



УДК 577.3

© 2000 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНЫХ РЕАКЦИЙ
И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ФОТОАКТИВНОГО БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА В РЕАКЦИОННЫХ
ЦЕНТРАХ *Rhodobacter sphaeroides*, МОДИФИЦИРОВАННЫХ D₂O
И КРИОРАСТВОРИТЕЛЯМИ

П.М. Красильников, В.В. Горохов, Е.А. Горячева,
П.П. Нокс, В.З. Пащенко, А.Б. Рубин

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119899 Москва, Воробьевы горы, тел. 939-11-07; факс: (095)939-1115

Исследовано влияние дейтерирования, добавления глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО) на редокс-потенциал E_m бактериохлорофилла специальной пары P_2 или $(P_M P_L)$, скорость миграции энергии от бактериофеофитина H_M к $(P_M P_L)$, перенос электрона от $(P_M P_L)$ к бактериофеофитину H_L и затем к хинону Q_A в реакционных центрах (РЦ), *Rhodobacter sphaeroides*. Показано, что замещение $H_2O \rightarrow D_2O$ не изменяет величину потенциала E_m специальной пары, тогда как добавление 70% глицерина и 35% ДМСО (по объему) увеличивает значение E_m на 30 и 45 мВ соответственно. Константы скоростей миграции энергии $k_m (H_M \xrightarrow{k_m} P_2)$, разделения зарядов $k_c ((P_M P_L)^+ H_L \xrightarrow{k_c} (P_M P_L)^+ H_L^-)$, переноса электрона на хинон k_Q не изменялись при добавлении глицерина, изотопное замещение и добавление ДМСО увеличивало значения k_m , k_c , k_Q в 2–3 раза.

Проведен теоретический анализ зависимости потенциала редокс-центра от диэлектрической проницаемости ϵ , набухания белковой глобулы в растворителе, а также от микроскопических параметров – изменения распределения зарядов (зарядовых смещений) в белковом интерьере вблизи редокс-центра. Показано, что замена H_2O на ДМСО может привести к увеличению E_m на десятки милливольт. Обнаружено отсутствие корреляции между изменениями величины E_m и скорости разделения зарядов k_c при изотопном замещении и добавлении криопротекторов. Оценено влияние изменения ϵ среды на скорость переноса электрона в результате уменьшения энергии межмолекулярного взаимодействия между донором и акцептором.

Первичные процессы фотосинтеза пурпурных бактерий происходят в пигмент-белковых комплексах реакционных центров (РЦ), включающих интегрированные в структуру белка первичный донор – димер бактериохлорофилла ($P_M P_L$ или P_2), две молекулы мономерного бактериохлорофилла V_L и V_M , локализованные в активной (L) и неактивной (M) цепях электронного транспорта, а также две молекулы бактериофеофетина H_L и H_M и две молекулы хинонов Q_A и Q_B . Разделение зарядов осуществляется в результате переноса электрона из возбужденного состояния $(P_M P_L)^+$ к H_L при участии молекулы V_L за время ~ 3 пс. Дальше за время ~ 200 пс электрон переносится от H_L к Q_A [1–3].

Особенностью первичных процессов фотосинтеза является то, что реакция переноса электрона отличается высокой квантовой эффективностью ($>0,9$) и направленностью. Несомненный интерес представляет исследование роли белкового окружения в этих быстрых высокоэффективных процессах, запускаемых возбуждением димера и начальным разделением зарядов.

Ранее мы показали, что в присутствии ряда криорастворителей, включая глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), происходят выраженные изменения фототрансформирующей активности РЦ: наблюдается замедление скорости миграции энергии и разделения зарядов в порфириновом комплексе РЦ, снижение эффективности фотопереноса электрона в системе хинонных акцепторов, увеличение скорости темновой рекомбинации разделенных зарядов [4-8].

Анализируя полученные данные, мы высказали предположение, что эффекты, вызываемые криорастворителями, связаны с изменениями внутримолекулярной динамики фотосинтетического аппарата (в частности, в результате модификации внутрибелковых водородных связей), приводящими к замедлению релаксационных процессов, сопровождающих стабилизацию фотомобилизованного электрона на кофакторах, к реализации определенных структурно-динамических состояний РЦ, характеризующихся различными константами скоростей переноса электрона [4-8]. Замещение в образцах H_2O на D_2O вызывало эффект, подобный влиянию криорастворителей на отдельные стадии электронного транспорта в бактериальных РЦ – стабилизацию фотомобилизованного электрона на бактериофеофитине (H_L) и последующий перенос электрона к первичному хинону (Q_A). Степень оказываемого криорастворителями воздействия на функциональные процессы в РЦ коррелировала с их способностью проникать в гидрофобные области препаратов и величиной их протон-акцепторной силы. Вместе с тем нельзя исключить, что способность криорастворителей модифицировать водородные связи и влиять на полярность окружения редокс центров может непосредственно изменять термодинамические характеристики (величины редокс-потенциалов) переносчиков электрона в РЦ и прежде всего фотоактивного донора электронов. Соответственно этому изменения электрон-транспортной активности РЦ под действием криопротекторов могут зависеть и от изменения величины свободной энергии состояний при разделении зарядов в результате сдвигов редокс-потенциала переносчиков электрона.

