

Лаборатория первичных процессов фотосинтеза

Состав лаборатории

Шувалов Владимир Анатольевич, д.б.н., академик РАН, заведующий лабораторией

Васильева Людмила Григорьевна, д.б.н., в.н.с.

Каминская Ольга Павловна, к.б.н., в.н.с.

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.

Шкуропатова Валентина Александровна, н.с.

Волщуклова Татьяна Сергеевна, ст. инженер

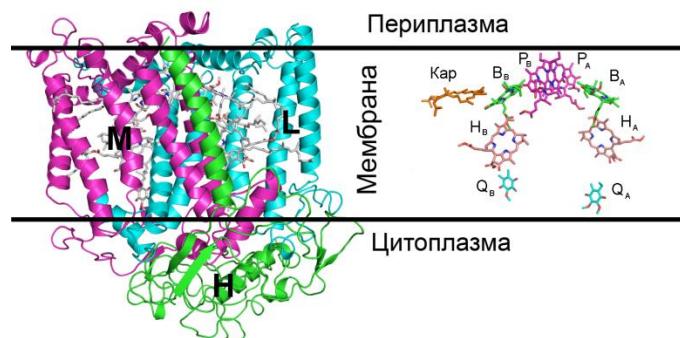
Хмельницкий Антон Юрьевич, к.б.н., с.н.с.

Христин Антон Михайлович, н.с.

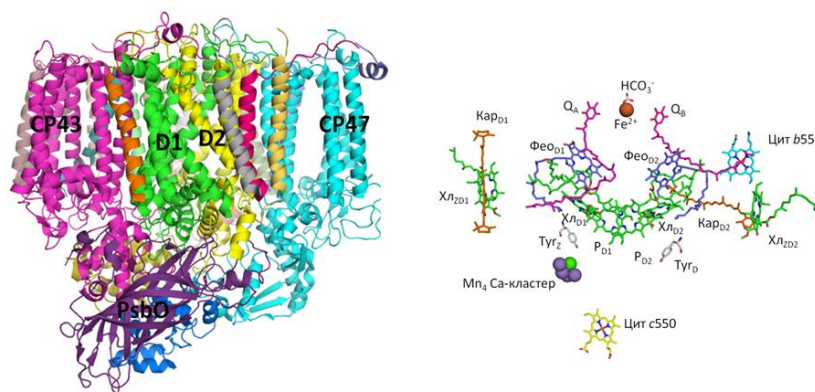
Селиханов Георгий Константинович, аспирант, прикомандирован из ИБ РАН.

Область научных исследований лаборатории

Структурно-функциональные взаимодействия в фотохимическом реакционном центре как одного из ключевых элементов глобального биосферного процесса преобразования солнечной энергии при фотосинтезе. Основное внимание уделяется исследованиям реакционных центров фотосинтезирующих бактерий и фотосистемы 2 высших растений.



Реакционный центр (РЦ) *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* (Ermler et al., 1994)



Основные направления исследований лаборатории

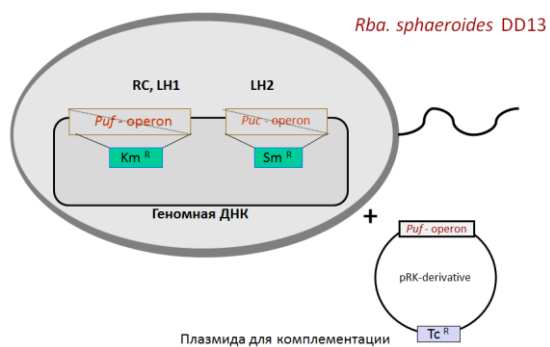
- Исследование влияния белкового окружения на первичные стадии переноса электрона в бактериальных фотосинтетических реакционных центрах с помощью сайт-направленного мутагенеза и фемтосекундной спектроскопии
- Изучение первичных стадий переноса электрона в фотосистеме 2 зеленых растений методом фемтосекундной спектроскопии
- Исследование влияния белкового окружения на структуру бактериальных фотосинтетических реакционных центров методами сайт-направленного мутагенеза и рентгеновской кристаллографии
- Исследование функциональной роли индивидуальных пигментов в реакционных центрах с помощью селективной химической модификации хромофоров
- Исследование функционирования цитохрома b559 в фотосистеме 2

