

## **Лаборатория первичных процессов фотосинтеза.**

### **Состав и структура лаборатории**

Васильева Людмила Григорьевна, д.б.н., заведующий лабораторией

Шкуропатов Анатолий Яковлевич к.б.н., в.н.с.

Хатыпов Равиль Александрович к.б.н., в.н.с.

Забелин Алексей Александрович, к.б.н., с.н.с.

Фуфина Татьяна Юрьевна, к.б.н., с.н.с.

Ковалев Вячеслав Борисович, к.х.н., с.н.с.

Христин Антон Михайлович, н.с.

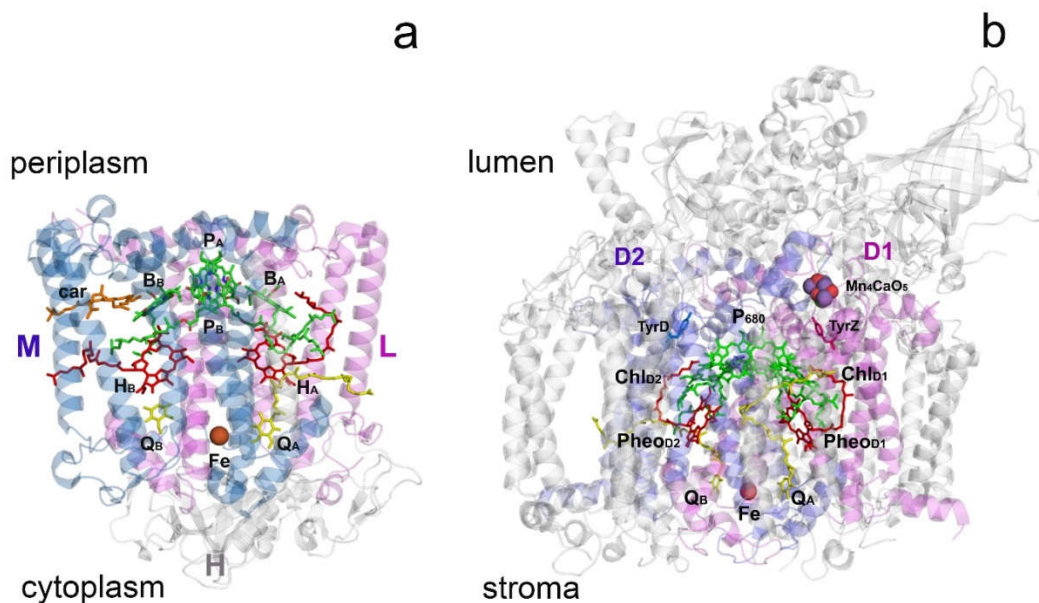
Солодкина Виктория Артемовна, инженер

### **В состав лаборатории входят три научные группы:**

1. Группа мутагенеза и кристаллизации фотосинтетических реакционных центров (РЦ) пурпурных бактерий (в.н.с. Васильева Л.Г. и с.н.с. Фуфина Т.Ю.)
2. Группа химической инженерии фотосинтетических комплексов (с.н.с. Забелин А.А., в.н.с. Шкуропатов А.Я. и с.н.с. Ковалев В.Б.)
3. Группа фемтосекундной спектроскопии (в.н.с. Хатыпов Р.А. и н.с. Христин А.М.)

### **Область научных интересов и методы, используемые в лаборатории**

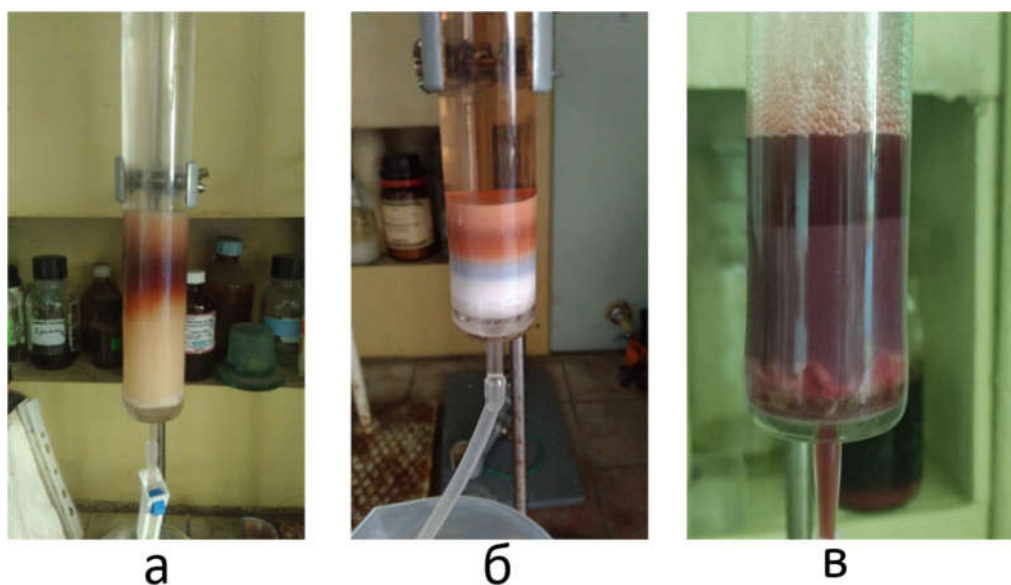
Исследования, проводимые в лаборатории, направлены на изучение механизмов процессов преобразования солнечной энергии в фотосинтетических комплексах фототрофных бактерий и фотосистемы 2 высших растений. С помощью селективного химического замещения вносятся изменения в спектральные свойства и энергетику переноса электрона в РЦ фотосинтеза. С помощью направленного мутагенеза исследуется роль белкового окружения кофакторов переноса электронов и его участия в начальных стадиях фотосинтетического преобразования световой энергии. Существенное внимание уделяется исследованию динамики начальных стадий фотохимического процесса, протекающих на фемто- и пикосекундной временных шкалах.



