

УДК 577.355

СОТРУДНИЧЕСТВО С АЛЕКСАНДРОМ КОНСТАНТИНОВЫМ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ЭЛЕКТРОГЕННЫХ РЕАКЦИЙ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ

Мини-обзор

© 2021 О.П. Каминская¹, А.Ю. Семенов^{2,3*}

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290 Пушкино, Московская обл., Россия

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: semenov@belozersky.msu.ru

³ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.10.2020

После доработки 11.11.2020

Принята к публикации 21.11.2020

Рассмотрены работы авторов 1985–1988 гг., выполненные в сотрудничестве с А.А. Константиновым, одним из крупнейших ученых в области мембранной биоэнергетики. Работы, посвященные исследованию быстрой кинетики генерации мембранного потенциала в фотосинтетических реакционных центрах (РЦ) пурпурных бактерий в ответ на лазерную вспышку, позволили детально изучить механизмы электрогенных реакций на донорном и акцепторном участках РЦ. На протеолипосомах, содержащих РЦ из несерных пурпурных бактерий *Rhodospirillum rubrum*, была выявлена электрогенная стадия, связанная с внутрибелковым переносом электрона к фотоокисленному димеру бактериохлорофилла P_{870} от экзогенных вторичных доноров – редокс-красителей и растворимых цитохромов (цит) типа *c*. Обнаружено, что восстановление вторичного хинонного акцептора электрона Q_B в хроматофорах из *R. rubrum* в ответ на четные вспышки света, сопровождающееся протонированием хинона, имеет электрогенный характер. Были определены спектральные характеристики и окислительно-восстановительные потенциалы четырех гемов прочносвязанного цит *c* в РЦ *Blastochloris viridis* и стадии электрогенеза, связанные с переносом электрона в комплексе РЦ. Впервые было проведено сопоставление относительных амплитуд мембранного потенциала, генерируемого в ходе отдельных электрогенных реакций, с расстояниями между редокс-кофакторами, полученными на основе трехмерной структуры РЦ *Bl. viridis*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериальные фотосинтетические реакционные центры, перенос электрона, прямой электрометрический метод, мембранный потенциал, цитохром *c*, хинон.

DOI: 10.31857/S0320972521010012

КРАТКИЙ ОБЗОР ПРЕДШЕСТВОВАВШИХ РАБОТ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ ЭЛЕКТРОГЕННЫХ РЕАКЦИЙ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЯМОГО ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

В 1985–1988 гг. авторы этой статьи сотрудничали с Александром Александровичем Константиновым в изучении природы и механизмов

электрогенных реакций в хроматофорах и фотосинтетических реакционных центрах (РЦ), выделенных из несерных пурпурных бактерий *Rhodospirillum rubrum* и *Rhodobacter* (прежнее название – *Rhodopseudomonas*) *sphaeroides* и из серных пурпурных бактерий *Blastochloris* (прежнее название – *Rhodopseudomonas*) *viridis* [1–6]. В 1974–1976 гг. Л.А. Драчевым, А.Д. Кауленом и одним из авторов настоящего обзора (А.С.) был разработан прямой электрометрический метод регистрации электрической активности мемб-

Принятые сокращения: ДАД – 2,3,5,6-тетраметил-*p*-фенилендиамин (диаминодурен); РЦ – реакционные центры; ТМФД – *N,N,N',N'*-тетраметил-*p*-фенилендиамин; ФМС – феназинметосульфат; цит – цитохром; E_m – среднеточечный редокс-потенциал; $\Delta\psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов; P_{870} (P_{960}) – димеры бактериохлорофилла в РЦ; Q_A , Q_B – первичный и вторичный хинонные акцепторы электрона; τ – характерное время реакции.

* Адресат для корреспонденции.

ранных белков [7, 8]. С помощью этого метода было установлено, что в бактериальных хроматофорах, ассоциированных с искусственной плоской фосфолипидной мембраной, при стационарном освещении в присутствии редокс-медиаторов наблюдается образование трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) со знаком плюс внутри хроматофоров [9, 10].

Было обнаружено, что в такой системе фотоиндуцированный перенос электронов ограничен восстановлением первичного хинонного акцептора Q_A , предположительно вследствие вымывания вторичного хинона Q_B и эндогенного пула убихинона в объем липидной фазы искусственной мембраны [9–11]. Показано, что экзогенные редокс-кофакторы – доноры и акцепторы электрона (аскорбат, N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД), диаминодурен (ДАД), феназинметосульфат (ФМС), 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ), метиленовый синий, искусственные хиноны) – поддерживают стационарный фотопотенциал, обеспечивая многократное ревосстановление фотоокисленного первичного донора РЦ – димера бактериохлорофилла P_{870} – и реокисление фотовосстановленного Q_A [10].

