

УДК 541.14

РАЗНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ОДИНАКОВЫХ СИММЕТРИЧНЫХ МУТАЦИЙ ВБЛИЗИ ДИМЕРА БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА В РЕАКЦИОННОМ ЦЕНТРЕ *Rhodobacter sphaeroides*

© 2015 Л.Г. Васильева^{1*}, Т.Ю. Фуфина¹,
А.Г. Габдулхаков², В.А. Шувалов¹

¹ Институт фундаментальных проблем биологии,
142290 Пущино Московской обл.; факс: +7(496)733-0532,
электронная почта: vsyulya@mail.ru

² Институт белка, 142290 Пущино
Московской обл.; факс: +7(495)514-0218,
электронная почта: protres@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 03.12.14
После доработки 11.02.15

В бактериальном реакционном центре (РЦ) асимметричное белковое окружение димера бактериохлорофилла (БХл) в значительной степени определяет фотофизические и фотохимические свойства первичного донора электрона. Ранее нами были замечены существенные различия в свойствах РЦ *Rhodobacter sphaeroides* с одинаковыми заменами в симметричных позициях – I(M206)Н и I(L177)Н. Мутация I(L177)Н приводила к появлению ковалентной связи БХл Р_А с L-субъединицей, а также к образованию шестой координационной связи центрального атома Mg²⁺ бактериохлорофилла В_В с его белковым окружением. В РЦ I(M206)Н подобных изменений пигмент-белковых взаимодействий обнаружено не было. Кроме того, удельное количество РЦ I(M206)Н после очистки из мембран было на порядок ниже, чем количество РЦ I(L177)Н. В данной работе показано, что замены аминокислотных остатков в положениях M203–M206 вблизи молекул Р_В и В_А на симметричные им остатки L-субъединицы из окружения БХл Р_А и В_В приводят к дальнейшему снижению количества РЦ в мембранах, связанному, очевидно, с нарушением сборки комплекса. Внесение водородной связи БХл Р_В с белком с помощью мутации F(M197)Н стабилизировало мутантные РЦ, однако не повлияло на их низкий выход при очистке. Предполагается, что мутация I(M206)Н и замены аминокислотных остатков в положениях M203–M205 могли нарушить связывание гликолипида с поверхностью РЦ вблизи мономерного БХл В_А, необходимое для стабильной сборки комплекса в мембране.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериальный фотосинтез, *Rhodobacter sphaeroides*, фотосинтетический реакционный центр, направленный мутагенез, бактериохлорофилл, координирование магния, пигмент-белковые взаимодействия.

Фотосинтез относится к важнейшим биохимическим процессам, поддерживающим жизнь на Земле. Первые этапы процесса преобразования энергии света в энергию химических связей происходят в фотосинтетических реакционных центрах (РЦ) растений, водорослей и бактерий. РЦ пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* состоит из трех белковых субъединиц L, M и H и десяти кофакторов, нековалентно связанных с белком. Кофакторы представлены

четырьмя молекулами бактериохлорофилла (БХл), двумя молекулами бактериофеофитина (БФео), двумя молекулами убихинона, атомом негемового железа и молекулой каротиноида [1]. В структуру РЦ включено значительное количество молекул воды [1–5], часть которых играет важную роль в функционировании комплекса [6, 7]. Кроме того, во многих известных к настоящему времени кристаллографических структурах РЦ *Rba. sphaeroides* обнаружено от одной до трех молекул липидов, которые, по-видимому, участвуют в прочном связывании кофакторов [4, 8].

Одной из особенностей РЦ является сочетание относительной структурной симметрии и строгой функциональной асимметрии. Несмотря на то, что кофакторы организованы в две псевдосимметричные ветви, А и В, только одна

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл; РЦ – реакционный центр; Р – специальная пара бактериохлорофиллов; Р_А и Р_В – бактериохлорофиллы специальной пары; В_А и В_В – мономерные бактериохлорофиллы; ЛДАО – лаурилдиметиламиноксид.

* Адресат для корреспонденции.

из них, ветвь А, функционально активна [9]. Известно, что степень гомологии аминокислотных последовательностей L- и М-субъединиц, связывающих кофакторы, составляет всего ~30% [2]. Известен ряд работ, направленных на искусственную «симметризацию» РЦ *Rba. capsulatus*, на повышение гомологии отдельных участков L- и М-субъединиц [10, 11]. Долгое время считалось, что именно различие белкового окружения кофакторов в двух ветвях переноса электрона лежит в основе функциональной активности А-ветви и неактивности В-ветви. Согласно последним данным, липиды, связанные с поверхностью комплекса, также могут участвовать в обеспечении структурной и функциональной асимметрии РЦ [4, 8].

В пространственной структуре РЦ *Rba. sphaeroides* на периплазматической стороне мембраны два БХл, P_A и P_B, формируют специальную пару Р, перекрываясь на уровне первых колец тетрапирролов (рис. 1, а). Ближайшее белковое окружение Р отличается высокой консервативностью и низкой степенью гомологии (рис. 1, б). В результате многочисленных исследований последних лет было показано, что окружение димера БХл в значительной степени определяет его фотофизические и фотохимические свойства как первичного донора электрона [9, 12, 13]. Также было показано, что в зависимости от количества водородных связей Р с ближайшими аминокислотными остатками может меняться термостабильность мутантных РЦ [14].

