

## СВОЙСТВА МУТАНТНЫХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ *Cereibacter sphaeroides* С ЗАМЕЩЕНИЕМ M206 Pe → Gln

© 2022 Т.Ю. Фуфина, О.А. Третчикова, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов, Л.Г. Васильева\*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН,  
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: vsulya@mail.ru

Поступила в редакцию 09.06.2022

После доработки 14.08.2022

Принята к публикации 14.08.2022

В структуре фотосинтетического реакционного центра (РЦ) пурпурной несерной бактерии *Cereibacter sphaeroides* консервативный аминокислотный остаток Pe-M206 расположен вблизи димера бактериохлорофилла P и мономерного бактериохлорофилла В<sub>A</sub>, являющихся первичным донором и ближайшим акцептором электрона соответственно. Непосредственная близость Pe-M206 к С2-ацетильной группе бактериохлорофилла P<sub>B</sub>, гидроксильной группе Tug-M210, С9-кето-группе бактериохлорофилла В<sub>A</sub>, а также к молекуле воды вблизи этой группы позволяет использовать данный сайт для мутагенеза с целью исследования механизмов первичных фотохимических процессов в РЦ. Ранее было показано, что внесение аминокислотного замещения Pe → Glu в положении M204 (аналог положения M206 в РЦ *C. sphaeroides*) в РЦ близкородственной пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* заметно повлияло на кинетику образования состояния с разделенными зарядами P<sup>+</sup>H<sub>A</sub><sup>-</sup>, а замена Pe M204 на Gln привела к потере бактериохлорофилла В<sub>A</sub> из структуры комплекса. В нашей работе показано, что одиночная I(M206)Q и двойная мутация I(M206)Q + F(M208)A в РЦ *C. sphaeroides* не приводят к изменению пигментного состава комплекса и существенно не влияют на редокс-потенциал первичного донора электрона. В то же время замещение Pe M206 на Gln повлияло на положение и амплитуды полос поглощения бактериохлорофиллов РЦ, привело к увеличению времени жизни возбужденного состояния первичного донора электрона P\* с 3,1 пс до ~22 пс и снижению квантового выхода образования состояния P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub> до ~60%, что указывает на значительные изменения пигмент-белковых взаимодействий в окружении первичного донора P и ближайшего акцептора электрона В<sub>A</sub>. Также было отмечено снижение устойчивости мутантных РЦ к тепловой денатурации, более выраженное для РЦ с двойным замещением I(M206)Q + F(M208)A и обусловленное, по-видимому, нарушением плотной упаковки белка вблизи бактериохлорофиллов P<sub>B</sub> и В<sub>A</sub>. Обсуждаются возможные причины различного влияния одинаковых мутаций на свойства двух высокомолекулярных РЦ из близкородственных пурпурных несерных бактерий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** реакционный центр фотосинтеза, *Rhodobacter capsulatus*, *Cereibacter sphaeroides*, бактериохлорофилл, пурпурные несерные бактерии, фотохимическое разделение зарядов, квантовый выход разделения зарядов, пигментный состав, редокс-потенциал, первичный донор электрона, термостабильность мембранных белков.

DOI: 10.31857/S0320972522100104, EDN: BCUNMI

### ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтетические реакционные центры пурпурных бактерий (пб-РЦ), относительно более просто организованные структурные аналоги фотосистемы-2 высших растений, цианобактерий и водорослей, многие годы служат

удобной моделью для изучения механизмов преобразования световой энергии в химическую энергию разделенных зарядов. К настоящему времени наиболее изучены РЦ из *Blastochloris viridis*, *Rhodobacter sphaeroides* (далее будет использовано новое название *Cereibacter sphaeroides* [1]) и *Rhodobacter capsulatus*. Про-

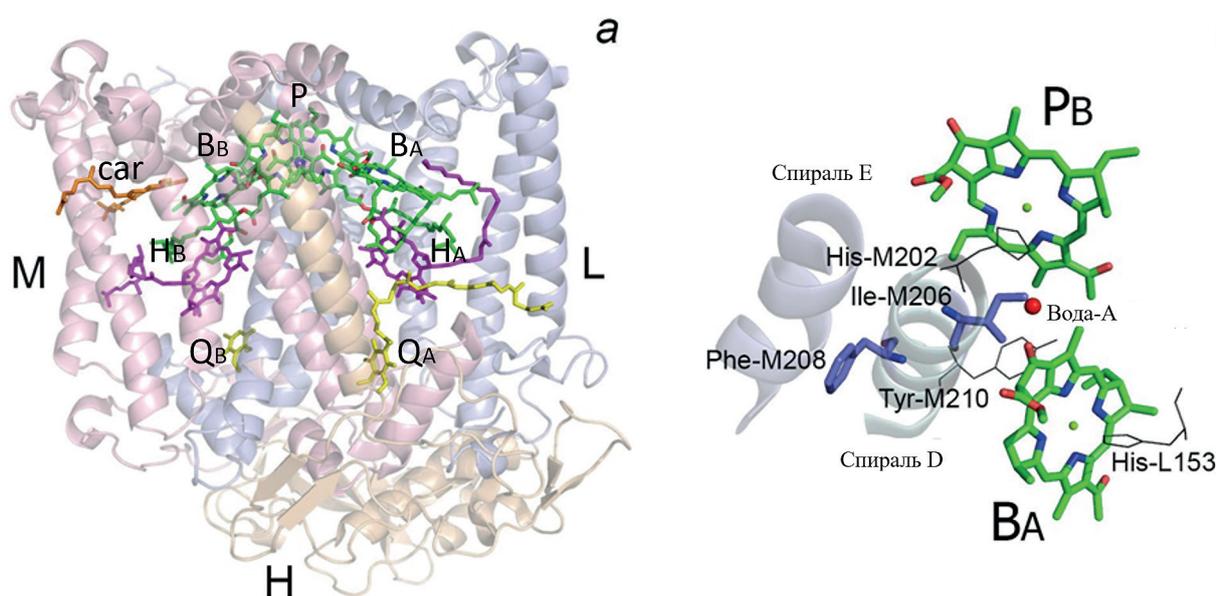
Принятые сокращения: БФео – бактериофеофитин; БХл – бактериохлорофилл; ДТ – дикий тип; ЛДАО – детергент лаурилдиметиламиноксид; пб-РЦ – реакционные центры пурпурных бактерий; В<sub>A</sub> и В<sub>B</sub> – мономерные бактериохлорофиллы; Н<sub>A</sub> и Н<sub>B</sub> – мономерные бактериофеофитины; P – димер бактериохлорофилла; P<sub>A</sub> и P<sub>B</sub> – бактериохлорофиллы димера P; Q<sub>A</sub> и Q<sub>B</sub> – убихиноны.

\* Адресат для корреспонденции.

