

## Медленная конформационная динамика фотовозбужденных реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides* при различных температурах

М. Т. Капустина, Ю. М. Барабаш, А. О. Гуша, М. В. Оленчук, В. Н. Харкянен

Институт физики НАН Украины  
Пр. Науки, 46, Киев, 03046, Украина

*Экспериментально изучена кинетика оптического поглощения реакционных центров (РЦ) ( $\Delta A$ ) при различных временах фотоактивации (от 1 до 400 с) и двух температурах ( $T_1 = 3$  и  $T_2 = 22$  °С). Для кратковременной экспозиции (1 с) кинетика  $\Delta A$  совпадает для «теплых» и «холодных» образцов. С увеличением времени экспозиции при  $T_2 = 22$  °С РЦ успевают претерпеть существенные конформационные изменения и кинетика их темновой релаксации становится значительно медленнее, чем у «холодных» РЦ. При дальнейшем увеличении времени экспозиции (300 с) ситуация меняется на противоположную. Для качественного описания полученных результатов использовали обобщенные уравнения Фоккера-Планка для двухуровневой системы. В нашей модели учитывали температурную зависимость двух параметров: диффузии системы в профиле структурного потенциала и скорости переноса между акцепторами. Результаты компьютерного моделирования хорошо согласуются с экспериментальными результатами.*

**Введение.** Экспериментальные исследования, весьма интенсивно развивающиеся в последние десятилетия, позволили установить, что перенос элементарных зарядов в биомолекулярных системах и сопряженные с ним конформационные перестройки в белково-мембранных макромолекулярных комплексах составляют основу энергообеспечения клеток организмов на молекулярном уровне.

Реакционный центр (РЦ) фотосинтезирующих бактерий является интегральным белковопигментным комплексом, способным в фотовозбужденном состоянии к первичному разделению зарядов. Трансформация энергии в фотосинтезе осуществляется, когда энергия электронного возбуждения, мигрируя по светособирающей антенне, захватывается фотоактивным пигментом РЦ. Реакционный центр можно представить в виде некоторой сложной белковой матрицы со встроенными в нее молекулами (редокс-кофакторами), проявляющими до-

нор-акцепторные свойства относительно фотовозбужденных электронов. Фотовозбужденный электрон с донора — димера бактериохлорофилла *P* по цепочке промежуточных акцепторов переносится на расстояние ~3—4 нм на первичный хинонный акцептор  $Q_A$ , а затем стабилизируется на вторичном хинонном акцепторе  $Q_B$ , создавая разность потенциалов на фотосинтетической мембране (рис. 1).

Экспериментальные свидетельства эффективности переноса электрона в РЦ, выполненные в широком температурном интервале, позволяют считать, что собственно электронный перенос представляет собой туннелирование электрона между донор-акцепторными парами (редокс-кофакторами) [1]. Согласно теории Маркуса, скорость прямого электронного переноса между двумя молекулами зависит от трех факторов: перекрытия электронных плотностей (волновых функций) двух молекул; разницы редокс-потенциалов молекул и величины энергии реорганизации, т. е. энергии, необходимой для перестройки молекулы при потере или присое-

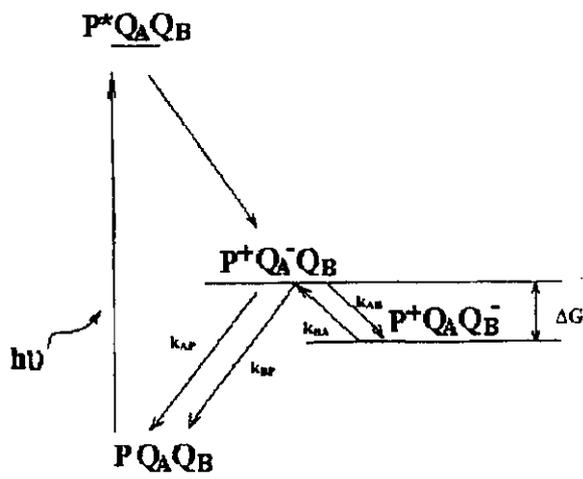


Рис. 1. Схема электронных уровней фотосинтетических реакционных центров (РЦ).  $PQAQB$  и  $P^*QAQB$  — основное и фотовозбужденное состояния первичного электронного донора;  $P^+QAQB^-$  и  $P^+QAQB$  — состояния с электроном, локализованным соответственно на первичном и вторичном хинонном акцепторах. Промежуточные короткоживущие состояния на рисунке не указаны. Стрелками показаны возможные электронные переходы между состояниями. Для РЦ *Rb. sphaeroides*  $k_{AP} \approx 10$ ,  $k_{BP} \leq 0,1$ ,  $k_{AB} \approx 10^4$ ,  $k_{BA} \approx 10^3$  с (два последних значения даны для «темно»-адаптированного состояния РЦ);  $\Delta G$  — разность свободной энергии между уровнями  $P^+QAQB^-$  и  $P^+QAQB$ .

динении электрона [2, 3]. Многочисленные эксперименты на модельных системах убедительно показали, что на реакционную способность и эффективность взаимодействия редокс-компонентов фотосинтетических электронно-транспортных цепей решающее влияние оказывает их окружение [4, 5]. Оно определяет расстояния между реагентами, их необходимую ориентацию, полярность и другие детали молекулярной организации среды, контролирующей направленность и скорости переноса электрона. В природных комплексах РЦ роль этого окружения выполняет белок. Однако вплоть до недавнего времени считалось, что фотосинтетические белки, в основном, выполняют только функцию носителя связанных с ним редокс-кофакторов, эффективность переноса между которыми регулируется главным образом высокочастотными внутримолекулярными колебаниями самих переносчиков, акцептирующими часть энергии переносимого электрона. Дальнейшее развитие исследований, особенно стимулированное изучением температурных зависимостей электронно-транспортных процессов в РЦ, показало, что адекватная физическая картина функционирования этих комплексов мо-

жет быть получена только при учете низкочастотных движений белка [11, 17]. Значение последних при этом значительно шире, чем просто возможность внесения определенного, пусть даже существенного, вклада в процессы диссипации части энергии при стабилизации переносимого электрона на редокс-кофакторах. Вполне возможно, что динамическая организация фотосинтетических РЦ служит основой для реализации конкретных реакционноспособных состояний системы, эффективно контролирующей ее функциональную активность.

