

Замедление реакции переноса электрона в фотосинтетическом реакционном центре как проявление флуктуаций его структуры

В. Н. Харкянен¹, Ю. М. Барабаш¹, Н. М. Березецкая¹, М. В. Оленчук¹,
П. П. Нокс², Л. Н. Христофоров^{1,3}

¹Институт физики НАН Украины
Просп. Науки, 46, Киев, Украина, 03039

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Ленинские горы, Москва, ГСП-1, Российская Федерация, 119992

³Институт теоретической физики им. Н. Н. Боголюбова НАН Украины
Ул. Метрологическая, 14^б, Киев, Украина, 03068

kharkyanen@iop.kiev.ua; knox@biophys.msu.ru; lchrist@bitp.kiev.ua

***Цель.** Определить характер структурной релаксации белка из анализа кинетики реакции электронного транспорта в фотосинтетическом реакционном центре (РЦ). **Методы.** Кинетические кривые, полученные методами абсорбционной спектроскопии, обрабатывали с использованием метода максимальной энтропии для получения спектра времен релаксации. **Результаты.** Обнаружен ряд характерных пиков этого спектра в интервале от 0,1 до сотен секунд. С увеличением длительности экспозиции образца в актиничном свете положения максимумов пиков линейно возрастают. **Выводы.** Из теоретического анализа результатов следует, что появляется несколько структурных состояний белкового компонента РЦ, в которых, однако, медленная кинетика реакции подчиняется одному и тому же дробно-степенному закону, отражающему стеклоподобные свойства белка.*

Ключевые слова: структурная релаксация белка, неэкспоненциальная кинетика, переменный барьер реакции, первичные реакции фотосинтеза.

Введение. Известно, что биохимические реакции с участием биологических макромолекул (чаще всего белков) демонстрируют, как правило, «отклонения от простого поведения» [1]. Характерным проявлением этого являются сложная, явно неэкспоненциальная во времени кинетика (наблюдаемая даже для «простых» реакций мономолекулярного типа, таких, например, как связывание лигандов или одноэлектронное окисление/восстановление), и неаррениусово температурное поведение кон-

тант скоростей, свидетельствующие о недостаточности описания этих реакций в рамках стандартной химической кинетики.

Также общепризнанной (хотя лишь в последние 20–30 лет) считается причина этих отклонений: они отражают прямое влияние на реакцию структурных движений белка, его конформационных флуктуаций, в большей или меньшей степени меняющих характеристики активного центра, порождающих эволюцию барьера реакции и т. п. Спектр таких флуктуаций может быть чрезвычайно широк и охватывать до десяти порядков временной шка-

лы. Это, в свою очередь, приводит к столь же сильной дисперсии «констант» скоростей (характерных времен) реакции.

Классическим (и по сей день одним из основных для исследований регуляторной роли медленных структурных движений белка) примером здесь служит реакция обратного связывания фотоотщепленного лиганда СО макромолекулой миоглобина, кинетика которой регистрируется в интервале времен от долей микросекунд до секунд и дольше [2, 3]. Аналогичная ситуация возникает и для реакций переноса электрона в пигмент-белковом комплексе фотосинтетического реакционного центра (РЦ) [4, 5].

Столь сильное замедление элементарных биохимических реакций, естественно, очень осложняет их теоретическое моделирование, поскольку практически исключает возможность компьютерных симуляций МД-типа даже при хорошо установленной статической структуре белка. Также нереально сколько-нибудь подробно проследить за ее динамикой непосредственно в эксперименте. В последнем регистрируют, как правило, лишь кинетику основной реакции (т. е. состояния лиганда, электрона или иного «субстрата» реакции).

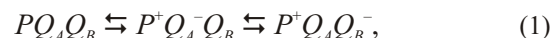
Все предполагаемые механизмы структурной регуляции имеют, таким образом, скрытую природу и пока не могут быть непосредственно доказаны. Единственным критерием адекватности моделей является их способность воспроизвести наблюдаемые тонкости кинетики соответствующей реакции и, что встречается реже, их предсказательная сила для проведения независимых экспериментов. При этом качество как экспериментальных данных, так и методов их анализа приобретает критическое значение.

Из результатов многочисленных работ, посвященных реакциям в сложном релаксирующем окружении [6, 7], к которым относятся реакции белков, можно выделить следующее. Во-первых, движение вдоль конформационных степеней свободы является диффузионным, тогда как описание реакций в рамках двух–трех дискретных конформаций (типа «активной-неактивной» и т. п.) – недостаточным (см., например [8, 9]). Во-вторых, эта диффузия имеет нестандартный характер, связанный с ие-

рархической «ярусной» структурой энергетического ландшафта белка [10] и со своеобразной иерархией степеней свободы, когда более быстрые из них «ограничивают» движение вдоль более медленных [11, 12]. Это чаще всего сводится к временной зависимости коэффициента диффузии по переменной, определяющей барьер реакции, что, в свою очередь, ведет к наблюдаемым релаксационным зависимостям типа «растянутых экспонент» ($\exp(-t/\tau_0)$), где $\tau_0 < 1$) или степенного убывания ($t^{-\alpha}$, $\alpha > 0$), что характерно для стеклоподобных материалов, с которыми в этом смысле сходны белки [7, 13–15].