В данной работе мы исследовали влияние дейтерирования, добавления трехатомного спирта глицерина и апроtonного криорастворителя диметилсульфоксида (ДМСО) на окислительно-восстановительные свойства фотоактивного димера P_2 в РЦ пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides*. Эти результаты сопоставлены с данными о влиянии указанных воздействий на функциональные процессы в окружении специальной пары $P_M P_L$ – миграцию энергии с H_M неактивной ветви кофакторов РЦ к P_2 , разделение зарядов между P_2 и H_L и перенос электрона на хинонный акцептор Q_A .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

РЦ изолировали из хромофоров клеток *Rb. sphaeroides*, дикий тип. Хромофоры в 10 mM Na-фосфатном буфере, pH 7,0 инкубировали с 0,5% детергента ЛДАО в течение 30 мин при 4 °C, затем центрифугировали 2 ч при 144 000g. РЦ отделяли хроматографированием на оксиапатите согласно [9]. Фракция, обогащенная РЦ, снималась с колонки при помощи 150–200 mM Na-фосфатного буфера, содержащего 0,05% ЛДАО. Затем эту фракцию обрабатывали сульфатом аммония (28% от насыщения), плавающий осадок суспендировали в 10 mM Na-фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 0,05% ЛДАО, диализовали в течение суток при 4 °C против избытка этого же буфера и повторяли хроматографирование на оксиапатите.

Для редокс-титрования использовали РЦ в 50 mM трис-HCl-буфере, содержащем 0,05% ЛДАО, pH 7,5. В абсорбционных пикосекундных измерениях использовали РЦ в 10 mM трис-HCl-буфере, содержащем 0,025% холата Na, pH 8,0. Как оказалось, препараты РЦ в такой среде инкубирования существенно устойчивы против денатурации при процедуре высушивания и последующего ресуспендирования в H_2O (D_2O), а также не агрегируют при высоких концентрациях белка в образцах, необходимых для пикосекундных измерений (концентрация по фотоактивному бактериохлорофиллу (Бхл) около $0,5 \cdot 10^{-3}$ M).

Для замещения H_2O на D_2O препараты РЦ лиофильно высушивали при давлении $\sim 10^{-1}$ мм рт.ст. в течение 2,5–3 ч, а затем ресуспендировали в D_2O (изотопное замещение 99,8%) или H_2O (контроль).

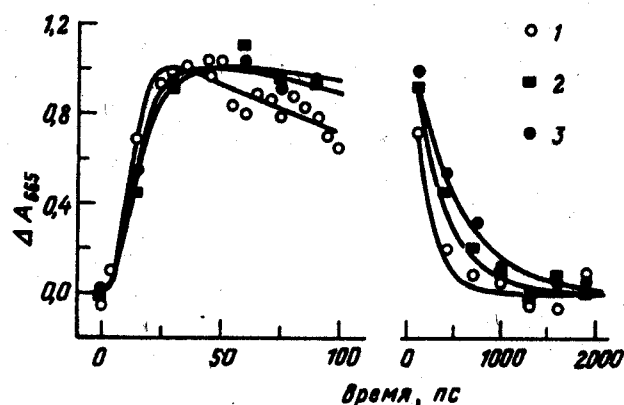
Амплитуду фотоиндуцированных изменений поглощения P_2 при редокс-титровании фотоактивного пигмента измеряли в Q_x полосе поглощения Бхл при 603 нм с помощью однолучевого дифференциального спектрофотометра с лазерным возбуждением (530 нм, полуширина возбуждающего импульса 15 нс, энергия 50 мДж). (Эти измерения выполнены М.Д. Мамедовым и А.Ю. Семеновым, НИИ физико-химической биологии МГУ [10]). Редокс-потенциал измеряли с помощью платинового и хлорсеребряного электродов. Измерительный электрод калибровали по стандартному раствору ферро/феррицианида при 25 °С. Феррицианид калия использован как титрующий агент, а 2,3,5,6-тетраметил-*n*-фенилендиамин (DAD) применялся как редокс-медиатор. ДМСО (квалификации х.ч. отечественного производства), глицерин и другие реактивы фирмы "Sigma" (США). Глицерин добавляли к образцам в концентрации до 70% по объему. Это обычно используемая в низкотемпературных спектральных оптических измерениях концентрация, способствующая образованию переохлажденных состояний – низкотемпературного "стекла", с существенно лучшими оптическими характеристиками по сравнению с мелкокристаллическими структурами льда. ДМСО добавляли в концентрации 35% – в соответствии с выраженностью оказываемого данной добавкой эффекта на функциональные показатели РЦ [4].

Изменения поглощения, отражающие появление и распад анион-радикальной формы H_L после импульсной световой активации РЦ, регистрировали при 665 нм на абсорбционном пикосекундном спектрофотометре, имеющем длительность возбуждающего и зондирующего импульсов 5 пс, точность измерения изменений оптической плотности $\Delta D - 3 \cdot 10^{-3}$. Длина волны возбуждения составляла 532 нм (Q_x полоса поглощения H_M) либо 590 нм. Математическую обработку кинетических данных производили путем варьирования параметров системы дифференциальных уравнений, описывающих переходы в РЦ, решение этой системы сворачивалось с функцией $\phi(t)$, характеризующей форму зондирующего импульса ($\phi(t)$ выбиралась гауссовой с полушириной, равной 5 пс).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Редокс-титрование фотоокисления димера Бхл по его поглощению в РЦ в 50 мМ трис- HCl -буфере, рН 7,5 дало значение среднеточечного потенциала $E_m = 430$ мВ, что соответствует результатам, полученным для этого вида пурпурных бактерий ранее [11]. Замещение в препаратах РЦ H_2O на D_2O не выявило отличий в ходе кривой редокс-титрования по сравнению с контролем. Результаты редокс-титрования изменений поглощения в образцах, содержащих 70% глицерина или 35% ДМСО, дали значения E_m для P_2 460 и 475 мВ соответственно.

