

PACS numbers: 42.50.Wk, 81.07.Nb, 82.30.Fi, 82.39.Jn, 87.15.A-, 87.15.ht, 87.80.Cc

Трехуровневая модель фотоиндуцированных структурных изменений в реакционных центрах биомолекул

М. А. Заболотный, Ю. М. Барабаш*, О. П. Дмитренко, Н. П. Кулиш,
Э. Л. Мартинчук**, Н. И. Соколов***, Ю. И. Прилуцкий, А. П. Оласюк

*Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64,
01033 Киев, Украина*

**Институт физики НАН Украины,
просп. Науки, 46,
03650 Киев, Украина*

***Технический центр НАН Украины,
ул. Покровская, 13,
04070 Киев, Украина*

****Национальный университет «Киево-Могилянская академия»,
ул. Григория Сковороды, 2,
04070 Киев, Украина*

Исследуются фотоиндуцированные изменения в структуре молекулярного комплекса реакционного центра (РЦ) пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* в процессе внутримолекулярного переноса электрона. Установлено, что после выключения возбуждающего света зависимость от времени константы скорости возврата электрона с акцептора на донор РЦ имеет *S*-образный характер. Предложена трехуровневая модель электронного транспорта. Проведен анализ изменения поглощения раствора РЦ в рамках трехуровневой модели. Установлено уравнение, определяющее отношение заселенностей электронных уровней первичного и вторичного хинонов при освещении РЦ. Решение этого уравнения даже в стационарном случае не имеет больцмановского характера и зависит от интенсивности возбуждающего света.

Досліджуються фотоіндуковані зміни структури молекулярного комплексу реакційного центру (РЦ) пурпурової бактерії *Rhodobacter sphaeroides* в процесі внутрішньомолекулярного переносу електрона. Встановлено, що після відключення збуджуючого світла залежність від часу константи швидкості повернення електрона з акцептора на донор РЦ має *S*-подібний характер. Запропоновано трирівневий модель електронного транспорту. Виконано аналізу зміни вбирання розчину РЦ в рамках трирівневого моделю. Одержано рівняння, що визначає відношення заселеності електро-

нних рівнів первинного й вторинного хінонів при освітленні РЦ. Розв'язок цього рівняння навіть у стаціонарному випадку не має Больцманного характеру і залежить від інтенсивності збуджуючого світла.

The photoinduced changes are studied in the structure of molecular complex of reactionary centre (RC) of *Rhodobacter sphaeroides* purple bacteria during intramolecular transfer of electron. As shown, after shutdown of exciting light, the time dependence of speed constant of electron return from acceptor to the donor of RC has S-type shape. The three-level model of electron transport is proposed. The analysis of RC-solution absorption change is performed within the scope of the three-level model. An equation determining the ratio of populations of electronic levels of primary and secondary quinones at illumination of RC is derived. The solution of this equation even for stationary case does not have the Boltzmann character and depends on the intensity of the exciting light.

Ключевые слова: пурпурная бактерия *Rhodobacter sphaeroides*, фотосинтетический реакционный центр, трехуровневая модель внутримолекулярного транспорта электрона.

(Получено 23 декабря 2008 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Известно, что при поглощении кванта света в РЦ происходит фотоокисление первичного донора электрона димера бактериохлорофилла (Р), после чего, электрон через ряд промежуточных кофакторов попадает вначале на первичный хинонный акцептор (Q_A), а потом на вторичный (Q_B) [1–3]. На каждом из кофакторов цепи переноса электрона, его стабилизация определяется структурно-динамической организацией молекулярного комплекса РЦ и сопровождается структурными перестройками [2–5]. Информация о закономерностях определяющих характер фотостимулированных перестроек биомолекул имеет как самостоятельный, так и прикладной интерес. С одной стороны биоактивность макромолекулы в значительной степени определяется её структурой, а с другой — управление её конформационными переходами открывает возможность их использования в молекулярной электронике. В дальнейшем будут анализироваться только вопросы, возникающие при исследовании динамики электронного транспорта РЦ с помощью изучения динамики оптического спектра поглощения на длине $\lambda_0 = 865$ нм [1–5]. Возможность такого подхода обусловлена зависимостью скоростей обратимого переноса электрона от электронного состояния комплекса РЦ, которое изменяется под воздействием освещения образца с РЦ возбуждающим светом с интенсивностью I . При уходе электрона с димера бактериохлорофилла, РЦ теряет способность поглощения света с длиной волны λ_0 . В связи с этим изменение поглощения (ΔA) образца пропор-

