

СРАВНЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ПРОЦЕССА РЕКОМБИНАЦИИ В ИОН-РАДИКАЛЬНОЙ ПАРЕ $P870^+Q_A^-$ И ТРИПТОФАНОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ *Rhodobacter sphaeroides*

© 2016 г. П.П. Нокс, Е.П. Лукашев, Б.Н. Корватовский, В.В. Горохов, Н.П. Гришанова, Н.Х. Сейфуллина, В.З. Пашенко, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: vz.paschenko@gmail.com

Поступила в редакцию 28.04.16 г.

Исследованы температурные зависимости скорости рекомбинации зарядов в ион-радикальной паре $P870^+Q_A^-$ в фотосинтетических реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides*, измеренные в индивидуальных полосах поглощения донора (600 нм) и акцептора (335 и 420–450 нм) электронов. Исследованы препараты реакционных центров в водно-глицериновом и трегалозном окружении после замораживания препаратов до -180°C в темноте и на активирующем свете и последующем их нагревании. В этих же условиях измерена длительность флуоресценции триптофанилов реакционных центров ($\lambda_{\text{рег}} = 325$ и 345 нм), являющихся внутренним индикатором динамического состояния белковой матрицы. Обнаружена корреляция в ходе температурных зависимостей функционального и динамического показателей реакционных центров в разных растворителях. Выявлены различия в среднем времени жизни флуоресценции триптофанилов в препаратах, замороженных в темноте или на активирующем свете. Полученные результаты объясняются переходами реакционных центров между различными конформационными состояниями и процессами протонной релаксации в структуре водородных связей окружения кофакторов реакционных центров.

Ключевые слова: пигмент-белковый комплекс, реакционный центр, первичный хинонный акцептор, бактериохлорофилл, триптофанил, ион-радикальная рекомбинация зарядов, конформационные состояния.

Пигмент-белковые комплексы фотосинтетических реакционных центров (РЦ) фактически представляют собой фотоактивный фермент, в котором его конформационная динамика играет важнейшую роль на всех стадиях преобразования световой энергии, в том числе и во временной стабилизации электронов в акцепторном звене РЦ [1–5]. Эффективная электростатическая стабилизация электрона на хинонных акцепторах Q_A и Q_B в РЦ феофитин-хинонного типа, существенно замедляющая процессы темновой рекомбинации разделенных зарядов, связана со смещениями протонов в их белковом окружении. Как показано на РЦ пурпурных бактерий, связывание H^+ при появлении семихинонов в РЦ не является диффузионно контролируемым процессом, а регулируется из-

менениями, сопряженными с конформационными переходами между «доступными» и «недоступными» состояниями, предшествующими реальному связыванию или переносу H^+ в структуре РЦ [6]. Проведенное нами ранее сравнительное исследование кинетики окислительно-восстановительных превращений первичного донора электрона (димера бактериохлорофилла, Р) в структуре РЦ пурпурных бактерий *Rb. sphaeroides* и конечного хинонного электронного акцептора Q_B в их индивидуальных полосах поглощения в ходе процессов одноэлектронного обратимого переноса заряда между Р и Q_B показало, что кинетика темнового возврата электрона от Q_B^- к P^+ , регистрируемая в полосах поглощения Q_B (335 нм и 420–450 нм), более медленная, чем кинетика, регистрируемая в Q_x -полосе поглощения Р (600 нм) [7]. Мы объяснили это релаксационными процессами в окружении Q_B , связанными с электростатиче-

Сокращение: РЦ – реакционные центры.

ской стабилизацией переносимого на Q_B электрона за счет смещения протонов в водородных связях белкового интерьера РЦ. Энергия активации (U_a) и характерное время (τ_r) протекания этого процесса оказались равными $U_a \approx 1,2$ ккал/моль ($\approx 0,052$ эВ) и $\tau_r \approx 0,1$ с для РЦ в водно-буферном окружении при физиологических температурах. Относительно небольшая величина энергии активации по сравнению с тепловой энергией и большее по молекулярным масштабам характерное время релаксации свидетельствуют о специфическом механизме релаксационного процесса, обусловленного смещениями протонов и деформацией водородных связей окружения Q_B . Важную информацию о связи электрон-транспортной активности РЦ и его внутримолекулярной динамики дают эксперименты по замораживанию РЦ до криогенных температур в темноте или на активирующем свете в различных растворителях с последующим параллельным изучением температурных зависимостей функциональных и динамических показателей препаратов РЦ при их нагревании. Именно такого рода исследования позволили нам ранее впервые обосновать представления о конформационных изменениях РЦ, связанных с переносом электрона и регулирующих элементарные константы этого переноса, в частности, при изменениях температуры [3,8].

Информативным внутренним природным индикатором конформации белков, их динамики, а также внутри- и межмолекулярных взаимодействий является флуоресценция белковых триптофанилов. Известно, что флуоресценция индольного хромофора высокочувствительна к состоянию его окружения, включая водородные связи, и реагирует даже на небольшие изменения в этом окружении [9]. Если структура белков известна, то изменения триптофанилов могут быть в принципе интерпретированы в терминах структурных изменений атомного разрешения. Положение максимума флуоресценции белковых триптофанилов, определяемое релаксационными характеристиками полярного окружения возбужденного хромофора, давно используется в качестве показателя состояния внутримолекулярной динамики белка, в том числе при варьировании температуры [10]. Сложнее ситуация с интерпретацией влияния состояния окружения на длительность флуоресценции белковых триптофанилов. Однако в последние годы и в этом направлении разрабатываются определенные информативные подходы, связывающие время жизни возбужденных триптофанилов с состоянием окружения, в том числе с состоянием водородных связей [11].

