

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ

© 2011 г. М. М. ЛЕОНОВА*, Т. Ю. ФУФИНА,
Л. Г. ВАСИЛЬЕВА, В. А. ШУВАЛОВ

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино

I. Введение. II. Состав и структура реакционных центров, спектральные свойства кофакторов. III. Последовательность и скорости переноса электрона. IV. Химические модификации кофакторов. V. Генетические модификации белка. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В фотосинтетических реакционных центрах (РЦ) бактерий и эукариот осуществляется важнейший этап фотосинтеза – трансмембранный перенос электрона и протона, в результате которого создается мембранный потенциал. Квантовая эффективность преобразования света на начальных стадиях фотосинтеза достигает почти 100%. Столь высокая

Принятые сокращения: (Б)Фео – (бактерио)феофитин; (Б)Хл – (бактерио)хлорофилл; B_A , B_B – мономерный БХл А-ветви и В-ветви кофакторов переноса электрона; D – гетеродимер БХл/БФео; H_A , H_B – БФео А-ветви и В-ветви кофакторов переноса электрона; Р – гомодимер БХл, первичный донор электрона, специальная пара; P_A , P_B – БХл-ы, образующие первичный донор электрона; Q_A , Q_B – первичный и вторичный хинонные акцепторы электрона; β – молекула БХл в сайте связывания БФео; Φ – молекула БФео в сайте связывания мономерного БХл; цит – цитохром; РЦ – реакционный центр; ССК-1 и ССК-2 – светособирающие комплексы коровой и периферической антенны; ФГК – фотосинтетический генный кластер; ФС – фотосистема; $E_m P/P^+$ – окислительно-восстановительный потенциал первичного донора электрона; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; *Blc.* – *Blastochloris*; *Rba.* – *Rhodobacter*; *Rsb.* – *Roseobacter*; *Rsp.* – *Rhodospirillum*; *Rvi.* – *Rubrivivax*.

*Адрес для корреспонденции: Leonova-mari@yandex.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК № 02.740.11.0293), программы «Молекулярная и клеточная биология», грантов Президента РФ (№ НШ-3201.2010.4) и РФФИ (грант 09-04-00109).

эффективность улавливания и трансформации световой энергии без разрушения включенных в этот процесс молекул и нежелательных побочных реакций достигается благодаря тонкой регулировке свойств кофакторов посредством их взаимодействия с окружающим белком. Исследования реакционных центров пурпурных бактерий внесли большой вклад в понимание принципов и механизмов преобразования энергии при фотосинтезе. Хорошо охарактеризованные бактериальные РЦ многие годы служат структурной и функциональной моделью для изучения более сложно организованной фотосистемы 2 зеленых растений и водорослей. В последние годы достигнуты значительные успехи в области кристаллизации и рентгеноструктурного анализа фотосинтетических белков. В настоящее время особое внимание уделяется исследованию влияния белка РЦ и его конформационных изменений на эффективность первичного акта разделения заряда [1–3]. Настоящий обзор посвящен анализу работ по химическим и генетическим модификациям структуры РЦ пурпурных бактерий, и в особенности использованию методов сайт-направленного мутагенеза для исследования взаимодействий белка и кофакторов РЦ. Из недавних обзоров по этой теме следует отметить специальные главы из книг серии *Advances in Photosynthesis and Respiration*, под редакцией Говинджи, 2006 и 2009 г. выпуска, а также обзоры [4–6].

II. СОСТАВ И СТРУКТУРА РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ, СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОФАКТОРОВ

РЦ из пурпурной бактерии *Blastochloris (Bcl.) viridis* стал первым мембранным пигмент-белковым комплексом, для которого был осуществлен рентгеноструктурный анализ, авторы этой работы в 1988 г. получили Нобелевскую премию (рис. 1А) [7, 8]. Позже были также получены структуры *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* [9, 10] и *Thermochromatium tepidum* [11]. Наиболее изученный РЦ *Rba. sphaeroides* состоит из трех полипептидов, L, M и H, и десяти кофакторов – 4-х молекул бактериохлорофилла (БХл) *a*, 2-х молекул бактериофеофитина (БФео) *a*, 2-х молекул убихинона, иона негемового железа Fe^{2+} и молекулы каротиноида (рис. 1Б) [12].

L и M субъединицы комплекса содержат по пять трансмембранных α -спиралей (A, B, C, D, E) [8, 13, 14], расположенных псевдо-симметрично друг другу относительно оси двусторонней симметрии, с которыми нековалентно связаны кофакторы РЦ [15]. На периплазматической стороне мембраны два БХл, P_A и P_B , формируют специальную пару P, хромофоры которой перекрываются на уровне

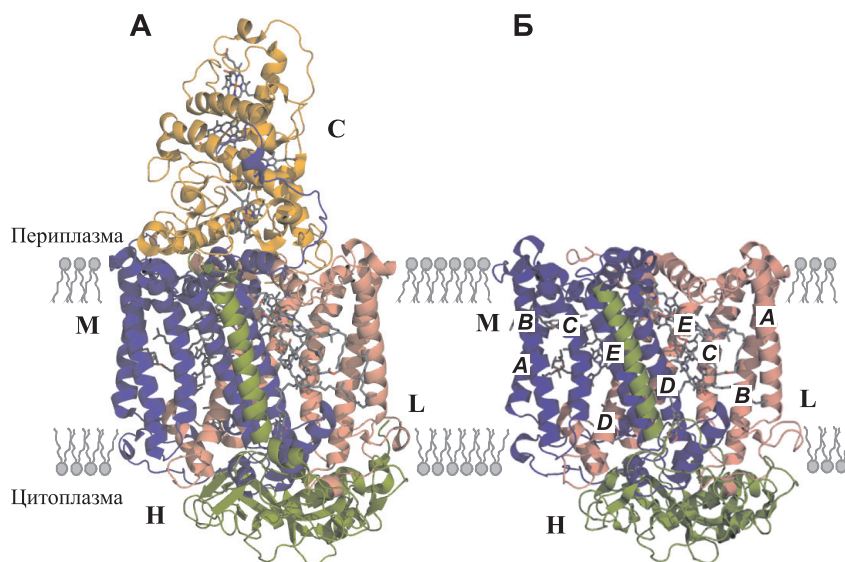


Рис. 1. Структура фотосинтетических реакционных центров (РЦ).

А – *Blastochloris viridis* (Protein Data Bank, 1PRC, [13]).

Б – *Rhodobacter sphaeroides* (файл 1M3X, [12]).

РЦ *Blc. viridis* состоит из четырех белковых субъединиц – L, M, H и C, а РЦ *Rba. sphaeroides* из трех – L, M и H. L- и M-субъединицы содержат по пять трансмембранных α -спиралей (обозначены как A, B, C, D и E), которые формируют сайты связывания кофакторов переноса электрона. H-субъединица состоит из одной трансмембранной α -спирали (на переднем плане структуры) и цитоплазматического домена. C-субъединица, расположенная на периплазматической поверхности LMN комплекса РЦ *Blc. viridis*, несет четыре гема цитохрома.

первых колец тетрапирролов. Макроциклы БХл димера Р почти параллельны друг другу и перпендикулярны поверхности мембраны. Расстояние между плоскостями макроциклов Р составляет 3,4 Å. В результате такого сближения электронные плотности пары БХл обобществляются [16–18], что приводит к изменению свойств тетрапирролов (в частности, спектральные свойства димера Р отличаются от свойств других бактериохлоринов РЦ). Остальные кофакторы – мономерные БХл B_A и B_B , БФео H_A и H_B , убихиноны Q_A и Q_B формируют две практически симметричные ветви А и В, идущие от димера БХл Р до иона Fe^{2+} на цитоплазматической стороне мембраны. Единственный каротиноид (сфероиден) связан с М-субъединицей в непосредственной близости от БХл B_B . Ось симметрии РЦ проходит перпендикулярно плоскости мембраны через центр димера БХл

Р и ион железа. Н-субъединица включает одну трансмембранную α -спираль и большой цитоплазматический домен, отделяющий сайты связывания хинонов от водной фазы. В структуру РЦ включено большое количество молекул воды [12, 13, 19], часть которых играет важную роль в функционировании комплекса [20–22]. Кроме того, во многих известных к настоящему времени структурах РЦ *Rba. sphaeroides* кристаллографически определяется одна и более молекул кардиолипина, которые, по-видимому, участвуют в стабилизации комплекса [5].

Большая часть кофакторов имеет хорошо различимые полосы в спектре поглощения РЦ. Бактериохлориновые кофакторы (P , B_A , B_B , H_A и H_B) поглощают в ближней инфракрасной, видимой и ближней ультрафиолетовой областях спектра. В оптическом спектре РЦ *Rba. sphaeroides*, измеренном при комнатной температуре, в инфракрасной области наблюдаются полосы поглощения с максимумами при 865, 805 и 760 нм, отражающие Q_Y -переходы димера БХл, мономерных БХл и БФео, соответственно (рис. 2А). В видимой области полоса поглощения с максимумом 600 нм соответствует Q_X -переходу четырех БХл, а полоса при 540 нм – поглощению двух БФео [15, 23–26]. При комнатной температуре полосы поглощения кофакторов одного типа, но из разных ветвей (А- и В-) взаимно перекрываются. В спектре поглощения, измеренном при 10 К, наблюдается сужение полос, вследствие чего полоса поглощения БФео расщепляется на две полосы с максимумами при 533 и 546 нм, отражающие Q_X -переходы БФео H_B и H_A , соответственно, а у полосы 805 нм появляется плечо с максимумом 813 нм, соответствующее Q_Y -переходу БХл B_B и высокоэнергетическому переходу БХл димера [25, 27, 28] (рис. 2Б). Тетрапиррольные пигменты также поглощают в области 370–390 нм (полоса Core). Считается, что БФео преимущественно поглощает на коротковолновой стороне полосы, а димер БХл Р – на ее длинноволновой стороне [29]. Полоса поглощения молекулы каротиноида расположена вблизи 500 нм, где слабо поглощают другие кофакторы.

III. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ И СКОРОСТИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА

Из двух ветвей переноса электрона в РЦ только А-ветвь функционально активна (рис. 3). В РЦ *Rba. sphaeroides* трансмембранный перенос электрона начинается с перехода димера Р в возбужденное состояние P^* и передачи электрона с P^* на БХл B_A за ~ 3 пс при 293 К. Время рекомбинации состояния $P^+B_A^-$ составляет около 1 нс, что в три раза

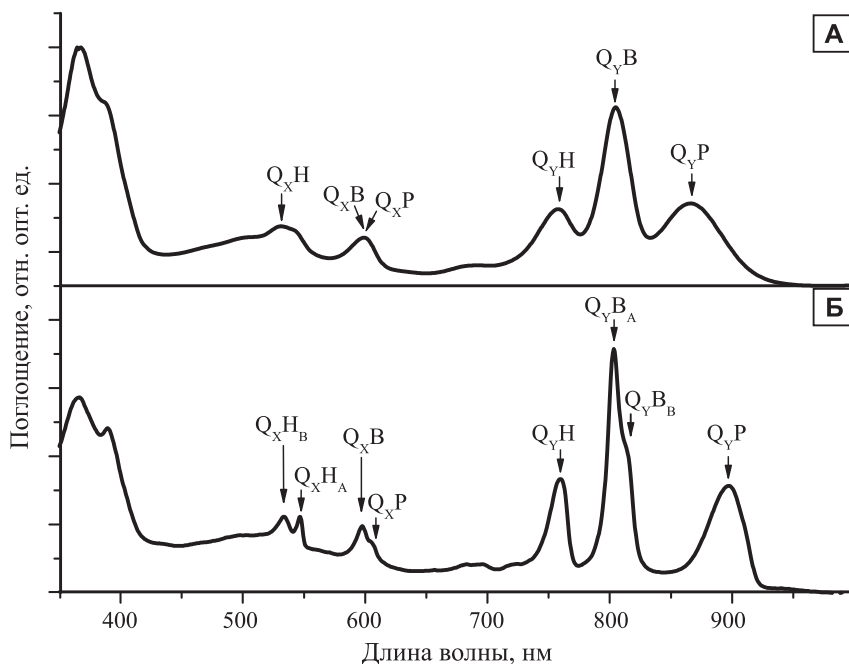


Рис. 2. Спектры поглощения РЦ *Rhodobacter sphaeroides*, измеренные при 293 К (А) и 10 К (Б).

Стрелками показаны полосы поглощения, соответствующие Q_x и Q_y -переходам молекул кофакторов переноса электрона: Р – димера бактериохлорофиллов (БХл), B_A и B_B – мономеров БХл активной и неактивной ветвей, соответственно, H_A и H_B – бактериофеофитинов активной и неактивной ветвей переноса электрона, соответственно.

медленное время жизни P^* (300 пс) [30]. Важным этапом исследования первичного разделения зарядов между P^* и B_A стало обнаружение образования волновых ядерных пакетов по измерению стимулированного излучения [31] и по осцилляциям в продукте реакции $P^+B_A^-$ [1, 22, 32, 33]. Эти факты были интерпретированы как указание на перенос волновых пакетов из состояния P^* на продукт реакции $P^+B_A^-$, причем с преимущественной селекцией колебания около 32 см^{-1} и ее гармоник. В дальнейших исследованиях было сделано предположение, что это колебание отражает вращение молекулы воды НОН55, находящейся между Р и B_A [22].

Далее электрон передается от БХл B_A^- на БФео H_A за $\sim 0,9$ пс, и время рекомбинации состояния $P^+H_A^-$ составляет 15 нс при 293 К [34, 35]. Все указанные процессы ускоряются в 2–3 раза при понижении

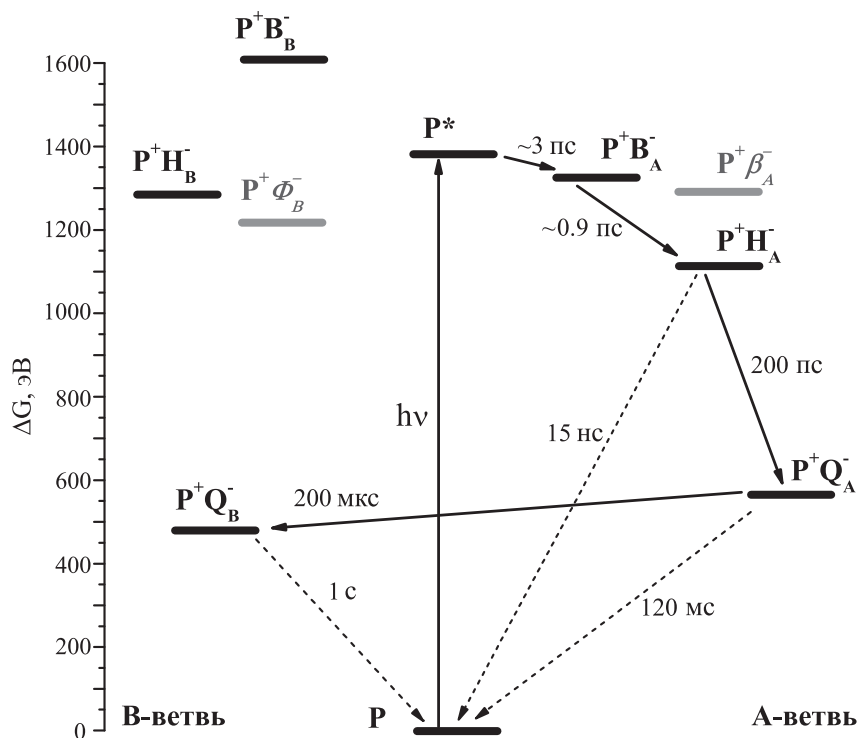


Рис. 3. Схема переноса электрона в реакционном центре *Rhodobacter sphaeroides*.