ционально изменению вероятности $p(t)$ нахождения электрона на димере бактериохлорофилла в момент времени наблюдения t [2, 5]:

$$\Delta A(t) \propto p(t). \quad (1)$$

При использовании соотношения (1) константа скорости возврата (k_{AD}) электронов с акцептора на донор может быть определена [5] с помощью приближенного соотношения, справедливого в случае медленного изменения (k_{AD}):

$$k_{AD}(t) = -\frac{1}{\Delta A(t)} \frac{d\Delta A(t)}{dt}, \quad (2)$$

Однако до сих пор не разработана модель, позволяющая адекватно описать внутримолекулярную динамику электрона под действием возбуждающего света. Это обусловлено сложностями, связанными с многостадийностью процесса переноса электрона внутри комплекса РЦ и многообразием каналов перехода электрона внутри РЦ. В простейшем случае предполагали, что РЦ можно представить в виде белковой матрицы, содержащей встроенные молекулы (редокс-кофакторы), которые проявляют донор – акцепторные свойства относительно фотовозбуждённого электрона. После поглощения кванта света электрон из димера бактериохлорофилла через ряд промежуточных кофакторов и первичный хинон Q_A переносится на расстояние 3–4 нм и стабилизируется на вторичном хинонном акцепторе Q_B , образуя при этом разницу потенциалов на фотосинтезирующей мембране. Стабилизация электрона описывается при помощи трехуровневой модели с медленно изменяющимся в процессе переноса электрона уровнем акцептора Q_B [5], энергетический уровень которого определяется поляризационными процессами в РЦ [2, 5]. Зависимость (k_{AD}), от величины интенсивности света I , времени экспонирования образца, его температуры, типа детергента, используемого при получении РЦ, исследовались в литературе [2, 4, 5], однако зависимость (k_{AD}) от времени для указанных выше параметров не была установлена. Неизученным также оставался в рамках трехуровневой модели вопрос о возможности представления экспериментально измеряемой величины k_{AD} через константы скоростей элементарных процессов этой модели.

Целью работы является исследование релаксационных процессов в РЦ в рамках трехуровневой модели, установление характеристик, которые могут быть определены при исследовании релаксации поглощения светоэкспонированного раствора РЦ к термоадаптированному состоянию, исследование особенностей отношения электронных заселенностей первичных и вторичных хинонных акцепторов в молекулярном комплексе РЦ.

2. ОБЪЕКТЫ, МЕТОД И РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ РЦ

В работе использовались изолированные белково-пигментные комплексы (реакционные центры — РЦ), выделенные на кафедре биофизики МГУ из фотосинтетических мембран клеток *Rhodobacter sphaeroides* при помощи детергента лаурилдиметиламинооксида (ЛДАО). Для обеспечения долговременной стабильности параметров РЦ использовался водный раствор 0,01 М натрий-фосфатного буфера с рН 7.2 и добавкой 0,05% детергента. Измерительная кювета имела размеры 3×5×2,5 см при толщине кварцевых стенок 1 мм. Раствор РЦ с концентрацией $\sim 10^{-6}$ М выдерживался в темноте при комнатной температуре не менее 12 часов (темноадаптированное состояние).

