦ L(M196)H. Временные константы переноса электрона с P* на H_A и с H_A на Q_A в РЦ мутанта L(M160)H (5,7 и 210 пс соответственно) [25] фактически совпадали с наблюдаемыми в РЦ L(M196)H (5,7 и 219 пс соответственно; настоящая работа).

Ранее квантово-химические расчеты и данные ЭПР показали, что в комплексах фотосистемы 1 (ФС 1), реконструированных модифици-

рованными хинонами с короткими боковыми цепями, семихионная форма хинонного акцептора A1 может стабилизироваться за счет переориентации молекулы хинона с последующим образованием π-водородной связи с триптофаном [26]. На основе квантово-химических расчетов было предположено также, что СН-π-взаимодействия между β-каротином и хлорофиллом наряду с π-π-стэкингом играют важную роль в связывании молекул β-каротина в ФС 1 из *Synechococcus elongatus* [27]. Мутантные РЦ *Rba. sphaeroides* L(M196)H, по-видимому, являются первым примером образования π-водородной связи между белком и одним из кофакторов переноса электрона в бактериальных РЦ. Насколько нам известно, кофактор-белковые связи такого типа не были обнаружены в нативных фотосинтетических РЦ, в то время как образование обычных водородных связей между белком и редокс-активными пигментными и хинонными кофакторами играет важную роль в оптимизации функции (и, возможно, в поддержании структуры) нативных РЦ-комплексов [28–30]. Согласно литературным данным, наиболее благоприятной ориентацией для π-водородной связи является перпендикулярное расположение связи X–H донора (X – атом N, O или C) и плоскости π-акцептора [1, 31, 32]. Показано также, что в отличие от обычной водородной связи, π-водородное взаимодействие характеризуется более «мягкой» геометрией, что делает вероятным образование большего числа конформаций в более широком диапазоне энергии связи [32]. Воз-