Целью настоящей работы явилось исследование и сопоставление температурных зависимостей показателя электрон-транспортной активности реакционных центров *Rb. sphaeroides* – темновой рекомбинации разделенных зарядов P^+ и Q_A^- , измеряемых в индивидуальных полосах поглощения донора и акцептора электронов, и флуоресцентных характеристик триптофановой флуоресценции в препаратах РЦ, замораживаемых до криогенных температур в темноте или на активирующем свете в различных растворителях, при их последующем нагревании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на препаратах РЦ пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides*. Клетки бактерий разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Отделяемые центрифугированием хромофоры инкубировали в течение 30 мин при 4°C в $0,01$ М натрий-фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем $0,5\%$ цвиттерионного детергента лаурилдиметиламинооксида. Затем их центрифугировали при 144000 g в течение 90 мин при 4°C . Фракцию РЦ, содержащуюся в надосадочной жидкости, отделяли хроматографией на колонке с оксипатитом, как описано в работе [12]. Концентрация получаемых РЦ, суспендируемых в $0,01$ М натрий-фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем $0,05\%$ лаурилдиметиламинооксида, составляла около 50 мкМ.

Фотоиндуцированные реакции исследовали на сконструированном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова однолучевом дифференциальном спектрофотометре с двойной монохроматизацией измерительного света. В качестве источника светового возбуждения был использован Nd-YAG лазер LS-2131M (532 нм, 8 нс, 5 мДж, LOTIS-ТП, Белоруссия). Фотоиндуцированные изменения поглощения регистрировали при 600 нм (Q_x полоса поглощения Р) и в полосах, отражающих редокс-превращения убихинонов РЦ – при 335 нм и в области 420 – 450 нм. Кинетики изменений поглощения при 335 нм и 420 – 450 нм практически не отличались. Поскольку, однако, амплитуда сигнала при 450 нм была наибольшей, то редокс-превращения убихинонов РЦ мы иллюстрируем по результатам измерений при данной длине волны. Для улучшения отношения сигнал/шум с помощью аналого-цифрового преобразователя Ostorpus CS 8327 (GaGe, США) проводили накопление и усреднение 8 – 10 одиночных сигналов. Аппроксимацию полученных кинетических кривых выполняли с помощью пакета программ QRI-

GIN. В экспериментах с замораживанием на свету образец (в присутствии о-фенантролина в концентрации 10^{-2} М для блокирования переноса электрона от Q_A к Q_B) при комнатной температуре освещали белым светом от лампы накаливания типа КГМ (350 Вт). Затем при включенном свете температуру понижали в течение 10 мин до -180°C . Свет выключали и проводили измерение индуцированных лазером изменений поглощения. Далее температуру образца повышали в темноте с шагом 10 град/мин и регистрировали светоиндуцированные изменения поглощения.

Измерения спектров белковой флуоресценции препаратов РЦ ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм) в диапазоне температур от -180°C до $+35^\circ\text{C}$ проводили на компьютеризированном спектрофлуориметре Hitachi 850 (Япония), снабженном сконструированным в лаборатории криостатом.

Измерение длительности белковой флуоресценции РЦ проводили на установке, работающей в режиме счета фотонов Simple Tau 140 (Becker & Hickl, Германия). Образец находился в охлаждаемой жидким азотом кювете, температуру которой контролировали с помощью термодпары. В этом случае время охлаждения до -180°C составляло около 10 мин, скорость последующего нагревания составляла $5-7^\circ/\text{мин}$. При охлаждении на свету РЦ активировали постоянным светом видимого диапазона, интенсивность ~ 1 Вт/см². По достижении -180°C активирующее освещение выключали. Флуоресценцию образца возбуждали при 280 нм с помощью пикосекундного полупроводникового лазера EPLED 280 (Edinburg Photonics, Ирландия), длительность импульса составляла 870 пс, спектральная ширина – 10 нм, частота следования импульсов 1 МГц. Флуоресценцию регистрировали с помощью 16-канального многоанодного фотоумножителя K5900 (Hamamatsu, Япония), перед которым располагался полихроматор с решеткой 600 штр/мм. Ширина спектра на выходе полихроматора составляла 200 нм, что соответствовало 12,5 нм/канал. Время накопления сигнала составляло 30 с. Таким образом, мы регистрировали трехмерную (λ , t , I – интенсивность) картину свечения триптофанов и могли «нарезать» кинетики затухания флуоресценции в любой точке спектра в пределах 200 нм. Кинетические кривые флуоресценции обрабатывали с помощью программы SPImage (Becker&Hickl, Германия), лучшая аппроксимация модельной кривой с экспериментальными результатами достигалась в двухкомпонентном приближении. Среднее время жизни (τ_{cp}) вычисляли как сумму произведений

амплитуд и времен соответствующих кинетических компонентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При охлаждении РЦ *Rb. sphaeroides* в темноте в условиях высокого окислительного потенциала среды, когда реализуется обратимый перенос электрона между первичным донором электрона в РЦ – димером бактериохлорофилла Р и хинонными акцепторами Q_A и Q_B , происходит блокирование прямого переноса электрона от Q_A к Q_B (перенос электрона от Q_A к Q_B почти полностью ингибируется уже при $-30 - -40^\circ\text{C}$). Скорость рекомбинации зарядов между Q_A^- и P^+ после световой активации замороженных до -180°C образцов составляет $25-30$ мс⁻¹. При комнатных температурах время этой реакции существенно больше и составляет около 100 мс. Как при комнатной температуре, так и при -180°C кинетика рекомбинации хорошо аппроксимируется одной экспонентой. Однако при нагревании замороженных до -180°C в темноте образцов в области промежуточных между криогенными и комнатными температур кинетика рекомбинации становится существенно немонотонноэкспоненциальной. Иная картина наблюдается при измерении кинетики рекомбинации в охлажденных на активирующем свету препаратах РЦ. В этих условиях время темновой рекомбинации зарядов между P^+ и Q_A^- остается близким к таковому при комнатной температуре (т.е. около 100 мс). При последующем размораживании до температур $\sim -110^\circ\text{C}$ наблюдается некоторое уменьшение этого времени и затем при дальнейшем нагревании – увеличение до значений, характерных для комнатной температуры. Эти результаты объясняются индуцируемыми светом переходами РЦ между различными конформационными состояниями, которые модулируются температурным фактором [5,13].

