

## О МЕХАНИЗМЕ СЕЛЕКТИВНОГО ХИМИЧЕСКОГО ЗАМЕЩЕНИЯ БАКТЕРИОФЕОФИТИНОВ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ *Rhodobacter sphaeroides* R-26

© 2022 А.А. Забелин\*, В.Б. Ковалев, А.Я. Шкуропатов

ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт фундаментальных проблем биологии РАН,  
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: zabelin.bio@gmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2022

После доработки 11.07.2022

Принята к публикации 10.08.2022

С целью выяснения механизма сайт-селективного химического замещения хромофоров в реакционных центрах (РЦ) фотосинтетических бактерий внешними пигментами исследована эффективность встраивания растительного феофитина *a* (Фео) в сайты связывания молекул бактериофеофитина *a* (БФео) в изолированных РЦ *Rhodobacter sphaeroides* R-26 в зависимости от температуры среды инкубации, агрегационного состояния Фео и присутствия органического растворителя (аcetона). Степень селективного замещения фотохимически неактивных молекул БФео Н<sub>В</sub> составляла ~15% при инкубации смеси РЦ/Фео при 5 °С в условиях, когда Фео находился в водно-детергентной среде инкубации в виде мономеров в составе свободных мицелл детергентов. Эффективность замещения увеличивалась до 40% при инкубации при 25 °С и составляла при этой температуре около 100%, если в среду инкубации добавлялся 10%-ный ацетон. Степень пигментного замещения была примерно в 2 раза выше при обеих температурах, когда в качестве инкубационной среды использовалась смесь мономеров и димеров Фео в присутствии 10%-ного аcetона. Удаление аcetона из такой среды с сохранением пигментных форм приводило к значительному снижению эффективности встраивания Фео. Влияние аcetона на пигментное замещение наблюдалось также при повышенной температуре инкубации (43,5 °С), когда частично замещались функционально активные молекулы БФео Н<sub>А</sub>. Результаты обсуждаются в рамках механизма, согласно которому (1) температурно-зависимые внутренние движения белка РЦ являются фактором, облегчающим высвобождение молекулы БФео из сайта связывания и одновременное внедрение молекулы Фео в тот же сайт в сопряжённом процессе, (2) роль температурного фактора в значительной степени зависит от стерической доступности связывающих белковых карманов, (3) встраивание Фео происходит из пула мономерных молекул, включённых в мицеллы РЦ-детергент, (4) присутствие аcetона в среде инкубации облегчает обмен мономерными молекулами Фео между мицеллами в растворе и детергентным поясом РЦ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** реакционный центр, (бактерио)феофитин, сайт связывания, химическое замещение, мицеллы детергента, *Rhodobacter sphaeroides*.

DOI: 10.31857/S0320972522100074, EDN: BCEFCU

### ВВЕДЕНИЕ

Фотохимические реакционные центры (РЦ) фотосинтеза представляют собой трансмембранные пигмент-белковые комплексы, в которых энергия квантов света, поглощённых пигментами, с помощью каскада реакций пере-

носа электрона преобразуется в биохимически доступную энергию разделённых зарядов [1]. Широкий временной интервал реакций переноса электрона (от пикосекунд до сотен микросекунд) и наличие пространственной структуры с атомным разрешением делают РЦ удобной моделью как для исследования механизма фо-

Принятые сокращения: ΔA – изменение поглощения; БФео – бактериофеофитин *a*; БХл – бактериохлорофилл *a*; ЛДАО – *N,N*-диметилдодециламино-*N*-оксид; РЦ – реакционный центр; ТХ100 – Triton X-100; Фео – феофитин *a*; В<sub>А</sub> и В<sub>В</sub> – мономерные молекулы БХл в А- и В-ветви кофакторов соответственно; Н<sub>А</sub> и Н<sub>В</sub> – молекулы БФео в А- и В-ветви кофакторов соответственно; Р – первичный донор электрона, димер молекул БХл; Q<sub>А</sub> и Q<sub>В</sub> – первичный и вторичный убихиноновый акцептор соответственно.

\* Адресат для корреспонденции.

тосинтеза, так и для тестирования теорий переноса электрона в молекулярных системах. Высокий (практически 100%-ный) квантовый выход разделения зарядов в РЦ обуславливает также активное применение РЦ при разработке искусственных гибридных преобразователей световой энергии [2, 3].

РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* R-26 состоит из трёх белковых субъединиц (L, M и H), две из которых (L и M) формируют сайты связывания кофакторов: димера молекул бактериохлорофилла *a* (БХл), служащего первичным донором электрона (P), двух мономерных молекул БХл ( $V_A$  и  $V_B$ ), двух молекул бактериофеофитина *a* (БФео;  $H_A$  и  $H_B$ ) и двух молекул убихинона ( $Q_A$  и  $Q_B$ ). Кофакторы организованы в две квазисимметричные ветви (A и B), из которых только одна ветвь (P- $V_A$ - $H_A$ - $Q_A$ - $Q_B$ ) участвует в фотоиндуцированном переносе электрона. Исследования реакций электронного переноса в нативных РЦ наталкиваются на ряд существенных трудностей, связанных с сильным перекрыванием полос поглощения индивидуальных пигментов и наличием экситонных взаимодействий между их оптическими переходами. Особенно остро эта проблема проявляется в случае РЦ оксигенного фотосинтеза (см., например, [4]). Кроме того, сверхвысокие скорости переноса электрона на ранних стадиях процесса фотосинтетического разделения зарядов осложняют идентификацию вовлечённых интермедиатов. Эффективным подходом к преодолению этих затруднений является внесение в структуру и пигментный состав РЦ контролируемых точечных изменений с последующим анализом их спектральных и функциональных последствий. В настоящее время известны несколько способов изменения состава пигментных кофакторов в РЦ фотосинтеза, включая сайт-направленный мутагенез [5], генетическую модификацию путей биосинтеза пигментов [5, 6], выращивание цианобактерий на дальнем красном свете [7], обработку борогидридом натрия [8], экстракцию с помощью Си-аффинной хроматографии [9] и химическое замещение хромофоров [10, 11]. Сайт-направленный мутагенез бактериальных РЦ был с успехом использован для встраивания БХл в сайты связывания БФео и, наоборот, за счёт введения/удаления лиганда к центральному атому Mg пигмента [5]. Более многообразные возможности в этом отношении предоставляет метод сайт-направленного химического замещения хромофоров [10, 11]. С помощью этого подхода редокс-потенциал отдельного специфического кофактора может быть селективно изменён без влияния на дру-

гие кофакторы [12, 13], и широкий интервал величин свободной энергии состояний может быть перекрыт за счёт введения в сайты связывания хромофоров РЦ чужеродных пигментов. В частности, такой подход был с успехом применён для решения долгое время существовавшей проблемы механизма участия мономерного БХл  $V_A$  в разделении зарядов в РЦ пурпурных бактерий [14–18]. Из-за ультракороткого времени жизни состояния  $P^+V_A^-$  и, как следствие, низкой степени его заселённости это состояние не удавалось надёжно зарегистрировать в нативных РЦ даже с использованием фемтосекундной оптической спектроскопии. Замещение БФео на Фео в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 позволило изменить взаимное положение уровней свободной энергии состояний  $P^+V_A^-$  и  $P^+H_A^-$  и значительно увеличить время жизни  $P^+V_A^-$ . На этой основе были получены прямые доказательства в пользу общепринятого в настоящее время двухступенчатого механизма первичного разделения зарядов в РЦ пурпурных бактерий с участием молекулы  $V_A$  в качестве первичного акцептора электрона. Возможность манипулирования уровнями энергии состояний с помощью замещения хромофоров также представляет интерес в связи с поиском способов увеличения эффективности сопряжения разделения зарядов внутри РЦ с переносом электрона на проводящие подложки [19].