можно, π -водородные связи не обладают заметными функциональными преимуществами перед обычными водородными связями (например, в отношении влияния на редокс-свойства кофакторов), в то время как достаточно специфическая пространственная организация π -водородного взаимодействия и ее потенциальная гетерогенность в отношении энергии связи могли бы быть, по крайней мере частично, причинами того, что взаимодействие такого типа не реализуется между белком и пигментными и хинонными кофакторами в нативных РЦ.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания № АААА-А17030110140-5 и при частичной поддержке РФФИ (грант № 17-00-00207 КОМФИ – ИК-Фурье-измерения, фемтосекундные измерения; грант № 17-44-500828 – получение образцов РЦ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Liao, S.M., Du, Q.S., Meng, J.Z., Pang, Z.W., and Huang, R.B. (2013) The multiple roles of histidine in protein interactions, *Chem. Cent. J.*, **7**, 44–55, doi: 10.1186/1752-153X-7-44.
- Fufina, T.Y., Vasilieva, L.G., Gabdulkhakov, A.G., and Shuvalov, V.A. (2015) The L(M196)H mutation in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center results in new electrostatic interactions, *Photosynth. Res.*, **125**, 23–29, doi: 10.1007/s11120-014-0062-0.
- Lutz, M., and Mantele, W. (1991) In *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 855–902.
- Breton, J., Naberdyk, E., and Parson, W.W. (1992) A new infrared electronic transition of the oxidized primary electron donor in bacterial reaction centers: a way to assess resonance interactions between the bacteriochlorophylls, *Biochemistry*, **31**, 7503–7510, doi: 10.1021/bi00148a010.
- Gabdulkhakov, A.G., Fufina, T.Y., Vasilieva, L.G., Mueller, U., and Shuvalov, V.A. (2013) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray structure analysis of wild-type and L(M196)H mutant *Rhodobacter sphaeroides* reaction centres, *Acta. Crystallogr. Sect. F*, **69**, 506–509, doi: 10.1107/S1744309113006398.
- Zabelin, A.A., Fufina, T.Y., Vasilieva, L.G., Shkuropatova, V.A., Zvereva, M.G., Shkuropatov, A.Y., and Shuvalov, V.A. (2009) Mutant reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)H with strongly bound bacteriochlorophyll a: structural properties and pigment–protein interactions, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 68–74, doi: 10.1134/S0006297909010106.
- Khatypov, R.A., Khristin, A.M., Fufina, T.Yu., and Shuvalov, V.A. (2017) An alternative pathway of light-induced transmembrane electron transfer in photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 692–697, doi: 10.1134/S0006297917060050.
- 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, doi: 10.1016/j.bbabi.2004.04.011.
- Snellenburg, J.J., Laptinok, 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, doi: 10.18637/jss.v049.i03.
- Thompson, M.A., Zerner, M.C., and Fajer, J. (1991) A theoretical examination of the electronic structure and excited states of the bacteriochlorophyll *b* dimer from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Phys. Chem.*, **95**, 5693–5700, doi: 10.1021/j100167a058.
- Parson, W.W., and Warshel, A. (1987) Spectroscopic properties of photosynthetic reaction centers. 2. Application of the theory to *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6152–6163, doi: 10.1021/ja00254a040.
- Naberdyk, E., Allen, J.P., Taguchi, A.K.W., Williams, J.C., Woodbury, N.W., and Breton, J. (1993) Fourier transform infrared study of the primary electron donor in chromatophores of *Rhodobacter sphaeroides* with reaction centers genetically modified at residues M160 and L131, *Biochemistry*, **32**, 13879–13885, doi: 10.1021/bi00213a017.
- Reimers, J.R., and Hush, N.S. (2003) Modeling the bacterial photosynthetic reaction center. VII. Full simulation of the intervalence hole-transfer absorption spectrum of the special-pair radical cation, *J. Chem. Phys.*, **119**, 3262–3277, doi: 10.1063/1.1589742.
- Malferrari, M., Turina, P., Francia, F., Mezzetti, A., Leibl, W., and Venturoli, G. (2015) Dehydration affects the electronic structure of the primary electron donor in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence from visible-NIR and light-induced difference FTIR spectroscopy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **14**, 238–251, doi: 10.1039/c4pp00245h.
- Sun, C., Carey, A.-M., Gao B.-R., Wraight, C.A., Woodbury, N.W., and Lin, S. (2016) Ultrafast electron transfer kinetics in the Im dimer of bacterial photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 5395–5404, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b05082.
- Arlt, T., Schmidt, S., Kaiser, W., Lauterwasser, C., Meyer, M., Scheer, H., and Zinth, W. (1993) The accessory bacteriochlorophyll: a real electron carrier in primary photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11757–11761, doi: 10.1073/pnas.90.24.11757.
- Shkuropatov, A.Ya., and Shuvalov, V.A. (1993) Electron transfer in pheophytin *a*-modified reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* (R-26), *FEBS Lett.*, **322**, 168–172, doi: 10.1016/0014-5793(93)81561-D.
- Kennis, J.T.M., Shkuropatov, A.Ya., van Stokkum, I.H.M., Gast, P., Hoff, A.J., Shuvalov, V.A., and Aartsma, T.J. (1997) Formation of a long-lived P⁺B_A⁻ state in plant pheophytin-exchanged reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26 at low temperature, *Biochemistry*, **36**, 16231–16238, doi: 10.1021/bi9712605.
- 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, doi: 10.1002/cphc.200400458.
- Khatypov, R.A., Khmel'nitskiy, A.Yu., Khristin, A.M., Fufina, T.Yu., Vasilieva, L.G., and Shuvalov, V.A. (2012) Primary charge separation within P870⁺ in wild type and heterodimer mutants in femtosecond time domain, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1392–1398, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.12.007.
- 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 P_B bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407–1417, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.008.
22. DeLano, W.L. (2002) The PyMOL molecular graphics system, <http://www.pymol.org>.
 23. 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, doi: 10.1073/pnas.91.22.10265.
 24. Allen, J.P., and Williams, J.C. (1995) Relationship between the oxidation potential of the bacteriochlorophyll dimer and electron transfer in photosynthetic reaction centers, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**, 275–283, doi: 10.1007/BF02110097.
 25. Williams, J.C., Alden, R.G., Murchison, H.A., Pelouquin, J.M., Woodbury, N.W., and Allen, J.P. (1992) Effects of mutations near the bacteriochlorophylls in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry*, **31**, 11029–11037, doi: 10.1021/bi00160a012.
 26. Kaupp, M. (2002) The function of photosystem I. Quantum chemical insight into the role of tryptophan–quinone interactions, *Biochemistry*, **41**, 2895–2900, doi: 10.1021/bi0159783.
 27. Wang, Y., Mao, L., and Hu, X. (2004) Insight into the structural role of carotenoids in the photosystem I: a quantum chemical analysis, *Biophys. J.*, **86**, 3097–3111, doi: 10.1016/S0006-3495(04)74358-1.
 28. Allen, J.P., and Williams, J.C. (2006) In *Chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications* (Grimm, B., Porra, R.J., Rudiger, W., and Scheer, H., eds), Springer, The Netherlands, pp. 283–295.
 29. Bylina, E.J., Kirmaer, C., McDowell, L., Holten, D., and Youvan, D.C. (1988) Influence of an amino acid residue on the optical properties and electron transfer dynamics of a photosynthetic reaction centre complex, *Nature*, **336**, 182–184, doi: 10.1038/336182a0.
 30. Flores, M., Isaacson, R., Abresch, E., Calvo, R., Lubitz, W., and Feher, G. (2007) Protein–cofactor interactions in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: II. Geometry of the hydrogen bonds to the primary quinone Q_A⁻ by ¹H and ²H ENDOR spectroscopy, *Biophys. J.*, **92**, 671–682, doi: 10.1529/biophysj.106.092460.
 31. Steiner, T., and Koellner, G. (2001) Hydrogen bonds with π -acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structure, *J. Mol. Biol.*, **305**, 535–557, doi: 10.1006/jmbi.2000.4301.
 32. Du, Q.-S., Wang, Q.-Y., Du, L.-Q., Chen, D., and Huang, R.-B. (2013) Theoretical study on the polar hydrogen-p (H_p -p) interactions between protein side chains, *Chem. Cent. J.*, **7**, 92–99, doi: 10.1186/1752-153X-7-92.