Недавние исследования показали, что пребывание электрона на каждом хинонном акцепторе приводит к изменениям в структуре РЦ, которые могут накапливаться и сохраняться длительное время [7, 12, 22]. Конформационные изменения в свою очередь влияют на эффективность туннелирования электрона. Существование такой обратной связи неизбежно вызывает самосогласованное поведение фотоактивированных электронов и структуры макромолекулы, что приводит к нелинейным эффектам в процессе фотоактивации РЦ [6, 8, 13, 23]. В частности, медленные конформационные перестройки, вызванные локализацией фотоэлектрона на хинонном акцепторе, способствуют стабилизации редокс-состояния,  $P^+QAQB^-$ , стимулируя одновременно переход структуры макромолекулы из «темно»-адаптированного в новое, «светло»-адаптированное, состояние со значительно большим временем жизни фоторазделенных зарядов [23]. Сосуществование двух функционально разных состояний в определенном интервале интенсивностей фотоактивации приводит к экспериментально наблюдаемому гистерезису в оптическом поглощении РЦ [6, 8, 9], а также к возможности управления заселенностью одного из двух состояний последовательным переключением интенсивности возбуждающего света между двумя уровнями [10].

Характерные времена конформационных перестроек, влияющие на кинетику электронного транспорта через макромолекулу, зависят от структуры макромолекулы и температуры среды. Температурные зависимости электронного транспорта — это важнейшие зависимости, позволяющие охарактеризовать эволюцию системы и установить роль медленной конформационной динамики в формировании устойчивых состояний макромолекулы. В настоящей работе приведены результаты изучения температурной зависимости скоростей прямой и обратной реакции  $PQAQB \rightleftharpoons P^+QAQB^-$  в РЦ и показано, что учет электрон-конформационного взаимодействия и медленных структурных мод позволяет адекватно описать функционирование РЦ при различных температурах. Эта работа дополняет наши

предыдущие исследования по нелинейной динамике РЦ, объясняя в рамках простой и очевидной модели влияние температуры на медленную компоненту в кинетике формирования и распада состояния  $P^+Q_AQ_B^-$  путем учета в явном виде зависимости коэффициента диффузии функции распределения РЦ по электронным и структурным переменным от температуры.

**Материалы и методы.** Фотовозбуждение димера бактериохлорофилла и последующий уход фотовозбужденного электрона на акцепторы сопровождаются характерными изменениями спектра поглощения РЦ, в частности, выцветанием полосы поглощения димера  $P$  в области  $\lambda = 850\text{--}870$  нм. После возврата электрона на димер спектр поглощения восстанавливается [14].

В настоящей работе методом оптической спектроскопии исследована кинетика изменения коэффициента поглощения РЦ при образовании фотокислородного состояния пигмента  $P$  под воздействием активирующего света разной длительности и кинетика распада этого состояния после выключения света.

**Образцы.** Исследования проводили с РЦ, изолированными с использованием детергента LDAO из бактерий *Rb. sphaeroides* (wild type) по методике, описанной ранее в работе [15].

**Экспериментальная установка.** Исследования осуществляли на программно-аппаратном комплексе, созданном на базе ПК IBM со встроенной платой системы сбора цифровой и аналоговой информации (ЕТ-1050, Институт физики полупроводников НАН Украины). Комплекс состоит из оптического блока, блока питания и блока предварительной обработки сигналов с цифровой индикацией результатов измерения. Комплекс позволяет измерять оптическое поглощение растворов и суспензий в диапазоне величин  $(10^{-3}\text{--}1) \pm 0,002$  при длине волны  $\lambda = 865 \pm 20$  нм, а также проводить кинетические исследования с временным разрешением от 1 мс до минут.

Источником тестирующего света служит светодиод, обеспечивающий среднюю интенсивность  $I_{\text{вст}} = 0,3$  мВт/см<sup>2</sup> с частотой 5 кГц. Дополнительную подсветку осуществляли набором из четырех инфракрасных светодиодов с максимальной мощностью 50 мВт каждый при  $\lambda = 865$  нм. Среднюю интенсивность дополнительной подсветки можно регулировать в диапазоне от 0 до 5 мВт/см<sup>2</sup> (200 градаций) на линейной (или логарифмической) шкале в соответствии с программным обеспечением и требованиями эксперимента. В качестве детекторов оптического излучения использованы кремниевые фотодиоды. В оптическом блоке размещается

также канал измерения температуры образца. В качестве термодатчика использовали кремниевый диод КД-524. Точность установления и поддержания температуры образца составляла 0,5 °С. Блок предварительной обработки сигналов обеспечивает формирование напряжений для светодиодов оптического блока, основное усиление сигналов с выходов измерительных каналов оптического блока, цифровое деление сигналов измерительных каналов прошедшего и тестирующего света, логарифмирование результата деления, стабилизацию величины тестирующего света. Блок обеспечивает цифровую индикацию величины возбуждающего света, отношения прошедшего света к тестируемому, величины поглощения раствора, температуры окружающей среды, ручное управление режимом эксперимента.

