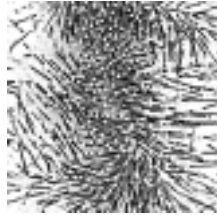


# Электронно-конформационные взаимодействия в первичных процессах фотосинтеза



Одной из центральных проблем биофизики является выяснение механизмов начального разделения зарядов в РЦ и транспорта электронов между переносчиками в первичных процессах фотосинтеза. Эта проблема по своей важности выходит за рамки фотосинтеза, а ее решение приобретает принципиальное значение для понимания глубоких механизмов функционирования биологических макромолекул. В многокомпонентных макромолекулярных комплексах переносчиков, объединенных в единый РЦ, начиная с самых первых этапов ( $\tau < 1$  пс) происходит высокоэффективный и направленный транспорт электронов. Добавим, что в пределах РЦ перенос электрона может происходить с высокой эффективностью и при сверхнизких температурах (100 К–4 К). Очевидно, обычные диффузионные механизмы химических реакций в растворах по типу сталкивающихся частиц не в состоянии обеспечить такого рода перенос электрона в плотной белковой среде. Мы видели (гл. XXVII), что в основе этого лежит туннелирование электрона, сопряженное с колебательными и конформационными изменениями в белковой матрице (гл. XIII).

Можно сравнить РЦ фотосинтеза с особым фотоактивным ферментом, в котором протестические группы переносчиков РЦ играют роль компонентов активного центра. Вместо обычного низкомолекулярного ферментного субстрата здесь выступают кванты света, поглощение которых «запускает» и работу РЦ фотосинтеза.

В обычных ферментах (гл. XIV) начальные изменения электронного состояния активного центра происходят за очень короткие времена. Они дают «толчок» разным по масштабу и времени конформационным перестройкам в белковой глобуле фермента. Накопленный в последнее время экспериментальный материал со всей очевидностью показывает, что подобный принцип тесного сопряжения электронных переходов с конформационными перестройками в белке справедлив и для РЦ фотосинтеза.

В настоящей главе мы рассмотрим механизмы электронных переходов, сопряженные с колебательными и конформационными степенями свободы, которые ответственны за высокие скорости и эффективность начального разделения зарядов и переноса электрона в РЦ фотосинтеза высших растений и бактериального типа. Мы будем опираться на схемы первичных процессов, которые были приведены в предыдущей главе (XXVII), а также на экспериментальные данные по кинетике переноса электрона в РЦ.

### § 1. Начальное разделение зарядов в РЦ

Первичные стадии транспорта электронов в РЦ бактериального типа включают отрыв электрона от электронно-возбужденного димера  $B_{хл_2}$  и перенос его на БФФ



Мономерный  $B_{хл}$  выступает здесь либо как непосредственный переносчик в двухступенчатом механизме  $P^* \xrightarrow{3,5 \text{ пс}} B_{хл} \xrightarrow{0,9 \text{ пс}} B_{фф}$ , либо играет роль виртуального переносчика в суперобменном механизме  $P^* \xrightarrow[B_{фф}^-]{B_{хл}} B_{фф}^-$  (см. XXVII, § 9). В обоих случаях вначале происходит эффективная дезактивация  $P^*$  и образование окисленного димера  $P^+$ . Совпадение диапазонов времен переноса электрона и колебаний ядерного скелета РЦ ( $\sim 3,5$  пс) говорит о тесном электронно-колебательном взаимодействии, лежащем в основе процесса разделения зарядов. Это значит, что в перенос электрона могут вовлекаться выделенные колебательные подсостояния в сложном пигмент-белковом комплексе РЦ, которые взаимодействуют с переносом электрона. В этом отношении высказываются разные гипотезы.

Мы видели (§ 9, XXVII), что имеются свидетельства о совпадении времен (1–3 пс) переноса электрона  $P^* \rightarrow B_{фф}^-$ , затухания флуоресценции  $P^*$  и величины  $T_1$ , полученной из ширины узкой линии провала. Отсюда следует, что первоначально возникшее состояние  $P^*$  должно совпадать с излучающим флуоресценцию состоянием димера  $B_{хл_2}$ . Но, с другой стороны, одновременное наличие также широкой полосы провала указывает на быстрые релаксационные процессы ( $\sim 20$ – $200$  фс), предшествующие излучению спонтанной флуоресценции с уровня  $P^*$ .

Это может указывать на то, что состояние  $P^*$  имеет примесь других состояний, например, состояния с разделенными зарядами  $P^+ B_{фф}^-$ , которое характеризуется большими смещениями ядерной конфигурации относительно основного состояния  $P$ . Это эквивалентно сильному электронно-колебательному взаимодействию с определенными степенями свободы (см. XIII, § 5). В перенос электрона, таким образом, вовлекаются выделенные колебательные степени свободы в сложном пигмент-белковом комплексе РЦ, которые взаимодействуют с переносом электрона в состоянии  $P^*$ .

Релаксационный переход в состояние с переносом заряда происходит вдоль поверхности потенциальной энергии возбужденного состояния  $P^*$  (рис. XXVIII.1) и носит квазиadiaбатический характер. Он сопряжен с большими смещениями равновесной ядерной конфигурации основного состояния. Именно в силу этого узкие провалы 0–0-переходов плохо наблюдаются (ср. рис. X.4) на фоне широкого провала. В самом деле, целый ряд экспериментальных данных, полученных в разных лабораториях методами фемтосекундной спектроскопии, указывает на быстрые релаксационные процессы в возбужденном состоянии  $P^*$ . Так, максимум выцветания основной полосы поглощения  $P$  сдвигается в течение первых 100–500 фс после образования  $P^*$ . Этот сдвиг происходит значительно быстрее, чем последующий за ним перенос электрона.

В инфракрасной области спектра удалось также зарегистрировать абсорбционные изменения при  $1000$ – $1300 \text{ см}^{-1}$ , которые нарастают в течение первых 200 фс после вспышки. Они обладают большой амплитудой и не могут быть отнесены к

простой тепловой колебательной релаксации. Они отражают колебания длин и углов  $C=C$ ,  $C-C$ ,  $C-N$  и  $C-H$  связей тетрапирольных колец специальной пары Бхл<sub>2</sub>. Имеются указания о быстрых ( $\tau \sim 600$  фс) изменениях колебаний карбонильных групп 9-кето  $C=O$  групп ( $170 \text{ см}^{-1}$ ) нейтрального  $P$  и возбужденного  $P^*$ , а также о быстрых временных изменениях длин связей карбонильных групп (поглощение при  $1665 \text{ см}^{-1}$ ), совпадающих с кинетикой образования Бхл<sup>-</sup> ( $\tau \sim 0,9$  пс). По-видимому начальные стадии эволюции возбужденного состояния  $P^*$  связаны с определенными локальными модами и «микроструктурными» быстрыми изменениями ядерной конфигурации пигмент-белкового комплекса РЦ. Детальная картина этих процессов еще далека от завершения. Однако мы можем сопоставить имеющиеся данные с известными принципами молекулярной спектроскопии.

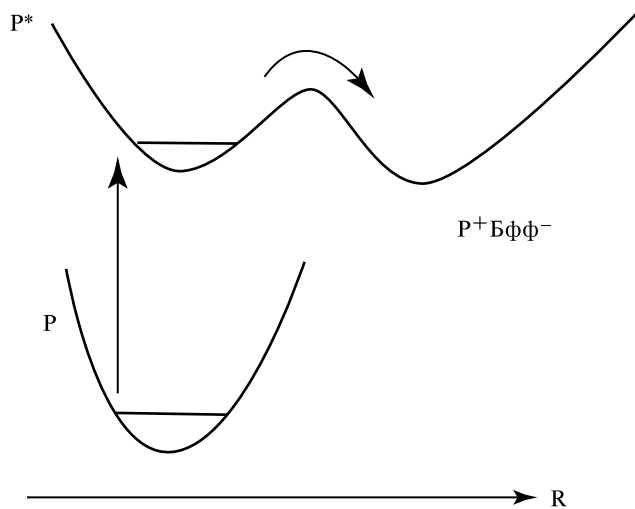


Рис. XXVIII.1.

Схема расположения кривых потенциальной энергии состояния РЦ:  $P — P^* — P^+ Bff^-$ ,  $R$  — ядерная координата.

Напомним, что в спектроскопии сложных молекул различают релаксационные процессы с тепловой диссипацией энергии и электронную релаксацию, связанную с определенными колебательными модами и изменением возбужденного состояния за время его существования (Непорент).

В первом случае тепловая релаксация сопряжена с быстрым рассеянием избытка колебательной энергии, образованного на колебаниях, которые принимали участие в переходе  $P \rightarrow P^*$ , и с достижением равновесного распределения всех частот и амплитуд нормальных колебаний. В случае же электронной релаксации происходит изменение молекулярного скелета по определенным степеням свободы с дальнейшей эволюцией Франк-Кондоновского электронного состояния, которое первоначально было достигнуто при оптическом переходе  $P \rightarrow P^*$ . Эволюция завершается образованием нового стационарного электронного состояния, самосогласованного с новой конфигурацией молекулы. Электронная релаксация происходит одновременно с выделенной колебательной, которая включает изменения координат положения уровней за счет излома кручения скелета молекулы. В результате возможны

изменения симметрии, степени переноса заряда, степени сопряжения  $\pi$ -электронных цепей двух частей молекулы, мультиплетности вследствие усиления спин-орбитальных взаимодействий. Электронные релаксации могут привести к размыванию вибронной структуры и появлению сплошных спектров.

Отметим, что максимальная скорость электронной релаксации может быть значительно больше, чем скорость тепловой колебательной релаксации и проходить на временах, не превышающих  $10^{-15}$ – $10^{-13}$  с.

Очевидно, рассмотренные выше особенности сопряжения электронных и колебательных процессов на разных стадиях разделения зарядов в РЦ соответствуют этим закономерностям. Аналогична и роль структурных факторов в обеспечении эффективности и направленности первичного разделения зарядов.

Мы уже говорили о существовании в РЦ пурпурных бактерий двух ветвей: активной  $L$  и неактивной  $M$ . Квантовохимические расчеты показали, что в фотоактивном димере  $Bchl_2$  наблюдается ассиметричное распределение возникающего положительного заряда  $P^+$  между входящими в состав димера молекулами  $Bchl_L$  и  $Bchl_M$  с преимущественной локализацией заряда на  $Bchl_L$ . Поэтому в активной  $L$ -ветви РЦ и происходит соответственно преимущественное образование состояния с переносом заряда. Переносу электрона от  $P^*$  в  $L$ -ветви также способствует вращение ацетильной группы  $Bchl_M$ , не связанной водородными связями, которое приводит к снижению здесь энергетических уровней состояний  $P^+ B\phi\phi_L^-$  и  $P^+ Bchl_L^-$ . Наряду с другими факторами это определяет перенос электрона по активной  $L$ -ветви.