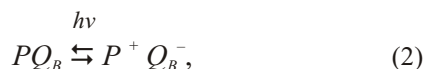
В общем же данная проблематика еще далека от формулирования надежных выводов о механизмах структурной регуляции. В этом плане анализируемые в данной работе нетривиальные свидетельства того, как сказываются конформационные флуктуации на кинетике перехода электрона между кофакторами реакционных центров, могут оказаться весьма информативными.

Материалы и методы. Фотосинтетический РЦ бактерий и реакции электронного транспорта в нем представляют одну из наиболее изученных биофизических систем (см., например [16]). В изолированных из бактерий *Rb. sphaeroides* РЦ схему первичных окислительно-восстановительных реакций можно свести к следующей:



где P , Q_A , Q_B – встроенные в белок РЦ кофакторы (P – первичный донор электрона, представленный димером бактериохлорофилла; Q_A , Q_B – соответственно первичный и вторичный акцепторы хиноновой природы). Возбужденный светом фотодонор чрезвычайно быстро (за ~ 100 пс) отдает электрон вначале первичному хинону, а затем разделение зарядов стабилизируется переносом электрона от Q_A к Q_B . В отсутствие дальнейшего фотохимического канала в ответ на импульсное возбуждение РЦ электрон возвращается к окисленному фотодонору за ~ 1 с при физиологических условиях; эта реакция и будет главным предметом дальнейшего анализа, поскольку она наиболее подвержена влиянию структурных флуктуаций [17]. В связи с этим, а также с тем, что промежуточное состояние $P^+ Q_A^- Q_B$

схемы (1) слабо заселено, для наших целей достаточно рассмотреть предельно упрощенную схему



помня лишь о том, что возврат электрона через Q_A будет зависеть от барьера реакции, определяемого разностью свободных энергий электрона на Q_A и Q_B [18]. Скорость прямой реакции пропорциональна интенсивности актиничного света. Здесь важно подчеркнуть, что в отличие от большинства исследований реакций в РЦ в ответ на импульсное возбуждение мы изучаем последствия непрерывного возбуждения определенной длительности и интенсивности, поскольку лишь тогда эффекты конформационных перестроек РЦ становятся особенно существенными (подробнее см. [19–21]).

Кинетику в схеме (2) чаще всего регистрируют методами дифференциальной абсорбционной спектроскопии, поскольку в системе имеется устойчивый оптический маркер – полоса поглощения на 865 нм, выцветающая при фотоокислении донора P . Абсорбционные изменения этой полосы, взятые с обратным знаком и должным образом нормированные, являются количественным индикатором разделения зарядов (т. е. представляют собой долю заселенности состояния $P^+Q_B^-$). Программно-аппаратный комплекс для регистрации этих изменений во времени и методика приготовления препаратов изолированных РЦ описаны в [22]. Наконец, анализ кинетики рекомбинации (получения распределения времен релаксации) выполняли с помощью разработанного нами варианта метода максимальной энтропии (ММЭ) (подробнее см. [22]).

Результаты. На рис. 1 представлена типичная серия экспериментальных кинетических кривых, отражающих процесс фоторазделения зарядов и последующей рекомбинации согласно схеме (2). В данном случае интенсивность возбуждающего света была одинаковой для всех кривых, но время экспозиции t_{exp} выбирали в интервале от 10 до 100 с. Ясно видны следующие характерные особенности процесса. В начале фотоактивации происходит быстрое окисление донора (восстановление акцептора), сопровождающееся (до момента выключения возбуждающего света) дополнительным и от-

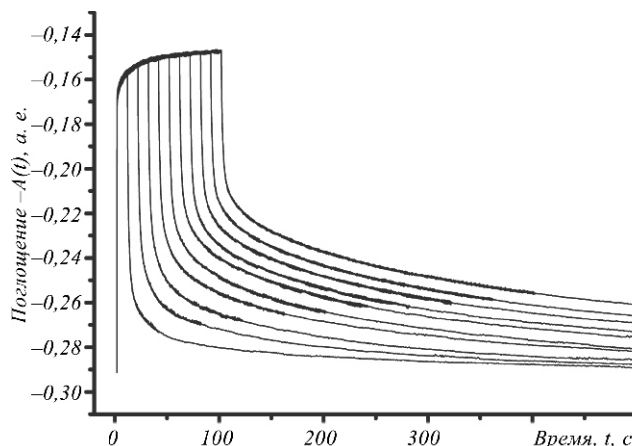


Рис. 1. Кинетика абсорбционных изменений при различных временах экспозиции: $t_{\text{exp}} = 10, 20, 30 \dots 100$ с, интенсивность света $I = 0,375$ мВт/см² (а. е. – аппаратные единицы)

носительно медленным разделением зарядов. Последнее связано со структурной подстройкой РЦ белка (в основном, в окружении Q_B) к новому зарядовому состоянию [19]. Той же причиной обусловлено явное замедление возврата электрона после прекращения освещения при увеличении t_{exp} .