Недавно нами было показано, что одиночное аминокислотное замещение изолейцина на гистидин вблизи димера БХл в двух симметричных позициях – М206 и L177 (рис. 1) приводит к сходным спектральным изменениям в РЦ *Rba. sphaeroides* [15–17]. В частности, в обоих случаях в спектре поглощения РЦ наблюдались падение дипольной силы и коротковолновый сдвиг Q_у полосы Р, а также отмечалось снижение стабильности РЦ [15–17]. В то же время были замечены существенные различия. Мутация I(L177)H приводит к появлению ковалентной связи БХл P_A с L-субъединицей, а также к образованию шестой координационной связи центрального атома Mg²⁺ бактериохлорофилла В_B с его белковым окружением [5, 17, 18], в то время как в РЦ I(M206)H подобных изменений пигмент-белковых взаимодействий обнаружено не было [15]. Следует также отметить, что снижение стабильности РЦ было более выражено в случае РЦ I(M206)H, и удельное количество этих РЦ при очистке из мембран было на порядок ниже, чем количество РЦ I(L177)H.

Целью данной работы было исследование причин различных последствий одинаковых замещений в симметричных позициях вблизи молекулы Р, направленное на понимание природы ковалентной связи БХл с белком в РЦ I(L177)H. Для повышения сходства белкового окружения БХл P_B и В_A с окружением молекул P_A и В_B были проведены аминокислотные замены в коротком, M203–M206, и более протяженном, M203–M212,

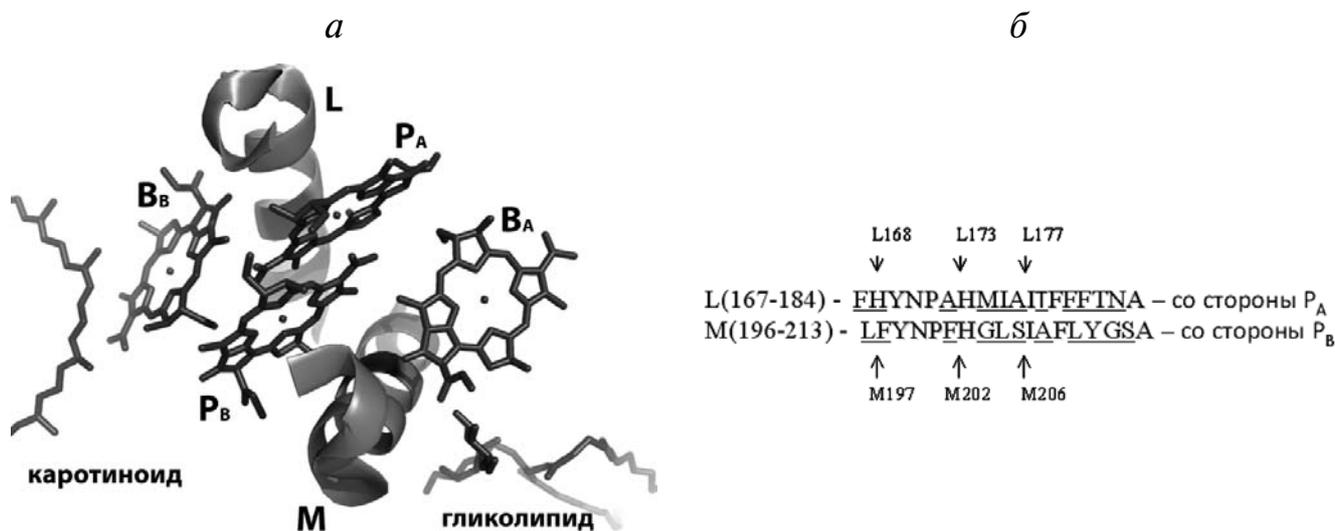


Рис. 1. а – Участки L(167–183) и M(196–212) α -спиралей L- и М-субъединиц вблизи бактериохлорофиллов в структуре РЦ *Rba. sphaeroides* (PDB 1M3X, [4]). Фитольные «хвосты» бактериохлорофиллов не показаны для улучшения обзора; б – фрагменты аминокислотных последовательностей α -спиралей, показанных на левом рисунке [5]. Гомологичные последовательности выделены, негомологичные – подчеркнуты. Позиции изолейцинов M206 и L177, гистидиновых лигандов M202 и L173, а также гистидина L168 и фенилаланина M197 показаны стрелками

