

УДК 541.14

СВОЙСТВА РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ *Rhodobacter sphaeroides* С АМИНОКИСЛОТНЫМИ ЗАМЕЩЕНИЯМИ Ile НА Tyr В ПОЗИЦИЯХ L177 И M206

© 2019 Т.Ю. Фуфина^{1*}, Г.К. Селиханов², И.И. Проскуряков¹,
В.А. Шувалов¹, Л.Г. Васильева¹

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино Московской обл., Россия;
электронная почта: tat-fufina@yandex.ru

² Институт белка РАН, 142290 Пущино Московской обл., Россия

Поступила в редакцию 17.12.2018

После доработки 28.01.2019

Принята к публикации 07.02.2019

Исследование пигмент-белковых взаимодействий в реакционных центрах фотосинтеза важно для понимания детальных механизмов фотохимического процесса. В статье описаны спектральные и фотохимические характеристики, пигментный состав и стабильность реакционных центров (РЦ) *Rhodobacter sphaeroides* с аминокислотными замещениями I(L177)Y и I(M206)Y. Полученные результаты сравнены с описанными ранее свойствами РЦ I(L177)H, I(L177)D и I(M206)H. Показано, что мутации I(L177)Y и I(M206)Y вызывают сходные смещения полосы Q_yP в спектрах поглощения мутантных РЦ и, очевидно, не влияют на распределение спиновой плотности внутри фотоокисленного димера P⁺. Обнаружены различия в положениях максимумов и величинах амплитуд полосы Q_yV в РЦ I(L177)Y и I(M206)Y. Полученные результаты указывают на возможное образование новых пигмент-белковых взаимодействий вблизи мономерных бактериохлорофиллов А и В цепей, которые представляют интерес для дальнейшего исследования.

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

DOI: 10.1134/S0320972519050117

Фотосинтез – это многостадийный процесс преобразования энергии света в энергию химических связей. На первых этапах этого процесса в фотосинтетических реакционных центрах (РЦ) световая энергия трансформируется в энергию разделенных зарядов с квантовой эффективностью, близкой к 100%. РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* представляет собой трансмембранный пигмент-белковый комплекс, состоящий из трех белковых субъединиц (H, M и L) и десяти кофакторов переноса электрона. Кофакторы представлены четырьмя молекулами бактериохлорофилла (БХл), двумя молекулами бактериофеофитина (БФео), двумя убихинонами, атомом негемового железа и молекулой каротиноида. Два БХл образуют димер,

Принятые сокращения: РЦ – реакционный центр; БХл – бактериохлорофилл; БФео – бактериофеофитин; Р – специальная пара бактериохлорофиллов; Р⁺ – окисленный первичный донор электрона; Р_A и Р_B – бактериохлорофиллы специальной пары; V_A и V_B – мономерные бактериохлорофиллы.

* Адресат для корреспонденции.

так называемую специальную пару (Р), которая является первичным донором электрона [1]. Согласно современным представлениям, высокая эффективность фотохимической реакции в РЦ определяется свойствами кофакторов, их взаимодействием друг с другом и с белковым окружением. В связи с этим выявление аминокислотных участков, критически значимых для функционирования комплекса, а также изучение особенностей пигмент-белковых взаимодействий представляют значительный интерес. Бактериохлорофиновые кофакторы РЦ имеют хорошо различаемые полосы в ближней инфракрасной, видимой и ближней ультрафиолетовой областях спектра поглощения РЦ. Изменение спектральных характеристик кофакторов в мутантных РЦ позволяет давать предварительную оценку влияния аминокислотных замен на структуру и свойства РЦ.

Ранее нами были описаны свойства РЦ с симметричными аминокислотными заменами Ile → His в положениях L177 и M206 вблизи молекул БХл специальной пары и мономерных

БХл (рис. 1). Было показано, что в спектрах поглощения РЦ I(L177)Н и I(M206)Н наблюдаются сходные изменения: коротковолновый сдвиг максимума полосы поглощения специальной пары и сдвиг максимума полосы поглощения мономерных БХл в длинноволновую область с одновременным уменьшением амплитуды этих полос [2, 3]. Также обнаружены и существенные различия свойств данных РЦ. Показано, что мутация I(L177)Н приводит к образованию прочной (возможно ковалентной) связи между остатком гистидина L177 и молекулой БХл P_A. Кроме того, в структуре этого РЦ с β-стороны БХл В_B появляется молекула воды, которая выступает вторым аксиальным лигандом атома магния БХл В_B [4]. В РЦ I(M206)Н не обнаружено значительных изменений пигмент-белковых взаимодействий, но было показано, что мутация приводит к существенному снижению удельного выхода этого РЦ при его очистке из мембран [5].