Методы исследования реакционных центров фотосинтеза, используемые в лаборатории

В лаборатории используется набор современных биофизических и биохимических методов: абсорбционная дифференциальная спектроскопия с фемтосекундным временным разрешением; фотоиндуцированная инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием; микробиологические, генно-инженерные и молекулярно-биологические методы и подходы; методы кристаллизации белков и их рентгеноструктурного анализа; селективное химическое замещение хромофоров; методы выделения, хроматографической очистки и определения основных характеристик РЦ-комплексов фотосинтезирующих бактерий. Для проведения оптических измерений при низких температурах используется криогенная техника.



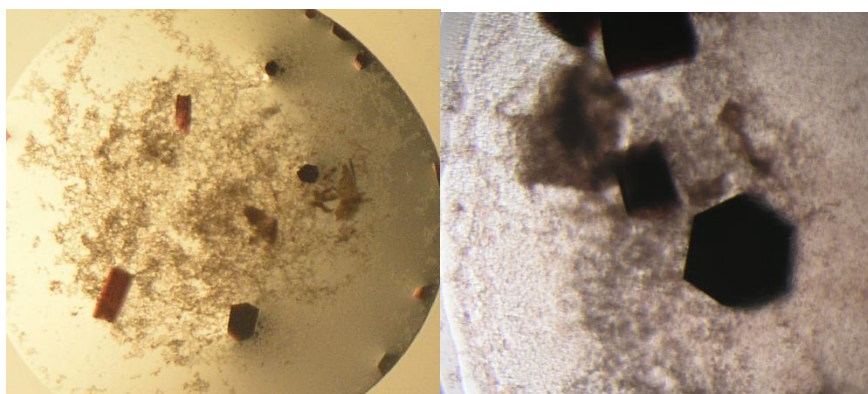
Сайт-направленный мутагенез белков реакционного центра пурпурных бактерий методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) – генетический метод, позволяющий вносить контролируемые точечные аминокислотные замещения в белковый матрикс РЦ.



Компоненты генетической системы для направленного мутагенеза реакционного центра *Rba. sphaeroides*: родительский *ruf-* и *puc-* дефицитный штамм *Rba. sphaeroides* и плазмида для комплементации, несущая полный или редуцированный *ruf-* оперон.

Кристаллизация реакционных центров

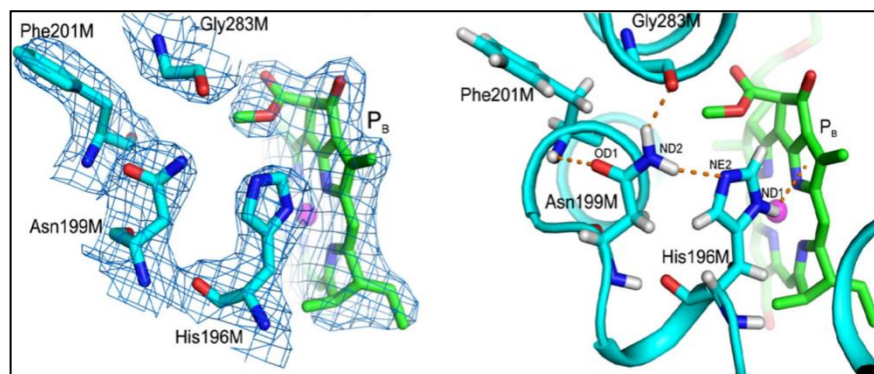
В лаборатории выращиваются кристаллы бактериальных реакционных центров. На основе кристаллографических данных можно смоделировать и предсказать изменения пигмент-белковых взаимодействий, происходящих в результате той или иной мутации.



Кристаллы реакционного центра пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides*

С целью достоверной идентификации локальных изменений структуры комплекса, вызванных мутацией, проводится рентгеноструктурный анализ кристаллов (совместно с Институтом белка РАН).

Были расшифрованы несколько структур мутантных реакционных центров (Vasilieva et al., *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1817**, 1407–1417 (2012); A.G. Gabdulkhakov et al., *Acta Cryst.F*, **69**, 506–509 (2013)).