На схеме черным цветом показаны рассчитанные уровни свободной энергии всех ион-радикальных состояний, которые теоретически могут образоваться в РЦ дикого типа. Перенос электрона идет по А-ветви от первичного донора электрона, возбужденного димера бактериохлорофиллов (БХл), P^* на вторичный хинонный акцептор убихинон Q_B через последовательное образование ряда промежуточных состояний с разделенными зарядами: $P^+B_A^-$, $P^+H_A^-$, $P^+Q_A^-$, где B_A – первичный акцептор электрона, мономер БХл; H_A – вторичный акцептор электрона, бактериофеофитин (БФео); Q_A – первичный хинонный акцептор электрона, молекула убихинона. Процесс сопровождается понижением уровней свободной энергии последующих состояний с разделенными зарядами [35, 38, 39, 43, 73]. Серым цветом показаны рассчитанные уровни свободной энергии состояний $P^+\Phi_B^-$ и $P^+\beta_A^-$ в мутантных РЦ H(M182)L [144, 209] и L(M214)H [166, 211], где Φ_B – молекула БФео, расположенная в сайте связывания мономерного БХл B_B неактивной В-ветви; β_A – молекула БХл, расположенная в сайте связывания БФео H_A .

температуры ниже 77 К. Перенос электрона с H_A^- на убихинон Q_A происходит за 200 пс при 293 К и 100 пс при 5 К. Состояние с разделенными зарядами $P^+Q_A^-$ рекомбинирует в основное состояние за 120 мс при 293 К и за 30 мс при температуре ниже 77 К. Прямые и обратные скорости переноса электрона определяются разницей свободных энергий ΔG состояний с разделенными зарядами [36, 37]. Изменение энергии при переходе димера Р из основного состояния в возбужденное (P^*) в РЦ *Blc. viridis* составляет 1240 мэВ, а в *Rba. sphaeroides* – 1380 мэВ [38]. Далее перенос электрона идет с постепенным понижением уровней энергии образующихся состояний с разделенными зарядами (рис. 3) [39–43]. При образовании состояния P^* наблюдается выцветание полос Р при 870 и 600 нм, а также возникает стимулированная флуоресценция в области 920 нм. По мере переноса электрона с P^* на B_A стимулированное излучение уменьшается, что сопровождается выцветанием полосы B_A при 800 нм и образованием полосы B_A^- при 1020 нм [1, 30, 44]. Дальнейший перенос электрона от первичного хинона Q_A до вторичного хинона Q_B с образованием убисемихинона происходит в диапазоне десятков микросекунд и резко замедляется с понижением температуры. Время рекомбинации этого состояния составляет более 1 секунды [42, 44]. Следующий фотоиндуцированный перенос электрона от P^* приводит к полному восстановлению и двойному протонированию убисемихинона Q_B , в результате чего формируется убихинол и забираются два протона из цитоплазмы. Восстановленный убихинол покидает РЦ и заменяется другой молекулой окисленного убихинона из внутримембранного пула. Окисленный димер восстанавливается либо экзогенным цитохромом (цит) *c*-типа (как в *Rba. sphaeroides*) [45], либо цитохромом интегральной *C*-субъединицы (как в *Blc. viridis*) [42], на который передаются электроны от убихинола через цитохромный *bc1* комплекс. При этом на периплазматической стороне мембраны высвобождаются протоны, взятые со стороны цитоплазмы, и таким образом генерируется протонный градиент, используемый клеткой для синтеза восстановительных эквивалентов.

IV. ХИМИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ КОФАКТОРОВ

Существуют различные подходы, позволяющие изменять свойства кофакторов с целью изучения их роли в функционировании РЦ. Химическое замещение хинона в сайте связывания Q_A было одним из первых подходов к серьезной модификации структуры РЦ пурпурных бактерий [46]. Модифицированные РЦ были использованы для исследова-

дования процессов переноса электрона на хиноны Q_A и Q_B , свойств радикальных пар $P^+Q_A^-$ и $P^+Q_B^-$ и их рекомбинации, а также многих других свойств РЦ и параметров фотохимических реакций с участием хинонов [47–54].

Шеер и соавторы впервые предложили методы биохимической обработки РЦ для замены природных БХл или БФео на другие бактериохлорины [55, 56], что позволило проводить замещения мономерных БХл [57] и БФео [58–61] в РЦ *Rba. sphaeroides*, *Rhodospirillum (Rsp.) rubrum* и *Blc. viridis* [55]. Природные Mg-бактериохлорины заменялись на Zn- и Ni- аналоги БХл *a* с целью изменения окислительно-восстановительных потенциалов кофакторов [55]. Только некоторые производные БХл и БФео могут быть встроены в РЦ, что указывает на избирательность белковых сайтов связывания [62]. Несмотря на большое сходство структуры двух молекул, до настоящего времени не удавалось заменить БХл *a* на хлорофилл (Хл) *a*, но в то же время природные БФео *a* были успешно замещены на феофитин (Фео) *a*, Фео *b* и ряд других производных Фео и БФео [55, 59, 63].

РЦ с замещениями мономерных БХл были использованы для исследования сверхбыстрых реакций переноса электрона с P^* на мономерные БХл [64], для выяснения принадлежности полос поглощения различным БХл РЦ [65], подтверждения роли B_A в первичном разделении заряда [66, 67] и участия B_B в переносе энергии триплетного состояния на каротиноид [68, 69]. Исследования РЦ, в которых БФео был замещен растительным Фео, помогли доказать, что разделение зарядов между димером БХл Р и БФео H_A — это двухступенчатый процесс, включающий образование состояния $P^+B_A^-$. За счет замещения БФео на Фео удалось изменить свободную энергию состояния $P^+H_A^-$ практически до уровня энергии состояния $P^+B_A^-$, что увеличило время жизни последнего и сделало возможным изучение его свойств [30, 36, 58, 67, 70, 71].

Важную роль в переносе электрона играет разница энергий между состояниями P^* и $P^+B_A^-$. В работах Шувалова и Яковлева [72] и Новака с соавторами [73] были использованы РЦ, в которых БФео был замещен на растительный Фео, что значительно замедляло скорость переноса электрона от B_A^- на Фео. В результате, исследования температурной зависимости стимулированного излучения P^* позволили показать, что энергия уровня P^* выше энергии $P^+B_A^-$ на $300\text{--}550\text{ см}^{-1}$, т.е. оба уровня достаточно близки и легко обмениваются энергиями, особенно при комнатной температуре.

До настоящего времени попытки химического замещения специальной пары БХл не увенчались успехом. Только в работе Кобаяши

и соавторов описано частичное (30%) замещение димера БХл на Zn-БХл *a* в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 [74].

На РЦ бескаротиноидных штаммов пурпурных бактерий *Rba. sphaeroides* R-26 и R-26.1, *Rsp. rubrum* G9 проводились эксперименты по реконструкции неприродных каротиноидов с целью исследования влияния боковых групп и системы электронных связей пигмента на его способность выполнять свою фотопротекторную функцию [75, 76, 77, обзор 54]. Также были исследованы роль мономерного БХл в переносе триплета [68, 69]; влияние каротиноида на электростатическое состояние белкового окружения первичного донора электрона P [78]; структурные факторы, обуславливающие однонаправленное связывание каротиноида с его белковым сайтом [79].

Для изучения структуры и свойств анион-радикалов Q_A^- и Q_B^- методами ЭПР, двойного электронного ядерного резонанса (ENDOR) и модуляции спада электронного спинового эха (ESEEM) из РЦ часто удаляют ион Fe^{2+} , замещая его на другой двухвалентный металл, например, на Zn^{2+} . Это связано с тем, что парамагнитные свойства железа природных РЦ изменяют спектры ЭПР [80]. Удаление Fe^{2+} из РЦ приводит к 20-кратному снижению скорости переноса электрона от H_A на Q_A [81], и лишь незначительно влияет на скорость переноса электрона от Q_A на Q_B [82]. В Zn-замещенных РЦ величина этих скоростей, как правило, восстанавливается до исходных значений [83, 84]. Zn-замещенные РЦ были использованы для исследования связывания хинонов с белком [85–87], реорганизации белка РЦ при образовании состояния $P^+Q_A^-$ [88–91], для изучения свойств состояния $P^+H_A^-$ [92], фотоиндуцированных конформационных изменений вблизи и внутри сайта связывания Q_B [93], спин-спиновых взаимодействий кофакторов [94–96] и других характеристик фотохимических реакций.

V. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКА

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ГЕННЫЙ КЛАСТЕР, *PUF*-ОПЕРОН И СИСТЕМЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

В пурпурных бактериях большая часть генетической информации, необходимой для построения фотосинтетического аппарата, сгруппирована в так называемый «фотосинтетический генный кластер» (ФГК) размером около 40–50 тысяч пар оснований, который содержит практически все структурные гены, отвечающие за биосинтез фотосистем, а также гены, кодирующие последние стадии синтеза БХл и каротиноидов [97]. Исключение составляют *Rsp. rubrum* и *Methylobacterium*, которые имеют три ФГК, расположенные в разных частях

бактериальной хромосомы (рис. 4) [98]. На рисунке 4 показаны схемы расположения генов в ФГК ряда пурпурных бактерий. У представителей разных родов организация генов внутри кластера может значительно варьировать.

Фотосинтетические кластеры *Rba. capsulatus* и *Rba. sphaeroides* сходны между собой. Они содержат все фотосинтетические опероны, за исключением *puc*-оперона (рис. 4) [99]. В центре кластера сгруппированы опероны, ответственные за биосинтез бактериохлоринов и каротиноидов (*bch*- и *crt*-опероны), а по краям – *puf*- и *puh*-опероны, кодирующие полипептиды свето-собирающего корового комплекса (ССК-1) и РЦ [100–103]. Гены *puc*-оперона кодируют α и β субъединицы комплекса периферической антенны ССК-2. *Puf*-оперон *Rba. capsulatus* и *Rba. sphaeroides* включает *pufQBALMX* гены [104]. В бактериях, РЦ которых содержит четвертую субъединицу, цитохром *c* (например, *Rubrivivax (Rvi.) gelatinosus*, *Blc. viridis*) есть дополнительный *pufC* ген (рис. 4). У представителей рода *Rhodobacter* первым геном *puf*-оперона является *pufQ* (или *orfQ*), необходимый для синтеза БХл. Внутри *orfQ* находится *puf*-промотор [105, 106]. *PufB* и *A* гены кодируют β - и α -субъединицы ССК-1, а *PufL* и *PufM* гены – L- и M-субъединицы РЦ [99]. Ген *pufX* кодирует полипептид, необходимый для оптимального фототрофного роста [99] и образования димеров комплексов РЦ-ССК-1 [107]. Роль PufX белка заключается в удерживании в открытом состоянии ССК-1, что является необходимым условием для быстрого перемещения хинона Q_B между РЦ и комплексом цитохрома *bc_L* [108]. До сих пор *pufX* ген был найден только у представителей рода *Rhodobacter* [109], однако в структуре РЦ-ССК-1 комплекса из *Rhodopseudomonas palustris* был обнаружен W-полипептид, выполняющий функции PufX белка [110].

Для изучения структуры и функции фотосинтетических генов и кодируемых ими белков был создан целый ряд генетических систем для мутагенеза. Такая система включает в себя родительский бактериальный штамм, в котором группа исследуемых генов заменена в хромосоме на ген устойчивости к тому или иному антибиотику. Вторым компонент системы – плазмидный вектор для комплементации, несущий в своем составе исследуемую группу генов [111]. После внесения мутации в исследуемые гены, они в составе вектора для комплементации переносятся в родительский штамм для экспрессии *in vivo*. Путем комбинирования различных родительских штаммов и плазмид можно получать рекомбинантные штаммы с разными фенотипами.

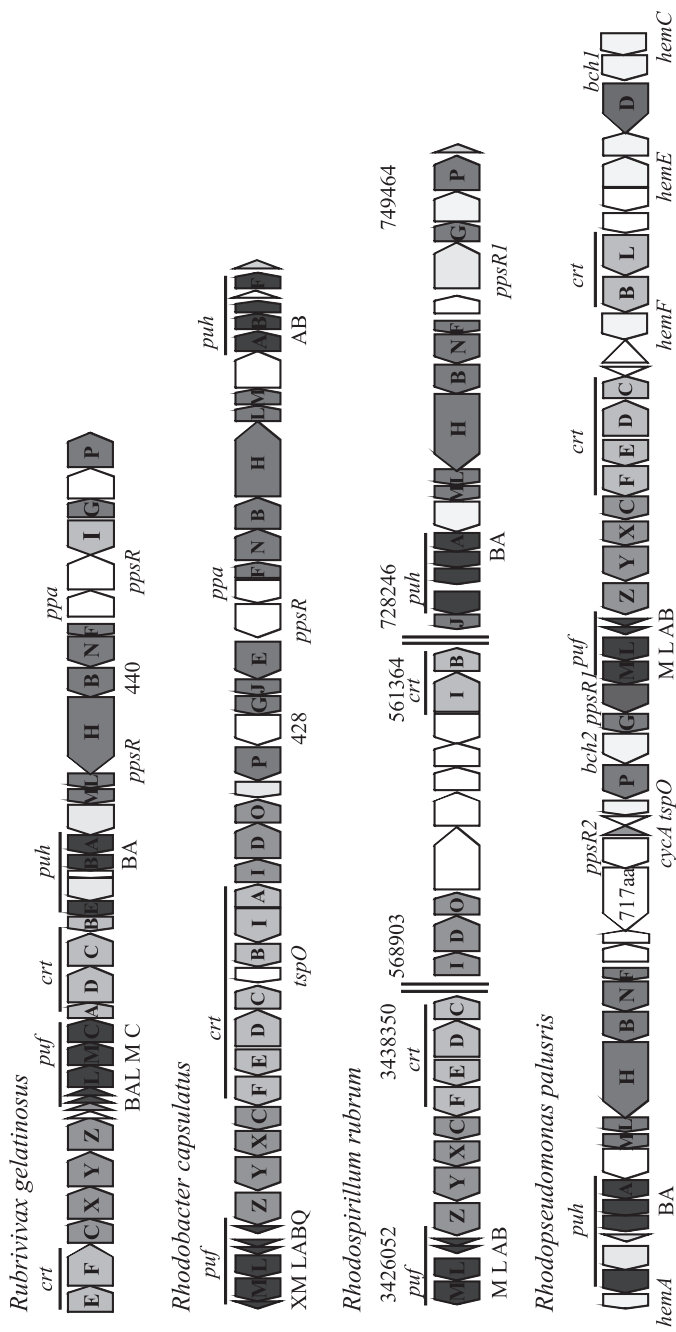


Рис. 4. Фотосинтетические генные кластеры различных пурпурных бактерий.