Для дальнейшего исследования пигмент-белковых взаимодействий в РЦ *R. sphaeroides*, а также для выяснения причин разных последствий замещения Ile → His в положениях L177 и M206, были введены новые аминокислотные замещения Ile → Tyr в этих позициях. Как и His, Tyr относится к полярным аминокислотным остаткам, а его гидроксифенольная группа может участвовать во взаимодействиях с пигмент-белковым матриксом РЦ. В частности, ранее было показано, что изменение ориентации ОН-группы Tyr M210 в процессе разделения зарядов в

РЦ пурпурных бактерий способствует стабилизации состояния с разделенными зарядами P⁺B_A⁻ [6–8]. В данной работе описаны спектральные и фотохимические свойства РЦ с замещениями I(L177)Y и I(M206)Y.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рекомбинантные штаммы *R. sphaeroides* выращивали на среде Хатнера в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл) и канамицина (5 мкг/мл), как описано ранее [3]. Реакционные центры выделяли методом ионообменной хроматографии, как описано ранее [9]. Количество РЦ после очистки из мембран оценивали по длинноволновой полосе поглощения мономерных БХл вблизи 800 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см (ODV₈₀₀) в расчете на 1 л трехдневной культуры. Полученные реакционные центры солибилизировали в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0 и 0,1% лаурилдиметиламинооксида. Спектры поглощения РЦ регистрировали при комнатной температуре на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония) и нормировали по Q_y-полосе поглощения БФео вблизи 760 нм. Дифференциальные спектры (свет-минус-темнота) измеряли на том же спектрофотометре с использованием скрещенных светофильтров СЗС22 и КС19. Пигментный анализ проводили по ранее описанному методу [4, 10]. Измерения спектров ЭПР проводили на спек-

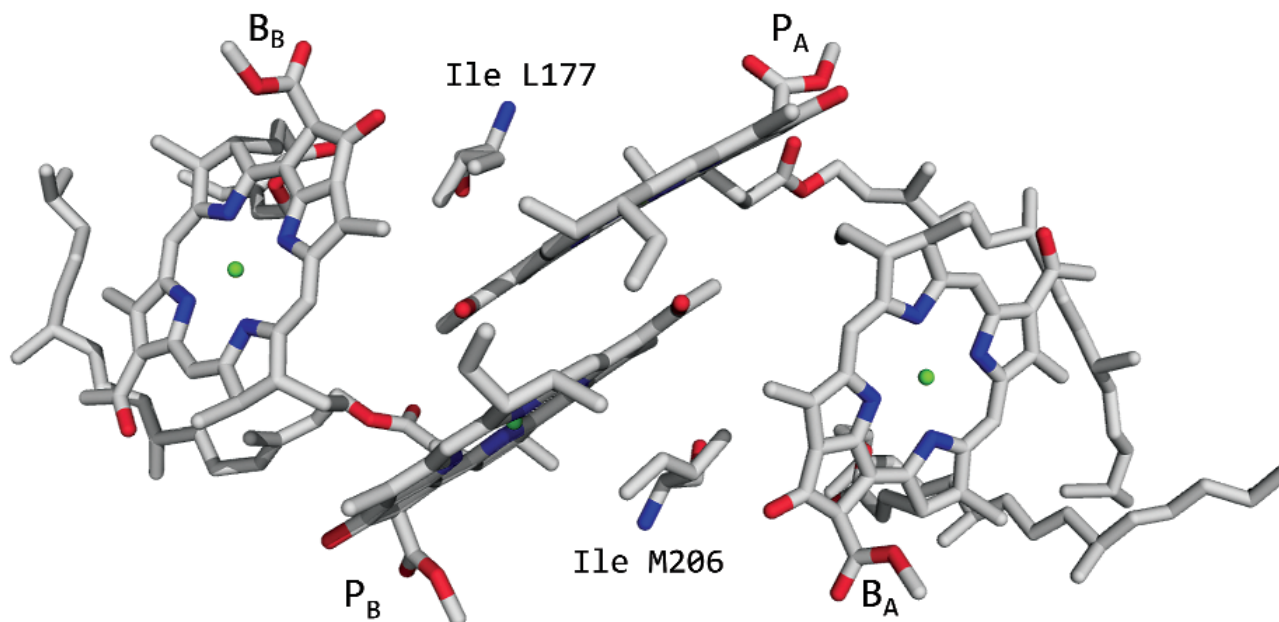


Рис. 1. Расположение молекул БХл первичного донора электронов P_A и P_B, мономерных БХл V_A и V_B, а также аминокислотных остатков Ile L177 и Ile M206 в структуре РЦ дикого типа. Номер структуры в PDB-банке – 3V3Y. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