Применение коллодиевой пленки в качестве каркаса для плоской фосфолипидной мембраны позволило регистрировать кинетику генерации $\Delta\psi$ в ответ на лазерную вспышку с временным разрешением ~ 200 нс [12]. В работах этого периода, выполненных в лаборатории Л.А. Драчева [11–15], было показано, что освещение хроматофоров пурпурных бактерий одиночной лазерной вспышкой вызывает быстрое, не разрешаемое по кинетике, образование $\Delta\psi$. Показано, что наблюдаемая быстрая стадия обусловлена переносом электрона между P_{870} (или P_{890} – в случае хроматофоров из серных пурпурных бактерий *Chromatium minutissimum* и *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*) и первичным хинонным акцептором Q_A . Кроме того, в хроматофорах *C. minutissimum* и *E. shaposhnikovii*, РЦ которых имеет в своем составе прочносвязанный четырехгемовый цитохром (цит) *c*, наблюдалась дополнительная стадия образования $\Delta\psi$, связанная с восстановлением фотоокисленного P_{890} от цит *c*. Было предположено, что вклад в генерацию $\Delta\psi$ может вносить и реакция окисления Q_A – либо при переносе электрона на внешний акцептор, либо при восстановлении вторичного хинонного акцептора Q_B .

Исследования показали, что $\Delta\psi$, генерируемая встроенными в коллодиевую фосфолипидную мембрану хроматофорами в ответ на единичную вспышку, спадает с гетерогенной кинетикой в шкале десятков миллисекунд–секунд

[13, 14]. Было предположено, что быстрая компонента спада $\Delta\psi$ обусловлена рекомбинацией зарядов между фотоокисленным P_{870}^+ и восстановленным Q_A^- . Медленная компонента спада $\Delta\psi$ с характерным временем $\tau \geq 0,5$ с отражала процесс пассивного разряда $\Delta\psi$ на искусственной мембране и мембране хроматофора. Было обнаружено, что спад $\Delta\psi$ замедлялся в присутствии восстановленного ФМС.

АНАЛИЗ КИНЕТИКИ СПАДА ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ОТВЕТА ХРОМАТОФОРОВ *R. rubrum* И ПРОТЕОЛИПОСОМ С РЦ *R. rubrum*, ВСТРОЕННЫХ В КОЛЛОДИЕВУЮ ФОСФОЛИПИДНУЮ МЕМБРАНУ

Работы 1985–1988 гг., выполненные нами в сотрудничестве с А.А. Константиновым [1–6], посвящены детальному исследованию кинетики нарастания и спада мембранного потенциала, генерируемого фотосинтетическими РЦ пурпурных бактерий в ответ на лазерную вспышку. Большой вклад в экспериментальную часть этих работ внесли С.М. Драчева и М.Д. Мамедов.

С использованием метода парных вспышек нами было доказано, что быстрая компонента спада индуцированного лазерной вспышкой фотопотенциала с $\tau \sim 70$ мс в хроматофорах *R. rubrum*, ассоциированных с коллодиевой мембраной, обусловлена возвратом электрона от Q_A^- к P_{870}^+ [4]. Показано, что вклад медленной ($\tau \geq 0,5$ с) компоненты в кинетику спада $\Delta\psi$ увеличивается в присутствии эффективных доноров и акцепторов электрона, способных восстанавливать либо окислять компоненты ион-радикальной пары $P_{870}^+Q_A^-$ и, как следствие, образовывать долгоживущие состояния $P_{870}Q_A$ и $P_{870}^+Q_A$. Было продемонстрировано, что относительная амплитуда медленной компоненты темнового спада $\Delta\psi$ может быть использована для оценки скорости восстановления P_{870}^+ и окисления Q_A^- экзогенными редокс-кофакторами. Показано, что эффективными восстановителями для P_{870}^+ являются редокс-медиаторы ТМФД, ДАД, ФМС, ДХФИФ, а эффективными акцепторами электрона от Q_A^- – 1,4-бензохинон, растворимые аналоги убихинона Q-1 и Q-2, а также убихинон-10 (Q-10), добавляемый в раствор фосфолипидов в н-декане, применявшийся для пропитки коллодиевой пленки [4].

Данные о том, что экзогенный убихинон способен быстро реокислять Q_A^- и тем самым предотвращать рекомбинацию ион-радикальной пары, указывали на реконструкцию функции Q_B в системе встроенных хроматофоров.