Для измерения кинетики спектра оптического поглощения РЦ при их освещении был разработан специализированный прибор, обеспечивающий различные параметры освещения раствора РЦ под управлением персонального компьютера с одновременным измерением оптического поглощения образцов. Погрешность измерения оптического поглощения раствора РЦ не превышала $\pm 0,0005$ в диапазоне оптической плотности растворов 0–1. Спектральный диапазон возбуждающего светодиода перекрывал большую часть полосы поглощения «антенны» РЦ. Светоадаптированное состояние формировалось при подсветке раствора РЦ импульсом света с вариацией длительности и интенсивности [1–5]. Относительное количество

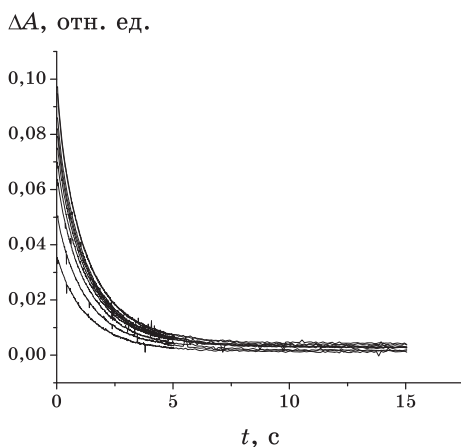


Рис. 1. Экспериментальная зависимость изменения поглощения водного раствора комплексов РЦ, выделенных из фотосинтетических мембран клеток *Rhodobacter sphaeroides* после выключения в момент $t = 0$ возбуждающего света при разном времени экспозиции (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 300, 600 с). Меньшим временам экспозиции соответствуют более низко расположенные кривые.

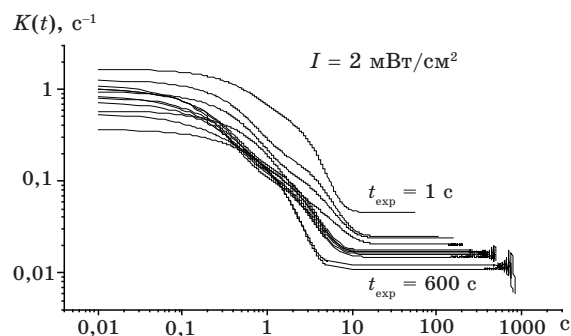


Рис. 2. Зависимость изменения поглощения водного раствора комплексов РЦ, выделенных из фотосинтетических мембран клеток *Rhodobacter sphaeroides* после выключения 0 возбуждающего света при разном времени экспозиции (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 300, 600 с) и $I_0 = 3 \text{ мВт/см}^2$.

центров и скорости перехода из одного состояния в другое определялись по кинетике спектра оптического поглощения (A) при $\lambda = 865 \text{ нм}$. Измерялась кинетика восстановления поглощения образца, после выключения возбуждающего света с различной интенсивностью и длительностью.

На рисунке 1 приведены данные восстановления поглощения РЦ для одной интенсивности возбуждающего света различной длительности экспонирования. Для ликвидации шумовой компоненты измерений, эти данные обрабатывались программным комплексом «ORIGIN» с использованием нелинейной регрессии на основе экспоненциальных функций с отрицательным декрементом. Результаты обработки экспериментальных данных с использованием формулы (2) приведены на рис. 2–4, где представлена кинетика константы скорости релаксации РЦ к темноадаптированному состоянию, после освещения РЦ возбуждающим светом различной интенсивности и временем экспозиции. Они показывают, что после выключения возбуждающего света в течение 10 с поглощение образца выходит на квазистационарный режим. Перепад значений ($A_{t=0} \rightarrow A_{t>10c}$) увеличивается с увеличением времени экспозиции и интенсивности возбуждающего света.