Для дальнейшего подробного анализа информации, содержащейся в таких кривых, их релаксационную (убывающую) часть раскладывали с применением ММЭ в спектр времен релаксации, что является гораздо более надежным, чем аппроксимация небольшим количеством экспонент [22]:

$$n(t) = n(0) \int_0^{\infty} g(\tau) e^{-t/\tau} d\tau \quad (3)$$

где в данном случае $n(t)$ – заселенность состояния с электроном, перешедшим на Q_B . Типичный результат такой процедуры показан на рис. 2 для экспозиции $t_{\text{exp}} = 60$ с, где хорошо разделены пять пиков $g_i(\tau)$ с максимумами при $\tau_1^{\text{max}} = 0,1$ с, $\tau_2^{\text{max}} = 1$ с, $\tau_3^{\text{max}} = 5$ с, $\tau_4^{\text{max}} = 50$ с и $\tau_5^{\text{max}} = 450$ с, площадь под которыми пропорциональна числу РЦ, у которых фотовозбужденный электрон рекомбинировал с характерным временем, соответствующим данному пику. Такому же разложению подвержены релаксационные части всех кривых, показанных на рис. 1. В результате кривые рекомбинации после фотовозбуждения интенсивности I в течение времени t_{exp} можно

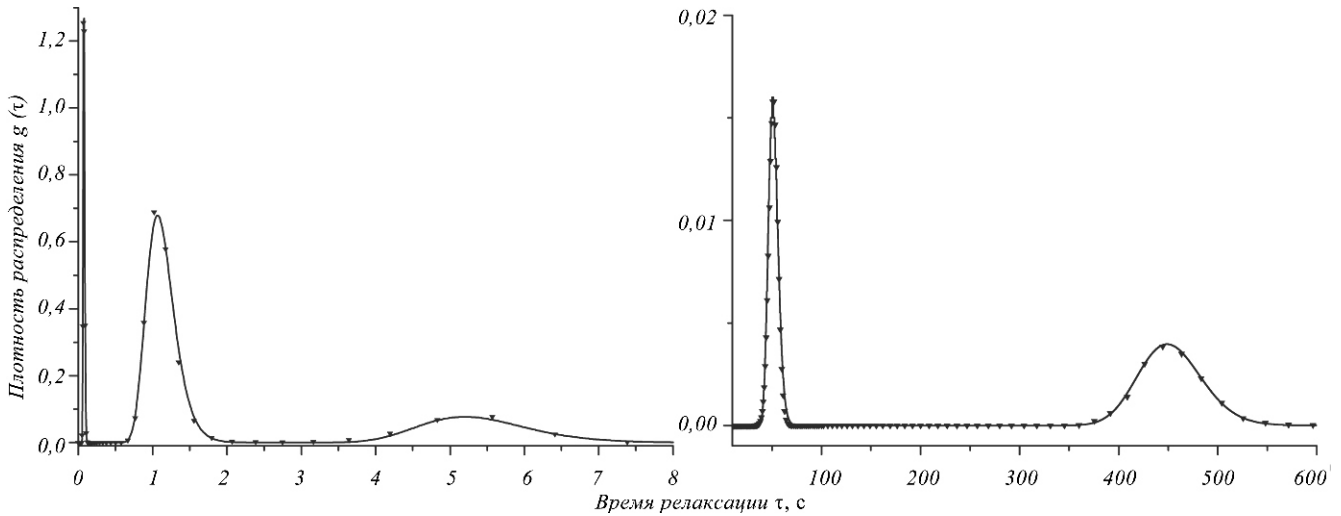


Рис. 2. Спектр времен релаксации $g(\tau)$ (см. формулу (3)); $t_{\text{exp}} = 60$ с

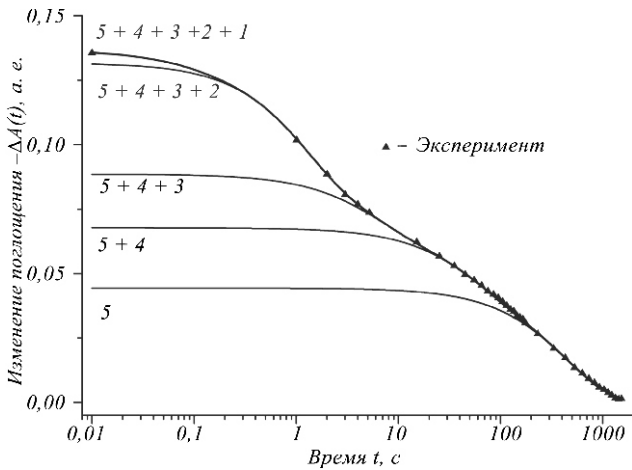


Рис. 3. Кинетика распада абсорбционных изменений после 60 с экспозиции. Кривая 5 соответствует пятой компоненте, кривая 5 + 4 – сумме 5-й и 4-й и т. д.

представить в виде суммы вкладов от каждого из полученных пиков:

$$n(t; t_{\text{exp}}) = \sum_{i=1}^5 n_i(t; t_{\text{exp}}) = \sum_{i=1}^5 n_i(0; t_{\text{exp}}) e^{-t/\tau_i} \quad (1)$$

На рис. 3 приведены компоненты $n_i(t; 60 \text{ с})$ релаксационной кривой $n(t; 60 \text{ с})$, восстановленные согласно выражению

$$n_i(t; t_{\text{exp}}) = g_i(\tau_i; t_{\text{exp}}) e^{-t/\tau_i} \quad (4)$$

где $g_i(\tau_i; t_{\text{exp}})$ – отдельные пики в распределении времен релаксации.

