

АНОМАЛЬНАЯ ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ТРИПЛЕТ-ТРИПЛЕТНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ МУТАНТА I(L177)N *Cereibacter sphaeroides*

© 2024 Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева, И.Б. Кленина, И.И. Проскуряков*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: pros@issp.serpukhov.su

Поступила в редакцию 20.03.2024

После доработки 08.08.2024

Принята к публикации 22.08.2024

Тушение триплетного состояния первичного донора фотосинтетических реакционных центров за счёт переноса энергии на молекулу каротиноида является эффективным механизмом защиты от заселения химически активного синглетно-возбуждённого кислорода. Этот процесс в реакционных центрах *Cereibacter sphaeroides* является термоактивированным и прекращается при температурах ниже 40 К. Замещение в этих реакционных центрах аминокислотного остатка изолейцина на гистидин в положении 177 L-субъединицы приводит к резкому уменьшению энергии активации, так что триплеты каротиноида продолжают заселяться даже при температуре 10 К. Энергия активации триплет-триплетного переноса энергии у мутанта оценена в $7,5 \text{ см}^{-1}$, что более чем в десять раз ниже активационной энергии в исходных реакционных центрах. При этом в определённом диапазоне температур перенос энергии протекает у мутанта медленнее, что связано с увеличением эффективного расстояния триплет-триплетного переноса. Насколько нам известно, данная мутация – это первая модификация реакционных центров, в результате которой произошло значительное понижение энергии активации процесса триплет-триплетного переноса энергии на молекулу каротиноида. Реакционные центры мутанта I(L177)N представляют значительный интерес для дальнейших исследований механизмов тушения триплетных состояний и других фотофизических и фотохимических процессов в реакционных центрах бактериального фотосинтеза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: реакционный центр, первичный донор электрона, каротиноид, триплет-триплетный перенос энергии, температурная зависимость, направленный мутагенез, *Cereibacter sphaeroides*.

DOI: 10.31857/S0320972524090045 EDN: JJXTCO

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших защитных функций фототрофных организмов является тушение триплетных состояний фотосинтетических пигментов. Такие состояния возникают с определённой вероятностью на всех стадиях процессов переноса и преобразования энергии возбуждённых молекул пигментов, и особенно при фотоиндуцированном переносе электронов в реакционных центрах (РЦ).

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл; БФео – бактериофеофитин; Кар – каротиноид; РЦ – реакционный центр; В_А, В_В – мономерные бактериохлорофиллы; Р – димер бактериохлорофиллов, первичный донор РЦ; Q_А, Q_В – акцепторы РЦ, убихиноны; T-T – триплет-триплетный.

* Адресат для корреспонденции.

Триплеты большинства хлорофиллов и бактериохлорофиллов (БХл) представляют существенную потенциальную опасность, поскольку они имеют энергию, достаточную для заселения чрезвычайно активного [1] синглетно-возбуждённого состояния кислорода. В данной работе исследовали тушение триплетов БХл РЦ *Cereibacter* (ранее *Rhodobacter*) *sphaeroides*. В состав РЦ *C. sphaeroides* входят три белковые субъединицы и десять кофакторов: 4 молекулы БХл *a*, две молекулы бактериофеофитина (БФео) *a*, две молекулы убихинона (Q), ион негемового железа и одна молекула каротиноида (Кар), обычно сфероидена, в 15,15'-цис-конфигурации [2, 3]. Кофакторы организованы в две квазисимметричные цепи (часто обозначаемые А и В). Два из четырёх БХл образуют димер Р с достаточно сильным межмолекулярным взаимодействием, а остальные два БХл (В_А, В_В) взаимодей-

ствуют с кофакторами РЦ значительно слабее и называются мономерными БХл. Димер Р при возбуждении РЦ выполняет роль первичного донора электрона. Перенос электрона развивается в значительной степени селективно по А-цепи кофакторов: $^1P^* \rightarrow V_A \rightarrow B_{Fеo_A} \rightarrow Q_A \rightarrow Q_B$ [4, 5]. В ходе нормально функционирующего фотосинтеза все стадии переноса, вплоть до $P^+Q_B^-$, имеют суммарный нулевой спин, сохраняя исходное синглетное состояние возбуждённого первичного донора, $S = 0$. Если, однако, перенос электрона от БФео к убихинону невозможен (например, при интенсивном освещении, когда Q_A может находиться в восстановленном состоянии), в радикальной паре $[P^+B_{Fеo}^-]$ протекает синглет-триплетная спиновая эволюция, после рекомбинации зарядов приводящая к заселению триплетного состояния первичного донора, 3P . Квантовый выход 3P меняется в пределах от примерно 0,1 до 1 при понижении температуры от комнатной до < 70 К [4]. Чаще всего тушение триплетов (бактерио)хлорофиллов происходит за счёт быстрого переноса их энергии на молекулы Кар. Впервые этот процесс был исследован в работе Parson и Monger [6] для РЦ *C. sphaeroides*. Триплеты большинства бактериальных Кар лежат по энергии ниже уровня синглетного кислорода и имеют короткое время жизни, что эффективно предотвращает генерацию $^1O_2^*$. В этой же работе было обнаружено, что быстрый триплет-триплетный ($T-T$) перенос энергии с первичного донора на Кар замедляется при понижении температуры и при $T < 40$ К прекращается. Авторами было сделано предположение о том, что наблюдаемый перенос энергии – двухступенчатый, и промежуточное состояние расположено выше 3P по энергии, так что весь процесс принимает характер термоактивированного. В ряде последующих работ было показано, что роль такого состояния играет молекула мономерного БХл V_B , расположенная в неактивной цепи РЦ (рис. 1) [7–16]. Поскольку состояние 3V_B ни в одной из работ зарегистрировать не удалось, такой вывод был сделан на основе исследования изменения температурной зависимости скорости $T-T$ переноса $^3P \rightarrow$ Кар в результате модификаций РЦ, влияющих на уровни энергии триплетов Р или V_B , т.е. на энергию активации (E_a) процесса. Были применены такие подходы, как использование различных штаммов *C. sphaeroides* [7], химическая модификация РЦ [8, 10, 11] и, наконец, изменение белкового окружения кофакторов РЦ путём внесения направленных мутаций [9, 12–16]. Экспериментально определённое значение E_a для дикого штамма *C. sphaeroides* варьирует в пределах от 100 см^{-1} до $210 \pm 40 \text{ см}^{-1}$. Во всех перечисленных работах внесённые изменения приводили либо к заметному увеличению энергии