Черным цветом обозначены *rnf*- и *rnfH*-опероны, содержащие структурные гены реакционного центра и светособирающего комплекса ССК-1. Светло-серым цветом показаны гены биосинтеза каротиноидов, темно-серым – бактенохлорофиллов. Белым цветом обозначены другие фотосинтетического аппарата, а также регуляторные гены. Линиями обозначены различные положения одинаковых групп генов в соседних кластерах. Числа над группами генов *Rhodospirillum rubrum* показывают локализацию отмеченного сегмента в геноме. [98].

Первыми в области мутагенеза фотосинтетических комплексов стали работы, проведенные Дугласом Йованом и соавторами на *Rba. capsulatus* [112–115]. Практически в то же время подобные исследования начали проводить на *Blc. viridis* [116], и *Rba. sphaeroides* [117, 118]. Важную роль для изучения мутантных РЦ сыграло создание генетических систем *Rba. sphaeroides* и *Rba. capsulatus*, позволяющих получать рекомбинантные штаммы без свето-собирающих антенн, в которых РЦ являются единственным БХл-содержащим комплексом. Наиболее широко используемые штаммы такого типа – U43 штамм *Rba. capsulatus*, впервые полученный Йованом и соавторами [113], а также DD13 и DD13/G1 штаммы *Rba. sphaeroides*, впервые описанные Джоунс с соавторами [119, 120].

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА И СВОЙСТВ КОФАКТОРОВ

Симметрия комплекса реакционного центра и мутации по ее восстановлению

Одной из важных особенностей РЦ является сочетание относительной структурной симметрии и строгой функциональной асимметрии. Эти два свойства взаимосвязаны, так как степень гомологии аминокислотных последовательностей L- и M-субъединиц, связывающих кофакторы, составляет всего около 30% [121], и именно различие белкового окружения кофакторов в двух ветвях переноса электрона лежит в основе функциональной активности А-ветви и неактивности В-ветви. Известен ряд работ, направленных на искусственную «симметризацию» РЦ, повышение гомологии отдельных участков L- и M-субъединиц. Наиболее изученный мутантный РЦ в рамках данного направления исследований – так называемый D_{LL} мутант *Rba. capsulatus*, в котором 27 аминокислотных остатков M-субъединицы (M192–217) замещены на симметричный им в структуре РЦ участок L-субъединицы (L165–190) [122]. Каждый из этих параллельных участков M- и L-полипептидов содержит часть α -спирали D и петлю, выходящую на периплазматическую поверхность комплекса. Полученные РЦ характеризуются повышенным уровнем окислительного потенциала P/P⁺ и не содержат БФео Н_A. Из-за значительного снижения стабильности мутантных РЦ их свойства исследовали в составе мембран безантенного штамма [123, 124]. В результате потери Н_A, в D_{LL} РЦ блокируется перенос электрона по А-ветви и значительно увеличивается время жизни возбужденного состояния первичного донора электрона Р*, что позволяет исследовать его свойства. При инкубировании на свету D_{LL} мутант восстанавливает свою способность к фототрофному росту после появления спонтанных

мутаций, приводящих к возвращению БФео H_A . Мутантные РЦ с генетическими конструкциями D_{MM} и D_{LM} оказались нестабильными даже в составе мембран [122]. В недавней работе Картер с соавторами показано, что в РЦ D_{LL} мутанта *Rba. capsulatus* при восстановлении тирозина в позиции, соответствующей M208 (как в РЦ дикого типа) наблюдается образование короткоживущего (<1 пс) состояния с разделенными зарядами $P^+B_A^-$ [125]. Эти данные подтверждают важную роль остатка тирозина M208 (M210 у *Rba. sphaeroides*) в образовании и стабилизации состояния $P^+B_A^-$ [33]. Более подробно роль этого тирозина обсуждается в разделе «Изменение белкового окружения димера бактериохлорофиллов».

Похожие мутантные РЦ *Rba. capsulatus* (так называемый *sym-1* мутант) с замещениями более коротких полипептидов из 17 аминокислот, M187–203, на участок L160–176, были описаны в работе Тагучи и соавторов [126]. Как и в D_{LL} мутанте, в этих РЦ наблюдалось повышение уровня $E_m P/P^+$, связанное, по-видимому, с заменой фенилаланина M195 на гистидин и образованием новой водородной связи между последним и ацетильной группой БХл P_B [127–130]. Позже было создано девять мутантных РЦ, подобных *sym-1*, с более короткими полипептидными заменами в области M162–280 на структурно параллельные участки L-полипептида. Пять из этих мутантов могли расти фототрофно, а в четырех остальных случаях РЦ в мембране не были обнаружены. Особенно критичными для фотосинтетической функции оказались мутации вблизи хинонов [131].

В результате наиболее масштабной замены участков с целью «симметризации» РЦ *Rba. capsulatus*, сделанной в области слабой гомологии последовательностей L- и M-субъединиц, был получен так называемый $Q_A Q_A$ РЦ. Участок L-полипептида, включающий 35 аминокислот (L193–227), был заменен на 42 аминокислотных остатка из M-полипептида (M220–261) [132]. В каждом полипептиде эти последовательности соответствуют двум петлям и короткой α -спиралью, соединяющим цитоплазматические концы трансмембранных спиралей D и E и формирующим часть контактной поверхности между LM и H-полипептидами. Путем этого перемещения полипептидов авторы заменили область белкового кармана для связывания Q_B на соответствующую область связывания Q_A . Среди замещенных аминокислотных остатков оказались те, которые играют ключевую роль в функционировании Q_B , в частности, Glu L212, Asp L213 и Ser L223. Вследствие этого рекомбинантный штамм, содержащий $Q_A Q_A$ РЦ, оказался неспособным к фототрофному росту [132].

Удаление кофакторов

Часть кофакторов РЦ может быть удалена без ущерба для структуры комплекса. Например, в результате единичной замены глицина М71 на лейцин можно получить бескаротиноидный штамм *Rba. sphaeroides*, сходный с упомянутым выше штаммом R-26. Эта мутация блокирует доступ каротиноида к месту его связывания на поверхности белка РЦ [133].

В то время как заселенность хинонового сайта Q_B в очищенных РЦ обычно варьирует из-за непрочности связывания этого кофактора с белком, хинон Q_A часто бывает утерян после модификаций его белкового окружения. Так, с помощью различных спектральных методов [133–135], а также рентгеноструктурного анализа [136], было показано, что в результате мутации A(M260)W были получены РЦ, не содержащие хинон Q_A . В таких РЦ Q_B остается единственным хиноном, что активирует перенос электрона по В-ветви. В результате сходного замещения A(M248)W также были получены РЦ без Q_A [133]. При внесении мутации T(M250)V в РЦ *Rba. capsulatus* [137] или замещении триптофана М252 на другие остатки в РЦ *Rba. sphaeroides* [138] белковый сайт связывания Q_A бывает заселен в РЦ, находящемся в мембране, но теряет хинон при выделении РЦ. В случае замены Trp М252 на Phe или Tug потеря Q_A обратима, но заселенность сайта нельзя восстановить, если проводить замену Trp М252 на неароматический аминокислотный остаток.

Некоторые бактериохлориновые кофакторы также могут быть исключены из РЦ в результате одиночного аминокислотного замещения. Например, в результате замены Ala М149 на Trp был получен РЦ *Rba. sphaeroides*, не имеющий БФео в В-ветви кофакторов [139]. Вывод об отсутствии этого БФео в мутантном РЦ был подтвержден рентгеноструктурными данными и спектром поглощения РЦ в мембране, однако, это не повлияло на функционирование комплекса. В D_{LL} мутанте *Rba. capsulatus*, о котором упоминалось выше, отсутствует БФео активной ветви кофакторов, что приводит к блокированию переноса электрона по этой ветви [122].

Известны мутантные РЦ, не имеющие димера БХл. Например, в спектре поглощения РЦ с аминокислотным замещением валина L157 на аргинин полностью отсутствовала полоса Q_Y Р. Соотношение БХл:БФео в этих РЦ составляло 1,25, что свидетельствует о потере большей части димера БХл [140]. В РЦ с тройным замещением гистидинов на глицины H(L168)G+H(L173)G+H(M202)G молекула димера, очевидно, теряется в результате утраты координационных и водородных связей составляющих ее молекул БХл с окружающим

белком [141]. В спектре поглощения этого РЦ также отсутствует полоса Q_Y -перехода Р, и соотношение БХл:БФео в изолированных РЦ составляет 1:1.

Был описан мутантный РЦ H(L153)Y *Rba. sphaeroides*, в котором замещение гистидина, лигандирующего атом магния БХл B_A , на тирозин, приводит к дестабилизации комплекса и потере мономерного БХл активной ветви. В спектре поглощения РЦ H(L153)Y, также как и в спектре поглощения РЦ с двойной мутацией H(L153)Y+H(M182)L, где вместо БХл B_B присутствует БФео, не наблюдается полоса поглощения БХл B_A . Исследование мембрансвязанных мутантных РЦ H(L153)Y методом спектроскопии высокого временного разрешения показало 14-кратное снижение квантового выхода образования радикальной пары $P^+Q_A^-$ и увеличение времени жизни P^* до 200 пс [142–144].

Замещение кофакторов

Как уже упоминалось в разделе IV, многие кофакторы переноса электрона в бактериальном реакционном центре могут быть заменены на их производные или молекулы того же класса с помощью методов химического замещения. Использование сайт-направленного мутагенеза позволяет осуществить биологическое замещение, при котором в бактериальных клетках осуществляется биосинтез комплексов РЦ с измененным составом пигментов. Замещение кофакторов в данном случае ограничивается молекулами БХл и БФео и достигается путем удаления или введения аминокислотных остатков, образующих координационную связь с атомами Mg.

Методом сайт-направленного мутагенеза каждый из бактериохлорофиллов димера Р в РЦ *Rba. capsulatus* и *Rba. sphaeroides* был заменен на БФео. Таким образом, были получены РЦ с БФео на месте P_B при замещении His M200 (M202 для *Rba. sphaeroides*) на Leu, Phe или Glu [145–149] и на месте P_A при замещении His L173 на Leu [145, 147, 150]. Гетеродимерные РЦ послужили хорошим объектом при исследовании влияния электронной асимметрии первичного донора на однонаправленный перенос электрона. Структурная и функциональная асимметрия возникает из-за значительных отличий в свойствах БХл и БФео, в частности, из-за разных окислительно-восстановительных потенциалов. Показано, что *in vitro* молекулу БФео на 150–300 мВ сложнее окислить, чем молекулу БХл, и также легче восстановить [151, 152]. В соответствии с этим, при разделении зарядов внутри гетеродимера (D) более стабильным оказывается состояние $D_{БХл}^+ D_{БФео}^-$ по сравнению с состоянием $D_{БХл}^- D_{БФео}^+$ [153]. В РЦ *Rba. sphaeroides* окислительный потенциал D на 140–160

мэВ более положителен, чем потенциал гомодимера Р [148, 154], и в то же время, состояние D^* несколько ниже по энергии, чем P^* . Эти различия приводят к тому, что в РЦ с гетеродимером свободная энергия состояний с разделенными зарядами растет, а свободная энергия D^* практически не изменяется, вследствие чего становится энергетически невозможным образование состояния $D^+B_A^-$. Поэтому в обоих гетеродимерных РЦ перенос электрона на H_A протекает по одностадийному суперобменному механизму за 45 пс в Н(М202)L и 85 пс в Н(L173)L [146]. Подробно свойства гетеродимерных мутантов были описаны в обзорах [137, 155] и последующих работах [149, 156–158]. Из данных рентгеноструктурного анализа РЦ Н(М202)L, полученных с разрешением 3,0 и 2,55 Å [159, 160] следует, что общая структура димера сохраняется, и изменения его белкового окружения незначительны, однако мутантный реакционный центр теряет консервативную молекулу воды, расположенную в РЦ дикого типа между аминокислотным остатком His M202 и кето группой B_A [21], которая играет важную роль в процессе первичного разделения зарядов [21, 22]. Исходя из этих данных, был сделан вывод, что эффект мутации, по-видимому, складывается из двух факторов – изменения свойств димера Р и ухода молекулы воды из окружения первичного донора электрона.

Мономерные бактериохлорофиллы в РЦ также могут быть замещены с помощью сайт-направленного мутагенеза. В В-ветви замена His M182 на Leu в РЦ *Rba. sphaeroides* (M180 в РЦ *Rba. capsulatus* и *Blc. viridis*) приводит к появлению молекулы БФео (Φ_B) в сайте связывания B_B (так называемый ϕ -мутант) [115, 161]. Более подробно о свойствах этого мутанта говорится в разделе «Перенос электрона по В-ветви». При замещении His L153, лиганда атома Mg БХл B_A , на Leu появление молекулы БФео в сайте связывания B_A наблюдалось только в РЦ *Blc. viridis* [162]. В мутантных РЦ было отмечено появление долгоживущего состояния $P^+\Phi_A^-$, обусловленное изменением уровня свободной энергии первичного акцептора электрона. В РЦ *Rba. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* ни одно из большого количества замещений His L153 не привело к замене БХл B_A на БФео [115, 144, 163]. При этом в спектре мутантных РЦ с замещениями His L153 на Thr [115], Gly, Val, [163], Cys и Met [144] появлялись значительные изменения в области поглощения бактериохлорофиллов, вызванные изменением природы лиганда БХл B_A [164]. Было показано, что мутация в положении L153 влияет на спектральные свойства не только мономерного БХл, но и димера БХл Р, а также на стабильность РЦ в целом. В процессе выделения ряда

мутантных РЦ наблюдалось появление фракции без димера Р наряду с фракцией, содержащей полный набор пигментов [163, Леонова, неопубликованные данные]. Было показано, что замещение Н(L153)L приводит к дестабилизации РЦ, затрудняющей их исследования не только в изолированном состоянии [163], но и в составе безантенных хромофоров [144]. Было высказано предположение, что возможность замещения His L153 без значительных структурных нарушений в РЦ *Blc. viridis* связана с наличием цитохромной субъединицы на периплазматической стороне РЦ, способствующей стабилизации структуры комплекса [54].