Ранее было показано, что пигментное замещение является сложным процессом, зависящим от ряда факторов, включая структуру, аминокислотный состав и стерическую доступность связывающего белкового кармана РЦ, природу боковых заместителей и гибкость макроцикла модифицированного пигмента, наличие в пигментной молекуле центрального атома Mg [10, 11]. Однако детальный механизм химического замещения пигментов в РЦ остаётся ещё не полностью выясненным. В частности, было предположено, что замещение нативных пигментов в сайтах связывания мономерных молекул БХл и БФео в РЦ пурпурных бактерий происходит при нагревании РЦ-комплексов до температуры, близкой к «точке плавления», когда амплитуда движений белка увеличивается, обеспечивая доступ экзогенным пигментам к внутренним областям РЦ [10, 11]. Позднее, однако, было показано, что замещение БФео на растительный феофитин *a* (Фео) в неактивной В-ветви РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 может происходить с высокой эффективностью уже при комнатной температуре [20]. Недавно была продемонстрирована возможность селективного замещения при комнатной температуре функционально активного БФео  $H_A$

молекулами Фео и [3-ацетил]-Фео в РЦ зелёной нитчатой фототрофной бактерии *Chloroflexus aurantiacus* [21]. Исходя из склонности (бактерии) хлоринов агрегировать в детергентных растворах [22, 23], ранее предполагалось, что свободные пигменты присутствуют в средах замещения не в мономерной форме [10]. Однако экспериментальные данные о состоянии внешних пигментов, вовлечённых в процесс замещения, в литературе отсутствуют.

Данная работа посвящена анализу влияния температуры инкубации и агрегационного состояния внешнего пигмента на процесс химического замещения молекул БФео на Фео в изолированных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26. Показано также, что степень пигментного замещения зависит от присутствия/отсутствия в среде инкубации молекул органического растворителя (ацетона).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 были выделены обработкой мембран детергентом *N,N*-диметилдодециламино-*N*-оксидом (ЛДАО) с последующей очисткой методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [24]. Пигментное замещение проводили в ТЛ-буфере [10 mM Tris-HCl (pH 8)/0,1% (v/v) ЛДАО]. Для экспериментов по фотонакоплению  $H_A^-$  РЦ были переведены в ТТ-буфер [10 mM Tris-HCl (pH 8)/0,1% (m/v) Triton X-100 (TX100)] путём замены детергента ЛДАО на TX100 на мембране 30 кДа («Millipore», США) в ячейке для ультрафильтрации под давлением газообразного аргона. Фео был получен экстракцией из листьев крапивы и очищен методом колоночной хроматографии на сахарной пудре [25].

Реакцию химического замещения проводили по методике, основанной на инкубации изолированных РЦ в присутствии избытка экзогенно добавленного модифицированного пигмента [10, 15, 20, 21, 26, 27]. Были проведены два типа экспериментов, которые отличались способом внесения экзогенного Фео в инкубационную смесь: из плёнки с TX100 в отсутствие ацетона (способ 1) или в виде ацетонового раствора (способ 2). По способу 1, Фео растворяли в ацетоне, содержащем 2%-ный TX100 (m/v). Затем ацетон полностью испаряли, формируя твёрдую пигментную плёнку, которую растворяли в ТЛ-буфере, получая, таким образом, раствор Фео в ТЛ-буфере [10 mM Tris-HCl (pH 8)/0,1% ЛДАО/0,1% TX100] без ацетона. По способу 2, раствор Фео в ацетоне добавляли к ТЛ-буферу до конечной концентрации ацето-

на, не превышающей 10%. В полученные обоими способами растворы Фео с детергентами добавляли концентрированный раствор РЦ в ТЛ-буфере (объём не превышал 10% от общего объёма смеси инкубации) таким образом, чтобы в смеси РЦ + Фео получить конечную концентрацию РЦ, равную 8 мкМ, и 15-кратный молярный избыток пигмента. (В исследованиях, выполненных ранее, обычно использовался способ, при котором раствор Фео в ацетоне добавлялся непосредственно к раствору РЦ в ТЛ-буфере [10, 15, 20, 21, 26, 27].) Смеси РЦ + Фео инкубировали в темноте в термостате Haake DC30-K20 («Thermo Fisher Scientific», США) при 5 °С или 25 °С в течение 6 ч или при 43,5 °С в течение 1 ч. Свободные пигменты удаляли в ходе последующей очистки модифицированных препаратов методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

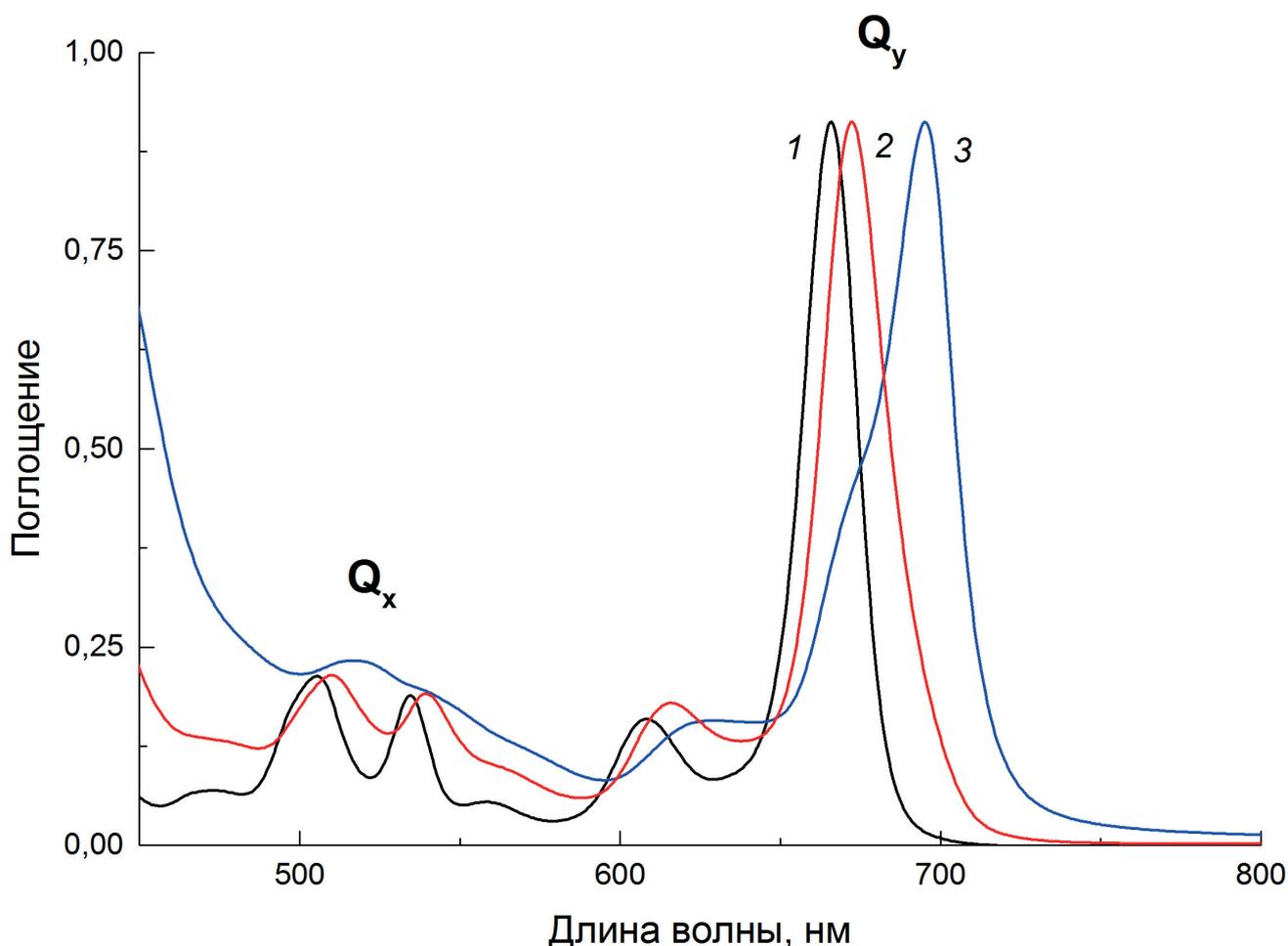
Спектры поглощения измеряли на спектрофотометрах UV-1800 («Shimadzu», Япония) и Agilent 8453 («Agilent», США). Для разложения спектров поглощения нативных и Фео-модифицированных РЦ на гауссовы полосы использовали процедуру минимизации методом наименьших квадратов в программе Origin. При анализе использовали минимальное количество спектральных компонентов, совокупность которых удовлетворительно описывала экспериментальные спектры поглощения.