При насыщающих концентрациях убихинона в коллоидной мембране реакция $Q_A^- \rightarrow Q_B$ реконструировалась в 75% РЦ [4]. Замедление спада $\Delta\psi$, вызванное добавлением Q-10, полностью снималось ингибитором сайта Q_B о-фенантролином. Эти эксперименты подтвердили первоначальное предположение о том, что ингибирование переноса электрона с Q_A на Q_B в хроматофорах, встроенных в искусственную фосфолипидную мембрану, обусловлено экстракцией убихинона, связанного в сайте Q_B , в гидрофобный объем искусственной мембраны [9, 10].

В экспериментах на хроматофорах *R. rubrum* в качестве доноров электрона для фотоокисленного P_{870} необходимо было использовать проникающие через мембрану восстановленные редокс-медиаторы, поскольку донорный участок белкового комплекса РЦ локализован вблизи внутренней поверхности мембраны хроматофоров. Мы показали, что для исследования редокс-реакций P_{870}^+ с непроникающими донорами электрона удобной моделью могут служить протеолипосомы, содержащие изолированные РЦ из *R. rubrum* [3]. В таких протеолипосомах в ответ на лазерную вспышку генерируется фотопотенциал со знаком минус внутри везикул, что указывает на локализацию P_{870} вблизи от наружной поверхности протеолипосомальной мембраны, т.е. противоположную его локализации в хроматофорах *R. rubrum*. Добавление к протеолипосомам с РЦ из *R. rubrum* непроникающих доноров электрона — гексааминоуретина и цит *c* из сердца лошади — приводило к значительному замедлению спада $\Delta\psi$, генерируемой в ответ на лазерную вспышку. Этот факт свидетельствовал о быстром восстановлении фотоокисленного P_{870} экзогенными редокс-кофакторами и появлении долгоживущего состояния $P_{870}Q_A^-$.

ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ДОНОРНОМ УЧАСТКЕ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ИЗ *Rhodospirillum rubrum*

Исследование электрогенеза, связанного с переносом электрона между первичным донором РЦ P_{870} и растворимым цит *c*, затруднено в случае хроматофоров из *R. rubrum*, поскольку эти замкнутые везикулы теряют значительную часть эндогенного цит c_2 при ультразвуковой обработке, при этом ориентированный внутрь хроматофора донорный участок РЦ недоступен для экзогенного цит *c*. Поэтому для исследования электрогенного восстановления P_{870}^+ цитохромами типа *c* мы использовали протеолипосомы, содержащие изолированные комплексы РЦ из *R. rubrum*.

В работе Drachev et al. [3] впервые с высоким разрешением была измерена быстрая кинетика генерации мембранного потенциала в ходе восстановления P_{870} от цит *c* из сердца лошади и от цит c_2 , выделенного из *R. rubrum*. Было показано, что в присутствии $\geq 0,1$ мкМ восстановленного цит *c* в кинетике нарастания $\Delta\psi$, помимо не разрешаемой по времени быстрой стадии А ($\tau < 0,2$ мкс), обусловленной разделением зарядов между P_{870} и Q_A , наблюдается дополнительная компонента с характерным временем τ в субмиллисекундной либо миллисекундной временной шкале, связанная с донированием электрона от цит *c* (стадия С). Было обнаружено, что относительный вклад этой дополнительной компоненты нарастания $\Delta\psi$ в суммарный электрогенез составляет 22–24% в присутствии митохондриального цит *c* (при его концентрации > 5 – 10 мкМ) и $\sim 16\%$ — в присутствии 7 мкМ цит c_2 из *R. rubrum*. Кинетический анализ стадии С свидетельствовал о насыщаемой реакции второго порядка между цит *c* и P_{870}^+ с максимальным значением константы скорости $k_{v \max} = 6 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ и константой Михаэлиса $K_M = 0,9$ мкМ при низкой ионной силе. Скорость нарастания стадии С заметно снижалась при повышении ионной силы, что соответствует представлению об ионном механизме взаимодействия белка РЦ с цит *c* при образовании бимолекулярного комплекса.

Важным этапом исследований электрогенеза в РЦ фотосинтезирующих бактерий явилось понимание того, что электрогенный характер восстановления P_{870}^+ не является специфичным для растворимых цитохромов типа *c* как доноров электрона, а имеет место и в случае восстановленных форм редокс-медиаторов ТМФД, ДАД и ФМС. В присутствии высоких концентраций ФМС и ТМФД, соответственно > 20 мкМ и $> 0,5$ мМ, в шкале от сотен микросекунд до миллисекунд в хроматофорах *R. rubrum* в ответ на единичную вспышку появлялась дополнительная стадия нарастания $\Delta\psi$ с вкладом 15–18% в суммарный электрогенез [1]. Характерное время τ этой дополнительной компоненты нарастания $\Delta\psi$ составляло ~ 250 мкс при концентрации ФМС 50 мкМ и ~ 2 мс — при концентрации ТМФД 4 мМ. Электрогенный характер восстановления P_{870}^+ низкомолекулярными донорами электрона свидетельствовал об электроизолированном расположении специальной пары в глубине белковой глобулы РЦ. Поскольку амплитуда дополнительной фазы нарастания $\Delta\psi$, обусловленной донированием электрона от восстановленного ТМФД или ФМС, была лишь немногим меньше амплитуды фазы С, наблюдаемой в присутствии цит *c*, было сделано

заключение, что основной вклад в электрогенез, связанный с восстановлением P_{870}^+ , вносит векторный перенос электрона внутри белковой глобулы самого РЦ.