Возможно также обратное замещение молекулы БФео на БХл в результате целого ряда мутаций. Так называемые β -мутантные РЦ *Rba. sphaeroides*, содержащие БХл B_A на месте БФео H_A , были получены путем замещения Leu M214 (Leu M212 в *Rba. capsulatus*) на His [165, 166] а также в результате одиночной мутации A(L124)H и двойной мутации F(L121)H+F(L97)V/C [167]. В первом случае гистидин M214, лиганд атома Mg, располагается на расстоянии координационной связи вблизи молекулы БХл β_A , и каких-либо дополнительных конформационных изменений в белковом окружении не наблюдается [168]. Во втором случае в лигандировании, по-видимому, участвует молекула воды (подробнее в разделе «Мутации, затрагивающие молекулу воды») [167]. В β -мутантных РЦ наблюдается замедление скорости переноса электрона и уменьшение квантового выхода образования радикальной пары $P^+Q_A^-$. В В-ветви замена Leu L185 на His в параллельной позиции также приводит к замещению БФео H_B на БХл β_B , однако данная мутация не изменяет кинетики переноса электрона по А ветви [139].

Недавно были исследованы РЦ из штамма *Rba. sphaeroides*, мутантного по магний-хелатазе (bchD) [169, 170]. Было показано, что в этих РЦ в сайтах связывания всех бактериохлоринов находится шесть молекул Zn-БХл. Четыре из них расположены на месте БХл и имеют Q_X -переход при 600 нм, остальные два, расположенные на месте БФео, поглощают при 560 нм. Разница в положении Q_X -полос Zn-БХл авторы объясняют наличием или отсутствием лиганда к атому цинка. Эффективность электронного транспорта в таких РЦ составляет более 95% от квантового выхода в РЦ дикого типа [170].

Изменение белкового окружения димера бактериохлорофиллов

В последние годы появилось много работ, в которых с помощью спектральных методов и генетических подходов показано, что взаимодействие димера БХл Р с белком играет важную роль в функционировании РЦ [54, 171, 172]. Ярким подтверждением этого являются гетеродимерные мутанты, описанные выше.

На энергию катион-радикала P^+ могут, очевидно, влиять электростатические взаимодействия с заряженными аминокислотными остатками из ближайшего белкового окружения димера. В ряде работ были проведены замещения, привносящие или удаляющие ионизируемые аминокислотные остатки в разных положениях на расстоянии 10–15 Å от Р [173–175]. Для некоторых из таких мутантных РЦ наличие электростатических взаимодействий между димером Р и белковым окружением было подтверждено зависимостью $E_m P/P^+$ от рН [173, 176]. Как правило, величина равновесного потенциала пары P/P^+ понижалась максимум на 60 мВ, если дополнительный отрицательный заряд появлялся на расстоянии до 10 Å от молекулы димера БХл, и повышалась максимум на 50 мВ, когда привносился положительный заряд.

Молекула бактериохлорина имеет 2 карбонильные группы – ацетильную в первом кольце и кето группу в третьем. Обе эти группы входят в систему сопряженных связей и могут служить акцепторами протона. В работах по исследованию влияния водородных связей на структуру димера БХл были сконструированы мутантные РЦ с измененными аминокислотными остатками вблизи этих групп. Например, с помощью замещения Н(L168)F удаляется водородная связь гистидина с ацетильной группой P_A , а в симметричной позиции M197 (рис. 5), напротив, замещением F(M197)H создается водородная связь с P_B [127, 162, 177, 178]. Появление аминокислотных остатков His вместо Leu в позициях L131 и M160 приводит к образованию водородных связей с кето группой P_A и P_B , соответственно (рис. 5) [179]. Комбинируя мутации можно варьировать число водородных связей от 0 до 4-х [180], и появление или удаление такой связи в каждой позиции можно отслеживать с помощью инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием и Рамановской спектроскопии с Фурье преобразованием [130, 181]. В недавней работе Дешмух и соавторов, при исследовании 11 мутантов с разным числом и положением водородных связей димера БХл Р с его белковым окружением, методами оптической и Штарк-спектроскопии были получены данные, свидетельствующие о связи между диэлектрической релаксацией белка вблизи Р и фотоиндуцированными конформационными изменениями [182].

Изменение количества водородных связей димера БХл с белком оказывает заметное влияние на величину окислительно-восстановительного потенциала Р [54, 172]. Результаты измерения окислительно-восстановительного потенциала показывают, что каждая водородная связь повышает величину $E_m \text{ Р/Р}^+$, которая в РЦ дикого типа составляет около 500 мВ. Удаление водородной связи в результате мутации Н(L168)F, напротив, понижает величину $E_m \text{ Р/Р}^+$ на 90 мВ. За счет сложения эффекта нескольких мутаций можно изменять $E_m \text{ Р/Р}^+$ от 410 мВ (Р без водородных связей) до 765 мВ (4 водородные связи Р с белком). В то же время, по данным рентгеноструктурного анализа в структуре РЦ с мутациями по L(L131)H, L(M160)H, F(M197)H и Н(L168)F не было найдено существенных изменений, за исключением поворота ацетильной группы на 20–27° и небольшого смещения РА в РЦ Н(L168)F [178, 183].

Тесное перекрывание первых колец тетрапирролов специальной пары Р приводит к обобществлению электронных орбиталей и, как следствие, к изменению свойств Р по сравнению с мономерным БХл. Одно из изменений – красный сдвиг длинноволновой полосы поглощения димера относительно полос поглощения мономерных БХл. В реакционных центрах дикого типа измерения электронной плотности неспаренного электрона методом ENDOR дает соотношение 2:1 на L стороне димера, по сравнению с M стороной. Показано, что путем изменения количества водородных связей Р с белком можно смещать распределение электронной плотности на двух молекулах БХл димера. Доля электронной плотности на БХл P_A может изменяться от 22% до 83% [184].

Известно, что в РЦ *Blc. viridis* и *Chromatium tepidum* в положении M197 находится тирозин, который образует водородную связь с кислородом ацетильной группы БХл P_B [185, 186]. В РЦ *Rba. sphaeroides* в положении M197 находится фенилаланин, и такая водородная связь отсутствует. Мутация F(M197)H приводит к ее появлению, и, следовательно, к повышению окислительно-восстановительного потенциала Р [187, 188]. Примечательно, что несмотря на вышесказанное, величины $E_m \text{ Р/Р}^+$ в РЦ *Blc. viridis* и *Rba. sphaeroides* одинаковы и составляют около 500 мВ [180, 189]. Причиной этого, по-видимому, является наличие С-субъединицы в РЦ *Blc. viridis*, которая отделяет специальную пару БХл от водной фазы, что приводит к сдвигу окислительно-восстановительного потенциала. Дополнительная водородная связь одного из БХл Р уравнивает этот эффект [190]. Одновременное присутствие тирозина M197 и С-субъединицы было показано для 16 видов пурпурных бактерий [191].

В работе Холден-Дай и соавторов для исследования взаимосвязи между структурой РЦ *Rba. sphaeroides* и его термостабильностью также использовались мутантные РЦ с измененным числом водородных связей димера БХл Р с белком [192]. Было показано, что образование водородной связи БХл Р_В с His M197 повышает термостабильность белка, а потеря такой связи БХл Р_А с His L168 при замещении этого остатка на Phe, снижает термостабильность комплекса РЦ. Однако повышения стабильности не наблюдалось, если в положении M197 находились Tug или Asp, способные образовывать водородные связи с ацетильными группами БХл специальной пары. С использованием данных рентгеноструктурного анализа и дополнительных мутаций авторам удалось выяснить причину этого противоречия. Оказалось, что остатки His M197 и L168 образуют по 2 дополнительные водородные связи с Asn M195 и L166, соответственно, что значительно повышает стабильность РЦ. По-видимому, не всякая водородная связь БХл с белком способствует укреплению комплекса, так как помещение гистидинов в положения M160 и L131, приводящее к образованию таких связей с кето группами БХл Р_В и Р_А соответственно, не повышает, а понижают термостабильность РЦ [192].

Реакционные центры *Rba. sphaeroides* с замещениями остатка Tug M210 относятся к наиболее детально изученным мутантным РЦ в отношении исследования скоростей переноса электрона, свойств первичного донора и других аспектов фотохимического разделения зарядов. Кроме того, для РЦ Y(M210)W получены данные рентгеноструктурного анализа [136, 193, 195]. Парсон математически обосновал предположение, что ОН-группа тирозина M210 (рис. 5) в РЦ *Rba. sphaeroides* (M208 в РЦ *Blc. viridis* и *Rba. capsulatus*) является одним из факторов, создающих разницу в уровнях энергии состояний $P^+B_V^-$ и $P^+B_A^-$, и что ориентация этой группы способствует стабилизации состояния $P^+B_A^-$ [196, 197]. Замещения Y(M210)W и Y(M210)L влияют на величину окислительно-восстановительного потенциала первичного донора, возрастающего на 55 мВ и 30 мВ, соответственно, по сравнению с величиной $E_m P/P^+$ в РЦ дикого типа [198]. Одновременно на 60 мВ уменьшается разница уровней свободных энергий между состояниями P^* и $P^+H_A^-$ [199]. Время жизни P^* увеличивается от 3 пс в РЦ дикого типа до нескольких десятков пс в РЦ Y(M210)W и 190 пс в РЦ Y(M210)L [194, 200]. В работах Яковлева и соавторов методом фемтосекундной спектроскопии была исследована роль остатка Tug M210 в разделении и стабилизации зарядов между первичным донором электрона Р и первичным акцеп-

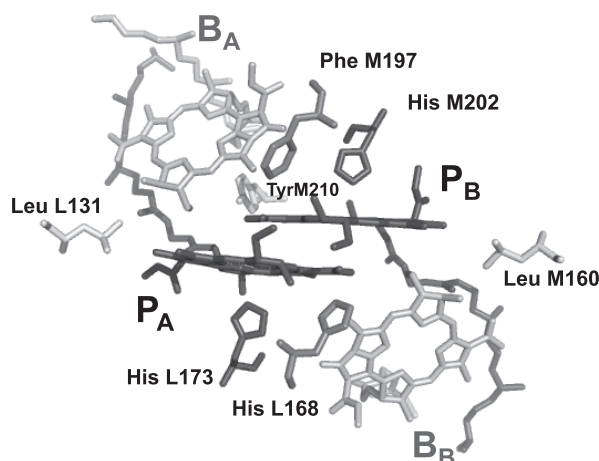


Рис. 5. Окружение димера бактериохлорофиллов (БХл) Р в структуре реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides*.

Координаты взяты из Protein Data Bank, файл 1M3X [12]. На рисунке отмечены кофакторы переноса электрона: P_A и P_B – молекулы БХл, образующие димер (плоскости макроциклов расположены перпендикулярно плоскости рисунка), B_A и B_B – мономерные БХл активной и неактивной ветвей переноса электрона, соответственно, и аминокислотные остатки His M202, His L173, Leu L131, Leu M160, His L168, Phe M197 и Tyr M210.

тором электрона B_A в РЦ *Rba. sphaeroides* [33]. Показано, что, как в нативных, так и в мутантных РЦ наблюдается обратимое когерентное фемтосекундное заселение состояния $P^+B_A^-$, однако в РЦ с замещениями Тирг М210 практически полностью отсутствовала стабилизация зарядов состояния $P^+B_A^-$ в пикосекундном временном интервале. Согласно полученным данным, взаимодействие полярной ОН-группы Тирг М210 с заряженными молекулами БХл P^+ и B_A^- ускоряет разделение зарядов между ними и стабилизирует состояние с разделенными зарядами $P^+B_A^-$. С помощью направленного мутагенеза было продемонстрировано, что отсутствие тирозина в положении М210 в мутантных РЦ не компенсируется его введением в положение М197 или значительным увеличением разницы свободной энергии состояний P^* и $P^+B_A^-$ в мутантных РЦ Y(M210)L+H(L168)L [201, 202].

Перенос электрона по В-ветви

В РЦ пурпурных бактерий уровень свободной энергии состояния $P^+B_B^-$ находится выше уровня P^* (в РЦ *Blc. viridis* на 240 мэВ [196], *Rba. capsulatus* на 100 мэВ [203], и в РЦ *Rba. sphaeroides* на ~50 мэВ), а уровень $P^+B_A^-$ находится несколько ниже уровня P^* [73]. Считается,

что эта разница в уровнях свободной энергии является одним из основных факторов, определяющих функциональную неактивность В-ветви [43]. Мутации, способствующие переносу электрона по В-ветви и затрудняющие его в А-ветви подробно рассмотрены в обзорах [4, 172], мы кратко остановимся лишь на некоторых из них.

В работе Кирмайер и соавторов описаны РЦ *Rba. capsulatus*, в которых аминокислотный остаток Leu M212 был замещен на His, что привело к замене молекулы БФео H_A на БХл β_A , и, как следствие, к значительному повышению уровня свободной энергии состояния $P^+\beta_A^-$ по сравнению с $P^+H_A^-$ (рис. 3). Еще одно замещение G(M201)D вблизи пятого кольца молекулы B_A вызвало повышение уровня свободной энергии состояния $P^+B_A^-$, в результате чего перенос электрона в А-ветви был замедлен в несколько раз [204]. В РЦ двойного мутанта G(M201)D+L(M212)H *Rba. capsulatus* наблюдается образование состояния $P^+H_B^-$ с квантовым выходом 15%, а также резкое ускорение процессов рекомбинации в А-ветви. Добавление третьей мутации S(L178)K, около пятого кольца БХл B_B , привело к понижению уровня энергии состояния $P^+B_B^-$ и увеличению квантового выхода переноса электрона по В-ветви до 23% [204]. Подобный результат достигается с помощью мутации F(L121)D, которая приводит к значительному повышению уровня энергии $P^+H_A^-$. В реакционном центре *Rba. capsulatus* с тройным замещением –F(L97)V+F(L121)D+L(M212)H, состояние $P^+H_B^-$ образуется с квантовым выходом 12%, а добавление четвертой мутации G(M201)D увеличивает его до 18% [203]. В недавно полученном тройном мутанте F(L181)Y+Y(M208)F+L(M212)H *Rba. capsulatus* в фотохимически активной фракции РЦ квантовый выход реакции образования $P^+H_B^-$ достигает 30%, и регистрируется дальнейший перенос электрона на Q_B с общим квантовым выходом 13% [205, 206]. Рекордный квантовый выход образования состояния $P^+H_B^-$ (80%) был зарегистрирован в фотохимически активной фракции РЦ мутанта D_{LL} -FYLFM *Rba. capsulatus*, причем процесс переноса электрона по В-ветви был близок к безактивационному, как и в А-ветви [207]. Перенос электрона в В-ветвь на H_B также наблюдался в гетеродимерных РЦ *Rba. capsulatus* в сочетании с дополнительной мутацией L(M212)H [153].