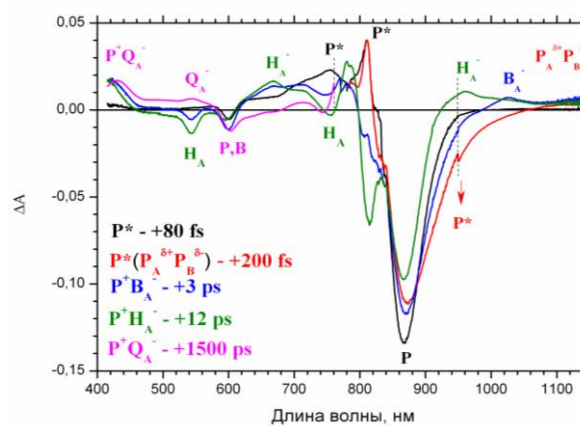


Структура мутантного РЦ *Rba. sphaeroides*, содержащего аминокислотную замену Leu на His в положении М196. (Fufina et al., *Photosynth.Res.*, **25**, 23–29 (2015))

Фемтосекундная абсорбционная дифференциальная спектроскопия является адекватным методом исследования механизма и динамики экспериментально наиболее трудно идентифицируемых и наименее изученных начальных стадий фотосинтетического разделения зарядов, протекающих на фемто- и пико-секундной временных шкалах. Этот тип оптической спектроскопии позволяет также регистрировать когерентную ядерную динамику, открывая возможность выявления и исследований ядерных движений, сопряженных с процессами переноса электрона.

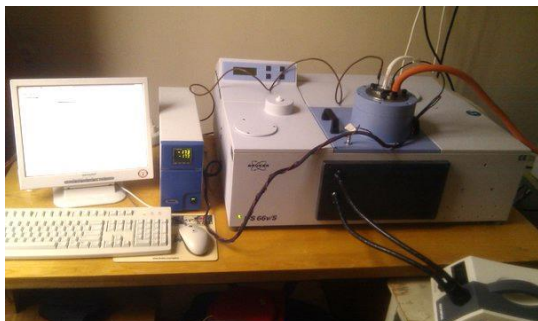


Дифференциальный фемтосекундный лазерный спектрометр Spitfire Pro

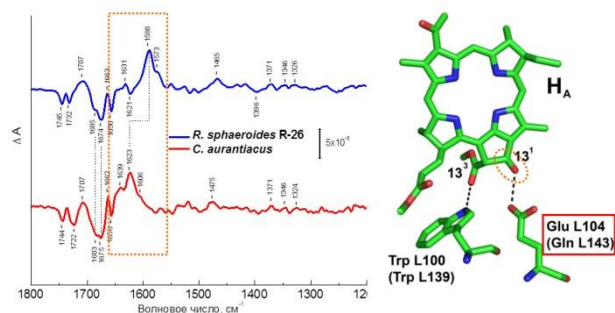


Временная эволюция фотоиндуцированных дифференциальных спектров при разделении зарядов в РЦ *Rba. sphaeroides* при комнатной температуре. P, P* – первичный донор электрона в основном и синглетно-возбужденном состояниях; V_A , V_A^- – мономерный бактериохлорофилл в основном и анион-радикальном состояниях; 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.

Фотоиндуцированная дифференциальная инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием (FTIR спектроскопия) обладает чрезвычайно высокой (на уровне одиночной химической связи) чувствительностью к молекулярным изменениям в кофакторах и белковом матриксе реакционных центров при разделении зарядов. В частности, FTIR спектроскопия позволяет исследовать водородные связи между хромофорами и аминокислотными остатками белка в нейтральном и ион-радикальном состояниях.

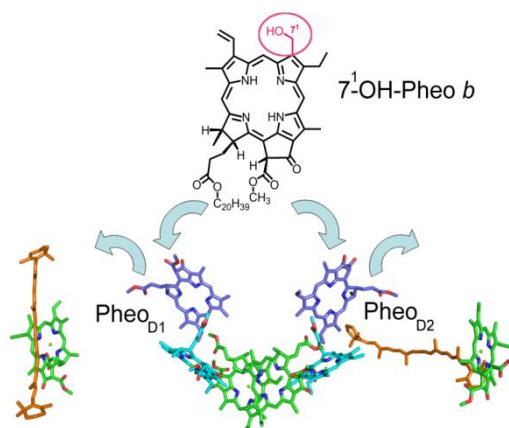


ИК-Фурье-спектрометр Bruker IFS 66v/S



Zabelin et al., *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1807**, 1013–1021 (2011)

Метод селективного химического замещения нативных хромофоров природными или синтетическими экзогенными аналогами дает возможность в широких пределах изменять оптические и окислительно-восстановительные свойства пигментов реакционного центра, позволяя модифицировать параметры переноса электрона.



