

Теоретическое моделирование и экспериментальное исследование нелинейных динамических процессов в ансамбле фотосинтетических реакционных центров

Г. А. Абгарян¹, А. О. Гуца, М. Т. Капустина, В. Н. Харкянен

¹ Ереванский государственный медицинский университет
375033, Ереван, ул. Ватутина, 2/2

Институт физики НАН Украины
252650, Киев, пр. Науки, 46

*Результаты теоретического изучения явления динамической самоорганизации в специфических макромолекулярных структурах, фотосинтетических реакционных центрах (РЦ), представлены с учетом стохастических эффектов, возникающих в ансамбле РЦ. Модель для общего описания кинетики переходов фотомобилизованного электрона и конформационных изменений структуры базируется на решении прямых уравнений Колмогорова с использованием марковского приближения. Зависимость общей функции распределения от конформационной координаты рассматривается для случая, когда система находится в термодинамическом равновесии, и для полностью неравновесного состояния. Расчеты показывают возможность бистабильного поведения системы в некотором интервале скоростей фотомобилизованного электрона. Модель хорошо согласуется с результатами экспериментальных исследований коэффициента оптического поглощения РЦ пурпурных бактерий *Rhodospseudomonas sphaeroides*.*

Введение. Фотореакционный центр пурпурных бактерий (ФРЦ) является классическим объектом молекулярной биологии, исследуемым уже более 30 лет. Тем не менее, в последние годы интерес к этой системе значительно возрос, что связано с появлением работ по рентгеновскому анализу структуры ФРЦ [1, 2] и расчетами реакций электронного переноса методом молекулярной динамики [3, 4].

ФРЦ представляет собой белковую макромолекулу, осуществляющую первичное разделение зарядов в бактериальном фотосинтезе (рис. 1). За счет энергии света происходит фотомобилизация электрона димера бактериохлорофилла *P* за время порядка 2—4 пс и с вероятностью, близкой к единице. Затем за время порядка 150—200 пс электрон переходит на первичный хинонный акцептор практически с той же вероятностью. На следующей, более медленной стадии, происходит

переход электрона на вторичный хинонный акцептор. В дальнейшем возможен его возврат обратно на первичный акцептор или рекомбинация с дыркой на пигменте в результате реализации полного цикла переноса (рис. 2). Экспериментальные данные [6, 7] позволяют считать, что чисто электронный перенос осуществляется за счет туннелирования. Однако пребывание электрона на каждом хинонном акцепторе приводит к изменениям в структуре ФРЦ [8, 9], что в свою очередь влияет на эффективность этого туннелирования. Такая обратная связь может рассматриваться как коррелированное поведение электрона и структурных переменных. Кроме того, для корректного описания эволюции рассматриваемой электрон-конформационной системы необходимо учитывать стохастическую силу, связанную с тепловым движением молекул [10]. По аналогии с другими химическими, физическими или биологическими системами, в рассматриваемой системе возможно появление но-

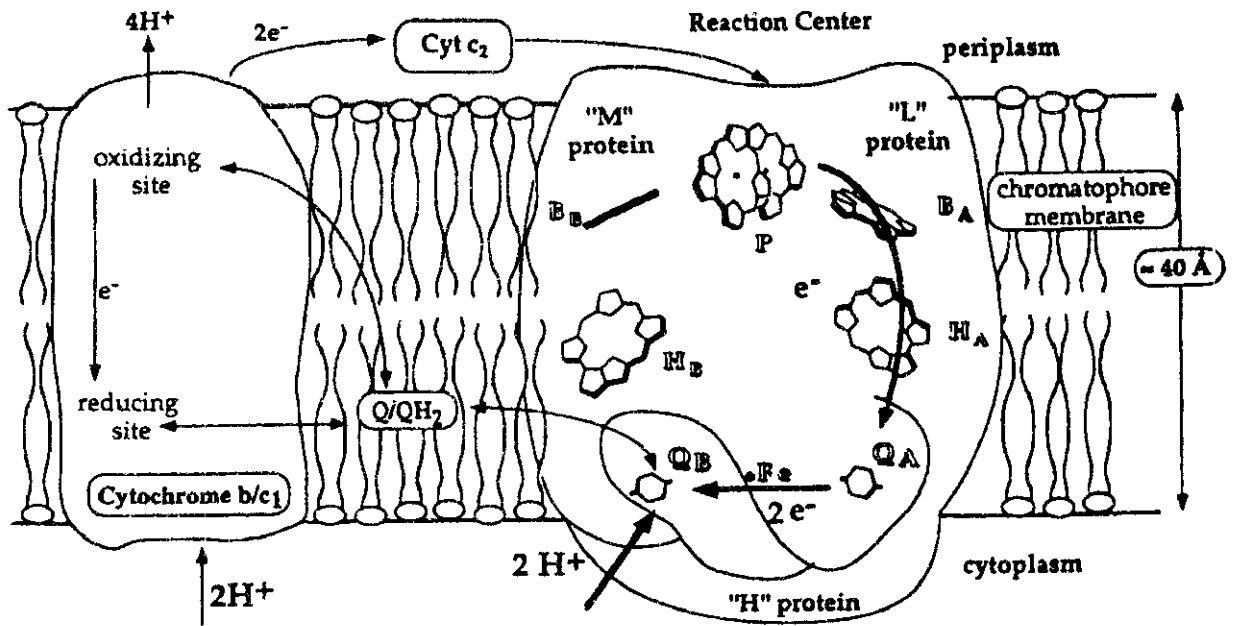


Рис. 1. Цикл электронного переноса в бактериальном фотосинтезирующем реакционном центре, происходящий с участием пула хинонных акцепторов и цитохромного комплекса b/c_1 , локализованных в фосфолипидной мембране, а также водного раствора цитохромов c_2 в периплазме вблизи мембраны. P — первичный электронный донор — димер бактериохлорофилла; B_A и B_B — мономеры бактериохлорофилла; H_A и H_B — молекулы феофитина; Q_A и Q_B — первичный и вторичный хинонные акцепторы соответственно. Фотоиндуцированный электронный перенос происходит только по « A »-ветви; Q_B — финальный акцептор [5]