участках трансмембранной α -спирали М-субъединицы. Кроме того, было внесено аминокислотное замещение F(M197)H, призванное стабилизировать мутантные РЦ за счет образования водородной связи между ацетильной группой БХл Р_В и имидазольной группой His-M197.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки рекомбинантных штаммов *Rba sphaeroides* выращивали на культуральной среде Хатнера в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл), канамицина (5 мкг/мл) и стрептомицина (5 мкг/мл) как описано ранее [16]. Процедура получения хромофоров из несодержащих антенн штаммов *Rba. sphaeroides* и выделения РЦ с помощью метода ионообменной хроматографии описана ранее [16, 17]. Количество РЦ после очистки из мембран оценивали по длинноволновой полосе поглощения мономерных БХл вблизи 800 нм в 1 см кювете (ODV₈₀₀) в расчете на 1 л трехдневной культуры. Экстракцию пигментов из реакционных центров осуществляли смесью ацетона с метанолом в соотношении 7 : 2 по ранее описанному методу [19]. Спектры поглощения измеряли при комнатной температуре на спектрофотометре Shimadzu UV-1601PC (Япония). Моделирование пространственных структур РЦ проводили с помощью программы PyMol (<http://www.pymol.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 представлены спектры поглощения РЦ дикого типа, РЦ I(M206)H и РЦ I(L177)H. В спектрах РЦ I(M206)H и I(L177)H в области Q_Y-переходов наблюдается сходное смещение максимумов полосы поглощения первичного донора электрона Р в коротковолновую область: 870 нм для РЦ дикого типа, 852 нм для РЦ I(M206)H и 847 нм для РЦ I(L177)H (рис. 2). Кроме того, в спектре РЦ I(M206)H наблюдается появление дополнительной полосы при 831 нм, природа которой не ясна. Количество РЦ после очистки в расчете на 1 л культуры составило 4–5 ODV₈₀₀ для дикого типа, 2–3 ODV для I(L177)H и 0,1 ODV для I(M206)H.

При замене аминокислотных остатков в положениях M203–M206 на остатки из симметричного участка L-субъединицы, L174–L176, изменялись свойства и молекулярный объем белкового окружения БХл Р_В (рис. 1, б). Значения парциальных молекулярных объемов аминокислотных остатков при 25° в воде, взяты из работы [20], приведены в скобках и указаны в см³·моль⁻¹.

В положении M203 остаток Gly (37,5) был заменен на остаток Met (99,6) большего объема. В положении M204 Leu (101,9) был заменен на Ile (99,9). Оба аминокислотных остатка алифатические, сходного объема, но с разной длиной боковых цепей. В положении M205 слабополярный остаток Ser (55,0) был заменен на неполярный Ala (54,7) сходного объема [20].

В спектре поглощения РЦ с двойной заменой G(M203)M+I(M206)H наблюдалось смещение длинноволновой полосы первичного донора электрона (870 нм в РЦ дикого типа) в коротковолновую область до 848 нм и длинноволновый сдвиг Q_Y полосы поглощения мономерных БХл от 804 до 810 нм. Как и в спектре РЦ I(M206)H, отмечалось появление полосы с максимумом при 831 нм (рис. 3, а). Удельное количество РЦ G(M203)M+I(M206)H при очистке, как и для РЦ I(M206)H, составило около 0,1 ODV₈₀₀ на 1 л трехдневной культуры. Аналогичные спектральные изменения наблюдались также в РЦ с двойной мутацией S(M205)A + I(M206)H и в РЦ с четырьмя замещениями G(M203)M + L(M204)I + S(M205)A + I(M206)H, которые далее для краткости будут обозначены как M203–M206 (рис. 3, б и в). РЦ этих мутантов были крайне нестабильны при выделении их из мембран, и их количество после очистки составило менее 0,01 ODV₈₀₀ на 1 л культуры.

В РЦ дикого типа гистидин L168 связан водородной связью с ацетильной группой БХл Р_А. С помощью мутации F(M197)H была внесена симметричная водородная связь между гистидином M197 и БХл Р_В. Новая Н-связь была призвана не только повысить симметрию белкового

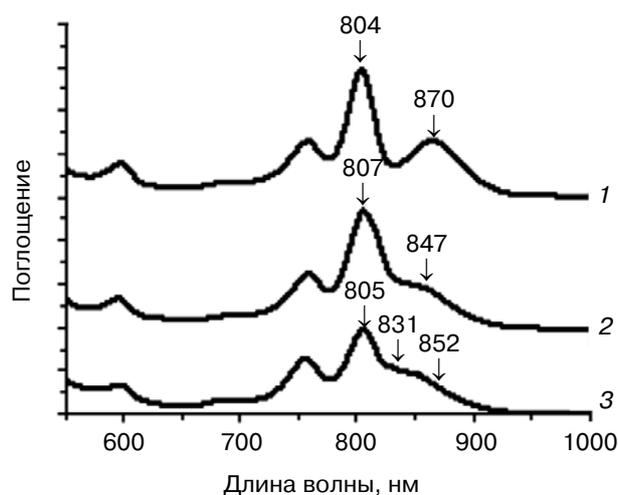


Рис. 2. Спектры поглощения РЦ дикого типа (1), РЦ I(L177)H (2) и РЦ I(M206)H (3)

окружения Р, но также стабилизировать его структуру. Добавление замены F(M197)H стабилизировало РЦ, и удельный выход РЦ с пятью заменами F(M197)H + G(M203)M + L(M204)I + S(M205)A + I(M206)H оказался на порядок выше по сравнению с количеством РЦ M203–M206, 0,1 ODV₈₀₀ на 1 л культуры. Спектр поглощения этого РЦ стал сходен со спектром РЦ I(L177)H (рис. 3, *з*). Кроме того, в спектре поглощения РЦ с пятью замещениями отсутствовала полоса при 831 нм. Полученные данные позволяют предположить, что появление этой полосы связано с нестабильностью структуры первичного донора электрона в мутантных РЦ и, как следствие, с гетерогенностью РЦ – присутствием примеси РЦ, у которых экситонное взаимодействие БХл специальной пары ослаблено или нарушено.