В проведенных экспериментах мы не регистрировали разницы в константе скорости P^+ и Q_A^- рекомбинации в РЦ, содержащих 70% глицерина в процессе нагревания замороженных в темноте РЦ при кинетических измерениях при 450 и при 600 нм во всем диапазоне температур. Следовательно, от -180°C до комнатной температуры процесс рекомбинации P^+ и Q_A^- отличается от обсуждавшегося выше процесса рекомбинации P^+ и Q_B^- . Невозможность экспериментально зарегистрировать различия для P^+ и Q_A^- рекомбинации при измерениях в области 600 нм (восстановление P^+) и 450 нм

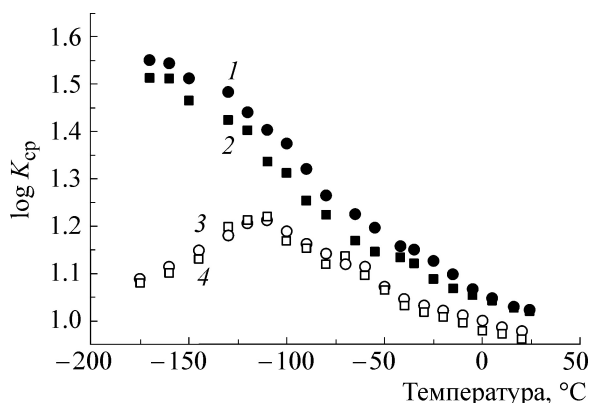


Рис. 1. Температурные зависимости константы средней скорости рекомбинации $\log K_{cp}$ зарядов P^+ и Q_A^- в РЦ *Rb. sphaeroides* (1,3) и в РЦ с изотопным замещением H_2O на D_2O (2,4), содержащих 70% глицерина и охлаждаемых до $-180^\circ C$ в темноте (1,2) или на активирующем свете (3,4). Редокс-превращения РЦ регистрировали в полосе 600 нм (1, 3) и при 450 нм (2, 4).

(окисление Q_A^-), вероятно, связана с более быстрой (на порядок) скоростью протекания данной реакции по сравнению со скоростью рекомбинации P^+ и Q_B^- . Вместе с тем в РЦ с изотопным замещением H_2O на D_2O мы зарегистрировали более медленную кинетику рекомбинации P^+ и Q_A^- при 450 нм, чем в H_2O -РЦ (рис. 1). Эта разница в адаптированных к темноте РЦ была особенно выражена при температурах ниже $-50^\circ C$. Очевидно, данный факт, как и в случае с Q_B^- , отражает участие атомов $H(D)$ в редокс-превращениях и стабилизации электрона на Q_A^- .

В препаратах, замороженных на свету, как для H_2O -РЦ, так и для D_2O -РЦ характерна выраженная немонотонность этих кривых с максимумом около $-110^\circ C$: наблюдается рост константы скорости рекомбинации в диапазоне от $-180^\circ C$ (11 с^{-1}) до $-110^\circ C$ ($12,5\text{ с}^{-1}$) с последующим уменьшением до 10 с^{-1} при $20^\circ C$ (рис. 1). При этом ни в H_2O -РЦ, ни D_2O -РЦ мы не наблюдали заметных отличий между значениями константы скорости рекомбинации, получаемыми в полосах 450 и 600 нм. По-видимому, в замороженных на свету РЦ под действием света формируется состояние с уже «отрелаксированными и замороженными» при низкой температуре протонами (дейтронами).

Для стеклообразного образца РЦ с трегалозой, приготовленного согласно работе [14] в виде пленки на поверхности стекла, температурные профили зависимости скорости рекомбинации заметно отличаются от таковых для РЦ в глицерине как при охлаждении препаратов

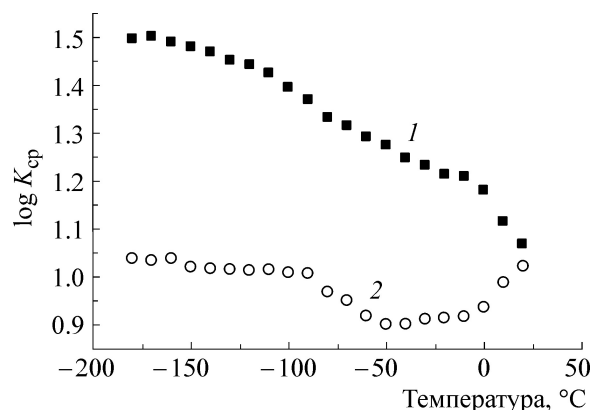


Рис. 2. Температурные зависимости константы средней скорости рекомбинации $\log K_{cp}$ зарядов P^+ и Q_A^- в препаратах РЦ *Rb. sphaeroides*, содержащих трегалозу и охлаждаемых до $-180^\circ C$ в темноте (1) или на активирующем свете (2). Редокс-превращения РЦ регистрировали в полосе 600 нм.

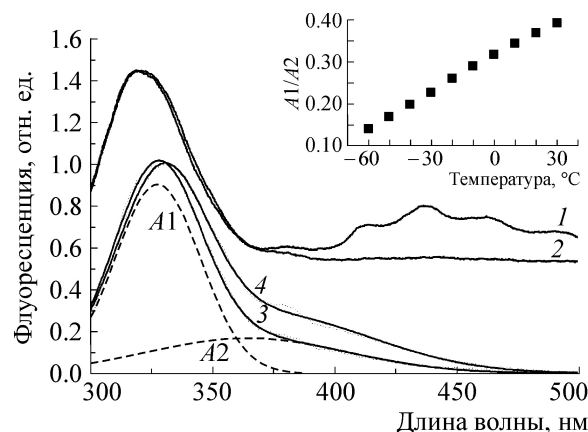


Рис. 3. Спектры флуоресценции РЦ *Rb. sphaeroides* в 70% глицерине (1–3) и в трегалозе (4) при температуре $-180^\circ C$ (1), $-70^\circ C$ (2) и комнатной температуре (3 и 4), а также разложение спектра 3 на гауссовы составляющие (A1 и A2). На вставке показано отношение площадей $A2/A1$ для РЦ в глицерине в зависимости от температуры. Спектры нормированы по максимуму при 320–330 нм. Для наглядности кривые 1 и 2 смещены относительно нулевой линии.