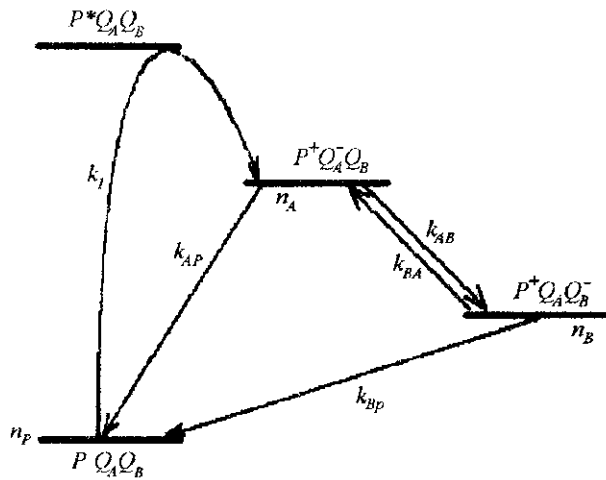


Рис. 2. Упрощенная схема электронных переходов в РЦ пурпурных бактерий *Rb. sphaeroides*: $P^*Q_A^-Q_B^-$, $P^+Q_A^-Q_B^-$, $P^+Q_A Q_B^-$ — состояния с локализацией электрона соответственно на димере бактериохлорофилла P , первичном акцепторе Q_A и вторичном акцепторе Q_B . Короткоживущие состояния с локализацией электрона на бактериофеофитине и мономере бактериохлорофилла на схеме не показаны; n_P , n_A , n_B — заселенности соответствующих уровней

вых и исчезновение старых электрон-конформационных состояний, а также функционирование всей системы в колебательном режиме [11—13]. В последних работах [14—16] показано, что взаимозависимое поведение электрона и структурных переменных приводит к эффектам динамической саморегуляции (или, лучше сказать, саморегуляции) в каждом отдельно взятом реакционном центре (РЦ). Было дано теоретическое описание электронной и конформационной динамики РЦ без учета стохастических эффектов, возникающих в ансамбле функционирующих РЦ. Доказательством наличия упомянутых эффектов саморегуляции может служить сложная функциональная зависимость изменений коэффициента поглощения РЦ [14, 17, 18], а также зависимость кинетики восстановления первичного донора [19, 20] от оптической «накачки». В данной работе впервые дается самосогласованное стохастическое описание ансамбля макромолекул, осуществляющих внутримолекулярный перенос электронов, и показана важность нелинейных динамических эффектов в экспериментально наблюдаемых зависимостях [18].

Теория. Рассмотрим ансамбль изолированных

РЦ с первичным и вторичным хинонными акцепторами. Нас будут интересовать только поздние стадии электронного туннелирования, такие как переходы и рекомбинации с обоих акцепторов. Для нашего типа РЦ можно пренебречь заселенностью уровней, соответствующих быстрым стадиям первичной локализации электрона, когда электрон находится на мономере бактериохлорофилла или молекуле бактериофеофитина, и будем рассматривать простую трехуровневую модель (см. рис. 2).

Для полного статистического описания ансамбля РЦ введем функцию $P_i(t, x)$, которая определяет совместную вероятность нахождения электрона на i -м месте связывания ($i = P, A, B$). Здесь A, B означают локализацию на первичном или вторичном хинонном акцепторе и одновременно нахождение РЦ в данной структурной конфигурации, соответствующей координате x . Известно, что процесс электронного переноса в ФРЦ является марковским процессом. Применяя марковский подход, используем для определения $P_i(t, x)$ прямые уравнения Колмогорова:

$$\begin{aligned} \frac{\partial P_P(t, x)}{\partial t} &= \hat{L}_P P_P(t, x) - k_{iP} P_P(t, x) + \\ &+ k_{AP} P_A(t, x) + k_{BP} P_B(t, x); \\ \frac{\partial P_A(t, x)}{\partial t} &= \hat{L}_A P_A(t, x) + k_{iP} P_P(t, x) - \\ &(k_{AP} + k_{AB}(x)) P_A(t, x); \\ \frac{\partial P_B(t, x)}{\partial t} &= \hat{L}_B P_B(t, x) - k_{BA} P_B(t, x) + \\ &+ k_{AB}(x) P_A(t, x) - k_{BP} P_P(t, x); \end{aligned} \quad (1)$$

$$\hat{L}_i = D \cdot \frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{1}{K_B T} \frac{\partial V_i(x)}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial x} \right], \quad (2)$$

где D — константа диффузии рассматриваемого процесса; $V_i(x)$ — потенциал структурной переменной в случае локализации электрона в i -м месте связывания.

Эксперименты свидетельствуют о том, что в процессе фотоактивации в белковой макромолекуле происходят обратимые структурные изменения, релаксация которых гораздо медленнее, чем таковая распределения зарядоразделенных состояний. В этом случае электронные переходы между кофакторами можно считать адиабатическими, а кинетические константы k_{ij} (см. рис. 2) — зависящими параметрически от медленной структурной переменной. В дальнейшем мы будем принимать в расчет зависимость от структурной переменной x только двух констант скоростей — k_{AB} и k_{BA} . Такой

подход действительно справедлив для фотосинтетических РЦ, так как именно эти две константы (что показано экспериментально для *Rhodopseudomonas sphaeroides* [8, 22]) существенно изменяют свое значение при изменении условий эксперимента (температуры, интенсивности освещения).

Большое число экспериментов показывает значимость быстрых динамических переменных в описании функционирования РЦ. По отношению к этим структурным переменным электронные переходы являются неадиабатическими. Поэтому в выражениях для кинетических констант мы учитываем вклад быстрых структурных переменных, задавая их в виде хорошо известных из теории Маркуса выражений для скоростей электронных переходов.

Простой подход для описания РЦ без вторичного хинонного акцептора был предложен в работе [8]. Авторы провели анализ соответствующей системы уравнений, однако не обсуждали возможности нелинейных динамических эффектов. В настоящей работе мы предлагаем модель (уравнения (1) и (2)), которую можно рассматривать как обобщенную модель Агмонда — Хопфильда для случая трех состояний, соответствующих электронной переменной (вероятности заселенности состояний P, Q_A и Q_B), учитывающей все возможные переходы между ними.

Общее решение уравнений (1) и (2) не может быть найдено без некоторых упрощений. Поскольку мы знаем, что релаксация электронной переменной происходит намного быстрее структурной, то решение этих уравнений может быть дано в адиабатическом приближении:

$$P_i(t, x) = n_i(t, x) P(t, x); \quad (3)$$

$$\frac{\partial P(t, x)}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{1}{K_B T} \frac{\partial V_{eff}(x)}{\partial x} + \frac{\partial P(t, x)}{\partial x} \right], \quad (4)$$

где $n_i(t|x)$ — заселенность i -го места связывания при фиксированной переменной x , которая усреднена по флуктуациям, вызванным электронными переходами. Поэтому эта структурная переменная может рассматриваться как управляющая мода [28]; $P(t, x)$ — плотность вероятности найти РЦ с данным значением структурной переменной x и с электроном, локализованным в произвольном месте; $V_{eff}(x)$ — эффективный адиабатический неравновесный потенциал для управляющей моды, который определяется из уравнения

$$\begin{aligned} \frac{\partial V_{eff}(x)}{\partial x} &= \sum_i \frac{\partial V_i(x)}{\partial x} n_i(x); \\ n_i(x) &= \lim_{t \rightarrow \infty} n_i(t, x). \end{aligned} \quad (5)$$

Эффективный потенциал имеет статистическую природу и зависит от интенсивности I действующего света через значение $n_i(t, x)$. Интенсивность света I в этом случае является управляющим параметром для неравновесного потенциала и определяет нелинейное динамическое поведение системы [28]. Позднее мы покажем, что в данной системе могут возникать бифуркации.