Результат, который мы особо хотим выделить в данной работе, представлен на рис. 4, а, где замедление релаксации с ростом t_{exp} иллюстрируется

сдвигом положения пятого пика в сторону еще больших значений, причем этот рост достаточно хорошо аппроксимируется линейной зависимостью

$$\tau_5^{\text{max}}(t_{\text{exp}}) = \tau_5^{(5)} + \tau_5^* t_{\text{exp}} \quad (5)$$

Аналогичный эффект наблюдается для 3-го, 4-го пиков и даже для «неподвижных» первого и второго, хотя и с очень малыми $\tau_{1,2}^*$ (что естественно, поскольку, как хорошо известно, первый пик соответствует фракции РЦ, неизбежно присутствующей в некотором количестве в образцах, в которой вторичный акцептор отсутствует или неактивен, и отражает, таким образом, быструю рекомбинацию с Q_A [16]. Второй же связан с долей РЦ, не претерпевшей структурных изменений при фоторазделении зарядов, и отражает релаксационный ответ РЦ на импульсное возбуждение (см. также «Обсуждение»)).

Сделаем теперь важное предположение о том, что и на стадии релаксации, т. е. после выключения света, «мгновенное» время рекомбинации $\tau_r^{(i)}(t; t_{\text{exp}})$ также следует линейному закону

$$\tau_r^{(i)}(t; t_{\text{exp}}) = \tau_r^{\text{max}}(t_{\text{exp}}) + \tau_r^{(i)}(t_{\text{exp}}) t \quad (6)$$

Если распад каждой компоненты $n_i(t; t_{\text{exp}})$ описывать уравнением

$$\frac{d n_i(t; t_{\text{exp}})}{dt} = -K_i(t; t_{\text{exp}}) n_i(t; t_{\text{exp}}) \quad (7)$$

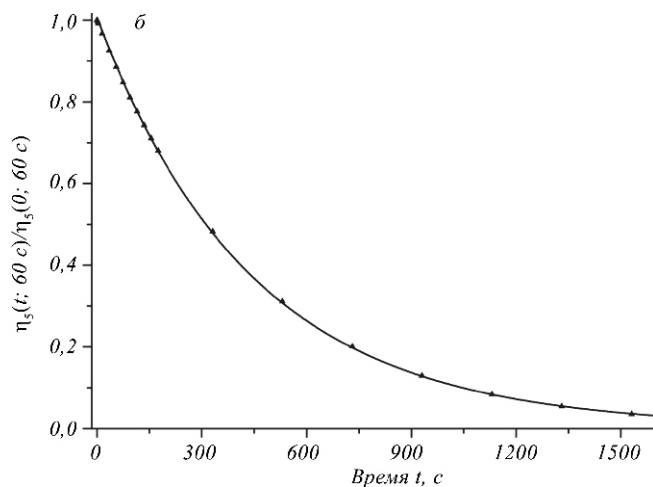
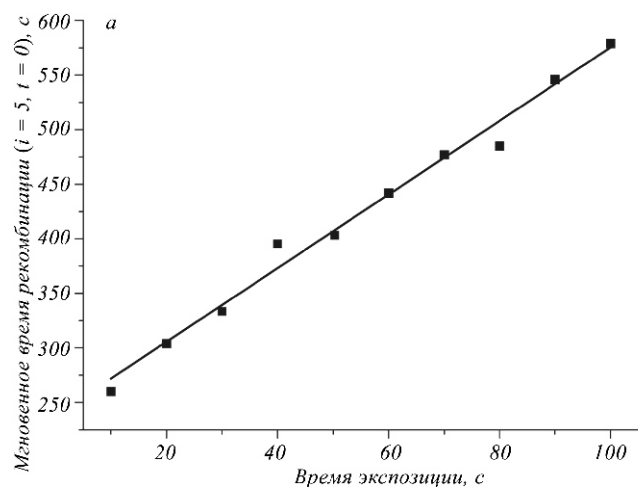


Рис. 4. Зависимость времени рекомбинации в ее начальный момент $\pi_5^{\max}(t_{\text{exp}})$ от времени экспозиции (а) и кинетика распада пятой компоненты, восстановленная по пятому пику, полученному с применением ММЭ (треугольники) и по формуле (9) (сплошная линия) (б)

в котором зависимость «константы» скорости $K_i(t; t_{\text{exp}}) \sim 1/t^{(i)}$ от времени отображает все эффекты «статического» и «динамического» разупорядочения [6] (т. е. влияния конформационных подсостояний и переходов между ними), то формула (6) означает гиперболическое убывание этой константы со временем. Тогда после интегрирования уравнения (7) находим

$$g_i(t; t_{\text{exp}}) = g_i(0; t_{\text{exp}}) \exp \int_0^t K_i(t'; t_{\text{exp}}) dt' = \frac{g_i(0; t_{\text{exp}})}{1 - \frac{i}{i^{\max}} t} \quad (8)$$

Возможность такого типа кинетики (переходящей в экспоненциальную лишь в пределе $i \rightarrow 0$) в реакциях белков отмечена еще в работах [23, 24] на двух самых популярных системах – РЦ и MbCO (см. также «Обсуждение»).