Хотя скорости электронного транспорта в РЦ *Rba. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* приблизительно одинаковы, направить перенос электрона по В-ветви в РЦ *Rba. sphaeroides* оказалось несколько сложнее, чем в РЦ *Rba. capsulatus* [208]. Катилиус и соавторы показали, что замещение His M182 на Leu в РЦ *Rba. sphaeroides* приводит к замене молекулы БХл B_B на молекулу БФео (Φ_B) [161]. В таких мутантных

комплексах скорость переноса электрона по В-ветви была соизмерима со скоростью переноса электрона по А-ветви в РЦ дикого типа, однако перенос электрона в РЦ Н(М182)L идет только от P^* на $P^+\Phi_B^-$, но не на $P^+H_B^-$, поскольку уровень свободной энергии состояния $P^+\Phi_B^-$ ниже уровня P^* на 160 мэВ, в то время как $P^+H_B^-$ – всего на 70 мэВ (рис. 3) [209]. Дополнительные аминокислотные замещения М(Л174)D, V(М175)D и Т(М133)D, призванные повысить энергию $P^+\Phi_B^-$, не способствовали увеличению потока электронов по неактивной ветви [210].

Высокоэффективный перенос электрона по В-ветви в РЦ *Rba. sphaeroides* был описан в работе Хатыпова и соавторов [142, 143]. Двойная мутация Н(Л153)Y+Н(М182)L привела одновременно к замене молекулы БХл В_В на молекулу БФео Φ_B и к потере мономерного БХл В_А. В спектре поглощения этих РЦ отсутствует длинноволновая полоса мономерных БХл в области 800 нм и появляется дополнительная полоса с максимумом 785 нм, соответствующая поглощению БФео Φ_B . Результаты спектроскопии высокого временного разрешения показали, что перенос электрона в мембрансвязанных РЦ Н(Л153)Y+Н(М182)L идет только по В-ветви с образованием состояния с разделенными зарядами $P^+\Phi_B^-$ в течение 2 пс с последующей рекомбинацией в основное состояние с временной константой ~180 пс [142, 143]. Эти данные согласуются с результатами, полученными [161] на РЦ Н(М182)L, однако если квантовый выход образования радикальной пары $P^+\Phi_B^-$ в РЦ двойного мутанта приближается к 100% с последующей рекомбинацией в основное состояние [142], то в РЦ Н(М182)L он составляет всего порядка 35%, и 65% приходится на образование радикальной пары $P^+H_A^-$ [161]. Дальнейший перенос электрона по А- или В-ветви в РЦ Н(Л153)Y+Н(М182)L отсутствует, поэтому данный мутантный штамм *Rba. sphaeroides* не способен к фототрофному росту.

В недавней работе Яковлева и соавторов методом дифференциальной фемтосекундной спектроскопии показано, что в РЦ тройного мутанта S(Л178)K+G(М203)D+L(М214)H *Rba. sphaeroides* активирован перенос электрона по В-ветви кофакторов, а перенос электрона в А-ветви заторможен [211]. В результате процессы разделения зарядов регистрируются в обеих ветвях кофакторов, причем состояние $P^+H_B^-$ формируется на ~50 фс раньше состояний $P^+B_A^-/P^+\beta_A^-$.

*Модификация участка взаимодействия
реакционного центра с цитохромом с*

Перенос электрона от цитохрома *c* на окисленный первичный донор P^+ является одним из важных этапов фотохимического разделения зарядов. В 2002 г. Аксельрод с соавторами с помощью рентгеновской кристаллографии определили структуру объединенного комплекса цит c_2 -РЦ *Rba. sphaeroides*, и было показано, что в кристаллах перенос электрона с цитохрома c_2 на первичный донор Р осуществляется с той же скоростью, что и в растворе [212]. Молекула цит c_2 контактирует с центром периплазматической поверхности РЦ, при этом гем цитохрома обращен непосредственно к димеру Р, также как в структуре РЦ *Blc. viridis*, у которого цитохром *c* является четвертой субъединицей комплекса [13]. В области контакта между цит c_2 и РЦ *Rba. sphaeroides* выделяют два важных домена – центральный гидрофобный домен, состоящий из остатков, отвечающих за Ван-дер-Ваальсовы и гидрофобные взаимодействия, а также окружающую его область аминокислотных остатков, несущих электростатический заряд – на цитохроме положительный, на поверхности РЦ отрицательный [45].

Молекулярные основы связывания двух комплексов и переноса электрона между ними изучались с использованием методов химической [213] и генетической модификаций [214, 215]. С помощью сайт-направленного мутагенеза была исследована роль гидрофобных остатков, а также остатков, образующих водородные связи [187, 216, 217]. Оказалось, что мутации аминокислотных остатков, расположенных на поверхности контакта РЦ и цит c_2 , могут влиять на ассоциацию – диссоциацию комплексов, а также на перенос электрона между ними. При этом замещения заряженных остатков в этой области, в основном, оказывают влияние на связывание комплексов, существенно не меняя скорость переноса электрона [214]. Эти результаты свидетельствуют о том, что короткие взаимодействия между комплексами, отвечающие за туннельный перенос электрона, происходят через гидрофобный домен в центре области контакта РЦ и цит c_2 . Противоположно заряженные остатки на поверхности контакта двух комплексов разделены растворителем и поэтому не оказывают заметного влияния на туннелирование электрона [218]. В свою очередь, замещения гидрофобных остатков в центральной области контакта показывают, что гидрофобные взаимодействия важны как для связывания, так и для передачи электрона с цит c_2 на первичный донор Р [187, 216].

Мутации, затрагивающие молекулы воды

В структуре РЦ *Rba. sphaeroides*, полученной с разрешением 1,87 Å [219], насчитывается более 400 молекул воды, сгруппированных, в основном, на периплазматической или цитоплазматической стороне мембраны, но также встречающихся вблизи димера БХл и хинонов и, в единичных случаях, в центральной мембранной части РЦ [12, 21, 219]. Как известно, молекулы воды полярны, способны образовывать водородные связи и донировать протоны, поэтому их появление в гидрофобной части мембранного комплекса или исчезновение из нее в результате мутации может серьезно повлиять на свойства и функционирование РЦ, хотя предсказать такие эффекты чаще всего невозможно [54]. Например, замещение Ser L223 на Ala или Asp дает РЦ с нефункциональным сайтом Q_B , а замещение этого Ser на Gly не нарушает работы Q_B сайта [220], замена Glu L212 на Gln нарушает функционирование Q_B , а при замещении Glu на Ala этого не происходит [221]. Было высказано предположение, что при замещении Ser и Glu на остатки меньшего объема в белковом кармане остается пространство, которое может занять молекула воды, способная выполнить функции природного серина или глутаминовой кислоты [220, 221].

Несмотря на то, что глицин не может служить лигандом для атома Mg БХл, в РЦ H(L173)G и H(M202)G первичный донор представлен парой молекул БХл [222]. Авторы этой работы предположили, что вместе с небольшой по объему молекулой Gly, заместившей His, в белковое окружение БХл могла встроиться молекула воды, которая и послужила пятым лигандом атома магния. Аналогичное предположение было выдвинуто Хеллером и соавторами [167] для объяснения замещения БФео H_A на БХл в РЦ двойного мутанта F(L97)V+F(L121)H, в котором расположение нововведенного His L121 было неоптимально для лигандирования атома магния БХл. Поскольку теоретически предсказать появление или удаление воды из структуры мутантных РЦ сложно, при изучении этой проблемы представляется целесообразным сочетать спектральные измерения и рентгеноструктурные исследования [54].

В качестве примера влияния мутации на конкретную молекулу воды можно назвать РЦ G(M203)L *Rba. sphaeroides*. В этом РЦ глицин M203, расположенный между димером Р и мономерным БХл А-ветви, был замещен на лейцин, и эта мутация привела к четырехкратному замедлению скорости первичного переноса электрона от P^* к B_A при 90 К [22]. Данные рентгеноструктурного анализа мутантного РЦ

показали, что молекула воды, расположенная в РЦ дикого типа на расстоянии водородной связи от кето группы БХл В_А и His M202, была вытеснена остатком Leu [21]. Хотя причины замедления электронного транспорта в РЦ G(M203)L остаются до конца невыясненными, было высказано предположение, что при удалении этой воды из РЦ мутанта G(M203)L прекращается перенос электрона с P* на В_А по наиболее эффективному пути по цепочке полярных атомов N-Mg(P_В)-N-C-N(His M202)-HOH55-O-(В_А) [22].

Мутации, направленные на изучение эволюционной связи между бактериальными реакционными центрами и фотосистемой 2

Сравнение структур РЦ пурпурных бактерий и фотосистемы 2 (ФС 2) цианобактерий и растений, относящихся к одному, хинонному, типу фотосинтетических реакционных центров, началось сразу после получения результатов рентгеноструктурного анализа первых кристаллов бактериальных РЦ [223] и продолжилось с появлением данных о трехмерной структуре ФС 2 [6, 172]. Главное отличие комплекса ФС 2 от РЦ бактерий состоит в том, что первый обладает способностью акцептировать электроны непосредственно от воды, а бактериальные РЦ в качестве доноров электрона использует цитохромы – молекулы со значительно более низким потенциалом. Окисление воды до кислорода в ФС 2 осуществляется благодаря наличию в ней ряда факторов: первичного донора электрона, димера Хл, обладающего очень высоким окислительно-восстановительным потенциалом, остатка Туг, который служит вторичным донором электрона, а также 4-х ядерного марганцевого кластера, способного принять 4 электрона для окисления воды. Ни одного из этих факторов нет в РЦ бактерий.

В лаборатории Аллена и Вильямс был проведен ряд модификаций бактериальных РЦ для исследования их способности фотоокислять тирозин, а также связывать и окислять марганец. С помощью направленных замещений Leu L131, Leu M160 и Phe M197 на His, а также Туг M210 на Тгр был получен РЦ *Rba. sphaeroides*, равновесный потенциал пары P/P⁺ которого составлял +800 мВ, что на 300 мВ выше потенциала специальной пары в РЦ дикого типа [224]. После введения дополнительных остатков Туг в положения M164, L135 или L167, с помощью ЭПР спектроскопии были получены доказательства окисления тирозина в мутантных РЦ [224, 225]. Также были введены дополнительные остатки His вблизи каждого из вновь внесенных остатков Туг, а также вблизи природных Туг L162 и M193, чтобы обеспечить акцептор протона, образуемого и высвобождаемого при фотоокислении тирозина [226]. Таким образом была

показана принципиальная возможность фотоокисления каждого из пяти тирозинов в полученном мутантном РЦ и установлена зависимость этого процесса от pH и наличия акцептора протона. На основе мутантного штамма L(L131)H+L(M160)H+F(M197)H++R(M164)Y с высоким E_m P/P⁺ и дополнительным тирозином в окружении первичного донора были получены РЦ, способные связывать и фотоокислять марганец [183, 227]. Для этого были введены в разных комбинациях дополнительные замены Met M168 и Val M192 на Glu и Gly M288 на Asp. Все эти аминокислотные остатки расположены в непосредственной близости от Glu M173, который является структурным аналогом Asp 170 субъединицы D1, входящей в состав димера белков D1D2 – ядра фотосистемы 2 растений, и играет ключевую роль в связывании марганцевого кластера. Три из четырех полученных мутантных РЦ были способны связывать марганец, а у одного из них наблюдался перенос электрона от марганца на фотоокисленный первичный донор P [183]. Было установлено, что процесс связывания марганца в мутантных РЦ зависел от pH, и при pH 8,0 наблюдалось высвобождение двух протонов [228]. Таким образом, с помощью небольшого количества аминокислотных замещений бактериальный РЦ можно так модифицировать, что он приобретает способность фотоокислять тирозин, а также связывать и окислять редокс-активный марганец, что свидетельствует об определяющей роли белкового окружения кофакторов в эволюции фотосинтетических комплексов. Следует отметить, что глобальный анализ белковых последовательностей бактериальных РЦ и ФС 2 цианобактерий показал, что механизмы регулирования окислительно-восстановительных свойств кофакторов и направленности электронного транспорта в ФС 2 могут отличаться от тех, которые функционируют в бактериальных РЦ [6, 191].

В РЦ фотохимически активного мутанта *Rba. capsulatus*, названного D1-ILMH, в результате изменения белкового окружения димер БХл Р стал походить на димер Хл ФС 2 растений [229]. После замены четырех аминокислот в L субъединице (L167–L170) вблизи димера Р образовался сегмент из 11 аминокислотных остатков, сходный с аналогичным сегментом D1 субъединицы ФС 2. Согласно данным ЭПР электронные свойства димера БХл изменились настолько, что он стал функционально более «мономерным», сохранив при этом невысокий окислительный потенциал P/P⁺ и характерную для бактериальных РЦ ориентацию в мембране.

В работе Лин и соавторов описан мутантный по магний-хелатазе (*bchD*) штамм *Rba. sphaeroides*, в РЦ которого специальная пара и

мономерный БХл представлены Zn-БХл вместо Mg-БХл, и в сайте связывания БФео также обнаружен Zn-БХл. Несмотря на значительное изменение пигментного состава, в этих РЦ была отмечена высокая эффективность электронного транспорта, составляющая более 95% от таковой в РЦ дикого типа. Авторы считают, что в РЦ, содержащих Zn-БХл, разница уровней энергий, от которой зависят кинетики и направленность электронного транспорта, определяется исключительно белковым окружением шести идентичных бактериохлороиновых кофакторов, как и в фотосистеме первого типа растений [170].

Неожиданные эффекты направленных мутаций

Не смотря на то, что бактериальные РЦ считаются достаточно хорошо изученными, эти комплексы хранят еще немало секретов, о чем свидетельствуют описанные в литературе неожиданные результаты некоторых аминокислотных замен. В разделе «Симметрия комплекса реакционного центра и мутации по ее восстановлению» упоминался фотохимически неактивный реакционный центр $Q_A Q_A$ мутанта *Rba. capsulatus* [132], в котором белковый участок связывания Q_B был заменен на участок связывания Q_A , что приводило к потере сродства вторичного хинонного акцептора к белку. При инкубировании на свету этот мутант возвращал себе способность к фототрофному росту за счет двух спонтанных обратных мутаций – M(M144)I и A(M145)S, которые были обнаружены в стороне от Q_B сайта, рядом с БФео H_B . Полученный мутантный РЦ, так называемый $A_6 D_1$ -комплекс, был достаточно стабилен, и в результате компенсирующих мутаций афинность хинона Q_B к сайту его связывания увеличилась до 33% от исходной величины в РЦ дикого типа, хотя скорость переноса электрона от Q_A на Q_B оставалась замедленной (в 500 раз ниже, чем в РЦ дикого типа) [51]. Отсутствие структурных данных об $A_6 D_1$ -комплексе затрудняет объяснение этого удивительного феномена, однако и другие авторы, исследовавшие мутантные РЦ с замещениями ключевых остатков Q_B сайта, Glu L212 и Asp L213, отмечали, что нередко фотосинтетическая активность мутантов восстанавливалась за счет обратных мутаций, удаленных от места первоначального аминокислотного замещения [52, 230]. Поскольку многие из таких замещений либо приносили отрицательно заряженные остатки, либо удаляли положительно заряженные, предполагается, что в первую очередь они оказывали компенсирующее влияние на электростатические взаимодействия белка и кофактора [52]. Однако значительная удаленность обратных мутаций от Q_B сайта наводит на мысль, что это влияние может быть обусловлено более значительными

структурными изменениями, включающими замещение нескольких аминокислотных остатков [50, 231, 232].