**Влияние водородных связей и низкой температуры.** В структуре димера  $Bchl_2$  важную роль играют водородные связи между аминокислотой гистидином и карбоксильными группами молекул  $Bchl$  в димере. В диком штамме *Rb. sphaeroides* образуется одна Н-связь между Гис- $L168$  и 2-ацетильной группой 1-го кольца  $Bchl_L$ . Методы геной инженерии (точечные мутации, XXVII, § 8) позволяют получать мутации с измененным количеством и локализацией водородных связей. Имеется мутант, где гистидин  $L168$  заменен на фенилаланин: HF( $L168$ ), и где тем самым удалена Н-связь с 2-ацетильной группой  $Bchl_L$ . Наоборот, в других мутантах появляются дополнительные водородные связи с 2-ацетильной группой  $Bchl_M$  за счет замены фенилаланина на гистидин в мутанте FH( $M197$ ).

Замена на гистидин лейцина в положении  $L131$  дала мутант LH( $L131$ ), а лейцина в положении  $M160$  — мутант LH( $M160$ ). В обоих случаях в структуре РЦ мутантов добавлены водородные связи с 9-кето группой молекул соответственно  $Bchl_L$  и  $Bchl_M$ . В этом мутанте с увеличением числа водородных связей увеличивается величина  $E_M$  средноточечного окислительного потенциала пары  $P/P^+$ . Окислительный потенциал определяли методом электрохимического титрования по выцветанию максимума  $A$  полосы поглощения при 865 нм ( $P \rightarrow P^+$ ):

$$P/P^+ = \frac{A - A_{\text{окисл.}}}{A_{\text{восст.}} - A} = \exp[0,03894(E_M - E)],$$

где  $A_{\text{окисл.}}$  — поглощение полностью окисленного  $P^+$ , а  $A_{\text{восст.}}$  — поглощение полностью восстановленного  $P$  образца РЦ.

Результаты (Парсон, Аллен) можно представить в виде ряда мутантов, где каждому из них соответствует значение  $E_M$  (мВ) (Таблица XXVIII.1):

Таблица XXVIII.1.

штамм	число Н-связей в Бхл <sub>2</sub>	$E_M$ , мВ	$\tau_{\text{реком}}$ , мс	$\tau_{\text{разд. зар}}$ , пс
HF(L168)	0	410	220	3,6
Дикий штамм	1	505	100	3,4
LH(M160)	2	565	75	5,7
LH(L131)/LH(M160)	3	635	60	24
LH(L131)/LH(M160)/FH(M197)	4	765	40	52

Рост  $E_M$  с увеличением числа водородных связей димера  $P$  связан с электростатическими взаимодействиями  $P^+$  с гистидином. Качественно это приводит к повышению сродства  $P^+$  к электрону.

Как видно из таблицы (XXVIII.1), в результате этого ускоряется процесс восстановления  $P^+$  в ходе рекомбинации  $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ . Одновременно замедляется и скорость начального разделения зарядов  $P^* \rightarrow P^+$ , что видно по увеличению времени  $\tau_{\text{разд. зар}}$  в этих объектах.

Однако увеличение прочности и числа водородных связей может проявиться в еще большей степени в их влиянии на скорость релаксационных процессов в белках РЦ и сопряженного с ними переноса электрона. Данный эффект будет обусловлен снижением внутримолекулярной подвижности белковой матрицы по выделенным колебательным степеням свободы и замедлением транспорта электрона вследствие участия «неотрелаксированных» состояний переносчиков.

Для изучения природы релаксационных процессов в высокоупорядоченном комплексе переносчиков используются различные воздействия, модифицирующие систему водородных связей в РЦ: изотопное замещение  $H_2O$  на  $D_2O$ , модификация водородных связей в образцах криопротекторами, многоатомными спиртами (этиленгликоль, пропиленгликоль), апротонными растворителями (диметилсульфоксид). Эти воздействия, делая водородные связи менее лабильными, замедляют релаксационные процессы, уменьшают подвижность и увеличивают жесткость макромолекул. Как оказалось, они замедляют в 2–2,5 раза перенос электрона в РЦ. На рис. XXVIII.2 представлены изменения поглощения при 665 нм, соответствующие появлению и исчезновению восстановленного бактериофеофитина под влиянием изотопного замещения  $D_2O$  на  $H_2O$  и действия диметилсульфоксида. Видно, что указанная модификация системы водородных связей приводит к замедлению переноса электрона на этапах  $P \rightarrow \text{Бфф}$  и  $\text{Бфф} \rightarrow Q_A$ . Степень эффекта, вызванного действием криопротектора, увеличивается в зависимости от его гидрофобности и коррелирует с глубиной его проникновения во внутренние области фотосинтетических мембран. Одновременно с замедлением прямого переноса  $P \rightarrow \text{Бфф}$  появляется компонента восстановления  $P^+$  в ходе рекомбинации  $P^+ \leftarrow \text{Бфф}^-$  (рис. XXVIII.2, в, кривая 2) со временем  $\sim 0,7$ –1 нс, что сопровождается возникновением замедленной люминесценции с тем же характерным временем.

Наблюдаемые кинетические эффекты говорят о том, что перенос электрона на бактериофеофитин сопровождается молекулярной релаксацией с участием

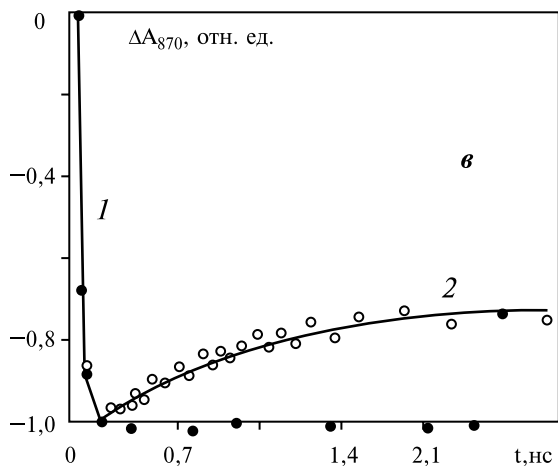
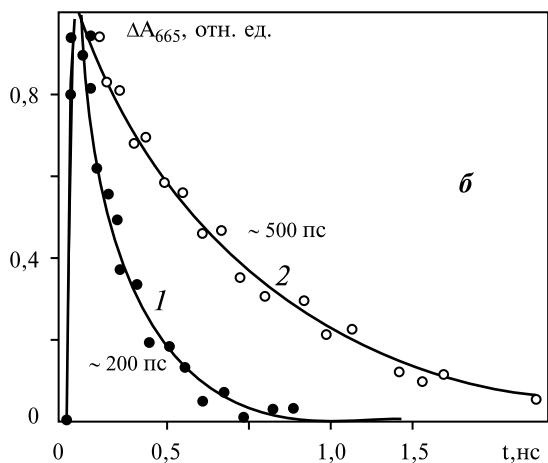
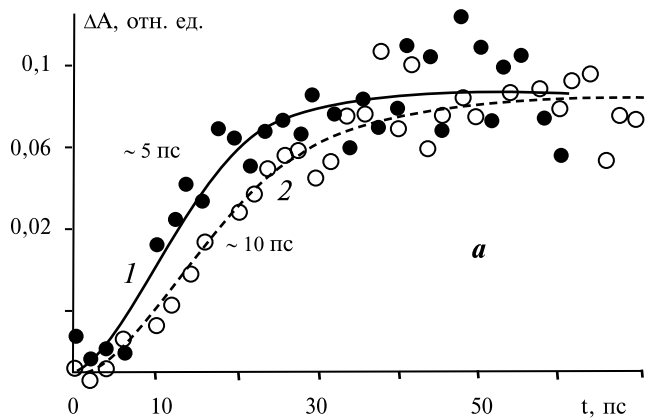
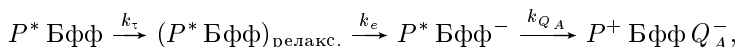


Рис. XXVIII.2.

Изменение скорости переноса электрона в РЦ ( $P^* \rightarrow \text{Бфф} \rightarrow Q_A$ ) в нормальных образцах (кривые 1), при модификации системы водородных связей (кривые 2) (по А. В. Rubin et al., 1994).

внутрибелковых водородных связей. Появление  $P^*$  дает начало переносу электрона  $P^* \rightarrow \text{Бфф}$  и изменяет зарядовое состояние в донорно-акцепторном комплексе по сравнению с исходным. При этом изменяется баланс сил, определяющий равновесную конформацию системы, адаптированной к темноте. В ходе последующей релаксации с участием системы водородных связей и достигается новое равновесное состояние ион-радикальной пары. Затем происходит дальнейший перенос электрона на  $Q_A$ .

Схема событий в цепи переноса имеет вид:



где  $(P^* \text{ Бфф})_{\text{релакс.}}$  — промежуточное состояние, которое достигается в процессе электронной релаксации  $P^*$ ,  $k_\tau$  — константа релаксации,  $k_e$  — константа переноса электрона на Бфф из «отрелаксированного» состояния,  $k_{Q_A}$  — константа переноса от  $\text{Бфф}^-$  на  $Q_A$ .

В нормальных условиях  $k_\tau \lesssim (100 \text{ фс})^{-1}$ , дальнейший перенос электрона происходит из этого полностью «отрелаксированного» состояния  $(P^* \text{ Бфф})_{\text{рел.}}$ .

Решающим фактором является соотношение между характерными временами электронных переходов  $\tau_{\text{эл}}$  и релаксационных процессов  $\tau_{\text{рел}}$ . Напомним, что соотношение  $\tau_{\text{рел}} \ll \tau_{\text{эл}}$ , необходимое для необратимого переноса электрона, обычно выполняется в нормальных условиях, поскольку процессы колебательной релаксации происходят достаточно быстро ( $< 1 \text{ пс}$ ) по сравнению с электронными переводами и не оказывают влияния на их характер. Однако на этапах начального переноса электрона в комплексе  $P \text{ Бфф}$  времена электронных переходов составляют несколько пикосекунд и сравнимы с временами колебательной релаксации  $\tau_{\text{рел}} \simeq \tau_{\text{эл}}$ . Модификация водородных связей в еще большей степени замедляет релаксацию первоначального состояния комплекса. В результате электрон не успевает стабилизироваться в достаточной степени на бактериофеофитине до того, как произойдет его дальнейший перенос из еще не отрелаксированного состояния  $[P^+ \text{ Бфф}^-]$ . Из этого состояния  $[P^+ \text{ Бфф}^-]$  электрон теперь успевает вернуться обратно, рекомбинируя с  $P^+$  за время  $\sim 1 \text{ нс}$ , что сопровождается замедленной люминесценцией. Может произойти и дальнейший перенос электрона из состояния  $[P^+ \text{ Бфф}^-]$  на  $Q_A$ , но с меньшей скоростью. Таким образом, в процессах релаксации при условии  $\tau_{\text{рел}} \simeq \tau_{\text{эл}}$  в донорно-акцепторном комплексе достигаются микроконформационные подсостояния, которые отличаются друг от друга по своей функциональной активности (скоростям и направленности переноса электрона). Состояние водородных связей влияет здесь на динамику фотоиндуцированных релаксационных процессов в системе.