рометре EMX-6 («Bruker», Германия) при комнатной температуре. Образец возбуждали светом с длиной волны $\lambda > 650$ нм и интенсивностью 10 мВт/см². Мощность СВЧ составляла 2 мВт, модуляция – 0,4 мТл, постоянная времени – 1,3 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Показано, что удельный выход при очистке для РЦ I(L177)Y и I(M206)Y сравним с таковым для РЦ дикого типа и составил 4–5 ODV₈₀₀ на литр культуры. Отмечено, что после процедуры замораживания с последующим оттаиванием спектральные свойства РЦ I(L177)Y и I(M206)Y не меняются. Полученные данные сходны с аналогичными показателями для РЦ дикого типа и свидетельствуют о стабильности мутантных РЦ.

В спектре поглощения РЦ дикого типа длинноволновый максимум полосы поглощения первичного донора электрона расположен при 865 нм, максимум полосы поглощения мономерных БХл находится при 804 нм, а БФео – при 758 нм. В Q_x-области спектра полоса поглощения всех молекул БХл в РЦ расположена при 598 нм, а максимум поглощения молекул БФео – при 533 нм (рис. 2, спектр 1). В спектре поглощения РЦ I(L177)Y длинноволновый максимум Q_y-полосы поглощения Р претерпевает коротковолновый сдвиг до 857 нм (рис. 2, спектр 2). Положение максимума Q_y-полосы поглощения мономерных БХл не меняется, но амплитуда этой полосы уменьшается. Максимум Q_y-полосы поглощения БФео смещается к 760 нм. Максимум Q_x-полосы поглощения молекул БХл в РЦ

смещен на 2 нм в коротковолновую область, максимум полосы БФео в Q_x-области спектра смещен на 3 нм в длинноволновую область до 536 нм. В спектре поглощения РЦ I(M206)Y полоса Q_yР имеет максимум при 860 нм, Q_y-полоса мономерных БХл – при 810 нм, а Q_y-полоса молекул БФео – при 760 нм. Максимум Q_x-полосы поглощения молекул БХл в РЦ I(M206)Y расположен при 599 нм, а полосы Q_x БФео – при 530 нм (рис. 2, спектр 3).

При освещении РЦ I(L177)Y и I(M206)Y в дифференциальных спектрах (свет-минус-темнота) наблюдается уменьшение поглощения первичного донора электрона, коротковолновый сдвиг полосы поглощения мономерных БХл и длинноволновый сдвиг полосы поглощения БФео, так же как и в РЦ дикого типа. Эти данные указывают на то, что в РЦ I(L177)Y и I(M206)Y происходит фотоиндуцированный процесс переноса электрона с образованием состояния P⁺Q_A⁻ (данные не приведены).

Пигментный анализ показал, что состав пигментов в РЦ I(L177)Y и I(M206)Y не изменился. Соотношение БХл/БФео в РЦ дикого типа составило 2,00 ± 0,05, а в РЦ I(L177)Y и I(M206)Y – 1,90 ± 0,05 и 2,10 ± 0,05 соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в мутантных РЦ, как и в РЦ дикого типа, на две молекулы БФео приходится четыре молекулы БХл.

С помощью методов двойного электронно-ядерного резонанса и ЭПР ранее было показано, что в димере БХл Р *R. sphaeroides* R26 спиновая плотность распределена неравномерно: около 2/3 плотности приходится на БХл P_A и около 1/3 – на БХл P_B [11]. На рис. 3 приведены фотоиндуцированные сигналы ЭПР для РЦ дикого типа и мутантных РЦ. Величина g-фактора во всех случаях составляет 2,0026 и соответствует известному значению P⁺. Для РЦ I(L177)Y и I(M206)Y ширина сигнала P⁺ остается такой же, как для РЦ дикого типа (таблица). В то же время в РЦ I(L177)Y наблюдается уширение линии сигнала ЭПР парамагнитного окисленного состояния катион-радикала Р до 1,14 мТл, что указывает на изменение распределения спиновой плотности внутри димера БХл. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными об изменении электронной структуры Р из-за образования прочной, предположительно ковалентной, связи БХл P_A с белком [4].