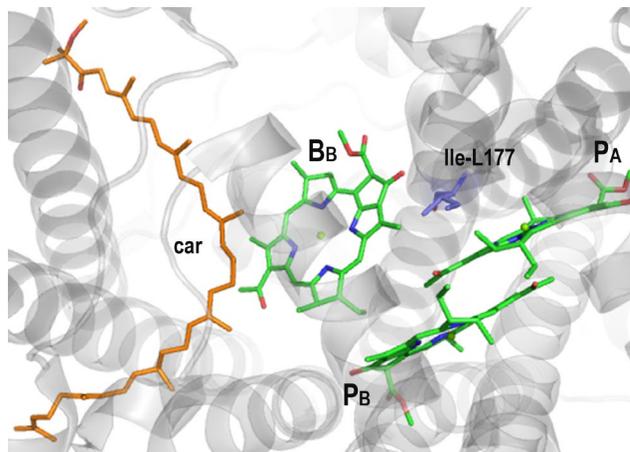


Рис. 1. Расположение аминокислотного остатка изолейцина L177 в структуре РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (PDB ID: 6Z02). Car – каротиноид

активации, либо к её незначительным изменениям. Невозможность наблюдения триплетов V_B была интерпретирована как результат быстрого переноса энергии $^3V_B \rightarrow$ Кар. Участие молекул V_B в тушении 3P также согласуется с рентгеноструктурными данными [2, 3]. $T-T$ перенос энергии протекает по механизму Декстера и требует перекрывания электронных оболочек донора и акцептора энергии, что приводит к экспоненциальному уменьшению скорости переноса с увеличением расстояния между участвующими молекулами [17, 18]. Расстояние между Р и Кар несколько превышает общепринятое предельное значение $T-T$ переноса (около 10 \AA). При этом молекула V_B расположена между Р и Кар, что делает её подходящим кандидатом на роль промежуточного акцептора.

В данной работе изучена аномальная температурная зависимость $T-T$ переноса энергии с 3P на Кар в РЦ мутанта I(L177)Н *C. sphaeroides* методами ЭПР с временным разрешением в диапазоне температур $200\text{--}10$ К и оптического флеш-фотолиза. В этом мутанте остаток изолейцина в положении L177 заменён на гистидин (рис. 1). Указанная мутация оказалась уникальной тем, что она приводит к значительному понижению активационной энергии E_a процесса $^3P \rightarrow$ Кар, так что перенос энергии с заселением триплетов Кар продолжается даже при $T = 10$ К.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение РЦ, несущих аминокислотную замену изолейцина на гистидин в позиции L177, описано ранее [19]. В качестве РЦ псевдодикого типа использовали РЦ, выделенные из штамма *C. sphaeroides* DD13, который содержал производ-

ную pRK-415, несущую немодифицированные копии генов *puf-LMX* [19]. Культуру рекомбинантных штаммов *C. sphaeroides* выращивали на среде Хатнера [20] в темноте, в полуаэробных условиях в присутствии тетрациклина (1 мкг/мл) и канамицина (5 мкг/мл). РЦ выделяли методом ионообменной (дикий тип) и аффинной (мутант) хроматографии, как описано ранее [21, 22]. Для работы с изолированными РЦ использовали буфер, содержащий 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 0,2%-ный холат натрия, который, как показано нами ранее, способствует стабилизации РЦ [23].

Измерения ЭПР проводили на спектрометре прямого детектирования высокого временного разрешения, разработанного в нашей лаборатории на базе 3-см спектрометра (РЭ 1306, СССР). Модуляцию магнитного поля выключали, сигнал снимали непосредственно с предусилителя блока СВЧ. Выходной сигнал усилителя подавался на вход стробоскопического интегратора SR 250 («Stanford Research Systems», США), где интегрировался в заданном временном интервале. Запуск интегратора (момент начала интегрирования) был синхронизирован с возбуждающей вспышкой света. Выходной сигнал интегратора записывали в память компьютера синхронно с развёрткой магнитного поля, управляемой тем же компьютером. Для повышения чувствительности развёртку магнитного поля проводили многократно, суммируя полученные спектры. Временное разрешение спектрометра составляет примерно 170 нс.