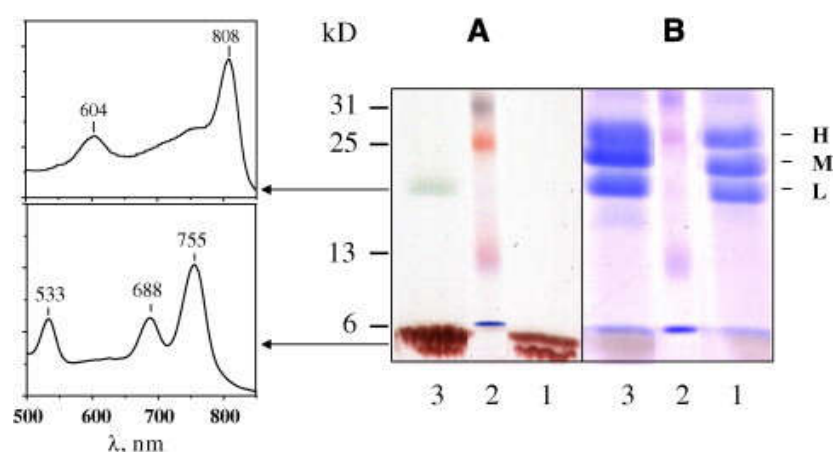
Фотосинтетический реакционный центр пурпурной бактерии *C. sphaeroides* (a) и ядро фотосистемы 2 (b).

**Группа мутагенеза и кристаллизации реакционных центров пурпурных бактерий** (зав. группой д.б.н. Васильева Л.Г) занимается изучением роли белкового матрикса реакционных центров пурпурных бактерий в обеспечении высокой эффективности фотохимических реакций. Кроме того, исследуются возможности использования генетически модифицированных фотосинтетических реакционных центров бактерий для биотехнологий. Группа использует методы сайт-направленного мутагенеза, и другие генно-инженерные и молекулярно-биологические подходы. Сайт-направленный мутагенез – генетический метод, позволяющий вносить контролируемые точечные аминокислотные замещения в белковый матрикс с помощью ПЦР. В лаборатории используется генетическая система для мутагенеза L- и M-субъединиц реакционного центра пурпурной бактерии *C. sphaeroides*, в которую входят шаттл-вектор на основе pRK-415, несущий полный или редуцированный *puf*-оперон *C. sphaeroides*, а также генетически модифицированные штаммы *C. sphaeroides*, дефицитные по РЦ, а также одному или двум светособирающим комплексам. Для выращивания рекомбинантных штаммов используются микробиологические методы. Генетически-модифицированные РЦ выделяются из мембран и очищаются методами ионообменной и аффинной

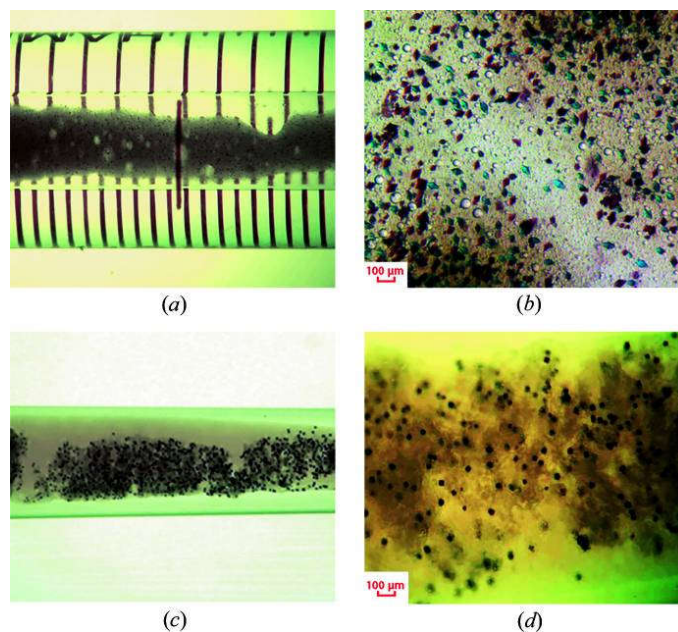
хроматографии. Для изучения структурных изменений, вызванных мутациями, применяется метод кристаллизации белков из солевых растворов или кристаллизация в липидах. Свойства РЦ исследуются методами пигментного анализа, оптической спектроскопии, определяется редокс-потенциал первичного донора электрона, измеряется термостабильность реакционного центра, также используются другие подходы.



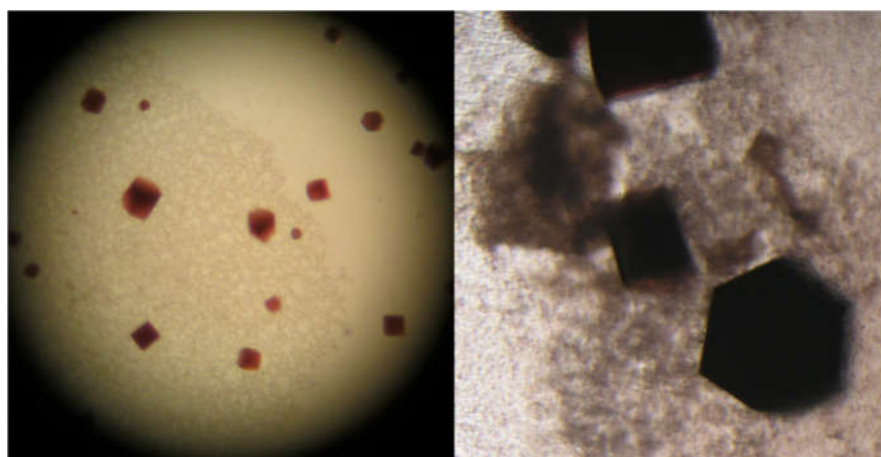
Выделение и очистка генетически-модифицированных РЦ методами ионообменной (а,б) и аффинной (в) хроматографии: хроматографические колонки с нанесенными образцами.