ГЕНЕРАЦИЯ $\Delta\psi$ ХРОМАТОФОРАМИ *R. rubrum* ПРИ ПЕРЕНОСЕ ЭЛЕКТРОНА НА АКЦЕПТОРНОМ УЧАСТКЕ РЦ

Возможность реконструкции функции Q_B в хромотофорах, ассоциированных с коллодиевой мембраной, позволила изучить вопрос об электрогенезе, связанном с окислением Q_A вторичным хиноном Q_B [2]. Наши исследования показали, что перенос первого электрона от Q_A к Q_B ($Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$) в хромотофорах *R. rubrum* не приводит к увеличению $\Delta\psi$. Эти данные соответствовали заключению предшествовавшего исследования электрогенеза в РЦ *Rba. sphaeroides*, встроенных в плоскую бислойную мембрану [16] (позже была выявлена небольшая рН-зависимая электрогенная стадия, обусловленная протонированием аминокислотного остатка вблизи Q_B при образовании Q_B^- в ответ на единичную вспышку [17]). Вместе с тем мы обнаружили, что восстановление семихинонной формы Q_B до убихинола связано с появлением дополнительной компоненты $\Delta\psi$, составляющей

~10% суммарной амплитуды ответа (стадия В) [2]. Эти данные явились первым свидетельством электрогенеза, сопряженного с протонированием вторичного хинона в бактериальных РЦ.

Электрогенная стадия В, связанная с образованием $Q_B H_2$, характеризовалась τ 130 мкс, 250 мкс и ~1 мс при рН 6,5, 7,5 и 9 соответственно [2], что близко к величинам, измеренным для скорости переноса электрона от Q_A к Q_B в хромотофорах *R. rubrum* и РЦ *Rba. sphaeroides* [18, 19] и скорости антимицин-нечувствительного связывания H^+ в хромотофорах *Rba. sphaeroides* [20] (см. также обзоры [21, 22]). Тот факт, что протонирование Q_B при образовании убихинола в ответ на вторую вспышку сопряжено с генерацией $\Delta\psi$, указывает на векторный перенос H^+ из внешней водной фазы к электроизолированному хинону Q_B , заглубленному внутрь белковой глобулы РЦ.

Рис. 1 суммирует данные по электрогенным реакциям в РЦ *R. rubrum*, полученные в работах Drachev et al. [1–4]. Схема показывает три стадии электрогенеза на мембране хромотофора, сопряженного с переносом электрона в комплексе РЦ. Стадия А обусловлена первичным разделением зарядов, В – протонированием восстановленного Q_B при образовании убихинола, С – восстановлением димера бактериохлорофилла от растворимых доноров электрона.