Из приведенных результатов можно сделать некоторые выводы о кинетике восстановления РЦ: 1) константа скорости возврата электрона сильно зависит от времени, прошедшего с момента выключения света; 2) в течение первых 1–2 с значение $k_{AD}(t)$ максимально и слабо зависит от времени. По истечении этого временного интервала в течение приблизительно 3 секунд происходит уменьшение величины $k_{AD}(t)$ на 2–3 порядка, после чего значение k_{AD} остаётся практически постоянным. Такое поведение константы k_{AD} свидетельствует о неизменности свойств РЦ в этом интервале времён. Кроме того,

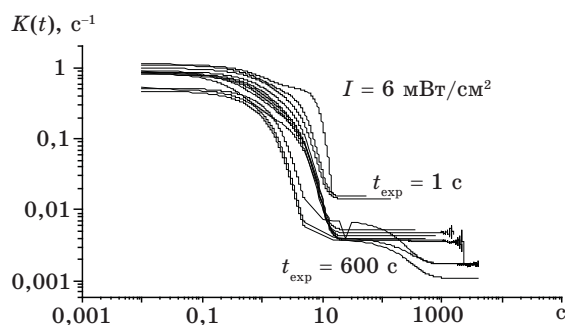


Рис. 3. Зависимость изменения поглощения водного раствора комплексов РЦ, выделенных из фотосинтетических мембран клеток *Rhodobacter sphaeroides* после выключения возбуждающего света при разных временах экспозиции (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 с) и $I = 6$ мВт/см².

можно отметить, что с увеличением времени экспонирования образца возбуждающим светом или увеличения его интенсивности наблюдается уменьшение значений k_{AD} . Такая сложная кинетика константы скорости релаксации поглощения образца РЦ к темноподготовленному состоянию требует рассмотрения трехуровневой модели переноса электрона в РЦ.

3. ТРЕХУРОВНЕВАЯ МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ ЭЛЕКТРОНА В РЦ

Используем систему уравнений [5], описывающих перенос электрона в молекулярном комплексе РЦ:

$$\begin{aligned} \frac{dp(t)}{dt} &= -k_{pA}p(t) + k_{AP}q_A(t) + k_{BP}q_B(t), \\ \frac{dq_A(t)}{dt} &= k_{pA}p(t) + k_{BA}q_B(t) - k_{AP}q_A(t) - k_{AB}q_A(t), \\ \frac{dq_B(t)}{dt} &= k_{AB}q_A(t) - k_{BA}q_B(t) - k_{BP}q_B(t), \end{aligned} \quad (3)$$

где k_{ij} — константа скорости перехода $i \rightarrow j$.

Установлено [5], что константы скоростей перехода электрона в РЦ имеют следующий порядок величин: $k_{AP} \propto 10$ с⁻¹, $k_{AB} \propto 0,02-0,2$ с⁻¹, $k_{AB} \propto 10^4$ с⁻¹, $k_{AB} \propto 10^3$ с⁻¹. Процессы в молекуле РЦ инициируются возбуждающим светом и поэтому параметр k_{pA} пропорционален интенсивности возбуждающего света I .

Система уравнений (3) должна быть дополнена соотношением [5]:

$$p(t) + q_A(t) + q_B(t) = 1. \quad (4)$$

Рассмотрим отношение заселённости электрона между Q_A и Q_B $f(t)$ в следующем виде:

$$f(t) = \frac{q_A(t)}{q_B(t)}. \quad (5)$$

Использование этой величины и второго из уравнений (3) позволяет записать:

$$\frac{dq_B(t)}{dt} f(t) + q_B(t) \frac{df(t)}{dt} = k_{PA} p(t) + k_{BA} q_B(t) - (k_{AP} + k_{AB}) f(t) q_B(t). \quad (6)$$

Учитывая (6), а также последнее из уравнений (3), получаем уравнение для отношения вероятностей нахождения неравновесного электрона на Q_A и Q_B :

$$[k_{AB} f(t) - k_{BA} - k_{BP}] f(t) + \frac{df(t)}{dt} = k_{PA} \frac{p(t)}{q_B(t)} + k_{BA} - (k_{AP} + k_{AB}) f(t). \quad (7)$$

Из (7) вытекает, что при освещении образца даже в стационарном случае отношение заселённости электрона между Q_A и Q_B зависит от I и не описывается соотношением Больцмана.