в темноте, так и при замораживании на свету (рис. 2). Последнее связано, вероятно, с изменениями структурно-динамического состояния окружения редокс-кофакторов в структуре РЦ при замене растворителя. Это подтверждается анализом полученных нами флуоресцентных данных.

Спектр флуоресценции препаратов РЦ в 70% глицерине (рис. 3, кривая 3) при комнатной температуре хорошо аппроксимируется суммой двух гауссовых кривых A1 и A2, первая из

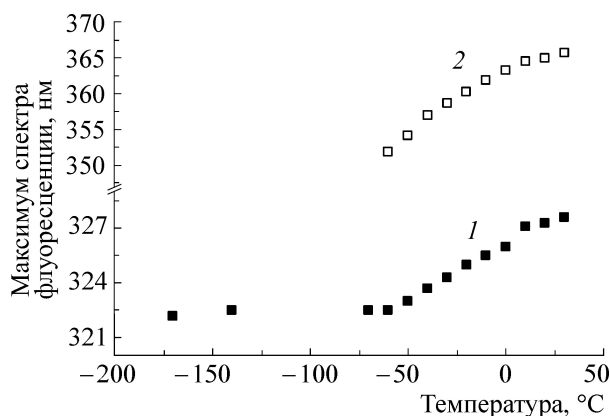


Рис. 4. Положение максимумов двух гауссовых компонентов $A1$ (1) и $A2$ (2) спектра флуоресценции РЦ *Rb. sphaeroides* в 70% глицерине в зависимости от температуры.

которых имеет максимум при 327 нм и полуширину 35 нм, а вторая характеризуется максимумом при 367 нм и полушириной 88 нм. Соотношение вкладов $A2/A1 \approx 0,3$. Согласно работам [10,15], $A1$ -компонента спектра может быть отнесена к флуоресценции триптофанилов, находящихся внутри белковой глобулы, в окружении которых есть релаксирующие полярные группы (так называемый класс I). Вторая компонента спектра ($A2$) отнесена к свечению триптофанилов, находящихся вблизи поверхности белка в окружении связанной воды (класс II). Отметим, что вклад тирозиновых остатков в суммарную белковую флуоресценцию РЦ незначительный, так как содержание триптофановых остатков в РЦ в 1,5 раза больше, чем тирозиновых при отношении коэффициентов экстинкции триптофан/тирозин на длине волны 280 нм ≈ 5 . Кроме того, квантовый выход флуоресценции тирозина в белках очень низок из-за различных эффектов тушения, в том числе из-за образования водородной связи между фенильным гидроксилом и ближайшей ионизированной карбоксильной группой, а также вследствие передачи энергии электронного возбуждения на триптофан [16]. Ранее проведенные в нашей лаборатории совместные с Э.А. Бурштейном исследования показали, что квантовый выход белковой флуоресценции в РЦ составляет около 0,02 [17]. Такое значение, очевидно, является следствием эффективного тушения флуоресценции за счет переноса энергии возбуждения на порфириновые пигменты РЦ, Соре-полоса поглощения которых хорошо перекрывается со спектром люминесценции триптофанилов. Субъединицы L и M, с которыми связаны порфириновые и хинонные кофакторы электронного переноса РЦ, содержат

32 и 20 триптофанилов соответственно [18], а в Н-субъединице РЦ локализованы три триптофановых остатка [19]. По оценкам, сделанным в работе [20], не менее 20 триптофанилов находятся от порфиринов на расстоянии порядка 20 Å, что в два раза меньше фёрстеровского радиуса. Очевидно, такая структурная организация РЦ способствует эффективной миграции энергии от триптофанов на порфириновые пигменты.

Для РЦ в 50% растворе трегалозы основной максимум флуоресценции сдвигается в длинноволновую область (рис. 3, кривая 4), что свидетельствует о возросшей подвижности окружения флуорофоров. Этот спектр флуоресценции также хорошо аппроксимируется двумя гауссовыми кривыми: $A1$ имеет максимум при 329 нм и полуширину 37 нм, $A2$ – максимум при 372 нм и полуширину 86 нм. Вклад второго компонента возрастает по сравнению с РЦ в 70% растворе глицерина в $\approx 2,6$ раза, соотношение площадей $A2/A1 = 0,8$. Оба этих параметра отражают рост подвижности белка в целом и его периферийных участков в особенности.

При охлаждении препаратов до -180°C максимум флуоресценции РЦ в глицерине сдвигается к 322 нм, а в трегалозе – к 325 нм, что является следствием «вымораживания» колебаний окружения флуорофоров при низкой температуре. В спектре излучения в области 400–500 нм появляются также характерные полосы фосфоресценции триптофанилов (рис. 3, кривая 1), которые отсутствуют в спектрах при более высоких температурах из-за очень малого квантового выхода этого процесса. При нагревании образцов положение основного максимума флуоресценции практически не меняется вплоть до $\sim -70^\circ\text{C}$, а вклад фосфоресценции падает до нуля (рис. 3, кривая 2). При дальнейшем росте температуры в спектре флуоресценции появляется длинноволновая полоса ($A2$), вклад которой линейно увеличивается с нагревом (отношение площадей $A2/A1$ в зависимости от температуры показано на вставке к рис. 3). Максимумы спектров флуоресценции для компонентов $A1$ и $A2$ при температурах выше -70°C также почти линейно сдвигаются в длинноволновую сторону, что указывает на увеличение динамической активности окружения хромофоров. Зависимость положения максимумов двух гауссовых компонентов спектра флуоресценции РЦ в 70% глицерине от температуры показана на рис. 4.