Особый интерес в биофизике фотосинтеза представляет изучение переноса электрона при сверхнизких температурах. Мы уже рассматривали (Т. I, гл. XIII) теоретические модели влияния низкой температуры на туннелирование электрона, сопряженное с тепловой диссипацией энергии по колебательным степеням свободы. Температура может влиять и на динамику релаксационных процессов в белке в ходе электронно-конформационных переходов, особенно тех, в которые вовлечены мягкие моды (XIII, § 11).

Оказалось, что на стадии разделения зарядов в РЦ ( $P^* \rightarrow P^+ \text{Бфф}^-$ ) понижение температуры ускоряет этот процесс, уменьшая его время от  $\sim 3,5$  пс при 300 К до  $\sim 1,2$  пс при 4 К.

На рис. XXVIII.3 приведена схема возможного расположения кривых потенциальной энергии начального  $P^* \text{Бфф}^-$  и конечного  $P^+ \text{Бфф}^-$  состояний при двух температурах (300 К и 77 К). Деформирование и смещение кривой состояния  $P^* \text{Бфф}^-$  при замораживании образца приводит к сдвигу точки пересечения этих кривых к вершине параболы начального состояния  $P^* \text{Бфф}^-$  (ср. рис. XIII.8).

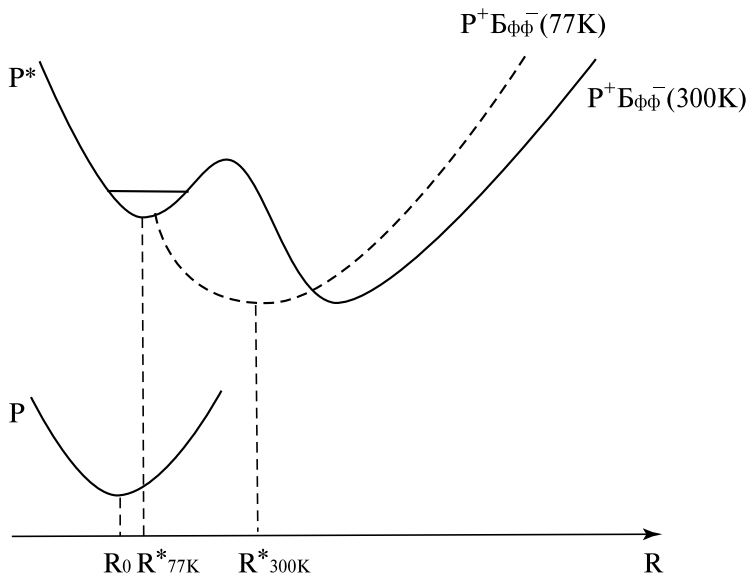


Рис. XXVIII.3.

Деформация кривых потенциальной энергии состояний РЦ при понижении температуры.

Процесс переноса электрона в этом случае становится безактивационным. С повышением температуры его скорость падает, так как происходит увеличение заселенности более высоких колебательных подуровней и, следовательно, отход системы от точки пересечения кривых начального и конечного состояний в вершине параболы, где вероятность перехода максимальна.

## § 2. Механизмы окисления цитохрома в реакционных центрах

Поглощение кванта света в РЦ вызывает появление окисленного димера  $P^+$ , который затем восстанавливается от донора (вторичного), роль которого в бактериальном фотосинтезе выполняют высоко- $C_H$  и низкопотенциальные  $C_L$  цитохромы (рис. XXVII.6).

Перенос электрона от цитохрома на  $P^+$  явился важным источником информации о механизмах элементарных процессов в биологических структурах. Это дало



толчок новому направлению в биофизике фотосинтеза — исследованию транспорта электронов в биологических мембранах в условиях, исключающих обычную диффузию молекул переносчиков.

В работе Де Во и Чанса понижение температуры клеток пурпурных бактерий (*Chromatium*) позволило впервые выявить и измерить температурную зависимость скорости такого рода реакции окисления цитохромов фотоокисленным димером бактериохлорофилла  $C \rightarrow P^+$  (см. рис. XIII.1). Оказалось, что при понижении температуры от 300 до 120 К характерное время реакции увеличивается от 1 мкс до 2,5 мкс, оставаясь практически неизменным при дальнейшем понижении температуры. Принципиальный вывод, следующий из этих экспериментов, состоял в том, что окисление цитохромов в фотосинтетических мембранах не требует обычных активационных механизмов, подобных окислительно-восстановительным реакциям в растворах, а протекает по другим законам. Основополагающая концепция, выдвинутая в результате обнаруженного эффекта, базируется на физическом явлении туннельного переноса электрона, который может происходить между молекулами донора  $D$  и акцептора  $A$  в условиях, когда энергия электрона меньше высоты разделяющего их активационного барьера. Напомним основные положения теории туннельного переноса (гл. XIII).

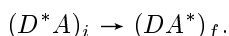
Согласно квантово-механическим представлениям существует определенная вероятность перекрытия электронных волновых функций начального и конечного состояния, зависящая от высоты и ширины барьера. За время пребывания электрона на молекуле акцептора происходит потеря части электронной энергии и, как следствие, нарушение резонансного совпадения положения уровней  $A$  и  $D$ . В результате этого обратное туннелирование практически невозможно, и перенос электрона становится необратимым. Диссипация электронной энергии за счет электроколебательных взаимодействий происходит за  $10^{-12}$ – $10^{-13}$  с с возбуждением колебательных акцептирующих мод в донорно-акцепторном комплексе в состоянии  $DA^*$ .

Таким образом, условием необратимости в конечном состоянии туннельного переноса является соотношение между временем электронного перехода  $\tau_{эл}$ , зависящим от перекрытия волновых функций начального и конечного состояний, и временем колебательной релаксации  $\tau_{рел}$  в конечном состоянии:  $\tau_{эл} \gg \tau_{рел}$  (золотое правило Ферми).

В литературе имеется большой материал по низкотемпературному окислению низкопотенциальных  $C_L$  и высокопотенциальных  $C_H$  цитохромов фотоактивным бактериохлорофиллом  $P$ .

На рис. XXVIII.4 приведены типичные двухфазные температурные кривые окисления  $C_L$  цитохрома, диаграмма потенциальных поверхностей электронной энергии  $U_i$  и  $U_f$  начального  $i$  и конечного  $f$  состояний донорно-акцепторной пары  $DA$  и экспериментальные данные о влиянии замещения  $H_2O$  на  $D_2O$ .

Туннелирование электрона происходит, когда энергии состояний  $i$  и  $f$  становятся равными, что имеет место в точке  $R^*$  ядерной координаты, где кривые  $U_i(R)$  и  $U_f(R)$  пересекаются (рис. XXVIII.4, б):



В состоянии  $(DA^*)_f$  система оказывается на одном из высших колебательных подуровней, с которого происходит сброс избытка энергии с переводом на нижние

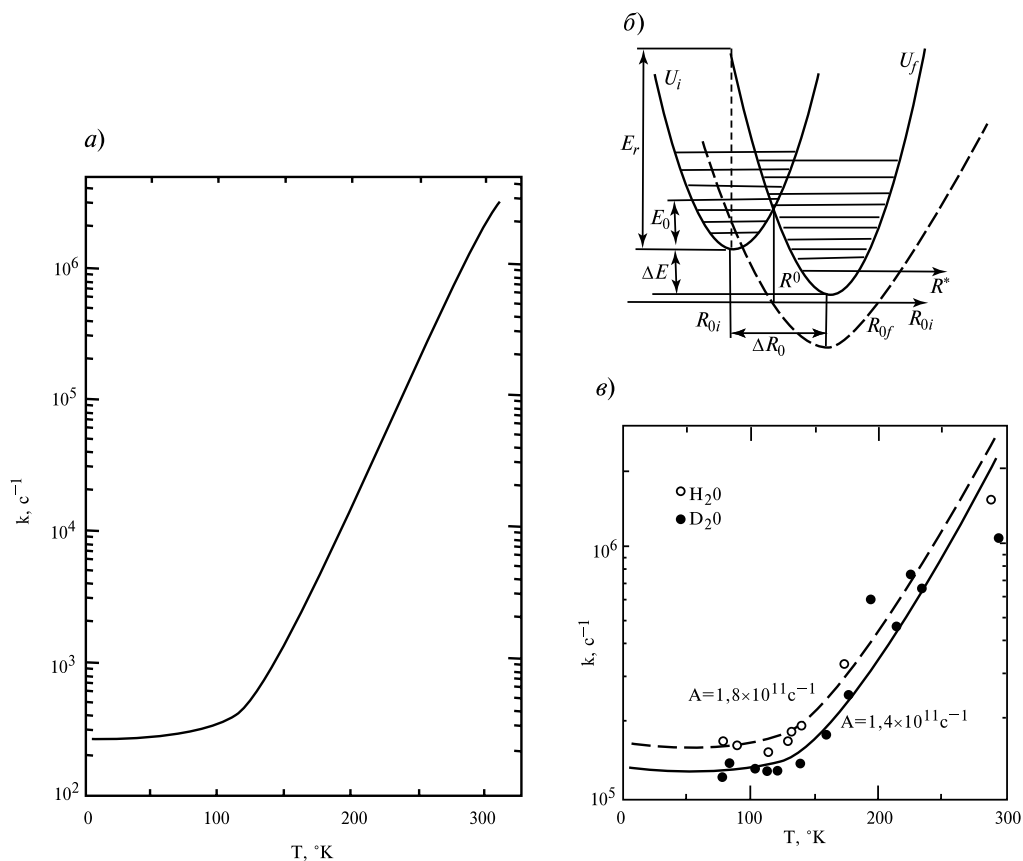


Рис. XXVIII.4.

Температурная зависимость скорости окисления цитохрома в фотосинтезирующих бактериях (а); электронно-колебательные взаимодействия при туннелировании электрона (б); (в) — изотопный эффект замещения  $\text{H}_2\text{O}$  на  $\text{D}_2\text{O}$ ;  $E_0$  — энергия активации,  $E_r$  — энергия реорганизации среды,  $\Delta E$  — тепловой эффект реакции переноса электрона,  $\Delta R_0$  — смещение положения равновесия ядер при переходе из начального  $i$  в конечное состояние  $f$ . Штриховая кривая соответствует безактивационному переносу электрона  $E_a$  (по R. E. Blankenship, W. W. Parson, 1979)

колебательные подуровни и возбуждение акцептирующих мод. Приближение вдоль ядерной координаты к точке  $R^*$  происходит при увеличении температуры и заселения высоких колебательных подуровней исходного состояния. При этом ширина активационного барьера перехода, как видно из рис. XXVIII.4, б, уменьшается, следовательно, скорость туннелирования растет с ростом температуры. При низких температурах в состоянии  $i$  заселены только нижние колебательные подуровни, и точка  $R^*$  может быть достигнута только за счет туннелирования самих ядер (ядра — достаточно легкие частицы). Здесь, однако, ширина и высота барьера наибольшие, и

поэтому скорость туннелирования минимальная, но от температуры уже не зависит. Таким образом, двухфазный характер температурной зависимости окисления цитохрома объясняется влиянием температуры на процесс перестройки ядерной конфигурации, который характеризуется величиной смещения  $\Delta R = R_{0f} - R_{0i}$  исходной равновесной ядерной конфигурации  $R_{0i}$  к новому равновесному значению  $R_{0f}$  при переносе электрона. Разработанная количественная теория туннельного переноса в белковой среде дает выражения для константы скорости туннелирования в случае сильной и слабой электронно-колебательной связи (XIII, § 6), которые позволяют найти параметры процесса переноса электрона и, в частности, частоты колебаний акцептирующей моды. Эти частоты характеризуются значениями  $\sim 300\text{--}400 \text{ с}^{-1}$ . В качестве акцептирующей моды могут выступать колебания молекул воды в гидратных оболочках порфириновых молекул, в других случаях — также колебания атомов водорода в химических группах C—H, O—H, N—H<sub>2</sub>. Низкотемпературный предел скорости реакции определяется туннелированием молекул H<sub>2</sub>O как целого на расстояния  $\Delta R \approx 0,15\text{--}0,2 \text{ \AA}$ .