Таким образом, добавление глицерина и ДМСО в отличие от дейтерирования изменяет величину E_m первичного донора электрона в РЦ. Известно, что величина E_m определяется локальным зарядовым окружением электронной пары. Очевидно, крио-растворители, модифицирующие водородные связи в локусе редокс-центра (димера Бхл), могут тем самым изменять и локальные диэлектрические свойства белка вблизи димера Бхл. Такое предположение согласуется с заключением [12], что экспериментально измеряемая величина окислительно-восстановительного потенциала димера Бхл в РЦ зависит не только от влияния связанной воды и окружающего раствора, но и от состояния водородных связей биополимера [13]. Применительно к фотосинтетическим РЦ об этом, в частности, свидетельствуют результаты точечного мутагенеза. Так, в работах [14, 15] для РЦ *Rb. sphaeroides* было показано, что добавление в результате аминокислотных замен новых водородных связей между первичным донором и белком приводит к повышению среднеточечного потенциала P_2 , причем пропор-



Нормированные кинетики фотоиндуцированных изменений поглощения анион-радикала H_L^- при 665 нм в РЦ *Rb. sphaeroides*. Длина волны возбуждения $\lambda_{ex} = 590$ нм (Q_X переход димера специальной пары P_2). 1 – контрольные образцы; 2 – препараты РЦ, модифицированные заменой $H_2O \rightarrow D_2O$; 3 – образцы, модифицированные добавлением ДМСО (35% по объему). Сплошные кривые построены в соответствии с кинетической схемой (1). Значения варьируемых параметров $k_c = 1/\tau_c$ и $k_Q = 1/\tau_Q$ приведены в табл. 1

ционально количеству дополнительных водородных связей. Однако аналогичные исследования, проведенные на РЦ *Rps. viridis*, свидетельствуют, что и уменьшение числа водородных связей в окружении P_2 может приводить к повышению его редокс-потенциала [16]. Таким образом, из этих работ следует, что как увеличение, так и уменьшение числа водородных связей между первичным донором и белком может приводить к увеличению редокс-потенциала P_2 . Скорость разделения зарядов между P_2 и первичным акцептором бактериофеофетином в обеих ситуациях уменьшалась [15, 16].

В нашей работе мы проанализировали влияние модификации водородных связей РЦ на следующие функциональные процессы с участием фотоактивного пигмента: миграцию энергии с H_M на P_2 , разделение зарядов между P_2 и H_L и последующий перенос фотомобилизованного электрона к Q_A . Результаты экспериментальных исследований представлены на рисунке и в табл. 1.

Значения представленных в табл. 1 кинетических параметров $\tau_c = 1/k_c$ и $\tau_Q = 1/k_Q$ определяли при аппроксимации экспериментальных кинетических кривых теоретическими (рисунок), получаемыми посредством решения системы дифференциальных урав-

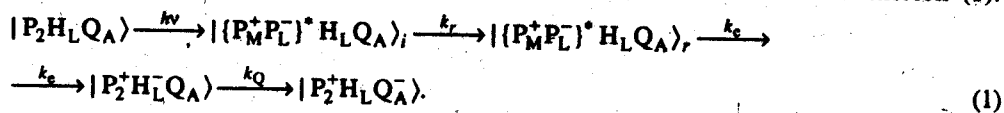
Таблица 1

Значения кинетических параметров, характеризующих функциональную активность РЦ *Rb. sphaeroides* в контрольных препаратах и образцах, модифицированных изотопным замещением $H_2O \rightarrow D_2O$, а также добавлением 70% глицерина и 35% ДМСО (v/v)

λ_{ex}	Параметр	Контроль	$H_2O \rightarrow D_2O$	70% глицерин	35% ДМСО
590 нм	τ_c , пс	$3,4 \pm 0,5$	$8,5 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,5$	$10,8 \pm 0,8$
	τ_Q , пс	205 ± 5	350 ± 10	230 ± 5	510 ± 20
532 нм	τ_m , пс	$3,2 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,5$
	τ_c , пс	$3,5 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,5$	$9,8 \pm 0,8$
	τ_Q , пс	195 ± 5	340 ± 5	240 ± 5	490 ± 20

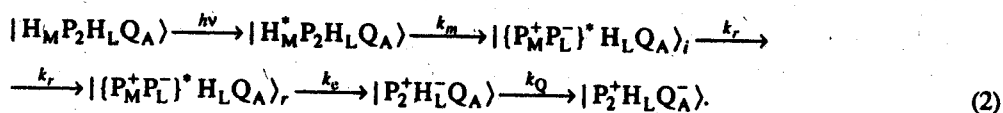
Примечание. λ_{ex} – длина волны возбуждения; τ_m – время миграции энергии $H_M^* \rightarrow P_2$; τ_c – время разделения зарядов между P_2 и H_L ; τ_Q – время переноса электрона от H_L к хинонному акцептору Q_A .

нений, описывающих переходы между состояниями РЦ в соответствии со схемой (1):



В этой схеме k_e , k_Q — константы скоростей разделения зарядов и переноса электрона на хинонный акцептор Q_A . В схеме (1) учтена релаксация начального состояния $|(P_M^+ P_L^-)^* H_L Q_A\rangle_i$ в конечное $|(P_M^+ P_L^-)^* H_L Q_A\rangle_r$, состояние РЦ, которое предшествует состоянию с разделенными зарядами $|P_2^+ H_L^- Q_A\rangle$. Константа скорости релаксации начального возбужденного состояния РЦ в отрелаксированное возбужденное состояние — k_r .