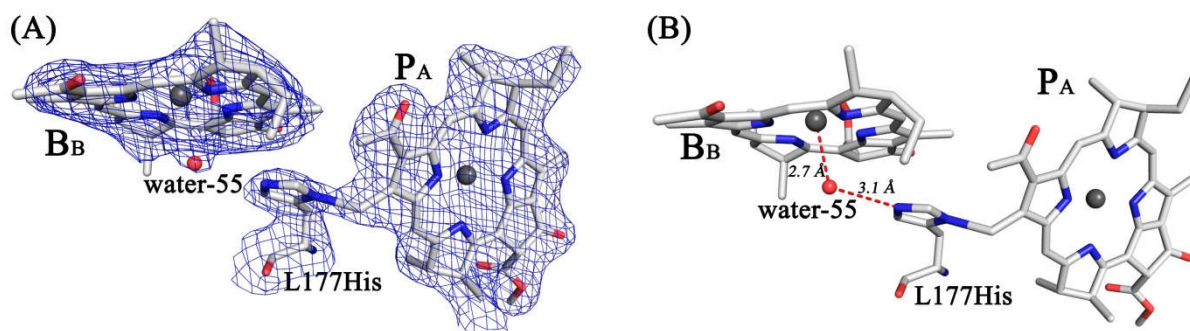
Электрофорез в ПААГ при денатурирующих условиях. Спектры поглощения мигрирующих в геле пигментов (левая панель) и полиакриламидный гель с нанесенными образцами до (а) и после (в) окраски (правая панель).



Фотографии кристаллов РЦ *C. sphaeroides*, выращенных в липидной фазе (a-d)



Фотографии кристаллов бактериальных РЦ, выращенных методом диффузии водных паров.



Пигмент-белковые взаимодействия в структуре РЦ I(L177)H/F(M197)H (Fufina et al., 2023).

**Группа химической инженерии фотосинтетических комплексов** (зав. группой к.б.н. Алексей Забелин).

*Направления исследований:*

- Динамика, энергетика и механизмы первичного разделения зарядов в реакционных центрах фотосинтезирующих бактерий (совместно с группой фемтосекундной спектроскопии) и фотосистемы 2 оксигенных организмов (совместно с ФИЦ Химической физики РАН им. Семенова и Институтом физико-химической биологии МГУ им. Ломоносова М.В.).

- Исследование особенностей функционирования реакционных центров в составе гибридных фотопреобразующих систем; разработка подходов к эффективному сопряжению фотосинтетического разделения зарядов с переносом электрона с электрод.

*Методы и подходы, используемые в группе:*

(1) Сайт-специфическое химическое замещение пигментов и кофакторов их природными и синтетическими аналогами в реакционных центрах бактерий и зеленых растений с использованием методов органического синтеза для получения синтетических производных (бактерио)хлоринов, а также хроматографических методов очистки белков и пигментов.

(2) Стационарная абсорбционная спектроскопия в видимой и ближней ИК области при комнатной и криогенной температурах.

(3) Фотоиндуцированная дифференциальная ИК спектроскопия с Фурье-преобразованием при комнатной и криогенной температурах.

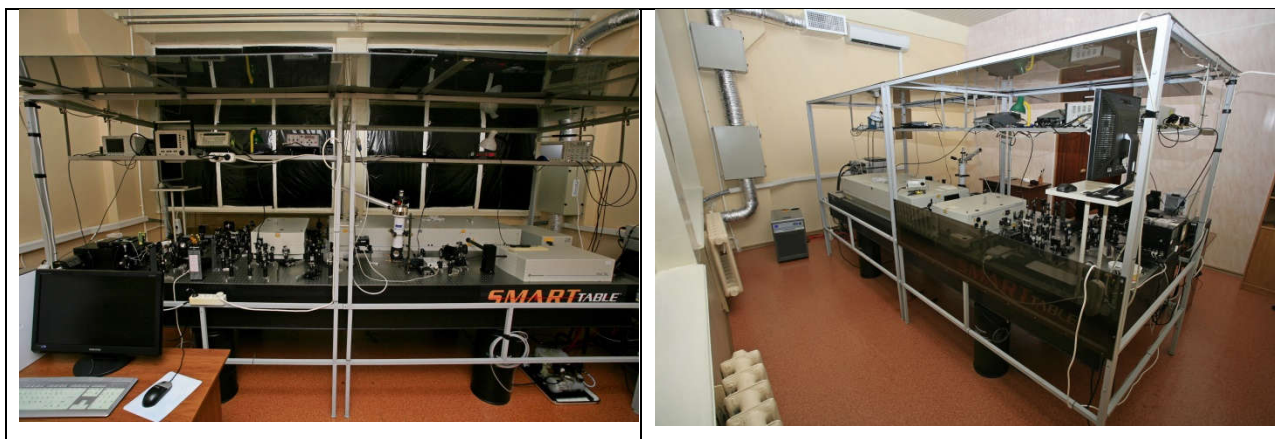
(4) Импульсная дифференциальная абсорбционная спектроскопия с микросекундным временным разрешением.

(5) Фемтосекундная дифференциальная абсорбционная спектроскопия при комнатной и криогенной температурах (совместно с группой фемтосекундной спектроскопии и ФИЦ Химической физики РАН им. Семенова).