Разностные (свет-минус-темнота) спектры фотонакопления бактериофеофитинового акцептора электрона  $H_A^-$  в восстановленном состоянии ( $H_A^-$ ) измеряли при освещении РЦ в ТТ-буфере в анаэробных условиях в присутствии красителей индиготетрасульфоната калия (0,1 mM) и нейтрального красного (0,1 mM) в качестве редокс-медиаторов и дитионита натрия (4 mM) в качестве восстановителя, как описано в работе [28].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 показаны нормированные спектры поглощения Фео в ацетоне и в мицеллярных буферных растворах, которые были использованы в работе в качестве инкубационных сред при получении Фео-модифицированных РЦ.

Спектр поглощения Фео в ацетоне (кривая 1), измеренный при концентрации ~1 mM, использованной в экспериментах, хорошо согласуется со спектрами мономерной формы пигмента [29, 30], показывая интенсивную  $Q_y$  (0-0) полосу при 667 нм и более слабую вибронную полосу  $Q_y$  (0-1) при 608 нм, а также две полосы с максимумами при 534 и 505 нм,

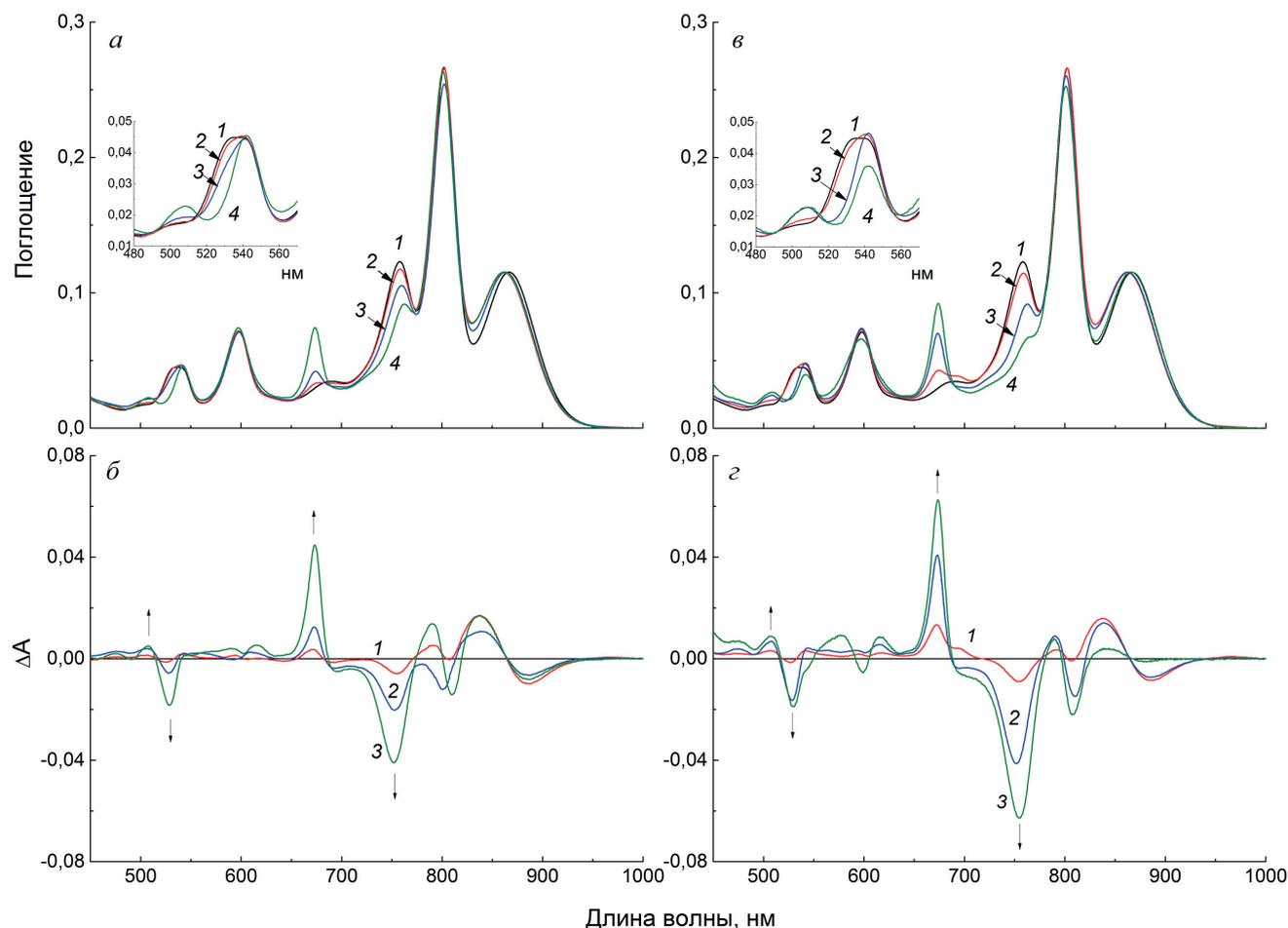


**Рис. 1.** Спектры поглощения Фео в ацетоне (1), в TLT-буфере без ацетона (2) и в TL-буфере в присутствии 10%-ного ацетона (3). Спектры измерены в области  $Q_x$  и  $Q_y$  переходов пигментов и нормированы друг к другу в максимуме  $Q_y$  полосы поглощения при 667, 672 и 695 нм соответственно

отнесённые к  $Q_x$  (0-0) и  $Q_x$  (0-1) переходам соответственно. Введение Фео через стадию сухой плёнки в водный TLT-буфер (способ 1) не оказывает значительного влияния на форму спектра поглощения пигмента (кривая 2) за исключением некоторого уширения и небольшого длинноволнового сдвига (на 5 нм до 672 нм)  $Q_y$  (0-0) полосы поглощения по сравнению со спектром в ацетоне. Аналогичные спектральные изменения характерны также для других полос поглощения Фео в спектре 2. Эти данные показывают, что Фео в TLT-буфере находится в основном в форме мономеров. Наблюдаемые минорные спектральные различия по отношению к ацетоновому раствору индуцированы, вероятно, изменением окружения мономерных молекул Фео при ассоциации их с мицеллами ЛДАО и TX100. Спектр поглощения Фео, введённого в водный TL-буфер из раствора в ацетоне (способ 2), содержит плечо при ~672 нм (кривая 3), показывая, что часть пигмента в этой среде также находится в мономерной

форме, ассоциированной с мицеллами ЛДАО. Однако в этом случае в спектре присутствует также интенсивная  $Q_y$  (0-0) полоса при 695 нм, приписываемая димерам Фео, в которых макроциклы молекул пигмента участвуют в  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействиях [29–34]. Агрегация пигментных молекул сопровождается модификацией также других полос поглощения Фео (кривая 3).