пространственные структуры двух первых РЦ расшифрованы с высоким разрешением [2, 3], а для РЦ *Rba. capsulatus* детальная структура пока не установлена, но, как полагают, она в целом сходна со структурой РЦ *C. sphaeroides* [4]. Трансмембранный пигмент-белковый комплекс РЦ *C. sphaeroides* состоит из трех субъединиц (L, M и H) и десяти кофакторов, интегрированных в мембрану, — четырех молекул бактериохлорофилла (БХл), двух молекул бактериофеофитина (БФео)  $H_A$  и  $H_B$ , двух хинонов  $Q_A$  и  $Q_B$ , молекулы каротиноида и атома негемового железа. Кофакторы организованы в две трансмембранные цепи переноса электрона (А и В), расположенные симметрично относительно оси симметрии 2-го порядка [4] (рис. 1, а). Известно, что в РЦ пурпурных бактерий только одна из цепей переноса электрона, А-цепь, является функционально активной. Два БХл,  $P_A$  и  $P_B$ , на периплазматической стороне мембраны образуют димер Р, выполняющий роль первичного донора электрона. Под воздействием света в РЦ инициируется серия быстрых трансмембранных реакций переноса электрона, сопровождающихся образованием состояний с разделенными зарядами. Квантовый выход фотоиндуцированного разделения зарядов в пб-РЦ близок к 100% [5].

К настоящему времени установлено, что белок пб-РЦ не только удерживает кофакторы внутри мембраны, но также участвует в регуляции их спектральных и окислительно-восстановительных свойств. Кроме того, ряд ами-

нокислотных остатков играет важную роль в процессе фотохимического разделения зарядов [6]. К таким остаткам относится, в частности, Тир-М210, расположенный вблизи димера БХл Р и мономерного БХл  $V_A$ . Установлено, что при передаче электрона от  $P^*$  на БХл  $V_A$  изменение конформации гидроксильной группы Тир-М210 приводит к понижению уровня энергии состояния с разделенными зарядами  $P^+V_A^-$  и, таким образом, способствует стабилизации этого короткоживущего состояния [7, 8]. К существенным компонентам структуры РЦ относятся также молекулы воды в гидрофобной части комплекса. Так, было показано, что кристаллографически определяемая молекула воды вблизи С9-кето-группы БХл  $V_A$  (в литературе нередко обозначаемая как «вода-А») необходима для эффективного переноса электрона с  $P^*$  на  $V_A$ . При ее отсутствии время жизни состояния  $P^*$  в РЦ *C. sphaeroides* повышалось в 8 раз [9]. Показано, что в процессе образования состояния  $P^+V_A^-$  формируется водородная связь между водой-А и С9-кето-группой БХл  $V_A$  [9, 10]. Предполагается, что вода-А входит в цепочку полярных атомов, участвующих в переносе электрона от возбужденного донора электрона  $P^*$  на ближайший акцептор БХл  $V_A$  [11]. Несмотря на значительный объем информации, накопленной к настоящему времени в отношении влияния белкового окружения на свойства кофакторов и процессы переноса электрона и протонов в пб-РЦ, вопрос о механизмах наиболее быстрых



**Рис. 1.** Структура реакционного центра *C. sphaeroides* (PDB ID 3v3y) (а). L – L-субъединица; M – M-субъединица; H – H-субъединица; P – димер БХл;  $V_A$  и  $V_B$  – мономерные БХл;  $H_A$  и  $H_B$  – мономерные БФео;  $Q_A$  и  $Q_B$  – убикиноны; car – каротиноид. б – Белковое окружение бактериохлорофиллов  $P_B$  и  $V_A$  в структуре РЦ дикого типа (PDB ID 3v3y). Показано расположение Ile-M206, Phe-M208, Tyr-M210, воды-А, фрагментов  $\alpha$ -спиралей D и E M-субъединицы

начальных этапов разделения зарядов остается предметом дискуссий.

Внесение направленных аминокислотных замещений в окружение кофакторов с целью изменения пигмент-белковых и белок-белковых взаимодействий служит одним из подходов к исследованию механизмов фотосинтетического переноса электрона в пб-РЦ [6]. В частности, в ряде работ внимание было акцентировано на высококонсервативном остатке Пе-M206, расположенном в непосредственной близости от БХл Р<sub>B</sub>, С9-кето-группы мономерного БХл В<sub>A</sub>, Туг-M210 и воды-А (рис. 1, б). Было показано, что в РЦ *C. sphaeroides* замены Пе-M206 на His и Туг существенно повлияли на оптические характеристики комплекса в области поглощения димера Р и мономерных БХл [12, 13]. Кроме того, было отмечено значительное падение квантового выхода образования состояния Р<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> и снижение количества РЦ I(M206)H после его выделения из мембран и очистки с использованием детергента лаурилдиметиламинооксида (ЛДАО) [12, 14]. Было высказано предположение, что внесение полярного остатка гистидина в сайт M206 в область контакта L- и M-субъединиц могло повлиять на связывание кристаллографически определяемого гликолипида [15] и, таким образом, отразиться на стабильности структуры РЦ [14]. В РЦ *Rba. capsulatus* положение M204 соответствует положению M206 в РЦ *C. sphaeroides*. В работе Saggu et al. [16] показано, что мутация I(M204)E повлияла на подвижность ОН-группы Туг-M210, а замена I(M204)Q привела к потере БХл В<sub>A</sub> из структуры комплекса [17]. Получение стабильных мутантных РЦ *C. sphaeroides* с аналогичными свойствами представляет интерес для изучения механизмов начальных этапов фотохимического процесса в этом РЦ.

В представленной работе были получены мутантные РЦ *C. sphaeroides* с одиночным I(M206)Q и двойным I(M206)Q + F(M208)A замещениями, исследованы их спектральные и фотохимические свойства, пигментный состав и термостабильность. Мутация M208 Phe → Ala была внесена для повышения гомологии белкового окружения Р и В<sub>A</sub> в РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus*. Также авторами обсуждаются возможные причины различного влияния одинаковых мутаций на свойства и пигментный состав гомологичных РЦ из пурпурных несерных бактерий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Направленные аминокислотные замещения в РЦ вносили методом ПЦР через

олигонуклеотидные праймеры, как описано ранее [18]. Путем определения последовательности ДНК ПЦР-фрагмента было подтверждено присутствие мутаций в гене *pufM*, кодирующем М-субъединицу РЦ. Модифицированный *puf*-оперон был клонирован в шаттл-вектор pRK-415 [19], полученная плазмида с помощью конъюгации была перенесена в штамм *C. sphaeroides* DD13 [20]. Клетки полученных рекомбинантных штаммов синтезировали РЦ с заданными мутациями и не содержали светособирающих комплексов [18]. В качестве контрольного реакционного центра псевдо-дикого типа (ДТ) использовали РЦ, выделенные из штамма *C. sphaeroides* DD13, который содержал производную pRK-415, несущую немодифицированные копии генов *puf-LMX* [18]. *C. sphaeroides* выращивали на среде Хатнера [21] в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл) и канамицина (5 мкг/мл). Реакционные центры выделяли методом ионообменной и аффинной хроматографии, как описано ранее [22, 23]. Для солюбилизации комплексов из мембран использовали детергент ЛДАО. Смену детергента после очистки РЦ осуществляли, как описано ранее [24]. Очищенные РЦ растворяли в 20 мМ Tris-HCl-буфере (рН 8,0), содержащем 0,2% холата натрия (ТХ) или 0,6% n-октил-глюкозида. Термостабильность РЦ исследовали при 48 и 55 °С в течение 60 мин путем регистрации термозависимых изменений амплитуды полосы Q<sub>Y</sub> В, как описано ранее [24]. Измерение спектров поглощения производили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 («Shimadzu», Япония) при комнатной температуре. К образцам добавляли аскорбат натрия в концентрации 1 мМ для поддержания первичного донора электрона в восстановленном состоянии. Экстракцию и анализ пигментов проводили методом, описанным ранее [25], ошибку измерений определяли методом стандартного отклонения. Величину среднеточечного потенциала Р/Р<sup>+</sup> определяли с помощью электрохимического титрования изолированных РЦ, используя феррицианид калия в качестве окислителя и аскорбат натрия в качестве восстановителя, как описано ранее [25]. Кинетики изменений поглощения с фемтосекундным разрешением в РЦ измеряли на установке, описанной ранее [26]. Импульсы света длительностью ~35 фс и частотой повторения 20 Гц получали с помощью титан-сапфирового лазера MaiTai SP («Spectra-Physics», США) и регенеративного усилителя Spitfire Ace («Spectra-Physics»). Энергию выходных импульсов Spitfire Ace ослабляли и использовали для накачки параметрического усилителя OPA800 CF («Spectra-Physics») с це-