Для дальнейшего повышения симметрии белкового окружения димера БХл было внесено еще шесть аминокислотных замещений в пози-

циях M207–M212, воспроизводящих аминокислотную последовательность соответствующего участка L-субъединицы (L177–L183). В длинноволновой области спектра поглощения хроматофоров F(M197)H + (M203–M212) наблюдаются три основных полосы – при 756, 801 и 856 нм. Полоса поглощения БФео при 756 нм по амплитуде значительно превалирует над остальными, указывая на нестабильность РЦ в составе мембран и о накоплении свободных и агрегированных форм БФео (рис. 4). Выделить эти комплексы из мембран не удалось.

Согласно результатам пигментного анализа соотношение пигментов БХл/БФео во всех вновь полученных очищенных мутантных РЦ было таким же, как и в РЦ дикого типа и составило 2 : 1. Таким образом, было показано, что поэтапное повышение симметрии белкового окружения димера БХл в сочетании с аминокислотной заменой I(M206)H не только не приводит к воспроизведению ковалентной связи од-

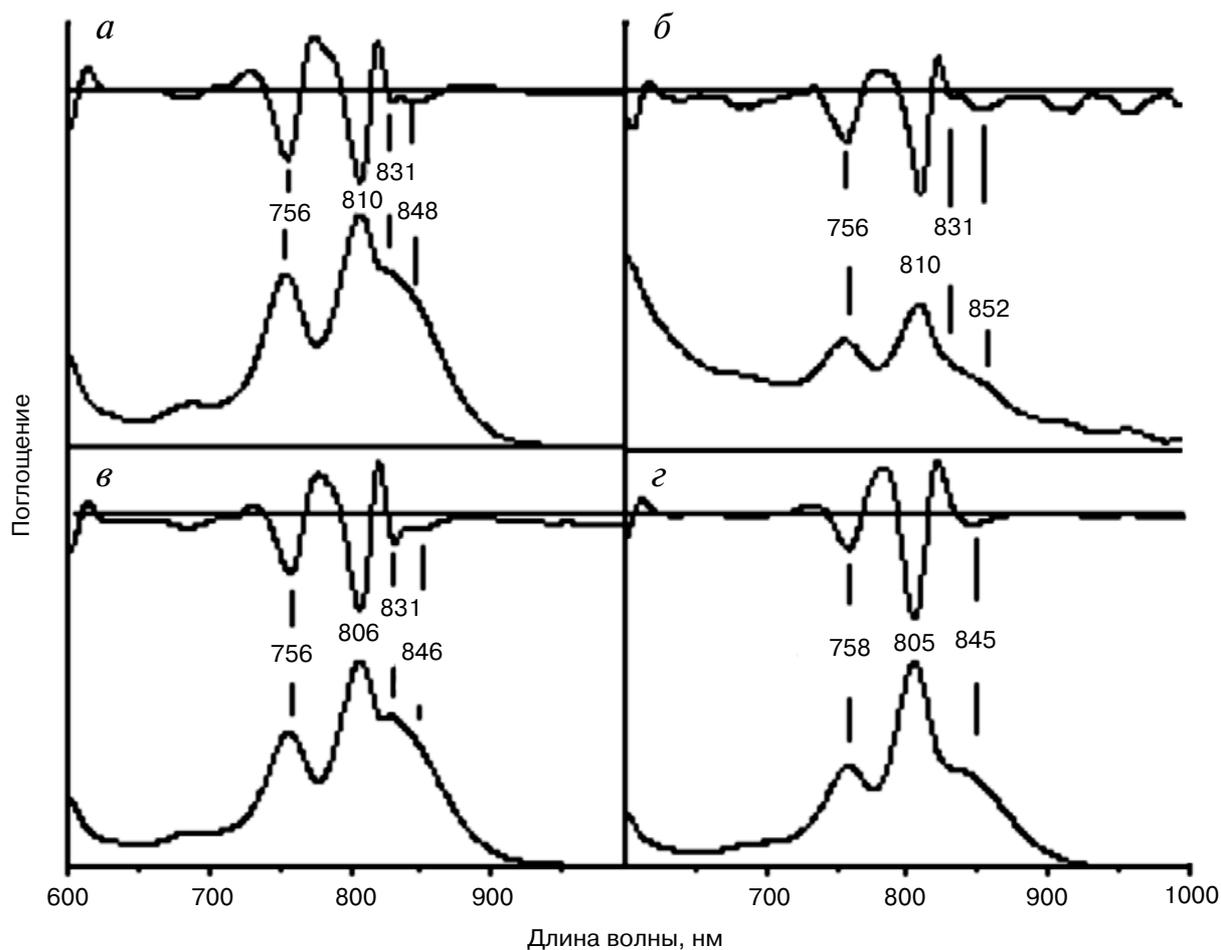


Рис. 3. Спектры поглощения реакционных центров G(M203)M + I(M206)H (*а*) S(M205)A + I(M206)H (*б*) M203–M206 (*в*) F(M197)H + (M203–M206) (*з*). Вторые производные спектров показаны сверху