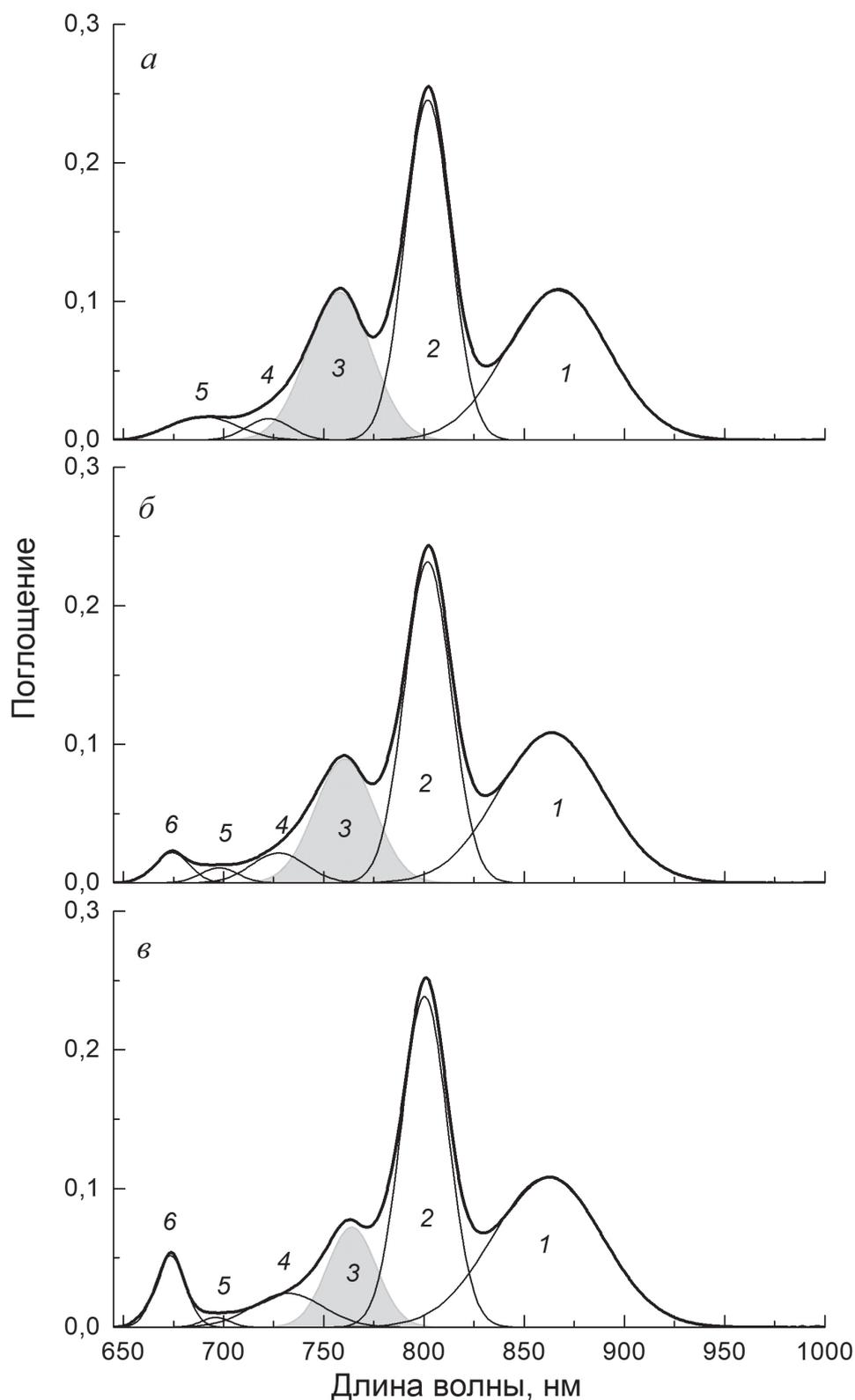
На рис. 2, а показаны нормированные спектры поглощения нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 (кривая 1) и РЦ после инкубации с Фео в TLT-буфере в отсутствие ацетона при 5 °С (кривая 2), 25 °С (кривая 3) и 43,5 °С (кривая 4). Спектр поглощения нативных РЦ соответствует спектрам, известным в литературе. В области  $Q_y$  переходов пигментов наиболее характерные изменения в спектрах поглощения РЦ, инкубированных с Фео при повышающихся температурах, включают постепенное уменьшение полосы поглощения молекул БФео  $H_A$  и  $H_B$  при 758 нм и параллельное появление/



**Рис. 2.** Спектры поглощения нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 (1) и РЦ, инкубированных с Фео при 5 °С (2), 25 °С (3) и 43,5 °С (4) в TLT-буфере (а) и в TL-буфере (б). Спектры измерены в области  $Q_x$  и  $Q_y$  переходов пигментов и нормированы в максимуме длинноволновой  $Q_y$  полосы первичного донора электрона Р при 864–867 нм. На вставках к панелям а и б в увеличенном масштабе показана область  $Q_x$  полос поглощения молекул (Б)Фео; кривые совмещены при 490 нм. б и з – Разностные спектры «РЦ, инкубированные при 5 °С-минус-нативные РЦ» (1), «РЦ, инкубированные при 25 °С-минус-нативные РЦ» (2) и «РЦ, инкубированные при 43,5 °С-минус-нативные РЦ» (3), полученные из спектров поглощения, представленных на панелях а и б соответственно. Стрелки показывают направление абсорбционных изменений

увеличение  $Q_y$  (0-0) полосы Фео при 674 нм. Эти данные свидетельствуют об уходе из модифицированных РЦ части нативных молекул БФео и одновременном встраивании в освобождаемые места связывания внешних молекул Фео вследствие процесса пигментного замещения. Наблюдаемые абсорбционные изменения особенно отчётливо видны в разностных спектрах (рис. 2, б), полученных вычитанием спектра поглощения нативных РЦ из спектров поглощения Фео-замещённых РЦ. В частности, в разностном спектре «РЦ, инкубированные при 43,5 °С-минус-нативные РЦ» разрешается вибронная полоса  $Q_y$  (0-1) при 613 нм, принадлежащая молекулам Фео, внедрившимся в структуру РЦ. Из сравнения разностных спектров также хорошо видно, что частичная замена БФео на Фео имеет место уже при 5 °С.

Вставка к рис. 2, а показывает, что в области  $Q_x$  переходов молекул (Б)Фео инкубация РЦ с Фео в TLT-буфере при 25 °С (кривая 3) приводит к частичному уменьшению поглощения на коротковолновой стороне широкой  $Q_x$ (0-0) полосы нативных РЦ при ~535 нм, принадлежащей перекрывающимся вкладкам от молекул БФео  $H_A$  и  $H_B$ , и к развитию вибронной полосы при 510 нм. Этот факт вместе с присутствием в разностном спектре «РЦ, инкубированные при 25 °С-минус-нативные РЦ» (рис. 2, б, кривая 2) отрицательной полосы при 527 нм и положительной полосы при 510 нм указывает на селективное замещение в этих условиях части молекул БФео  $H_B$  в неактивной ветви кофакторов РЦ [20]. Аналогичные спектральные изменения меньшей амплитуды можно также различить на рис. 2, а (вставка, кривая 2) и рис. 2, б (кривая 1) для РЦ, инкубированных с Фео при 5 °С.



**Рис. 3.** Результаты разложения на гауссовы компоненты спектров поглощения РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 в области 645–1000 нм: нативные (а), инкубированные с Фео в ТЛТ-буфере при 25 °С (б) и при 43,5 °С (в). Спектры, показанные утолщёнными линиями, представляют собой спектры поглощения из рис. 2, а, из каждого из которых была вычтена соответствующая базовая линия в виде прямой линии, соединяющей точки спектра при 645 и 950 нм. Тонкими линиями показаны гауссовы компоненты. Полуширины гауссовых компонентов (полуширина на полувысоте) для полос БХл Р (кривые 1) и БХл В<sub>А/В</sub> (кривые 2) были примерно одинаковыми для всех образцов (60–63 нм для Р и 27–28 нм для В<sub>А/В</sub>). Полуширина компонента для БФео Н<sub>А/В</sub> (кривые 3, закрашенные серым цветом) уменьшалась с увеличением степени пигментного замещения с 38 до 30 нм в связи с необходимостью учёта асимметрии полосы [20]. Компоненты 4 и 5 обусловлены фоновым поглощением РЦ. Компонент 6 представляет полосу поглощения инкорпорированных молекул Фео

Степень замещения БФео на Фео в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 в зависимости от температуры среды инкубации и способа введения молекул Фео в среду

Температура, °С	Фео в ТЛТ-буфере без ацетона (способ 1)	Фео в смеси ТЛ-буфер + 10%-ный ацетон (способ 2)
5	7%	12%
25	20% (52%*)	51% (26%**)
43,5	48%	70%

Примечание. Степень замещения оценивалась по уменьшению площади полосы БФео при 760 нм в спектрах поглощения Фео-замещённых РЦ относительно площади аналогичной полосы в спектре нативных РЦ (см. рис. 3). Точность оценки составляла  $\pm 5\%$ .

\* После добавки 10%-ного ацетона.

\*\* После удаления 10%-ного ацетона.

Амплитуда таких изменений значительно возрастает после инкубации при 43,5 °С, когда пигментному замещению подвергается основная часть молекул БФео в сайте  $H_B$ . В этом случае в спектре поглощения (рис. 2, а, вставка, кривая 4) наблюдаются  $Q_x(0-1)$  полоса Фео<sub>В</sub>

при 510 нм и  $Q_x(0-0)$  полоса при 545 нм, включающая в основном вклады от молекул Фео<sub>В</sub> и БФео<sub>А</sub>, а также, возможно, в небольшой степени от молекулы Фео<sub>А</sub>.