Температурную зависимость микроконформационной динамики белков РЦ также отражают результаты измерения длительности флуо-

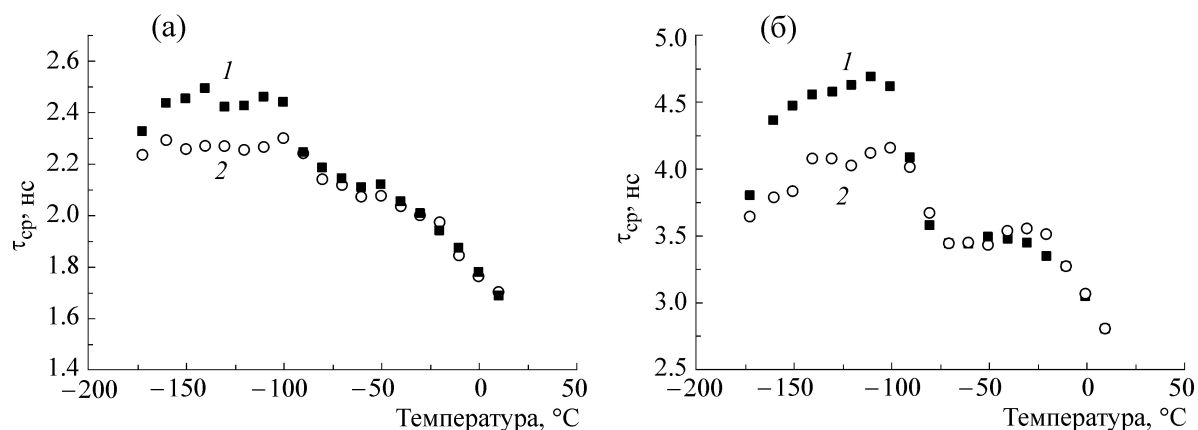


Рис. 5. Температурные зависимости средней длительности $\tau_{\text{ср}}$ флуоресценции триптофановых остатков в РЦ *Rb. sphaeroides* в 70% глицерине, регистрируемые при 325 нм (а) и 345 нм (б) в ходе нагревания РЦ, предварительно замороженных до -180°C в темноте (1) и на активирующем свете (2). Точность измерения времени жизни $\pm 0,05$ нс.

ресценции триптофанилов. В наших экспериментах кинетика затухания флуоресценции триптофанилов РЦ с хорошим приближением аппроксимировалась суммой двух экспонент. Для РЦ в 70% глицерине при $\lambda_{\text{рег}} = 325$ нм и температуре 20°C их характерные времена составляли $\tau_1 \approx 1,5$ нс и $\tau_2 \approx 5,5$ нс, хотя ранее в этих РЦ при комнатной температуре были обнаружены четыре компонента длительностью $\approx 0,07, 0,5, 2$ и 10 нс [20]. Наиболее быстрые компоненты в работе [20] были отнесены к флуоресценции триптофановых остатков, находящихся вблизи порфириновых молекул в структуре РЦ и передающих энергию возбуждения к ним по механизму Фёрстера. Долгоживущие наносекундные компоненты были приписаны авторами к триптофанилам РЦ, находящимся в более гидрофильном окружении, т.е. ближе к поверхности белковой глобулы. Очевидно, что в нашем случае кинетическая компонента с большей длительностью характеризует излучение периферийных триптофанилов, а с меньшей – внутренних. В первом приближении их можно отнести к триптофанилам класса II и класса I.

На рис. 5 приведены температурные зависимости $\tau_{\text{ср}}$ для РЦ в 70% глицерине в препаратах, замороженных в темноте или на свету, измеренные при длинах волн 325 нм и 345 нм. На рис. 6 показаны аналогичные зависимости $\tau_{\text{ср}}$ от температуры для РЦ в трегалозе. Очевидно, что уменьшение длительности флуоресценции с ростом температуры отражает увеличение подвижности окружения флуорофоров [21]. Видно также, что при измерении длительности флуоресценции при большей длине волны регистрируется и ббольшая средняя длитель-

ность. Аналогичный факт был показан ранее для РЦ *Rb. sphaeroides* при комнатной температуре [20]. Кроме того, сходное увеличение длительности наносекундной флуоресценции при сдвиге длины волны регистрации в красную область при комнатной температуре приводится в работе [22] для белков, имеющих и внутренние, и внешние триптофановые остатки. Отметим также, что при увеличении длины волны регистрации растет также длительность флуоресценции (единицы нс) чистого триптофанила в водном растворе при комнатной температуре, что объясняется вкладом в спектр флуоресценции различных ротамеров триптофановой молекулы, обусловленных различными конфигурациями аланильной боковой цепи относительно индольного ядра [23]. Переходы между этими ротамерами имеют активационный характер, в том числе с участием подвижных протонов ближайшего микроокружения, о чем свидетельствует изотопное замещение $\text{D}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$. Аналогичный эффект мы наблюдали и для водно-глицеринового (70%) раствора триптофана во всем температурном диапазоне от -180°C до 20°C (данные не приводятся).

Как видно из рис. 5 и 6, существует выраженная разница в значениях $\tau_{\text{ср}}$ для образцов РЦ, охлаждаемых в темноте или на активирующем свете. С другой стороны, в сухой пленке РЦ, выдерживаемой при атмосферной влажности, такого рода различий при замораживании в темноте и на свету не обнаружено (данные не приводятся). Этот эффект, очевидно, связан с особенностями внутримолекулярной динамики белка РЦ.