В качестве источника возбуждающего импульса света использовали лазерную систему («Solar Laser Systems», Белоруссия), состоящую из лазера накачки LQ 529В и параметрического преобразователя LP 603. Возбуждение, если не указано иначе, проводили в полосу поглощения Р; конкретные длины волн возбуждения указаны в подписях к рисункам. Энергия вспышки на поверхности образца составляла ~ 1 мДж при длительности 6 нс и ширине полосы генерации < 1 нм.

Изменения оптического поглощения образцов в ответ на такую же лазерную вспышку измеряли с помощью фотоумножителя ФЭУ-79 (СССР). Измерения сигнала триплетов Кар проводили на длине волны 540 нм с использованием интерференционного светофильтра и стеклянного фильтра СЗС-21 для подавления артефакта вспышки. Для измерения отклика системы измеряли сигнал от лазерной вспышки без образца и при удалённом стеклянном фильтре. Сигналы ФЭУ записывали на осциллограф НДО4022 («Teledyne/LeCroy», США) и затем передавали на компьютер для обработки.

Температуру образцов в обоих случаях стабилизировали при помощи криостатов ESR 900

(«Oxford Instruments», Англия). В качестве крионосителя использовали жидкий азот или жидкий гелий в зависимости от требуемой температуры. Препараты РЦ, содержащие 66% глицерина, помещали в кварцевые трубки внутренним диаметром 3 мм. Состояние с восстановленным акцептором Q_A получали путём добавления 10 мМ аскорбата натрия и замораживания под светом, начиная от температуры 285 К.

Использованная оптическая система не имеет достаточного временного разрешения для прямого определения интересующей нас скорости нарастания сигнала ³Кар. Кинетические параметры оптических изменений поглощения образца получали следующим образом. С использованием программы Origin («OriginLab», США) проводили свёртку функции отклика системы с теоретической биэкспоненциальной кривой. Результат совмещали с экспериментальной кинетикой, меняя параметры расчёта и добиваясь наилучшего совпадения с экспериментом.

Измерение спектра оптического поглощения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1601PC («Shimadzu», Япония) в плоской 1-мм кювете, помещаемой в самодельный криостат. К образцам, содержащим 66%-ный глицерин, был добавлен 1 мМ аскорбат натрия для поддержания первичного донора в восстановленном состоянии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 представлены низкотемпературные спектры поглощения РЦ *C. sphaeroides* дикого типа и мутанта I(L177)Н. Данная мутация вызывает наиболее яркие изменения спектра в районе длинноволновой Q_v-полосы поглощения Р, которая в случае мутанта сдвигается в коротковолновую область на 18 нм, и её интенсивность падает.

На рис. 3 представлены спектры ЭПР РЦ мутанта I(L177)Н (рис. 3, а) и РЦ дикого типа (рис. 3, б) *C. sphaeroides*, измеренные при нескольких температурах.

Более детальные температурные зависимости триплетных спектров ЭПР приведены на рис. П1 и рис. П2 Приложения.

Достаточно хорошее спектральное разрешение позволяет легко идентифицировать линии ЭПР, принадлежащие триплетам Кар и первичного донора РЦ, как показано на рис. 3. Важные параметры спектров ЭПР триплетных состояний, расщепление в нулевом поле [25], составляют: |D| = 0,0190 см⁻¹, |E| = 0,0033 см⁻¹ для триплетта Р и |D| = 0,0278 см⁻¹, |E| = 0,0040 см⁻¹ для триплетта Кар. Эти значения одинаковы для мутанта и дикого типа и хорошо соответствуют впервые

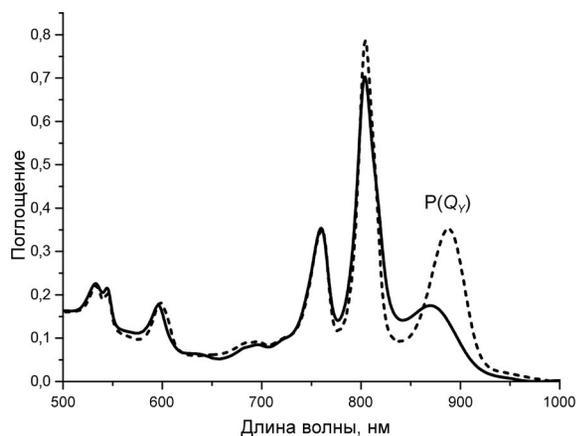


Рис. 2. Спектры поглощения РЦ *C. sphaeroides* дикого типа (пунктир) и мутанта I(L177)H (сплошная линия), $T = 100$ К. Полосы Q_y первичного донора Р лежат в области 870–890 нм. Подробное описание спектра приведено в работе Vasilieva et al. [24]

приведённым в работе Frank et al. [26] величинам. Сравнивая спектры на рис. 3, можно отметить следующие различия между свойствами триплетных состояний в этих РЦ. В РЦ дикого типа *C. sphaeroides* при температурах 100 К и 10 К наблюдаются чистые спектры триплетов Кар (рис. 3, б, 1) и первичного донора (рис. 3, б, 3). Спектры мутантных РЦ при всех приведённых температурах представляют собой суперпозицию обоих этих триплетных состояний. Важно отметить, что триплет Кар в этом случае отчётливо виден даже при 10 К (рис. 3, а, 3). Температурная зависимость спектра ЭПР мутанта I(L177)H указывает на значительное уменьшение энергии активации E_a T - T переноса энергии на Кар. Оценка величины E_a приведена в разделе «Обсуждение результатов».