Уравнения (3), (4) совместно с (5) и балансными уравнениями для вероятности заселенности (см. ниже (7)) дают корректное общее описание ансамбля РЦ. Они учитывают взаимодействие фотоактивированного электрона с адиабатической структурной переменной x . Можно заметить, что уравнение (4) для ансамбля РЦ соответствует стохастическому уравнению для структурной переменной x одиночного РЦ и может, согласно работе [10], быть записано в виде

$$\tau_x \frac{dx}{dt} = -\frac{\partial V_{\text{eff}}(x)}{\partial x} + \sqrt{2D} \cdot \zeta(t), \quad (6)$$

где x является усредненной по флуктуациям, вызванным электронными переходами, как было указано выше; $\zeta(t)$ — δ -коррелированный случайный процесс, моделирующий температурные флуктуации структурной переменной одиночного РЦ; $\tau_x = D \setminus K_b T$. Теория для одиночного РЦ была разработана ранее в работах [14, 15], где авторы пренебрегли стохастическим членом $2D \cdot \zeta(t)$. В этих работах считалось, что функция распределения РЦ по структурным переменным существенно отлична от нуля только вблизи максимума. Это позволяет ввести конформационное приближение, предполагая, что почти все РЦ обладают одинаковым значением структурной переменной, которое соответствует некоторому максимуму распределения функции $P(t, x)$.

Рассмотрим эволюцию уровней заселенности РЦ. Она может быть описана системой балансных уравнений, соответствующей схеме на рис. 2:

$$\begin{aligned} \frac{dn_P}{dt} &= -k_1 n_P + k_{AP} n_A + k_{BP} n_B; \\ \frac{dn_A}{dt} &= -k_{AP} n_A - k_{AB} n_A + k_1 n_P + k_{BA} n_B; \\ \frac{dn_B}{dt} &= +k_{AB} n_A - k_{BA} n_B - k_{BP} n_B; \end{aligned} \quad (7)$$

с условием нормировки:

$$n_P + n_A + n_B = 1. \quad (8)$$

В уравнении (7) k_1 пропорционально интенсивности действующего света I ; k_{AB} можно считать

константой, поскольку конформационная координата x слабо изменяется при изменении заселенности Q_A [13]. Значение этой константы может быть найдено из экспериментов [7, 21]. $k_{AB}/k_{BA} = \exp(\Delta_{AB} \setminus K_b T)$, где Δ_{AB} — разность энергий между уровнями первичного и вторичного акцепторов; K_b — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура. Мы также положим, что $k_{BP} = 0$, учитывая ничтожную вероятность прямой релаксации $P^+ Q_A Q_B^- \rightarrow P Q_A Q_B$ по сравнению с рекомбинацией через первичный акцептор Q_A для РЦ типа *Rb. sphaeroides* при нормальных физиологических условиях [29].

Теперь нам необходимо найти подходящий макроскопический параметр для того, чтобы ввести корреляцию между константами скорости электронных переходов и структурными изменениями, вызванными световой «накачкой». Принимая во внимание очевидную зависимость Δ_{AB} от структуры РЦ (см., например, [29—33], где изучали k_{AB} , k_{BA} и Δ_{AB} при различных экспериментальных условиях, изменяющих внутреннюю структуру), мы будем описывать структурные изменения РЦ как изменение свободной энергии между уровнями $P^+ Q_A^- Q_B^-$ и $P^+ Q_A Q_B^-$. В таком описании предполагается, $\Delta_{AB} = \varphi(x)$, где φ — некоторая функция структурной переменной x . Структурные изменения, вызванные локализацией электрона на хинонных акцепторах Q_A и Q_B , очень сложные. К примеру, мы знаем о быстром процессе протонирования белковых групп, находящихся вблизи хинонных акцепторов; о более сильной связи восстановленного хинона с белком по сравнению с окисленным и о медленной, измеряемой десятками минут, конформационной перестройке белкового окружения места локализации Q_B [21]. В нашей теоретической модели мы считаем, что медленные конформационные перестройки, влияющие на значение Δ_{AB} , могут быть описаны в виде единой обобщенной структурной переменной. Такая переменная может описывать комплексную реконструкцию в системе и ее можно вводить таким же путем, как и «координату реакции» в химической кинетике. Мы предполагаем также, что Δ_{AB} является однозначной функцией структурной переменной, и для простоты будем считать зависимость между Δ_{AB} и x линейной. Далее положим, что $x = \Delta_{AB} \setminus K_b T$ — безразмерная координата. Теперь уравнения (1)—(6) становятся уравнениями для этой структурной переменной. Учитывая все изложенное выше, можно легко получить выражения для стационарных заселенностей $n_A(I, x)$ и $n_B(I, x)$ исходя из балансных уравнений и условия нормировки:

$$n_A(I, x) = \frac{I}{I \cdot (1 + \exp(x)) + k_{AP}};$$

$$n_B(I, x) = \frac{I \exp(x)}{I \cdot (1 + \exp(x)) + k_{AP}}. \quad (9)$$

Рассмотрим, как изменяется эффективный потенциал трехуровневой системы в зависимости от интенсивности действующего света. В этом случае $V_{eff}(x) \equiv V_{eff}(x, I)$. Потенциал $V_{eff}(x, I)$ определим из (5) при условии

$$n_A(I, x) \ll n_P(I, x), n_B(I, x), \quad (10)$$

что следует непосредственно из соотношения (9) и очевидного отношения $k_{AB}/k_{BA} = \exp(x) \gg 1$. Это означает, что структурная переменная $x = \Delta_{AB} \setminus K_b T$ оказывает решающее влияние на локальную структуру в месте расположения Q_B . Это может быть подтверждено следующими независимыми аргументами: во-первых, полярность места локализации хинона Q_B намного выше, чем Q_A [34]. По этой причине влияние фотоактивированного электрона на локальную структуру Q_B больше, чем на Q_A ; во-вторых, сила связи убихинона Q_B с белковой матрицей сильно зависит от того, локализован на нем электрон или нет [35, 36]; в-третьих, время жизни состояния $P^+Q_AQ_B^-$ существенно больше, чем для всех других зарядоразделенных состояний РЦ. Поэтому в уравнении (5) можно пренебречь членом $[(\partial V_A(x))/\partial x] \cdot n_A(I, x)$ и, используя (8) и (10), получить выражение для эффективного потенциала $V_{eff}(x, I)$:

$$\frac{\partial V_{eff}(x, I)}{\partial x} = \frac{\partial V(x, 0)}{\partial x} + f_B n_B(I, x), \quad (11)$$

где $V(x) \equiv V_P(x)$ и

$$f_B = \left(-\frac{\partial V_B(x)}{\partial(x)} \right) - \left(\frac{\partial V_P(x)}{\partial x} \right); \quad (12)$$

f_B — дополнительная сила, действующая на структурную переменную только в случае локализации электрона на Q_B . Эта сила имеет стохастическую природу и описывает изменение структуры РЦ в состоянии $P^+Q_AQ_B^-$.