**Методы.** Исследовали кинетику изменения поглощения РЦ при  $\lambda = 865$  нм после включения активирующей подсветки РЦ и ее поддержания на постоянном уровне, а также кинетику релаксации фотовозбужденного состояния РЦ после прекращения световой активации при двух температурах,  $T_1 = 3$  и  $T_2 = 22$  °С. Время экспозиции  $\tau_{\text{exp}}$  варьировали от 0,4 до 1000 с.

Константа скорости фотоактивации РЦ с образованием состояния  $P^+Q_AQ_B^-$  зависит от скорости переноса фотовозбужденного электрона с пигмента на вторичный хинонный акцептор через цепочку промежуточных акцепторов и от вероятности попадания кванта света на пигмент, т. е. интенсивности активирующего света. Лимитирующим участком в этой цепи является собственно фотовозбуждение РЦ, интенсивность которого в условиях эксперимента составляет обычно от 0,3 до 100 с<sup>-1</sup>, в то время как скорости промежуточных переходов имеют значения на разных участках от 10<sup>6</sup> до 10<sup>10</sup> с<sup>-1</sup> [5]. В настоящей работе использовали фотовозбуждение РЦ с интенсивностью, близкой к 2 с<sup>-1</sup> (примерно 2 мВт/см<sup>2</sup> при  $\lambda = 865$  нм).

**Результаты.** Экспериментальные кривые изменения поглощения РЦ при возбуждении прямоугольными импульсами различной длительности представлены на рис. 2. Увеличение времени экспозиции  $\tau_{\text{exp}}$  приводило к замедлению кинетики рекомбинации после прекращения фотоактивации, причем эта зависимость одинаково ярко проявлялась для обоих температурных режимов. Подобный эффект отмечен многими авторами (см., например, [16, 24, 25]) и часто объяснялся открытием нефункционального канала переноса электрона при достаточно больших временах экспозиции [16, 17].

Наши недавние исследования показали, что медленная компонента в релаксации фотовозбуж-

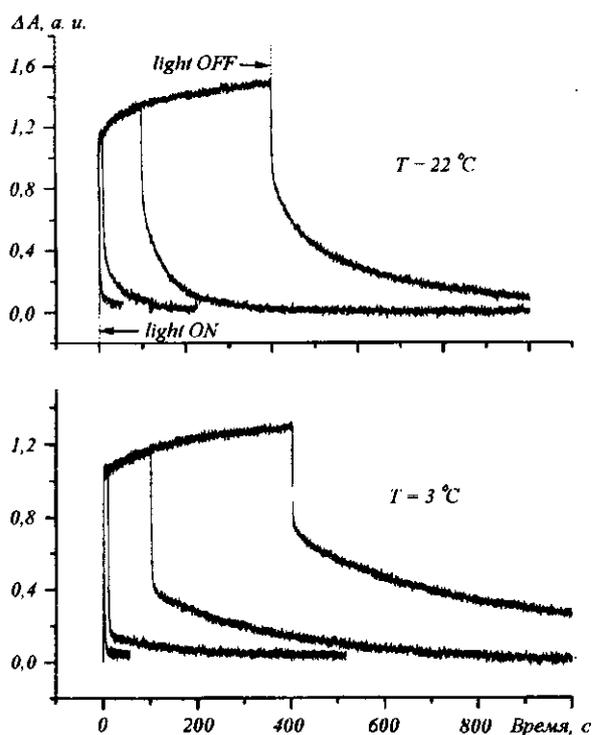


Рис. 2. Изменение оптического поглощения реакционных центров *Rb. sphaeroides* при фотоактивации прямоугольными импульсами различной длительности ( $I = 3 \text{ мВ/см}^2$ ) и последующей темновой релаксации для «теплых» ( $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ) и «холодных» ( $3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) образцов

денных РЦ — это естественное следствие динамических свойств открытой биомолекулярной системы [10, 23], а не артефакт, возникающий вследствие разветвления реакции транспорта электронов на «нефункциональный» канал. Далее мы проанализируем медленную компоненту в кривых выцветания и восстановления поглощения РЦ (рис. 2) в рамках динамической модели с учетом диффузии функции распределения РЦ по конфигурационной координате.

Рассмотрим вначале кривые нарастания сигнала после начала фотоактивации и сравним их характеристики для разных температур.

На первом этапе после начала фотоактивации в РЦ устанавливается квази-равновесное распределение электронов по уровням локализации на редокс-кофакторах, которому соответствует начальное быстрое изменение поглощения  $\Delta A$  (рис. 2). Целесообразно предположить, что на этом этапе медленные структурные изменения еще не вносят заметного вклада в динамику системы. Скорость

обратного перехода электрона со вторичного хинонного акцептора на донор в условиях отсутствия медленных структурных изменений макромолекулы равна примерно  $1 \text{ с}^{-1}$  [17]. Учитывая соотношение скоростей прямой и обратной реакции, можно считать, что первый этап длится примерно 1 с.

Изменение  $\Delta A$  на первом этапе слабо зависит от температуры, поэтому для большей наглядности дальнейшего анализа графики кривых нарастания сигнала построены с нормировкой на значение  $\Delta A$  в момент времени  $t = 1 \text{ с}$  после начала засветки (рис. 3). Это позволяет наглядно сравнить медленную фазу нарастания сигнала для обеих температур.