При сопоставлении температурных зависимостей скорости рекомбинации зарядов в струк-

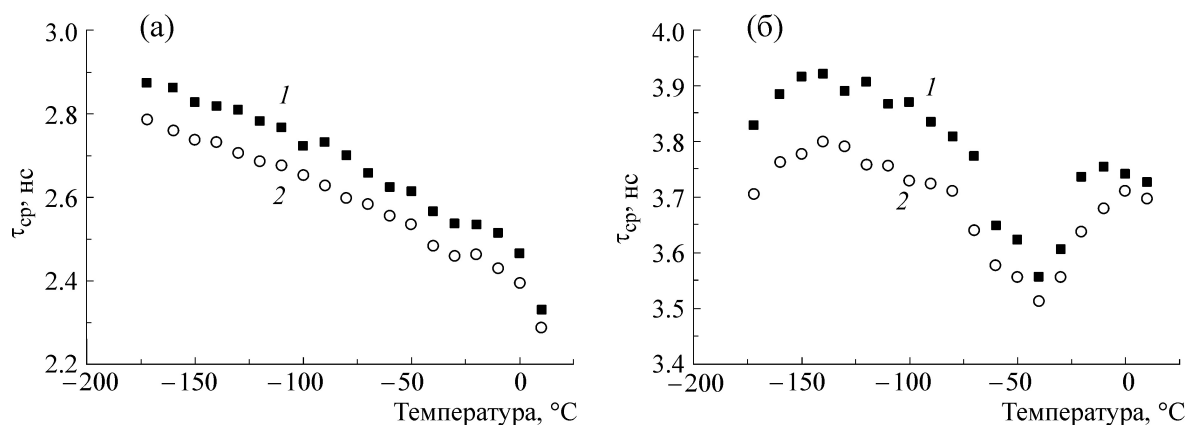


Рис. 6. Температурные зависимости средней длительности $\tau_{\text{ср}}$ флуоресценции триптофановых остатков в РЦ *Rb. sphaeroides* в трегалозе, регистрируемые при 325 нм (а) и 345 нм (б) в ходе нагревания РЦ, предварительно замороженных до -180°C в темноте (1) и на активирующем свете (2). Точность измерения времени жизни $\pm 0,05$ нс.

туре РЦ (рис. 1, 2) и длительности триптофановой флуоресценции РЦ, отражающей внутримолекулярную динамику белка РЦ (рис. 5, 6), видно, что профили этих изменений в области температур $-180 - \sim -80^{\circ}\text{C}$ совпадают. При переводе РЦ в трегалозное окружение температурные профили и функционального, и динамического показателей претерпевают похожие изменения: в целом более пологий температурный ход, увеличение значений константы скорости рекомбинации при температурах выше $\sim -50^{\circ}\text{C}$ ($\lambda_{\text{рег}} = 600$ нм), хорошо коррелирующее с ростом $\tau_{\text{ср}}$, регистрируемого при 345 нм. Следует отметить, что изменения длительности триптофановой флуоресценции (рис. 5, 6) сильнее проявляются в длинноволновой области спектра из-за увеличения вклада второго, более медленного компонента A_2 . Так, на длине волны 325 нм вклад A_2 при увеличении температуры от -180°C до комнатной возрастает от 0 до 15%, тогда как при 345 нм – от 0 до 23%. В целом наблюдаемая зависимость средней длительности флуоресценции на разных длинах волн регистрации определяется как собственно уменьшением времени жизни триптофанов классов I и II при увеличении температуры, так и изменением их спектров флуоресценции и величины вклада разных флуоресцирующих компонентов. Отметим, что при криогенных температурах спектр флуоресценции периферийных триптофанов класса II не отличается от спектра внутренних триптофанов класса I. Об этом свидетельствует хорошая аппроксимация всего спектра одной гауссовой кривой с максимумом при 322 нм. Однако при температуре выше -80°C возникает вторая длинноволновая гауссова компонента A_2 , которая при дальнейшем температурном увели-

чении конформационной подвижности окружения демонстрирует рост вклада и сдвиг в длинноволновую сторону (рис. 3). Такое изменение спектра накладывается на собственное изменение времен жизни компонентов A_1 и A_2 , приводя к возникновению немонотонной зависимости $\tau_{\text{ср}}$, значение которого флуктуирует на различных длинах волн из-за различий в соотношениях этих компонент. При этом, как видно из рис. 5а и 6а, в случае регистрации при 325 нм (отражает внутренние триптофаны РЦ) $\tau_{\text{ср}}$ для РЦ в глицерине имеет меньшие значения, чем для РЦ в трегалозе, что, вероятно, связано с большей подвижностью внутренних областей РЦ в глицерине по сравнению с РЦ в трегалозе. Возможно, это объясняется более высокой температурой стеклования образцов в трегалозе по сравнению с водно-глицериновым окружением, в результате чего происходит большее подавление внутренней динамики белка в трегалозной матрице при низких температурах [24]. Отметим, что согласно [25,26] стеклование водно-глицериновой матрицы происходит при температуре $\sim -120^{\circ}\text{C}$. Различные экспериментальные методики свидетельствуют, что активизация крупномасштабной ангармонической активности в белках, существенной для их каталитической активности, происходит при нагревании замороженных образцов до температур примерно от -90°C до -45°C – области «глобального динамического перехода» [27]. Тем не менее энзиматическая каталитическая активность, требующая соответствующей внутримолекулярной динамики, может наблюдаться и при температурах ниже этого перехода [28,29]. Наличие достаточной для индуцируемых рентгеновским облучением изменений конформационной подвижности белка при температу-

рах в области стеклования образца отмечено также в работе [27].