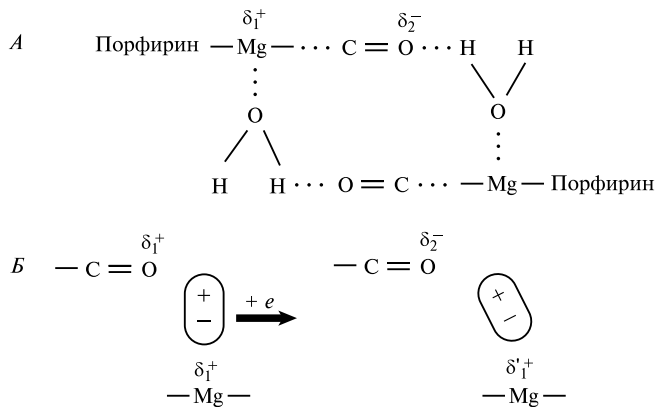


Рис. XXVIII.5.

Участие молекул воды в диссипации энергии по акцептирующей моде в реакции окисления цитохрома в РЦ пурпурных бактерий

При изменении зарядового состояния димера (A) изменяются эффективные заряды  $\delta_1$  и  $\delta_2$  на атомах Mg и кислорода C=O-группы. Это должно вызывать изменение равновесного положения диполя воды (B)

**Изотопный эффект.** Замена H<sub>2</sub>O на D<sub>2</sub>O в бактериальных хромофорах приводит при низких температурах к уменьшению константы скорости окисления  $C_L$  реакционным центром в  $\sim 1,4$  раза, причем этот эффект несколько уменьшается при переходе к комнатным температурам. Частота колебаний акцептирующей моды, найденная по температуре точки излома кривой температурной зависимости рассматриваемой реакции, составляет  $330\text{--}350 \text{ с}^{-1}$ . Это очень близко к частоте колебаний H<sub>2</sub>O в гидратных оболочках Mg и Fe. Замена H<sub>2</sub>O на D<sub>2</sub>O уменьшает частоту колебаний  $\omega$  до  $314 \text{ с}^{-1}$  и несколько увеличивает константу электронно-колебательной связи, которая отражает величину относительной деформации молекулы вдоль координаты акцептирующей моды  $\omega$  при изменении электронного состояния [см. (XIII.5.14)].

Характерные изменения равновесных расстояний между Mg<sup>2+</sup> и H<sub>2</sub>O в координационной сфере при изменении заряда иона на единицу составляют  $\Delta R \sim \sim 0,01 \div 0,12 \text{ нм}$ . Сопоставляя это со значением параметра связи  $S_{\text{H}_2\text{O}} = 6,6$ , можно заключить, что в процессе участвуют две-три молекулы воды (рис. XXVIII.5).

Природа акцептирующей моды в данном случае связана, таким образом, с переориентацией диполей воды. Однако эту роль могут выполнять и другие высокочастотные колебания легких атомных групп. В частности, возможны смещения равновесного положения  $H_2$  вдоль направления несимметричной двухъямной водородной связи с диссипацией в теплоту части энергии (см. § 2 гл. VIII; рис. VIII.4).

Предпринятые во многих лабораториях экспериментальные проверки изложенных выше представлений подтверждают основное положение о том, что электронные переходы в макромолекулярных комплексах неразрывно связаны с преобразованием ядерной подсистемы. Однако в последние годы накопился ряд новых данных. Они не укладываются в рамки только электронно-колебательных взаимодействий, согласно которым, как было сказано выше, наблюдаемые эффекты целиком определяются зависимостью от температуры константы скорости элементарного акта переноса электрона. Например, трудно объяснить таким образом очень большие различия в зависимости константы скорости переноса  $k(T)$ , наблюдаемые для препаратов из разных бактерий, а также значительно более резкий, чем это следует из

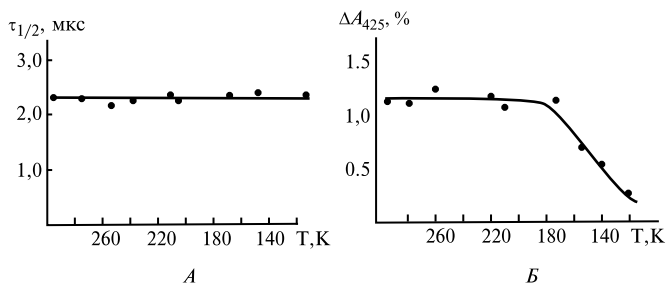


Рис. XXVIII.6.

Зависимость от температуры времени  $\tau_{1/2}$  и амплитуды сигнала  $\Delta A_{425}$  процесса окисления высокопотенциального цитохрома  $C_H$  (по S. K. Chamrovsky et al., 1980)

В отличие от низкопотенциального цитохрома  $C_L$ , скорость окисления  $C_H$  практически не зависит от температуры, по крайней мере в диапазоне от 300 до 120 К (А). Однако при температурах ниже некоторой критической наблюдается уменьшение количества молекул цитохрома  $C_H$ , способных подвергаться фотоиндуцированному окислению (В). У оставшихся активных молекул  $C_H$  конечные скорости окисления остаются практически неизменными. Дегидратация образцов оказывает на реакцию окисления  $C_H$  аналогичное действие

формул теории электронно-колебательных переходов, излом на кривой зависимости  $k(T)$  в области низких температур (рис. XXVIII.4, а). Кроме того, было обнаружено, что скорость окисления высокопотенциального цитохрома  $C_H$  в РЦ (*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*) вообще не зависит от температуры в области от 300 до 120 К ( $\tau \sim 2,5$  мкс). Однако в диапазоне 210–120 К при неизменной скорости окисления наблюдалось уменьшение амплитуды сигнала, т. е. уменьшение количества окисляемых цитохромов (рис. XXVIII.6).

**Роль контактных состояний.** Очевидно, характер наблюдаемых температурных зависимостей переноса электрона определяется двумя факторами (см. § 6, 8 гл. XIII). Во-первых, это собственно внутримолекулярные электронно-колебательные взаимодействия, отражающие роль квантовой акцептирующей моды. Во-вторых, здесь играют роль мягкие моды, отражающие конформационные перестройки белков-переносчиков, при которых обеспечивается движение донорно-акцепторных

групп в процессе формирования контактных состояний между ними. Именно спонтанное движение донорно-акцепторных групп в комплексе  $C_H - P_{870}$  определяет возможность формирования такого контактного состояния, в пределах которого происходит туннелирование электрона, характеризующееся слабой электронно-колебательной связью.

Для реализации контактного состояния необходима определенная конформационная свобода или набор внутримолекулярных степеней свободы молекулы цитохрома. Таким образом, речь идет о структурном туннелировании между донорно-акцепторными группами (см. § 7 гл. XIII), где белковая цепь, видимо, выступает как медиатор электронного переноса. □

В последнее время существование специфической электронной тропы с участием аминокислотных остатков было показано для цитохрома  $C_H$  между донорной группой гема и поверхностью глобулы. В белке РЦ такая менее специфическая тропа идет от поверхности глобулы к фотоактивному димеру  $P$  (Онучек) (гл. XIII, § 7). Результаты говорят о множественности путей структурного туннелирования электрона между белками цитохрома и РЦ.

В такой системе нарушение структурной целостности сказывается на возможности образования электронной «тропы» в макромолекулярном комплексе, где донорно-акцепторные группы занимают соответствующие места. В контактной позиции существует перекрытие волновых функций групп  $D$  и  $A$ , и поэтому расстояние между ними составляет около 0,1 нм. В неконтактной позиции расстояние между группами  $D$  и  $A$  увеличивается до 0,3–0,5 нм (такова амплитуда сегментального движения отдельных  $\alpha$ -спиральных участков белка, возможных носителей групп  $D$  и  $A$ ). Поскольку на расстояниях 0,3–0,5 нм перекрытие волновых функций практически равно нулю, между группами возникает барьер  $\Delta E \leq 10$  эВ, соответствующий потенциалу ионизации нейтральных групп. Это сразу же снижает скорость туннелирования в неконтактной позиции в  $10^6$  раз, т. е. делает практически невозможным перенос электрона. □

Очевидно, в ЭТЦ роль релаксационных процессов в белке не сводится только к акцептированию избытка электронной энергии, а может быть связана с более глубокой реорганизацией донорно-акцепторного комплекса по выделенным степеням свободы. К этому заключению приводят результаты по влиянию дегидратации на фотоиндуцированное окисление высокопотенциальных цитохромов. При дегидратации пленочных образцов РЦ от уровня нормальной относительной влажности до 0,1–0,3  $P/P_s$  (0,15–0,25 г воды на 1 грамм сухого веса препарата, т. е. гН<sub>2</sub>О/г) так же, как и при понижении температуры в оводненных образцах, происходит уменьшение количества окисляемых молекул высокопотенциального цитохрома при относительно неизменной скорости окисления тех молекул  $C_H$ , которые оставались в активном состоянии. При гидратации обезвоженных препаратов наблюдалось резкое увеличение подвижности протонов воды и неводных молекул, регистрируемое по появлению медленных компонент спада спинового эха  $T_2 \simeq 1$  мс (X, §2). Это увеличение подвижности в мембране коррелирует с ростом функциональной активности процесса фотоокисления  $C_H$  при влажностях от 0,5 до 0,8  $P/P_s$  (0,25–0,47 гН<sub>2</sub>О/г), где появляются подвижные молекулы слабо связанной воды. Если оставаться в рамках изложенной выше теории туннельного переноса, то согласно

расчетам, в условиях обезвоживания расстояние между  $C_H$  и  $P$  должно было бы возрасти до 20 Å, что явно нереально. Очевидно, влияние гидратации связано не с изменениями параметров барьера какого-то одного элементарного акта туннелирования ( $C_H \rightarrow P$ ). При изменении состояния воды изменяется структура всего комплекса вследствие модификации взаимного расположения донорно-акцепторных пар в белковой матрице. Это обстоятельство влияет на образование контактного состояния между ними, в пределах которого возможен межбелковый перенос электрона от цитохрома к бактериохлорофиллу. Роль воды в этом процессе перестройки мембран велика, поскольку нативная конформация комплекса цитохрома с РЦ зависит от гидрофобных взаимодействий. Характер и направленность структурных перестроек в мембранах определяется соотношением фактов упорядоченности водного окружения (энтропийный фактор) и образованием водородных связей между молекулами воды и гидрофобных связей между молекулярными группами (энтальпийный фактор). Перестройка мембран, сопровождающая эти переходы, носит сложный характер и по-разному проходит в липидной и белковой фазах у разных организмов. Во всех случаях, однако, при  $P/P_s = 0,80$  резко увеличивается подвижность всех мембранных компонентов, растет количество сорбированных молекул воды и становится возможной их латеральная подвижность. Функциональная активность на всех участках ЭТЦ достигает при этом нормальных значений.