Для простоты будем полагать эту силу постоянной и не зависящей от x . Для того чтобы определить зависимость структурной переменной x от интенсивности действующего света, необходимо выбрать первоначальный вид эффективного потенциала $V(x)$. Мы выбрали для этой цели параболическую функцию: $V(x) = k \cdot (x - x_0)^2 / 2$, где x_0 — точка равновесия структурной переменной при отсутствии света; k — квазиупругая постоянная среды. Теперь из (11) и (12) получаем

$$\frac{\partial V_{eff}(x, I)}{\partial x} = k(x - x_0 - f_B n_B(I, x)). \quad (13)$$

После интегрирования (13) и учета (9) имеем

$$V_{eff}(x, I) = \frac{k(x - x_0)^2}{2} - k(x_B - x_0) \times$$

$$\times \ln \frac{(1 + \exp(x)) \cdot I + k_{AP}}{(1 + \exp(x_0)) \cdot I + k_{AP}} + C(I), \quad (14)$$

где $(x_B - x_0) = f_B/k$ определяют максимальное изменение структурной переменной, которое может возникнуть в предельном случае при постоянной локализации электрона на Q_B ; $C(I)$ — константа интегрирования, зависящая от первоначальной интенсивности действующего света, для которой легко получить значение:

$$C(I) = \frac{f_B^2}{2k} \left[\frac{I \cdot \exp(x_0)}{I(1 + \exp(x_0)) + k_{AP}} \right]^2. \quad (15)$$

Анализируя выражение (14), приходим к условию

$$x_B - x_0 \geq 4, \quad (16)$$

при выполнении которого эффективный потенциал $V_{eff}(x, I)$ имеет два минимума.

На рис. 3 представлена кривая зависимости $V_{eff}(x)$ от интенсивности действующего света для модели, описывающей РЦ *Rb. sphaeroides*. Минимумы эффективного потенциала соответствуют стабильным состояниям системы. В дальнейшем мы будем отождествлять их с конформационными состояниями, а соответствующее значение структурной переменной x — с конформационной координатой. Уравнение для определения конформационных координат точек экстремумов x_{ext} может быть получено из условия $[\partial V_{eff}(x, I)]/\partial x = 0$, которое приводит к уравнению

$$x_{ext} = x_0 + \frac{f_B}{2k} \frac{I \cdot \exp(x_0)}{I(1 + \exp(x_0)) + k_{AP}}. \quad (17)$$

Анализ уравнения (17) показывает, что возможны два типа зависимости x_{ext} от интенсивности действующего света. Первый тип — это случай слабого воздействия локализованного на Q_B электрона с локальной структурой вокруг места посадки, $(x_B - x_0)$ меньше критического значения. При этом структурные изменения недостаточны для того, чтобы вызвать обратные воздействия на электрон-конформационную систему в РЦ. Кривая зависимости $x_{ext}(I)$ в этом случае монотонно растет с ростом I , приближаясь асимптотически к константе x_B при $I \rightarrow \infty$ (этот тривиальный случай не указан

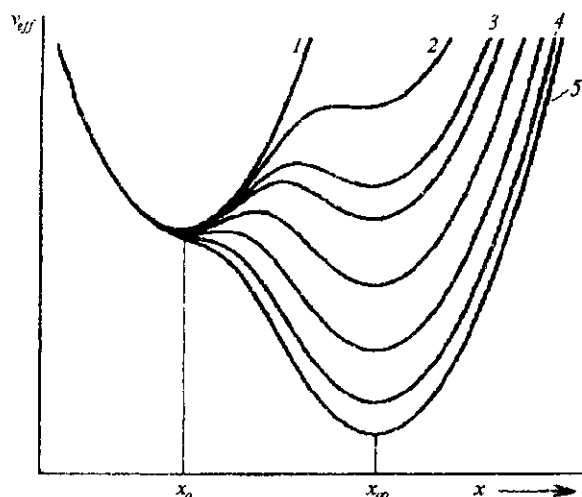


Рис. 3. Конформационный потенциал системы при различных интенсивностях I стационарно действующего света: 1 — 0; 2 — 0,01; 3 — 0,035; 4 — 0,2; 5 — 1. Все кривые между 3 и 4 относятся к промежуточным значениям I . Второй минимум потенциала появляется вблизи точки $I = 0,035$ (точка бифуркации). Значение $I = 1$ означает насыщающую силу света, равную $2 \cdot 10^{15}$ квант/(см²с⁻¹); $x_\infty = f_B/k + x_0$ — значение конформационной координаты в точке нового минимума потенциала после прохождения второй бифуркационной точки; x_0 — значение конформационной координаты при отсутствии света. Кривые получены при следующих значениях параметров РЦ: $k_{AP} = 9$; $f_B = 11$; $k = 1,2$; $x_0 = 1$

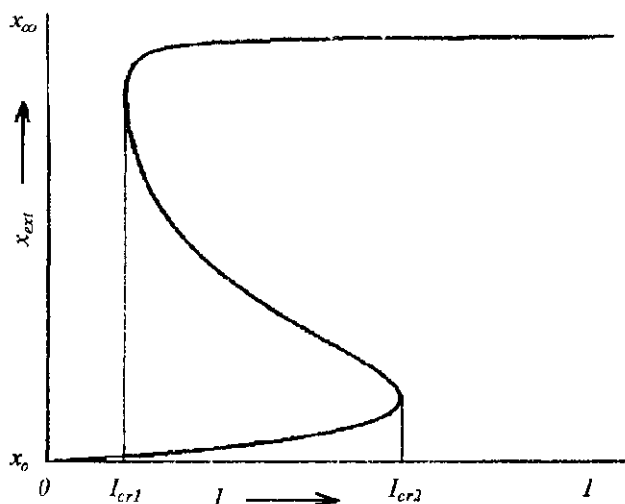


Рис. 4. Зависимость значения конформационной координаты x_{eff} от интенсивности действующего света. I_{cr1} и I_{cr2} — интенсивности света в точках бифуркаций системы. Кривая получена при тех же значениях параметров РЦ, что и на рис. 3

на рис. 4). Второй тип зависимости, представляющий для нас особенный интерес, — это случай зависимости в виде S-образной кривой. Как указывалось ранее, такой тип зависимости характерен для координаты реакции в системах, далеких от термодинамического равновесия [11—13, 28]. Это означает, что в определенных условиях при действии света мы можем наблюдать характерное синергетическое поведение некоторых параметров РЦ. Действительно, в случае $x_B - x_0 \geq 4$, в системе могут появляться точки бифуркации. Значения конформационных координат, соответствующих этим точкам (где производная $(\partial x_{eff}/\partial I) = 0$), определяются из (17), как:

$$x_{1,2} = \frac{x_B + x_0}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{x_B + x_0}{2}\right)^2 - (x_B + x_0)}. \quad (18)$$

Очевидно, что при $x_B - x_0 < 4$ область бистабильности отсутствует. Заметим, что значения x_1 и x_2 приближаются к соответствующим значениям x_0 и x_B , которые определяют значения конформационной координаты в темноте и при насыщающем освещении (см. рис. 4). Это справедливо для исходного потенциала параболического типа. Для потенциалов другого типа значения конформационных координат точек бифуркации могут существенно отличаться от x_0 и x_B .