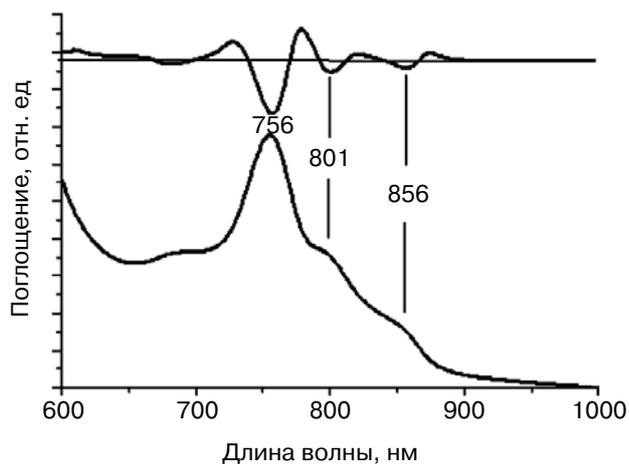


Рис. 4. Спектр хроматофоров F(M197)H + (M203–M212). Вторая производная спектра показана сверху

ного из БХл димера Р с белком, обнаруженной ранее в РЦ I(L177)H, но вызывает нарушение сборки мутантных комплексов в мембранах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то, что РЦ *Rba. sphaeroides* обладает внешними признаками симметрии, существует несколько принципиальных отличий во взаимодействии разных сторон димера БХл с его окружением: 1) высоко консервативные аминокислотные последовательности трансмембранных α -спиралей L- и M-субъединиц по обе стороны молекулы Р имеют низкую степень гомологии; 2) His-L168 связан водородной связью с ацетильной группой БХл Р_A, в то время как фенилаланин в симметричной позиции M197 не образует H-связи с БХл Р_B; 3) в структуре РЦ обнаружены сайты связывания липидов, и их расположение на поверхности комплекса асимметрично.

Ранее в работах [10, 11] была проведена симметризация белкового окружения кофакторов в РЦ *Rba. capsulatus* с целью исследования причин асимметрии фотосинтетического переноса электрона. Вблизи молекулы Р были внесены как протяженные (M187–M204, Sym1 мутант), так и более короткие (M194–M204, Sym1-2 мутант; M205–M211, Sym2-1 мутант) замены участков M-субъединицы на симметричные участки L-субъединицы. Не останавливаясь на свойствах РЦ мутантов с этими заменами, заметим лишь, что в Sym1 мутанте количество РЦ при очистке было снижено [11], а для хорошо охарактеризованных Sym1-2 и Sym2-1 мутантов такое упомина-

ние отсутствует [21]. Учитывая, что гомология аминокислотных последовательностей рассматриваемых участков вблизи Р в РЦ *Rba. capsulatus* и *Rba. sphaeroides* очень высока [22], можно предположить, что симметризация короткого участка M203–M205 не должна приводить к нарушению сборки РЦ *Rba. sphaeroides* в мембране, хотя в случае более протяженного участка M203–M212 такой эффект возможен.

По-видимому, снижение удельного выхода РЦ при очистке из мембран мутанта I(M206)H и других мутантов, полученных в данной работе, прежде всего, связано с внесением замещения Ile-His в позиции M206. После введения дополнительной H-связи между БХл Р_B и белком с помощью мутации F(M197)H исчезает спектральная гетерогенность полосы поглощения Р в мутантных РЦ, однако их количество после очистки остается низким. Примечательно, что спектральные свойства РЦ с пятью аминокислотными заменами F(M197)H + G(M203)M + L(M204)I + S(M205)A + I(M206)H и РЦ I(L177)H в значительной степени схожи, однако пигмент-белковые взаимодействия, возникающие в РЦ I(L177)H, а именно ковалентная связь БХл Р_A с L-субъединицей и б-координирование БХл Р_B, ни в одном другом из мутантных РЦ обнаружены не были.

Учитывая близость позиции M206 от места связывания гликолипида (рис. 1) можно предположить, что мутация I(M206)H и, возможно, дальнейшие замены аминокислотных остатков, направленные на симметризацию белкового окружения Р, могли нарушить связывание этого липида с поверхностью РЦ, необходимое для стабильной сборки комплекса [4]. Известно, что в структурах бактериальных РЦ, имеющихся в настоящее время в базе данных белков (PDB), обнаруживается от одного до нескольких липидов [8]. Наиболее часто встречается кардиолипид, но также есть данные о связывании фосфатидилхолина и гликолипида [4]. Отмечено, что липиды имеют постоянные сайты связывания на поверхности комплекса РЦ и, вероятно, играют структурную роль, укрепляя нестабильные участки белка за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий [8]. В работе [23] было показано, что аминокислотные остатки, контактирующие с кардиолипином, высоко консервативны, а мутации, нарушающие связывание этого липида, снижали термостабильность РЦ [24]. При выделении и очистке РЦ, по-видимому, происходит потеря части липидов, и поэтому во многих структурах РЦ в местах предполагаемого связывания липидов нередко обнаруживаются молекулы детергентов.