Вслед за быстрой фазой изменения  $\Delta A$  при длительных экспозициях фотовозбуждения начинается медленное увеличение интенсивности сигнала. Этот медленный процесс связан со структурной

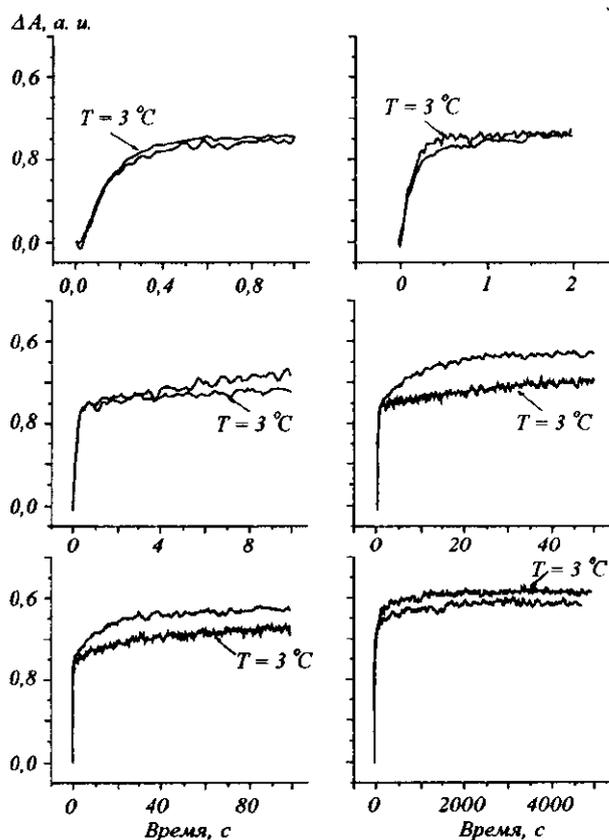


Рис. 3. Сравнение изменений оптического поглощения реакционных центров в процессе фотоактивации прямоугольными импульсами различной длительности ( $I = 3 \text{ мВ/см}^2$ ) для «теплых» ( $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ) и «холодных» ( $3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) образцов

перестройкой макромолекулы и, как мы предполагаем, именно он вызывает увеличение времени жизни макромолекулы в возбужденном (зарядово-разделенном) состоянии [18]. При комнатной температуре медленная компонента в кинетике выцветания появлялась при меньших  $\tau_{\text{exp}}$ , чем при  $T = 3^\circ\text{C}$ , а при достаточно длительных засветках ( $\tau_{\text{exp}} > 10$  с) время жизни состояния  $P^+$  резко увеличивалось, так что дальнейшее увеличение времени экспозиции уже не влияло на рост сигнала (сравните кривые на рис. 3, в и г). При температуре  $3^\circ\text{C}$  выход сигнала на стационарное значение продолжался значительно дольше, чем при комнатной температуре.

Рассмотрим кривые кинетики рекомбинации электрона из состояния  $P^+Q_AQ_B^-$ . На рис. 4 представлены нормированные на максимальное значение релаксационные кривые для нескольких значений  $\tau_{\text{exp}}$  фотовозбуждения. При  $\tau_{\text{exp}} = 1$  с кривые для разных температур практически совпадают. По мере увеличения времени экспозиции восстановление поглощения РЦ происходит гораздо медленнее при  $T = 22^\circ\text{C}$ , чем при  $T = 3^\circ\text{C}$ , так как при  $T = 22^\circ\text{C}$  большой процент РЦ успевает претерпеть структурные изменения за время действия фотоактивации, в то время как при  $T = 3^\circ\text{C}$  диффузия замедлена и большая часть РЦ имеет первоначальную («темную») конформацию по окончании действия активации. Наибольший эффект в различии кинетики рекомбинации при разных температурах наблюдается при экспозициях 10–50 с (рис. 4, б). С дальнейшим увеличением  $\tau_{\text{exp}}$  (~100–200 с) восстановление поглощения происходит со сравнимыми скоростями при обеих температурах (рис. 4, в). При еще более длительных засветках релаксация фотовозбужденного состояния при  $T = 3^\circ\text{C}$  оказывается значительно медленнее, чем при комнатных температурах (рис. 4, г).

**Обсуждение результатов.** Процессы конформационной перестройки белковой макромолекулы сопровождаются движениями отдельных фрагментов белковой цепи и несут диффузионный характер. Структурные изменения требуют преодоления потенциальных барьеров, что соответствует переходам между отдельными конформационными подсостояниями с разными значениями структурной координаты  $x$ , которая в общем случае может быть выбрана в зависимости от специфики решаемой задачи. Движение фрагмента белка определяется конформационным потенциалом  $U(x)$ , перемещение вдоль которого связано со структурной деформацией системы.

Упрощенная схема процесса переноса фотомобилизованного электрона в РЦ с двумя хинонными

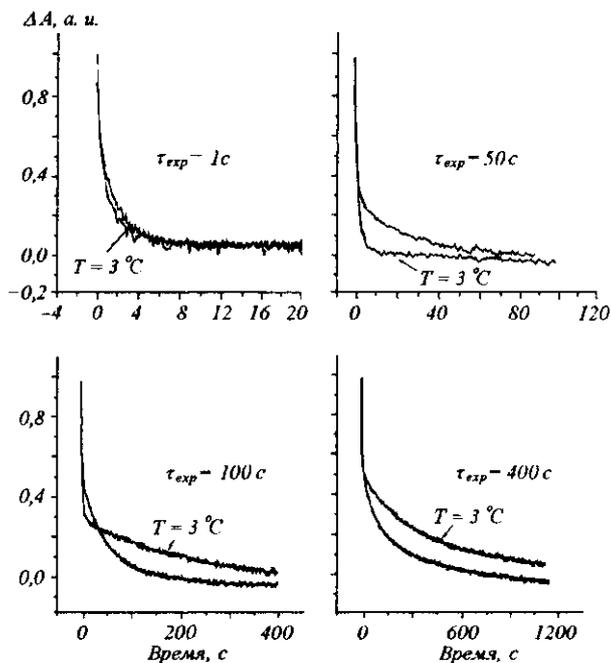
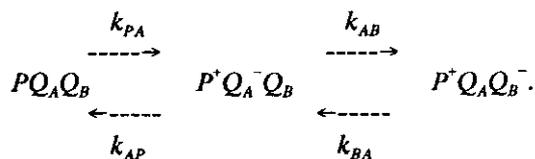