Нельзя полностью исключить вероятность неомогенности препарата РЦ мутанта. Теоретически препарат может содержать фракции с различной эффективностью переноса энергии ${}^3P \rightarrow {}^3V \rightarrow {}^3Car$, что вызывается присутствием неодинаковых по энергии молекул Р и В. В таком случае освещение на разных длинах волн будет приводить к возбуждению разных фракций и к появлению спектров ЭПР с разными вкладами состояний 3P и 3Car . На рис. ПЗ Приложения приведены результаты такого измерения при возбуждении в области первичного донора (860–905 нм) и мономерных БХл (800–804 нм). Во всех случаях наблюдаемая форма линии ЭПР практически не изменяется, что указывает на гомогенность препарата РЦ мутанта.

Несмотря на меньшую величину энергии активации, T - T перенос энергии у мутанта I(L177)H при некоторых температурах протекает медленнее, чем у дикого типа. На это указывает при-

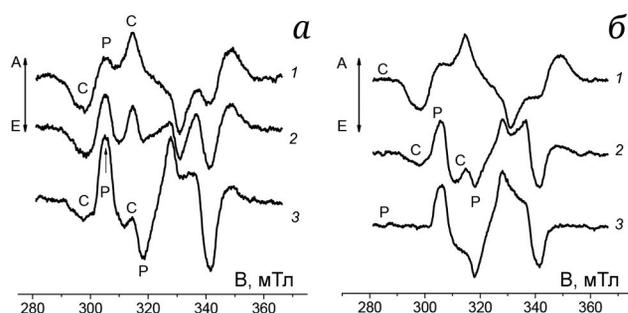


Рис. 3. Влияние температуры на спектры ЭПР РЦ мутанта I(L177)H (а) и РЦ дикого типа (б) *C. sphaeroides*. (1) $T = 100$ К, (2) $T = 40$ К, (3) $T = 10$ К. Буквами на спектрах обозначены: С – линии триплетов Кар, Р – линии триплетов первичного донора Р. Линии обозначены только в низкопольной части спектра. Условия измерения: запись сигнала в интервале 0,2–1,7 мкс после возбуждающей вспышки, $\lambda_{\text{возб}} = 882$ нм. Стрелки показывают направление поглощения (А) и излучения (Е) мощности СВЧ

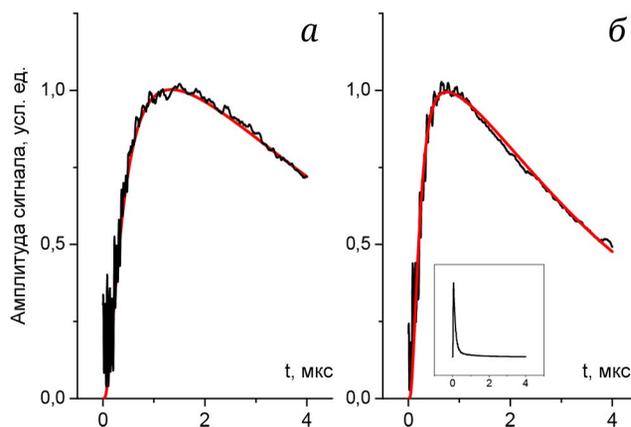


Рис. 4. Изменения оптического поглощения при $\lambda = 540$ нм, вызванные возбуждением в полосу первичного донора ($\lambda_{\text{возб}} = 870$ нм) в РЦ с восстановленным первичным акцептором. а – РЦ мутанта I(L177)H; б – РЦ дикого типа. $T = 100$ К. На врезке представлен инвертированный отклик системы на 6-нс вспышку лазера. Гладкими кривыми представлены результаты свёртки сигнала вспышки с теоретическими биэкспонентами. Параметры теоретических кривых приведены в тексте

сутствие сигнала триплета Р в интервале времён регистрации ЭПР (пик Р на рис. 3, а, 1), отсутствующего у дикого типа (рис. 3, б, 1). Для более детального изучения данного эффекта были проведены оптические измерения динамики 3Car (рис. 4).