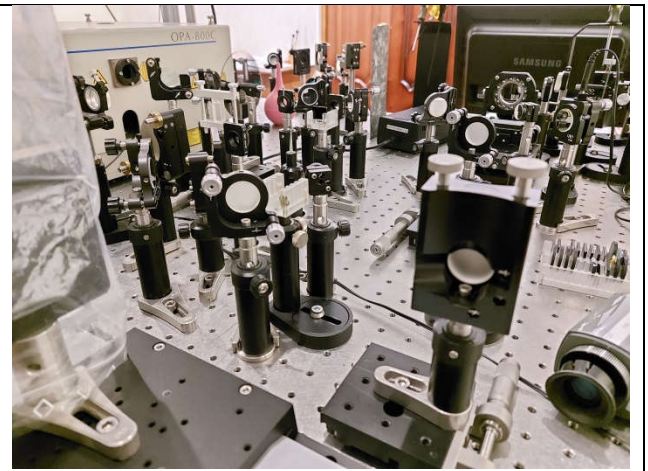
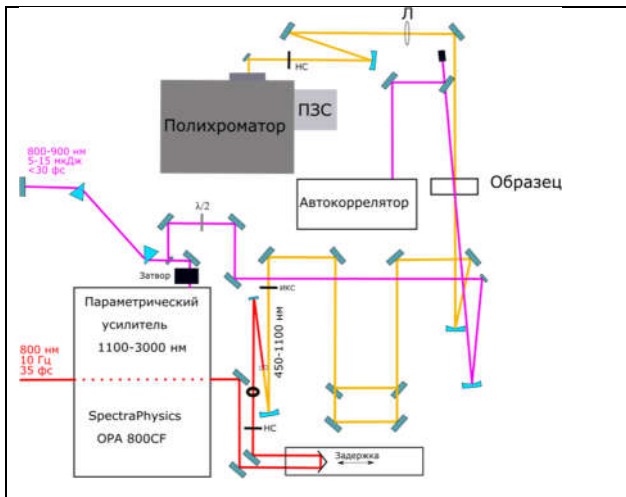
(6) Глобальный анализ 3D массивов спектрально-временных данных с использованием специализированных компьютерных программ (Glottaran, OPTIMUS).

## Группа фемтосекундной спектроскопии (зав. группой к.б.н. Хатыпов Р.А.)

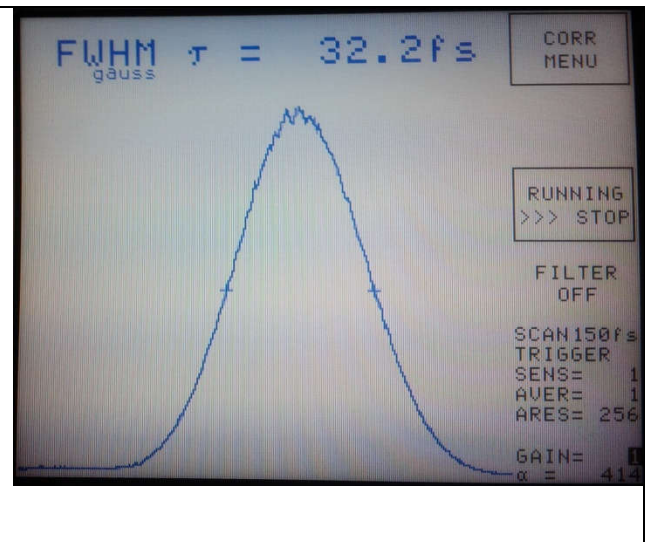
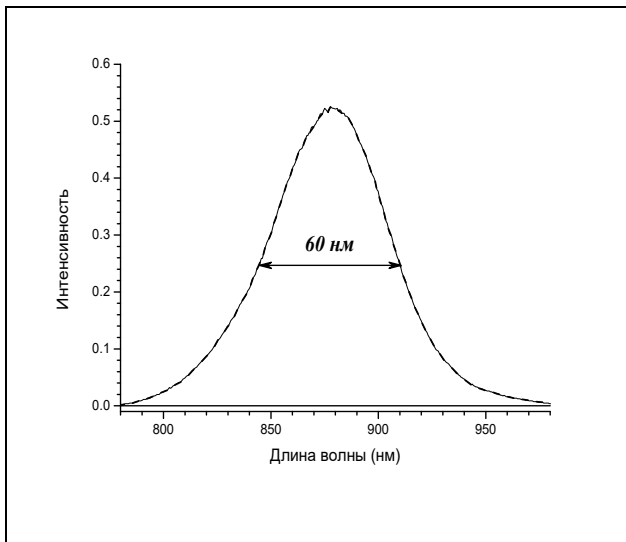
Область научных интересов группы сконцентрирована на исследовании механизмов начальных сверхбыстрых стадий разделения зарядов в фотосинтетических реакционных центрах второго типа. В настоящее время экспериментальные наблюдения и квантово-механические расчеты указывают на когерентное образование состояния с переносом заряда  $P_A^+P_B^-$  при возбуждении специальной пары бактериальных реакционных центров. Остается дискуссионной вовлеченность комплекса с переносом заряда в процессы переноса электрона и его роль в обеспечении высокой квантовой эффективности разделения зарядов. С целью прояснения этого вопроса в нашей лаборатории используется метод возбуждения-зондирования при возбуждении первичного донора электрона сверхкороткими импульсами света, длительность которых не превышает 25 фс. Глобальный и таргетный анализ полученных экспериментальных данных, разложение переходных спектров поглощения на сумму гауссовых компонентов, описание кинетики изменений поглощения линейной комбинацией затухающих гармонических функций, преобразование Фурье осциллирующей составляющей изменений поглощения открывают возможность выявления и исследования когерентных процессов, сопряженных с процессами переноса электрона.