Рис. 4. Сравнение изменений оптического поглощения реакционных центров в процессе темновой рекомбинации после различной длительности фотоактивации ( $I = 3$  мВ/см<sup>2</sup>) для «теплых» ( $22^\circ\text{C}$ ) и «холодных» ( $3^\circ\text{C}$ ) образцов

акцепторами (в пренебрежении промежуточными короткоживущими состояниями) имеет вид



При включении фотоактивации в системе начинает изменяться заселенность донора и хинонных акцепторов, причем скорость и характер этого процесса зависит от значений скоростей переходов между кофакторами. Напомним, что за счет взаимодействия фотоэлектрона с очень быстрыми тепловыми колебаниями атомов (времена релаксации  $\sim 10^{-13}$ – $10^{-11}$  с), которые служат для него термостатом, квантовое движение электрона, описываемое волновой функцией, становится полуклассическим и описывается неравновесной матрицей плотности. В силу длительной локализации электрона на отдельных кофакторах движение электрона можно считать марковским, а соответствующая система уравнений для диагональных компонент матрицы плотности (в нашем случае — населенностей кофакторов) принимает балансный вид.

Для одновременного описания стохастического движения фрагментов белковой макромолекулы в потенциальном профиле структурных переменных и туннельных переходов электрона между различными местами локализации (этот процесс носит марковский характер) целесообразно использовать прямые уравнения Колмогорова:

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

$$\begin{aligned} \frac{\partial P_B(t, x)}{\partial t} &= \hat{L}_B P_B(t, x) - k_{BA} P_B(t, x) + \\ &+ k_{AB}(x) P_A(t, x) - k_{BP} P_B(t, x); \\ \hat{L}_i &= D \cdot \frac{\partial}{\partial x} \left[ \frac{1}{K_b T} \frac{\partial U_i(x)}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial x} \right], \end{aligned} \quad (2)$$

где  $P_i(t, x)$  определяет вероятность нахождения электрона на  $i$ -м месте связывания ( $i = P, A, B$ , здесь  $A, B$  означают локализацию на первичном или вторичном акцепторе;  $P$  — на димере бактериохлорофилла) и одновременно нахождение РЦ в некоторой структурной конфигурации, соответствующей координате  $x$ .  $U(x)$  — конформационный потенциал системы;  $D$  — коэффициент конформационной диффузии;  $k_{ij}$  — скорости перехода электрона с  $i$ -го на  $j$ -е место связывания;  $k_{PA}$  пропорционально интенсивности действующего света  $I$ ;  $k_{AP}$  можно считать константой, поскольку при используемых нами интенсивностях фотоактивации конформационная координата  $x$  слабо изменяется при изменении заселенности состояния  $P^+Q_A^-Q_B$  [23]. Значение этой константы легко находится экспериментально [17].

Квази-равновесная константа скорости реакции переноса электрона между хинонными акцепторами определяется, как

$$K_{AB} = k_{AB}/k_{BA} = \exp(\Delta G/k_B T), \quad (3)$$

где  $\Delta G$  — это разность энергий между уровнями  $P^+Q_A^-Q_B$  и  $P^+Q_A Q_B^-$ ;  $k_B$  — постоянная Больцмана;  $T$  — абсолютная температура.

Коэффициент конформационной диффузии резко возрастает с ростом температуры и в общем случае может быть записан в виде

$$D(T) = D_0(T) \cdot \exp(-w/k_B T), \quad (4)$$

где  $D_0(T)$  — коэффициент пропорциональности, зависящий линейно от температуры;  $w$  — энергия активации конформационных движений.

При изменении температуры основную роль в изменении  $D(T)$  играет экспоненциальная зависимость, поэтому в дальнейшем, учитывая небольшой диапазон исследуемых температур, мы будем пренебрегать зависимостью  $D_0$  от температуры.

Ранее в наших работах показано, что при температурах, близких, к комнатной, когда для бактериальных РЦ константа скорости  $k_{AB}$  намного превосходит все другие константы скоростей и возврат электрона со вторичного хинонного акцептора на пигмент осуществляется преимущественно через первичный хинонный акцептор, структурные изменения РЦ могут быть описаны в терминах изменения условной свободной энергии между уровнями  $P^+Q_A^-Q$  и  $P^+Q_A Q_B^-$  [8, 10, 23]. Иными словами, нами показано, что величина  $\Delta G$  может быть однозначно соотнесена с единственной обобщенной безразмерной структурной переменной  $x$ ,  $x = \Delta G/k_B T_k$ . Тогда (1), (2) становятся уравнениями для этой структурной переменной, а соотношение прямой и обратной скорости перехода электрона между  $Q_A$  и  $Q_B$  принимает вид  $k_{AB}/k_{BA} = \exp(x)$ .