На этом рисунке представлены начальные участки сигналов, измеренных в районе максимума поглощения триплетов Кар [6] при возбуждении в полосу поглощения первичного донора. Время нарастания сигналов было оценено в 250 нс для РЦ мутанта и в 100 нс в случае РЦ дикого типа при $T = 100$ К. Время полуспада

сигналов лежит в пределах 3–5 мкс, характерных для триплетных состояний Кар.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тушение триплетного состояния первичного донора РЦ является важным процессом, поскольку защищает РЦ от генерации активного синглетного кислорода в условиях высокой освещённости, когда первичный акцептор Q_A не успевает реокисляться цепью электронного транспорта, так что очередной квант света застаёт его в восстановленном состоянии. В результате описываемой мутации изолейцин в положении 177 L-субъединицы РЦ *S.phaeroides* был замещён на гистидин. Остаток изолейцина расположен приблизительно между первичным донором Р и БХл V_B (рис. 1). Внесение мутации I(L177)H достаточно слабо влияет на фотохимические свойства РЦ. Так, квантовый выход фотоиндуцированного переноса электрона практически не меняется по сравнению с РЦ дикого типа и остаётся близким к единице. Это подтверждается измерениями квантового выхода как в стационарном режиме, так и с временным разрешением [19, 27].

С другой стороны, некоторые свойства мутантного РЦ меняются существенно. В частности, заметно снижается стабильность его структуры при нагревании в присутствии детергентов LDAO и Triton-X100 [28], но использование холата натрия помогает снять эту проблему [23]. Кроме того, полоса поглощения первичного донора смещается в коротковолновую сторону, и её амплитуда существенно снижается (рис. 2). Происходят структурные изменения РЦ, к наиболее существенному из которых следует отнести возникновение прочной, предположительно ковалентной связи P_A (половины димера Р со стороны А-цепи кофакторов) с внесённым остатком гистидина L177 [19, 21, 22, 24], см. также структуру PDB, ID: 8C3F. Значительное изменение претерпевает также T-T перенос энергии с первичного донора на Кар РЦ. В резком отличии от РЦ дикого типа, такой перенос продолжается даже при температурах гелиевого диапазона (рис. 3, а). Это, исходя из современных представлений о механизме процесса, указывает на значительное понижение E_a , активационной энергии T-T переноса энергии ${}^3P \rightarrow V_B$. Такое понижение может быть вызвано повышением энергии триплетного первичного донора, сопровождающим повышение его синглетно-возбуждённого уровня (рис. 2). Была предпринята попытка оценить значение E_a мутанта. Корректный подход основан на измерении температурной зависимости константы скорости заселения состояния ${}^3\text{Кар}$ в РЦ с восстановленным акцептором Q_A .

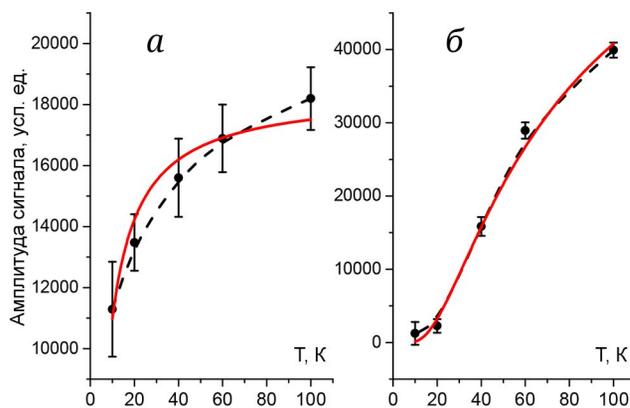


Рис. 5. Температурные зависимости амплитуды низкочастотной линии ЭПР триплетного состояния Q_A в РЦ мутанта I(L177)H (а) и дикого типа (б) в условиях фотовосстановленного первичного акцептора Q_A . Пунктиром и точками обозначены экспериментальные данные, а сплошными линиями – кривые, рассчитанные по формуле $A = B \cdot \exp(-E_a/kT)$. Наилучшие совпадения с экспериментальными зависимостями получены при значениях $E_a = 7,5 \text{ см}^{-1}$ (а); $E_a = 91 \text{ см}^{-1}$ (б). В качестве погрешностей измерения приведены стандартные отклонения шумовой составляющей спектров

Некоторым приближением к такому подходу можно считать использование температурной зависимости амплитуды сигнала ЭПР состояния ${}^3\text{Кар}$, измеренной в коротком интервале после возбуждающей вспышки, чтобы минимизировать возможный эффект температурной зависимости спада сигнала ${}^3\text{Кар}$. При этом остаётся неучтённой температурная зависимость квантового выхода триплетного Р. Однако, согласно работе Parson et al. [29], эта зависимость не является критической для температур ниже 77 К, по крайней мере для РЦ дикого типа. Температурная зависимость амплитуды сигнала триплетного Кар моделировалась экспонентой $A = B \cdot \exp(-E_a/kT)$. Были использованы данные спектров рис. П1 и рис. П2 Приложения. На рис. 5, а представлен результат такой процедуры для РЦ мутанта. Наилучшее соответствие экспериментальным данным получено при значении $E_a = 7,5 \text{ см}^{-1}$.