В структуре РЦ, полученной с разрешением 2,55 Å (PDB 1M3X), кристаллографически опре-

деляется гликолипид гликозил-галактозил-диацилглицерол, который взаимодействует преимущественно с М-субъединицей, а также с единственной трансмембранной спиралью Н субъединицы (рис. 1, а) [4]. Полярная дисахаридная часть этого липида располагается на расстоянии 3,5 Å от БХл В_А, а неполярный «хвост» гликолипида взаимодействует с изопреноидной цепью молекулы Q_А. Считается, что гликолипид создает гидрофобное окружение для мономерного БХл активной цепи переноса электрона, а также, возможно, стабилизирует структуру РЦ на участке соединения двух субъединиц. В пользу консервативности сайта связывания этого гликолипида свидетельствует тот факт, что в структуре РЦ *Rhodospseudomonas (Blastochloris) viridis* в том же месте присутствует электронная плотность, которая была интерпретирована как детергент [2]. В полученной нами структуре РЦ I(L177)Н на расстоянии 2,98 Å от БХл В_А была также обнаружена молекула ЛДАО (рис. 5).

Показано, что в структуре РЦ вблизи мономерного БХл В_А полярная дисахаридная часть гликолипида, способная участвовать в ионных взаимодействиях, близко контактирует с Leu-M204, Phe-M208 и Trp-M268 из М-субъединицы, а также с Leu-H24 и Ile-H28 из Н-субъединицы [4]. Можно предположить, что при замене участка M203–M206 на L174–L176 свойства белкового сайта связывания полярной части гликолипида изменяются вследствие замещения глицина-M203 на метионин, лейцина-M204 на изолейцин, и слабо полярного серина-M205 на неполярный аланин. Однако основное дестабилизирующее влияние на сборку РЦ в мембране, очевидно, вносит введение полярного гистидина в позицию M206, существенно нарушающее белок-белковые и белок-липидные взаимодействия вблизи бактериохлорофиллов активной цепи ко-факторов. Как известно, имидазольная группа гистидина в нейтральном состоянии обладает значительным дипольным моментом, наибольшим среди боковых групп других полярных аминокислотных остатков [25]. Если гистидин не вступает в устойчивые взаимодействия с ближайшими молекулами, его появление в гидрофобном окружении может в большой степени дестабилизировать структуру мембранного белка. В РЦ I(L177)Н введенный в симметричный сайт гистидин L177 образует ковалентную связь с БХл P_А, а также Н-связь с новой молекулой воды с β-стороны БХл В_В [5], о чем свидетельствует структура мутантного комплекса, полученная с разрешением 2,9 Å (рис. 5). Хотя РЦ I(L177)Н менее стабилен, чем РЦ дикого типа, удельные количества этих РЦ после очистки из мембран сравнимы. Вероятно, из-за присутствия глико-

липида вблизи БХл В_А образование подобных взаимодействий в РЦ I(M206)Н невозможно, что приводит к его дестабилизации, а также препятствует воспроизведению ковалентной связи БХл с белком, наблюдаемой в РЦ I(L177)Н.

Примером стабильного мутантного РЦ, в котором замещение I(M206)Н не создает проблем для сборки комплекса в мембране, служит РЦ I(M206)Н + Н(M202)L. Недавно нами было показано, что гистидиновые лиганды димера Р могут быть перемещены с их позиций L173 (лиганд БХл P_А) и M202 (лиганд БХл P_В) на один виток спирали на позиции L177 и M206 соответственно [5, 26, 27]. Перемещение лигандов приводит к значительному коротковолновому сдвигу полосы Q_Y Р, вызванному, очевидно, смещением плоскостей макроциклов в димере относительно друг друга и, как следствие, изменением экситонного взаимодействия в специальной паре Р. Моделирование на основе структуры РЦ I(L177)Н предполагает, что имидазольная группа гистидина L177 в РЦ I(L177)Н + Н(L173)L меняет свою ориентацию и поворачивается в сторону центрального атома магния БХл P_А. Сходство спектральных свойств и пигментного состава этих двух РЦ предполагает, что в результате одинаковых мутаций в них происходят похожие структурные изменения. Было отмечено, что, несмотря на присутствие «дестабилизирующей» мутации I(M206)Н, РЦ I(M206)Н + Н(M202)L отличается стабильностью и выделяется из мембран в количествах, сравнимых с удельным

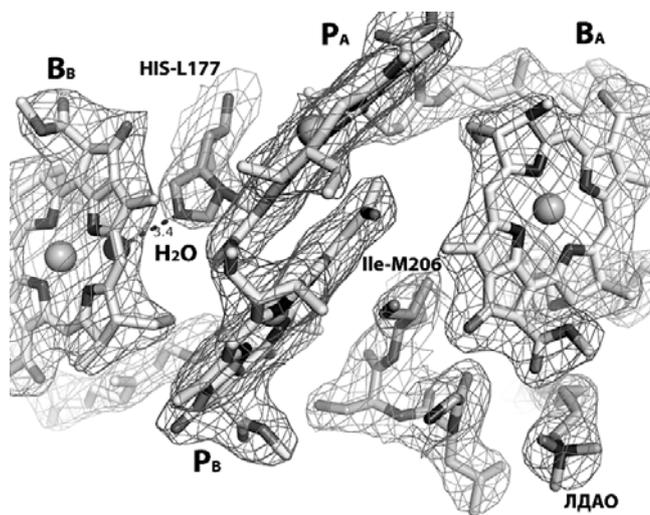


Рис. 5. Структура РЦ I(L177)Н вблизи молекул бактериохлорофиллов, разрешение 2,9 Å ([5], PDB ID 1E6D). Показаны димер БХл P_А и P_В, мономерные БХл V_А и V_В, молекула ЛДАО, участок M203–M206 в нижней части рисунка между БХл P_В и ЛДАО, а также гистидин L177 и изолейцин M206