**EFFECTS OF SUBSTITUTION OF LEUCINE M196
BY HISTIDINE ON THE ELECTRONIC STRUCTURE
OF THE PRIMARY ELECTRON DONOR AND ELECTRON
TRANSFER IN REACTION CENTERS FROM
*Rhodobacter sphaeroides***

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

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

Received November 13, 2018

Revised December 27, 2018

Accepted December 27, 2018

In our recent X-ray study, we demonstrated that substitution of the natural leucine residue M196 with histidine in the reaction center (RC) from *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* leads to formation of a close contact between the genetically introduced histidine and the primary electron donor P, a dimer of bacteriochlorophylls (BChls) P_A and P_B, creating a novel pigment–protein interaction that is not observed in native RCs. In the present work, the possible nature of this novel interaction and its effects on the electronic properties of P and the photochemical charge separation in isolated mutant RCs L(M196)H are investigated at room temperature using stationary absorption spectroscopy, light-induced difference FTIR spectroscopy, and femtosecond transient absorption spectroscopy. The results are compared with the data obtained for RCs from *Rba. sphaeroides* pseudo-wild type strain. It is shown that the L(M196)H mutation results in a decrease of intensity and broadening of the long-wavelength Q_y absorption band of P at ~865 nm. Due to the mutation, there is also weakening of the electronic coupling between BChls in the radical cation P⁺ and increase in the positive charge localization on the P_A molecule. Despite the significant perturbations of the electronic structure of P, the mutant RCs retain high electron transfer rates and quantum yield of the P⁺Q_A⁻ state (Q_A is the primary quinone acceptor), which is close to the one observed in the native RCs. Comparison of our results with the literature data suggests that the imidazole group of histidine M196 forms a π -hydrogen bond with the π -electron system of the P_B molecule in the P dimer. It is likely that the specific (T-shaped) spatial organization of the π -hydrogen interaction and its potential heterogeneity in relation to the bonding energy is, at least partially, the reason that this type of interaction between the protein and the pigment and quinone cofactors is not realized in the native RCs.

Keywords: bacterial reaction center, amino acid replacement, primary electron donor, electronic structure, electron transfer, *Rhodobacter sphaeroides*