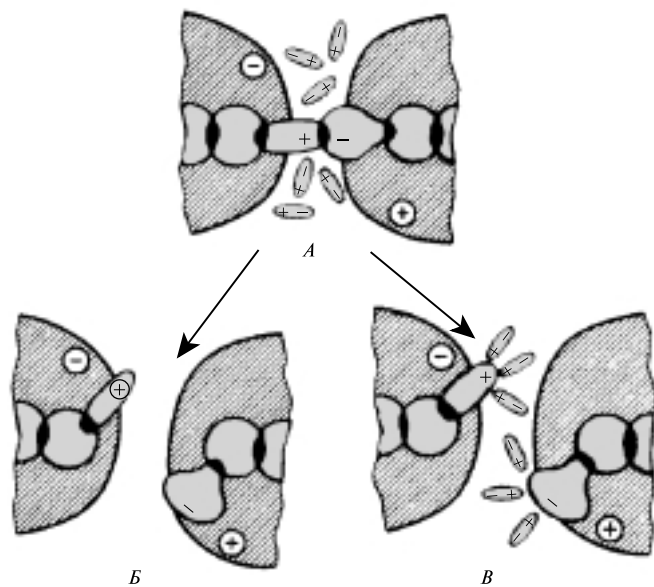


Рис. XXVIII.7.

Поведение молекулярных групп в области контакта между макромолекулами высокопотенциального цитохрома (донор) и реакционного центра (акцептор) в фотосинтетических мембранах пурпурных бактерий при понижении степени гидратации и температуры.

*A* — контактная позиция;  
*B, B* — неконтактные позиции

На рис. XXVIII.7 приведена в качестве примера схема, иллюстрирующая возможность образования контактного и неконтактного состояний по этому механизму. Баланс сил, обуславливающий стабилизацию контактного состояния, определяется полярным взаимодействием контактирующих групп и гидрофобными силами, которые зависят от наличия молекул воды в системе. В присутствии воды

при низких температурах неконтактная позиция ( $B$ ) сохраняется вследствие слабой подвижности структурных групп и молекул воды в области контакта. Однако при повышении температуры подвижность отдельных молекулярных групп и, главное, молекул воды растёт. Следовательно, возрастает и энтропия системы. Именно это обстоятельство делает энергетически более выгодной и устойчивой при комнатной температуре позицию  $A$ , несмотря на то, что энтальпия в этом состоянии увеличивается. В пределах позиции  $A$  происходит формирование собственно контактного состояния между подвижными группами 1 и 2. Снижение энтропии, сопровождающее образование комплекса, не может существенно уменьшить общую величину энтропии конформационно «расторженной» позиции  $A$ . Таким образом, роль воды здесь заключается в одновременном обеспечении конформационной подвижности и «энтропийной» устойчивости контактного состояния. Аналогичную роль может играть вода и в акте первичного разделения зарядов. Как оказалось, удаление воды ингибирует процесс разделения зарядов в РЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий, нарушая образование контактных состояний, либо препятствует стабилизации электрона на Бфф за счет изменения характера водородных связей.

Таким образом, действие температуры и влажности в случае слабой электронно-колебательной связи осуществляется через мягкие моды путем влияния на формирование контактного состояния между функционально активными группами. Однако и при сильной электронно-колебательной связи процессы формирования контактных состояний дают свой вклад в наблюдаемую температурную зависимость туннелирования. □

Итак, процесс окисления  $C_H$  является конформационно контролируемым. Это значит, что он может происходить, например, за счет образования  $\pi$ -мостика при движении одного из ароматических аминокислотных остатков (тирозина). Если положение этого мостика зависит от значения обобщенной конформационной координаты, то существует наиболее благоприятная ситуация для его порогового образования и, следовательно, для переноса электрона на  $P^+$ . Анализ уравнений типа Фоккера—Планка (XIII, § 11) показал, что это происходит при нерегулярном, случайном характере зависимостей коэффициентов диффузии от конформации системы или при достаточно широком распределении высот потенциальных барьеров, преодолеваемых конкретной белковой группой при конформационной релаксации. Причина этой нерегулярности в конечном счете заключается в очень сложном характере гиперповерхности конформационной энергии биополимеров.

### § 3. Конформационная динамика и перенос электрона в реакционных центрах

Электронные переходы должны быть сопряжены с внутримолекулярной подвижностью белка РЦ, которая обеспечивает, во-первых, процессы электронно-колебательной релаксации по акцептирующей моде и фиксации электрона в акте туннельного переноса, и во-вторых, индуцированные вследствие изменения зарядового состояния акцептора последующие конформационные перестройки в макромолекулярном комплексе. Для изучения этой проблемы были проведены исследования внутримолекулярной подвижности белка РЦ и эффективности переноса электрона при соответствующих параметрах температуры и влажности препаратов. Показатели

электронно-транспортной активности РЦ сопоставляли с параметрами введенных в препараты спиновых зондов и меток (нитроксильные радикалы), гамма-резонансных зондов  $^{65}\text{Fe}$ , люминесцентных меток (индикаторы локальных внутримолекулярных движений с частотами  $10^7\text{--}10^9\text{ с}^{-1}$ ), а также фосфоресцентных меток (регистрируемые частоты движения  $10^3\text{--}10^4\text{ с}^{-1}$ ).

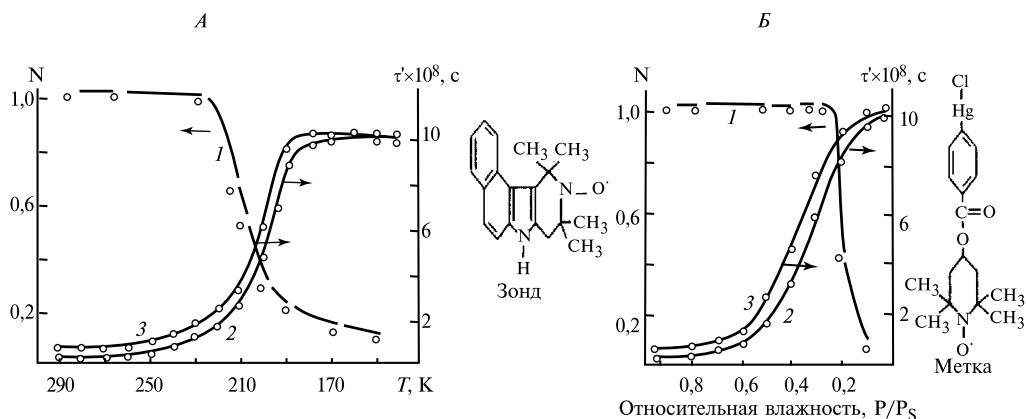


Рис. XXVIII.8.

Функциональная активность (1) и конформационная динамика (2,3) реакционных центров в спин-меченых хроматофорах *R. rubrum* в зависимости от температуры (А) и влажности (Б) (по А. И. Берг и др., 1979):

$N$  — эффективность фотоиндуцированного переноса электрона от  $Q_A$  на  $Q_B$  (кривые 1);  $\tau'$  — эффективный параметр времени корреляции вращательной диффузии гидрофобного зонда (2) и спиновой метки на SH-группы (3)

**Влияние температуры и гидратации.** На рис. XXVIII.8 показаны температурные зависимости эффективности фотоиндуцированного прямого переноса электрона  $N$  в системе хинонных акцепторов, а также времен корреляции вращательной диффузии спиновой метки, ковалентно присоединенной к SH-группам белка и гидрофобного спинового зонда в мембранах хроматофоров (см. § 2, гл. X). В интервале 140–180 К величина  $\tau'$  (эффективный параметр времени корреляции) изменяется мало, что указывает на отсутствие быстрых движений в системе. Однако при повышении температуры происходит резкое уменьшение  $\tau'$  до значений  $\leq 10^{-7}\text{ с}$ , что свидетельствует о «размораживании» движений в белково-липидном локальном окружении нитроксильных фрагментов. В том же температурном диапазоне, где возрастает внутримолекулярная подвижность белка РЦ, увеличивается и функциональная активность. При  $T < 180\text{ К}$  сильному торможению подвижности соответствует и низкий (близкий к нулевому) уровень электрон-транспортной активности.

На рис. XXVIII.8, Б видно, что согласованность в изменении эффективности переноса электрона от  $Q_A$  на  $Q_B$  и динамических параметров фотосинтетической мембраны отчетливо проявляется и при изменении степени гидратации препаратов.

При использовании методики ЭПР с насыщением сигнала удалось показать,



что нитроксильный радикал участвует также в более медленных движениях с частотами  $\nu_c = 10^3 \text{ с}^{-1}$ , возможно, связанных с липидной фазой РЦ.

Типичная температурная зависимость вероятности поглощения  $\gamma$ -кванта без отдачи или фактора  $f'(-\ln f')$  [см. (X.2.26)] для хромофоров показана на рис. XXVIII.9. Видно, что при повышении температуры  $T > 170 \text{ К}$  величина  $f'$  падает; это свидетельствует о появлении движений мессбауэровского атома  $^{57}\text{Fe}$  с амплитудами  $\langle x_a \rangle \gg 0,03 \text{ нм}$  и временами, превышающими  $10^{-7} \text{ с}$ . Следовательно, при  $T > 170 \text{ К}$  растормаживается движение белковой макромолекулы по конформационным подстояниям. □

Однако в обезвоженных препаратах, когда содержание воды не превышает 3%, кривая  $f'(T)$  монотонна и не имеет точки перегиба (сплошная кривая). Амплитуда смещений мессбауэровских ядер лишь несколько увеличивается при нагревании, но зависимость от температуры остается линейной, т. е. типичной для кристаллических твердых тел (см. гл. X). В увлажненных образцах зависимость  $f'(T)$  в области температур ниже 180–200 К совпадает с аналогичной зависимостью

для максимально высушенных препаратов; при дальнейшем нагревании наблюдается аномальное уменьшение  $f'$  и соответствующее возрастание амплитуды смещений. Оказалось, что границы излома для гидрофобных мессбауэровских меток лежат в целом при более низких температурах, чем для меток, локализованных в полярных областях. Эти данные свидетельствуют о более высокой подвижности внутренних областей мембран по сравнению с поверхностными участками, по крайней мере, при низких температурах. Очевидно, в процессе нагревания образца начинает растормаживаться подвижность внутренних гидрофобных областей. В дальнейшем активируются и движения поверхностных гидрофильных участков мембраны, а также собственно молекулярные движения мембранных белков.