В случае сильного электрон-конформационного взаимодействия и наличия обратной связи в системе, когда $x_B - x_0 \geq 4$, и при интенсивности $I < 0,035$ (кривые 1 и 2 на рис. 3) мы имеем адиабатический потенциал только с одним минимумом. В момент прохождения первой точки бифуркации появляется второй минимум потенциала (кривая 3), соответствующий новому конформационному состоянию. После прохождения критического значения, I_{cr1} , система начинает характеризоваться тремя возможными стационарными состояниями. Два из них (верхний и нижний на рис. 4) — устойчивые и соответствуют минимумам потенциала. Третье состояние нестабильно и относится к максимуму потенциала. После прохождения второй точки бифуркации I_{cr2} в системе остается лишь одно состояние, но с существенно измененной конформацией.

Как указывалось выше, конформационную координату в РЦ можно рассматривать в качестве контрольной моды для быстрых электронных переходов. Она демонстрирует нетривиальную зависимость при изменении действующей световой «накачки». Значение этой координаты медленно растет с ростом интенсивности от 0 до I_{cr1} . В области $I_{cr1} < I < I_{cr2}$ сосуществуют два различных конформационных состояния с существенно различными значе-

ниями конформационной координаты x_{ext} . Поскольку мы предполагаем экспоненциальную зависимость констант скоростей k_{AB} и k_{BA} от структурной переменной x , то они будут значительно отличаться в различных конформационных состояниях. Для случая $I > I_{cr2}$ конформационная координата имеет одно значение, практически независимое от I . При условии уменьшения интенсивности действующего света в районе бистабильности конформационная координата может оставаться неизменной, если не происходят температуроактивируемые переходы между двумя минимумами адиабатического потенциала и в системе за время изменения I не успевают устанавливаться термодинамическое равновесие.

Таким образом, поведение электрон-конформационной системы должно существенно зависеть от предыстории электронной фотоактивации. При выполнении условия (16), когда $\Delta_{AB}(I = \infty) - \Delta_{AB}(I = 0) > 4K_bT$, нелинейные динамические эффекты действительно становятся существенными и могут наблюдаться экспериментально (см. [14, 17, 18], где эффекты гистерезисного поведения наблюдались для РЦ *Rb. sphaeroides*). Следует отметить, что в соответствии с теорией, развитой выше, измерения значения $\Delta_{AB}(I = \infty)$ следует проводить после длительного периода освещения насыщающим светом, когда все процессы релаксации конформационной координаты завершены.

Моделирование и экспериментальные результаты. Для сравнения нашей теории с экспериментальными данными необходимо развить в рамках этой теории анализ макроскопических параметров РЦ, наблюдаемых в эксперименте. Основным параметром, с которым мы будем проводить сравнение, является оптическое поглощение образцов РЦ.

Рассмотрим два случая изменения распределения ансамбля РЦ по структурной переменной под действием возбуждающего света: а) медленное адиабатическое изменение I , настолько медленное, что на каждом шаге изменения успевает устанавливаться термодинамическое равновесие между конформационными состояниями в системе; б) неадиабатическое изменение I , когда термодинамическое равновесие достигается только вблизи минимумов эффективного потенциала независимо друг от друга. В последнем случае мы будем считать высоту потенциального барьера между двумя потенциальными ямами настолько большой, что во время действия активирующего освещения можно пренебречь термоактивированными переходами между двумя конформационными состояниями.

Путь N — общее количество реакционных центров. Плотность вероятности обнаружить систему со структурной переменной, равной x , в стационар-

ных условиях записывается в виде распределения Больцмана

$$P(x) = Z^{-1} \exp(V_{eff}(x, I)/K_bT);$$

$$Z = \int_{-\infty}^{\infty} \exp(V_{eff}(x, I)/K_bT) dx. \quad (19)$$

Этот вариант реализуется в случае, когда скорость изменения световой интенсивности намного меньше по сравнению с таковой температурных переходов через потенциальный максимум. Поэтому при каждом новом значении интенсивности в системе успевает устанавливаться общее термодинамически равновесное состояние, при котором предыстория изменения интенсивности никак не будет сказываться на плотности вероятности.

Противоположный вариант реализуется, когда температурными переходами через максимум потенциала можно пренебречь. Это означает возникновение квазистационарного распределения независимо около каждого из двух потенциальных минимумов. Потенциальный максимум делит общее количество РЦ N на две части — $\nu_1 \cdot N$ и $\nu_2 \cdot N$, где ν_1 и ν_2 — заселенности конформационных состояний РЦ. Часть общего количества $\nu_1 \cdot N$ относится к центрам, у которых $x < x_{max}$, и соответственно $\nu_2 \cdot N$ для тех, у которых $x > x_{max}$. При $I = 0$ и до достижения $I = I_{cr1}$ имеем: $\nu_1 = 1, \nu_2 = 0$; после прохождения $I = I_{cr2}$ значения населенностей меняются на противоположные $\nu_1 = 0, \nu_2 = 1$. Функция распределения для полного неравновесного случая может быть записана в виде:

$$P(x) = \begin{cases} \nu_1 Z_1^{-1} \exp\left(\frac{V_{eff}(x, I)}{K_bT}\right), \\ (1 - \nu_1) Z_2^{-1} \exp\left(\frac{V_{eff}(x, I)}{K_bT}\right), \end{cases}$$

$$Z_1 = \int_{-\infty}^{x_{max}} \exp\left(\frac{V_{eff}(x, I)}{K_bT}\right) dx, \quad x < x_{max},$$

$$Z_2 = \int_{x_{max}}^{\infty} \exp\left(\frac{V_{eff}(x, I)}{K_bT}\right) dx, \quad x > x_{max} \quad (20)$$

При росте I от I_{cr1} до I_{cr2} значение заселенности ν_1 уменьшается по следующему закону:

$$d\nu_1(I + dI) = -Z_1^{-1} \exp\left(\frac{V_{eff}(x_{max}, I)}{K_bT}\right) \cdot \nu_1 \cdot dx_{max}. \quad (21)$$

А соответствующее значение ν_2 увеличивается на такую же величину.