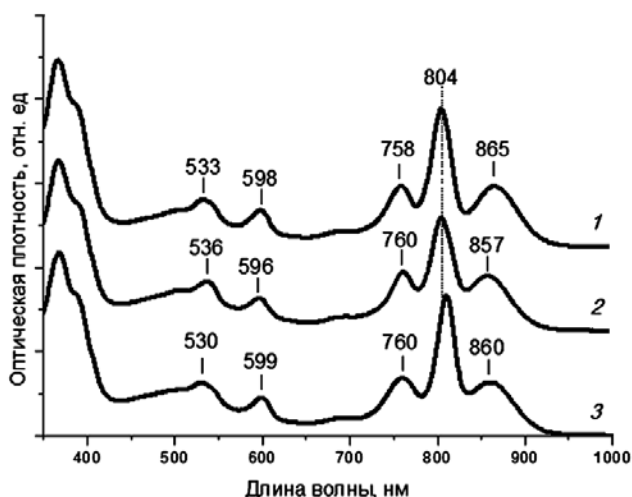


Рис. 2. Спектры поглощения РЦ дикого типа (1), I(L177)Y (2) и I(M206)Y (3), измеренные при комнатной температуре. Спектры нормировали по Q_y-полосе поглощения молекулы БФео

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что аминокислотные замещения Ile → Thr в симметричных позициях M206 и L177 вызывают сход-

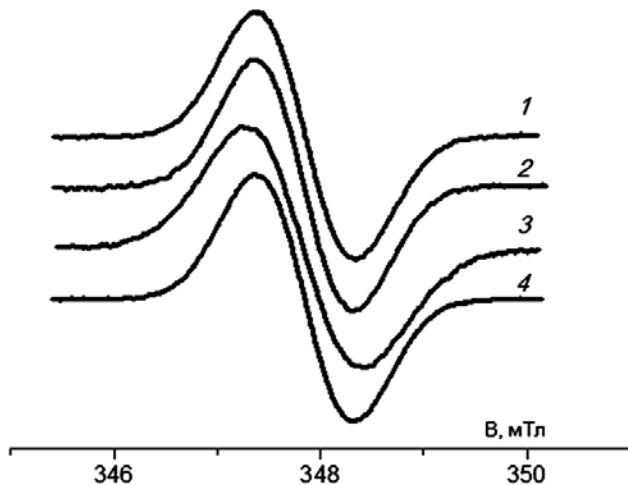


Рис. 3. Спектры ЭПР фотоиндуцированного окисленного состояния первичного донора (P^+) в РЦ дикого типа (1) и с аминокислотными замещениями вблизи молекул БХл I(L177)Y (2), I(L177)H (3), I(M206)Y (4), измеренные при комнатной температуре

ные изменения в спектрах мутантных РЦ в области поглощения димера БХл Р. Мутация I(L177)Y приводит к коротковолновому сдвигу полосы $Q_Y P$ на 8 нм, а мутация I(M206)Y – к аналогичному сдвигу на 5 нм. Замещение I(L177)Y практически не влияет на максимум полосы $Q_Y V$, однако отмечается заметное снижение амплитуды этой полосы в спектре поглощения РЦ. В свою очередь, мутация I(M206)Y вызывает смещение полосы $Q_Y V$ в длинноволновую область спектра на 6 нм без видимого уменьшения ее амплитуды.

Результаты ЭПР-спектроскопии свидетельствуют о том, что в РЦ I(L177)Y и I(M206)Y распределение спиновой плотности внутри димера БХл Р не изменилось. Эти данные согласуются с результатами компьютерного моделирования замещений I(L177)Y и I(M206)Y с использованием программы визуализации белковых молекул PyMol [12], показывающими, что наиболее вероятное расположение гидроксифенольной группы тирозина направлено в сторону мономерных БХл (не показано). Можно предположить, что коротковолновый сдвиг полосы $Q_Y P$, ранее также наблюдавшийся в спектрах поглощения мутантных РЦ с замещениями в позициях L177 и M206 [2, 3, 13], а также ряда РЦ с другими замещениями [14], является ответом на изменение белкового окружения димера БХл.