**Определение параметров подвижности.** В соответствии с моделью ограниченной диффузии (см. § 1 гл. XI), основным фактором, вызывающим увеличение подвижности мессбауэровского атома при росте температуры, является уменьшение времени корреляции движения  $\tau_c$  вследствие уменьшения коэффициента трения  $\gamma$ . Согласно (XI.1.27)–(XI.1.29),

$$\tau_c = \frac{\gamma}{m\omega_0^2} = \frac{6\pi b\eta}{m\omega_0^2}, \quad (\text{XXVIII.3.1})$$

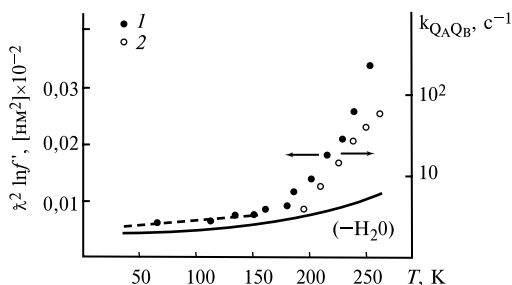


Рис. XXVIII.9.

Температурная зависимость фактора  $f$  (1) и константы скорости  $k_{QAQB}$  (2) фотоиндуцированного переноса электрона от первичного хинонного акцептора ко вторичному для хромофоров (величина фактора  $f$  является мерой вероятности эффекта Мессбауэра) (по А. В. Rubin et al., 1994)

где  $\eta = \eta_0 \exp(\varepsilon/RT)$  — микровязкость в локальной окрестности мессбауэровского ядра;  $\omega_0$  — частота колебаний в отсутствие активации вязкого течения внутри белковой глобулы;

$$\tau_c \sim \eta \sim \exp(\varepsilon/RT). \quad (\text{XXVIII.3.2})$$

Путем обработки экспериментальных кривых  $f'(T)$  были найдены значения энергии активации вязкого течения, микровязкости при комнатной температуре и их зависимости от степени гидратации хромофоров. Значение  $\varepsilon \simeq 8$  кДж/моль для гидрофобных областей мембраны близко к энергии активации заторможенного вращения вокруг С—С-связи. Это означает, что флуктуации плотности в гидрофобной среде, делающие возможным смещение метки, определяются конформационными движениями липидной цепи. Значение  $\varepsilon \simeq 25$  кДж/моль для поверхностных участков мембраны близко к энергии водородных связей и энергии активации вязкости воды. Абсолютные значения микровязкости в случае размеров движущегося участка в  $\simeq 0,5$  нм составляют примерно 60 и 40 Па·с для гидрофобных и полярных областей, и возрастают в несколько раз при обезвоживании препаратов. Большие абсолютные значения микровязкости ( $\eta \simeq 10$  Па·с) по сравнению с обычно измеряемыми величинами вязкости липидов (0,1–1,0 Па·с) свидетельствуют о специфическом микроокружении в окрестности введенной метки (см. § 4, гл. XV).

∇ Корреляция эффективности транспорта электрона и величины  $f'(T)$  не означает непосредственной связи переноса электрона именно с теми конформационными степенями свободы, которые дают вклад в движение мессбауэровского атома. Резкое уменьшение фактора  $f'$  указывает лишь на то, что в рассматриваемой области температур происходит быстрое уменьшение времен корреляции конформационных движений с амплитудой  $\geq 0,1$  нм ниже значений  $10^{-7}$  с. Тем самым создаются предпосылки для растормаживания других, более масштабных конформационных степеней свободы. Это, в свою очередь, создает условия для формирования контактных донорно-акцепторных состояний, в пределах которых происходит туннелирование электрона в системе хинонных цепей. □

Метод  $\gamma$ -резонансной спектроскопии позволяет регистрировать высокочастотные движения ( $\tau < 10^{-7}$  с) с амплитудами  $\geq 0,02$  нм в фотосинтетических мембранах и РЦ. Измерение параметров флуоресценции и фосфоресценции хромофорных меток (см. § 2 гл. X) в тех же температурных областях позволило оценить подвижность молекул среды в диапазоне времен  $\tau_c$  от 1 до  $10^{-9}$  с. Оказалось, что, как и в случае применения методов ЯГР и ЭПР, температурная зависимость для эффективности прямого переноса электрона в системе  $Q_A$ — $Q_B$  — звена электрон-транспортной цепи, локализованного вблизи поверхности трансмембранного белка РЦ — лучше коррелирует с быстрыми движениями в поверхностных слоях препаратов с характерными временами  $\tau_c \sim 10^{-8}$  с. В то же время изменения скорости обратной реакции — рекомбинация  $P^+$  и  $Q_A^-$  ( $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ ) процесса, протекающего во внутренних структурах РЦ, лучше коррелирует с появлением в образцах при размораживании низкочастотных движений с  $\tau_c \gg 10^{-8}$  с. В температурном интервале 130–190 К во внутренних частях мембранных белков также наблюдаются движения с временами  $\tau_c \sim 1$  с, которые регистрируются по сдвигу спектров собственной фосфоресценции ароматических аминокислот.

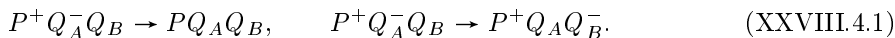
Таким образом, наблюдаемая конформационная подвижность характеризуется широким набором времен релаксации (от 1 до  $10^{-8}$  с в зависимости от температуры). Это и составляет основу для формирования контактных состояний между компонентами цепи.

Проявление при данной температуре того или иного вида движения с определенным значением времени корреляции  $\tau_c$  не означает, что смещения соответствующих молекулярных групп полностью отсутствовали при других температурах. Наблюдаемые температурные эффекты могут быть связаны с такими изменениями уже существующих движений молекулярных групп, когда их времена корреляции попадают в пределы временного разрешения данного метода и становятся тем самым доступными для наблюдения.  $\square$

#### § 4. Перенос электронов и формирование контактных состояний в системе хионных акцепторов ( $PQ_AQ_B$ )

Система хионных акцепторов представляет собой характерный пример, где влияние температуры на перенос электрона может осуществляться не только путем изменения константы скорости (см. § 5–7 гл. XIII), но и через образование выделенных или контактных конформационных состояний между переносчиками в комплексе  $PQ_AQ_B$ . При этом сами константы скорости собственно электронного переноса в конкретных выделенных состояниях могут и не зависеть от температурного фактора, поскольку температура влияет на переходы между этими состояниями.

**Рекомбинационные процессы в  $PQ_AQ_B$ .** В гл. XXVII было показано, что под действием света фотоактивный пигмент окисляется, а электрон сначала переходит на  $Q_A$ , а затем на  $Q_B$ . Поэтому на свету вначале образуется состояние  $P^+Q_A^-Q_B$ , которое распадается по двум каналам:



После выключения света наблюдается темновое восстановление фотоокисленного пигмента  $P$ , которое носит обычно двухкомпонентный характер (рис. XXVIII.10). Быстрый компонент восстановления соответствует возвращению электронов на  $P^+$  от  $Q_A^-$  из состояния  $P^+Q_A^-Q_B$  ( $P^+Q_A^-Q_B \rightarrow PQ_AQ_B$ ), а медленный — от  $Q_B^-$  из состояния  $P^+Q_AQ_B^-$  ( $P^+Q_AQ_B^- \rightarrow PQ_AQ_B$ ).

Таким образом, эффективность  $N$  переноса электрона от  $Q_A$  к  $Q_B$  можно оценить по соотношению медленного и быстрого компонентов темнового восстановления  $P^+$ . Уменьшение величины  $N$  при понижении температуры и влажности свидетельствует о падении эффективности переноса электрона между  $Q_A$  и  $Q_B$  (см. рис. XXVIII.8).

Однако основная причина состоит не в уменьшении константы скорости собственно переноса электрона  $Q_A \rightarrow Q_B$ . Такое заключение следует из сопоставления результатов, полученных при охлаждении исследуемых препаратов в темноте или при одновременном активирующем освещении. Оказывается, что при охлаждении в темноте при некоторых достаточно низких температурах ( $T < 200$  К) перенос электрона от  $Q_A$  к  $Q_B$  почти полностью блокируется — об этом свидетельствует доминирование быстрого компонента в кинетике восстановления  $P^+$  после фотовозбуждения РЦ (рис. XXVIII.10, I). Однако картина выглядит совсем по-другому

при охлаждении тех же препаратов, но на свету. В этом случае в некоторой части реакционных центров фотомобилизованный электрон вообще фиксируется в акцепторном комплексе на неопределенное время. В результате в кинетической кривой появляется большая доля «необратимой» компоненты регистрируемого сигнала при выключении света после замораживания препарата (см. рис. XXVIII.10, III). Она соответствует невосстанавливаемой доле  $P^+$ . В оставшейся же обратимой доле сигнала кинетика восстановления  $P^+$  по существу не отличается от таковой при комнатной температуре (XXVIII.10, I). Она характеризуется лишь медленными компонентами восстановления  $P^+$ .

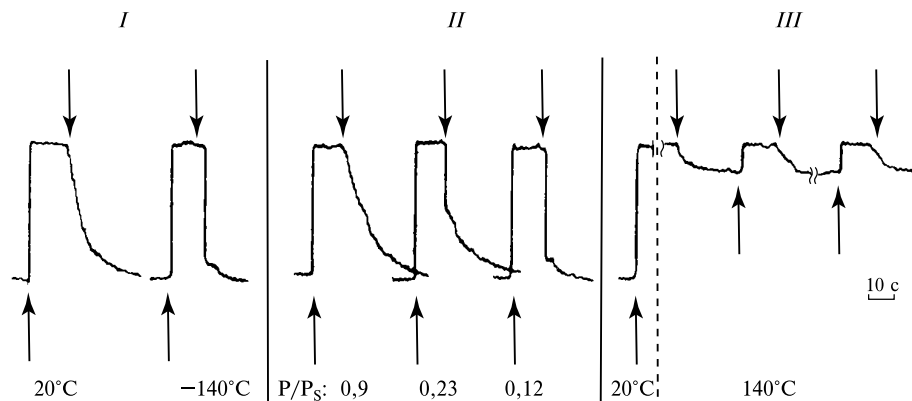


Рис. XXVIII.10.

Кинетика темнового восстановления  $P^+$  в реакционном центре хромофоров в зависимости от температуры I, влажности II и при охлаждении препаратов на свету III (по П. П. Нокс и др., 1979; Э. Г. Петров и др., 1983) (стрелками вверх и вниз обозначено включение и выключение освещения)

Следовательно, при охлаждении на свету формируется такое структурное состояние пигмент-белкового комплекса РЦ, в котором перенос  $Q_A \rightarrow Q_B$  происходит быстро даже при низких температурах и является поэтому безактивационным. По существу, этому соответствует формирование контактного состояния в паре  $Q_A Q_B$  в этих условиях.