При уменьшении I_{cr2} до I_{cr1} значение заселенности $\nu 1$ увеличивается:

$$d\nu 1(I - dI) = -Z_2^{-1} \exp\left(\frac{V_{eff}(x_{max}, I)}{K_b T}\right) \times (1 - \nu 1) \cdot dx_{max}. \quad (22)$$

А соответствующее значение $\nu 2$ уменьшается на такую же величину.

Зависимость заселенности $\nu 1$ первого конформационного состояния от значения действующего света без температурных переходов показана на рис. 5 (сплошная линия). Зависимость имеет вид гистерезиса с шириной, зависящей от максимально достигнутой интенсивности «накачки». Если $I_{max} \geq I_{cr2}$, то мы получим максимально широкий гистерезис (рис. 5, сплошная линия), если же световая «накачка» будет прекращена на участке $I_{cr1} > I_{max} > I_{cr2}$, то при уменьшении интенсивности мы получим гистерезис меньшей ширины (рис. 5, точечная линия). Для случая полной термодинамически равновесной системы гистерезиса не будет (рис. 5, пунктирная линия).

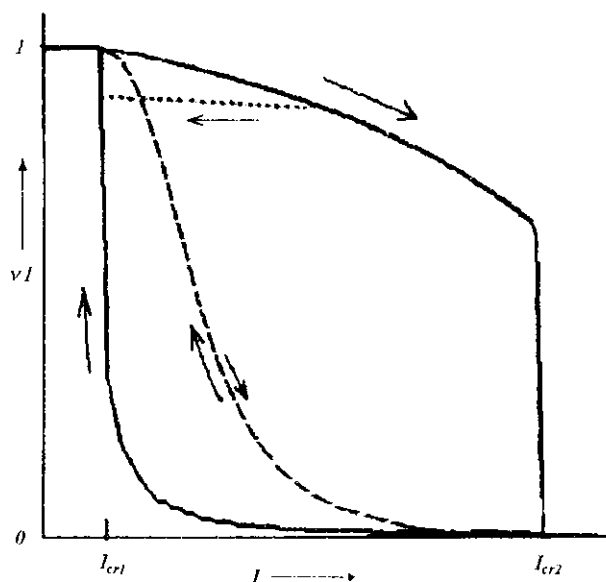


Рис. 5. График зависимости заселенности первого потенциального минимума $\nu 1$ от интенсивности действующего света для случая полного термодинамического равновесия при $I_{max} > I_{cr2}$ (пунктирная линия) и случая, далекого от равновесия (сплошная линия при $I_{max} > I_{cr2}$ и точечная при $I_{max} > I_{cr2}$). Стрелками показано направление изменения интенсивности света. Значениях параметров РЦ те же, что и на рис. 3

Для определения роли нелинейных динамических эффектов в фотосинтетических реакционных центрах был проведен ряд направленных экспериментов. Использовали реакционные центры пурпурных бактерий *Rb. sphaeroides*, штамм R-26, в виде суспензии. Схема выделения и приготовления препарата была общепринятой [37]. Эксперимент проводили при комнатной температуре, суспензию помещали в кювету размером 1 см, рН 7,5. В ходе эксперимента измеряли изменения максимальной полосы поглощения димера бактериохлорофилла *P* на длине волны $\lambda = 865$ нм. Интенсивность тестирующей подсветки составляла 10^9 квант/(см²с⁻¹). Дополнительную световую «накачку» производили с помощью лампы накаливания и интерференционного фильтра ($\lambda = 865$ нм). Вначале увеличивали интенсивность световой «накачки» от нуля до некоторого максимального уровня I_{max} , а затем уменьшали ее в обратном порядке до нуля. При каждом новом значении интенсивности систему выдерживали достаточно длительное время для достижения квазистационарного состояния и только после этого проводили измерения максимальной полосы поглощения.

Эксперимент показал гистерезисное поведение оптического поглощения ($\Delta A(I)$), которое пропорционально изменению общего числа фотовозбужденных реакционных центров (рис. 6). Соответствующее теоретическое значение можно записать так:

$$\Delta A \approx \int_{-\infty}^{\infty} dx [n_A(x) + n_B(x)] \cdot P(x), \quad (23)$$

где $P(x)$ определяется из уравнений (13), (20—22); $n_A(I, x)$, $n_B(I, x)$ — из уравнения (9).

Результаты расчетов на предложенной модели с различными начальными условиями (см. подпись к рис. 6) для РЦ *Rb. sphaeroides* представлены на рис. 6 (сплошная и пунктирная линии). Модель показывает наличие широкой области бистабильности. Ширина петли гистерезиса достаточно мала. Это хорошо согласуется с экспериментальными данными и может быть объяснено тем, что при таких условиях эксперимента только небольшая часть общего объема РЦ переходит в новое конформационное состояние и дает вклад в гистерезис. k_{AP} , x_0 , k и f_B — наиболее важные параметры, существенным образом влияющие на вид теоретической кривой $-\Delta A_{865}/A_{865}$. Зависимости, представленные на рис. 6, получены для двух групп параметров: 1) $k_{AP} = 9$, $x_0 = 1$, $k = 1,2$, $f_B = 11$ — сплошная линия; 2) $k_{AP} = 6$, $x_0 = 1$, $k = 1,8$, $f_B = 10$ — пунктирная линия. Соответствующие этим пара-

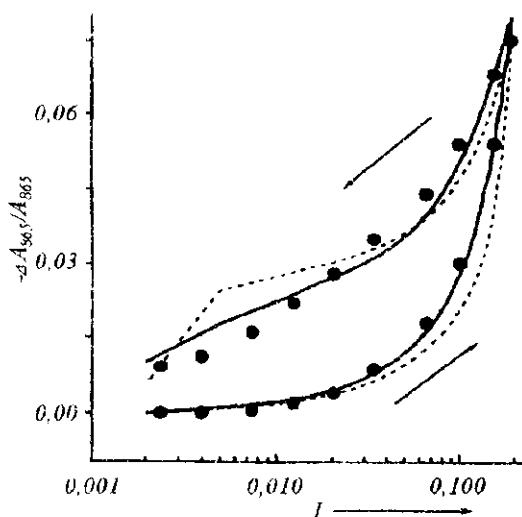


Рис. 6. Экспериментальная (точечная) и теоретическая (сплошная и пунктирная) кривые зависимости изменений оптического поглощения для РЦ *Rb. sphaeroides* от интенсивности действующего света. Теоретические кривые были получены при таких значениях параметров: 1) $k_{AP} = 9$; $f_B = 11$; $k = 1,2$; $x_0 = 1$ — сплошная линия; 2) $k_{AP} = 6$; $f_B = 10$; $k = 1,8$; $x_0 = 1$ — пунктирная линия. $-\Delta A_{865}/A_{865} = 0$ относится к состоянию системы в отсутствие света. Шкала оси x указывает на доли уровня насыщающей интенсивности $I = 1$ (что равно потоку $2 \cdot 10^{15}$ квант/(см²·с⁻¹)). Стрелка указывает направление изменения интенсивности световой активации

метрам изменения энергии Δ_{AB} , полученные из соотношения $x = \Delta_{AB}/K_b T$, составили: 1) от 25 до 250 мэВ; 2) от 25 до 165 мэВ при изменении интенсивности световой «накачки» РЦ от 0 до I_{max} . Первый набор параметров даст лучшее приближение теории и эксперимента, хотя и требует допущения больших пределов изменения Δ_{AB} при варьировании интенсивности фотоактивирующего света. Необходимо заметить, что форма теоретического гистерезиса строгим образом зависит от параметров, определяющих как адиабатический потенциал, так и функцию распределения РЦ, т. е. от k и f_B . Это означает, что при выборе другого типа потенциала (например, Морса, Бункингема или Ленарда—Джонса) мы вполне можем получить при данном теоретическом приближении меньшие пределы изменения Δ_{AB} .