Соответствующее кинетике вида (8) аналитическое распределение времен релаксации легко найти, поскольку, согласно (4), $(1/t^2)g_i(t; t_{\text{exp}})$ есть не что иное, как лаплас-образ $K_i(t; t_{\text{exp}})$. Обратное преобразование дает [25]:

$$g_i(t; t_{\text{exp}}) = \frac{g_i(0; t_{\text{exp}})}{1 - \frac{i}{i^{\max}} t} = \frac{1}{i} \int_0^{\frac{i^{\max}}{1 - \frac{i}{i^{\max}} t}} e^{-\lambda t} d\lambda \quad (9)$$

где Γ – гамма-функция. Отметим, что распределение (9) имеет один максимум при $i^{\max} / (i - 1)$, близком к i^{\max} при $i \rightarrow 1$. Таким образом, распределение времен релаксации, полученное из полной релаксационной кривой $n(t; t_{\text{exp}})$, имеет вид

$$g(t; t_{\text{exp}}) = \sum_{i=1}^5 g_i(t; t_{\text{exp}}) = \sum_{i=1}^5 \frac{g_i(0; t_{\text{exp}})}{1 - \frac{i}{i^{\max}} t} = \sum_{i=1}^5 \frac{1}{i} \int_0^{\frac{i^{\max}}{1 - \frac{i}{i^{\max}} t}} e^{-\lambda t} d\lambda \quad (10)$$

Наложим теперь теоретическую зависимость (10) на экспериментальные результаты, проанализированные с помощью ММЭ (именно это показано сплошной кривой на рис. 2). Легко видеть, что существует очень хорошее совпадение теории с экспериментом. В таблице приведены полученные таким образом параметры всех пяти пиков распределения $g(t; 60\text{с})$.

Не менее хорошее совпадение получается и на отдельных компонентах. Так, на рис. 4, б, кинетика распада пятой компоненты восстановлена, с одной стороны, по последнему пику с максимумом ~ 450 с, а с другой – по формуле (9) с соответствующими параметрами из таблицы. Наконец, на рис. 5 (в отличие от рис. 3) представлено сравнение полученной экспериментально релаксационной кривой $n(t; 60\text{с})$ с кривой, восстановленной по формуле (3)

Параметры распределений $g_i(t; 60 \text{ с})$ вида (9) для каждого из пиков полного спектра $g(t; 60 \text{ с})$, полученного с помощью ММЭ из кинетики рекомбинации

Пик, i	$g_i(0; 60 \text{ с})$	$g_i^{\max}(60 \text{ с})$	τ_i
1	0,034	0,076	0,015
2	0,32	1,1	0,03
3	0,14	5,3	0,019
4	0,19	51,2	0,009
5	0,316	451	0,005

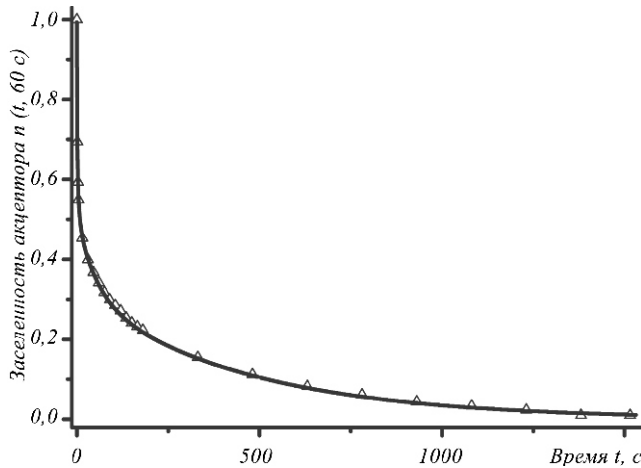


Рис. 5. Кинетика рекомбинации после освещения в течение 60с. Сплошная линия – теория, треугольниками обозначен ход экспериментальной кривой

с теоретическим распределением (10). Наблюдаемое очевидное совпадение подтверждает справедливость линейного (гиперболического) закона роста (убыли) мгновенного времени рекомбинации (константы скорости реакции) со временем (6).

Аналогичные результаты получены и при всех других экспозициях.

Наконец, сделаем еще одно важное замечание. При нормальных условиях рекомбинация электрона со вторичного хинонного акцептора обусловлена главным образом его термоактивационным забросом на первичный хинонный акцептор [16], поэтому справедливо выражение

$$K(t) = a e^{-X(t)}, \quad (11)$$

где a – постоянная; $X(t)$ – разность свободных энергий электрона на первичном и вторичном хинонных акцепторах, изменения которой отражают эво-

люцию барьера реакции. Отсюда непосредственно следует, что гиперболическая зависимость вида $K(t) = (a_0 + t)^{-1}$ приводит к логарифмическому закону изменения величины барьера реакции

$$X(t) = \ln[a_0 + t], \quad (12)$$

который также встречался в некоторых моделях структурной диффузии [26].