Для определения значения константы скорости миграции энергии $k_m = 1/\tau_m$ фотовозбуждение образца осуществляли в Q_X полосе поглощения H_M ($\lambda_{cx} = 532$ нм). Характер экспериментальных кинетических кривых переходных процессов ($\lambda_{per} = 665$ нм), сопровождающих образование и распад анион-радикала H_L в этом случае был близок к таковому, показанному на рисунке. Отличие заключалось главным образом в затягивании переднего фронта кинетик, связанным с замедлением процесса образования H_L^- за счет миграции энергии $H_M^* \rightarrow P_2$. Последовательность событий в РЦ в этом случае может быть представлена в виде следующей схемы:



В схеме (2) $k_m = 1/\tau_m$ — константа скорости миграции энергии $H_M^* \rightarrow P_2$. Значения параметров k_m , k_e и k_Q , указанных в схеме (2), приведены в табл. 1.

Обобщенные результаты исследования влияния модифицирующих воздействий на средноточечный окислительно-восстановительный потенциал P_2 и константы скорости разделения зарядов k_e и переноса электрона на хинон k_Q в РЦ *Rb. sphaeroides* сопоставлены в табл. 2.

Видно, что криоразтворители, обычно используемые в биологических экспериментах — глицерин и ДМСО, могут влиять на термодинамические характеристики редокс-центров в функциональных белках. Сам по себе этот факт заслуживает внимания и должен, очевидно, учитываться в соответствующих исследованиях. Вместе с тем мы не наблюдали корреляции между изменением редокс-потенциала P_2 при модификации РЦ в результате изотопного замещения H_2O на D_2O и добавления к препаратам исследовавшихся криоразтворителей и влиянием данных воздействий на функциональные процессы с участием P_2 . Так, дейтерирование РЦ не изменяло редокс-потенциал P_2 , а добавление к препаратам РЦ 35% ДМСО сдвигало этот потенциал на 45 мВ. Влияние же дейтерирования на скорости разделения зарядов (k_e) и переноса электрона (k_Q) (см. табл. 2), было одного порядка с влиянием ДМСО. Добавление 70% глицерина сдвигало E_m первичного донора на величину, составляющую 2/3 от эффекта добавления ДМСО, что, однако, не отражалось заметным образом на величине констант скорости k_e и k_Q (см. табл. 2). Последние начинали изменяться, как было показано нами ранее [4], только при концентрациях глицерина выше 90%, причем степень этих изменений заметно меньше, чем при дейтерировании РЦ или добавлении ДМСО.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В общем виде влияние диэлектрического окружения на потенциал некоторого редокс-центра можно учесть на основании теории локального поля Лоренца [17]. Это влияние определяется двумя составляющими: 1) макроскопическими диэлектрическими

Влияние дейтерирования и добавления глицерина или ДМСО на редокс-потенциал (E_m) специальной пары P_2 , скорость разделения зарядов k_s между P_2 и H_L и перенос электрона от H_L на хинон k_Q .

Образец	E_m , мВ	k_s , пс ⁻¹	k_Q , нс ⁻¹
Контроль	430	0,29	4,76
$H_2O \rightarrow D_2O$	430	0,12	2,86
70% Глицерин	460	0,28	4,35
35% ДМСО	475	0,092	1,96

параметрами среды и 2) деталями микроскопической структуры ближайшего атомного окружения редокс-центра.

Обозначим заряд редокс-центра через Q , диэлектрические постоянные белка и растворителя ϵ_p и ϵ_s соответственно. Заряд Q оказывает поляризующее воздействие на диэлектрик, а эта поляризация в свою очередь – на электрический потенциал редокс-центра. В такой самосогласованной системе изменение одного параметра влечет за собой изменение другого. Молекулы растворителя, в котором находится белок, могут частично проникать внутрь глобулы белка. Если набухание по радиусу глобулы неравномерное (например в силу того, что наружные слои более рыхлые), то диэлектрическая постоянная глобулы будет функцией радиального расстояния от редокс-центра $\epsilon_p = \epsilon_p(r)$. Радиус сферической глобулы белка при набухании будет изменяться от значения R_{in} , отвечающего исходному состоянию, до R_{fm} – радиуса набухшей глобулы. В рамках теории Лоренца [17] потенциал на редокс-центре примет вид:

$$\phi_1 = Q \int_{R_L}^{\infty} \frac{dr}{\epsilon(r)r^2} - \frac{Q}{R_L}, \quad (3)$$

где ϕ_1 – интегральный вклад в потенциал редокс-центра от окружающего выделенную полость (полость Лоренца) объема диэлектрика; R_L – радиус полости Лоренца (выделенной вокруг редокс-центра сферы, на границах которой учитываются поляризационные заряды от остальной части диэлектрика). Условие на бесконечности: $\phi(\infty) = 0$.

Анализируя уравнение (3), вначале пренебрежем эффектом набухания глобулы, а учтем только диэлектрические постоянные белка и растворителя. Зависимость $\epsilon(r)$ в этом случае примет вид:

$$\epsilon(r) = \begin{cases} \epsilon_p & R_L \leq r \leq R_{in} \\ \epsilon_s & r > R_{in} \end{cases}$$

Подставив значение $\epsilon(r)$ в уравнение (1) и выполнив интегрирование, получим:

$$\phi_1^0 = \left(\frac{1}{\epsilon_p} - 1 - \gamma_p \left(\frac{1}{\epsilon_p} - \frac{1}{\epsilon_s} \right) \right) \frac{Q}{R_L}, \quad (4)$$

где $\gamma_p = R_L/R_{in}$.