лью получения импульсов возбуждения на длине волны 865 нм (вторая гармоника холостого пучка). Небольшую часть энергии импульсов из регенеративного усилителя использовали для генерации континуума в кювете с водой толщиной 5 мм в качестве импульсов зондирования. После кюветы с образцом спектры зондирующих импульсов измеряли с помощью CCD-камеры Pixis 400BR и спектрографа SpectraPro 2300i («Princeton Instruments», США) в области длин волн 750–1100 нм. Разностные спектры получали путем усреднения 500 спектров для каждой задержки времени. Возбуждающий луч с энергией ~1–5 мкДж фокусировали на образец так, чтобы выцветание первичного донора электрона составляло ~10%. Измерения проводили при комнатной температуре. Относительную поляризацию импульсов возбуждения устанавливали параллельно измерительному импульсу. Визуализацию структуры реакционного центра и моделирование аминокислотных замещений проводили с помощью программы PyMol [27].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

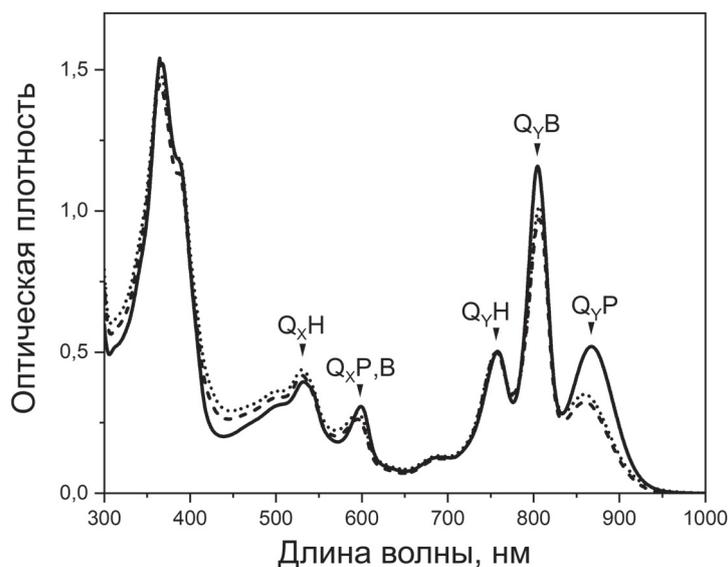
В спектре поглощения изолированных РЦ ДТ, представленном на рис. 2, длинноволновая полоса  $Q_Y P$  с максимумом при 865 нм принадлежит поглощению димера БХл Р, полоса поглощения с максимумом при 804 нм приписывается поглощению мономерных БХл ( $Q_Y B$ ), а также высокоэнергетическому переходу в молекуле первичного донора электрона. Полоса  $Q_Y H$  с максимумом при 760 нм соответствует

поглощению молекул БФео. В коротковолновой области спектра полоса при 599 нм отражает  $Q_X$ -переходы в молекулах БХл. При 532 нм расположен максимум полосы поглощения молекул БФео активной и неактивной цепей переноса электрона,  $Q_X H$ . Плечо в районе 500 нм принадлежит молекуле каротиноида. В коротковолновой области спектра поглощения изолированных РЦ ДТ расположена полоса  $Core$  с максимумом при 363 нм и плечом на длинноволновом склоне полосы при 390 нм, отражающая поглощение всех бактериохлоринов РЦ (рис. 2).

В спектре поглощения мутантных РЦ с одиночным и двойным замещениями наблюдаются сходные изменения – заметное снижение амплитуды полосы  $Q_Y P$  и коротковолновый сдвиг этой полосы на 7 нм. Кроме того, отмечается снижение амплитуды и длинноволновый сдвиг на 4 нм полосы  $Q_Y B$  вблизи 800 нм (рис. 2). Сходство спектров поглощения РЦ I(M206)Q и РЦ I(M206)Q + F(M208)A свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения связаны с одиночной мутацией I(M206)Q, а замещение F(M208)A не оказало существенного влияния на спектральные свойства РЦ.

Пигментный анализ показал, что в мутантных РЦ соотношение БХл/БФео такое же, как и в РЦ ДТ (таблица). Эти результаты свидетельствуют о том, что аминокислотное замещение M206 Ile → Gln в РЦ *C. sphaeroides* не приводит к удалению мономерного БХл В<sub>A</sub> из структуры комплекса, как это наблюдалось ранее в РЦ *Rba. capsulatus* с аналогичной мутацией I(M204)Q [17].

Значение среднеточечного потенциала  $P/P^+$  для РЦ ДТ составило  $490 \pm 8$  мВ,



**Рис. 2.** Спектры поглощения изолированных РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (—), I(M206)Q (···) и I(M206)Q + F(M208)A (---), измеренные при комнатной температуре. Спектры нормированы по полосе  $Q_Y H$  при 760 нм

Величина среднеточечного потенциала  $P/P^+$  и пигментный анализ РЦ *C. sphaeroides*

РЦ	$E_m P/P^+$ , мВ	БХл/БФео
ДТ	$490 \pm 8$	$2,00 \pm 0,1$
I(M206)Q	$470 \pm 5$	$1,98 \pm 0,1$
I(M206)Q + F(M208)A	$475 \pm 5$	$1,98 \pm 0,1$

для РЦ I(M206)Q –  $470 \pm 5$  мВ, для РЦ I(M206)Q + F(M208)A –  $475 \pm 5$  мВ (таблица). Близкие, в пределах ошибки измерения, значения окислительного потенциала  $P$  в двух мутантных РЦ указывают на то, что обнаруженное небольшое понижение величины  $E_m P/P^+$  является результатом внесения замещения M206  $Pe \rightarrow Gln$ . Изменение величины  $E_m P/P^+$  в сторону понижения позволяет также сделать заключение, что мутация I(M206)Q не привела к образованию водородной связи между Gln-M206 и C2-ацетильной группой БХл  $P_B$ , входящей в  $\pi$ -электронную систему макроцикла. На основании того, что величины  $E_m P/P^+$  в РЦ ДТ и мутантных РЦ близки, можно предположить, что движущая сила фотохимической реакции  $\Delta G$  в генетически модифицированных комплексах также существенно не изменилась. Учитывая, что замещение F(M208)A не оказало влияния на спектральные свойства и окислительный потенциал  $P$ , определение времени жизни  $P^*$  и квантового выхода образования состояния  $P^+Q_A^-$  были проведены только для РЦ с одиночным замещением I(M206)Q.