Обсуждение. Получение информации о структурных перестройках РЦ, сопряженных с процессами фотовозбуждения и рекомбинации электрона, на основе кинетических кривых является нетривиальной задачей и требует адекватных методов анализа экспериментальных данных.

Использованный в работе метод максимальной энтропии позволяет выделить из кинетической кривой рекомбинации электрона ее отдельные релаксационные компоненты. Как отмечалось, наблюдаемая компонента рекомбинации $g_i(t; t_{\text{exp}})$ с характерным временем $\tau_i^{\max} = 0,1 \text{ с}$ соответствует рекомбинации электрона в РЦ без вторичного хинонного акцептора. Остальные компоненты рекомбинации можно было бы легко связать с различиями в структуре РЦ, существующими изначально, если не принимать во внимание выявленные экспериментально перераспределения РЦ между компонентами (подробнее см. [22]). Если считать, что остальные компоненты рекомбинации соответствуют исходно идентичным РЦ, существенное отличие в их кинетике можно объяснить более быстрой структурной релаксацией, произошедшей на первом этапе после локализации фотомобилизованного электрона на вторичном хинонном акцепторе. Такая релаксация должна приводить к появлению трех фракций РЦ, обладающих различными структурными деформациями (состояниями) и проявляющихся в виде соответствующих компонент $g_i(t; t_{\text{exp}})$, $i = 3, 4, 5$, которые при экспозиции 60 с имеют характерные времена $\tau_3^{\max} = 5 \text{ с}$, $\tau_4^{\max} = 50 \text{ с}$, $\tau_5^{\max} = 450 \text{ с}$ (см. рис. 2), отличающиеся на порядок.

Процессы релаксации, вызывающие появление подобных состояний, следуя работам [11, 12], можно считать релаксацией верхнего уровня и связать с локальными перестройками структуры РЦ вблизи мест локализации разделенных зарядов. По-види-

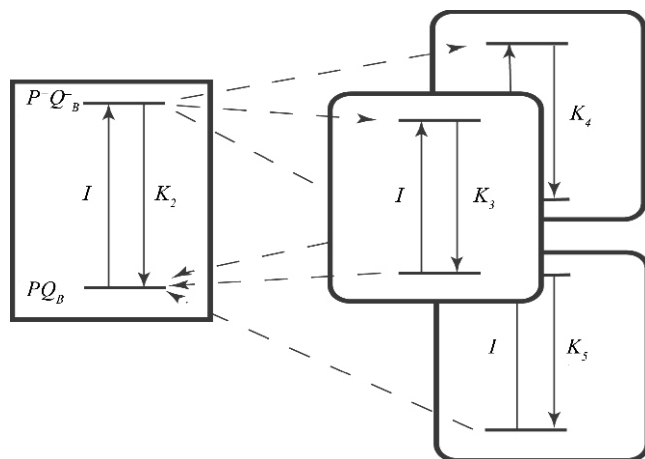


Рис. 6. Схема образования структурно-деформированных состояний 3, 4, 5

тому, медленную структурную релаксацию более низкого уровня для образовавшихся таким образом фракций РЦ мы и наблюдаем экспериментально. Логарифмическую зависимость барьера реакции рекомбинации электрона, отвечающую найденным линейным зависимостям обратной скорости рекомбинации, логично отнести к медленной неспецифической релаксации периферийных участков глобулы макромолекулы [7, 26], характерной для релаксационных процессов в стеклоподобных матрицах.

Изложенное выше можно представить в виде схемы на рис. 6, где каждая из четырех двухуровневых (электрон на доноре или на акцепторе) электронных схем соответствует своему структурному состоянию. Структурное состояние 2 отвечает структуре РЦ с электроном на доноре (т. е. является «темноадаптированным») и после попадания фотовозбужденного электрона на акцептор инициирует структурные изменения, приводящие к переходу РЦ к одному из структурных состояний 3–5. Пополнение РЦ в состоянии 2 происходит за счет РЦ из этих фракций после рекомбинации фотовозбужденного электрона. Таким образом, «темноадаптированное» состояние 2 имеет выраженную динамическую природу (см. также [24]). Распределение времен рекомбинации для этой структуры не зависит от экспозиции фотовозбуждения, имеет максимум при $\frac{\max}{2} \approx 1$ с и форму, хорошо описываемую выражением (9). Отсутствие зависимости положения пика «темноадаптированного» состояния от времени фотовозбуждения можно пояснить тем об-

стоятельством, что электрон в нем быстро рекомбинирует и структура остается в исходном состоянии, соответствующем положению электрона на доноре.

Эти соображения можно также частично применить к структурному состоянию 3, зависимость максимума распределения которого $\frac{\max}{3}$ от времени экспозиции слабо выражена. Структурные состояния 4, 5 и частично 3, образованные в результате релаксации верхнего уровня, продолжают релаксировать согласно характерному для систем в стеклоподобной матрице закону (12), причем время возврата структуры в «темноадаптированное» состояние, по-видимому, зависит от «глубины деформации», что приводит к сильной зависимости $\frac{\max}{i}$ от времени экспозиции для состояний 4 и, в особенности, 5, но слабой – для состояния 3. Другими словами, РЦ после рекомбинации электрона в состояниях 4, 5 в среднем не успевают релаксировать в «темноадаптированное» состояние до момента повторного фотовозбуждения. Для состояния 3 характерное время рекомбинации намного меньше, и эта зависимость является выраженной слабо. Заметим, что похожие соображения использованы нами ранее при моделировании «свето»- и «темноадаптированных» РЦ в условиях продолжительной фотоактивации [19–21].