Для того чтобы количественно оценить степень замещения молекул БФео на Фео в ТЛТ-буфере, спектры поглощения нативных и Фео-модифицированных РЦ из рис. 2, а разлагали на гауссовы полосы в области  $Q_y$  переходов пигментов (645–1000 нм) (рис. 3).

Используя отношения площадей (интегрированного поглощения) под кривыми 3 для модифицированных препаратов к площади под кривой 3 для нативных РЦ в качестве меры замещаемости пигментов в сайтах  $H_A$  и  $H_B$ , из рис. 3 было определено, что 20% и 48% молекул БФео были заменены на Фео после инкубации при 25 °С и 43,5 °С соответственно (таблица). Степень пигментного замещения после инкубации при 5 °С (данные не представлены на рис. 3) составляла 7% (таблица). Учитывая, что отношение площадей на рис. 3 даёт суммарную оценку степени замещения молекул БФео в сайтах связывания  $H_A$  и  $H_B$ , а в ТЛТ-буфере замещению подвергаются главным образом молекулы в сайте  $H_B$  (рис. 2, а и б), степень селективного замещения БФео  $H_B$  на Фео при 5 °С,

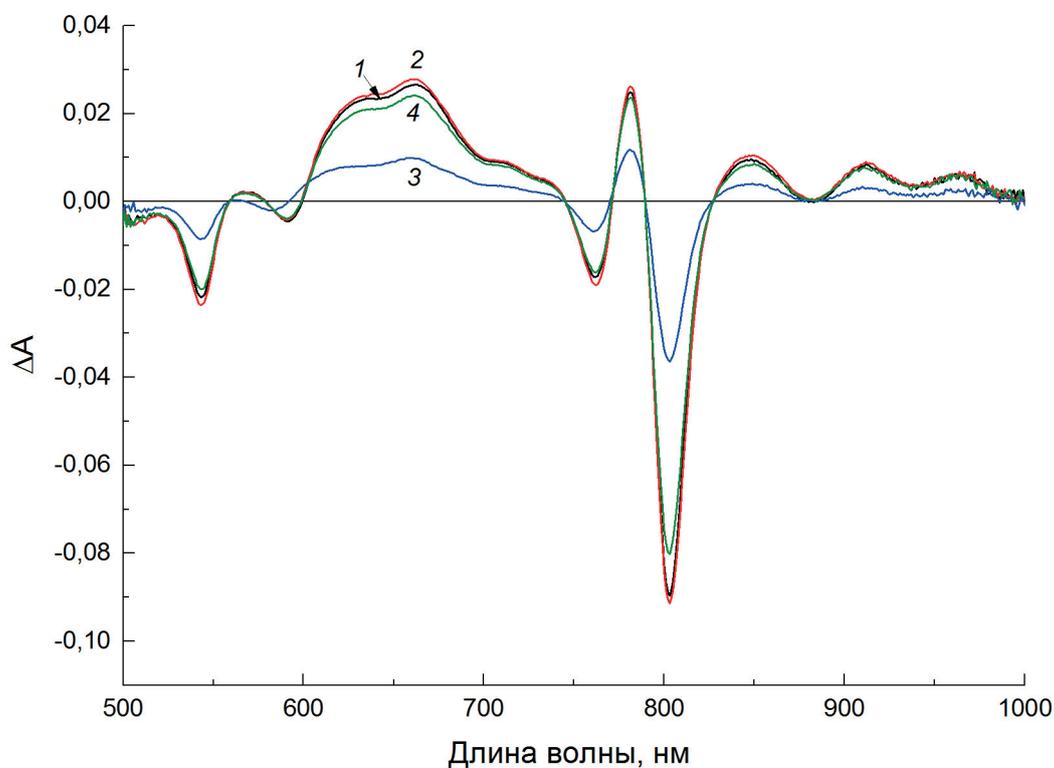


Рис. 4. Разностные (свет-минус-темнота) спектры  $H_A^-/H_A$  для нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 (1) и РЦ после инкубации с Фео в ТЛТ-буфере при 25 °С (2) и 43,5 °С (3). Кривая 4 представляет аналогичный разностный спектр для РЦ после инкубации с Фео в ТЛТ-буфере при 43,5 °С. Все разностные спектры получены для препаратов, имеющих одинаковое поглощение в максимуме  $Q_y$  полосы Р при 864–867 нм в исходных спектрах поглощения

25 °C и 43,5 °C может быть оценена как 14%, 40% и 96% соответственно. Однако в случае инкубации при 43,5 °C оценочное значение является, по-видимому, несколько завышенным, поскольку, как будет показано ниже (рис. 4), при этой температуре замещению подвергается также небольшая часть (~10%) молекул БФео в сайте  $H_A$ .

Нормированные спектры поглощения и разностные спектры, представленные на рис. 2, *в* и *г* соответственно, показывают, что инкубация РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 с Фео в ТЛ-буфере в присутствии 10%-ного ацетона при 5 °C, 25 °C и 43,5 °C приводит к спектральным изменениям, качественно сходным с теми, что наблюдаются при инкубации в ТЛТ-буфере в отсутствие ацетона (рис. 2, *а* и *б*). Однако замещение БФео на Фео в ТЛ-буфере было значительно более эффективным, чем в ТЛТ-буфере. Используя разложение спектров поглощения в области 645–1000 нм на гауссовы компоненты (рис. S1 Приложения), было определено, что суммарная степень пигментного замещения в ТЛ-буфере составляла 12%, 51% и 70% после инкубации при 5 °C, 25 °C и 43,5 °C соответственно (таблица). Исходя из этих данных, эффективность селективного замещения БФео  $H_B$  на Фео при 5 °C и 25 °C может быть оценена величинами 24% и около 100% соответственно, в то время как при 43,5 °C, наряду с преимущественным замещением в  $H_B$ -сайт, в значительной части модифицированных РЦ внешний Фео встраивается в сайт  $H_A$ .

Для более точной оценки степени замещения БФео на Фео в сайте  $H_A$  в обеих использованных буферных системах были проведены сравнительные исследования разностных (свет-минус-темнота) спектров  $H_A^-/H_A$  (рис. 4), отражающих селективное фотонакопление восстановленного БФео  $H_A^-$  при низких окислительно-восстановительных потенциалах среды [24, 35, 36].

Приведённый на рис. 4 (кривая 1) разностный спектр  $H_A^-/H_A$  для нативных РЦ хорошо соответствует спектрам фотонакопления  $H_A^-$ , ранее опубликованным для РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 [24, 35, 36], демонстрируя селективное выцветание  $Q_y$  и  $Q_x$  полос БФео  $H_A$  при 762 и 543 нм соответственно, появление характерных полос поглощения анион-радикала  $H_A^-$  при 660, 912 и 965 нм, а также электрохромный коротковолновый сдвиг и уменьшение дипольной силы полосы поглощения мономерных молекул БХл в области 800 нм. Из рис. 4 видно, что разностный спектр для Фео-модифицированных РЦ, полученных инкубацией в ТЛ-буфере

при 25 °C (кривая 2), практически идентичен по форме спектру для нативных РЦ и совпадает с ним по амплитуде. (Минорное различие по амплитуде между кривыми 1 и 2 находится в пределах ошибки измерений, которая составляла  $\pm 5\%$ .) Аналогичный результат был получен также для Фео-модифицированных РЦ после инкубации в ТЛТ-буфере при 25 °C (рис. S2 Приложения). Эти наблюдения подтверждают, что при инкубации при комнатной температуре внешний Фео замещает преимущественно неактивные молекулы БФео  $H_B$  при сохранении фотохимически активных молекул БФео  $H_A$ . После инкубации в ТЛ-буфере при 43,5 °C разностный спектр остаётся неизменным по форме, но значительно уменьшается по амплитуде (рис. 4, кривая 3), показывая, что в этих условиях молекулы Фео частично встраиваются также в сайт  $H_A$ , но, в отличие от нативного БФео, они не способны к фотонакоплению восстановленной формы ( $Фео_{A^-}$ ). Наиболее вероятной причиной этого эффекта является более отрицательный потенциал восстановления Фео по сравнению с БФео, что приводит к повышению уровня свободной энергии состояния  $Р^+Фео_{A^-}$  и к изменению энергетики процесса разделения зарядов в модифицированных РЦ (для более детального обсуждения и ссылок см. работу [21]). Из соотношения амплитуд абсорбционных изменений в разностных спектрах 3 и 1 в полосе анион-радикала  $H_A^-$  при 660 нм степень замещения БФео  $H_A$  после инкубации в ТЛ-буфере при 43,5 °C была оценена равной 60%. Аналогичное сравнение амплитуд абсорбционных изменений при 660 нм в разностных спектрах фотонакопления анион-радикала  $H_A^-$  в нативных РЦ и Фео-модифицированных РЦ, инкубированных в ТЛТ-буфере при 43,5 °C (рис. 4, кривые 1 и 4), показало ~10%-ное замещение БФео  $H_A$  на Фео.