Для оценки возможных погрешностей выбранной процедуры аналогичный подсчёт был сделан для РЦ дикого типа (рис. 5, б). Полученная при этом величина энергии активации 91 см^{-1} хорошо соответствует значению 100 см^{-1} , определённому из корректного измерения температурной зависимости константы скорости заселения ${}^3\text{Кар}$ [11]. Более низкое качество моделирования температурной зависимости в случае мутанта (рис. 5, а) может быть связано с иной, чем у дикого штамма, зависимостью квантового выхода 3P от температуры. Ещё одна возможность – появление у мутанта независимого от температуры прямого

канала переноса энергии ${}^3P \rightarrow \text{Кар}$. В этом случае температурная зависимость будет описываться выражением $A = C + B \cdot \exp(-E_a/kT)$. Результаты обработки данных по этой формуле приведены на рис. П4 Приложения. Наилучшее совпадение с экспериментом получено при $E_a = 36 \text{ см}^{-1}$, $B = 9700$, $C = 10\,500$. Несмотря на хорошее совпадение расчётной и экспериментальной кривых, очень большой вклад прямого канала $T-T$ переноса энергии вызывает сомнение. Доводы в пользу такого вывода будут подробнее обсуждены ниже.

При промежуточных значениях температуры $T-T$ перенос энергии ${}^3P \rightarrow \text{Кар}$ у мутанта протекает медленнее, чем в РЦ дикого типа. На рис. 3, а и рис. 4 это продемонстрировано для $T = 100 \text{ К}$. На спектре ЭПР (рис. 3, а, 1) такое замедление проявляется в виде остаточного сигнала 3P . Прямая регистрация кинетики оптического поглощения ${}^3\text{Кар}$ (рис. 4) при той же температуре позволила оценить уменьшение скорости $T-T$ переноса у мутанта в 2,5 раза по сравнению с РЦ дикого типа. Ранее похожее влияние внесённой мутации наблюдали в работе Frank et al. [14]. Наблюдаемое замедление объясняется изменением величины предэкспоненциальных множителей в соотношениях, описывающих температурные зависимости этих процессов (коэффициент B в случае приведённых выше зависимостей амплитуды ${}^3\text{Кар}$). Эти множители при переносе энергии по механизму Декстера сами экспоненциально зависят от расстояния между донором и акцептором энергии [17, 18]. Экспоненциальная зависимость означает, что даже небольшие структурные изменения могут существенно влиять на скорость переноса. Отметим, что кристаллическая структура РЦ I(L177)Н + F(M197)Н, полученная с разрешением $2,6 \text{ \AA}$, не выявила существенных смещений молекул Кар, Р или В_в относительно друг друга [22].

Существует иная возможность увеличения расстояния $T-T$ переноса энергии, не требующая пространственного смещения донора и акцептора. Известно, что триплетное состояние распределено по димеру Р в случае РЦ *S. sphaeroides* не вполне симметрично, примерно в соотношении 63 : 37 в пользу половины димера Р_А [30]. Образование прочной химической связи с этой половиной [19, 21, 22, 24] может внести изменение в характер делокализации триплета Р и привести к увеличению эффективного расстояния переноса энергии на мономерный БХл. Предлагаемое изменение делокализации триплетного возбуждения в димере Р должно приводить к увеличению параметра D , которого в эксперименте не наблюдается. Нужно, однако, отметить, что на величину D триплетного состояния пер-

вичного донора влияет также примешивание состояния с переносом заряда [4], способное значительно уменьшить D . Увеличение асимметрии Р в результате проведённой аминокислотной замены повышает вероятность увеличения вклада состояния с переносом заряда. На появление значительной асимметрии донора Р в результате мутации указывает также существенное увеличение ширины сигнала ЭПР состояния Р* [31] и данные FTIR-спектроскопии [32]. Увеличение расстояния и замедление $T-T$ переноса энергии делает менее вероятным появление прямого канала переноса энергии, упомянутого выше, хотя данный вывод требует дополнительного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РЦ мутанта I(L177)Н *Cereibacter sphaeroides* сохраняют высокую фотохимическую активность и достаточную стабильность и по этой причине являются интересным объектом исследования. Они демонстрируют аномальную возможность $T-T$ переноса энергии от первичного донора Р к молекуле Кар при температурах диапазона жидкого гелия. Мы предполагаем, что это связано с понижением активационной энергии первой стадии $T-T$ переноса, ${}^3P \rightarrow \text{В}_в$, которое вызывается повышением уровня энергии 3P . Возможность активации канала прямого переноса энергии ${}^3P \rightarrow \text{Кар}$ также нельзя полностью отвергать без проведения дополнительного исследования, как и процессы с участием экситонных состояний [33]. Приведённая оценка энергии активации $E_a = 7,5 \text{ см}^{-1}$ (приблизительно $0,9 \text{ кДж/моль}$) носит весьма предварительный характер. Для уточнения этого параметра и механизма $T-T$ переноса энергии необходимо проведение измерений температурной зависимости константы скорости процесса ${}^3P \rightarrow \text{В}_в$. Полученные мутантные РЦ представляют значительный интерес для изучения альтернативных механизмов тушения триплетных состояний, в частности, радикал-триплетных пар [34], и влияния магнитного поля на дезактивацию 3P [35]. Работа в этом направлении проводится в настоящее время.