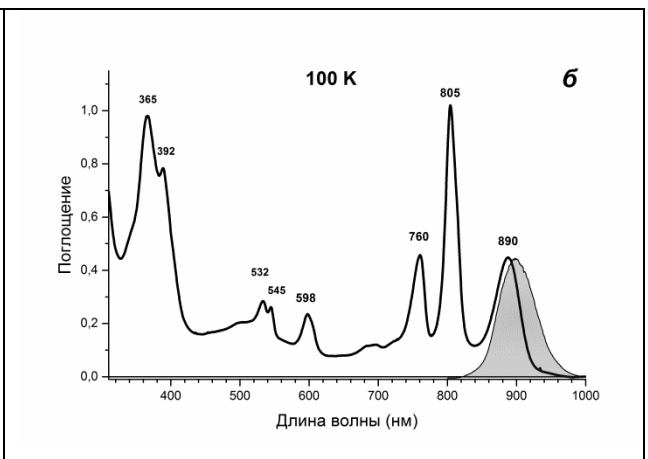
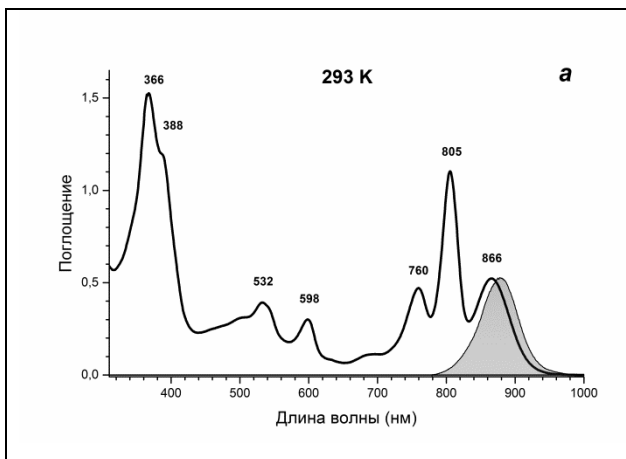
Общий вид дифференциального лазерного спектрометра на базе фемтосекундной лазерной установки «MaiTai SP» с оптическим параметрическим усилением света.



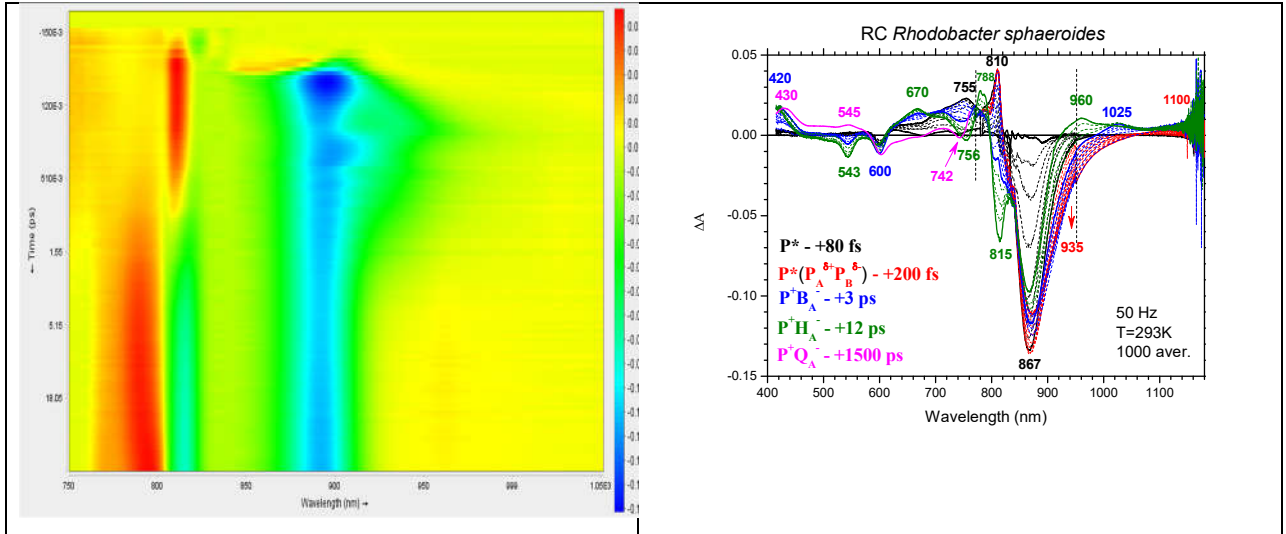
Принципиальная оптическая схема метода возбуждения – зондирования и ее реализация в дифференциальном лазерном спектрометре.



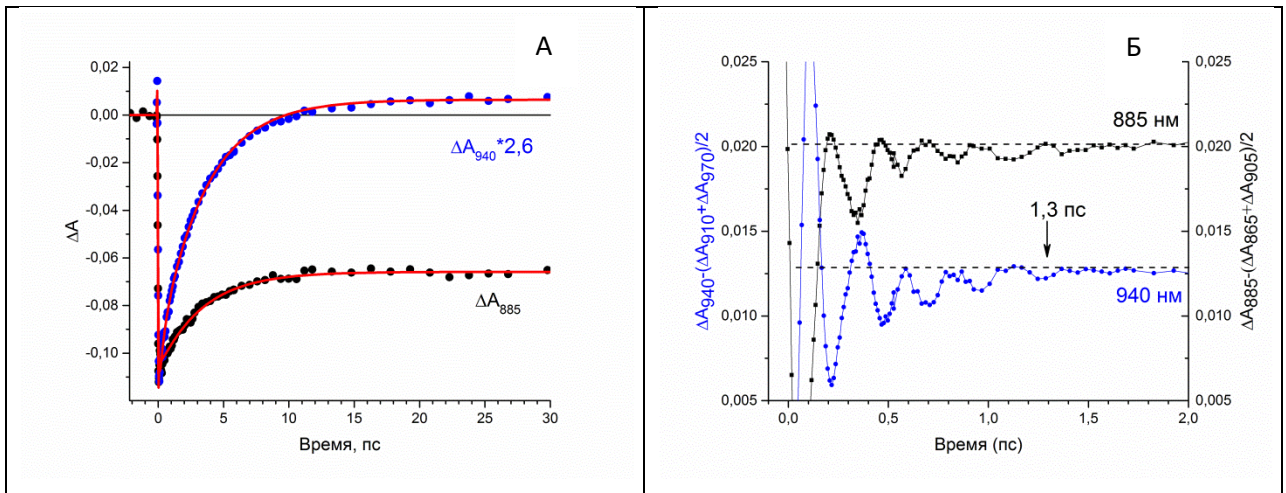
Спектр излучения возбуждающего импульса (FWHM = 60 нм) и его длительность в единицах фемтосекунд.