Уравнение (4) позволяет оценить изменение потенциала ϕ_1^0 редокс-центра при замене, например, воды на ДМСО. Пусть $R_L = 15 \text{ \AA}$ – некое ориентировочное минимальное расстояние от центра, сравнимое с радиусом экранирования Дебая [17], когда диэлектрическую среду вне этой сферы можно характеризовать некоторой усредненной диэлектрической постоянной без учета деталей микроскопической структуры. Если R_{in} принять равным $25 \text{ \AA}$, то для γ_p получится значение 0,61. Диэлектрические постоянные воды, ДМСО и белка возьмем равными соответственно $\epsilon_s = 80$, $\epsilon_D = 49$,

$\epsilon_p = 3$ (ϵ для белка РЦ обычно выбирают в интервале 2–4 [18]). Оказывается, что при этих условиях изменение потенциала $\Delta\phi_1^0 = \phi_1^0(\text{H}_2\text{O}) - \phi_1^0(\text{ДМСО})$ составляет ~ 5 мВ. Таким образом, уже простая замена растворителя может повлиять на потенциал редокс-центра.

Учтем теперь возможность эффекта набухания белка. Каким при этом будет вид функции $\epsilon_p = \epsilon_p(r)$, априори сказать сложно, так как это зависит от многих факторов. Одной из наиболее простых является степенная зависимость, которую можно представить в виде:

$$\epsilon(r) = \epsilon_p^0 - (\epsilon_p^0 - 1)r/R_{\text{fin}} + (\epsilon_s^0 - 1)r/R_{\text{fin}}, \quad (5)$$

где индекс 0 указывает на значение ϵ для чистого вещества. Используя соотношение (5), из (3) получим следующее значение потенциала после набухания белка от R_{in} до R_{fin} :

$$\phi_1^{\text{fin}} = \frac{Q}{R_L} \left[\frac{1}{\epsilon_p^0} - 1 - \gamma_{\text{fin}} \left(\frac{1}{\epsilon_p^0} - \frac{1}{\epsilon_s^0} \right) + \frac{\Delta\epsilon_0}{\epsilon_p^2} \gamma_{\text{fin}} \ln \left(\frac{\epsilon_s^0}{\Delta\epsilon_0 + \epsilon_p^0 \gamma_{\text{fin}}^{-1}} \right) \right], \quad (6)$$

где $\gamma_{\text{fin}} = R_L / R_{\text{fin}}$, $\Delta\epsilon_0 = \epsilon_s^0 - \epsilon_p^0$.

С помощью выражения (6) оценим сдвиг потенциала $\Delta\phi_1^{\text{fin}}$ при замене воды на ДМСО. Для оценки величины γ_{fin} воспользуемся полученным нами совместно с Р.Л. Каюшиной (Институт кристаллографии РАН) методом рентгеновского малоуглового рассеяния экспериментальным фактом, что радиус инерции белка РЦ *Rh. sphaeroides* в 40% растворе ДМСО возрастает на 15%. В таком случае значение γ_{fin} составит $\sim 0,53$. Соответственно сдвиг потенциала редокс-центра в выбранных нами условиях достигает 9 мВ. Таким образом, если принять, что ДМСО проникает в белок, частично вытесняя воду и вызывая набухание глобулы, сдвиг потенциала редокс-центра оказывается заметно больше, чем в случае, если этого эффекта не учитывать. Тем не менее его величина меньше экспериментально наблюдаемого сдвига (~ 45 мВ) P_2 при действии ДМСО. В связи с этим учтем, что растворитель, проникая в белок, может вызывать сдвиг электростатического потенциала редокс-центра не только вследствие эффектов замещения одних малых молекул другими с новым значением ϵ и набухания глобулы, но и в результате возможного изменения распределения зарядов в белковом интерьере вблизи редокс-центра. Микроскопический вклад в потенциал редокс-центра от атомов, составляющих его ближайшее окружение и находящихся в сфере радиуса R_L , определяется выражением:

$$\phi_2 = \sum_i \frac{q_i}{r_i}, \quad (7)$$

где q_i – эффективный заряд в точке, отстоящей от редокс-центра на расстоянии r_i . Молекулы растворителя, проникая внутрь белковой глобулы и "расталкивая" атомы белка, могут вызвать смещение этих атомов или атомных групп из начальных положений. Очевидно, этот эффект будет также приводить к изменению ϕ_2 . При этом чем ближе к редокс-центру располагается сместившийся атом или группа атомов, тем более выраженными могут оказаться последствия их смещения для ϕ_2 . Так, вычисления, проведенные применительно к белку рубредоксину, показывают, что замена всего одного аминокислотного остатка в положении 44 (Val на Ala) вблизи редокс-центра сдвигает его потенциал на 50 мВ – из-за эффекта небольшого сдвига полярного "остова" полипептидной цепи [19].