Вместе с тем в случае измерения $\tau_{\text{ср}}$ в более длинноволновой области спектра (345 нм) получаются, наоборот, большие значения $\tau_{\text{ср}}$ для РЦ в водно-глицериновой среде, чем для РЦ в трегалозе (рис. 5б и 6б). Следовательно, в трегалозном окружении сохраняется бóльшая подвижность поверхностных областей белка, чем в водно-глицериновом. Очевидно, в присутствии трегалозы происходит специфическое изменение структурно-динамического состояния глобулы РЦ по сравнению с глицерином. Детальные механизмы влияния окружающего растворителя на конформационную динамику белка до сих пор неизвестны [27]. Существуют определенные предположения о том, как взаимодействует трегалоза с белком, в результате чего реализуется, в частности, известный стабилизирующий эффект этого дисахарида против денатурирующих воздействий. Одни исследователи считают, что трегалоза может замещать молекулы гидратной воды и формировать водородные связи непосредственно с поверхностью макромолекулы [30,31]. Согласно другому предположению, трегалоза не напрямую связывается с поверхностью макромолекулы, а способствует удержанию части гидратной воды вблизи ее поверхности, что сопровождается формированием стеклоподобной пограничной структуры между макромолекулой и самим дисахаридом [31,32]. При этом молекулы воды в приповерхностных областях белка сохраняют бóльшую подвижность [33]. В результате наблюдается и бóльшая подвижность поверхностных областей белка в окружении трегалозы по сравнению с водно-глицериновым окружением.

Как следует из сопоставления температурных зависимостей скорости рекомбинации разделенных зарядов в замороженных в темноте и на свету РЦ в разных растворителях (рис. 1, 2) и внутримолекулярной динамики РЦ, отражаемой флуоресцентными индикаторами в аналогичных условиях (рис. 3–6), процессы стабилизации разделенных между димером бактериохлорофилла и хинонным акцептором зарядов оказывают влияние на структурно-функциональные свойства всей белковой глобулы. Ион-радикальная пара $P870^+Q_A^-$ является источником сильного электрического поля, которое влияет на заряженные группы белка, меняя их пространственную ориентацию. Опосредованно это влияние проявляется и во флуоресцентных характеристиках триптофановых остатков. При этом внутренние флуоресцентные индикаторы, видимо, в большей степени отслеживают ситуацию в хинонной акцепторной части РЦ, поскольку, как отмечалось выше, почти поло-

вина триптофанилов РЦ находится на очень малых расстояниях от фотоактивного пигмента РЦ и хинонов Q_A и Q_B . Сделанный нами вывод об обобщенном механизме стабилизации разделенных зарядов в РЦ отвечает известным экспериментальным наблюдениям, согласно которым эффективная электростатическая стабилизация электрона на хинонных акцепторах Q_A и Q_B , связанная со смещениями протонов в их белковом окружении, вовлекает в эти процессы не только протонируемые аминокислотные остатки ближайшего окружения хинонных кофакторов. Показано, в частности, что изменение зарядового состояния хинонов сопровождается изменениями pK протонируемых аминокислот на расстояниях до 15–17 Å [34–36], а скорость темновой рекомбинации зарядов зависит также от состояния и состава липидного окружения РЦ [37,38].

Интересно также отметить, что при охлаждении на свету регистрируются меньшие времена флуоресценции триптофанов (там, где есть разница), чем при охлаждении в темноте. Это отвечает изменениям функционального показателя: в охлажденных на свету РЦ константа скорости рекомбинации разделенных между Р и Q_A зарядов близка к таковой для комнатных температур, в отличие от ситуации с охлаждением в темноте.

На основании полученных результатов можно предположить, что РЦ находится в двух основных макроконформациях – «быстрой» и «медленной», которые характеризуются различной скоростью реакции рекомбинации P^+ и Q_A^- . «Быстрая» (или темноадаптированная) конформация РЦ, в которой Q_A готов принять электрон от Р, замораживается при охлаждении в темноте, но Q_A при этом не восстановлен. «Медленная» (светадаптированная) конформация РЦ возникает и фиксируется при восстановлении Q_A в условиях освещения при замораживании. Между этими состояниями могут происходить переходы, скорость которых увеличивается с повышением температуры. Одновременно с общей конформационной релаксацией РЦ, сопровождающей перенос электрона, происходит и локальная релаксация водородных связей, образуемых Q_A с окружающим белком. Как показано в работах [39,40], именно механизм протонной релаксации водородных связей при восстановлении Q_A отвечает за аномальную температурную зависимость константы скорости рекомбинации (ее уменьшение с ростом температуры) для РЦ, замороженных в темноте. Эта протонная релаксация обуславливается изменением заселенности (вероятности локализации) протонов в двухъямном потенциале водородной связи, возникающем при вос-

становлении Q_A . Существенно, что скорость протонной релаксации уменьшается с увеличением температуры, в то время как скорость активационной релаксации, наоборот, увеличивается при возрастании температуры. Наблюдаемую температурную зависимость константы скорости рекомбинации для РЦ, замороженных на свету, можно качественно объяснить следствием одновременного действия двух конкурирующих процессов – активационного перехода между заселенной на свету «медленной» и «быстрой» конформациями РЦ, который ускоряется с повышением температуры с увеличением общей скорости реакции рекомбинации (пик при -110°C), и протонной релаксации в структуре водородных связей локального окружения Q_A , которая замедляется с ростом температуры и уменьшает константу скорости рекомбинации. Модификация внутримолекулярной динамики, отражаемой температурными зависимостями флуоресцентного индикатора, при замене глицерина в окружении РЦ на трегалозу трансформирует и температурные профили скорости рекомбинации. Регистрируется более «пологая» температурная зависимость константы скорости рекомбинации в замороженных в темноте образцах, а в замороженных на свету РЦ – исчезновение максимума в области -110°C и дальнейшее ее уменьшение до температур $\sim -40^\circ\text{C}$ с последующим ростом вплоть до комнатных температур.