На рис. 3 и 4 показаны результаты исследования динамики разделения зарядов в РЦ ДТ и I(M206)Q, полученные методом накачки-зондирования. Целью данного исследования было выяснение влияния замещения изолейцина на глутамин в позиции M206 на время жизни возбужденного состояния первичного донора электрона и квантовый выход образования состояния с разделенными зарядами  $P^+Q_A^-$  в РЦ I(M206)Q.

На рис. 3 приведена кинетика затухания стимулированного излучения из возбужденного состояния при 930 нм в РЦ ДТ (рис. 3, открытые символы (o)) и РЦ I(M206)Q (рис. 3, закрытые символы (•)). В РЦ ДТ кинетика стимулированного излучения состояния  $P^*$  удовлетворительно описывается экспонентой с временем жизни  $3,1 \pm 0,03$  пс. В РЦ I(M206)Q кинетика стимулированного излучения сохранила экспоненциальный характер, но время жизни увеличилось до  $22 \pm 1,4$  пс. В реакционных центрах дикого типа время жизни возбужденного первичного донора электрона с заблокированным переносом электрона,

$$\tau = \frac{1}{\sum k_i} \approx 300 \text{ пс},$$

снижается до

$$\tau = \frac{1}{k_p + \sum k_i} \approx 3 \text{ пс},$$

когда канал переноса электрона открыт. Это позволяет оценить как константу скорости переноса электрона от возбужденного первичного донора в активную цепь кофакторов,  $k_p \approx 3,3 \cdot 10^{-13}$  (1/с), так и квантовый выход разделения зарядов,

$$\varphi_p = \frac{k_p}{k_p + \sum k_i} \approx 0,99.$$

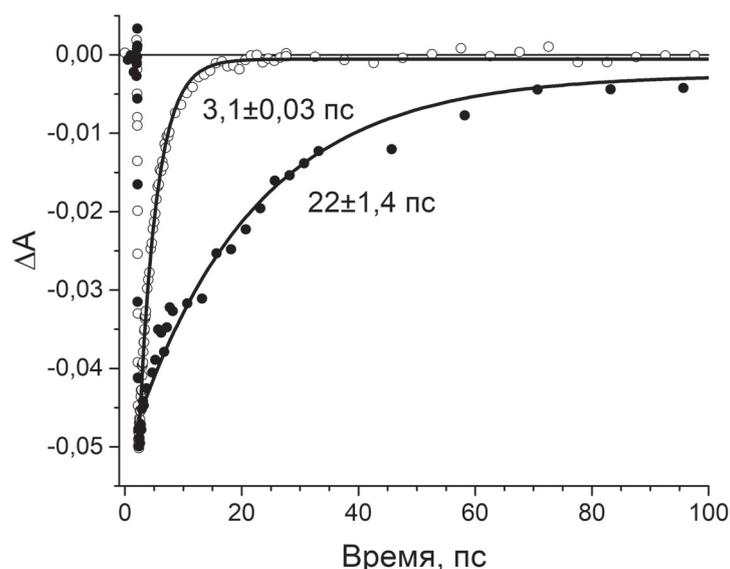


Рис. 3. Кинетика стимулированного излучения при 930 нм для РЦ ДТ *C. sphaeroides* дикого типа (o) и РЦ I(M206)Q (•). Сплошными линиями показана экспоненциальная аппроксимация кинетики изменений поглощения

В реакционных центрах мутанта I(M206)Q увеличение времени жизни возбужденного первичного донора электрона до

$$\tau = \frac{1}{k_p + \sum k_i} \approx 22 \text{ пс}$$

должно приводить к уменьшению константы скорости переноса электрона от возбужденного первичного донора в активную цепь кофакторов до  $k_p \approx 4,2 \cdot 10^{-14}$  (1/с) и снижению квантового выхода разделения зарядов до

$$\varphi_p = \frac{k_p}{k_p + \sum k_i} \approx 0,92.$$

Для оценки квантового выхода разделения зарядов в РЦ мутанта РЦ I(M206)Q на рис. 4 приведены разностные спектры поглощения, измеренные на отдельных задержках времени. В РЦ ДТ (рис. 4, а) при импульсном возбуждении первичный донор электрона переходит в возбужденное состояние (кривая 1). К задержке времени  $\sim 20$  пс происходит переход возбужденного  $P^*$  в состояние  $P^+H_A^-$  с квантовым выходом 0,99 (кривая 2). На задержке времени 1600 пс можно наблюдать состояние  $P^+Q_A^-$  (кривая 3). В РЦ мутанта I(M206)Q (рис. 4, б) при той же концентрации возбужденного первичного донора (кривая 1) состояние  $P^+H_A^-$  образуется на задержке времени 260 пс с квантовым выходом  $\sim 0,6$  (кривая 2). К задержке времени 1600 пс в РЦ I(M206)Q разностный спектр поглощения отражает состояние  $P^+Q_A^-$  (кривая 3).

Разница в ожидаемой величине квантового выхода (92%) и фактической величине квантового выхода (60%) образования состояния  $P^+Q_A^-$  в РЦ I(M206)Q может быть обусловлена изменением констант скорости как прямых, так и обратных реакций переноса электрона,

в частности, рекомбинации зарядов состояний  $P^+B_A^-$  и  $P^+H_A^-$ .

В литературе неоднократно отмечалась относительно высокая стабильность РЦ пурпурных бактерий [28]. Также известно, что некоторые аминокислотные замены могут способствовать как ослаблению, так и укреплению структуры этого комплекса [13, 29]. Влияние мутаций в положении M206, внесенных в данной работе или описанных ранее для РЦ I(M206)H [12] и РЦ I(M206)Y [13], на стабильность структуры РЦ было исследовано методом регистрации термозависимых изменений амплитуды полосы  $Q_Y$  В при температуре 48 °С [24]. В составе буфера для растворения РЦ был использован детергент холат натрия, способствующий стабилизации комплекса [24]. Сравнительное исследование показало, что после 60 мин инкубирования в данных условиях амплитуда  $Q_Y$ -полосы мономерных БХЛ при 804 нм в РЦ I(M206)Y уменьшалась менее, чем на 5%, как и в РЦ ДТ, в то время как в РЦ I(M206)Q она уменьшалась на  $\sim 10\%$ . Наименьшей устойчивостью к температурной денатурации обладали РЦ I(M206)Q + F(M208)A и I(M206)H, их инкубирование при 48 °С в течение 60 мин приводило к 20%-ному снижению амплитуды полосы  $Q_Y$  В (рис. 5). Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о дестабилизирующем влиянии замещения I(M206)H на структуру РЦ *C. sphaeroides*, более выраженном в присутствии детергента ЛДАО [14]. Таким образом, показано, что двойная мутация I(M206)Q + F(M208)A, целью которой было повышение гомологии белкового окружения молекул Р и  $B_A$  в РЦ *C. sphaeroides*