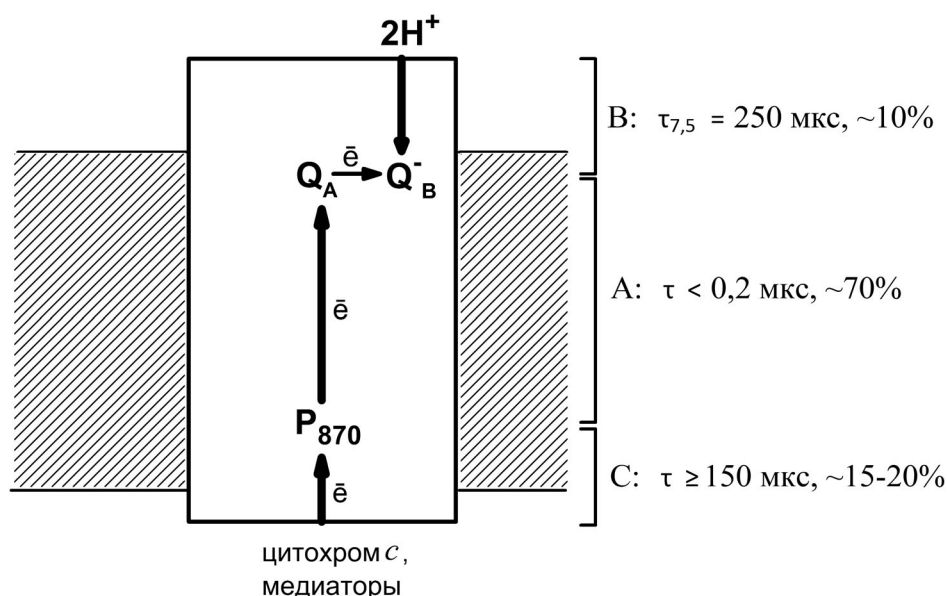


Рис. 1. Схема электрогенных реакций в реакционных центрах *R. rubrum*. Электрогенное восстановление фотоокисленного P_{870} от экзогенных вторичных доноров электрона наблюдается в ответ на каждую лазерную вспышку, электрогенное протонирование вторичного хинонного акцептора Q_B – в ответ на четные вспышки света. Указаны характерные времена τ (для компоненты В – при рН 7,5) и относительные вклады трех стадий генерации $\Delta\psi$

**ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА
И ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ
В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ
ИЗ *Blastochloris viridis***

Работы Dracheva et al. [5, 6], выполненные с участием А.А. Константинова, были посвящены исследованию переноса электрона и электрогенных реакций в РЦ, выделенных из серных пурпурных бактерий *Bl. viridis*. Интерес к изучению именно этих РЦ обусловлен двумя обстоятельствами. Во-первых, именно для этого пигмент-белкового комплекса была получена первая трехмерная структура кристалла мембранного белка с атомным разрешением [23, 24]. Во-вторых, вторичным донором электрона для димера бактериохлорофилла в этих РЦ служит не водорастворимый цит c_2 , как в РЦ из несерных бактерий *R. rubrum* и *Rba. sphaeroides*, а прочно-связанный с РЦ четырехгемовый цит c .

До начала этих работ считалось, что четырехгемовый цит c в РЦ *Bl. viridis* содержит по два одинаковых высокопотенциальных и низкопотенциальных гема со среднеточечными редокс-потенциалами $E_m + 340$ и 0 мВ и максимумами поглощения соответственно при 558 и 552–553 нм [25, 26]. Нами было показано, что как высокопотенциальные, так и низкопотенциальные гемы не идентичны и характеризуются различными спектральными и окислительно-восстановительными свойствами [5, 6]. Гемы с $E_m + 380$, $+310$, $+20$ и -60 мВ характеризовались максимумами поглощения при 559, 556, 552 и 554 нм соответственно. Ранее было показано, что аксиальными лигандами гема, расположенного вторым по счету от P_{960} в РЦ *Bl. viridis*, служат аминокислотные остатки гистидинов, что является характерным признаком низкопотенциального гема [24, 27]. Измерения с помощью импульсной абсорбционной спектроскопии кинетики переноса электрона в РЦ из *Bl. viridis* показали, что в физиологических условиях (когда гемы c_{559} и c_{556} восстановлены) непосредственным донором электрона для фотоокисленного P_{960} служит гем c_{559} ($\tau = 0,3$ мкс), в то время как гем c_{556} , в свою очередь, восстанавливает гем c_{559} ($\tau = 2,5$ мкс) [5]. Поэтому мы предположили, что высокопотенциальные и низкопотенциальные гемы цит c чередуются, и ближайшим к P_{960} является наиболее высокопотенциальный гем c_{559} , а второй высокопотенциальный гем c_{556} является третьим по счету от P_{960} . В этом случае редокс-центры должны быть расположены в следующей последовательности: $c_{554} - c_{556} - c_{552} - c_{559} - P_{960}$ [6] (рис. 2).

Для исследования электрогенных реакций протеолипосомы, содержащие РЦ из *Bl. viridis*,

были встроены в коллоидные фосфолипидные мембраны. Анализ фотоэлектрических сигналов, индуцированных лазерными вспышками, показал, что кинетика образования $\Delta\psi$ включает три последовательные электрогенные реакции, наблюдаемые в ответ на каждую лазерную вспышку: А — не разрешаемый по времени перенос электрона от P_{960} на первичный хинонный акцептор Q_A ($\tau < 0,2$ мкс), С1 — восстановление фотоокисленного P_{960}^+ от самого высокопотенциального гема c_{559}^{2+} ($\tau = 0,3$ мкс), С2 — ревосстановление окисленного c_{559}^{3+} от второго высокопотенциального гема c_{556}^{2+} ($\tau = 2,5$ мкс), и компоненту В, наблюдаемую в ответ на четные вспышки и связанную с протонированием дважды восстановленного вторичного хинонного акцептора Q_B с образованием $Q_B H_2$ ($\tau = 400$ мкс) [6]. Относительный вклад кинетических стадий С2, С1, А и В в суммарный электрогенез составлял 5, 15, 70 и 10% соответственно (рис. 2). Полученные результаты показывают, что относительный вклад электрогенных стадий возрастает в центральной гидрофобной области белка и снижается на периферических участках.