Спектры поглощения реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides* и спектры излучения возбуждающего импульса, измеренные при 293 К (а) и 100 К (б).

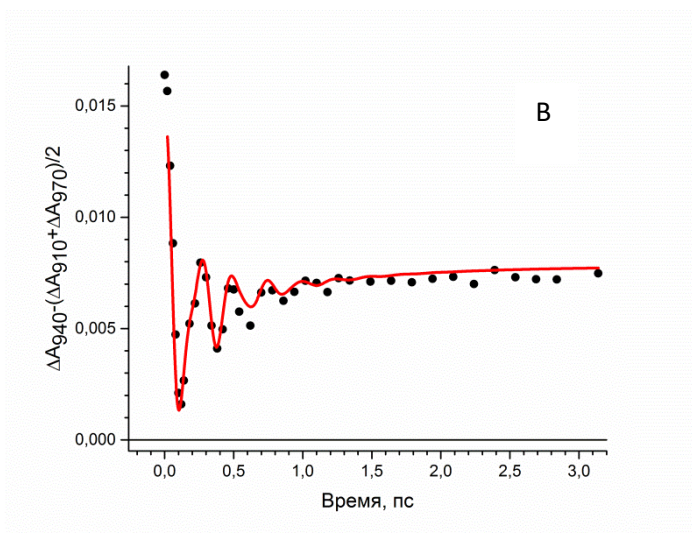


Двумерная карта интенсивностей и временная эволюция фотоиндуцированных дифференциальных спектров при разделении зарядов в РЦ *C. sphaeroides* при комнатной температуре. P, P\* – первичный донор электрона в основном и синглетно-возбужденном состояниях;  $B_A$ ,  $B_A^-$  - мономерный бактериохлорофилл в основном и анион-радикальном состояниях;  $H_A$ ,  $H_A^-$  - бактериофеофитиновый акцептор электрона в основном и анион-радикальном состояниях;  $Q_A$ ,  $Q_A^-$  - первичный хинонный акцептор в основном и анион-радикальном состояниях



Кинетика изменений поглощения  $\Delta A$  на фиксированной длине волны при 940 нм (А), 885 нм (Б) и осцилляции стимулированного излучения на фемтосекундной шкале времени (В).





Частота, см <sup>-1</sup>	Время затухания, пс	Амплитуда
225,01868 ± 14,39295	0,1875 ± 0,09413	-0,00331 ± 0,00241
136,50782 ± 4,05699	0,27884 ± 0,05244	0,00599 ± 0,00139

Экспонента:  $\tau=0,89954 \pm 0,25841$ ;  $A=-0,00253 \pm 2,27606E-4$

Аппроксимация кинетики стимулированного излучения при 940 нм линейной комбинацией затухающих гармонических функций и экспоненциального компонента согласно уравнению:  $f(t) = \sum_i A_i \cos(2\pi t \nu_i * 0,03 + \varphi_i) e^{-\frac{t}{\tau_i}} + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}}$

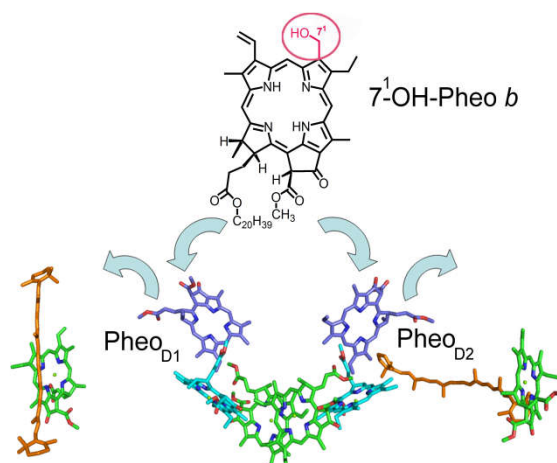
### Основные достижения лаборатории за 2013-2024

На основе собственной экспериментальной базы для мутагенеза РЦ пурпурных бактерий получен ряд штаммов *C. sphaeroides* с аминокислотными замещениями, направленными на модификацию пигмент-белковых взаимодействий, влияющими на спектральные и редокс-свойства кофакторов переноса электрона. (Vasilieva et al., 2012; Фуфина и др., 2019; Khristin et al., 2020). Несколько мутантных РЦ были закристаллизованы, и их кристаллическая структура была расшифрована с высоким разрешением (Fufina et al., 2015; Selikhanov et al., 2020; Fufina et al., 2023; Selikhanov et al., 2023). При анализе структуры мутантных РЦ *C. sphaeroides* в 2021 г. были описаны сети водородных связей на донорной стороне комплекса, проведен их анализ в сравнении с аналогичными структурами РЦ из других фототрофных организмов, выдвинуты предположения о возможной роли кластеров Н-связей на периплазматической стороне РЦ (Fufina and Vasilieva 2023).