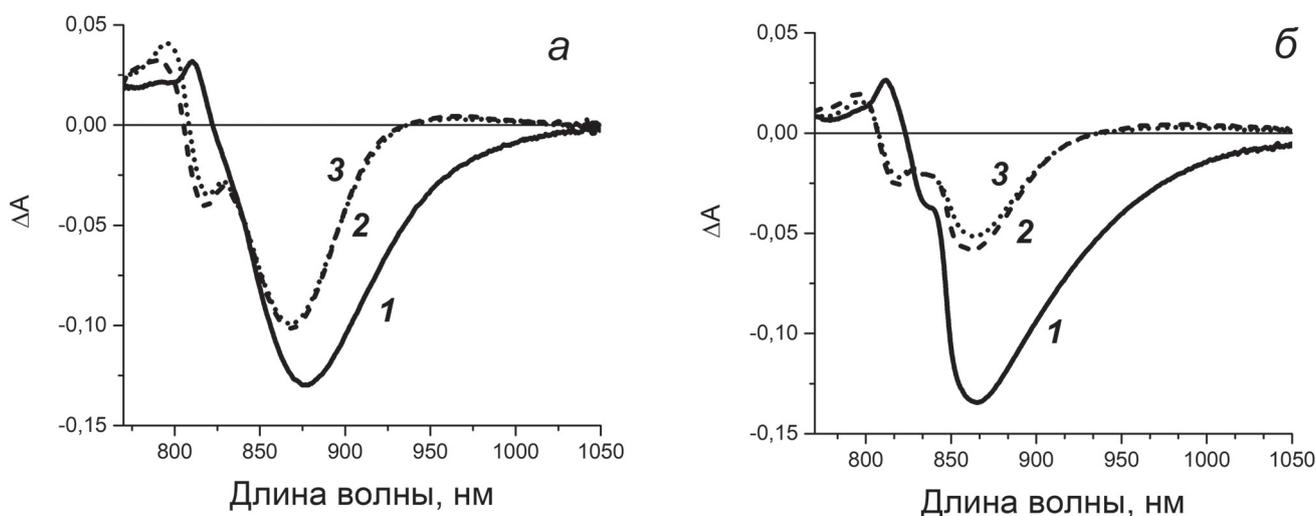


Рис. 4. Разностные «свет–минус–темнота» спектры поглощения, измеренные на задержках времени 0,3 пс (1), 20 пс (2) и 1600 пс (3) для РЦ ДТ *C. sphaeroides* (а) и на задержках времени 0,3 пс (1), 260 пс (2) и 1600 пс (3) для РЦ I(M206)Q (б) при возбуждении в  $Q_Y$  полосу Р

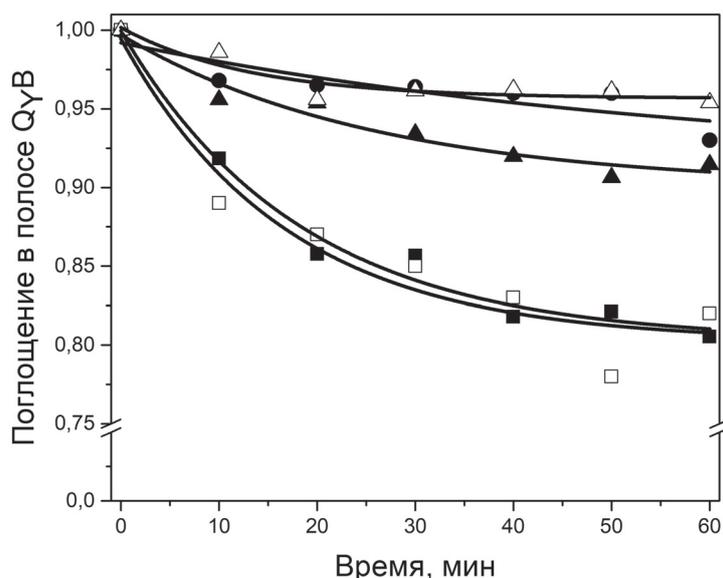


Рис. 5. Изменение поглощения в  $Q_y$  В области в спектре РЦ дикого типа (●), I(M206)Q (▲), I(M206)Q + F(M208)A (■), I(M206)Y (Δ) и I(M206)H (□) пурпурной бактерии *C. sphaeroides*, измеренные в течение 60 мин инкубации при 48 °С в ТХ-буфере

и *Rba. capsulatus*, оказала большее дестабилизирующее влияние на структуру комплекса, по сравнению с одиночной мутацией I(M206)Q. Результаты, приведенные на рис. 5 позволяют предположить, что замещение M206 Ile → Tyr не повлияло на термостабильность РЦ или даже привело к небольшой стабилизации структуры комплекса, например, как было ранее показано для РЦ с замещением M197 Phe → His [29]. Однако при нагревании в буфере с детергентом *n*-октил-глюкозидом при 48 и 55 °С РЦ I(M206)Y проявляли значительно меньшую устойчивость к термальной денатурации по сравнению с РЦ дикого типа (данные не приведены). Таким образом, относительно высокая термостабильность структуры мутантных РЦ I(M206)Y, очевидно, объясняется стабилизирующим действием детергента холата натрия, показанным ранее [24].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как упоминалось во введении, Ile-M206 расположен в непосредственной близости от молекул предполагаемых участников первого этапа разделения зарядов (рис. 1, б). Моделирование аминокислотного замещения I(M206)Q с помощью программы PyMol показывает 16 возможных положений боковой группы Gln в положении M206. В зависимости от положения этой группы замещение M206 Ile → Gln потенциально может изменить взаимодействия любой из перечисленных молекул с их окружением, что должно повлиять на квантовый выход

разделения зарядов в мутантных РЦ. Так, показано, что мутация I(M204)E в РЦ *Rba. capsulatus* привела к образованию водородной связи между внесенным остатком Glu и гидроксильной группой Tyr-M210, что повлияло на кинетику образования состояния  $P^+H_A^-$  [16].

В данной работе показано, что аминокислотное замещение I(M206)Q заметно повлияло на спектральные свойства димера Р и мономерных БХл. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что различные факторы могут влиять на положение и амплитуду полосы  $Q_y$  Р. Среди них ориентация С2-ацетильной группы БХл, расстояние между макроциклами в димере, электростатическое окружение и другие [30, 31]. Согласно полученным данным, окислительный потенциал Р, и, очевидно, ориентация С2-ацетильной группы БХл Р<sub>В</sub> в мутантных РЦ не претерпели значительных изменений. Gln, как и Ile, является нейтральной аминокислотой, поэтому в результате мутации I(M206)Q изменения электростатического окружения Р также не ожидается. Таким образом, причина спектральных изменений в области поглощения димера БХл остается неясной. В связи с перекрыванием полос  $Q_y$  В и  $Q_y$  Р уменьшение поглощения в области  $Q_y$  В вблизи 800 нм в мутантных РЦ, по-видимому, связано со снижением амплитуды полосы  $Q_y$  Р. Учитывая расположение сайта мутации, длинноволновый сдвиг и снижение амплитуды полосы поглощения  $Q_y$  В может свидетельствовать об образовании новых взаимодействий БХл В<sub>А</sub> с белком. Как одно из предположений, в мутантных РЦ боковая группа Gln-M206 могла обра-

зовать водородную связь с близкой к месту мутации С9-кето-группой БХл В<sub>А</sub>. В этом случае перенос электрона от Р\* на В<sub>А</sub> через цепочку полярных связей, о котором говорилось выше, окажется затруднен. Как показано в данной работе, в мутантных РЦ I(M206)Q время жизни возбужденного состояния первичного донора электрона Р\* составляет ~22 пс, что свидетельствует о значительном замедлении переноса электрона с Р\* на БХл В<sub>А</sub> и согласуется с этим предположением.

