

УДК 577.3

УСКОРЕНИЕ РЕАКЦИИ РЕКОМБИНАЦИИ ФОТООКИСЛЕННОГО БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И ВОССТАНОВЛЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ХИНОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ Rb. SPHAEROIDES ПРИ $T > 300$ K

© 2000 г. П. М. Красильников, П. П. Нокс, Е. П. Лукашев, В. З. Пашенко,
И. Ю. Чурбанова, К. В. Шайтан, член-корреспондент РАН А. Б. Рубин

Поступило 11.07.2000 г.

Информативным подходом в изучении механизмов начальных стадий трансформации энергии реакционными центрами (РЦ) фотосинтеза является анализ температурных зависимостей этих процессов. Реакция темнового восстановления фотоокисленного бактериохлорофилла (Р) от восстановленного первичного хинонного акцептора (Q_A) в РЦ бактерий *Rb. sphaeroides* исследуется уже давно. Эта реакция, осуществляемая туннельным путем от физиологических температур до криогенных, имеет аномальную температурную зависимость: характерное время процесса (τ) около 100 мс при 295 K сокращается до 25–30 мс при $T < 150$ K. Причем данная зависимость во всем этом диапазоне температур носит монотонный характер. Изменение скорости реакции при варьировании температуры может быть обусловлено как тепловым расширением среды [1], так и конформационными перестройками РЦ [2]. Продолжая детальное исследование процесса, в настоящей работе мы расширили диапазон изучения реакции в область температур выше 295 K и обнаружили, что скорость реакции в этой области снова возрастает. Исследованию этого эффекта и посвящена данная статья.

Клетки бактерий *Rb. sphaeroides* выращивали и выделяли из них РЦ при помощи детергента ЛДАО, как описано в [3]. РЦ суспендировали в 10 mM NA-Р-буфере, содержащем 0.05% ЛДАО, pH 7.0. Для анализа процесса рекомбинации P^+ и Q_A^- к РЦ добавляли *o*-фенантролин ($5 \cdot 10^{-3}$ M), блокирующий перенос электрона от Q_A к вторичному хинону. При низкотемпературных измерениях к образцам добавляли 65–70% (по объему) глицерина. Фотореакции регистрировали в Q_y -полосе поглощения Р (870 нм) на компьютеризированном однолучевом спектрофотометре после

возбуждения образцов импульсным светом (энергия вспышки 9 мДж, длительность на полувысоте профиля 10 мкс).

Зависимость времени реакции рекомбинации P^+ и Q_A^- от температуры вплоть до 320 K представлена на рис. 1. Регистрируемые во всем этом диапазоне изменения τ были полностью обратимы. Рассмотрим качественно возможные механизмы наблюдаемой немонотонной зависимости. За основу возьмем идеи, развиваемые в физике твердого тела применительно к процессу электронного переноса в неупорядоченных средах [4]. Для учета эффекта локального окружения донора и акцептора используем представления о влиянии растворителя на скорости химических (окислительно-восстановительных) реакций [5].

Туннелирование электрона между P^+ и Q_A^- идет через энергетический барьер $U(r)$ (рис. 2), определяемый кулоновским взаимодействием электрона с донором и акцептором. Пусть точка $r = 0$ отвечает центру локализации электрона на Р, $r = L_0$ – на Q_A . Электрон обладает энергией E , ширина барьера на уровне E есть $L = b - a$, где a и

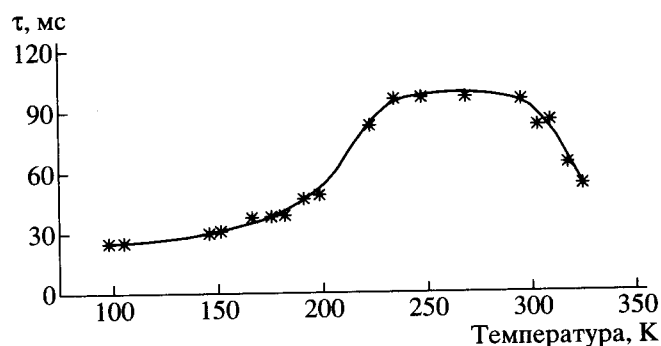


Рис. 1. Температурная зависимость характерного времени τ (в моноэкспоненциальном приближении) реакции рекомбинации P^+ и Q_A^- в РЦ *Rb. sphaeroides*.