выходом РЦ дикого типа. По-видимому, предполагаемое образование устойчивого взаимодействия His-M206 с атомом Mg²⁺ БХЛ Р_В убирает препятствия для связывания гликолипида и таким образом способствует нормальной сборке комплекса. Более детальную информацию об изменении локальной конформации белка в РЦ I(M206)H + H(M202)L может предоставить получение его кристаллической структуры с высоким разрешением, и такая работа ведется в настоящее время.

Таким образом, разные последствия одинаковых аминокислотных замещений в симметричных положениях M206 и L177 в реакционном

центре *Rba. sphaeroides* связаны, по-видимому, с присутствием вблизи БХЛ В_А полярной части молекулы гликолипида. Внесение His-M206, а также других аминокислотных остатков, замещаемых при симметризации белкового окружения Р, вероятно, мешает связыванию гликолипида и, как следствие, дестабилизирует РЦ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РАН, программы «Молекулярная и клеточная биология», программы Президента Российской Федерации (грант НШ-4525.2008.4) и РФФИ (гранты 12-04-00332, 13-04-40297-Н, 15-04-03041).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiyama, H., and Rees, D.S. (1987) Structure of reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the cofactors, *PNAS*, **84**, 5730–5734.
- Deisenhofer, J., and Michel, H. Nobel lecture. (1989) The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *EMBO*, **8**, 2149–2170.
- Ermiler, U., Fritzsche, G., Buchanan, S.K., and Michel, H. (1994) Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: cofactors and protein-cofactor interactions, *Structure*, **2**, 925–936.
- Camara-Artigas, A., Magee, C., Goetsch, A., and Allen, J.P. (2002) The structure of the heterodimer reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.55 Å resolution, *Photosynth. Res.*, **74**, 87–93.
- Vasilieva, L.G., Fufina, T.Y., Gabdulkhakov, A.G., Leonova, M.M., Khatypov, R.A., and Shuvalov, V.A. (2012) The site-directed mutation I(L177)H in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center affects coordination of P_A and B_B bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407–1417.
- Potter, J.A., Fyfe, P.K., Frolov, D., Wakeham, M.C., van Grondelle, R., Robert, B., and Jones, M.R. (2005) Strong effects of an individual water molecule on the rate of primary charge separation in the *Rhodobacter sphaeroides* reaction centre, *J. Biol. Chem.*, **280**, 27155–27164.
- Yakovlev, A.G., Jones, M.R., Potter, J.A., Fyfe, P.K., Vasilieva, L.G., Shkuropatov, A.Y., and Shuvalov, V.A. (2005) Primary charge separation between P* and B_A: electron-transfer pathways in native and mutant GM203L bacterial reaction centers, *J. Chem. Phys.*, **319**, 297–307.
- Jones, M.R. (2007) Lipids in photosynthetic reaction centres: structural roles and functional holes, *Prog. Lipid Res.*, **46**, 56–87.
- Леонова М.М., Фуфина Т.Ю., Шувалов В.А., Васильева Л.Г. (2014) Исследование пигмент-белковых взаимодействий в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий. В кн.: Современные проблемы фотосинтеза (под ред. Аллавердиева С.И., Рубина А.Б., Шувалова В.А.), Институт компьютерных исследований, Москва–Ижевск, с. 157–196.
- Robles, S.J., Breton, J., and Youvan, D.C. (1990) Partial symmetrization of the photosynthetic reaction center, *Science*, **248**, 1402–1405.
- Taguchi, A.K.W., Stocker, J.W., Alden, R.G., Causgrove, T.P., Peloquin, J.M., Boxer, S.J., and Woodbury, N.W. (1992) Biochemical characterization and electron-transfer reactions of *symI*, a *Rhodobacter capsulatus* reaction center symmetry mutant which affects the initial electron donor, *Biochemistry*, **31**, 10345–10355.
- Hughes, A.V., Rees, P., Heathcote, P., and Jones, M.R. (2006) Kinetic analysis of the thermal stability of the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biophys. J.*, **90**, 4155–4166.
- Jones, M.R. (2009) in *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., and Beatty, J.T., eds), Springer, 295–321.
- Holden-Dye, K., Crouch, L.I., Williams, C.M., Bone, R.A., Cheng, J., Bohles, F., Heathcote, P., and Jones, M.R. (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.
- Болгарина Т.И., Хатыпов Р.А., Васильева Л.Г., Шкуropатов А.В., Шувалов В.А. (2004) Замещение изолейцина M206 на гистидин в реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides* приводит к изменению структуры молекулы бактериохлорофилла специальной пары, *Докл. Академии наук*, **394**, 265–268.
- 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.
- Fufina, T.Y., Vasilieva, L.G., Khatypov, R.A., Shkuropatov, A.Y., and Shuvalov, V.A. (2007) Substitution of isoleucine L177 by histidine in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center results in the covalent binding of P_A bacteriochlorophyll to the L-subunit, *FEBS Lett.*, **581**, 5769–5773.
- Фуфина Т.Ю., Васильева Л.Г., Хатыпов Р.А., Шувалов В.А. (2011) Свойства фотосинтетического реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides* с двойным аминокислотным замещением I(L177)H + H(M182)L, *Биохимия*, **76**, 551–557.
- van der Rest, M., and Gingras, G. (1974) The pigment complement of the photosynthetic reaction center isolated from *Rhodospirillum rubrum*, *J. Biol. Chem.*, **249**, 6446–6453.
- Нолдинг Б. (2005) *Новейшие методы исследования биосфер, Техносфера*, Москва.
- Taguchi, A.K., Eastman, J.E., Gallo, D.M., Sheagley, E., Xiao, W., and Woodbury, N.W. (1996) Asymmetry requirements in the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter capsulatus*, *Biochemistry*, **35**, 3175–3186.