Выводы. Предложенная выше схема электронно-конформационных переходов в РЦ позволяет, исходя из полученных экспериментальных данных, выделить в исследуемом процессе фотовозбуждения следующие составные части.

1. Переход электрона с донора на финальный хинонный акцептор, скорость которого $K_i(0; t_{\text{exp}})$ в любой момент фотовозбуждения t_{exp} для каждого РЦ зависит от его структурного состояния i .

2. Относительно быстрый процесс релаксации РЦ с электроном на акцепторе из «темнового» (динамического) структурного состояния 2 в одно из структурных состояний верхнего уровня 3, 4, 5, которому, по-видимому, соответствует минимум свободной энергии системы, достигаемый за времена, в нашем эксперименте не фиксируемые.

3. Медленные процессы дальнейшей релаксации РЦ с электроном на акцепторе и в i -м структурном состоянии происходят согласно характерному

для систем в стеклоподобной матрице закону (12), что, по-видимому, соответствует релаксации периферийных участков белковой глобулы РЦ, сопровождающих более быструю (локальную) релаксацию верхнего уровня.

Следует отметить, что предложенная в работе схема является упрощенной и не учитывает детального характера перехода РЦ между структурными состояниями верхнего уровня, которые могут проявляться при различной интенсивности фотовозбуждения. Так, при значительно меньшей интенсивности фотовозбуждения мы наблюдали появление нового структурного состояния РЦ вследствие бифуркации [22], что может быть связано со взаимодействием релаксационных процессов различных уровней.

Работа частично выполнена в рамках целевой темы «Фундаментальные свойства физических систем в экстремальных условиях» ОФА НАН Украины.

V. N. Kharkyanen, Yu. M. Barabash, N. M. Berezetskaya, M. V. Olenchuk, P. P. Knox, L. N. Christophorov

Deceleration of the electron transfer reaction in the photosynthetic reaction centre as a manifestation of its structure fluctuations

Summary

Aim. To extract information on the nature of protein structural relaxation from the kinetics of electron transfer reaction in the photosynthetic reaction centre (RC). **Methods.** The kinetic curves obtained by absorption spectroscopy are processed by a maximum entropy method to get the spectrum of relaxation times. **Results.** A series of distinctive peaks of this spectrum in the interval from 0.1 s to hundreds of seconds is revealed. With the time of exposure of the sample to actinic light increasing, the positions of the peak maxima grow linearly. **Conclusions.** Theoretical analysis of these results reveals the formation of several structural states of the RC protein. Remarkably, in each of these states the slow reaction kinetics follow the same fractional power law that reflects the glass-like properties of the protein.

Keywords: protein structure relaxation, nonexponential kinetics, time-dependent reaction barrier, primary reactions of photosynthesis.

V. M. Харкянен, Ю. М. Барабаш, Н. М. Березецька, М. В. Оленчук, П. П. Нокс, Л. М. Христофоров

Уповільнення реакції перенесення електрона у фотосинтетичному реакційному центрі як прояв флукутацій його структури

Резюме

Мета. Визначити характер структурної релаксації білка з аналізу кінетики реакції електронного транспорту у фотосинтетичному реакційному центрі (РЦ). **Методи.** Кінетичні кри-

ві, одержані з використанням абсорбційної спектроскопії, обробляли методом максимальної ентропії для отримання спектра часів релаксації. **Результати.** Знайдено низку характерних піків цього спектра в інтервалі від 0,1 до сотень секунд. Зі збільшенням тривалості експозиції зразка в активному світлі положення максимумів піків лінійно зростають. **Висновки.** З теоретичного аналізу результатів випливає, що виникає декілька структурних станів білкового компонента РЦ, у яких, однак, повільна кінетика реакції підпорядкована одному й тому ж дрібно-ступеневому закону, що відбиває склоподібні властивості білка.