Zabelin et al., *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1837**, 1870-1881 (2014)

Гранты лаборатории

Программа Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» до 2020 года.

Грант РФФИ № 16-04-00521 (руководитель Каминская О.П.) 2016-2018 гг.

Грант РФФИ № 16-34-0829 (руководитель Забелин А.А.) 2016-2017 гг.

Грант РФФИ № 17-44-500828 (руководитель Фуфина Т.Ю.) 2017-2019 гг.

Избранные статьи лаборатории за период 2007-2017 гг.

1. Хатыпов Р.А., Христин А.М., Фуфина Т.Ю., Шувалов В.А. Альтернативный путь индуцированного светом трансмембранного переноса электрона в фотосинтетических реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides*. *Биохимия*, **82**, 919-925 (2017).
2. Zabelin A.A., Neverov K.V., Krasnovsky A.A. Jr., Shkuropatova V.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Ya. 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 Bioenergetics*, **1857**, 782–788 (2016).
3. Kaminskaya O.P., Shuvalov V.A. Towards an understanding of redox heterogeneity of the photosystem II cytochrome *b559* in the native membrane. *Eur. Biophys. J.*, **45**, 129-138 (2016).
4. Fufina T.Y., Vasilieva L.G., Gabdulkhakov A.G., Shuvalov V.A. The L(M196)H mutation in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center results in new pigment- protein interactions. *Photosynth. Res.*, **125**, 23-29 (2015).
5. Zabelin A.A., Shkuropatova V.A., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Y. Chemically modified reaction centers of photosystem II: Exchange of pheophytin a with 7-deformyl-7-hydroxymethyl-pheophytin b. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1837**, 1870-1881 (2014).
6. Кляшторный В.Г., Фуфина Т.Ю., Васильева Л.Г., Шувалов В.А., Габдулхаков А.Г. Структурные и предварительные молекулярно-динамические исследования реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides* и его мутантной формы L(M196)H+H(M202)L. *Кристаллография*, **59**, 580–585 (2014).
7. Gabdulkhakov A.G., Fufina T.Y., Vasilieva L.G., Mueller U., Shuvalov V.A. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray structure analysis of wild-type and L(M196)H-mutant *Rhodobacter sphaeroides* reaction centres. *Acta Cryst.F*, **69**, 506–509 (2013).
8. Хмельницкий А.Ю., Хатыпов Р.А., Христин А.М., Леонова М.М., Васильева Л.Г., Шувалов В.А. Разделение зарядов в мутантных реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides* с повышенным потенциалом первичного донора электрона Р. *Биохимия*, **78**, 82-91 (2013).
9. Kaminskaya O. P., Shuvalov V.A. Biphasic reduction of cytochrome *b559* by plastoquinol in photosystem II membrane fragments. Evidence for two types of cytochrome *b559*/plastoquinone redox equilibria. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1827**, 471–483 (2013).
10. Вишнев М.И., Забелин А.А., Шкуропатова В.А., Янюшин М.Ф., Шувалов В.А., Шкуропатов А.Я. Химическая модификация пигментов комплекса ядра фотосистемы 2 борогидридом натрия. *Биохимия*, **78**, 492-500 (2013).
11. Vasilieva L.G., Fufina T.Y., Gabdulkhakov A.G., Leonova M.M., Khatypov R.A., Shuvalov V.A. The site-directed mutation I(L177)H in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center affects coordination of P_A and P_B bacteriochlorophylls. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1817**, 1407–1417 (2012).
12. Khatypov R.A., Khmelnskiy A.Yu., Khristin A.M., Fufina T.Yu., Vasilieva L.G., Shuvalov V.A. Primary charge separation within P870* in wild type and heterodimer mutants in femtosecond time domain. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1817**, 1392–1398 (2012).