Удельный выход РЦ одиночных мутантов I(L177)Y и I(M206)Y при их очистке из мембран был соизмерим с аналогичной величиной для РЦ дикого типа. Для сравнения, ранее было показано снижение удельного выхода РЦ I(L177)H

в ~2 раза, РЦ I(M206)H – более чем на порядок [5]. Дополнительным свидетельством стабильности РЦ I(L177)Y и I(M206)Y является отсутствие фракции без длинноволновой полосы поглощения Р при очистке этих комплексов из мембран, что также отличает их от РЦ I(L177)H и I(M206)H [5]. Таким образом, внесение полярных остатков Туг в окружение бактериохлорофиллов P_A и V_B (мутация I(L177)Y) и P_B и V_A (мутация I(M206)Y) не дестабилизирует структуру РЦ. Совокупность полученных результатов позволяет предположить, что характеристики этих взаимодействий отличаются от таковых, вызванных внесением полярных остатков His в те же позиции.

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что обязательным условием для внедрения аминокислотных остатков с полярными группами в гидрофобную среду мембранных белков является вовлечение этих групп в стабильные взаимодействия с пигмент-белковым окружением [15]. Нарушение этого условия может приводить к таким последствиям, как потеря мономерного БХл V_A из структуры РЦ H(L153)Y [15] или дестабилизация и снижение количества РЦ в мембране при внесении мутации I(M206)H [5]. Результаты ЭПР и анализ спектров поглощения мутантных РЦ указывают на то, что гидроксильные группы тирозинов в положениях M206 и L177, по всей вероятности, вступают в устойчивые взаимодействия с белковым окружением мономерных БХл V_A и V_B .

Ранее было показано, что с помощью ряда замещений можно модифицировать пигмент-белковые взаимодействия с β -стороны макроцикла БХл V_B [4, 16] вблизи положения L177. Так, Фролов с соавт. показали, что мутация F(L181)R приводит к образованию шестой координационной связи, сформированной между молекулой воды, расположенной с β -стороны БХл V_B , и атомом магния этого пигмента. Добавление дополнительной мутации H(M182)L + F(L181)H приводило к формированию РЦ, в которых аксиальный лиганд БХл V_B располагался с β -сторо-

Ширина сигнала ЭПР P^+ в изолированных РЦ дикого типа и генетически модифицированных РЦ I(L177)Y, I(L177)H и I(M206)Y

РЦ	Ширина сигнала, мТл
Дикий тип	0,98 ± 0,01
I(L177)Y	0,97 ± 0,01
I(L177)H	1,14 ± 0,01
I(M206)Y	0,95 ± 0,01

ны макроцикла пигмента [16]. Аналогичные результаты были получены позднее на мутантных РЦ I(L177)H. Было показано, что в структуре РЦ I(L177)H БХл В_B имеет два аксиальных лиганда, одним из которых, как и в РЦ F(L181)R, выступает молекула воды [4]. При удалении нативного аксиального лиганда БХл В_B в РЦ H(M182)L + I(L177)H данная молекула воды, очевидно, координирует атом магния В_B с β-стороны макроцикла [4, 17].

Внесение His в позицию M206, расположенную симметрично сайту L177, приводило к качественно иным результатам, прежде всего, к значительной дестабилизации структуры РЦ [5]. Было выдвинуто предположение, что полярный остаток His в этом положении мог нарушить взаимодействие РЦ с молекулой гликолипида, необходимое для поддержания стабильности комплекса [5]. В этой связи значительный интерес представляет вопрос о том, за счет каких взаимодействий полярный Туг M206, имеющий больший молекулярный объем ($118 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$), чем объем Ile ($99,9 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$) и His ($93,1 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$) [18], не влияет на стабильность РЦ, и, предположительно, на связывание гликолипида с поверхностью комплекса. Можно ожидать, что Туг M206 и L177 занимает все пространство вблизи атома магния с β-стороны плоскости мономерных БХл, не оставляя возможности для дополнительного встраивания молекул воды. Ответы на эти вопросы может дать расшифровка кри-

сталлической структуры РЦ I(L177)Y и I(M206)Y, и такая работа в настоящее время ведется.