Ранее аналогичное 8-кратное замедление затухания состояния Р\* наблюдали в РЦ *C. sphaeroides* с замещением G(M203)L [9]. Структура этого РЦ показала, что в результате мутации вода-А оказалась стерически вытеснена боковой группой лейцина M203. В спектрах поглощения РЦ G(M203)L наблюдали небольшой коротковолновый сдвиг полосы Q<sub>Y</sub> Р без уменьшения дипольной силы этой полосы, а также коротковолновый сдвиг полосы Q<sub>Y</sub> В без снижения ее амплитуды [9]. Поскольку спектры поглощения РЦ I(M206)Q, описанные в данной работе, и РЦ G(M203)L, описанного ранее [9], существенно отличаются в области полосы Q<sub>Y</sub> В (рис. 2), можно предположить, что характер изменений межмолекулярных взаимодействий, вызванный внесением Gln-M206, отличается от изменений, вызванных замещением Gly-M203 на Leu. Для уточнения деталей этих взаимодействий необходима информация о пространственной структуре РЦ I(M206)Q.

Для РЦ I(M206)Q было отмечено уменьшение квантового выхода образования состояния с разделенными зарядами Р<sup>+</sup>Q<sub>А</sub><sup>-</sup> до ~60% от величины квантового выхода в РЦ ДТ (рис. 4). Наряду с предположением о том, что данная мутация могла повлиять на скорости как прямых, так и обратных реакций переноса электрона (см. раздел «Результаты исследования»), также можно ожидать, что внесение аминокислотного замещения в участок D-спирали M-субъединицы вблизи кофакторов активной цепи фотопереноса электрона могло привести к изменению динамики белка. В недавней работе Dods et al. [32] были показаны заметные изменения конформаций E α-спирали L-субъединицы и D α-спирали M-субъединицы, происходящие в процессе фотохимической реакции, и, по-видимому, связанные с эффективным протеканием этого процесса.

Несмотря на то что генетическая система для направленного мутагенеза и структурно-функциональных исследований РЦ *Rba. capsulatus* была получена раньше, чем для

других пурпурных бактерий [33], закристаллизовать этот комплекс и расшифровать его структуру до настоящего времени не удалось. В работе Foloppe et al. [34] была сделана попытка гомологического моделирования структуры РЦ *Rba. capsulatus* на основе известных к тому времени структур пурпурных бактерий *B. viridis* и *C. sphaeroides* с разрешениями 2,3 Å и 2,8 Å соответственно. Относительно невысокое разрешение структуры РЦ *C. sphaeroides*, используемой для гомологического моделирования, значительно ограничивало возможности этого подхода. Тем не менее были обнаружены небольшие, но достоверные различия во взаимной ориентации мономерных БХл и БФео В-цепи между РЦ *C. sphaeroides* и моделью РЦ *Rba. capsulatus* [34]. Значимых различий в белковом окружении кофакторов активной цепи А, выходящих за пределы ошибки разрешения структуры РЦ *C. sphaeroides*, найдено не было.

До недавнего времени пурпурные несерные бактерии *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* относились к одному роду *Rhodobacter* [1], а их РЦ считались высокогомологичными комплексами [35]. В нашей работе показано, что свойства РЦ *C. sphaeroides* с замещением I(M206)Q существенно отличаются от свойств мутантных РЦ близкородственной бактерии *Rba. capsulatus* с аналогичной заменой I(M204)Q, в которых эта мутация приводила к утере БХл В<sub>А</sub> из структуры РЦ [17]. Эти результаты являются достаточно неожиданными, если учитывать высокую консервативность Ile-M206 в РЦ пурпурных бактерий, значительное сходство общей архитектуры двух пигмент-белковых комплексов, одинаковый состав кофакторов, особенности взаимодействия хромофоров с их белковым окружением [36], а также высокую (77%) общую степень гомологии белковых последовательностей этих РЦ [35]. Особенно высока гомология белкового окружения бактериохлорофиллов функционально активных цепей переноса электрона, достигающая 96% для α-спирали D M-субъединиц РЦ.

Предположение о возможных причинах различного влияния замещения Ile → Gln в аналогичных позициях M206 и M204 в РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* может быть сделано на основе экспериментальных данных, полученных ранее Wang et al. [37]. В этой работе было проведено сравнение свойств изолированных РЦ четырех пурпурных бактерий, включая *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus*. Были отмечены разные положения максимумов полос Q<sub>Y</sub> Р в спектре поглощения этих РЦ, разные положения максимумов полосы окислен-

ного донора электрона  $P^+$  при 1250 нм, а также отличия в дипольной силе этих полос. Кроме того, было показано различное влияние ионных детергентов на положения максимумов полос  $Q_Y P$  в РЦ этих двух бактерий [37]. Одновременно в работе Rautter et al. [38] было показано, что электронная структура  $P$  в мембраносвязанных и изолированных РЦ *C. sphaeroides* была одинакова, тогда как в РЦ *Rba. capsulatus* она менялась после выделения этих пигмент-белковых комплексов из мембран. Wang et al. [37] предположили, что РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* отличаются друг от друга характером связывания и электростатического взаимодействия фосфолипидов мембраны с димером БХл и его окружением. Поскольку сайт внесенной мутации M206/M204 расположен непосредственно в белковом окружении  $P$ , мы предполагаем, что эти отличия могли послужить причиной различного влияния аминокислотного замещения Ile  $\rightarrow$  Gln на свойства РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus*. Также нельзя исключать существование отличий в расстояниях между аминокислотным остатком в положении M206/M204 и ближайшими кофакторами, которые могли послужить причиной разных последствий аналогичного аминокислотного замещения и для выявления которых требуется расшифровка структуры *Rba. capsulatus*.