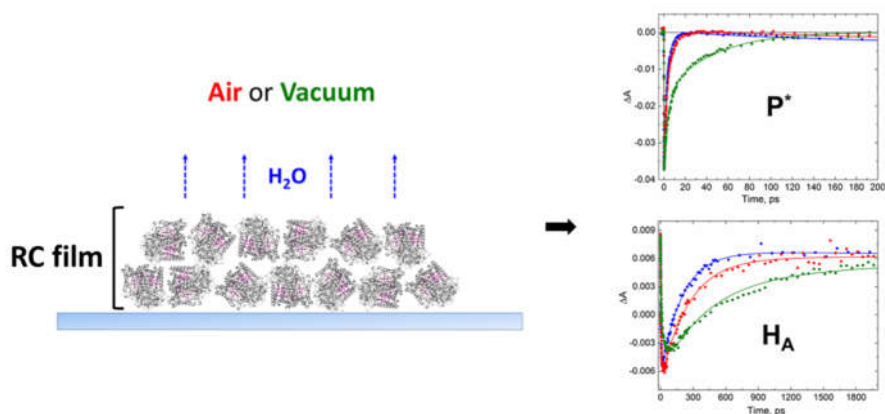
Получен ряд фотосинтетических РЦ с параметрами переноса электрона, направленно измененными химическими методами, проведен их спектральный и

функциональный анализ методами стационарной и кинетической спектроскопии (Zabelin et al., 2014, 2020, 2023; Zabelin and Shkuropatov, 2021).

Впервые было осуществлено химическое замещение феофитинового акцептора электрона в изолированном РЦ фотосистемы 2 высших растений синтезированным пигментом (7-деформил-7-гидроксиметилфеофитином *b*), способным функционировать в фотореакции переноса электрона вместо природного феофитина (Zabelin et al., 2014).

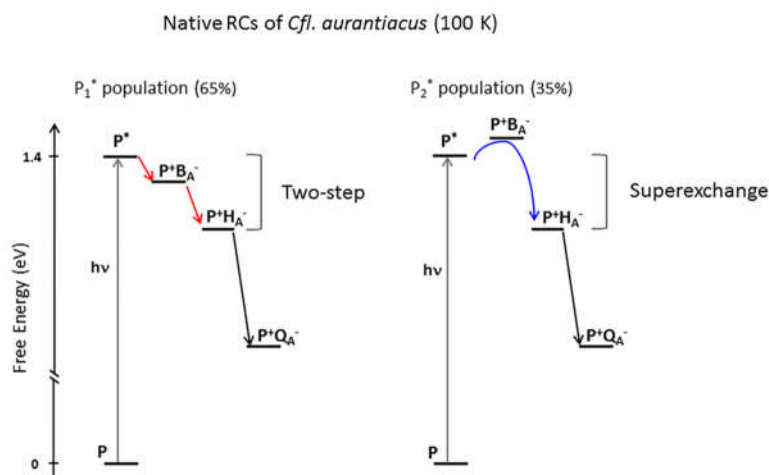


С использованием метода обратимой дегидратации/гидратации в вакуумных условиях выявлена взаимосвязь между динамикой переноса электрона, квантовыми выходами состояний с разделенными зарядами и присутствием различных пулов слабо- и прочносвязанной воды в реакционных центрах пурпурных фотосинтезирующих бактерий (Zabelin et al. 2020).



Найдена возможность селективного замещения фотоактивной молекулы бактериофеофитина производными растительного феофитина в РЦ *Cfl. aurantiacus*, представителя группы зеленых нитчатых бактерий (Zabelin and Shkuropatov, 2021). Показано, что при криогенных температурах в бактериальных реакционных центрах

предельно высокий (практически 100%) квантовый выход первичного преобразования энергии квантов света в электрохимическую энергию разделенных зарядов может обеспечиваться как с помощью двухступенчатого каскадного механизма (за несколько пикосекунд), так и путем одностадийного суперобменного процесса (в течение десятков пикосекунд) (Zabelin et al. 2023).



В РЦ пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* впервые были обнаружены признаки образования состояния с переносом заряда первичного донора электрона на фемтосекундной шкале времени в ближней ИК области спектра (Хатыпов и др., 2010). Было показано, что это состояние образуется с задержкой времени  $\sim 110$  фс в РЦ мутантов L173NL и M202NL, в которых первичный донор представляет собой гетеродимер, образованный парой БФео:БХл и БХл:БФео, соответственно (Khatypov et al., 2012). Было обнаружено, что в РЦ тройного мутанта M160LN+L131LN+M197FN, в котором затруднен перенос электрона на первичный акцептор  $V_A$  вследствие повышения потенциала окисления первичного донора электрона, образуется долгоживущее смешанное состояние  $P^*(P_A^+P_B^-)$  (Хмельницкий и др., 2013). Был предложен метод интервалов, позволяющий извлекать собственную кинетику минорных полос из суперпозиции перекрывающихся спектральных компонентов (Хатыпов и др., 2019).

В РЦ *Rba. sphaeroides* обнаружена корреляция затухания колебательной когерентности возбужденного первичного донора электрона со временем жизни состояния с разделенными зарядами  $P^+V_A^-$ , что свидетельствует об обратимости переноса электрона на первичный акцептор электрона – молекулу  $V_A$  (Христин и др., 2024). На задержках времени менее 200 фс при блокировании переноса электрона на ближайший акцептор  $V_A$

обнаружены признаки суперпозиции двух электронных состояний первичного донора электрона  $P^*$  и  $P_A^+P_B^-$ . Величина примеси состояния с переносом заряда составляет ~24%.