Вид уравнения (7) упрощается в случае отсутствия возбуждающего света ($k_{PA} = 0$), и оно тогда запишется:

$$\frac{df(t)}{dt} = k_{BA} + (k_{BA} + k_{BP} - k_{AP} - k_{AB}) f(t) - k_{AB} f^2(t). \quad (8)$$

Для решения уравнения (8) необходимо указать значения $f(t)$ в некоторый (начальный) момент времени. Сравнение решения уравнения (8) и его линеаризованного варианта (т.е. без учета последнего слагаемого в правой части (8)) показывает, что в случае рассмотрения области времен релаксации $f(t)$ больших 10^{-3} с при указанных выше значениях констант скоростей переходов вместо уравнения (8) (с точностью 0,1% не хуже) можно использовать соотношение:

$$0 = k_{BA} + (k_{BA} + k_{BP} - k_{AP} - k_{AB}) f(t), \quad (9)$$

из которого следует:

$$f(t) = \frac{k_{BA}}{k_{AP} + k_{AB} - k_{BA} - k_{BP}}. \quad (10)$$

При сделанных предположениях, используя данные о величинах k_{ij} , зависимость (10) является достаточно точной по истечении времени $\sim 10^{-3}$ с после выключения экспонирования образца возбуж-

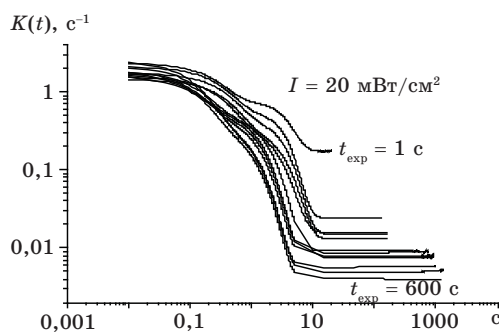


Рис. 4. Зависимость изменения поглощения водного раствора комплексов РЦ, выделенных из фотосинтетических мембран клеток *Rhodobacter sphaeroides* после выключения возбуждающего света при разных временах экспозиции (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 300, 600 с) и $I = 20$ мВт/см².

дающим светом. Проводя дальнейшие упрощения, отношение электронных заселенностей уровней Q_B и Q_A можно представить в следующем виде:

$$f(t) = \frac{k_{BA}}{k_{AB}} \text{ и } q_A(t) = \frac{k_{BA}}{k_{AB}} q_B(t). \quad (11)$$

Используем соотношение (11) при анализе первого из уравнений (3), записанного для случая отсутствия возбуждающего света ($k_{PA} = 0$) и уравнения (4). Тогда эти уравнения можно записать так:

$$\frac{dp(t)}{dt} = k_{AP}q_A(t) + k_{BP}q_B(t), \quad (t) = \frac{k_{AP}k_{BA} + k_{AB}k_{BP}}{k_{AB}} q_B(t), \quad (12)$$

$$p(t) + \frac{k_{BA}}{k_{AB}} q_B(t) + q_B(t) = p(t) + \frac{k_{BA} + k_{AB}}{k_{AB}} q_B(t) = 1. \quad (13)$$

Для РЦ характерным является следующее соотношение $k_{AB} \propto 10^4 \text{ с}^{-1} \gg k_{BA} \propto 10^3 \text{ с}^{-1}$; следовательно, вместо (13) можно использовать:

$$p(t) + q_B(t) = 1, \quad (14)$$

что позволяет уравнение (12) переписать следующим образом:

$$\frac{dp(t)}{dt} = \frac{k_{AP}k_{BA} + k_{AB}k_{BP}}{k_{AB}} (1 - p(t)). \quad (15)$$

Уравнение (15) в совокупности с начальным условием $p(t=0) = p_0$ описывает кинетику системы РЦ после выключения возбуждающе-