В дополнительных экспериментах с инкубацией при 25 °C (спектры не показаны) было найдено, что добавка в ТЛТ-буфер 10%-ного ацетона увеличивала суммарную степень замещения БФео на Фео с 20% до 52% (таблица). Напротив, удаление из ТЛ-буфера 10%-ного ацетона путём выдерживания раствора (до внесения РЦ) на воздухе при комнатной температуре в течение суток со спектрофотометрическим контролем содержания ацетона приводило к уменьшению степени замещения с 51% до 26% (таблица). Этот результат показывает, что в описанных выше экспериментах роль ацетона как органического растворителя не ограничивалась введением гидрофобных молекул Фео в буферную водно-детергентную среду.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в работе данные показывают, что температура среды инкубации и агрегационная форма внешнего пигмента относятся к факторам, контролирующим возможность, селективность и эффективность химического замещения нативных хромофоров в БФео-содержащих белковых карманах РЦ *Rba. sphaeroides* R-26.

**Роль температуры среды инкубации.** Ранее Scheer и Struck [10] предположили, что для успешного протекания процесса химического замещения инкубационную смесь, содержащую РЦ с избытком модифицированного пигмента, необходимо нагреть до температуры, близкой к «точке плавления» РЦ (~42-43 °С). При этом происходит усиление внутренних движений белка, что обеспечивает условия для достижения равновесия между добавленным модифицированным пигментом и молекулами нативного пигмента, связанного с белком [11]. Результаты наших исследований подтверждают влияние температуры на эффективность пигментного замещения (рис. 2; таблица). Однако предполагаемый ранее «высокотемпературный» режим не является, очевидно, критически важным во всех случаях, поскольку эффективное замещение БФео  $H_B$  на Фео наблюдается уже при комнатной температуре [20] и, частично, уже при 5 °С (эта работа), то есть в условиях, когда белковая структура РЦ-комплекса сохраняется невозмущённой. В последнее время в многочисленных исследованиях было показано, что белки в их нормальном состоянии (например, при физиологических условиях) не обладают фиксированной структурой, флуктуируя между множеством конформационных состояний (для обзора см. [37, 38]). В работе [39] были теоретически проанализированы нормированные амплитуды и направления доминирующих мод, связанных с согласованными флуктуациями белкового матрикса в РЦ *Rba. sphaeroides*. Полученные нами данные указывают на то, что белковые движения, вовлечённые в процесс пигментного замещения в РЦ-комплексе, активированы уже при 5 °С, и их влияние на эффективность замещения возрастает при повышении температуры среды. Хотя детали процесса обмена пигментными молекулами остаются неясными, термоактивированные белковые движения в РЦ, по-видимому, способствуют (ассистируют) выходу нативного БФео из сайта связывания и одновременно встраиванию в тот же сайт внешнего Фео. Дальнейшие исследования с помощью комбинации экспериментальных и теоретических ме-

тодов, включая молекулярную динамику, нейтронное рассеяние и ЯМР [38, 40], потребуются для выяснения природы и характеристик таких движений. Вероятно, влияние температурного фактора на процесс замещения в значительной степени определяется степенью стерической доступности связывающего белкового кармана для внешнего пигмента. Вследствие этого молекула БФео, локализованная в относительно доступном сайте  $H_B$  в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 [21], эффективно замещается молекулой Фео уже при комнатной температуре ([20], эта работа). В то же время для встраивания молекулы Фео в стерически более заблокированный сайт  $H_A$  [21] требуются движения белка большей амплитуды, активируемые только при повышенных температурах [10, 15, 20, 27].

**Роль агрегационного состояния Фео.** Для эффективного осуществления предполагаемого выше сопряжённого процесса пигментного замещения экзогенный пигмент должен оказаться, очевидно, вблизи сайтов связывания  $H_A$  и  $H_B$ . Однако, поскольку эти сайты находятся в гидрофобной области РЦ-комплекса, окружённой «детергентным поясом» из молекул ЛДАО [41], возникают вопросы, каким образом такая ситуация реализуется при внесении молекул Фео в водно-детергентную среду инкубации и в какой форме агрегации находятся молекулы Фео, непосредственно участвующие в реакции замещения.

Полученные нами данные показывают, что в системе Фео + ТЛТ-буфер, приготовленной по способу 1 в отсутствие ацетона, пигмент находится, судя по его спектру поглощения (рис. 1, 2), преимущественно в мономерной форме в составе свободных мицелл детергентов среды. Тот факт, что внесение в эту систему нативных РЦ приводит к их модификации (рис. 2, а и б), указывает на то, что в процессе инкубации происходит обмен мономерным Фео между мицеллами ТЛТ-буфера и детергентным поясом ЛДАО. Возможность обмена солибилизованным веществом между мицеллами хорошо известна в литературе (для обзора см. [42]). Переход пигмента из свободных мицелл буферной среды в мицеллярный детергентный пояс РЦ происходит, по-видимому, при слиянии мицелл с образованием короткоживущих супермицелл с последующей фрагментацией на мицеллы обычного размера [42]. Исходя из предположения о том, что распределение молекул пигмента между мицеллами подчиняется распределению Пуассона [43], расчёт на основе используемых в данной работе концентраций пигмента (~10<sup>-4</sup> М) и детергентов [ТХ100 (1,6·10<sup>-4</sup> М) и ЛДАО (4·10<sup>-4</sup> М)] позволяет оце-

нить, что более 99% мицелл содержали две и более молекулы Фео после достижения равновесия в инкубационной смеси.

При внесении ацетонового раствора Фео в ТЛ-буфер (способ 2), по-видимому, образуется микрогетерогенная система, в которой гидрофобные молекулы пигмента распределяются по меньшей мере между двумя фазами: водно-ацетоновой фазой (ацетон не образует отдельной фазы и полностью растворяется в воде) и мицеллами ЛДАО. Исходя из спектра поглощения пигмента (рис. 1, кривая 3), наиболее вероятно, что гидрофобные молекулы Фео в водно-ацетоновой фазе образуют  $\pi$ - $\pi$ -сопряжённые димеры, поглощающие при 695 нм, в то время как в мицеллярной фазе Фео находится в виде мономеров, ассоциированных с мицеллами ЛДАО (поглощение при ~672 нм). Рис. 2, в и г и таблица показывают, что степень пигментного замещения в такой микрогетерогенной системе была существенно выше, чем в системе Фео + ТЛ-буфер. Результаты данного исследования не позволяют сделать однозначный вывод относительно возможности эффективного вовлечения в пигментное замещение димеров Фео в ТЛ-буфере. Однако такая возможность представляется маловероятной, поскольку наблюдаемое различие в выходе реакции может быть объяснено тем (несколько неожиданным) фактом, что степень замещения БФео на Фео в присутствии ацетона оказалась выше, чем в случаях, когда ацетон не добавлялся или был удалён (таблица). Ранее было показано, что добавка ацетона вызывает ограничение мицеллообразования и повышение температуры точки помутнения в системе вода–ТХ100 вследствие изменения структуры водной фазы и адсорбции ацетона на поверхности мицелла–вода [44]. Предположительно, в присутствии ацетона мицеллы ТХ100 и, возможно, ЛДАО становятся менее стабильными, что могло бы облегчить пигментный обмен между ними и детергентным поясом РЦ, повышая тем самым концентрацию мономерного Фео в области БФео-связывающего белкового кармана и увеличивая вероятность реакции замещения. В то же время, хотя в описанных здесь экспериментах использовалась относительно низкая концентрация ацетона (10%), нельзя исключить, что присутствие этого органического растворителя могло сделать локальную структуру связывающих белковых карманов в РЦ несколько более лабильной, обеспечивая большую доступность молекул БФео для пигментного обмена. Однако, если такая ситуация имеет место, она, очевидно, не оказывает значительного влияния на