Неожиданный результат одиночного аминокислотного замещения описан для мутантного РЦ I(L177)H *Rba. sphaeroides* [233]. В структуре РЦ *Rba. sphaeroides* изолейцин L177, расположенный между двумя молекулами БХл P_A и B_B , условно консервативен. Ранее в работе Виллиамс и коллег описано замещение Ile L177 на остаток Asp, которое стало причиной снижения скорости рекомбинации состояния $P^+Q_A^-$ [179]. Другое замещение, Ile L177 на His, повлияло на спектральные свойства БХл P_A и B_B . Данные пигментного анализа свидетельствовали об отсутствии одной молекулы БХл в реакционных центрах I(L177)H [234]. Позже было показано, что аминокислотное замещение I(L177)H приводит к возникновению ковалентной связи между БХл P_A и L-субъединицей, и связанный БХл не экстрагируется из РЦ органическими растворителями [233, 235]. Связь БХл-белок стабильна в присутствии 8 М мочевины, 5% додецилсульфата натрия, а также при pH 3,0, в процессе денатурирующего электрофореза и при нагревании. При этом было отмечено необычно прочное координирование атома Mg у связанного с белком БХл [233, 235]. Интересно отметить, что при замещении Ile на His в симметрично расположенной позиции M206 не наблюдалось образование ковалентной связи между белком и кофактором, хотя изменения в спектрах поглощения РЦ I(M206)H и I(L177)H были сходными [236].

С целью изучения природы этой ковалентной связи, а также для исследования причин стабильного лигандирования магния ковалентно связанного БХл, были получены РЦ с двойными аминокислотными замещениями I(L177)H+N(M182)L и I(L177)H+N(L173)L. Каждая из этих двух дополнительных мутаций приводит к удалению лигандов бактериохлорофиллов B_B и P_A соответственно, что, должно приводить к появлению на их месте БФео. Однако ни в одном из РЦ с двойными мутациями этого не произошло. Было показано, что в РЦ I(L177)H+N(M182)L сохранились как ковалентная связь БХл P_A с L-субъединицей, так и координирование БХл B_B . Изменение спектральных свойств БХл в РЦ этого двойного мутанта указывает на то, что лигандирование БХл B_B может осуществляться с β -стороны макроцикла, аналогично тому, как это было показано для РЦ мутанта F(L181)R+N(M182)L [237]. Возможно, в этом РЦ, как и в РЦ F(L181)R [237], вода участвует в координировании атома магния БХл B_B , хотя экспериментального подтверждения этому пока не получено [237]. Согласно спектральным данным в РЦ двойного мутанта I(L177)H+N(L173)L, первичный донор электрона остается

гомодимером БХл, несмотря на замещение природного лиганда His L173 на Leu. При этом полоса поглощения димера Р претерпевает беспрецедентный коротковолновый сдвиг на 45 нм [239]. Роль лиганда атома магния P_A в этих РЦ, по-видимому, выполняет His L177, хотя место его предполагаемой локализации в данном РЦ не оптимально для координирования. Ковалентная связь БХл-белок в мутантных РЦ I(L177)H+N(L173)L не образуется, что указывает на возможное участие His L173 в возникновении этой связи [239]. Природа прочной ковалентной связи БХл P_A и L-субъединицы в РЦ с мутациями I(L177)H и I(L177)H+N(M182)L до настоящего времени остается неизвестной.

Таким образом, метод направленного мутагенеза позволил изменять структуру реакционного центра и состав его кофакторов, предоставив новые перспективы исследования процесса первичного переноса электрона. Использование этого подхода позволило выявить роль асимметричности белковой составляющей реакционного центра не только в акте разделения зарядов, но и в последующем процессе переноса электрона на хинон Q_B . Более того, удалось конкретизировать роль отдельных кофакторов переноса электрона, механизм участия аминокислотных остатков и даже отдельных встроенных молекул воды в функционировании РЦ.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Относительно просто организованные и хорошо изученные бактериальные РЦ представляют собой удобную модельную систему для управления параметрами фотосинтетического электронного транспорта, исследования отдельных стадий этого процесса и изучения общих принципов структуры, функции и эволюции реакционных центров фотосинтеза. Использование спектральных методов в сочетании со структурным анализом, молекулярно-биологическими и биохимическими подходами дает взаимодополняющую информацию и открывает путь к пониманию механизмов, обеспечивающих высокую эффективность функционирования фотосинтетических реакционных центров. В настоящее время становится ясным, что белок РЦ не только служит остовом, удерживающим кофакторы переноса электрона внутри мембраны на оптимальном расстоянии и в оптимальной ориентации друг относительно друга, но и играет важную, возможно определяющую роль в регулировании скорости и направленности фотосинтетического переноса электрона.

Многочисленные работы по направленному мутагенезу РЦ пурпурных бактерий свидетельствуют о чрезвычайной пластичности комплексов РЦ, их устойчивости к локальным изменениям структуры белка. Отмечено, что одиночное аминокислотное замещение лишь в редких случаях может оказать существенное влияние на процесс переноса электрона в РЦ. Для комплексов РЦ характерно сохранение высокой стабильности после их выделения из мембран. Факторы, определяющие это свойство РЦ пока ещё недостаточно изучены. Этот вопрос заслуживает внимание в связи с более общей проблемой роли мембранных белков в функционировании живых организмов. Кроме того, поиск условий стабильного длительного функционирования бактериальных РЦ представляет особый интерес в связи с возможной перспективой использования этих комплексов в биотехнологических проектах, например, при создании преобразователей световой энергии. Здесь по-прежнему актуальной остается задача выяснения физических механизмов, обеспечивающих необычайно высокую эффективность начальных этапов переноса электрона в РЦ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yakovlev, A.G., Shkuropatov, A.Ya., and Shuvalov, V.A. (2002) *Biochemistry*, **41**, 2667–2674.
2. Parson, W.W. (2007) *Science*, **316**, 1438–1439.
3. Wang, H., Lin, S., Allen, J.P., Williams, J.C., Blankert, S., Laser, C., Woodbury N.W. (2007). *Science*, **316**, 747–750.
4. Wakeham, M.C., and Jones, M.R. (2005) *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 851–857.
5. Jones, M.R. (2007) *Progress in Lipid Research*, **46**, 56–87.
6. Allen, J.P., and Williams, J.C. (2011) *Photosynth. Res.*, **107**, 59–69.
7. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1984) *J. Mol. Biol.*, **180**, 385–398.
8. Deisenhofer, J., Epp, K., Miki K., Huber R., and Michel H. (1985) *Nature*, **318**, 618–624.
9. Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Rees, D.C., Deisenhofer, J., Michel, H., and Huber, R. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8589–8593.
10. Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H., and Rees, D.S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5730–5734.
11. Nogi, T., Fathir, I., Kobayashi, M., Nozawa, T., and Miki, K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13561–13566.
12. Camara-Artigas, A., Brune, D., and Allen, J.P. (2002a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11055–11060.
13. Deisenhofer, J., and Michel, H. (1989) *EMBO J.*, **8**, 2149–2170.
14. Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H., and Rees, D.C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8487–8491.
15. Feher, G., Allen, J.P., Okamura, M.Y., and Rees, D.C. (1989) *Nature*, **339**, 111–116.
16. Norris, J.R., Uphaus, R.A., Crespi, H.L., and Katz, J.J. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 625–628.
17. Norris, J.R., Scheer, H., and Katz, J.J. (1975) *Ann. NY Acad. Sci. USA*, **244**, 260–280.

18. *Feher, G., Hoff, A.J., Isaacson, R.A., and Ackerson, L.C.* (1975) *Ann. NY Acad. Sci. USA*, **244**, 239–259.
19. *Ermiler, U., Fritzsche, G., Buchanan, S.K., and Michel, H.* (1994) *Structure*, **2**, 925–936.
20. *Fritzsche, G., Kampmann, L., Kapaun, G., and Michel, H.* (1998) *Photosynth. Res.*, **55**, 127–132.
21. *Potter, J.A., Fyfe, P.K., Frolov, D., Wakeham, M.C., van Grondelle, R., Robert, B., and Jones, M.R.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 27155–27164.
22. *Yakovlev, A.G., Jones, M.R., Potter, J.A., Fyfe, P.K., Vasilieva, L.G., Shkuropatov, A.Ya., and Shuvalov, V.A.* (2005) *Chem. Phys.*, **319**, 297–307.
23. *Zinth, W., Sander, M., Dobler, J., Kaiser, W., and Michel, H.* (1985) *Antennas and Reaction Centers in Photosynthetic Bacteria* / Michel-Beyerle, M.-E., (ed.), Springer-Verlag, Berlin and New York, pp. 97–102.
24. *Parson, W.W.* (1991) in *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 1153–1180.
25. *Breton, J.* (1988) *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center: Structure and Dynamics* / Breton, J., and Vermeglio, A., (eds.), Plenum Press, New York, pp. 59–69.
26. *Breton, J., Bylina, E.J., and Youvan, D.C.* (1989) *Biochemistry*, **28**, 6423–6430.
27. *Kirmaier, C., and Holten, D.* (1987) *Photosynth. Res.*, **13**, 225–260.
28. *Bylina, E.J., Kirmaier, C., McDowell, L., Holten, D., and Youvan, D.C.* (1988) *Nature*, **336**, 182–184.
29. *Wang, H., Lin, S., and Woodbury, N.W.* (2006) *J. Phys. Chem. B*, **110**, 6956–6961.
30. *Kennis, J.T., Shkuropatov, A.Y., van Stokkum, I.H.M., Gast, P., Hoff, A.J., Shuvalov, V.A., and Aartsma, T.J.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 16231–16238.
31. *Vos, M.H., Jones, M.R., McGlynn, P., Hunter, C.N., Breton, J., and Martin, J.L.* (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1186**, 117–122.
32. *Yakovlev, A.G., Shkuropatov, A.Y., and Shuvalov, V.A.* (2000) *FEBS Lett.*, **466**, 209–212.
33. *Yakovlev, A.G., Vasilieva, L.G., Shkuropatov, A.Ya., Bolgarina, T.I., Shkuropatova, V.A., and Shuvalov, V.A.* (2003) *J. Phys. Chem. A*, **107**, 8330–8338.
34. *Shuvalov, V.A., and Parson, W.W.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 957–961.
35. *Arlt, T., Schmidt, S., Kaiser, W., Lauterwasser, C., Meyer, M., Scheer, H., and Zinth, W.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11757–11761.
36. *Schmidt, S., Arlt, T., Hamm, P., Huber, H., Nagele, T., Wachtveitl, J., Meyer, M., Scheer, H., and Zinth, W.* (1994) *Chem. Phys. Lett.*, **223**, 116–120.
37. *Schmidt, S., Arlt, T., Hamm, P., Huber, H., Nagele, T., Wachtveitl, J., Zinth, W., Meyer, M., and Scheer, H.* (1995) *Spectrochim. Acta A*, **51**, 1565–1578.
38. *Gunner, M.R.* (1991) *Curr. Topics Bioenerg.*, **16**, 319–367.
39. *Arata, H., and Parson, W.W.* (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **638**, 201–209.
40. *Шувалов В.А.* (1990) *Первичное преобразование световой энергии при фотосинтезе*. М.: Наука, 209 с.
41. *Du, M., Rosenthal, S.J., Xie, X., DiMaggio, T.J., Schmidt, M., Hanson, D.K., Schiffer, M., Norris, J.R., and Fleming, G.R.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8517–8521.
42. *Lancaster, C.R.D., and Michel, H.* (2001) *Handbook of Metalloproteins*, vol. 1 / Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and K. Wieghardt, (eds.) John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 119–135.

43. Parson, W.W., and Warshel, A. (2009) The Purple Phototrophic Bacteria, vol. 28 / Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. and Beatty, J.T., (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 337–353.
44. Шувалов В.А. (2000) Преобразование солнечной энергии в первичном акте разделения зарядов в реакционных центрах фотосинтеза. Москва, Наука, 50 с.
45. Axelrod, H., Miyashita, O., and Okamura, M. (2009) in The Purple Phototrophic Bacteria, vol. 28 / Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. and Beatty, J.T., (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 323–336.
46. Okamura, M.Y., Isaacson, R.A., and Feher, G. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 3491–3495.
47. Gunner, M.R., and Dutton, P.L. (1989) J. Am. Chem. Soc., **111**, 3400–3412.
48. Woodbury, N.W., Parson, W.W., Gunner, M.R., Prince, R.C., and Dutton, P.L. (1986) Biochim. Biophys. Acta, **851**, 6–22.
49. Allen, J.P., Williams, J.C., Graige, M.S., Paddock, M.L., Labahn, A., Feher, G., and Okamura, M.Y. (1998) Photosynth. Res., **55**, 227–233.
50. Paddock, M.L., Graige, M.S., Feher, G., and Okamura, M.Y. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 6183–6188.
51. Li, J.L., Takahashi, E., and Gunner, M.R. (2000) Biochemistry, **39**, 7445–7454.
52. Okamura, M.Y., Paddock, M.L., Graige, M.S., and Feher, G. (2000) Biochim. Biophys. Acta Bioenerg., **1458**, 148–163.
53. Schmid, R., and Labahn, A. (2000) Phys. Chem. B, **104**, 2928–2936.
54. Jones, M.R. (2009) The Purple Phototrophic Bacteria, vol. 28 / Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. and Beatty, J.T., (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 295–321.
55. Scheer, H., and Hartwich, G. (1995) Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, vol. 2 / Blankenship, R.E., Madigan, M.T., and Bauer, C., (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 649–663.
56. Scheer, H., and Struck, A. (1993) The Photosynthetic Reaction Center, vol. 1 / Deisenhofer, J., and Norris, J.R., (eds.), Academic Press, San Diego, USA, pp. 157–192.
57. Struck, A., and Scheer, H. (1990) FEBS Lett., **261**, 385–388.
58. Shkuropatov, A.Y., and Shuvalov, V.A. (1993) FEBS Letts., **322**, 168–172.
59. Meyer, M., and Scheer, H. (1995) Photosynth. Res., **44**, 55–65.
60. Franken, E.M., Shkuropatov, A.Y., Francke, C., Neerken, S., Gast, P., Shuvalov, V.A., Hoff, A.J., and Aartsma, T.J. (1997a) Biochim. Biophys. Acta, **1319**, 242–250.
61. Franken, E.M., Shkuropatov, A.Y., Francke, C., Neerken, S., Gast, P., Shuvalov, V.A., Hoff, A.J., and Aartsma, T.J. (1997b) Biochim. Biophys. Acta, **1321**, 1–9.
62. Storch, K.F., Cmiel, E., Schafer, W., and Scheer, H. (1996) Eur. J. Biochem., **238**, 280–286.
63. Shkuropatov, A.Ya., Proskuryakov, I.I., Shkuropatova, V.A., Zvereva, M.G., and Shuvalov, V.A. (1994) FEBS Lett., **351**, 249–252.
64. Hartwich, G., Friesse, M., Scheer, H., Ogrodnik, A., and Michel-Beyerle, M.E. (1995a) Chem. Phys., **197**, 423–434.
65. Hartwich, G., Scheer, H., Aust, V., and Angerhofer, A. (1995b) Biochim. Biophys. Acta Bioenerg., **1230**, 97–113.
66. Finkle, U., Lauterwasser, C., Struck, A., Scheer, H., and Zinth, W. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 9514–9518.