Вклад авторов: И.И. Проскураков – концепция исследования и руководство работой; Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева – направленный мутагенез, выделение реакционных центров, приготовление образцов; И.Б. Кленина, И.И. Проскураков – проведение измерений, обработка результатов, написание и редактирование текста статьи; Т.Ю. Фуфина, Л.Г. Васильева, И.Б. Кленина, И.И. Проскураков – обсуждение результатов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта № 122041100204-3 Минобрнауки России.

Благодарности. В работе использовались приборы ЦКП ПНЦБИ РАН (№ 670266, <http://www.scr-rf.ru/scr/670266/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., and Cadet, J. (2019), Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins, *Chem. Rev.*, **119**, 2043-2086, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00554>.
2. Yeates, T. O., Komiya, H., Chirino, A., Rees, D. C., Allen, J. P., and Feher, G. (1988) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: protein-cofactor (bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin, and carotenoid) interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7993-7997, <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.7993>.
3. Ermler, 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, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00094-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00094-8).
4. Hoff, A. J., and Deisenhofer, J. (1997) Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria, *Phys. Rep.*, **287**, 1-247, [https://doi.org/10.106/S0370-1573\(97\)00004-5](https://doi.org/10.106/S0370-1573(97)00004-5).
5. Blankenship, R. E. (2021) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.
6. Parson, W. W., and Monger, T. G. (1976) Interrelationships among excited states in bacterial reaction centers, *Brookhaven Symp. Biol.*, **28**, 195-212.
7. Schenck, C. C., Mathis, P., and Lutz, M. (1984) Triplet formation and triplet decay in reaction centers from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Photochem. Photobiol.*, **39**, 407-417, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1984.tb08198.x>.
8. Frank, H. A., Chynwat, V., Hartwich, G., Meyer, M., Katheder, I., and Scheer, H. (1993) Carotenoid triplet state formation in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers exchanged with modified bacteriochlorophyll pigments and reconstituted with spheroidene, *Photosynth. Res.*, **37**, 193-203, <https://doi.org/10.1007/BF00032823>.
9. Frank, H. A., Innes, J., Aldema, M., Neumann, R., and Schenck, C. C. (1993) Triplet state EPR of reaction centers from the His^{L173} → Leu^{L173} mutant of *Rhodobacter sphaeroides* which contains a heterodimer primary donor, *Photosynth. Res.*, **38**, 99-109, <https://doi.org/10.1007/BF00015066>.
10. Frank, H. A., Chynwat, V., Posteraro, A., Hartwich, G., Simonin, I., and Scheer, H. (1996) Triplet state energy transfer between the primary donor and the carotenoid in *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1 reaction centers exchanged with modified bacteriochlorophyll pigments and reconstituted with spheroidene, *Photochem. Photobiol.*, **64**, 823-883, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb01842.x>.
11. Angerhofer, A., Bornhäuser, F., Aust, V., Hartwich, G., and Scheer, H. (1998) Triplet energy transfer in bacterial photosynthetic reaction centres, *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 404-420, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00093-0).
12. Laible, P. D., Chynwat, V., Thurnauer, M. C., Schiffer, M., Hanson, D. K., and Frank, H. A. (1998) Protein modifications affecting triplet energy transfer in bacterial photosynthetic reaction centers, *Biophys. J.*, **74**, 2623-2637, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77968-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77968-8).
13. De Winter, A., and Boxer, S. G. (1999) The mechanism of triplet energy transfer from the special pair to the carotenoid in bacterial photosynthetic reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8786-8789, <https://doi.org/10.1021/jp992259d>.
14. Laible, P. D., Morris, Z. S., Thurnauer, M. C., Schiffer, M., and Hanson, D. K. (2003) Inter- and intraspecific variation in excited-state triplet energy transfer rates in reaction centers of photosynthetic bacteria, *Photochem. Photobiol.*, **78**, 114-123, [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780114IAIVIE2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780114IAIVIE2.0.CO2).
15. Mandal, S., Carey, A.-M., Locsin, J., Gao, B.-R., Williams, J. C., Allen, J. P., Lin, S., and Woodbury, N. W. (2017) Mechanism of triplet energy transfer in photosynthetic bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **121**, 6499-6510, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b03373>.
16. Mandal, S., Espiritu, E., Akram, N., Lin, S., Williams, J. C., Allen, J. P., and Woodbury, N. W. (2018) Influence of the electrochemical properties of the bacteriochlorophyll dimer on triplet energy-transfer dynamics in bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 10097-10107, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b07985>.