функциональные реакции переноса электрона в РЦ. В пользу этого свидетельствует тот факт, что инкубация РЦ с Фео в ТЛ-буфере в присутствии 10%-ного ацетона при 25 °С, приводящая к ~100%-ному замещению БФео Н<sub>В</sub>, не влияла на форму и амплитуду разностного спектра фотонакопления анион-радикала Н<sub>Д</sub> (рис. 4, кривая 2). Кроме того, выполненные ранее фемтосекундные измерения на модифицированных РЦ *Rba. sphaeroides*, в которых молекулы БФео Н<sub>А</sub> и БФео Н<sub>В</sub> были замещены в присутствии 10%-ного ацетона молекулами [3-ацетил]-Фео, имеющими потенциал восстановления *in vitro*, сравнимый с потенциалом БФео, выявили динамические характеристики процесса первичного разделения зарядов очень близкие к таковым, наблюдаемым в РЦ дикого типа [45].

В заключение отметим, что в сочетании с другими факторами [10, 11] температурный фактор, состояние агрегации внешнего пигмента и присутствие небольшого количества органического растворителя, исследованные в данной работе на примере встраивания молекул Фео в структуру РЦ пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* R-26, могут, очевидно, играть важную роль в процессах сайт-селективного замещения пигментов также в РЦ других фотосинтезирующих организмов. Учёт таких факторов необходим для достижения максимальной степени пигментного замещения и получения спектрально и функционально гомогенных препаратов модифицированных РЦ, что является важным при исследовании начальных, ультрабыстрых стадий фотоиндуцированного разделения зарядов при фотосинтезе методом кинетической абсорбционной спектроскопии.

**Благодарности.** В работе использовали оборудование (спектрофотометр UV-1800 («Shimadzu»)) центра коллективного пользования Пушкинского научного центра. Авторы выражают благодарность И.А. Шагиной за помощь на начальной стадии работы.

**Вклад авторов.** А.А. Забелин, А.Я. Шкурпатов – концепция и руководство работой; А.А. Забелин, В.Б. Ковалев – проведение экспериментов; А.А. Забелин, А.Я. Шкурпатов, В.Б. Ковалев – обсуждение результатов исследования; А.А. Забелин, А.Я. Шкурпатов – написание текста.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена за счёт средств госзадания «Структура и функции пигмент-белковых комплексов фотосинтези-

рующих организмов как наноразмерных природных преобразователей солнечной энергии» (№ 122041100204-3).

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследо-

ваний с участием людей или животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шувалов В. А. (1990) *Первичное преобразование световой энергии при фотосинтезе*, Наука, Москва.
2. Yehezkeili, O., Tel-Vered, R., Michaeli, D., Willner, I., and Nechushtai, R. (2014) Photosynthetic reaction center-functionalized electrodes for photobioelectrochemical cells, *Photosynth. Res.*, **120**, 71-85, doi: 10.1007/s11120-013-9796-3.
3. Friebe, V. M., Barszcz, A. J., Jones, M. R., and Frese, R. N. (2022) Sustaining electron transfer pathways extends biohybrid photoelectrode stability to years, *Angew. Chem. Int. Ed.*, e202201148, doi: 10.1002/anie.202201148.
4. Zabelin, A. A., Shkuropatova, V. A., Makhneva, Z. K., Moskalenko, A. A., Shuvalov, V. A., et al. (2014) Chemically modified reaction centers of photosystem II: exchange of pheophytin a with 7-deformyl-7-hydroxymethyl-pheophytin b, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1870-1881, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.08.004.
5. Jones, M. (2009) in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., Beatty, J. T., eds) Springer, Dordrecht, pp. 295-321, doi: 10.1007/978-1-4020-8815-5\_16.
6. Xu, H., Vavilin, D., and Vermaas, W. (2001) Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14168-14173, doi: 10.1073/pnas.251530298.
7. Gan, F., Zhang, S., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. C., et al. (2014) Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light, *Science*, **345**, 1312-1316, doi: 10.1126/science.1256963.
8. Shkuropatov, A. Ya., Khatypov, R. A., Volshchukova, T. S., Shkuropatova, V. A., Owens, T. G., et al. (1997) Spectral and photochemical properties of borohydride-treated D1-D2-cytochrome b-559 complex of photosystem II, *FEBS Lett.*, **420**, 171-174, doi: 10.1016/S0014-5793(97)01512-3.
9. Vacha, F., Joseph, D. M., Durrant, J. R., Telfer, A., Klug, D. R., et al. (1995) Photochemistry and spectroscopy of a five-chlorophyll reaction center of photosystem II isolated by using a Cu affinity column, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2929-2933, doi: 10.1073/pnas.92.7.2929.
10. Scheer, H., and Struck, A. (1993) in *The Photosynthetic Reaction Center* (Deisenhofer, J., and Norris, J.R., eds) Academic Press, San Diego, pp. 157-192.
11. Scheer, H., and Hartwich, G. (1995) in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 649-663.
12. Meyer, M., Scheer, H., and Breton, J. (1996) Probing native-like orientation of pigments in modified reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R26 by linear dichroism, *FEBS Lett.*, **393**, 131-134, doi: 10.1016/0014-5793(96)00869-1.
13. Meyer, M. (1997) *Pigment-Modified Reaction Centers of Rb. sphaeroides R26.1*. Dissertation, University of Munich, Munich.
14. 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.
15. 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.
16. Schmidt, S., Arlt, T., Hamm, P., Huber, H., Nägele, T., et al. (1994) Energetics of the primary electron transfer reaction revealed by ultrafast spectroscopy on modified bacterial reaction centers, *Chem. Phys. Lett.*, **223**, 116-120, doi: 10.1016/0009-2614(94)00429-3.
17. Schmidt, S., Arlt, T., Hamm, P., Huber, H., Nägele, T., et al. (1995) Primary electron-transfer dynamics in modified bacterial reaction centers containing pheophytin-a instead of bacteriopheophytin-a, *Spectrochim. Acta A*, **51**, 1565-1578, doi: 10.1016/0584-8539(95)01440-6.
18. Kennis, J. T. M., Shkuropatov, A. Ya., van Stokkum, I. H. M., Gast, P., Hoff, A. J., et al. (1997) Formation of a long-lived P<sup>+</sup>B<sub>A</sub><sup>-</sup> state in plant pheophytin-exchanged reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26 at low temperature, *Biochemistry*, **36**, 16231-16238, doi: 10.1021/bi9712605.
19. Lu, Y., Xu, J., Liu, Y., Liu, B., Xu, C., et al. (2006) Manipulated photocurrent generation from pigment-exchanged photosynthetic proteins adsorbed to nanostructured WO<sub>3</sub>-TiO<sub>2</sub> electrodes, *Chem. Commun.*, **7**, 785-787, doi: 10.1039/b514606b.
20. Franken, E. M., Shkuropatov, A. Ya., Francke, C., Neerken, S., Gast, P., et al. (1997) Reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26 with selective replacement of bacteriopheophytin by pheophytin a I. Characterisation of steady state absorbance and