В данной работе также показано, что аминокислотные замещения I(M206)Q и I(M206)Q + F(M208)A повлияли на устойчивость структуры РЦ к повышенным температурам. Для РЦ двойного мутанта снижение термостабильности было более выражено, чем для РЦ I(M206)Q. Одной из возможных причин изменения стабильности мутантных РЦ может быть повышение подвижности трансмембранной  $\alpha$ -спирали D M-субъединицы РЦ (рис. 1, б) за счет уменьшения парциального молекулярного объема аминокислотных остатков в положениях M206 и M208 в результате внесения мутаций. Так, замещение гидрофобного остатка Ile на полярный Gln приводит к локальному уменьшению объема остатка в положении M206 на 11,7 см<sup>3</sup>/моль, а замещение гидрофобных остатков Phe  $\rightarrow$  Ala в положении M208 уменьшает парциальный объем в данном участке на 38,6 см<sup>3</sup>/моль [39]. Таким образом, суммарное уменьшение парциального молекулярного объема остатков M206 и M208 в D-спирали M-субъединицы за счет двойной мутации I(M206)Q + F(M208)A составляет 50,3 см<sup>3</sup>/моль, что сопоставимо с объемом небольшого аминокислотного остатка. Можно ожидать, что такое изменение приводит к нарушению плот-

ной упаковки трансмембранного участка белка вблизи бактериохлорофиллов  $P$  и  $V_A$ , ослаблению Ван-дер-Ваальсовых и гидрофобных взаимодействий в этой области и, как следствие, к снижению стабильности мутантных РЦ. Следует также заметить, что 28 аминокислотных остатков D-спиралей M-субъединиц РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* отличаются только одним остатком в положении M208 [35], и этот сайт в РЦ *C. sphaeroides* является местом связывания гликолипида [15]. Можно предположить существование различий во взаимодействии двух РЦ с этим липидом, что также могло послужить причиной дестабилизации РЦ *C. sphaeroides* после внесения замещения M208 Phe  $\rightarrow$  Ala.

Таким образом, в данной работе получен и охарактеризован новый мутантный РЦ *C. sphaeroides* с аминокислотным замещением Ile  $\rightarrow$  Gln в положении M206 вблизи молекул БХл  $P_B$  и  $V_A$  в активной цепи кофакторов. Показано, что данная мутация не приводит к изменению пигментного состава комплекса, но заметно влияет на спектральные свойства кофакторов, близких к месту мутации, на время жизни  $P^*$  и на квантовый выход разделения зарядов, что, возможно, связано с образованием новых межмолекулярных взаимодействий в активной цепи кофакторов. Свойства РЦ *C. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* с одинаковым замещением Ile  $\rightarrow$  Gln в аналогичных позициях отличаются значительно, что, возможно, объясняется различиями во взаимодействиях этих комплексов с липидами фотосинтетической мембраны.

**Вклад авторов.** Л.Г. Васильева – концепция и руководство работой; Т.Ю. Фуфина, О.А. Третчикова, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов – проведение экспериментов; Л.Г. Васильева, Т.Ю. Фуфина, О.А. Третчикова, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов – обсуждение результатов исследования; Л.Г. Васильева, Т.Ю. Фуфина, А.М. Христин, Р.А. Хатыпов – написание и редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках госзадания № 122041100204-3.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность М.М. Леоновой за ее вклад в начальный этап работы.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hordt, A., Lopez, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., et al. (2020) Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of *Alphaproteobacteria*, *Front. Microbiol.*, **11**, 468, doi: 10.3389/fmicb.2020.00468.
- Wöhri, A. B., Wahlgren, W. Y., Malmerberg, E., Johansson, L. C., Neutze, R., K et al. (2009) Lipidic sponge phase crystal structure of a photosynthetic reaction center reveals lipids on the protein surface, *Biochemistry*, **48**, 9831-9838, doi: 10.1021/bi900545e.
- Selikhhanov, G., Fufina, T., Vasilieva, L., Betzel, C., and Gabdulkhakov, A. (2020) Novel approaches for the lipid sponge phase crystallization of the *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center, *IUCrJ*, **7**, 1084-1091, doi: 10.1107/S2052252520012142.
- Komiya, H., Yeates, T. O., Rees, D. C., Allen, J. P., and Feher, G. (1988) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: symmetry relations and sequence comparisons between different species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9012-9016, doi: 10.1073/pnas.85.23.9012.
- Wraight, C. A., and Clayton, R. K. (1974) The absolute quantum efficiency of bacteriochlorophyll photooxidation in reaction centres of *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 246-260, doi: 10.1016/0005-2728(74)90009-7.
- 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.), Ижевский Институт компьютерных исследований, Москва–Ижевск, с. 157-196.
- 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., et al. (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.
- Potter, J. A., Fyfe, P. K., Frolov, D., Wakeham, M. C., van Grondelle, R. B. R., et al. (2005) Strong effects of an individual water molecule on the rate of light-driven charge separation in the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center, *J. Biol. Chem.*, **280**, 27155-27164, doi: 10.1074/jbc.M501961200.
- Robert, B., and Lutz, M. (1988) Proteic events following charge separation in the bacterial reaction center: resonance Raman spectroscopy, *Biochemistry*, **27**, 5108-5114, doi: 10.1021/bi00414a024.
- Yakovlev, A. G., Jones, M. R., Potter, J. A., Fyfe, P. K., Vasilieva, L. G., et al. (2005) Primary charge separation between P\* and B<sub>A</sub>: electron-transfer pathways in native and mutant GM203L bacterial reaction centers, *Chem. Phys.*, **319**, 297-307, doi: 10.1016/j.chemphys.2005.08.018.
- Болгарина Т. И., Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г., Шкоропатов А. В., 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, doi: 10.1023/b:dobi.0000017147.33235.b4.
- Фуфина Т. Ю., Селиханов Г. К., Проскуряков И. И., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2019) Свойства реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides* с аминокислотными замещениями Ile на Tyr в позициях L177 и M206, *Биохимия*, **5**, 739-744, doi: 10.1134/S0006297919050110.
- Васильева Л. Г., Фуфина, Т. Ю., Габдулхаков, А. Г., Шувалов, В. А. (2015) Разные последствия одинаковых симметричных мутаций вблизи димера бактериохлорофилла в реакционном центре *Rhodobacter sphaeroides*. *Биохимия*, **80**, 767-774, doi: 10.1134/S0006297915060012.
- Camara-Artigas, A., Brune, D., and Allen J. P. (2002) Interactions between lipids and bacterial reaction centers determined by protein crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11055-11060, doi: 10.1073/pnas.162368399.
- Saggi, M., Carter, B., Zhou, X., Faries, K., Cegelski, L., et al. (2014) Putative hydrogen bond to tyrosine M208 in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter capsulatus* significantly slows primary charge separation, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 6721-6732, doi: 10.1021/jp503422c.
- Carter, B., Boxer, S. G., Holten, D., and Kirmaier, C. (2012) Photochemistry of a bacterial photosynthetic reaction center missing the initial bacteriochlorophyll electron acceptor, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 9971-9982, doi: 10.1021/jp305276m.
- Хатыпов Р. А., Васильева Л. Г., Фуфина Т. Ю., Болгарина Т. И., Шувалов В. А. (2005) Влияние замещения изолейцина L177 гистидином на пигментный состав и свойства реакционных центров пурпурной бактерии *Rhodobacter*