Для проведения численного моделирования путем решения системы дифференциальных уравнений (1) и (2) в температурном диапазоне от  $T_0 = 3$  до  $T_k = 22$  °C удобно ввести переменную  $\gamma = T_i/T_k$ . Тогда для данной температуры  $T_i$  значение коэффициента диффузии будет иметь вид

$$D(T_i) \approx D_0 \cdot \exp((-w/k_B T_k) \cdot \gamma). \quad (5)$$

Далее необходимо учесть соотношения скоростей переноса электрона между точками локализации. Известно, что для РЦ *Rb. sphaeroides* возврат электрона со вторичного хинонного акцептора на пигмент осуществляется преимущественно через первичный хинонный акцептор [19, 20]. Таким образом,

$$k_{BP} = k_{AP} \cdot \exp(-x \cdot \gamma). \quad (6)$$

Очевидно, что результаты численного моделирования могут сильно зависеть от формы конформационного потенциала системы. Для описания формы потенциала мы использовали функцию Морза, не учитывая при этом возможной зависимости параметров потенциала от температуры:

$$V_P(x) = \alpha_P (1 - \exp(-\beta_P(x - x_P)/x_P))^2; \quad (7)$$

$$V_B(x) = \alpha_B (1 - \exp(-\beta_B(x_B - x)/x_B))^2,$$

где  $\alpha_P, \alpha_B, \beta_P, \beta_B$  — коэффициенты функции Мор-

за;  $x_p$ ,  $x_B$  — точки минимума потенциала соответственно в случае, когда электрон постоянно находится на пигменте  $P$  или вторичном хинонном акцепторе  $Q_B$ . Заметим, что в общем случае точная форма конформационного потенциала макромолекулы может быть получена из анализа совокупности экспериментальных данных по измерению коэффициента поглощения при различных условиях фотоактивации. Для детального сравнения теории с экспериментальными данными форма потенциала должна определяться отдельно для каждого конкретного образца РЦ.

Несложно показать, что коэффициент оптического поглощения при длине волны  $\lambda = 865$  нм пропорционален количеству окисленных пигментов в наблюдаемом ансамбле РЦ. Для ансамбля РЦ эта величина должна быть усреднена по всем возможным конфигурациям реакционного центра [8, 23]:

$$A_{865}(t) \sim \int_{-\infty}^{\infty} (P_A(t, x) + P_B(t, x)) \cdot dx, \quad (8)$$

где  $P_A(t, x)$  и  $P_B(t, x)$  вычисляются в рамках приведенного выше формализма.

Результаты численного моделирования зависимостей  $A_{865}(t)$  для двух разных температур и различных длительностей освещения РЦ приведены на рис. 5.

Параметры, использованные при численном моделировании, были следующими:

$x_p = 2$  — это значение выбрано исходя из условия того, что скорость возврата электрона со вторичного хинонного акцептора на пигмент после однократной фотоактивации составляет  $1 \text{ с}^{-1}$ ;

$x_B = 8$  — из экспериментальных исследований известно, что изменение  $\Delta G$  при постоянной локализации электрона на  $Q_B$  составляет примерно  $5-7 k_B T_k$ ;

$\alpha_p = 10$ ;  $\alpha_B = 5$ ;  $\beta_p = 1,3$ ;  $\beta_B = 3$  — параметры потенциала, выбранные из соображения качественного совпадения с экспериментом;

$D_p = 500 \text{ с}^{-1}$ ;  $D_B = 1000 \text{ с}^{-1}$ ;  $w = 9,5/k_B T$  — исходя из общепринятых экспериментальных оценок, значение  $w$  лежит в диапазоне  $2-40 \text{ кДж/моль}$  [26].

Поведение модельных кривых при  $T = 3$  и  $T_k = 22$  °С полностью повторяет характер экспериментальных кривых (рис. 2—4). При малых временах экспозиции кривые для разных температур практически совпадают (рис. 5, а). С увеличением  $\tau_{\text{exp}}$  восстановление поглощения после исключения фотовозбуждения происходит значительно быстрее для  $T = 3$ , чем для  $T_k = 22$  °С (рис. 5, б). Скорости затухания для двух температур выравниваются при

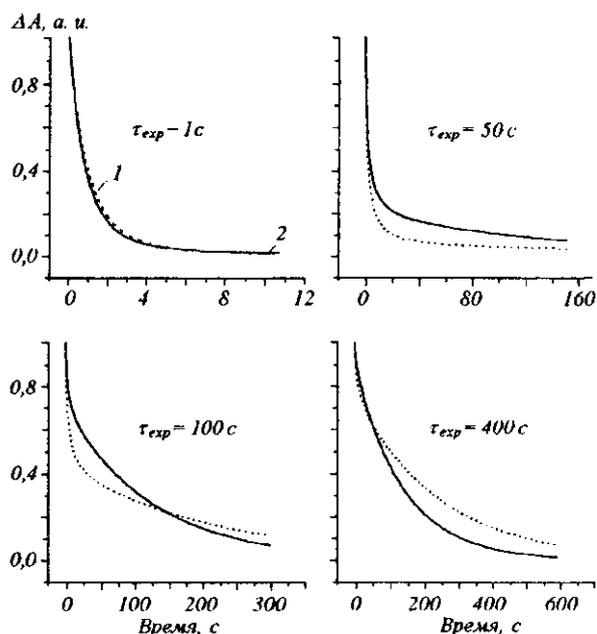


Рис. 5. Результаты компьютерного моделирования изменения оптического поглощения реакционных центров в процессе фотоактивации импульсами различной длины и последующей релаксации к основному состоянию для «теплых» (22 °С) и «холодных» (3 °С) образцов. В процессе моделирования использовали такие значения параметров:  $x_p = 2$ ;  $x_B = 8$ ;  $I = 3$ ;  $\alpha_p = 10$ ;  $\alpha_B = 5$ ;  $\beta_p = 1,3$ ;  $\beta_B = 3$ ;  $D_p = 500$ ;  $D_B = 1000$ ;  $w = 9,5/k_B T_{\text{room}}$

$\tau_{\text{exp}} = 100$  с (рис. 5, в), а при дальнейшем увеличении фотоактивации релаксация фотовозбужденного состояния при  $T = 3$  °С становится существенно медленней таковой при  $T = 22$  °С (рис. 5, г). Поведение модельных фаз нарастания сигнала после включения фотоактивации также повторяет ход экспериментальных кривых.