- circular dichroism, and of the  $P^+Q_A^-$  state, *Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 242-250, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00165-X.
21. Zabelin, A. A., and Shkuropatov, A. Ya. (2021) Pigment-modified reaction centers of *Chloroflexus aurantiacus*: chemical exchange of bacteriopheophytins with plant-type pheophytins, *Photosynth. Res.*, **149**, 313-328, doi: 10.1007/s11120-021-00855-x.
  22. Katz, J. J., Bowman, M. K., Michalski, T. J., and Worcester, D. L. (1991) in *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 211-236.
  23. Scherz, A., Rosenbach-Belkin, V., and Fisher, J. R. E. (1991) in *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 237-268.
  24. Zabelin, A. A., Shkuropatova, V. A., Shuvalov, V. A., and Shkuropatov, A. Ya. (2011) FTIR spectroscopy of the reaction center of *Chloroflexus aurantiacus*: photoreduction of the bacteriopheophytin electron acceptor, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1013-1021, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.05.018.
  25. Strain, H. H., and Svec, W. A. (1966) in: *The chlorophylls* (Vernon, L. P., Seele, G. R., eds) Academic Press, N.Y., pp. 21-66.
  26. Scheer, H., Meyer, M., and Katheder, I. (1992) in *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II: Structure, Spectroscopy, and Dynamics* (Breton, J., and Vermeglio, A., eds) NATO ASI Series, Springer, N.Y., pp. 49-57.
  27. Meyer, M., and Scheer, H. (1995) Reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26 containing C-3 acetyl and vinyl (bacterio)pheophytins at sites  $H_{A,B}$ , *Photosynth. Res.*, **44**, 55-65, doi: 10.1007/BF00018296.
  28. Забелин А. А., Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г., Шкуropатова В. А., Зверева М. Г., и др. (2009) Мутантные реакционные центры *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)H с прочно связанным бактериохлорофиллом *a*: структурные свойства и пигмент-белковые взаимодействия, *Биохимия*, **74**, 86-94.
  29. Гуринович Г. П., Стрелкова Т. И. (1963) Изучение ассоциации молекул некоторых порфиринов, *Биофизика*, **2**, 172-180.
  30. Luisetti, J., Möhwald, H., and Galla, H. J. (1979) Spectroscopic and thermodynamic studies of chlorophyll containing monolayers and vesicles. Part II: chlorophyll a and pheophytin a aggregation on DMPC vesicles, *Z. Naturforsch.*, **34**, 406-413, doi: 10.1515/znc-1979-5-615.
  31. Ballschmitter, K., and Katz, J. J. (1972) Chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-water interactions in the solid state, *Biochim. Biophys. Acta*, **256**, 307-327, doi: 10.1016/0005-2728(72)90062-X.
  32. Cotton, T. M., Loach, P. A., Katz, J. J., and Ballschmitter, K. (1978) Studies of chlorophyll-chlorophyll and chlorophyll-ligand interactions by visible absorption and infrared spectroscopy at low temperatures, *Photochem. Photobiol.*, **27**, 735-749, doi: 10.1111/j.1751-1097.1978.tb07672.x.
  33. Луганская А. Н., Лебедев Н. Н., Красновский А. А. (1984) Молекулярная организация феофитина а в водных растворах детергентов, *Мол. биол.*, **18**, 963-971.
  34. Hynninen, P.H., and Lötjönen, S. (1993) Effects of  $\pi$ - $\pi$  interactions on the  $^1H$ -NMR spectra and solution structures of pheophytin a and a' dimers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**, 374-380, doi: 10.1016/0005-2728(93)90242-8.
  35. Okamura, M. Y., Isaacson, R. A., and Feher, G. (1979) Spectroscopic and kinetic properties of the transient intermediate acceptor in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **546**, 394-417, doi: 10.1016/0005-2728(79)90076-8.
  36. Shuvalov, V. A., Shkuropatov, A. Ya., Kulakova, S. M., Ismailov, M. A., and Shkuropatova, V. A. (1986) Photoreactions of bacteriopheophytins and bacteriochlorophylls in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and *Chloroflexus aurantiacus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **849**, 337-346, doi: 10.1016/0005-2728(86)90145-3.
  37. Khodadadi, S., and Sokolov, A. P. (2015) Protein dynamics: from rattling in a cage to structural relaxation, *Soft. Matter.*, **11**, 4984-4998, doi: 10.1039/c5sm00636h.
  38. Grimaldo, M., Roosen-Runge, F., Zhang, F., Schreiber, F., and Seydel, T. (2019) Dynamics of proteins in solution, *Quart. Rev. Biophys.*, **52**, e7, doi: 10.1017/S0033583519000027.
  39. Stoica, I. (2006) Characterization of protein matrix motions in the *Rb. sphaeroides* photosynthetic reaction center, *J. Mol. Model.*, **12**, 468-480, doi: 10.1007/s00894-005-0074-y.
  40. Puthenveetil, R., Christenson, E. T., and Vinogradova, O. (2022) New horizons in structural biology of membrane proteins: experimental evaluation of the role of conformational dynamics and intrinsic flexibility, *Membranes*, **12**, 227, doi: 10.3390/membranes12020227.
  41. Roth, M., Arnoux, B., Ducruix, A., and Reiss-Husson, F. (1991) Structure of the detergent phase and protein-detergent interactions in crystals of the wild-type (strain y) *Rhodobacter sphaeroides* photochemical reaction center, *Biochemistry*, **30**, 9403-9413, doi: 10.1021/bi00103a003.
  42. Rharbi, Y., and Winnik, M. A. (2001) Solute exchange between surfactant micelles by micelle fragmentation and fusion, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **89-90**, 25-46, doi: 10.1016/S0001-8686(00)00054-3.
  43. Infelta, P.P., and Gratzel, M. (1979) Statistics of solubilize distribution and its application to pyrene fluorescence in micellar systems. A concise kinetic model, *J. Chem. Phys.*, **70**, 179-186, doi: 10.1063/1.437218.

44. Gu, T., and Galera-Gómez, P. A. (1999) The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water, *Colloids Surf A Physicochem. Eng. Aspects*, **147**, 365-370, doi: 10.1016/S0927-7757(98)00710-9.
45. Huber, H., Meyer, M., Nägele, T., Hartl, I., Scheer, H., et al. (1995) Primary photosynthesis in reaction centers containing four different types of electron acceptors at site H<sub>A</sub>, *Chem. Phys.*, **197**, 297-305, doi: 10.1016/0301-0104(95)00132-8.

## ON THE MECHANISM OF SELECTIVE CHEMICAL EXCHANGE OF BACTERIOPHEOPHYTINS IN REACTION CENTERS OF *Rhodobacter sphaeroides* R-26

A. A. Zabelin\*, V. B. Kovalev, and A. Ya. Shkuropatov

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

In order to elucidate the mechanism of site-selective chemical exchange of chromophores in reaction centers (RCs) of photosynthetic bacteria by external pigments, the efficiency of incorporation of plant pheophytin *a* (Pheo) into the binding sites of bacteriopheophytin *a* molecules (BPheo) in isolated *Rhodobacter sphaeroides* R-26 RCs was studied depending on the temperature of the incubation medium, the aggregation state of Pheo, and the presence of an organic solvent (acetone). The degree of selective replacement of photochemically inactive BPheo H<sub>B</sub> molecules was ~15% upon incubation of the RC/Pheo mixture at 5 °C under conditions when Pheo was in a water–detergent incubation medium in the form of monomers in free detergent micelles. The exchange efficiency increased to 40% upon incubation at 25 °C and was about 100% at this temperature if 10% acetone was added to the incubation medium. The degree of pigment exchange was approximately twice as high at both temperatures when a mixture of Pheo monomers and dimers in the presence of 10% acetone was used as an incubation medium. The removal of acetone from such a medium with the preservation of pigment forms led to a significant decrease in the efficiency of Pheo incorporation. The effect of acetone on pigment exchange was also observed at an elevated incubation temperature (43.5 °C), when functionally active BPheo H<sub>A</sub> molecules were partially replaced. The results are discussed in terms of the mechanism according to which (1) the temperature-dependent internal movements of the RC protein are a factor facilitating the release of the BPheo molecule from the binding site and the simultaneous insertion of the Pheo molecule into the same site in a coupled process, (2) the role of the temperature factor largely depends on the steric accessibility of binding protein pockets, (3) the incorporation of Pheo occurs from a pool of monomeric molecules included in the micelles RC–detergent, (4) the presence of acetone in the incubation medium facilitates the exchange of Pheo monomer molecules between micelles in solution and the detergent belt of the complex.

*Keywords:* reaction center, (bacterio)pheophytin, binding site, chemical exchange, detergent micelles, *Rhodobacter sphaeroides*