67. *Sporlein, S., Zinth, W., Meyer, M., Scheer, H., and Wachtveitl, J.* (2000) *Chem. Phys. Letts.*, **322**, 454–464.
68. *Frank, H.A., Chynwat, V., Hartwich, G., Meyer, M., Katheder, I., and Scheer, H.* (1993) *Photosynth. Res.*, **37**, 193–203.
69. *Frank, H.A., Chynwat, V., Posteraro, A., Hartwich, G., Simonin, I., and Scheer, H.* (1996) *Photochem. Photobiol.*, **64**, 823–831.
70. *Huber, H., Meyer, M., Scheer, H., Zinth, W., and Wachtveitl, J.* (1998) *Photosynth. Res.*, **55**, 153–162.
71. *Shkuropatov, A.Y., Neerken, S., Permentier, H.P., de Wijn, R., Schmidt, K.A., Shuvalov, V.A., Aartsma, T.S.J., Gast, P., and Hoff, A.J.* (2003) *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1557**, 1–12.
72. *Шувалов В.А., Яковлев А.Г.* (1998) *Биологические мембраны*, **15**, 455–460.
73. *Nowak, F.R., Kennis, J.T.M., Franken, E.M., Shkurupatov, A.Ya., Yakovlev, A.G., Gast, P., Hoff, A.J., Aartsma, T.J., and Shuvalov, V.A.* (1998) *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vol. 2 / Garab, G., (ed.), Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, pp. 783–786.
74. *Kobayashi, M., Takaya, A., Kanai, N., Ota, Y., Saito, T., Wang, Z.-Y., and Nozawa, T.* (2004) *J. Biochem.*, **136**, 363–369.
75. *Chadwick, B.W., and Frank, H.A.* (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **851**, 257–266.
76. *Frank, H.A., Chadwick, B.W., Taremi, S., Kolaczowski, S., and Bowman, M.K.* (1986) *FEBS Lett.*, **203**, 157–163.
77. *Farhoosh, R., Chynwat, V., Gebhard, R., Lugtenburg, J., and Frank, H.A.* (1997) *Photochem. Photobiol.*, **66**, 97–104.
78. *Yanagi, K., Shimizu, M., Hashimoto, H., Gardiner, A.T., Roszak, A.W., and Cogdell, R.J.* (2005) *J. Phys. Chem. B*, **109**, 992–998.
79. *Roszak, A.W., McKendrick, K., Gardiner, A.T., Mitchell, I.A., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J., Hashimoto, H., and Frank, H.A.* (2004) *Structure*, **12**, 765–773.
80. *Utschig, L.M., and Thurnauer, M.C.* (2004) *Acc. Chem. Res.*, **37**, 439–447.
81. *Kirmaier, C., Holten, D., Debus, R.J., Feher, G., and Okamura, M.Y.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6407–6411.
82. *Debus, R.J., Feher, G., and Okamura, M.Y.* (1986) *Biochemistry*, **25**, 2276–2287.
83. *Stehlik, D., and Mübius, K.* (1997) *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **48**, 745–784.
84. *Lubitz, W., Lendzian, F., and Bittl, R.* (2002) *Acc. Chem. Res.*, **35**, 313–320.
85. *Lubitz, W., and Feher, G.* (1999) *Appl. Mag. Res.*, **17**, 1–48.
86. *Schnegg, A., Fuhs, M., Rohrer, M., Lubitz, W., Prisner, T.F., and Mübius, K.* (2002) *J. Phys. Chem. B*, **106**, 9454–9462.
87. *Flores, M., Isaacson, R., Abresch, E., Calvo, R., Lubitz, W., and Feher, G.* (2006) *Biophys. J.*, **90**, 3356–3362.
88. *Zech, S.G., Bittl, R., Gardiner, A.T., and Lubitz, W.* (1997) *Appl. Mag. Res.*, **13**, 517–529.
89. *Borovykh, I.V., Dzuba, S.A., Proskuryakov, I.I., Gast, P., and Hoff, A.J.* (1998) *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1363**, 182–186.
90. *Poluektov, O.G., Utschig, L.M., Tang, J., Dubinski, A.A., Schlesselman, S., and Thurnauer, M.C.* (2001) *Appl. Mag. Res.*, **21**, 311–323.
91. *Poluektov, O.G., Utschig, L.M., Dubinskij, A.A., and Thurnauer, M.C.* (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4049–4059.
92. *Hulsebosch, R.J., Borovykh, I.V., Paschenko, S.V., Gast, P., and Hoff, A.J.* (1999) *J. Phys. Chem. B*, **103**, 6815–6823.

93. Utschig, L.M., Thurnauer, M.C., Tiede, D.M., and Poluektov, O.G. (2005) *Biochemistry*, **44**, 14131–14142.
94. Calvo, R., Abresch, E.C., Bittl, R., Feher, G., Hofbauer, W., Isaacson, R.A., Lubitz, W., Okamura, M.Y., and Paddock, M.L. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7327–7341.
95. Calvo, R., Isaacson, R.A., Paddock, M.L., Abresch, E.C., Okamura, M.Y., Maniero, A.L., Brunel, L.C., and Feher, G. (2001) *J. Phys. Chem. B*, **105**, 4053–4057.
96. Calvo, R., Isaacson, R.A., Abresch, E.C., Okamura, M.Y., and Feher, G. (2002) *Biophys. J.*, **83**, 2440–2456.
97. Wellington, C.L., Taggart, A.K.P., and Beatty, J.T. (1991) *J. Bacteriol.*, **173**, 2954–2961.
98. Swingle, W.D., Blankenship, R.E., and Raymond, J. (2009) *The Purple Phototrophic Bacteria*, vol. 28 / Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. and Beatty, J.T., (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 17–29.
99. Wellington, C.L., Bauer, C.E., and Beatty, J.T. (1992) *Can. J. Microbiol.*, **38**, 20–27.
100. Youvan, D.C., Bylina, E.J., Alberti, M., Begusch, H., and Hearst, J.E. (1984) *Cell*, **37**, 949–957.
101. Coomber, S.A., Chaudri, M., Connor, A., Britton G., and Hunter C.N. (1990) *Mol. Microbiol.*, **4**, 977–989.
102. Hunter, C.M., McGlynn, P., Ashby, M.K., Burgess, J.G., and Olsen, J.D. (1991) *Mol. Microbiol.*, **5**, 2649–2661.
103. Kaplan, S. (2002) *Photosynth. Res.*, **73**, 95–108.
104. Donohue, T.J., Kiley, P.J., and Kaplan, S. (1988) *Photosynth. Res.*, **19**, 39–61.
105. Belasco, J.G., Beatty, J.T., Adams, C.W. von Gabain A., and Cohen S.N. (1985) *Cell*, **40**, 171–181.
106. Kaplan, S., and Donohue, T.J. (1993) *The Photosynthetic reaction center*, vol. 2 / Deisenhofer, J., and Norris, J.P., (eds.), Academic Press, JNC, pp. 101–131.
107. Vermeglio, A. and Joliot, P. (1999) *Trends in Microbiology*, **7**, 435–440.
108. Holden-Dye, K., Crouch, L.I., and Jones, M.R. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 613–630.
109. Tsukatani, Y., Matsuura, K., Masuda, S., Shimada, K., Hiraishi, A., and Nagashima, K.V.P. (2004) *Photosynth. Res.*, **79**, 83–91.
110. Roszak, A.W., Howard, T.D., Southall, J., Gardiner, A.T., Law, C.J., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J. (2003) *Science*, **302**, 1969–1972.
111. Williams, J.C., and Taguchi, A.K.W. (1995) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, vol 2 / Blankenship, R.E., Madigan, M.T., and Bauer, C., (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1029–1065.
112. Youvan, D.C., and Marrs, B.L. (1984) *Cell*, **39**, 1–3.
113. Youvan, D.C., Ismail, S., and Bylina, E.J. (1985) *Gene*, **38**, 19–30.
114. Bylina, E.J., Ismail, S., and Youvan, D.C. (1986) *Plasmid*, **16**, 175–181.
115. Bylina, E.J., Kolaczowski, S.V., Norris, S.V., and Youvan, C.Y. (1990) *Biochemistry*, **29**, 6203–6210.
116. Lang, F.S., and Oesterhelt, D.J. (1989) *Bacteriol.*, **171**, 4425–4435.
117. Farchaus, J.W., and Oesterhelt, D.A. (1989) *EMBO J.*, **8**, 47–54.
118. Paddock, M.L., Rongey, S.H., Feher, G., and Okamura M.Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6602–6606.
119. Jones, M.R., Visschers, R.W., van Grondelle, R., and Hunter, C.N. (1992a) *Biochemistry*, **31**, 4458–4465.
120. Jones, M.R., Fowler, G.J.C., Gibson, L.C.D., Grief, G.G., Olsen,

- J.D., Crielgaard, W., and Hunter, C.N.* (1992b) *Mol. Microbiol.*, **6**, 1173–1184.
121. *Williams, J.C., Steiner, L.A., Feher, G., and Simon, M.I.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7303–7307.
122. *Robles, S.J., Breton, J., and Youvan, D.C.* (1990) *Science*, **248**, 1402–1405.
123. *Vos, M.H., Lambry, J.C., Robles, S.J., Youvan, D.C., Breton, J., and Martin, J.L.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8885–8889.
124. *Vos, M.H., Rappaport, F., Lambry, J.C., Breton, J., and Martin, J.L.* (1993) *Nature*, **363**, 320–325.
125. *Carter, B., Boxer, S.G., Holten, D., and Kirmaier, C.* (2009) *Biochemistry*, **48**, 2571–2573.
126. *Taguchi, A.K.W., Stocker, J.W., Alden, R.G., Causgrove, T.P., Peloquin, J.M., Boxer, S.G., and Woodbury, N.W.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 10345–10355.
127. *Stocker, J.W., Taguchi, A.K.W., Murchison, H.A., Woodbury, N.W., and Boxer, S.G.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 10356–10362.
128. *Wachtveitl, J., Farchaus, J.W., Das, R., Lutz, M., Robert, B., and Mattioli, T.A.* (1993) *Biochemistry*, **32**, 12875–12886.
129. *Mattioli, T.A., Williams, J.C., Allen, J.P., and Robert, B.* (1994) *Biochemistry*, **33**, 1636–1643.
130. *Mattioli, T.A., Lin, X., Allen, J.P., and Williams, J.C.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 6142–6152.
131. *Taguchi, A.K.W., Eastman, J.E., Gallo, D.M., Sheagley, E., Xiao, W.Z., and Woodbury, N.W.* (1996) *Biochemistry*, **35**, 3175–3186.
132. *Coleman, W.J. and Youvan, D.C.* (1993) *Nature*, **366**, 517–518.
133. *Ridge, J.P., van Brederode, M.E., Goodwin, M.G., van Grondelle, R., and Jones, M.R.* (1999) *Photosynth. Res.*, **59**, 9–26.
134. *Wakeham, M.C., Goodwin, M.G., McKibbin, C., and Jones, M.R.* (2003) *FEBS Letts.*, **540**, 234–240.
135. *Wakeham, M.C., Breton, J., Nabedryk, E., and Jones, M.R.* (2004) *Biochemistry*, **43**, 4755–4763.
136. *McAuley, K.E., Fyfe, P.K., Ridge, J.P., Cogdell, R.J., Isaacs, N.W., and Jones, M.R.* (2000) *Biochemistry*, **39**, 15032–15043.
137. *Coleman, W.J., and Youvan, D.C.* (1990) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **19**, 333–367.
138. *Stilz, H.U., Finkele, U., Holzapfel, W., Lauterwasser, C., Zinth, W., and Oesterheld, D.* (1994) *Eur. J. Biochem.*, **223**, 233–242.
139. *Watson, A.J., Fyfe, P.K., Frolov, D., Wakeham, M.C., Nabedryk, E., van Grondelle, R., Breton, J., and Jones, M.R.* (2005) *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1710**, 34–46.
140. *Jackson, J.A., Lin, S., Taguchi, A.K.W., Williams, J.C., Allen, J.P., and Woodbury, N.W.* (1997) *J. Phys. Chem. B*, **101**, 5747–5754.
141. *Moore, L.J., and Boxer, S.G.* (1998) *Photosynth. Res.*, **55**, 173–180.
142. *Хатыпов Р.А., Хмельницкий А.Ю., Леонова М.М., Васильева Л.Г., Шувалов В.А.* (2008a) *ДАН*, **422**, 835–840.
143. *Khatypov, R.A., Khmel'nitskiy, A.Yu., Leonova, M.M., Vasilieva, L.G., and Shuvalov, V.A.* (2008b) *Photosynth. Res.*, **98**, 81–93.
144. *Леонова М.М., Васильева Л.Г., Хатыпов Р.А., Бойченко В.А., Шувалов В.А.* (2009) *Биохимия*, **74**, 558–567.
145. *Bylina, E.J., and Youvan, D.C.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7226–7230.
146. *Kirmaier, C., Holten, D., Bylina, E.J., and Youvan, D.C.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7562–7566.