По оценкам различных исследователей, значение Δ_{AB} изменяется в пределах от -10 до +100 мэВ в зависимости от значения k_{AB} и k_{BA} и различных внешних условий. Такая вариация Δ_{AB} достаточна для того, чтобы быть причиной появления гистерезиса

в рамках нашей модели, хотя форма экспериментальной гистерезисной петли будет существенно отличаться от теоретической. Используя непараболический тип для адиабатического потенциала, можно значительно сблизить теоретически и экспериментально наблюдаемые кривые при вариации Δ_{AB} в пределах от -10 до +100 мэВ. Для этого необходимо как можно точнее знать форму конформационного потенциала. Эта важная информация может быть получена из детального экспериментального изучения кинетики рекомбинации РЦ при различных условиях освещения образцов. Для этого были проведены предварительные эксперименты по изучению кинетики P^* рекомбинации на образцах РЦ при длительном облучении светом высокой интенсивности. Эти эксперименты показали различие в формах конформационного потенциала для РЦ в состоянии $P^+Q_A^-Q_B^-$ и $P^+Q_AQ_B^-$. В последующих работах мы собираемся учесть полученные поправки в теории. Принципиальной целью данной работы было развитие теории и освещение роли медленных конформационных переменных в функционировании РЦ.

Выводы. Проведенное теоретическое изучение ансамбля фотосинтетических РЦ показывает значимость нелинейных динамических эффектов в их функционировании. Нами установлено, что взаимодействие между фоторазделенными зарядами и белково-акцепторной конформацией является причиной возникновения нелинейной зависимости оптического поглощения РЦ от интенсивности действующего светового потока. Сравнение теории с экспериментальными результатами показывает хорошее согласование между теоретически и экспериментально выявленными изменениями оптического поглощения. Полученные результаты объясняются исходя из различий свободной энергии электронных состояний Δ_{AB} , изменяющейся под действием светового потока. В темноадаптированном состоянии значение Δ_{AB} меньше, чем то же значение при достаточно долгом, близком к насыщающему, световом воздействии. Медленные конформационные изменения, вызванные локализацией электрона на Q_B , появляются по истечении определенного промежутка времени. Мы предполагаем, что характерное время релаксации структурной переменной x составляет величину порядка 10 мин. Существование такой моды со временем релаксации 15—20 мин было недавно обнаружено при фотоакустических изучениях РЦ *Rb. sphaeroides* [19].

Два конформационных состояния, описанные как нижняя и верхняя ветви на рис. 6, могут играть важную роль в функционировании РЦ. После длительной световой адаптации, т. е. после

перехода на верхнюю ветвь бистабильной кривой, конформационное состояние всех РЦ становится полностью независимым от изменения интенсивности действующего света, что означает стабильный режим в функционировании РЦ. Этот режим согласуется с существенно возросшей константой скорости электронного перехода k_{AB} и соответственно со сниженным значением обратной константы k_{BA} по сравнению с их значениями в темновом состоянии, которому отвечает нижняя ветвь бистабильной кривой.

Г. А. Абгарян, О. О. Гуца, М. Т. Капустина, В. М. Харкянен

Теоретичне моделювання та експериментальне дослідження нелінійних динамічних процесів в ансамблі фотосинтетичних реакційних центрів

Резюме

Результати теоретичного вивчення явища динамічної самоорганізації у специфічних макромолекулярних структурах, фотосинтетичних реакційних центрах (РЦ), представлені з урахуванням стохастичних ефектів, що виникають в ансамблі РЦ. Модель для спільного опису кінетики переходів фотомобілізованого електрона та конформаційних змін структури базується на вирішенні прямих рівнянь Колмогорова з використанням марковського наближення. Залежність загальної функції розподілу від конформаційної координати розглядається для випадку, коли система знаходиться у термодинамічній рівновазі, та для повністю нерівноважного стану. Розрахунки показують можливість бистабільної поведінки системи у деякому інтервалі швидкостей фотомобілізованого електрона. Модель добре узгоджується з результатами експериментальних досліджень коефіцієнта оптичного поглинання РЦ пурпурових бактерій *Rhodospseudomonas sphaeroides*.

G. A. Abgaryan, A. O. Goushcha, M. T. Kapoustina, V. N. Kharkyanen

Theoretical modelling and experimental investigation of nonlinear dynamic processes in ensemble of photosynthetic reaction centers

Summary

The results of theoretical study of dynamic selforganization phenomenon in a specific macromolecular structure, the photosynthetic reaction center (RC), is presented with accounting of the stochastic effects in the RCs ensemble. The description both the photomobilised electron transfer kinetics and structure conformational transitions is based on the solution of the direct Kolmogorov equations using the Markov approach. Both the case of thermodynamically equilibrium system and nonequilibrium one were considered for the variables distribution function which describes the diffusion in the conformational coordinate space. The calculations revealed the bistable system behaviour in a certain interval of electron photomobilization rate. The modelling showed a good agreement with the results of experimental investigation of transient absorbance of the RCs from purple bacteria *Rhodospseudomonas sphaeroides*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deisenhofer J., Epp O., Sinning I., Michel H. Crystallographic refinement at 2.3 Å resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis* // J. Mol. Biol.—1995.—246.—P. 429—457.

2. Allen J., Feher G., Yeates T. et al. Structural homology of reaction centres from *Rhodospseudomonas sphaeroides* and *Rhodospseudomonas viridis* as determined by X-ray diffraction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—83.—P. 8589—8593.

3. Treutlein H., Schulten K., Brunger A. T. et al. Chromophore-protein interaction and function of the photosynthetic reaction center: A molecular dynamics study // Ibid.—1992.—89.—P. 75—79.

4. Schulten K., Tesch M. Coupling of protein motion to electron transfer: molecular dynamics and stochastic quantum mechanics study of photosynthetic reaction centers // Chem. Phys.—1991.—158.—P. 421—446.