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

b – значения координат, при которых $U(r) = E$. В квазиклассическом приближении время перехода электрона от Q_A^- на P^+ описывается выражением [6]

$$\tau = v^{-1} \exp \left\{ \frac{2}{\hbar} \int_a^b \sqrt{2m(U(r) - E)} dr \right\}, \quad (1)$$

где v – параметр, имеющий смысл частоты осцилляций электрона в месте локализации, $\hbar$ – постоянная Планка, m – масса электрона, $U(r)$ – потенциальная энергия электрона, r – пространственная координата. Время туннелирования зависит как от E , так и от формы и ширины барьера $U(r)$, определяемого кулоновским взаимодействием электрона с донором и акцептором и полярным окружением. Этот барьер можно представить как

$$U(r) = -\frac{e^2}{\epsilon|\mathbf{r} - \mathbf{r}_d|} - \frac{e^2}{\epsilon|\mathbf{r} - \mathbf{r}_a|} - e\phi(\mathbf{r}), \quad (2)$$

где $\mathbf{r}$ – текущая координата, $\mathbf{r}_d$ и $\mathbf{r}_a$ – координаты положения донора и акцептора, $\phi(\mathbf{r})$ – электрический потенциал, определяемый структурой макромолекулы (распределением заряженных и полярных групп атомов):

$$\phi(r) = \sum_{i=1}^N \frac{q_i}{\epsilon|\mathbf{r} - \mathbf{r}_i|}, \quad (3)$$

здесь q_i – эффективный заряд i -й атомной группы, $\mathbf{r}_i$ – радиус-вектор ее положения в макромолекуле.

Для точного расчета $\phi(r)$ необходим анализ детальной структуры РЦ. Поскольку, однако, из (3) видно, что наибольшее влияние на электрон оказывают ближайшие полярные группы (диполи), то это позволяет сделать определенные оценки и без учета этих деталей. Положим, что в окрестности центра локализации электрона на Q_A в результате, например, конформационных изменений РЦ оказывается диполь с моментом $\mathbf{p}$. В месте локализации электрона данный диполь создает потенциал:

$$\phi_p = \frac{p \cos \theta}{\epsilon|\mathbf{r} - \mathbf{r}_p|^2}, \quad (4)$$

где $\mathbf{r}_p$ – радиус-вектор диполя, θ – угол между осью диполя и радиусом-вектором $\mathbf{r}$. Этот потенциал используем для качественных оценок.

Как следует из (1), влияние температуры на скорость рекомбинации является опосредованным. Прежде всего оно связано с тепловым расширением РЦ, увеличивающим расстояние между центрами локализации электрона и уширяющим энергетический барьер. В случае линейной зависимости $L(T)$ имеет вид $L_0^{(h)} = L_0^{(c)}(1 + \alpha\Delta T)$,

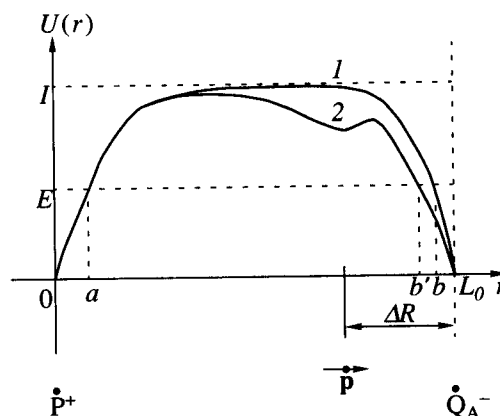


Рис. 2. Профиль потенциальной энергии $U(r)$: 1 – без учета потенциала среды $\phi(r)$; 2 – с учетом потенциала диполя $\mathbf{p}$, находящегося на расстоянии ΔR от электрона. При учете электростатического взаимодействия электрона с диполем $\mathbf{p}$ ширина барьера уменьшается на величину $\delta L = b - b'$.