147. McDowell, L.M., Gaul, D., Kirmaier, C., Holten D., and Schenck C.C. (1991) *Biochemistry*, **30**, 8315–8322.
148. Allen, J.P., Artz, K., Lin, X., Williams, J.C., Ivancich, A., Albouy, D., Mattioli, T.A., Fetsch, A., Kuhn, M., and Lubitz, W. (1996) *Biochemistry*, **35**, 6612–6619.
149. Nabedryk, E., Schulz, C., Muh, F., Lubitz, W., and Breton, J. (2000) *Photochem. Photobiol.*, **71**, 582–588.
150. Bylina, E.J., and Youvan D.C. (1990) in *Current Research in Photosynthesis*, vol. 1 (Baltscheffsky, M., ed.), Kluwer Academic, The Netherlands, pp. 53–59.
151. Fajer, J., Borg, D.C., Forman, A., Dolphin, D., and Felton, R.H. (1973) *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2739–2741.
152. Fajer, J., Brune, D.C., Davis, M.S., Forman, A., and Spaulding, L.D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4956–4960.
153. Kirmaier, C., Bautista, J.A., Laible, P.D., Hanson, D.K., and Holten, D. (2005) *J. Phys. Chem. B*, **109**, 24160–24172.
154. Laporte, L.L., Palaniappan, V., Davis, D.G., Kirmaier, C., Schenck, C.C., Holten, D., and Bocian, D.F. (1996) *J. Phys. Chem.*, **100**, 17696–17707.
155. Woodbury, N.W., and Allen, J.P. (1995) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, vol 2 / Blankenship, R.E., Madigan, M.T., and Bauer, C., (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 527–557.
156. Albouy, D., Kuhn, M., Williams, J.C., Allen, J.P., Lubitz, W., and Mattioli, T.A. (1997) *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1321**, 137–148.
157. Moore, L.J., Zhou, H.L., and Boxer, S.G. (1999) *Biochemistry*, **38**, 11949–11960.
158. King, B.A., de Winter, A., McAnaney, T.B., and Boxer, S.G. (2001) *J. Phys. Chem. B*, **105**, 1856–1862.
159. Chirino, A.J., Lous, E.J., Huber, M., Allen, J.P., Schenck, C.C., Paddock, M.L., Feher, G., and Rees, D.C. (1994) *Biochemistry*, **33**, 4584–4593.
160. Camara-Artigas, A., Magee, C., Goetsch, A., and Allen, J.P. (2002b) *Photosynth. Res.*, **74**, 87–93.
161. Katilius, E., Turanchik, T., Lin, S., Taguchi, A.K.W., and Woodbury, N.W. (1999) *J. Phys. Chem. B*, **103**, 7386–7389.
162. Arlt, T., Dohse, B., Schmidt, S., Wachtveitl, J., Laussermair, E., Zinth, W., and Oesterhelt, D. (1996) *Biochemistry*, **35**, 9235–9244.
163. Katilius, E., Babendure, J.L., Lin, S., and Woodbury, N.W. (2004) *Photosynth. Res.*, **81**, 165–180.
164. Callahan, P., and Cotton, T.J. (1987) *Am. Chem. Soc.*, **109**, 7001–7007.
165. Kirmaier, C., Gaul, D., DeBey, R., Holten, D., and Schenck, C.C. (1991) *Science*, **251**, 922–927.
166. Heller, B.A., Holten, D., and Kirmaier, C. (1995a) *Science*, **269**, 940–945.
167. Heller, B.A., Holten, D., and Kirmaier, C. (1995b) *Biochemistry*, **34**, 5294–5302.
168. Paddock, M.L., Chang, C., Xu, Q., Abresch, E.C., Axelrod, H.L., Feher, G., and Okamura, M.Y. (2005) *Biochemistry*, **44**, 6920–6928.
169. Jaschke, P.R., and Beatty, J.T. (2007) *Biochemistry*, **46**, 12491–12500.
170. Lin, S., Jaschke, P.R., Wang, H., Paddock, M., Tufts, A., Allen, J.P., Rosell, F.I., Mauk, A.G., Woodbury, N.W., and Beatty, J.T. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8537–8542.
171. Allen, J.P., and Williams, J.C. (2006) *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*, *Biochemistry*, *Biophysics*, *Functions and Applica-*

- tions, vol. 25 / Grimm, B., Porra, R.J., Rudiger, W. and Scheer, H., (eds.) Springer, Dordrecht, pp. 283–295.
172. Williams, J.C., and Allen, J.P. (2009) The Purple Phototrophic Bacteria, vol. 28 / Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. and Beatty, J.T., (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 337–353.
 173. Williams, J.C., Haffa, A.L.M., McCulley, J.L., Woodbury, N.W., and Allen, J.P. (2001) *Biochemistry*, **40**, 15403–15407.
 174. Johnson, E.T., and Parson, W.W. (2002) *Biochemistry*, **41**, 6483–6494.
 175. Johnson, E.T., Müh, F., Nabadryk, E., Williams, J.C., Allen, J.P., Lubitz, W., Breton, J., and Parson, W.W. (2002) *J. Phys. Chem. B*, **106**, 11859–11869.
 176. Haffa, A.L.M., Lin, S., Katiilius, E., Williams, J.C., Taguchi, A.K.W., Allen, J.P., and Woodbury, N.W. (2002) *J. Phys. Chem.*, **106**, 7376–7384.
 177. Murchison, H.A., Alden, R.G., Allen, J.P., Peloquin, J.M., Taguchi, A.K.W., Woodbury, N.W., and Williams, J.C. (1993) *Biochemistry*, **32**, 3498–3505.
 178. Spiedel, D., Jones, M.R., and Robert, B. (2002) *FEBS Lett.*, **527**, 171–175.
 179. Williams, J.C., Alden, R.G., Murchison, H.A., Peloquin, J.M., Woodbury, N.W., and Allen, J.P. (1992) *Biochemistry*, **31**, 11029–11037.
 180. Lin, X., Murchison, H.A., Nagarajan, V., Parson, W.W., Allen, J.P., and Williams, J.C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10265–10269.
 181. Nabadryk, E., Allen, J.P., Taguchi, A.K.W., Williams, J.C., Woodbury, N.W., and Breton, J. (1993) *Biochemistry*, **32**, 13879–13885.
 182. Deshmukh, S.S., Williams, J.C., Allen, J.P., and Kalman, L. (2011) *Biochemistry*, **50**, 340–348.
 183. Thielges, M., Uyeda, G., Camara-Artigas, A., Kalman, L., Williams, J.C., and Allen, J.P. (2005) *Biochemistry*, **44**, 7389–7394.
 184. Müh, F., Lenzian, F., Roy, M., Williams, J.C., Allen, J.P., and Lubitz, W. (2002) *J. Phys. Chem. B*, **106**, 3226–3236.
 185. Deisenhofer, J., Epp, O., Sinning, I., and Michel, H. (1995) *J. Mol. Biol.*, **246**, 429–457.
 186. Ivancich, A., Kobayashi, M., Drepper, F., Fathir, I., Saito, T., Nozawa, T., and Mattioli, T. A. (1996) *Biochemistry*, **35**, 10529–10538.
 187. Wachtveitl, J., Farhaus, J.W., Das, R., Lutz, M., Robert, B., and Mattioli, T.A. (1993) *Biochemistry*, **32**, 12875–12886.
 188. Kuglstatter, A., Hellwig, P., Fritzsche, G., Wachtveitl, J., Oesterheld, D., Mantele, W., and Michel, H. (1999) *FEBS Lett.*, **463**, 169–174.
 189. Dracheva, S.M., Drachev, L.A., Konstantinov, A.A., Semenov, A.Y., Skulachev, V.P., Arutjunjan, A.M., Shuvalov, V.A., and Zaberezhnaya, S.M. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 253–264.
 190. Ullmann, G.M., Kloppmann, E., Essigke, T., Krammer, E.M., Klengen, A.R., Becker, T., and Bombarda, E. (2008) *Photosynth. Res.*, **97**, 33–53.
 191. Krammer, E., Sebban, P., and Ullmann G.M. (2009) *Biochemistry*, **48**, 1230–1243.
 192. Holden-Dye, K., Crouch, L.I., Williams, C.M., Bone, R.A., Cheng, J., Böhles, F., Heathcote, P., Jones, M.R. (2011) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **505**, 160–170.
 193. Hamm, P., Gray, K.A., Oesterheld, D., Feik, R., Scheer, H., and Zinth,

- W. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1142**, 90–105.
194. Vos, M.H., Jones, M.R., Breton, J., Lambry, J.C., and Martin, J.-L. (1996) *Biochemistry*, **35**, 2687–2692.
195. Shochat, S., Arlt, T., Francke, C., Gast, P., van Noort, P.I., Otte, S.C., Schelvis, H.P.M., Schmidt, S., Vijgenboom, E., Vrieze, J., Zinth, W., and Hoff, A.J. (1994) *Photosynth. Res.*, **40**, 55–66.
196. Parson, W.W., Chu, Z.T., and Warshel, A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1017**, 251–272.
197. Alden, R.G., Parson, W.W., Chu, Z.T., and Warshel, A. (1996) *J. Phys. Chem.*, **100**, 16761–16770.
198. Beekman, L.M.P., van Stokkum, I.H.M., Monshouwer, R., Rijnders, A.J., McGlynn, P., Visschers, R.W., Jones, M.R., and van Grondelle, R. (1996) *J. Phys. Chem.*, **100**, 7256–7268.
199. Nagarajan, V., Parson, W.W., Davis, D., and Schenck, C.C. (1993) *Biochemistry*, **32**, 12324–12336.
200. Jia, Y., DiMaggio, T.J., Chan, C.-K., Wang, Z., Du, M., Hanson, D.K., Schiffer, M., Norris, J.R., Fleming, G.R., and Popov, M.S. (1993) *J. Phys. Chem.*, **97**, 13180–13191.
201. Яковлев А.Г., Васильева Л.Г., Шкурюпатов А.Я., Шувалов В.А. (2009) *Биохимия*, **74**, 1479–1487.
202. Яковлев А.Г., Васильева Л.Г., Хмельницкая Т.И., Шкурюпатова В.А., Шкурюпатов А.Я., Шувалов В.А. (2010а) *Биохимия*, **75**, 944–953.
203. Roberts, J.A., Holten, D., and Kirmaier, C. (2001) *J. Phys. Chem. B*, **105**, 5575–5584.
204. Kirmaier, C., Weems, D., and Holten, D. (1999) *Biochemistry*, **38**, 11516–11530.
205. Kee, H.L., Laible, P.D., Bautista, J.A., Hanson, D.K., Holten, D., and Kirmaier, C. (2006) *Biochemistry*, **45**, 7314–7322.
206. Kirmaier, C., and Holten, D. (2009) *J. Phys. Chem. B*, **113**, 1132–1142.
207. Chuang, J.I., Boxer, S.G., Holten, D., and Kirmaier, C. (2008) *J. Phys. Chem. B*, **112**, 5487–5499.
208. Kirmaier, C., Laible, P.D., Czarnecki, K., Hata, A.N., Hanson, D.K., Bocian, D.F., and Holten, D. (2002) *J. Phys. Chem. B*, **106**, 1799–1808.
209. Katilius, E., Katiliene, Z., Lin, S., Taguchi, A.K.W., and Woodbury, N.W. (2002) *J. Phys. Chem. B*, **106**, 1471–1475.
210. Katilius, E., Babendure, J.L., Katiliene, Z., Lin, S., Taguchi, A.K.W., and Woodbury, N.W. (2003) *J. Phys. Chem. B*, **107**, 12029–12034.
211. Яковлев А.Г., Шкурюпатова Т.А., Шкурюпатова В.А., Шувалов В.А. (2010б) *Биохимия*, **75**, 501–513.
212. Axelrod, H.L., Abresch, E.C., Okamura, M.Y., Yeh, A.P., Rees, D.C., and Feher, G. (2002) *J. Mol. Biol.*, **319**, 501–515.
213. Long, J., Durham, B., Okamura, M., and Millett, F. (1989) *Biochemistry*, **28**, 6970–6974.
214. Tetreault, M., Rongey, S.H., Feher, G., and Okamura, M. (2001) *Biochemistry*, **40**, 8452–8462.
215. Caffrey, M.S., Bartsch, R.G., and Cusanovich, M.A. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 6317–6321.
216. Gong, X., Paddock, M., and Okamura, M. (2003) *Biochemistry*, **42**, 14492–14500.
217. Abresch, E.C., Paddock, M.L., Villalobos, M., Chang, C., and Okamura, M.Y. (2008) *Biochemistry*, **47**, 13318–13325.
218. Abresch, E.C., Gong, X.M., Paddock, M.L., and Okamura, M.Y. (2009) *Biochemistry*, **48**, 11390–11398.
219. Koepke, J., Krammer, E.-M., Klengen, A.R., Sebban, P.G., Ullmann, M., and Fritzsche, G. (2007) *J. Mol. Biol.*, **371**, 396–409.

220. Paddock, M.L., Feher, G., and Okamura, M.Y. (1995) *Biochemistry*, **34**, 15742–15750.
221. Mikovska, J., Kalman, L., Schiffer, M., Maroti, P., Sebban, P., and Hanson, D.K. (1997) *Biochemistry*, **36**, 12216–12226.
222. Goldsmith, J.O., King, B., and Boxer, S.G. (1996) *Biochemistry*, **35**, 2421–2428.
223. Michel, H., and Deisenhofer, J. (1988) *Biochemistry*, **27**, 1–7.
224. Kalman, L., LoBrutto, R., Allen, J.P., and Williams, J.P. (1999) *Nature*, **402**, 696–699.
225. Kalman, L., LoBrutto, R., Narvaez, A.J., Williams, J.C., and Allen, J.P. (2003a) *Biochemistry*, **42**, 13280–13286.
226. Narvaez, A.J., LoBrutto, R., Allen, J.P., and Williams, J.C. (2004) *Biochemistry*, **43**, 14379–14384.
227. Kalman, L., Williams, J.C., and Allen, J.P. (2003b) *FEBS Lett.*, **545**, 193–198.
228. Kalman, L., Williams, J.C., and Allen, J.P. (2005) Photosystem II, the light-driven water plastoquinone oxidoreductase / Wydrzynski, T., Satoh, K., (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 715–727.
229. Coleman, W.J., Mattioli, T.A., Youvan, D.C., and Rutherford, A.W. (1997) *Biochemistry*, **36**, 2178–2187.
230. Wraight, C.A. (2004) *Frontiers in Biosciences*, **9**, 309–337.
231. Sebban, P., Maroti, P., Schiffer, M., and Hanson, D.K. (1995) *Biochemistry*, **34**, 8390–8397.
232. Tandori, J., Baciou, L., Alexov, E., Maroti, P., Schiffer, M., Hanson, D.K., and Sebban, P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 45513–45515.
233. Fufina, T.Yu., Vasilieva, L.G., Khatypov, R.A., Shkuropatov, A.Ya., and Shuvalov, V.A. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 5769–5773.
234. Хатыпов Р.А., Васильева Л.Г., Фуфина Т.Ю., Болгарина Т.И., Шувалов, В.А. (2005) *Биохимия*, **70**, 1527 – 1533.
235. Фуфина Т.Ю., Васильева Л.Г., Шувалов В.А. (2010) *Биохимия*, **75**, 256–263.
236. Болгарина Т.И., Хатыпов Р.А., Васильева Л.Г., Шкурюпатов А.Я., Шувалов В.А. (2004) *ДАН*, **394**, 1–4.
237. Frolov, D., Marsh, M., Crouch, L.I., Fyfe, P.K., Robert, B., van Grondelle, R., Hadfield, A., and Jones, M.R. (2010) *Biochemistry*, **49**, 1882–1892.
238. Фуфина Т.Ю., Васильева Л.Г., Хатыпов Р.А., Шувалов В.А. (2011) *Биохимия*, **76**, 552–558.
239. Fufina, T.Y., Vasilieva, L.G., Khatypov, R.A., and Shuvalov, V.A. (2010) *Proceedings Phot. Congress, China*, in press.