Учитывая высокие значения дипольного момента и протон-акцепторной силы молекулы ДМСО [20, 21], вполне возможно допустить ее воздействие на легкие протон-содержащие группы в интерьере белка РЦ. Такое воздействие приведет к изменению

зарядового распределения в окружении редокс-центра, в том числе и через систему водородных связей. Выражение (7) можно переписать в виде:

$$\Delta\phi_2 = \sum_i q_i \frac{\Delta r_i}{(r_i^0)^2} \quad (8)$$

где смещение i -х зарядов $|\Delta r_i| = |r_i - r_0| \ll r_i^0$. Оценим порядок величины возможного изменения $\Delta\phi_2$. Так, если принять $q_i = e$, $\Delta r_i \sim 0,1 \text{ \AA}$, $r_0 \sim 10 \text{ \AA}$, то изменение потенциала от единичного сместившегося заряда будет порядка 1,5 мВ.

Таким образом, при объяснении наблюдаемых нами в эксперименте сдвигов редокс-потенциала P_2 при добавлении криоразтворителей, особенно ДМСО (см. табл. 2), необходимо учитывать эффекты, связанные не только с изменением интегрального значения ϵ в белке РЦ, но и с возможностью зарядовых смещений в окружении P_2 .

Проведенный анализ влияния факторов диэлектрического окружения на потенциал редокс-центра выполнен в самом общем виде, безотносительно к конкретной природе самого редокс-центра. Очевидно, эти же факторы аналогичным образом должны изменять не только потенциал первичного донора электрона в РЦ, но и потенциал акцептирующего донируемый электрон бактериофеофитина, причем в принципе на близкую величину. Другими словами, сдвиги окислительно-восстановительных потенциалов димера P_2 и промежуточного акцептора H_L при внедрении криоразтворителей в структуру РЦ должны происходить одновременно и в одну сторону. Следовательно, разность редокс-потенциалов P_2 и H_L будет изменяться в конечном итоге мало, не оказывая заметного влияния на скорость переноса электрона между ними. Экспериментальные результаты работы согласуются с данным заключением и свидетельствуют о существенной роли других факторов, помимо редокс-потенциалов, которые влияют на скорость разделения зарядов. Действительно, изотопное замещение $H_2O \rightarrow D_2O$ не влияет на величину среднеточечного потенциала P_2 , тогда как добавление глицерина (70% v/v) и ДМСО (35% v/v) увеличивает потенциал P_2 на 30 и 45 мВ соответственно (см. табл. 2). Вместе с тем изотопное замещение и добавление ДМСО приводят к замедлению как скорости разделения зарядов, так и переноса электрона на хинонный акцептор примерно в одинаковой степени – в 2–3 раза, тогда как добавление 70% глицерина практически не влияет на эти скорости (см. табл. 1, 2).

Учтем непосредственный эффект изменения ϵ среды на саму скорость переноса электрона. Действительно, из общих соображений следует, что энергия межмолекулярного взаимодействия в системе донор–акцептор будет зависеть от диэлектрической проницаемости растворителя ϵ_s , причем тем сильнее, чем ближе к поверхности белковой глобулы расположены взаимодействующие заряды. Это влияние обусловлено экранирующим действием сил изображения, возникающих на границе раздела двух различных диэлектриков – белка и растворителя [22].

Для оценки величины возможного эффекта изменения ϵ на скорость переноса электрона рассмотрим сферическую белковую глобулу с диэлектрической проницаемостью ϵ_p . В центре глобулы находится донор электрона, а акцептор располагается на расстоянии $L < R_p$, где R_p – радиус глобулы. Тогда в соответствии с теорией Джортнера [23] отношение констант скоростей переноса электрона при замене растворителя с диэлектрической проницаемостью $\epsilon_s^{(1)}(k_1)$ на растворитель с диэлектрической проницаемостью $\epsilon_s^{(2)}(k_2)$ можно представить в виде:

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{\left| 1 - \left(\frac{L}{2(R_p - L)} \right)^2 \frac{\epsilon_s^{(1)} - \epsilon_p}{\epsilon_p(\epsilon_s^{(1)} + \epsilon_p)} \right|^2}{\left| 1 - \left(\frac{L}{2(R_p - L)} \right)^2 \frac{\epsilon_s^{(2)} - \epsilon_p}{\epsilon_p(\epsilon_s^{(2)} + \epsilon_p)} \right|^2} \quad (9)$$

Нетрудно показать, что если в (9) диэлектрические постоянные растворителей различаются в 2 раза ($\epsilon_s^{(1)} = 2\epsilon_s^{(2)}$, что приблизительно отвечает случаям воды и глицерина или ДМСО), то отношение констант k_1/k_2 составит $\approx 0,96$. Однако в эксперименте замена воды, например на ДМСО, замедляет скорость переноса электрона гораздо сильнее, приблизительно в 3 раза.

Таким образом, модификация структуры РЦ путем изотопного замещения H_2O на D_2O , внедрения криорастворителей, способных частично замещать воду в этих белково-пигментных комплексах, влияет на скорости первичных стадий фототрансформации энергии в основном не вследствие изменения окислительно-восстановительных потенциалов переносчиков электронов. Этот эффект вызван действием других факторов. Он, по-видимому, определяется в первую очередь воздействием на структурно-динамическое состояние РЦ через систему его водородных связей, от состояния которой зависят скорости поляризационных перестроек (процессов сольватации) в интерьере донора и акцептора, сопровождающих перенос электрона.

Проблема переноса электрона в фотосинтезе относится к общей проблеме переноса зарядов в неупорядоченных средах, теория которого развивалась, в частности в работах [24, 25]. В диэлектрических средах в условиях равновесия всегда имеет место детальный баланс сил, поэтому вероятности (числа) прямых и обратных переходов равны. Для нарушения равновесия необходимо наложить на систему электрическое поле, которое будет вызывать более частые переходы электрона в определенном направлении.