**Фотоконформационный переход в системе хинонных акцепторов.** Характер движений  $Q_A$  и  $Q_B$  можно выяснить по влиянию температуры на реакцию темнового восстановления  $P^+$  от  $Q_A$ . Результаты экспериментов показывают, что с понижением температуры скорость рекомбинации  $P^+$  и  $Q_A^-$  может возрастать в 2–3 раза ( $\tau_{1/2}$  снижается от 80 до 25–30 мс), если образец охлаждается в темноте. Для изучения рекомбинации  $P^+ \leftarrow Q_A^-$  в «чистом» виде обычно используют РЦ с искусственно блокированным в результате различных химических воздействий переносом электрона от  $Q_A^-$  к  $Q_B$ . При этом кинетика рекомбинации в области промежуточных температур характеризуется существенной немонотонностью. Если же охлаждение идет на активизирующем свету, то время рекомбинации практически не зависит от температуры и сохраняется близким к таковому

при 20° С. Очевидно, присоединение электрона к  $Q_A$  и образование  $Q_A^-$  в исходно-равновесной конфигурации  $PQ_A$  изменяет ее электронное состояние ( $Q_A \rightarrow Q_A^-$ ).

Последующая конформационная релаксация включает переполаризацию ближайших к  $Q_A^-$  групп белка и более медленное смещение аниона  $Q_A^-$  в направлении к положительно заряженному иону железа  $Fe^{2+}$  в комплексе с  $Q_B$ .

С понижением температуры эффект увеличения расстояния между  $P^+$  и  $Q_A^-$  при движении  $Q_A^-$  снижается, что и объясняет аномальное увеличение при этом скорости рекомбинации  $P^+$  и  $Q_A^-$ . Если же охлаждение происходит постепенно и на свету, то в этих условиях образованный  $Q_A^-$  успевает сместиться от  $P^+$  к  $Q_B$ . В этом случае скорость рекомбинации  $P^+$  и  $Q_A^-$  уменьшается. Наблюдаемое в опытах небольшое (на 20%) увеличение скорости реакции рекомбинации  $P^+$  и  $Q_A^-$  при дейтерировании и замещении  $H_2O$  на  $D_2O$  связано с увеличением микровязкости и замедлением движения  $Q_A^-$ , при котором затрагиваются гидратные оболочки белка. □

Таким образом, изменение зарядового состояния комплекса при освещении  $PQ_A \rightarrow P^+Q_A^-$  вызывает переход системы в напряженно-конформационное состояние, которое далее релаксирует к новому равновесию. В процессе этого движения понижение температуры фиксирует систему в той или иной точке конформационной координаты. Иными словами, в этом случае мы имеем дело с так называемым фотоконформационным переходом. С первых же моментов освещения начинается каскад конформационных изменений. Если на этом фоне понижается температура исследуемого образца, то в зависимости от скорости охлаждения и интенсивности освещения можно зафиксировать объект (при низкой температуре) на той или иной глубине конформационного перехода. В итоге можно получить наборы различных кинетик рекомбинации  $P^+$  и  $Q_A^-$  — от характерной для выраженного «светового» состояния системы до таковой, присущей адаптированному к темноте препарату. Оказалось, например, что кинетические кривые рекомбинации образцов при комнатных температурах и охлажденных на слабом свету до 80 К сильно отличаются друг от друга. Однако если охлаждение проводилось под сильным фоновым освещением ( $2 \cdot 10^3 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ ), то эти различия практически исчезали. Иными словами, при комнатной температуре в ответ на насыщающую вспышку и восстановление  $Q_A$  успевает произойти соответствующий конформационный переход. При охлаждении в темноте различие в кинетике есть следствие того, что конформационная подвижность заторможена. Однако при охлаждении на сильном свету система вновь конформационно «оживает» и фиксируется в положении, близком к равновесному положению при комнатной температуре ( $P^+Q_A^-$ )<sub>релакс.</sub> Таким образом, изменяя интенсивность освещения и режим охлаждения образцов РЦ, мы можем фиксировать при замораживании определенные конформационные состояния, которые система последовательно достигает в процессе релаксации. Можно в различное время после начала освещения при различных температурах (т. е. при различной глубине конформационного перехода) измерять скорость возвращения электрона от хионного акцептора на  $P^+$  (рис. XXVIII.11). Оказывается, что она зависит от времени, прошедшего после возбуждающей вспышки. Чем больше времени прошло после этой вспышки (1, 40, 80, 120 мс), тем больше времени требуется электрону, чтобы вернуться на окисленный пигмент от первичного

хинона. В свою очередь это время зависит от температуры. Если проводить опыты при температуре выше, чем 230 К, то практически через 1 мс после действия возбуждающей вспышки время возврата электрона увеличивается до 100 мс. Это означает, что после возбуждения при температуре выше 230 К успевает пройти весь конформационный переход в первичном акцепторе.

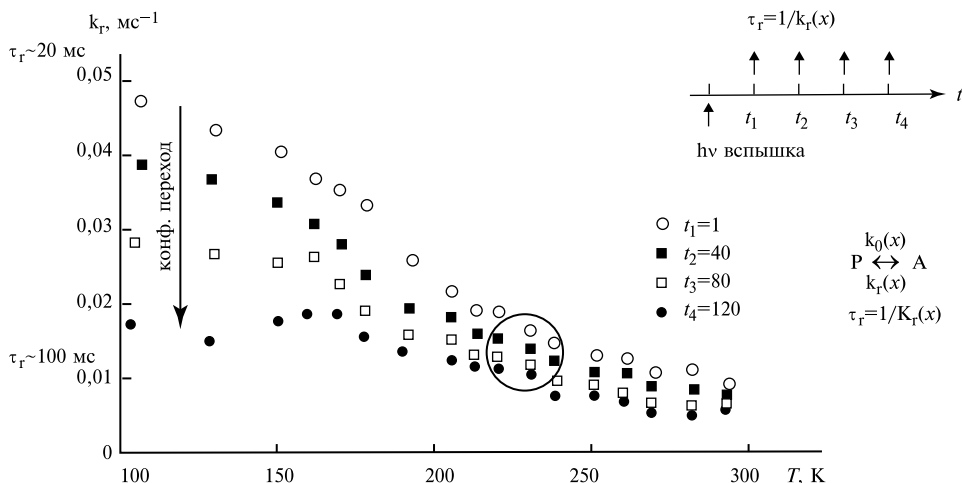


Рис. XXVIII.11.

Зависимость скорости конформационного перехода от времени и температуры после вспышки (объяснения в тексте) (по А. В. Rubin et al., 1994)

Если провести такого же рода опыты при температуре ниже 200 К, то видно, что при этом скорость конформационного перехода замедляется. Если ждать после возбуждающей вспышки те же промежутки времени: 1, 40, 80, 120 мс, то, поскольку конформационный переход при этих температурах замедлен, скорость возврата электрона не так сильно падает, как при температурах выше 230 К.

На рисунке можно видеть, что если мы производим охлаждение на свету, то сразу меняется конформационный потенциал и происходит движение системы вдоль новой конформационной координаты, появление которой индуцировано приходом электрона. При разных температурах мы фиксируем объект в разных состояниях и, следовательно, имеем набор процессов, связанных с возвратом электрона из разных точек на пути конформационного перехода. Интересно, что при температуре 100 К и ниже, когда скорость конформационного перехода сильно уменьшается, он тем не менее все равно происходит, хотя и требует значительно большего времени. Это означает, что путь, по которому происходит конформационный переход в РЦ, становится более длинным.

Таким образом, полученные результаты показывают, что константы скоростей реакций переноса электрона зависят от того, в каком конформационном состоянии находится соответствующий переносчик.

Движение системы вдоль конформационной координаты описываются уравнением Фоккера—Планка для внутримолекулярной динамики в плотно структурированной среде, которую представляет собой белок РЦ. Результаты (Шултен) численного моделирования внутримолекулярной динамики РЦ показали, что длины и углы связей атомных групп меняются на величины до  $0,4\text{--}1 \text{ \AA}$  при переносе электрона по цепи  $P \rightarrow \text{Бхл} \rightarrow \text{Бфф} \rightarrow Q_A$ .

Мы отсылаем читателя к теоретическому рассмотрению динамики фотоконформационного перехода, приведенному в Т. I, гл. XIII, § 11.

**Движение  $Q_B$ .** Возвращаясь к общему описанию «контактного» и «неконтактного» состояний, регулирующих скорости и эффективность переноса электрона, продолжим это рассмотрение применительно ко вторичному хинону. Движение  $Q_B$  при образовании контактного состояния можно рассмотреть на основании модели электронно-конформационных взаимодействий, где учитывается изменение конформационного потенциала при изменении зарядового состояния подвижной группы (см. § 8 гл. XIII; рис. XIII.13). Будем считать, что образование контактного состояния  $Q_A^- Q_B$  связано в основном с конформационной подвижностью  $Q_B$ , который, двигаясь в конформационном потенциале, приближается к  $Q_A^-$ , принимает от него электрон и переходит в анион-радикальное состояние  $Q_B^-$ . В отличие от схемы на рис. XIII.13  $Q_B^-$  из-за сильной электростатической стабилизации не может покинуть места посадки и практически прекращает свое диффузное движение, оставаясь в комплексе с  $Q_A$ . Только после принятия второго электрона, захвата  $2\text{H}^+$  и восстановления до  $Q_B\text{H}_2$  вторичный хинон начинает диффундировать в мембране.

Нейтральная дважды восстановленная форма хинона  $Q_B\text{H}_2$ , так же как и форма  $Q_B$ , обладает значительной подвижностью, и вследствие этого может быстро обмениваться на окисленный хинон мембранного пула. Возможность значительной латеральной диффузии хинона подтверждается данными о том, что коэффициенты диффузии для фосфолипидов составляют  $10^{-8}\text{--}10^{-9} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ . Это означает, что при двумерной диффузии хинон за 1 мкс смог бы пройти расстояние  $0,5\text{--}2 \text{ нм}$ . В последних работах Феера (1997) было показано, что после восстановления  $Q_B$  меняет свою позицию, сдвигаясь на  $0,45 \text{ нм}$  в сторону цитоплазмы и одновременно поворачиваясь на  $180^\circ$  относительно изопренового молекулярного хвоста. Результаты были получены при замораживании «световых» и «темновых» образцов РЦ и изучении их рентгенограмм в кристаллизованном состоянии.