**Выводы.** Проведенные экспериментальные исследования показали, что с увеличением времени экспозиции фотовозбуждения процесс рекомбинации электрона из состояния на финальном акцепторе  $Q_B$  замедляется как для комнатной температуры, так и для  $T = 3$  °С. Анализ показал, что этот эффект связан не только с увеличением вклада более медленных компонент рекомбинации при понижении температуры, но и с увеличением времени жизни этих компонент. Последнее особенно важно для понимания экспериментальных результатов и для анализа физических механизмов, определяющих свойства электронного транспорта в РЦ. Действительно, полученные результаты могут быть объяснены исходя из активационного характера температурных зависимостей коэффициента диф-

фузии вдоль конформационной координаты и скорости электронного переноса с учетом того, что энергия активации  $x \cdot k_B T_k$  для обратной реакции перехода электрона на пигмент  $P$  увеличивается с увеличением времени экспозиции фотовозбуждения. В рамках развитой в работе модели это увеличение связано с диффузионным движением функции распределения  $P_B(t, x)$  в область больших значений переменной  $x$  под действием фотоактивации. При малых временах экспозиции диффузия очень незначительна, и смещение функции распределения из «темно»-адаптированного равновесного положения под действием фотоактивации не успевает вызвать существенного изменения заселенности финального акцептора  $Q_B$ . При незначительном увеличении времени экспозиции при  $T = 22^\circ\text{C}$  диффузионные процессы существенно изменяют форму функции распределения, смещая среднее значение конформационной координаты в область значений, близких к квази-равновесному значению для условия постоянной локализации фотозлектрона на  $Q_B$ . Этот эффект приводит к значительному замедлению скорости рекомбинации возбужденного (зарядоворазделенного) состояния при  $T = 22^\circ\text{C}$ , в то время как при  $T = 3^\circ\text{C}$  диффузия все еще незначительна и мало влияет на скорость рекомбинации зарядов в РЦ. При достижении некоторой длительности фотоактивации, несмотря на то, что изменение значения конформационной координаты вследствие диффузии при  $T = 3^\circ\text{C}$  все еще отстает от ее изменения при  $T = 22^\circ\text{C}$ , в игру вступает температурная зависимость  $k_{BP}(T)$ , замедляя зарядовую рекомбинацию для центров, успевших сильно изменить свою конформацию вследствие диффузии при  $T = 3^\circ\text{C}$ . Таким образом, скорости рекомбинации зарядов для двух температур практически сравниваются. Дальнейшее увеличение времени экспозиции вызывает значительное изменение конформационной координаты для обеих температурных режимов, однако скорость релаксации при  $T = 3^\circ\text{C}$  РЦ остается существенно медленнее релаксации при  $T = 22^\circ\text{C}$ .

В настоящей работе показано, что нетривиальные температурные зависимости скорости переноса электрона при функционировании РЦ могут быть объяснены наличием медленных структурных перестроек макромолекулы РЦ, вызванных локализацией электрона на хинонных акцепторах. Такое описание поведения РЦ хорошо согласуется с нашими предыдущими работами по динамике РЦ [6, 8—10, 22], а также с результатами работ других авторов по динамике РЦ без вторичного хинонного акцептора [11, 26].

*M. T. Kapustina, Yu. M. Barabash, A. O. Goushcha, M. V. Olenchuk, V. N. Kharkyanen*

Slow conformational dynamics of the reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* under photoactivation at different temperatures

#### Summary

*We experimentally investigated kinetics of the reaction centers (RCs) optical absorbance at the different exposition times (from 0.1 s to 400 s) of actinic light at two temperatures ( $T_1 = 3^\circ\text{C}$  and  $T_2 = 22^\circ\text{C}$ ). At short photoexcitation times (less 1 s) the optical absorbance kinetics under illumination and after turning it off was the same in both cold and warm samples. It is interesting that in the cold samples at the photoexcitation times 2 s—50 s the RCs possessing the slow recombination component have no time to be accumulated, and we observed a recombination kinetics faster than that in warm samples. However, with this time sufficiently long (> 300 s), the situation changes to opposite and the recombination kinetics of the cold samples becomes slower than that of the warm one. To describe qualitatively all the manifold of data obtained we used the general basic Fokker-Planck-type equations for a two-level system. In our model we took into consideration the temperature dependence of two parameters: the system diffusion along structure potential and the rate of electron transfer between quinone acceptors. The results of the computer modeling of absorbance changes at different temperatures are in good agreement with the experimental data.*

*M. T. Капустіна, Ю. М. Барабаш, А. О. Гушча, М. В. Оленчук, В. Н. Харкянен*

Повільна конформаційна динаміка фотозбуджених реакційних центрів *Rhodobacter sphaeroides* за різних температур

#### Резюме

*Експериментально вивчали кінетику оптичного поглинання реакційних центрів (РЦ) ( $\Delta A$ ) за різних термінів експозиції фотозбудження (від 1 до 400 с) при двох температурах ( $T_1 = 3^\circ\text{C}$  і  $T_2 = 22^\circ\text{C}$ ). Для короткої експозиції (1 с) кінетика  $\Delta A$  збігається для «теплих» та «холодних» зразків. Із збільшенням часу експозиції при  $T_2 = 22^\circ\text{C}$  РЦ встигають зазнати суттєвих конформаційних змін і кінетика їхньої темнотвої релаксації стає значно повільнішою, ніж у «холодних» РЦ. При подальшому зростанні часу експозиції (300 с) ситуація змінюється на протилежну. Для якісного описання отриманих результатів використовували узагальнені рівняння Фоккера-Планка для дворівневої системи. В нашій моделі враховували температурну залежність двох параметрів: дифузії системи у профілі структурного потенціалу та швидкості переносу між акцепторами. Результати комп'ютерного моделювання добре узгоджуються з експериментальними результатами.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Vault D., Chance B. Photosynthesis using a pulsed laser. I. Temperature dependence of cytochrome oxidation rate in chromatium evidence for tunnelling // *Biophys. J.*—1966.—6, N 6.—P. 12—43.
2. Marcus R. A. On the theory of oxydation-reduction reactions involving electron transfer // *J. Chem. Phys.*—1956.—24.—P. 966—978.
3. Marcus R. A., Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology // *Biochim. et biophys. acta.*—1985.—811.—P. 265—322.