Первые данные рентгеноструктурного анализа РЦ из *Bl. viridis*, доступные к моменту этих исследований [23, 24], позволили сопоставить амплитуды наблюдаемых стадий генерации $\Delta\psi$ с расстояниями между соответствующими редокс-кофакторами. Такое сопоставление показало, что относительный вклад реакций переноса заряда в суммарный электрогенез определяется не только расстояниями между редокс-кофакторами, но и диэлектрическими свойствами соответствующих участков белка [6]. Это наблюдение продемонстрировано на рис. 2, где указаны проекции расстояний между цитохромными гемами c_{556} и c_{559} , c_{559} и P_{960} , P_{960} и Q_A , а также между Q_B и ближайшей границей белок/вода на нормаль к плоскости мембраны, определенные на основании более поздней публикации [28]. Указанные расстояния составляли соответственно 27, 22, 29 и 22% от проекции расстояния между гемом c_{556} и ближайшей границей белок/вода на акцепторном участке белковой глобулы комплекса РЦ. Видно, например, что векторный перенос электрона от P_{960} к Q_A на участке белка внутри гидрофобной области, соответствующей центральной части мембраны, вносит существенно больший вклад в электрогенез, чем перенос электрона на сходное расстояние между гемами c_{556} и c_{559} , расположенными в области белковой глобулы, выступающей из мембраны в водную фазу.

В заключение отметим, что рассмотренные в данном обзоре работы 1985–1988 гг., выполненные в сотрудничестве с А.А. Константиновым, выявили важные аспекты механизмов электро-

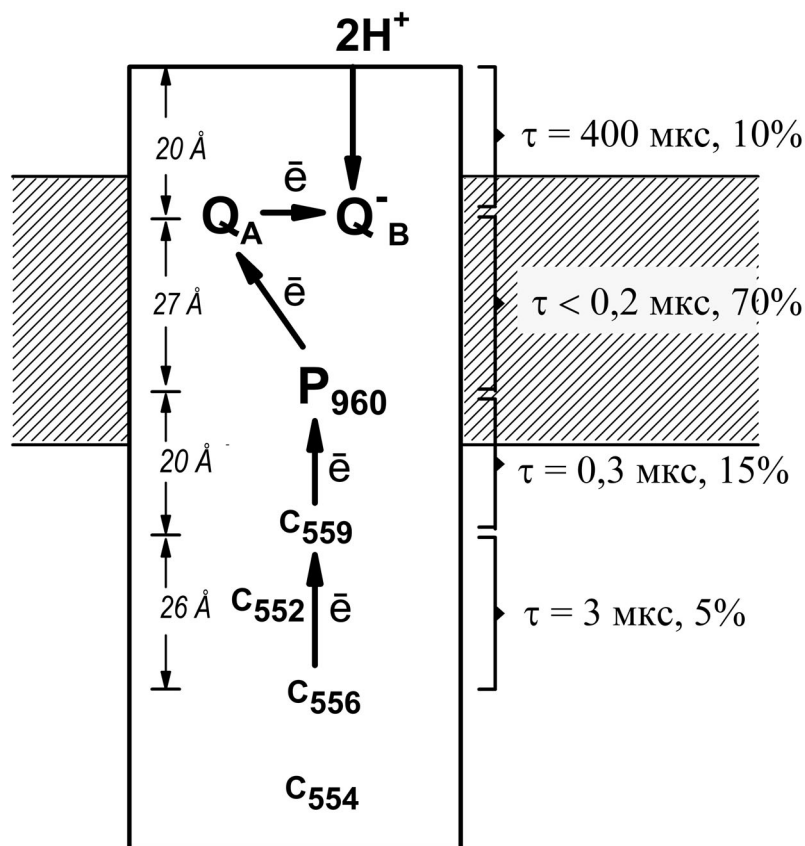


Рис. 2. Схема электрогенных реакций в РЦ из *Bl. viridis*. Справа указаны относительные вклады в суммарный электрогенез (% $\Delta\psi$) и характерные времена (τ) отдельных реакций переноса электрона; слева – проекции расстояний между редокс-кофакторами на нормаль к плоскости мембраны