го света. Параметр p_0 , определяется заселённостью донора электронов в момент выключения света. Эти соотношения обуславливают возможность описания трехуровневой системы восстановления РЦ как двухуровневой системы при использовании временных интервалов больших 0,001 с. В этом случае константа (k_{AD}) скорости перехода электрона с акцептора (динамическое объединение Q_A и Q_B) на донор определяется выражением:

$$k_{AD} = \frac{k_{AP}k_{BA} + k_{AB}k_{BP}}{k_{AB}}. \quad (16)$$

Таким образом, для исследования динамики релаксации поглощения раствора РЦ можно использовать уравнение:

$$\frac{dp(t)}{dt} = k_{AD}(t)(1 - p(t)). \quad (17)$$

Вид константы скорости возврата электрона на донор k_{AD} определяется соотношением (16) с начальным условием p_0 . Таким образом, величины k_{AD} и p_0 являются единственными характеристиками, которые могут быть определены из экспериментов по исследованию релаксации поглощения раствора РЦ, после прекращения освещения РЦ возбуждающим светом. При сделанных предположениях задача становится эквивалентной системе уравнений, описывающих двухуровневую систему [2, 5]. Повторение проведенного анализа в случае $I \neq 0$, показывает, что кинетику электронной заселенности p можно описать уравнением:

$$\frac{dp(t)}{dt} = -I\alpha p(t) + k_{AD}(t)(1 - p(t)), \quad (18)$$

где α — коэффициент экстинкции, в экспериментально исследуемой области интенсивностей света (не превышающей 20 Вт/м²) практически не зависит от интенсивности I , а коэффициент k_{AD} в этом случае может быть определен с помощью уравнения (8). Дополнительным предположением является допущение о том, что коэффициент экстинкции не зависит от времени [5]. Таким образом, в рассматриваемой модели особенности кинетики РЦ описываются с помощью константы скорости обратных переходов, зависящих от времени.

Процессы, происходящие в комплексе РЦ при выключении освещения, описываются уравнением (18) с начальным условием $p(t=0) = p_0$. Представление (18) было использовано при обработке полученных экспериментальных данных, полученных при исследовании кинетики восстановления поглощения света на длине волны 865 нм образцов, содержащих РЦ. Для использования приведенной информации о поведении k_{AD} для изучения констант скоростей переходов k_{ij} необходима дополнительная информация о про-

цессах электронного транспорта в РЦ.

4. ВЫВОДЫ.

1. Установлена существенная зависимость от времени константы скорости перехода электрона с акцептора на донор при выключенном возбуждающем свете, что характерно для диффузионно-контролируемых процессов.

2. В течение первых 0,1–2 с значение константы скорости переходов электронов максимально и практически не зависит от времени, по истечении этого временного интервала за время ~ 1–3 секунд происходит уменьшение величины константы на 2–3 порядка, после чего значение константы скорости переходов электронов остаётся практически постоянным, что говорит о неизменности свойств РЦ в этом интервале времён.

3. Трехуровневая модель РЦ позволила установить:

а) что отношение стационарных электронных заселенностей уровней первичных и вторичных хинонов Q_A и Q_B при включенном возбуждающем свете не описывается соотношением Больцмана и зависит от интенсивности света;

б) комбинацию констант скоростей процессов проходящих в РЦ, которая экспериментально определяется при исследовании кинетики поглощения образца после выключения экспонирующего света.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. J. M. Olson and J. P. Trornber, *Membrane Proteins in Energy Transduction* (Ed. R. A. Capaldi) (New York: Marcel Dekker: 1978), p. 279.
2. А. Б. Рубин, *Биофизика* (Москва: Московский университет: 2000).
3. В. А. Шувалов, В. А. Климов, *Биофизика*, **32**, вып. 5: 814 (1987).
4. М. А. Заболотный, Е. А. Андреев, Ю. М. Барабаш, Е. Л. Мартинчук, А. И. Соколов, *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии*, **6**, вып. 1: 277 (2008).
5. A. O. Goushcha, V. N. Kharkyanen, G. W. Scott, R. Alfred, and A. R. Holzwarth, *Biophysical Journal*, **79**: 1237 (2000).