где $L_0^{(c)}$ – расстояние между Q_A^- и P^+ при более низкой температуре, $L_0^{(h)}$ – при более высокой, α – коэффициент линейного расширения, ΔT – разность этих температур. Следовательно, тепловое расширение должно замедлять реакцию. Однако рост температуры может приводить и к активации конформационных перестроек РЦ, способствовать проникновению внутрь глобулы РЦ молекул растворителя (воды). У центра локализации электрона может появиться полярная группа или дипольная молекула. Из-за того, что полярность окружения электрона изменится, форма барьера может трансформироваться, в том числе и в сторону его сужения. Существенным условием сужения является появление соответствующих изменений полярного окружения в области между центрами локализации электрона на P и Q_A . Если диполь приблизится на достаточное расстояние к электрону – $\Delta R = |\mathbf{r} - \mathbf{r}_p|$, то барьер при какой-то температуре в ходе ее повышения может настолько сузиться, что это компенсирует тепловое уширение. В результате подобной конкуренции может при дальнейшем нагреве выше 295 К реализоваться уже ускорение реакции. Из (1), (2) и (4) следует, что при линейном тепловом расширении РЦ время τ_c при низких T (например, 200 К) будет равно времени τ_h при высоких T (320 К) при условии, что диполь отстоит от электрона на расстоянии

$$\Delta R \sim \sqrt{\frac{pe(L_0 + 4a)}{2\alpha L_0(I - E)\epsilon\Delta T}}, \quad (5)$$

где $a = e^2/(I - E)$. Из (5) получаем, что для $\Delta T = T_h - T_c = 320 - 200 = 120$ К $\Delta R \sim 4$ Å. Потенциал

“ускорения” реакции могут создать несколько полярных групп или молекул воды, что приведет к увеличению расстояний ΔR .

В рамках данного подхода понятно наличие “плато” на зависимости $\tau(T)$ (рис. 1): в интервале от ~230 до ~290 К происходит конкурентная компенсация теплового уширения барьера в результате его сужения за счет электростатического взаимодействия электрона с приблизившимися диполями. В итоге скорость реакции остается постоянной. Однако рост $T > 295$ К ведет к такой интенсификации конформационно-диффузионных процессов внутри РЦ (или, можно сказать, к такому уменьшению вязкости), что обусловленное электростатическими взаимодействиями сужение барьера начинает превалировать над его тепловым расширением. Это и приводит к наблюдаемому ускорению реакции рекомбинации.

Эффект можно интерпретировать и с позиций, что форма барьера не меняется, а изменяется энергия электрона в потенциальной яме на хиноне. Учитывая величину расстояния между Р и Q_A в структуре РЦ (около 30 Å), форму потенциальных ям можно приближенно принять прямоугольной. При этом энергия электрона $E = E_0 + e\phi(r)$, где E_0 – его энергия до реорганизации среды. Используя (1) для оценки расстояния ΔR , получим выражение

$$\Delta R = \sqrt{\frac{ep \cos \theta}{ew_p}},$$

где

$$w_p = e\phi(r) = -\ln\left(\frac{\tau_h}{\tau_r}\right) \frac{\hbar}{2L} \sqrt{\frac{U_0 - E_0}{2m}}$$

есть энергия поляризации среды, U_0 – глубина потенциальной ямы, θ – угол, определяющий ориен-

тацию диполя. Из этого выражения при $\tau_h/\tau_r = 1/2$ (что соответствует ΔT в (5)) получаем для ΔR те же 4 Å. Обратим также внимание на следующий момент. Величина ΔR зависит от ориентации диполя по отношению к прямой, соединяющей Р и Q_A . Видно, что при $\theta = \pi/2$ присутствие диполя не оказывает влияния на электрон, а при $\theta > \pi/2$ его присутствие будет замедлять переход. Увеличение температуры позволяет преодолевать мелкие потенциальные барьеры и в силу этого “правильно” ориентироваться диполями под действием электрического поля электрона.

Таким образом, видно, что скорость реакции рекомбинации P^+ и Q_A^- может определяться конкурентным влиянием факторов теплового сужения–расширения белка и изменений микроконформационной динамики РЦ. Влияние последней может приводить к таким изменениям параметров потенциального барьера, что увеличение скорости реакции будет происходить не только при понижении температуры от комнатной, но и при ее росте выше 295 К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hales B.J. // Biophys. J. 1976. V. 16. P. 471–480.
2. Горбач В.В., Лукашев Е.П., Нокс П.П. и др. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1986. № 1. С. 11–23.
3. Захарова Н.И., Фабиан М., Успенская Н.Я. и др. // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 1703–1711.
4. Маделунг О. Физика твердого тела. Локализованные состояния. М.: Наука, 1985. 184 с.
5. Амис Э. Влияние растворителя на скорость и механизм химических реакций. М.: Мир, 1968. 328 с.
6. Давыдов А.С. Квантовая механика. М.: Физматгиз, 1963. 748 с.