генных реакций в фотосинтетических РЦ из пурпурных бактерий *R. rubrum*, *Rba. sphaeroides* и *Bl. viridis*. Многие особенности электрогенеза и реакций электронного транспорта в бактериальных РЦ были описаны впервые. С высоким разрешением исследована кинетика электрогенного переноса электрона между растворимым цит *c* и комплексом бактериального РЦ. Было показано, что электрогенез, связанный с восстановлением фотоокисленного P_{870} от цит *c* и искусственных редокс-красителей, обусловлен переносом электрона внутри белкового комплекса РЦ, а также выявлен электрогенный характер протонирования дважды восстановленного вторичного хинонного акцептора Q_B . При исследовании РЦ из *Bl. viridis* были определены спектральные и окислительно-восстановительные характеристики четырех гемов прочносвязанного цит *c*, измерены скорости восстановления P_{960} и переноса электрона между гемами, а также зарегистрированы стадии электрогенеза, связанные с электрон-транспортными реакциями в этом пигмент-белковом комплексе. Сопоставление

относительных вкладов отдельных стадий переноса зарядов в суммарный электрогенез с проекциями расстояний между редокс-кофакторами на нормаль к плоскости мембраны позволило сделать вывод о неоднородности диэлектрической проницаемости внутри белка РЦ.

Александр Константинов сыграл неограничиваемую роль в выполнении рассмотренных в настоящем обзоре исследований. Он был крупнейшим ученым, настоящим профессионалом, ценил красоту научного эксперимента, обладал блестящей интуицией. Стиль его работы характеризовался широтой научной проблематики, четкостью постановки задач, продуманностью экспериментов, включающей тщательный подбор оптимальных экспериментальных условий. Это делало научные результаты ясными и эффектными. Работать с ним было интересно. При участии А.А. Константинова, часто – при его непосредственном руководстве, были выполнены и защищены кандидатские диссертации И.А. Смирновой, С.М. Драчевой, О.П. Каминской, Д.Л. Заславского, С.А. Силецкого, связанные с

использованием прямого электрометрического метода для изучения электрогенеза мембранных белков митохондрий и реакционных центров фотосинтезирующих бактерий.

Коллеги и сотрудники навсегда сохраняют светлую память об Александре Константинове.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1985) Electrogenic reduction of *Rhodospirillum rubrum* reaction centre bacteriochlorophyll P870⁺ by redox dyes. Indication of intraprotein electron transfer, *FEBS Lett.*, **189**, 45-49.
- Kaminskaya, O. P., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1986) Electrogenic reduction of the secondary quinone acceptor in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. Rapid kinetic measurements, *FEBS Lett.*, **2**, 224-228.
- Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Kotova, E. A., Mamedov, M. D., et al. (1986) The effect of cytochrome c, hexaammineruthenium and ubiquinone-10 on the kinetics of photoelectric responses of *Rhodospirillum rubrum* reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta*, **848**, 137-146.
- Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Mamedov, M. D., Samuilov, V. D., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1986) Effects of electron donors and acceptors on the kinetics of the photoelectric responses in *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 1-9.
- Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Zaberezhnaya, S. M., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1986) Spectral, redox and kinetic characteristics of high-potential cytochrome c hemes in *Rhodopseudomonas viridis* reaction centers, *FEBS Lett.*, **205**, 41-46.
- Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., Skulachev, V. P., et al. (1988) Electrogenic steps in the redox reactions catalysed by photosynthetic reaction centre complex from *Rhodopseudomonas viridis*, *Eur. J. Biochem.*, **171**, 253-264.
- Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., et al. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324.
- Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Liberman, E. A., Ostroumov, S. A., et al. (1976) Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059-7065.
- Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Samuilov, V. D., et al. (1976) Generation of electric current by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* and reconstitution of electrogenic function in subchromatophore pigment-protein complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 637-660.
- Smirnova, I. A., Konstantinov, A. A., and Skulachev, V. P. (1981) Role of cofactors in the formation of the membrane potential by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*, incorporated into a Teflon filter, *Biochemistry (Moscow)*, **46**, 925-934.
- Drachev, L. A., Dracheva, S. M., Samuilov, V. D., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1984) Photoelectric effects in bacterial chromatophores. Comparison of spectral and direct electrometric methods, *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 257-262.
- Драчев Л. А., Семенов А. Ю., Скулачев В. П. (1979) Генерация разности электрических потенциалов хроматофорами, индуцируемая лазерной вспышкой, *Доклады АН СССР*, **245**, 991-994.
- Drachev, L. A., Semenov, A. Yu., Skulachev, V. P., Smirnova, I. A., Chamorovsky, S. K., et al. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 483-489.
- Семенов А. Ю., Чаморовский С. К., Смирнова И. А., Драчев Л. А., Кононенко А. А., Успенская Н. Я., Рубин А. Б., Скулачев В. П. (1981) Кинетика образования фотоиндуцируемой разности электрических потенциалов хроматофорами фотосинтезирующих бактерий, *Молекулярная биология*, **15**, 622-635.
- Chamorovsky, S. K., Drachev, L. A., Karagulian, A. K., Kononenko, A. A., Rubin, A. B., et al. (1985) Fast phases of the generation of the transmembrane electric potential in chromatophores of the photosynthetic bacterium *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, *Biochim. Biophys. Acta*, **808**, 201-208.
- Packham, N. K., Dutton, P. L., and Mueller, P. (1982) Photoelectric currents across planar bilayer membranes containing bacterial reaction centers. Response under conditions of single electron turnover, *Biophys. J.*, **37**, 465-473.
- Drachev, L. A., Mamedov, M. D., Mulkidjanian, A. Ya., Semenov, A. Yu., Shinkarev, V. P., and Verkhovskiy, M. I. (1990) Electrogenesis associated with proton transfer in the reaction center protein of the purple bacterium, *FEBS Lett.*, **259**, 324-326.
- Wright, C. A. (1979) Electron acceptors of bacterial photosynthetic reaction centers II. H⁺ binding coupled to secondary electron transfer in the quinone acceptor complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **548**, 309-327.
- Vermeglio, A. (1982) Electron transfer between primary and secondary electron acceptors in chromatophores and reaction centers of photosynthetic bacteria, in: *Function of quinones in energy conserving systems* (Trumpower, B. L., ed.), Academic Press, New York, pp. 169-180.
- Petty, K. M., and Dutton, P. L. (1976) Properties of the flash-induced proton binding encountered in membranes of *Rhodopseudomonas sphaeroides*: a functional pK on the ubisemiquinone? *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 335-345.
- Sebban, P., Maroti, P., and Hanson, D. K. (1995) Electron and proton transfer to the quinones in bacterial photosynthetic reaction centers: insight from combined approaches of molecular genetics and biophysics, *Biochimie*, **77**, 677-694.
- Okamura, M. Y., Paddock, M. L., Graige, M. S., and Feher, G. (2000) Proton and electron transfer in bacterial reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 148-163.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex: electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodopseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.*, **180**, 385-398.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the

- photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution, *Nature*, **318**, 618-624.
25. Clayton, R. K., and Clayton, B. J. (1978) Molar extinction coefficients and other properties of an improved reaction center preparation from *Rhodospseudomonas viridis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 478-487.
 26. Case, G. D., Parson, W. W., and Thornber, J. P. (1970) Photooxidation of cytochromes in reaction center preparations from *Chromatium* and *Rhodospseudomonas viridis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **223**, 122-128.
 27. Weyer, K. A., Lottspeich, F., Gruenberg, H., Lang, F., Oesterhelt, D., and Michel, H. (1987) Amino acid sequence of the cytochrome subunit of the photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*, *EMBO J.*, **6**, 2197-2202.
 28. Deisenhofer, J., Epp, O., Sinning, I., and Michel, H. (1995) Crystallographic refinement at 2.3 Å resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.*, **246**, 429-457.

THE MECHANISMS OF ELECTROGENIC REACTIONS IN BACTERIAL PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTERS: STUDIES IN COLLABORATION WITH ALEXANDER KONSTANTINOV

Mini-review

O. P. Kaminskaya¹ and A. Yu. Semenov^{2,3*}

¹ *Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region*

² *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; E-mail: semenov@belozersky.msu.ru*

³ *Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

In this review, we discuss our studies conducted in 1985-1988 in collaboration with A. A. Konstantinov, one of the top scientists in the field of membrane bioenergetics. Studying fast kinetics of membrane potential generation in photosynthetic reaction centers (RCs) of purple bacteria in response to a laser flash has made it possible to examine in detail the mechanisms of electrogenic reactions at the donor and acceptor sites of RCs. Electrogenesis associated with the intraprotein electron transfer from the exogenous secondary donors, redox dyes, and soluble cytochrome (cyt) *c* to the photooxidized dimer of bacteriochlorophyll P₈₇₀ was studied using proteoliposomes containing RCs from the non-sulfur purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. It was found that reduction of the secondary quinone electron acceptor Q_B accompanied by its protonation in the chromatophores from *R. rubrum* in response to every second light flash was electrogenic. Spectral characteristics and redox potentials of the four hemes in the tightly bound cyt *c* in the RC of *Blastochloris viridis* and electrogenic reactions associated with the electron transfer within the RC complex were identified. For the first time, relative amplitudes of the membrane potential generated in the course of individual electrogenic reactions were compared with the distances between the redox cofactors determined based on the three-dimensional structure of the *Bl. viridis* RC.

Keywords: bacterial photosynthetic reaction centers, electron transfer, direct electrometric method, membrane potential, cytochrome *c*, quinone