17. Dexter, D. L. (1953) A theory of sensitized luminescence in solids, *J. Chem Phys.*, **21**, 836-850, <https://doi.org/10.1063/1.1699044>.
18. You, Z.-Q., Hsu, C.-P., and Fleming, G. R. (2006) Triplet-triplet energy-transfer coupling: theory and calculation, *J. Chem. Phys.*, **124**, <https://doi.org/10.1063/1.2155433>.
19. 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, <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0256-3>.
20. 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, <https://doi.org/10.1002/jcp.1030490104>.
21. Fufina, T. Y., 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_A bacteriochlorophyll to the L subunit, *FEBS Lett.*, **581**, 5769-5773, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.032>.
22. Fufina, T. Y., Selikhanov, G. K., Gabdulkhakov, A. G., and Vasilieva, L. G. (2023) Properties and crystal structure of the *Cereibacter sphaeroides* photosynthetic reaction center with double amino acid substitution I(L177)H + F(M197)H, *Membranes*, **13**, 157, <https://doi.org/10.3390/membranes13020157>.
23. Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г. (2021) Влияние детергентов и осмолитов на термостабильность нативных и мутантных реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **86**, 607-614, <https://doi.org/10.31857/S0320972521040126>.
24. 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 P_B bacteriochlorophylls, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1407-1417, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.008>.
25. Budil, D. E., and Thurnauer, M. C. (1991) The chlorophyll triplet state as a probe of structure and function in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1057**, 1-41, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(05\)80081-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80081-7).
26. Frank, H. A., Bolt, J. D., de V. Costa, S. M., and Sauer, K. (1980) Electron paramagnetic resonance detection of carotenoid triplet states, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4893-4898, <https://doi.org/10.1021/ja00535a009>.
27. Фуфина Т. Ю., Леонова М. М., Хатыпов Р. А., Христин А. М., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2019) Особенности аксиального лигандирования бактериохлорофиллов в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий, *Биохимия*, **84**, 509-519, <https://doi.org/10.1134/S0320972519040043>.
28. Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г., Шувалов В. А. (2010) Исследование стабильности мутантного фотосинтетического реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)H и установление местоположения бактериохлорофилла, ковалентно связанного с белком, *Биохимия*, **75**, 256-263, <https://doi.org/10.1134/s0006297910020112>.
29. Parson, W. W., Clayton, R. K., and Cogdell, R. J. (1975) Excited states of photosynthetic reaction centers at low redox potentials, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 265-278, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90109-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90109-7).
30. Norris, J. R., Budil, D. E., Gast, P., Chang, C.-H., El-Kabbani, O., and Schiffer, M. (1989) Correlation of paramagnetic states and molecular structure in bacterial photosynthetic reaction centers: the symmetry of the primary electron donor in *Rhodospseudomonas viridis* and *Rhodobacter sphaeroides* R-26, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4335-4339, <https://doi.org/10.1073/pnas.86.12.4335>.
31. Фуфина Т. Ю., Селиханов Г. К., Проскуряков И. И., Шувалов В. А., Васильева Л. Г. (2019) Свойства реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides* с аминокислотными замещениями Le на Tyr в позициях L177 и M206, *Биохимия*, **84**, 739-744, <https://doi.org/10.1134/S0320972519050129>.
32. Забелин А. А., Фуфина Т. Ю., Васильева Л. Г., Шкуропатова В. А., Зверева М. Г., Шкуропатов А. Я., Шувалов В. А. (2009) Мутантные реакционные центры *Rhodobacter sphaeroides* I(L177)H с прочно связанным бактериохлорофиллом *a*: структурные свойства и пигмент-белковые взаимодействия, *Биохимия*, **74**, 86-94, <https://doi.org/10.1134/s0006297909010106>.
33. Scholes, G. D. (2003) Long-range resonance energy transfer in molecular systems, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **54**, 57-87, <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.54.011002.103746>.
34. Quintes, T., Mayländer, M., and Richert, S. (2023) Properties and applications of photoexcited chromophore-radical systems, *Nature Rev. Chem.*, **7**, 75-90, <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00453-y>.
35. Chidsey, C. E. D., Takiff, L., Goldstein, R. A., and Boxer, S. G. (1985) Effect of magnetic fields on the triplet state lifetime in photosynthetic reaction centers: Evidence for thermal repopulation of the initial radical pair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6850-6854, <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6850>.

ANOMALOUS TEMPERATURE DEPENDENCE OF THE TRIPLET-TRIPLET ENERGY TRANSFER IN *Cereibacter sphaeroides* I(L177)H MUTANT REACTION CENTERS

T. Y. Fufina, L. G. Vasilieva, I. B. Klenina, and I. I. Proskuryakov*

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: pros@issp.serpukhov.su*

In photosynthetic reaction centers, quenching of the primary donor triplet state by energy transfer to the carotenoid molecule provides efficient suppression of singlet-excited oxygen generation, the potent chemical oxidant. This process in the *Cereibacter sphaeroides* reaction centers is thermoactivated, and discontinues at temperatures below 40 K. In these reaction centers, substitution of amino acid residue isoleucine for hystidine at the 177 position of the L-subunit results in a sharp decrease of the activation energy, so the carotenoid triplets are populated even at 10 K. Activation energy of the T-T energy transfer was estimated as 7.5 cm⁻¹, which is more than 10-fold lower than the activation energy of the original reaction centers. At certain temperatures the energy transfer in the mutant is decelerated, which is related to the increase of the effective distance of the triplet-triplet transfer. To our knowledge, the described mutation presents the first reaction center modification leading to a significant decrease in activation energy of T-T energy transfer to the carotenoid molecule. The I(L177)H mutant reaction centers present a considerable interest for further studies of the triplet state quenching mechanisms, and of other photophysical and photochemical processes in reaction centers of bacterial photosynthesis.

Keywords: reaction center, primary electron donor, carotenoid, triplet-triplet energy transfer, temperature dependence, site-directed mutagenesis, *Cereibacter sphaeroides*