Особенностью процесса переноса электрона по фотосинтетической электрон-транспортной цепи является то, что этот процесс с высокой эффективностью и направленностью происходит в присутствии внутренних электрических полей в окружении редокс-центров. Такие поля возникают в фотосинтетических макромолекулярных системах непосредственно в процессе разделения зарядов. Другими словами, после фотовозбуждения молекулы пигмента и последующего разделения зарядов в среде возникает электрическое поле, способствующее эффективной миграции энергии и переносу электрона от донора к акцептору.

Локальное электрическое поле (градиент потенциала), задающее направление движения электрона, определяется наличием следующих структурных особенностей среды: а) заряженными и полярными группами атомов в окружении донорно-акцепторных центров; б) поляризуемостью, связанной с конформационной подвижностью белковых молекул; в) диэлектрическими свойствами среды, окружающей молекулу белка. Другими словами, локальное электрическое поле в точке нахождения электрона определяется пространственным распределением зарядов, полярных групп и атомов вокруг донорно-акцепторного центра.

Разделение зарядов и первичная стабилизация электрона на хинонном акцепторе Q_A в РЦ пурпурных бактерий осуществляется за $10^{-12} - 10^{-10}$ с. Возникает вопрос, какие физические молекулярные процессы способны создать локальные электрические поля в окружении донора и акцептора электрона в пикосекундном временном диапазоне. Согласно теории электронно-конформационных взаимодействий, после фотовозбуждения электрона и его релаксации за $\sim 10^{-14}$ с к низшему колебательному уровню возбужденного электронного состояния возникает электрический диполь (дырка-электрон). За время существования этого диполя в результате взаимодействия его электрического поля с окружающими полярными группами возбуждаются колебательные моды белка, причем наибольшие смещения испытывают легкие ядра, например протоны, обладающие высокой подвижностью.

Идея о реориентации подвижных атомов водорода в электрическом поле диполя, возникающем при разделении зарядов в РЦ, была предложена в работах [26, 27]. Согласно [28, 29], смещение протонов воды в электрическом поле может происходить за $10^{-13} - 10^{-12}$ с. В результате такого взаимодействия часть энергии электронного возбуждения пигмента будет расходоваться на реполяризацию водородных связей,

т.е. переходить в энергию нового микроконформационного состояния макромолекулы. Перераспределение электронной плотности, отвечающее новой конформации, может привести к возникновению локального электрического поля $\vec{E}$, действующего в свою очередь на возбужденный электрон.

На величину и направление этого поля $\vec{E}$ могут влиять и макроскопические диэлектрические свойства жидкости, окружающей белковую молекулу, которые проявляются благодаря вектору поляризации раствора под действием электрического поля диполя. Поляризация среды, например, воды, возникает за времена $10^{-13} - 10^{-12}$ с. Влияние такого рода поляризационных процессов на константу скорости переноса электрона осуществляется через энергию донор-акцепторного взаимодействия V , а также через изменение свободной энергии, т.е. через параметры, входящие в выражение для константы скорости переноса электрона – формулу Джортнера [23].

Именно благодаря быстрой конформационной релаксации белковой молекулы, сопровождающейся перераспределением электронной плотности, ориентационной поляризацией водородных связей, а также вследствие макроскопического влияния окружающего диэлектрика происходит быстрая ($10^{-13} - 10^{-12}$ с) релаксация электронного уровня донора электрона, сопровождаемая расходом части энергии электронного возбуждения $\Delta E \sim 0,05$ эВ [8, 28, 30]. Потеря части энергии сильно понижает вероятность обратных реакций (выброс энергии возбуждения P_2^* в антенну, рекомбинация разделенных зарядов). Эти же релаксационные процессы способствуют возникновению оптимальной конфигурации для донор-акцепторного взаимодействия, в результате чего создаются условия для необратимого переноса электрона по электрон-транспортной цепи фотосинтеза в пикосекундном временном диапазоне.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований (проекты № 98-04-48874 и 98-04-48677) за частичную поддержку данной работы, а также проф. К.В. Шайтана за полезное обсуждение результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kirmaier C., Holten D., Parson W.W. // *Biochim. et biophys. acta*. 1985. V. 810. P. 33–40.
2. Paschenko V.Z., Korvatovsky B.N., Kononenko A.A., Chamorovsky S.K., Rubin A.B. // *FEBS. Lett.* 1985. V. 191. P. 245–248.
3. Shuvalov V.A., Klevanik A.V. // *FEBS. Lett.* 1983. V. 160. P. 51–55.
4. Paschenko V.Z., Korvatovsky B.N., Logunov S.L., Kononenko A.A., Knox P.P., Zakharova N.I., Grishanova N.P., Rubin A.B. // *FEBS Lett.* 1987. V. 214. P. 28–34.
5. Логунов С.Л., Васильев С.С., Корватовский Б.Н., Тусов В.Б., Нокс П.П., Гришанова Н.П., Пашенко В.З., Кононенко А.А. // *Докл. АН СССР*. 1988. Т. 299. № 4. С. 1004–1007.
6. Paschenko V.Z., Vasil'ev S.S., Gorokhov V.V., Knox P.P., Rubin A.B. // *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. The Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1995. V. 1. P. 491–494.
7. Paschenko V.Z., Gorokhov V.V., Grishanova N.P., Goryacheva E.A., Korvatovsky B.N., Knox P.P., Zakharova N.I., Rubin A.B. // *Biochim. et biophys. acta*. 1998. V. 1364. P. 361–372.
8. Горохов В.В., Нокс П.П., Корватовский Б.Н., Пашенко В.З., Рубин А.Б. // *Биол. мембраны*. 1998. Т. 15. С. 477–489.
9. Захарова Н.И., Фабиан М., Успенская Н.Я., Кононенко А.А., Рубин А.Б. // *Биохимия*. 1981. Т. 46. С. 1703–1711.
10. Чаморовский С.К., Мамедов М.Д., Семенов А.Ю., Захарова Н.И., Нокс П.П., Рубин А.Б. // *Докл. Академии наук*. 1998. Т. 361. С. 120–122.
11. Jackson J.B., Cogdell R.J., Crofts A.R. // *Biochim. et biophys. acta*. 1973. V. 290. P. 218–225.
12. Creighton S., Hwang J.-K., Warshel A., Parson W.W., Norris J. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 774–781.
13. Gekko K., Mugishima H., Kogo S. // *Intern. J. Biol. Macromol.* 1987. V. 9. P. 146–152.
14. Lin X., Murchison H.A., Nagarajan V., Parson W.W., Allen J.R., Williams J.C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 10265–10269.