- sphaeroides*, *Биохимия*, **70**, 1527-1533, doi: 10.1007/s10541-005-0256-3.
19. Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trollinger, D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria, *Gene*, **70**, 191-197, doi: 10.1016/0378-1119(88)90117-5.
  20. Jones, M. R., Visschers, R. W., van Grondelle, R., and Hunter, C. N. (1992) Construction and characterization of a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* with the reaction center as the sole pigment-protein complex, *Biochemistry*, **31**, 4458-4465, doi: 10.1021/bi00133a011.
  21. Cohen-Basire, G., Siström, W. R., and Stanier, R. Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria, *J. Cell Comp. Physiol.*, **49**, 25-68, doi: 10.1002/jcp.1030490104.
  22. Goldsmith, J. O., and Boxer, S. G. (1996) Rapid isolation of bacterial photosynthetic reaction centers with an engineered poly-histidine tag, *Biochim. Biophys. Acta*, **1276**, 171-175, doi: 10.1016/0005-2728(96)00091-6.
  23. Fufina, T. Yu., Vasilieva, L. G., Khatypov, R. A., Shkuropatov, A. Ya., and Shuvalov, V. A. (2007) Substitution of isoleucine L177 by histidine in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center results in the covalent binding of P<sub>A</sub> bacteriochlorophyll to the L subunit, *FEBS Lett*, **581**, 5769-5773, doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.032.
  24. Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г. (2021) Влияние детергентов и осмолитов на термостабильность нативных и мутантных реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **86**, 607-614, doi: 10.1134/S000629792104012X.
  25. Vasilieva, L. G., Fufina, T. Yu., Gabdulkhakov, A. G., Leonova, M. M., Khatypov, R. A., et al. (2012) The site-directed mutation I(L177)H in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center affects coordination of P<sub>A</sub> and B<sub>B</sub> bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407-1417, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.008.
  26. Хатыпов Р. А., Христин А. М., Фуфина Т. Ю., Шувалов В. А. (2017) Альтернативный путь индуцированного светом трансмембранного переноса электрона в фотосинтетических реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **82**, 916-922, doi: 10.1134/S0006297917060050.
  27. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL molecular graphics system, URL: <http://www.Pymol.Org>.
  28. Jones, M. R. (2008) Structural plasticity of reaction centers from purple bacteria, in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C., and Beatty, N., eds) Springer, pp. 295-321.
  29. Holden-Dye, K., Crouch, L. I., Williams, C. M., Bone, R. A., Cheng, J., et al. (2011) Opposing structural changes in two symmetrical polypeptides bring about opposing changes to the thermal stability of a complex integral membrane protein, *Arch. Biochem. Biophys.*, **505**, 160-170, doi: 10.1016/j.abb.2010.09.029.
  30. Spiedel, D., Roszak, A. W., McKendrick, R., McAuley, K. E., Fyfe, P. K., et al. (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.
  31. Haffa, A. L. M., Lin, S., Katilius, E., Williams, J. C., Taguchi, A. K. W., et al. (2002) The dependence of the initial electron-transfer rate on driving force in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 7376-7384, doi: 10.1021/jp0257552.
  32. Dods, R., Bath, P., Morozov, D., Gagner, V. A., Arnlund, D., et al. (2021) Ultrafast structural changes within a photosynthetic reaction centre, *Nature*, **589**, 310-314, doi: 10.1038/s41586-020-3000-7.
  33. Youvan, D. C., Ismail, S., and Bylina, E. J. (1985) Chromosomal deletion and plasmid complementation of the photosynthetic reaction center and light-harvesting genes from *Rhodospseudomonas capsulate*, *Gene*, **38**, 19-30, doi: 10.1016/0378-1119(85)90199-4.
  34. Foloppe, N., Ferrand, M., Breton, J., and Smith, J. C. (1995) Structural model of the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter capsulatus*, *Proteins*, **22**, 226-244, doi: 10.1002/prot.340220304.
  35. Michel, H., Epp, O., and Deisenhofer, J. (1986) Pigment-protein interactions in the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*, *EMBO J.*, **5**, 2445-2451, doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04520.x.
  36. Lancaster, C. R. D., Ermler, U., and Michel, H. (1995) The structures of photosynthetic reaction centers from purple bacteria as revealed by X-ray crystallography. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, *Advances in Photosynthesis and Respiration* v. 2. (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., eds) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 503-526, doi: 10.1007/0-306-47954-0\_23.
  37. Wang, S., Lin, S., Lin, X., Woodbury, N. W., and Allen, J. P. (1994) Comparative study of reaction centers from purple photosynthetic bacteria: Isolation and optical spectroscopy, *Photosynth. Res.*, **42**, 203-215, doi: 10.1007/BF00018263.
  38. Rautter, J., Lenzian, F., Lubitz, W., Wang, S., and Allen, J. P. (1994) Comparative study of reaction centers from photosynthetic purple bacteria: electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopy, *Biochemistry*, **33**, 12079, doi: 10.1021/bi00206a010.
  39. Нолдинг Б. (2005) *Новейшие методы исследования биосистем*, Техносфера, Москва.

**PROPERTIES OF MUTANT PHOTOSYNTHETIC  
REACTION CENTERS OF PURPLE NON-SULFUR BACTERIA  
*Cereibacter sphaeroides* WITH SUBSTITUTION M206 Ile → Gln**

**T. Yu. Fufina, O. A. Tretchikova, A. M. Khristin, R. A. Khatypov, and L. G. Vasilieva\***

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

In the structure of the photosynthetic reaction center (RC) of the purple bacterium *Cereibacter sphaeroides* the highly conserved amino acid residue Ile-M206 is located near the primary electron donor P and the accessory bacteriochlorophyll molecule B<sub>A</sub>, which is the nearest electron acceptor. Since Ile-M206 is close to the C2-acetyl carbonyl group of bacteriochlorophyll P<sub>B</sub>, the hydroxyl group of Tyr-M210, the C9-keto group of bacteriochlorophyll B<sub>A</sub>, and a water molecule near the latter group, this site is useful for introducing mutations in order to study mechanisms of primary photochemical processes in the RC. Previously it was shown, that in the RC of the closely related purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*, the Ile → Glu substitution at M204 position (analog of M206 in the RC of *C. sphaeroides*) significantly affected the kinetics of the P<sup>+</sup>H<sub>A</sub><sup>-</sup> state formation whereas M204 Ile → Gln replacement led to the loss of BChl B<sub>A</sub> molecule from the complex structure. In the present work, it is shown that introduction of the single I(M206)Q or double I(M206)Q + F(M208)A amino acid substitutions in the RC of *C. sphaeroides* do not change the pigment composition or redox properties of primary electron donor. However, substitution of Ile M206 by Gln affected positions and amplitudes of the absorption bands of bacteriochlorophylls, increased lifetime of the primary electron donor P\* excited state from 3.1 ps to 22 ps, and decreased quantum yield of the P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> state to 60%. These data suggest significant changes in pigment-protein interactions near the primary electron donor P and the nearest electron acceptor B<sub>A</sub>. A considerable decrease in thermal stability of the RC I(M206)Q + F(M208)A was also noticed that apparently associated with disturbance of the dense packing of the membrane protein environment of bacteriochlorophylls P<sub>B</sub> and B<sub>A</sub>. Possible reasons for different effects of identical mutations on the properties of the two highly homologous RCs from closely related purple non sulfur bacteria are discussed.

*Keywords:* photosynthesis reaction center, *Rhodobacter capsulatus*, *Cereibacter sphaeroides*, bacteriochlorophyll, purple non sulfur bacteria, photochemical charge separation, quantum yield, pigment composition, redox potential, primary electron donor, thermal stability of membrane proteins