22. El-Kabbani, O., Chang, C.H., Tiede, D., Norris, J., and Schiffer, M. (1991) Comparison of reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospseudomonas viridis*: overall architecture and protein-pigment interactions, *Biochemistry*, **30**, 5361–5369.
23. Wakeham, M.C., Jones, M.R., Sessions, R.B., and Fyfe, P.K. (2001) Is there a conserved interaction between cardiolipin and the Type II bacterial reaction center? *Biophys. J.*, **80**, 1395–1405.
24. Wakeham, M.C., Frolov, D., Fyfe, P.K., van Grondelle, R., and Jones, M.R. (2003) Acquisition of photosynthetic capacity by a reaction centre that lacks the Q(A) ubiquinone; possible insights into the evolution of reaction centres? *Biochim. Biophys. Acta*, **1607**, 53–63.
25. Sandberg L., and Edholm, O. (2001) Calculated solvation free energies of amino acids in a dipolar approximation, *J. Phys. Chem.*, **105**, 273–281.
26. Fufina, T.Y., Vasilieva, L.G., Khatypov, R.A., and Shuvalov, V.A. (2013) Spectral properties of the *Rhodobacter sphaeroides* mutant photo-reaction center with double amino acid substitution I(L177)H + H (L173)L, *Photosynthesis research for food, fuel and the future, Advanced Topics in Science and Technology in China*, 46–49.
27. Vasilieva, L.G., Fufina, T.Y., Gabdulhakov, A.G., Khatypov, R.A., and Shuvalov, V.A. (2014) Relocation BChl axial ligands in *Rhodobacter sphaeroides* mutant reaction centers, *Book of abstracts of International Meeting «Photosynthesis Research for Sustainability»*, Pushchino, p. 52.

**DIFFERENT EFFECTS OF IDENTICAL
SYMMETRY-RELATED MUTATIONS NEAR
BACTERIOCHLOROPHYLL DIMER
IN PHOTOSYNTHETIC REACTION
CENTER OF *Rhodobacter sphaeroides***

**L. G. Vasilyeva^{1*}, T. Y. Fufina¹,
A. G. Gabdulhakov², V. A. Shuvalov¹**

¹ *Institute of Basic Biological Problems, Pushchino, Moscow
Region 142290, Russia; fax: +7(496)733-0532,
E-mail: vsyulya@mail.ru*

² *Institute of Protein Research, Pushchino, Moscow
Region 142290, Russia; fax: +7(495)514-0218,
E-mail: protres@vega.protres.ru*

Received December 3, 2014
Revision received February 11, 2015

In bacterial photosynthetic reaction center (RC), the asymmetric protein environment of the bacteriochlorophyll (BChl) dimer largely determines the photophysical and photochemical properties of the primary electron donor. Previously, we noticed significant differences in properties of RC of *Rba. sphaeroides* with identical mutations in symmetry related positions – I(M206)H and I(L177)H. The substitution I(L177)H resulted in covalent binding of BChl P_A with L-subunit, as well as in 6-coordination of BChl B_B, whereas in RC I(M206)H no such changes of pigment–protein interactions were found. In addition, the yield of RC I(M206)H after its isolation from membranes was significantly lower than the yield of RC I(L177)H. This study shows that replacement of amino acid residues in positions M203–M206 near BChls P_B and B_A by symmetry-related residues from the L-subunit near BChls P_A and B_B leads to further decrease in RC amount in the membranes, obviously associated with poor assembly of the complex. Introduction of the new hydrogen bond between BChls P_B and its protein environment by means of the F(M197)H mutation stabilized the mutant RC, but it did not affect its low yield. We suggest that the I(M206)H mutation and substitution of amino acid residues in positions M203–M205 could disturb glycolipid binding on the RC surface near BChl B_A that is important for stable assembly of the complex in the membrane.

Key words: bacterial photosynthesis, *Rhodobacter sphaeroides*, photosynthetic reaction center, site-directed mutagenesis, bacteriochlorophyll, magnesium atom coordination, pigment-protein interactions