15. Williams J.E., Alden R.G., Coryell V.H., Lin X., Marchison H.A., Peloquin J.M., Woodbury N.W., Allen J.P. // Research in Photosynthesis / Ed. Murata N. Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1992. V. 1. P. 377–380.
16. Bibikova M., Arlt Th., Zinth W., Oesterhelt D. // Photosynthesis: from Light to Biosphere. Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1995. V. 1. P. 867–870.
17. Браун В. Диэлектрики. М.: Иностран. лит., 1961. 326 с.
18. Michel-Beyerle M.E., Plato M., Deisenhofer J., Michel H., Bixon M., Jortner J. // Biochem. et biophys. acta. 1998. V. 932. P. 52–70.
19. Swartz P.D., Beck B.W., Jchye T. // Biophys. J. 1996. V. 30. P. 2958–2969.
20. Гордон А., Форд П. Спутник химика. М.: Мир, 1976.
21. Luck W.A.P. // Acta Chim. Hung. 1986. V. 121. P. 119–145.
22. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Электродинамика сплошных сред. М.: Наука, 1992. 664 с.
23. Jortner J. // J. Chem. Phys. 1976. V. 64. P. 4860–4867.
24. Anderson P.W. // Phys. Rev. 1958. V. 109. P. 1492.
25. Момм Н. Электроны в неупорядоченных структурах. М.: Мир, 1969. 172 с.
26. Fok M.V., Borisov A.Yu. // Stud. Biophys. 1981. V. 32. P. 115–124.
27. Фок М.В., Борисов А.Ю. // Мол. биология. 1981. Т. 15. С. 951–958.
28. Борисов А.Ю. // Мол. биология. 1996. Т. 30. С. 951–958.
29. Grant E.A., Sheppard R.J., South G.H. Dielectric behaviour of biological molecules in solution. Oxford: Clarendon Press, 1998. P. 257.
30. Streltsov A.M., Yakovlev A.G., Shkuropatov A.Ya., Shuvalov V.A. // FEBS Lett. 1995. V. 357. P. 239–241.

Поступила в редакцию
11.XI.1998
после доработки
1.II.1999

INVESTIGATION OF THE ELECTRON TRANSFER REACTIONS AND REDOX MIDPOINT POTENTIAL OF PHOTOACTIVE BACTERIOCHLOROPHYLL IN THE REACTION CENTERS OF *Rhodobacter sphaeroides* MODIFIED BY D₂O AND CRYOPROTECTANTS

P.M. Krasilnikov, V.V. Gorokhov, E.A. Goryacheva,
P.P. Knox, V.Z. Paschenko, A.B. Rubin

Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119899 Moscow, Russia

Changes of redox midpoint potential E_m of bacteriochlorophyll of the special pair ($P_M P_L$), the rates of energy migration from bacteriopheophytin H_M to ($P_M P_L$), electron transfer from ($P_M P_L$) to H_L and from H_L to quinone Q_A were investigated in reaction centers (RC) of *Rhodobacter sphaeroides* under the action of deuteration and addition of glycerol and DMSO. It was shown that $H_2O \rightarrow D_2O$ substitution did not change E_m of the special pair, while the addition of 70% glycerol and 35% DMSO (v/v) increases the value of E_m by 30 and 45 mV, correspondingly. Rate constants of energy migration k_{mi} ($H_M^* \xrightarrow{k_m} P_2$), charge separation k_e ($(P_M P_L)^* H_L \xrightarrow{k_e} (P_M P_L)^+ H_L^-$), electron transfer to Q_A k_Q remained stable upon addition of glycerol. On the other hand, isotopic substitution of water and addition of DMSO lead to a 2–3-fold increase of k_m , k_e and k_Q values.

Theoretical analysis of the dependence of the redox-center potential on the dielectric constant ϵ , swelling of the protein globule in solvent, and changing in the distribution of charges in the protein interior in the vicinity of the redox center was performed. It was shown that replacement of H_2O by DMSO resulted in the increase of E_m by tens of mV. There was no correlation between changes of E_m and k_m , k_e and k_Q under deuteration and DMSO addition in the RC's. Direct influence of changes in ϵ of the medium on the rate constants of electron transfer as a result of decrease of energy of intermolecular interaction between donor and acceptor molecules was analysed.