5. Seban P., Maroti P., Hanson D. K. Electron and proton transfer to the quinones in bacterial photosynthetic reaction centers: Insight from combined approaches of molecular genetics and biophysics // Biochimie.—1995.—77.—P. 677—694.

6. De Vault P., Parkes J. H., Chance B. Electron tunnelling in cytochromes // Nature.—1967.—215.—P. 642.

7. Chamorovsky S. K., Kononenko A. A., Remennikov S. M., Rubin A. B. The oxidation rate of high-potential C-type cytochrome in the photochemical reaction centre is temperature-independent // Biochim. et biophys. acta.—1980.—589.—P. 151—155.

8. Шайтан К. В., Упоров І. В., Лукашев Е. Р. и др. Фотоконформаційний перехід — причина температурних і светових ефектів при рекомбінації електронів в реакційних центрах фотосинтезуючих бактерій // Молекуляр. біологія.—1991.—25.—P. 695—705.

9. Yruela I., Churio M., Geusch T. et al. Optoacoustic and singlet oxygen near-IR emission study of the isolated D1-D2-cyt b-559 reaction center complex of photosystem II. Protein movement associated with charge separation // J. Phys. Chem.—1994.—98.—P. 12789—12795.

10. Gardiner C. W. Handbook of stochastic methods.—Berlin etc.: Springer, 1985.

11. Haken H. Synergetics—an introduction.—Berlin etc.: Springer, 1978.

12. Glansdorf P., Prigogine I. Thermodynamics theory of structure stability and fluctuations.—London: Wiley, 1971.

13. Nicolis G., Prigogine I. Selforganization in nonequilibrium systems.—New York: Wiley, 1977.

14. Goushcha A. O., Dobrovolskii A. A., Kapoustina M. T. et al. New physical phenomenon of dynamical self-organization in molecular electron transfer systems // Phys. Lett.—1994.—A191.—P. 393—397.

15. Goushcha A. O., Kapoustina M. T., Kharkyanen V. N. Nonlinear effects of dynamic self-organization in macromolecular system caused by photocontrolled electron flux // J. Biol. Phys.—1994.—19.—P. 273—283.

16. Christoforov L. N. Conformation-dependent charge transport: A new stochastic approach // Phys. Lett.—1995.—A205.—P. 14—17.

17. Dobrovolskii A. A., Filippov A. G., Goushcha A. O. et al. Experimental evidence of dynamic self-organization in the electron-transfer system (example of reaction centers of purple bacteria) // J. Biol. Phys.—1994.—19.—P. 285—293.

18. Goushcha A., Kharkyanen V., Holzwarth A. Nonlinear light-induced properties of photosynthetic reaction centers under low intensity irradiation // J. Phys. Chem.—1997.—101.—P. 259—265.

19. Dobrovolskii A., Filippov A., Goushcha A. et al. New approach to experimental investigation of dynamic selforganization in reaction centers of purple bacteria // J. Biol. Phys.—1995.—21/4.—P. 265—272.

20. Goushcha A., Berezetska N., Kapoustina M., Kharkyanen V.

- Two stable electron-conformational states of photoactivated reaction center and their observation in primary donor recovery kinetics // *Ibid.*—1996.—22.—P. 113—124.
21. Puchenkov O. V., Kopf Z., Malkin S. Photoacoustic diagnostics of laser-induced processes in the reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* // *Biochim. et biophys. acta.*—1995.—1231.—P. 197—212.
 22. Kleinfeld D., Okamura M. Y., Feher G. Electron-transfer kinetics in photosynthetic reaction centers cooled to cryogenic temperatures in the charge-separated state. Evidence for light-induced structural changes // *Biochemistry.*—1984.—23.—P. 5780—5786.
 23. Malkin S., Churio M. S., Shochat S., Braslavsky S. E. Photochemical energy storage and volume changes in the microsecond time range in bacterial photosynthesis — a laser induced optoacoustic study // *J. Photochem. Photobiol.*—1994.—23.—P. 79—85.
 24. Mauzerall D. C., Gunner M. R., Zhang J. M. Volume contraction of photoexcitation of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26. Internal probe of dielectrics // *Biophys. J.*—1995.—68.—P. 275—280.
 25. Marcus R. A. On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer // *J. Chem. Phys.*—1956.—24.—P. 966—978.
 26. Marcus R. A., Sutin N. Electron transfer in chemistry and biology // *Biochim. et biophys. acta.*—1995.—811.—P. 265—322.
 27. Agmon N., Hopfield J. J. Transient kinetics of chemical reactions with bounded diffusion perpendicular to the reaction coordinate: Intramolecular processes with slow conformational changes // *J. Chem. Phys.*—1983.—78.—P. 6947—6959.
 28. Haken H. *Light. Laser Lidht dynamics.*—Amsterdam: North-Holland, 1985.
 29. Kleinfeld D., Okamura M. Y., Feher G. Electron transfer in reaction centers *Rhodospseudomonas sphaeroides* // *Biochim. et biophys. acta.*—1984.—766.—P. 126—140.
 30. McComb J. C., Stein R. R., Wright C. A. Investigations of the influence of headgroup substitution and isoprene side-chain length in the function of primary and secondary quinones of bacterial reaction centers // *Ibid.*—1990.—1015.—P. 156—171.
 31. Beroza P., Fredkin D. R., Okamura M. Y., Feher G. Protonation of interacting residues in a protein by a Monte-Carlo method — Application to lysozyme and the photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88.—P. 5804—5808.
 32. Beroza P., Fredkin D. R., Okamura M. Y., Feher G. Electrostatic calculations of amino acid titration and electron transfer, $Q_a^- Q_b \rightarrow Q_a Q_b^-$, in the reaction center // *Biophys. J.*—1995.—68.—P. 2233—2250.
 33. Gao J.-L., Shopes R. J., Wraight C. Heterogeneity of kinetics and electron transfer equilibria in the bacteriopheophytin and quinone electron acceptors of reaction centers from *Rps. viridis* // *Biochim. et biophys. acta.*—1991.—1056.—P. 259—272.
 34. Okamura M. I., Feher G. Proton transfer in reaction centers from photosynthetic bacteria // *Ann. Rev. Biochem.*—1992.—61.—P. 861—896.
 35. Wright C. A. Oxidation-reduction physical chemistry of the acceptor quinone complex in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence for a new model of herbicide activity // *Israel J. Chem.*—1981.—21.—P. 348—354.
 36. Nonella M., Schulten K. Molecular dynamics simulation of electron transfer in proteins. Theory and application $Q_A \rightarrow Q_B$ transfer in the photosynthetic reaction center // *J. Phys. Chem.*—1991.—95.—P. 2059—2067.
 37. Muller M. G., Griebenow K., Holzwarth A. R. Primary processes in isolated bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* studied by picosecond fluorescence kinetics // *Chem. Phys. Lett.*—1992.—199.—P. 465—469.