Таким образом, замещения Ile → Tug в позициях M206 и L177 оказывают сходное влияние на спектральные свойства Р, но приводят к разным изменениям в области поглощения мономерных БХл. РЦ I(L177)Y и I(M206)Y фотохимически активны, относительно стабильны при выделении из мембран и, благодаря интересным спектральным характеристикам, представляют собой перспективные объекты для исследования роли белка в обеспечении функциональной активности А-цепи и неактивности В-цепи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания № АААА-А17-117030110140-5 (изменение спектральных свойств изолированных реакционных центров), а также при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 17-00-0207 (К) – направленный мутагенез реакционных центров; № 17-44-500828 – выращивание рекомбинантных штаммов и выделение реакционных центров).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiyama, H., and Rees, D.C. (1987) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5730–5734, doi: 10.1073/pnas.84.16.5730.
- Болгарина Т.И., Хатыпов Р.А., Васильева Л.Г., Шкуропатов А.Я., Шувалов В.А. (2004) Замещение изолейцина M206 на гистидин в реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides* приводит к изменению структуры молекулы бактериохлорофилла специальной пары, *Доклады Академии наук*, **394**, 265–268.
- Khatypov, R.A., Vasilieva, L.G., Fufina, T.Y., Bolgarina, T.I., and Shuvalov, V.A. (2005) Substitution of isoleucine L177 by histidine affects the pigment composition and properties of the reaction center of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 1256–1261.
- 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 В_B bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407–1417, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.008.
- Vasilieva, L.G., Fufina, T.Y., Shuvalov, V.A., and Gabdulkhakov, A.G. (2015) Different effects of identical symmetry-related mutations near the bacteriochlorophyll dimer in the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 647–653.
- Parson, W.W., Chu, Z.T., and Warshel, A. (1990) Electrostatic control of charge separation in bacterial photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1017**, 251–272, doi: 10.1016/0005-2728(90)90192-7.
- Alden, R.G., Parson, W.W., Chu, Z.T., and Warshel, A. (1996) Orientation of the OH dipole of tyrosine (M)210 and its effect on electrostatic energies in photosynthetic bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem.*, **100**, 16761–16770, doi: 10.1021/jp961271s.
- Yakovlev, A.G., Vasilieva, L.G., Shkuropatov, A.Ya., Bolgarina, T.I., Shkuropatova, V.A., and Shuvalov, V.A. (2003) Mechanism of charge separation and stabilization of separated charges in reaction centers of *Chloroflexus aurantiacus* and of YM210W(L) mutants of *Rhodobacter sphaeroides* excited by 20 fs pulses at 90 K, *J. Phys. Chem. A*, **107**, 8330–8338, doi: 10.1021/jp0300647.
- 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, doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.032.
- Van der Rest, M., and Gingras, G. (1974) The pigment complement of the photosynthetic reaction center isola-

- ted from *Rhodospirillum rubrum*, *J. Biol. Chem.*, **249**, 6446–6453.
11. Lenzian, F., Huber, M., Isaacson, R.A., Endeward, B., Plato, M., Bonigk, B., Mobius, K., Lubitz, W., and Feher, G. (1993) The electronic structure of the primary donor cation radical in *Rhodobacter sphaeroides* R-26: ENDOR and TRIPLE resonance studies in single crystals of reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**, 139–160, doi: 10.1016/0005-2728(93)90013-6.
 12. DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, <http://pymol.sourceforge.net/>.
 13. Williams, J.C., Alden, R.G., Murchison, H.A., Peloquin, 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.
 14. 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, doi: 10.1016/S0005-2728(02)00215-3.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Fufina, T.Yu., 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.
 18. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем, Москва, Техносфера, 2005, 256 с.

THE PROPERTIES OF *Rhodobacter sphaeroides* REACTION CENTERS WITH AMINO ACID SUBSTITUTIONS OF Ile FOR Tyr AT L177 AND M206 POSITIONS

T. Yu. Fufina^{1*}, G. K. Selikhanov², I. I. Proskuryakov¹,
V. A. Shuvalov¹, and L. G. Vasilieva¹

¹ Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: tat-fufina@yandex.ru

² Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Received December 17, 2018
Revised January 28, 2019
Accepted February 7, 2019

Study of pigment–protein interactions in photosynthetic reaction centers is important for understanding detailed mechanisms of the photochemical process. The article describes the spectral and photochemical characteristics, pigment composition and stability of the *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers (RCs) with amino acid substitutions I(L177)Y and I(M206)Y. The data obtained are compared with the properties of the I(L177)H, I(L177)D, and I(M206)H RCs, which were described earlier. It is shown that the I(L177)Y and I(M206)Y mutations cause similar shifts of the Q_YP band in absorption spectra of the mutant RCs and, obviously, do not affect the distribution of electron spin density within the photooxidized P⁺ dimer. Differences in the peak positions and the amplitudes of the Q_YB band in the I(L177)Y and I(M206)Y RCs were found. The results indicate the possibility of formation of new pigment–protein interactions in the vicinity of monomeric bacteriochlorophylls in A and B chains, which is of interest for future research.

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