Ключові слова: структурна релаксація білка, неекспоненційна кінетика, змінний бар'єр реакції, первинні реакції фотосинтезу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Karplus M. Aspects of protein reaction dynamics: Deviations from simple behavior // J. Phys. Chem.—2000.—**104**, N 1.—P. 11–27.
2. Agmon N., Doster W., Post F. The transition from inhomogeneous to homogeneous kinetics in CO binding to myoglobin // Biophys. J.—1994.—**66**, N 5.—P. 1612–1622.
3. Jackson T. A., Lim M., Anfinsen P. A. Complex nonexponential relaxation in myoglobin after photodissociation of MbCO: measurement and analysis from 2 ps to 56 s // Chem. Phys.—1994.—**180**, N 2–3.—P. 131–140.
4. Goushcha A. O., Dobrovolskii A. A., Kapoustina M. T., Privalko A. V., Kharkyanen V. N. New physical phenomenon of dynamical self-organization in molecular electron transfer systems // Phys. Lett. A.—1994.—**191**, N 5–6.—P. 393–397.
5. Abgaryan G. A., Christophorov L. N., Goushcha A. O., Holzwarth A. R., Kharkyanen V. N., Knox P. P., Lukashev E. A. Effects of mutual influence of photoinduced electron transitions and slow structural rearrangements in bacterial photosynthetic reaction centers // J. Biol. Phys.—1998.—**24**, N 1.—P. 1–17.
6. Zwanzig R. Rate processes with dynamic disorder // Acc. Chem. Res.—1990.—**23**, N 5.—P. 148–152.
7. Plonka A. Dispersive kinetics // Ann. Rep. Progr. Chem. C.—2001.—**97**, N 1.—P. 91–147.
8. Agmon N. Conformational cycle of a single working enzyme // J. Phys. Chem. B.—2000.—**104**, N 32.—P. 7830–7834.
9. Christophorov L. N., Kharkyanen V. N. Discrete versus continuous schemes of conformational regulation // Chem. Phys. Res. J.—2007.—**1**, N 1.—P. 1–14.
10. Frauenfelder H., Wolynes P. G., Austin R. H. Biological physics // Rev. Mod. Phys.—1999.—**71**, N 2.—P. S419–S430.
11. Palmer R. G., Stein D. L., Abrahams E., Anderson P. W. Models of hierarchically constrained dynamics for glassy relaxation // Phys. Rev. Lett.—1984.—**53**, N 10.—P. 958–961.
12. Berlin Yu. A., Burin A. L., Siebbeles L. D. A., Ratner M. A. Conformationally gated rate processes in biological macromolecules // J. Phys. Chem. A.—2001.—**105**, N 23.—P. 5666–5678.
13. Frauenfelder H., Wolynes P. G. Biomolecules: Where the physics of simplicity and complexity meet // Phys. Today.—1994.—**47**, N 2.—P. 58–64.
14. Sokolov I. M., Klafter J., Blumen A. Fractional kinetics // Phys. Today.—2002.—**55**, N 11.—P. 48–54.
15. Berlin Yu. A., Fisher S. F., Chekunaev N. I., Goldanskii V. I. Non-exponential non-Arrhenius relaxation in the course of CO rebinding to heme proteins // Chem. Phys.—1995.—**200**, N 3.—P. 369–385.

16. Hoff A. J., Deisenhofer J. Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria // Phys. Rep.–1997.–**287**, N 1–2.–P. 1–247.
17. Stowell M. H. B., McPhillips T. M., Rees D. S., Soltis S., Abresh E., Feher G. Light-induced structural changes and the mechanism of electron/proton transfer in the photosynthetic reaction center // Science.–1997.–**276**, N 5313.–P. 812–816.
18. Okamura M. Y., Feher G. Proton transfer in reaction centers from photosynthetic bacteria // Ann. Rev. Biochem.–1992.–**61**, N 1.–P. 861–896.
19. Barabash Yu. M., Berezetskaya N. M., Christophorov L. N., Goushcha A. O., Kharkyanen V. N. Effects of structural memory in protein reactions // J. Chem. Phys.–2002.–**116**, N 10.–P. 4339–4352.
20. Goushcha A. O., Manzo A. J., Scott G. W., Christophorov L. N., Knox P. P., Barabash Yu. M., Kapoustina M. T., Berezetska N. M., Kharkyanen V. N. Self-regulation phenomena applied to bacterial reaction centers. Nonequilibrium adiabatic potential: dark and light conformations revisited // Biophys. J.–2003.–**84**, N 2.–P. 1146–1160.
21. Christophorov L. N., Kharkyanen V. N. Synergetic mechanisms of structural regulation of the electron transfer and other reactions of biological macromolecules // Chem. Phys.–2005.–**319**, N 1–3.–P. 330–341.
22. Lukashev E. P., Knox P. P., Rubin A. B., Olenchuk M. V., Barabash Yu. M., Berezetskaya N. M., Kharkyanen V. N. The analysis of the kinetics of dark recombination of photodivided charges in the *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction centers using the method of relaxation time constant distribution // Biofizika.–2009.–**54**, N 3.–P. 296–301.
23. Austin R. H., Beeson K., Eisenstein L., Frauenfelder H., Gunsalus I. C., Marshall V. P. Activation energy spectrum of a biomolecule: Photodissociation of carbonmonoxy myoglobin at low temperatures // Phys. Rev. Lett.–1974.–**32**, N 8.–P. 403–405.
24. Kleinfeld D., Okamura M. Y., Feher G. Electron transfer kinetics in photosynthetic reaction centers cooled to cryogenic temperatures in the charge-separated states: Evidence for light-induced structural changes // Biochemistry.–1984.–**23**, N 24.–P. 5780–5786.
25. Bateman H., Erdelyi A. Tables of integral transforms.–New-York: McGraw-Hill Inc., 1954.–Vol. 1.–343 p.
26. Berlin Yu. A., Siebbeles L. D. A. Energy relaxation during thermally activated diffusion along one-dimensional chains with site disorder // Chem. Phys. Lett. –1998.–**291**, N 1–2.–P. 85–93.

УДК 577.355

Поступила в редакцию 11.01.10