Авторы выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований (проекты № 14-04-01536, 15-29-01167) за частичную финансовую поддержку данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. M. Streltsov, A. G. Yakovlev, A. Ya. Shkuropatov, et al. *FEBS Lett.* **357**, 239 (1995).
2. V. Z. Paschenko, V. V. Gorokhov, N. P. Grishanova, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 361 (1998).
3. А. А. Кононенко, П. П. Нокс, С. К. Чаморовский и др., *Хим. физика* **5**, 795 (1986).
4. G. A. Abgaryan, L. N. Christophorov, A. O. Goushcha, et al., *J. Biol. Phys.* **24**, 1 (1998).
5. V. H. McMahon, J. D. Muller, C. A. Wright, and G. U. Nienhaus, *Biophys. J.* **74**, 2567 (1998).
6. P. Maroti, and C. A. Wraight, *Biophys. J.* **73**, 367 (1997).
7. П. П. Нокс, П. М. Красильников, Е. П. Лукашев и др., *Докл. РАН* **455**, 105 (2014).
8. П. П. Нокс., Е. П. Лукашев, А. А. Кононенко и др., *Молекуляр. биология* **11**, 1090 (1977).
9. Y. Chen and M. D. Barkley, *Biochemistry* **3**, 9976 (1998).
10. Э. А. Бурштейн, *Молекуляр. биология* **17**, 455 (1983).
11. J. R. Albani, *J. Fluoresc.* **21**, 1301 (2011).
12. Н. И. Захарова, И.Ю. Чурбанова, *Биохимия* **65**, 181 (2000).
13. П. П. Нокс, В. В. Горохов и В. З. Пашенко, в *Современные проблемы фотосинтеза*, под ред. С. И. Аллахвердиева, А. Б. Рубина и В. А. Шувалова (Ижевский институт компьютерных исследований, М.–Ижевск, 2014), т. 1, сс. 225–268.
14. G. Palazzo, A. Mallardi, A. Hochkoeppler, et al., *Biophys. J.* **82**, 558 (2002).
15. Y. K. Reshetnyak and E.A. Burstein, *Biophys. J.* **81**, 1710 (2001).
16. С. В. Конев и И. Д. Волоотовский, *Фотобиология* (Изд-во БГУ, Минск, 1979).
17. Н. И. Захарова, Е. А. Пермяков, М. Фабиан и др., *Молекуляр. биология* **18** (3), 719 (1984).
18. J. C. Williams, L. A. Steiner, G. Feher, and M. I. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7303 (1984).
19. I. Fathir, T. Mori, T. Nogi, et al., *Eur. J. Biochem.* **268**, 2652 (2001).
20. V. I. Godik, R. E. Blankenship, T. P. Causgrove, and N. Woodbury, *FEBS Lett.* **321**, 229 (1993).
21. J. R. Alcalá, E. Gratton, and F.G. Prendergast, *Biophys. J.* **51**, 925 (1987).
22. J. R. Albani, *J. Fluoresc.* **21**, 1301 (2011).
23. A. G. Szabo and D. M. Rayner, *J. Amer. Chem. Soc.* **102**, 554 (1980).
24. P. D. Miller, J. J. de Pablo, and H. R. Corti, *J. Phys. Chem. B* **103**, 10243 (1999).
25. W. W. Wright, G. T. Guffanti, and J. M. Vanderkooi, *Biophys. J.* **85**, 1980 (2003).
26. J. L. Dashnau, B. Zelent, and J. M. Vanderkooi, *Biophys. Chem.* **114**, 71 (2005).
27. M. Weik, R. B. G. Ravelli, I. Silman, et al., *Prot. Sci.* **10**, 1953 (2001).
28. N. More, R. M. Daniel, and H. H. Petach, *Biochem. J.* **305**, 17 (1995).
29. R. M. Daniel, J. C. Smith, M. Ferrand, et al., *Biophys. J.* **75**, 2504 (1998).
30. J. F. Carpenter and J. H. Crowe, *Biochemistry* **28**, 3916 (1989).
31. S. Paul and S. Paul, *J. Phys. Chem. B* **119**, 1598 (2015).
32. P. S. Belton and A. M. Gil, *Biopolymers* **34**, 957 (1994).
33. J. Schlichter, J. Friedrich, L. Herenyi, and J. Fidy, *Biophys. J.* **80**, 2011 (2001).
34. M. Y. Okamura and G. Feher, *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 861 (1992).
35. C. R. D. Lancaster, H. Michel, B. Honig, and M. R. Gunner, *Biophys. J.* **70**, 2469 (1996).
36. J. Miksovská, P. Maroti, J. Tandori, et al., *Biochemistry* **35**, 15411 (1996).
37. P. Maroti, *J. Photochem. Photobiol. B* **8**, 263 (1991).
38. J. Lavergne, C. Matthews, and N. Ginet, *Biochemistry* **38**, 4542 (1999).
39. P. M. Krasilnikov, P.A. Mamonov, P. P. Knox, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 541 (2007).
40. P. M. Krasilnikov, P. P. Knox, and A. B. Rubin, *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 181 (2009).

A Comparison of Temperature Dependence of Charge Recombination in Ion-Radical Pair P870⁺Q_A⁻ and Tryptophan Fluorescence in Photosynthetic Reaction Centers of *Rhodobacter sphaeroides*

P.P. Knox, E.P. Lukashev, B.N. Korvatovskii, V.V. Gorokhov, N.P. Grishanova, N.Kh. Seyfullina, V.Z. Paschenko, and A.B. Rubin

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow 119991 Russia

The temperature dependences of the charge recombination rate in ion-radical pair P870⁺Q_A⁻ in photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* were investigated. Recombination kinetics were measured in the individual absorption bands of the donor (600 nm) and an electron acceptor (335 and 420–450 nm) for the reaction center in the water–glycerol and trehalose environment after freezing preparations to –180°C in the dark and on the actinic light and after their subsequent heating. In similar conditions the fluorescence lifetime of tryptophanlys in reaction centers ($\lambda_{\text{reg}} = 325$ and 345 nm), an internal indicator of the dynamic state of the protein matrix, was measured. A correlation between the temperature dependences of functional and dynamic parameters of reaction centers in different solvents was shown. The differences in the average fluorescence lifetime of tryptophanlys in reaction centers of preparations frozen in the dark or on the actinic light were found. These results are explained due to transitions of reaction centers between different conformational states and processes of proton relaxation in the structure of the hydrogen bonds in the environment of reaction centers cofactors.

Key words: pigment-protein complex, reaction center, primary quinone acceptor, bacteriochlorophyll, tryptophanyl, ion-radical charge recombination, conformational states