### Избранные статьи лаборатории за период 2014-2024 гг.

- Христин А.М., Фуфина Т.Ю., Хатыпов Р.А., Фемтосекундная динамика возбужденного первичного донора электрона в реакционных центрах пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*. Биохимия, 2024 (принята в печать) (перевод) Anton M. Khristin, Tatyana Yu. Fufina, and Ravil A. Khatypov, Femtosecond Dynamics of the Excited Primary Electron Donor in Reaction Centers of the Purple Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, ISSN 0006-2979, Biochemistry (Moscow), 2024, Vol. 89, No. 7, pp. 1313-1324, 2024.
- Фуфина Т.Ю., Забелин А.А., Хатыпов Р.А., Христин А.М., Шкуропатов А.Я., Васильева Л.Г., Сравнительное изучение спектральных и функциональных свойств реакционных центров дикого типа и двойного мутанта Н(L173)Л/Л(L177)Н пурпурной бактерии *Cereibacter sphaeroides*, Биохимия, 2024 (принята в печать)
- Selikhanov G., Atamas A., Yukhimchuk D., Fufina T., Vasilieva L., Gabdulkhakov A. (2023) Stabilization of *Cereibacter sphaeroides* photosynthetic reaction center by the introduction of disulfide bonds. *Membranes*, 13, 154.
- Fufina T.Yu., Selikhanov G.K., Gabdulkhakov A.G., Vasilieva L.G. (2023) Properties and crystal structure of the *Cereibacter sphaeroides* photosynthetic reaction center with double amino acid substitution I(L177)H + F(M197)H. *Membranes*, 13, 157.
- Fufina T.Yu., Vasilieva L.G. (2023) Role of hydrogen-bond networks on the donor side of photosynthetic reaction centers from purple bacteria. *Biophys Rev.*, 2023, 15, 921-937.
- Zabelin A.A., Khristin A.M., Kovalev V.B., Khatypov R.A., Shkuropatov A.Ya. (2023) Primary charge separation in native and plant pheophytin a-modified reaction centers of *Chloroflexus aurantiacus*: Ultrafast transient absorption measurements at low temperature. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1864, 148976. doi: 10.1016/j.bbabi.2023.148976.
- Selikhanov G., Fufina T., Guenther S., Meents A., Gabdulkhakov A., Vasilieva L. (2022) X-ray structure of the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center with an M197 Phe→His substitution clarifies the properties of the mutant complex. *IUCrJ*, 9, 261-271.
- Zabelin A.A., Kovalev V.B., Shkuropatov A.Ya. (2022) On the mechanism of selective chemical exchange of bacteriopheophytins in the reaction centers of *Rhodobacter*

- sphaeroides* R-26. *Biochemistry (Mosc)*, 87, 1119-1129. doi: 10.1134/S0006297922100054.
- Zabelin A.A., Shkuropatov A.Y. (2021) Pigment-modified reaction centers of *Chloroflexus aurantiacus*: chemical exchange of bacteriopheophytins with plant-type pheophytins. *Photosynth Res.*, 149, 313-328. doi: 10.1007/s11120-021-00855-x.
  - Khristin A.M., Zabelin A.A., Fufina T.Y., Khatypov R.A., Proskuryakov I.I., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y., Vasilieva L.G. (2020) Mutation H(M202)L does not lead to the formation of a heterodimer of the primary electron donor in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* when combined with mutation I(M206)H. *Photosynth Res.*, 146, 109-121. doi: 10.1007/s11120-020-00728-9
  - Zabelin A.A., Khristin A.M., Shkuropatova V.A., Khatypov R.A., Shkuropatov A.Y. (2020) Primary electron transfer in *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction centers under dehydration conditions. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.*, 1861, 148238. doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148238.
  - Selikhanov G., Fufina T., Vasilieva L., Betzel C., Gabdulkhakov A. (2020) Novel approaches for lipid sponge phase crystallization of *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center // *IUCrJ.* 7:1084-1091. <https://doi.org/10.1107/S2052252520012142>
  - Khatypov R.A., Khristin A.M., Vasilyeva L.G., Shuvalov V.A. (2019) Algorithm for extracting weak bands kinetics from the transient absorption spectra of the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center. *Biochemistry (Mosc)*, 84, 644-651. doi: 10.1134/S0006297919060075.
  - Zabelin A.A., Shkuropatova V.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y. (2019) Spectral and photochemical properties of *Rhodobacter sphaeroides* R-26 reaction center films in vacuum. *Biochemistry (Mosc)*, 84, 1107-1115. doi: 10.1134/S000629791909013X.
  - Фуфина Т.Ю., Леонова М.М., Хатыпов Р.А., Христин А.М., Шувалов В.А., Васильева Л.Г. (2019) Особенности аксиального лигандирования бактериохлорофиллов в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий. *Биохимия*, 84, 509-519. doi: 10.1134/S0006297919040047.
  - Zabelin A.A., Neverov K.V., Krasnovsky A.A. Jr, Shkuropatova V.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y. (2016) Characterization of the low-temperature triplet state of chlorophyll in photosystem II core complexes: Application of phosphorescence measurements and Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 1857, 782-788. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.029.

- Fufina T.Y., Vasilieva L.G., Gabdulkhakov A.G., Shuvalov V.A. (2015) The L(M196)H mutation in reaction center results in new pigment- protein interactions. *Photosynth. Res.*, 125, 23-29. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0062-0>
- Zabelin A.A., Shkuropatova V.A., Shkuropatov A.Y., Shuvalov V.A. (2015) Temperature dependence of light-induced absorbance changes associated with chlorophyll photooxidation in manganese-depleted core complexes of photosystem II. *Biochemistry (Mosc)*, 80, 1279-1287. doi: 10.1134/S0006297915100089.
- Neverov K.V., Krasnovsky A.A. Jr, Zabelin A.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y. (2015) Low-temperature (77 K) phosphorescence of triplet chlorophyll in isolated reaction centers of photosystem II. *Photosynth Res.*, 125, 43-9. doi: 10.1007/s11120-015-0105-1.
- Zabelin A.A., Shkuropatova V.A., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y. (2014) Chemically modified reaction centers of photosystem II: Exchange of pheophytin a with 7-deformyl-7-hydroxymethyl-pheophytin b. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 1870-1881. doi: 10.1016/j.bbabi.2014.08.004.