4. Moser Ch. C., Keske J. M., Warncke K., Farid R. S., Dutton P. L. Nature of biological electron transfer // Nature.—1992.—355.—P. 796—802.
5. Hoff A. J., Deisenhofer J. Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria. Phys. Rpts // Rev. Sect. Phys. Letts.—1997.—287.—P. 2—247.
6. Gushcha A. O., Dobrovolskii A. A., Kapustina M. T., Privalko A. V., Kharkyanen V. N. New physical phenomenon of dynamic self-organization in molecular electron transfer systems // Phys. Lett.—1994.—A191.—P. 393—397.
7. Puchenkov O. V., Kopf Z., Malkin S. Photoacoustic diagnostics of laser-induced processes in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* // Biochim. et biophys. acta.—1995.—1231.—P. 197—212.
8. Goushcha A. O., Kapoustina M. T., Kharkyanen V. N., Holzwarth A. R. Non-linear dynamic processes in an ensemble of photosynthetic reaction centers. Theory and experiment // J. Phys. Chem.—1997.—B101.—P. 7612—7619.
9. Goushcha A. O., Kharkyanen V. N., Holzwarth A. R. Non-linear light-induced properties of photosynthetic reaction centers under low intensity irradiation // J. Phys. Chem.—1997.—B101.—P. 259—265.
10. Goushcha A. O., Holzwarth A. R., Kharkyanen V. N. Self-regulation phenomenon of electronic-conformational transitions in biological electron transfer under non-equilibrium conditions // Phys. Rev.—1999.—E59.—P. 3444—3452.
11. McMahon B. H., Muller J. D., Wraight C. A., Nienhaus G. U. Electron transfer and protein dynamics in photosynthetic reaction center // Biophys. J.—1998.—74.—P. 2567—2587.
12. Grafton A. K., Wheeler R. A. Amino acid protonation states determine binding sites of the secondary ubiquinone and its anion in the *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center // J. Phys. Chem.—1999.—103.—P. 5380—5387.
13. Christophorov L. Conformation-dependent charge transport: a new stochastic approach // Phys. Lett.—1995.—A205.—P. 14—17.
14. Clayton R. K. Molecular Physics in Photosynthesis.—New York; Blaisdell: Publ. Co., 1965.
15. Zakharova N. I., Fabion M. Ya., Uspenskaya N. Ya., Kononenko A. A., Rubin A. B. Structuro-functional characteristics of the photosynthetic reaction centers isolated with lauryldimethylamine oxide from *Rhodospseudomonas sphaeroides* (wild type) // Биохимия.—1981.—46.—P. 1703—1711.
16. Clayton R. K., Szuts E. Z., Fleming H. Temperature dependence of charge recombination from  $PP^+Q_A^-$  and  $P^+Q_B^-$  states in photosynthetic reaction centers // Biophys. J.—1972.—12.—P. 64—79.
17. Kleinfeld D., Okamura M. Y., Feher G. Electron transfer kinetics in photosynthetic reaction centers cooled to cryogenic temperatures in the charge-separated state: Evidence of light-induced structural changes // Biochemistry.—1984.—23.—P. 5780—5786.
18. 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.
19. Kleinfeld D., Okamura M. Y., Feher G. Electron transfer in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. I. Determination of the charge recombination pathway of  $D^+Q_A^-Q_B$  and  $Q_AQ_B^-$  and free energy and kinetic reactions between  $Q_A^-Q_B$  and  $Q_AQ_B^-$  // Biochim. et biophys. acta.—1984.—766.—P. 126—140.
20. Labahn A., Paddock M. L., McPherson P. H., Okamura M. Y., Feher G. Direct charge recombination from  $D^+Q_AQ_B^-$  to  $DQ_AQ_B$  in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* // J. Phys. Chem.—1994.—98.—P. 3417—3423.
21. Parson W. W., Chu Zh. T., Warshel A. Reorganization energy of the initial electron-transfer step in photosynthetic bacterial reaction centers // Biophys. J.—1998.—74.—P. 182—191.
22. Stowell M. H. B., McPhillips T. M., Rees D. C., Soltis S. M., Abresch E., Feher G. Light-induced structural changes and the mechanism of electron/proton transfer in the photosynthetic reaction center // Science.—1997.—276.—P. 812—816.
23. Goushcha A. O., Kharkyanen V. N., Scott G. W., Holzwarth A. R. Self-regulation phenomena applied to bacterial reaction centers: I. General theory // Biophys. J.—2000.—79.—P. 000—000.
24. McElroy J. D., Mauzerall D. C., Feher G. Characterization of primary reaction in bacterial photosyntheses // Biochim. et biophys. acta.—1974.—333.—P. 261—277.
25. Kalman L., Maroti P. Conformation-activated protonation in reaction centers of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* // Biochemistry.—1997.—36.—P. 15269—15276.
26. Рубин А. Б. Биофизика.—М.: Книжный дом «Университет», 1999.—Том 1.—448 с.

УДК 537.35

Надійшла до редакції 19.10.2000