## § 5. Математические модели первичных процессов переноса электрона в фотосинтезе

Из изложенного в гл. XXVII материала видно, что в фотосинтетических РЦ перенос электрона осуществляется как подвижными переносчиками, так и переносчиками, организованными в молекулярные комплексы. В первом случае процессы транспорта описываются бимолекулярными уравнениями второго порядка, основанными на применении закона действующих масс. Во втором случае математическое описание основывается на уравнениях для вероятностей переходов между разными состояниями молекулярного комплекса; эти состояния включают переносчики в соответствующих окислительно-восстановительных состояниях.  $\square$

**Общий вид уравнений переноса.** Математический аппарат, используемый в этих двух типах моделей, был подробно описан в гл. I–IV. Например, реакция переноса электрона между двумя подвижными переносчиками  $C_1$  и  $C_2$ , взаимодействующими в открытой цепи с внешними донором  $D$  и акцептором  $A$ ,



Кинетические уравнения имеют вид

$$dC_1^1/dt = k_1 D^1 C_1^0 - k_2 C_1^1 C_2^0; \quad dC_2^1/dt = k_2 C_1^1 C_2^0 - k_3 C_2^1 A^0, \quad (\text{XXVIII.5.2})$$

где  $D^1$ ,  $C_1^1$ ,  $C_2^1$  — концентрации восстановленных, а  $D^0$ ,  $C_1^0$ ,  $C_2^0$  — окисленных форм компонентов цепи,  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  — бимолекулярные константы скоростей соответствующих реакций.

Как правило, в цепи (XXVIII.5.1) общая концентрация переносчиков остается неизменной, т. е.  $C_1^1 + C_1^0 = C_{10}$ ;  $C_2^1 + C_2^0 = C_{20}$ . Основное условие применения закона действующих масс заключается в том, что редокс-состояния отдельных переносчиков в ЭТЦ независимы. Они определяются лишь окислительно-восстановительным состоянием среды, с которой переносчики находятся в равновесии. Это означает, что в условиях равновесия в темноте исходные концентрации окисленных и восстановленных форм переносчиков задаются окислительно-восстановительным потенциалом среды  $E_h$ . А именно, согласно уравнению Нернста,

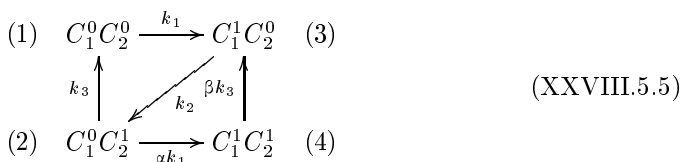
$$E_h = E_{1/2} + (RT/F) \ln(C_1^1/C_1^0) \quad (\text{XXVIII.5.3})$$

или отсюда

$$C_1^1 = \frac{C_{10}}{1 - \exp\left(\frac{(E_{1/2} - E_h)F}{RT}\right)}, \quad (\text{XXVIII.5.4})$$

где  $E_{1/2}$  — нормальный потенциал полувосстановления переносчика,  $E_h$  — равновесный окислительно-восстановительный потенциал среды,  $F$  — число Фарадея.

Включение света вызывает перенос электрона в соответствии с уравнениями (XXVIII.5.2) при начальных условиях (XXVIII.5.4). Однако независимость редокс-состояний переносчиков нарушается при отсутствии равновесия со средой, например на свету, когда редокс-состояние переносчиков определяется фотоиндуцированным потоком электронов. При наличии кооперативности в переносе электрона в комплексах, когда переносчики влияют друг на друга, их окислительно-восстановительные состояния также становятся взаимозависимыми. В этих случаях применяются описание «в комплексе», которое позволяет учитывать также состояния, отличные от окисленных и восстановленных: протонированные, депротонированные, конформационные. Если перенос электрона по схеме (XXVIII.5.1) осуществляется в комплексе из двух переносчиков, то размеченный граф состояний этого комплекса ( $C_1$ ,  $C_2$ ) будет иметь следующий вид:





Здесь цифры в скобках указывают номер состояния комплекса ( $C_1C_2$ ),  $k_i$  — константы скоростей соответствующих переходов, указанных на схеме (XXVIII.5.1). Кооперативность в переносе может проявляться в том, что константы скоростей переходов между состояниями комплекса зависят от состояний переносчиков, не принимающих непосредственного участия в реакции. В (XXVIII.5.5) степень кооперативности для переходов



характеризуется параметрами  $\alpha$  и  $\beta$ , которые показывают, как зависит процесс восстановления  $C_1$  или окисления  $C_2$  от редокс-состояний переносчиков  $C_1$  или  $C_2$  соответственно. При  $\alpha = \beta = 1$  кооперативность отсутствует; система дифференциальных уравнений в этом случае для вероятностей состояний комплекса ( $C_1C_2$ ) в схеме (XXVIII.5.5) имеет вид

$$\begin{aligned} \frac{dp_1}{dt} &= k_3p_2 - k_1p_1, & \frac{dp_2}{dt} &= k_2p_3 - (k_1 + k_3)p_2, & \sum_{i=1}^4 p_i &= 1. & (XXVIII.5.6) \\ \frac{dp_3}{dt} &= k_1p_1 + k_3p_4 - k_2p_3, & \frac{dp_4}{dt} &= k_1p_2 - k_3p_4, & & \end{aligned}$$

Решив систему уравнений (XXVIII.5.6) относительно вероятностей  $p_i$  состояний комплекса ( $C_1C_2$ ), можно найти вероятности состояний отдельных переносчиков. Для этого надо просуммировать вероятности всех тех состояний комплекса, в которых рассматриваемый переносчик находится в интересующем нас состоянии. Так, вероятность того, что первый переносчик находится в окисленном состоянии  $C_1^0$ , равна сумме вероятностей состояний (1) и (2) комплекса в схеме (XXVIII.4.5):

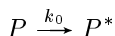
$$p(C_1^0) = p(C_1^0C_2^0) + p(C_1^0C_2^1) = p_1 + p_2 = 1 - p(C_1^1). \quad (XXVIII.5.7)$$

∎ Суммарная скорость  $v$  переноса электрона между  $C_1$  и  $C_2$  в комплексе пропорциональна концентрации комплексов, находящихся в состоянии  $C_1C_2^0$  ( $v = k_2[C_1^1C_2^0]$ ). Здесь в едином акте происходит как окисление  $C_1$ , так и восстановление  $C_2^0$ . Поэтому если оба переносчика, входящие в комплекс, либо окислены, либо восстановлены, переноса электрона между ними нет. Следовательно, компоненты одного и того же комплекса взаимодействуют между собой, а отдельные комплексы изолированы друг от друга. В фотосинтезе это соответствует параллельным изолированным цепям переноса электронов. ∎


В бимолекулярных реакциях, протекающих в растворах для восстановленного переносчика  $C_1^1$ , всегда найдется окисленный  $C_2^0$ , между которыми и произойдет перенос электрона.

В фотосинтетической цепи переноса электронный поток запускается при поглощении кванта света фотоактивным пигментом  $P$ , чему соответствует «световая» константа скорости  $k_0$  генерации возбуждаемых молекул  $P^*$ .

В схеме функционирования РЦ [см. (XXVII.5.1)] для перехода



$k_0$  равна произведению интенсивности  $I$  падающего света на сечение поглощения  $\sigma$ :  $k_0 = I\sigma$  ( $\text{с}^{-1}$ ). На прямом солнечном свете  $I_{\text{max}}$  составляет  $\sim 10^{16}$  квант  $\cdot \text{см}^{-2}\text{с}^{-1}$  и  $\sigma \sim 10^{-16}$   $\text{см}^2$ . В этом случае значение  $k_0$  близко к единице (см. § 3 гл. XXVII). Следовательно, на постоянном свете значение  $k_0$  лимитируется интенсивностью света или частотой попадания квантов в РЦ. Истинные времена и константы переноса электрона в ЭТЦ можно определить в условиях, когда интенсивность света не является лимитирующим фактором. Это достигается (см. гл. XXVII) при возбуждении короткими лазерными импульсами длительностью  $10^{-11}$  с мощностью  $10^{22}$ – $10^{25}$  квант  $\cdot \text{с}^{-1}$  (или  $10^{11}$ – $10^{14}$  квант в импульсе).

 **Модель переноса в комплексе  $PQ_AQ_B$ .** На основании данных о функционировании ЭТЦ составляются математические модели, описывающие окислительно-восстановительные превращения переносчиков. Результаты теоретического исследования свойств математической модели позволяют описать зависимость стационарных концентраций и переходных кривых редокс-превращений переносчиков при включении и выключении возбуждающего света от значений констант переноса, и в частности, от величины  $k_0$ . Сопоставление этих результатов с экспериментальными данными дает возможность не только проверить справедливость исходных предположений о характере функциональной организации ЭТЦ, но и определить значения констант переноса и соотношение между ними на отдельных участках цепи.  $\square$

Идентификация моделей включает выбор структуры модели и определение ее параметров, наилучшим образом соответствующих экспериментальным данным по кинетике переноса электрона. Для этого необходимо построение моделей фрагментов ЭТЦ, ее отдельных участков, для которых имеются достоверные кинетические данные.

Для идентификации параметров используются кинетические (рис. XXVIII.10) кривые фотоиндуцированных изменений поглощения, отражающие редокс-превращения  $P$  и хинонных акцепторов. Условия однозначности идентификации параметров сформулированы лишь для линейных систем, к которым относятся изолированные бактериальные РЦ, комплексы ФС I. В случае более сложных нелинейных систем привлекаются дополнительные критерии зависимости кинетических характеристик от режима освещения, действия ингибиторов. Идентификация проводится путем минимизации суммы взвешенных квадратов отклонений теоретических значений переменных от экспериментальных.

Идентификация модели показала, что значения констант скорости переноса электрона в реакции рекомбинации  $P^+ \leftarrow Q_A^-$  в темноте или на свету не одинаковы, а отличаются друг от друга по крайней мере на порядок. Этот результат соответствует изложенным выше представлениям о различных конформационных состояниях РЦ, формирующихся в темноте или на свету при функционировании ЭТЦ. Причина столь большого различия в значения «темновых» и «световых» констант не может быть вызвана только изменением кулоновских взаимодействий и перекрыванием электронных волновых функций при изменении редокс-состояний переносчиков, а связана с процессом реорганизации белка РЦ. Анализ этого фактора проводили по зависимости константы рекомбинации  $P^+ \leftarrow Q_A^-$  от коэффициента конформационной диффузии  $D$  и разницы в расстояниях  $\Delta R$  между компонентами

донорно-акцепторной пары в темновой и световой конформациях

$$\bar{k} = \frac{D}{a\Delta R \exp(-E/kT)},$$

где  $a$  — ширина энергетической ямы,  $E$  — энергия активации. В результате удалось получить значение характерного времени завершения полных конформационных перестроек в белке РЦ ( $\tau \lesssim 10^2$  с) (Ризниченко, Шайтан). Этот результат интересен также в том отношении, что показывает возможности современных методов математического моделирования по теоретическому определению параметров объекта, которые используются в уравнениях, но не могут быть найдены непосредственно в экспериментах. Для железосерных центров в фотовосстанавливающей части ФС I также оказалось, что константы возврата электрона на  $P_{700}^+$  изменяются на свету и в темноте, что соответствует представлениям об изменении их конформационного состояния в процессе переноса электрона. Таким образом, идентификация параметров математических моделей может стать серьезным инструментом в изучении реальных свойств фотосинтетического электронного транспорта.