

ОБЗОРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

Физическая стадия разделения зарядов при фотосинтезе

А.Г. Яковлев, В.А. Шувалов

Проведён аналитический обзор работ по биофизическим аспектам первичного разделения зарядов под действием света в реакционных центрах (РЦ) фотосинтеза, которые представляют собой особые пигмент-белковые комплексы в составе клеточной мембраны. Первичная (физическая) стадия разделения зарядов происходит в пико- и фемтосекундном диапазонах и заключается в переносе электрона по активной А-цепи пигментов. Представлен обширный фактический материал как по общим вопросам первичного фотосинтеза, так и по ряду более специальных тем. К числу последних относятся: 1) роль неактивной В-цепи пигментов, 2) влияние белкового окружения на разделение зарядов, 3) участие мономерного бактериохлорофилла В_А в первичном акцептировании электрона. Раскрыта важная роль молекул кристаллографической воды и тирозина М210, входящих в ближайшее окружение В_А, в переносе и стабилизации электрона. Показана связь коллективных ядерных движений и переноса электрона при разделении зарядов. Обсуждается природа высокой квантовой эффективности первичных реакций разделения зарядов.

Ключевые слова: фотосинтез, реакционный центр, разделение зарядов, перенос электрона

PACS numbers: 87.15.ht, 87.15.M-, 87.15.R-

DOI: 10.3367/UFNr.2016.02.037701

Содержание

Принятые сокращения (597).

1. Введение (597).
2. Общие сведения о процессах при фотосинтезе (599).
 - 2.1. Элементарные представления о фотосинтезе.
 - 2.2. Структура бактериальных реакционных центров.
 - 2.3. Первичное разделение зарядов в реакционных центрах.
 - 2.4. Эффективность первичного акта фотосинтеза.
3. Когерентный и некогерентный перенос электрона в В-цепи (606).
 - 3.1. Активация В-цепи с помощью направленного мутагенеза.
 - 3.2. Когерентный перенос электрона в В-цепи.
4. Влияние окружения на разделение зарядов (609).
 - 4.1. Последствия точечных изменений в окружении пигментов.
 - 4.2. Роль тирозина М210 в стабилизации разделённых зарядов.
 - 4.3. Роль связанной воды в первичном разделении зарядов.
5. Участие мономера бактериохлорофилла В_А в первичном разделении зарядов (617).

5.1. Положение уровня энергии $P^+V_A^-$. 5.2. Участие молекулы В_А в первичном разделении зарядов. 5.3. Движение волнового пакета при разделении зарядов.

6. Заключение (621).

Список литературы (622).

Принятые сокращения

ΔA — изменение поглощения (свет – темнота); ВChl — бактериохлорофилл; В_А (В_L) и В_В (В_M) — мономерный ВChl в А- и В-цепи соответственно; *Blc.* — *Blastochloris*; ВPheo — бактериофеофитин; *Cfx.* — *Chloroflexus*; Chl — хлорофилл; Н_А (Н_L) и Н_В (Н_M) — ВPheo в А- и В-цепи соответственно; Pheo — феофитин; Р — первичный донор электрона, димер ВChl; Р* — возбуждённое состояние Р; Р_А (Р_L) и Р_В (Р_M) — молекулы ВChl в составе Р; Q_А и Q_В — первичный и вторичный хинон соответственно; РЦ — реакционный центр; *Rba.* — *Rhodobacter*; Ф_В — молекула ВPheo, введённая вместо В_В.

1. Введение

Фотосинтез — это глобальный биологический процесс преобразования солнечной энергии в энергию химически устойчивых соединений. Фотосинтез растений и водорослей является основным источником кислорода и органических соединений на Земле, которые служат для питания человека и животных в настоящее время, а также находятся в виде запасов ископаемых углеводородов. Солнечная энергия — это практически неисчерпаемый и экологически чистый вид энергии. Важность исследований процессов фотосинтеза является очевидной как с научной, так и с прикладной точек зрения.

Фотосинтез представляет собой совокупность сложнейших физических и химических превращений, которые

А.Г. Яковлев. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Ленинские горы 1, стр. 40, 119992 Москва, Российская Федерация
Факс (495) 939-31-81. E-mail: yakov@genebee.msu.ru
В.А. Шувалов. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Ленинские горы 1, стр. 40, 119992 Москва, Российская Федерация; Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ул. Институтская 2, 142292 Пушкино, Московская обл., Российская Федерация
Факс (496) 779-05-32. E-mail: shuvalov@issp.serpukhov.ru

Статья поступила 19 октября 2015 г.,
после доработки 28 января 2016 г.

начинаются с поглощения квантов света в светособирающих комплексах хлорофилла. Затем энергия возбуждения передаётся на так называемые реакционные центры (РЦ) фотосинтеза, представляющие собой особые пигмент-белковые комплексы в составе клеточной мембраны.

Создание лазерных спектрометров сверхвысокого временного разрешения в сочетании с развитием методов направленного мутагенеза и получением рентгеноструктурных данных о трёхмерном строении ряда РЦ обусловили быстрый рост объёма данных о первичных этапах фотосинтеза. Эти данные имеют фундаментальный характер и формируют современные представления о мире.

В результате серии быстрых реакций переноса электрона в РЦ происходит первичное преобразование световой энергии в энергию разделённых зарядов с феноменально высокой квантовой эффективностью ($\sim 100\%$) и достаточно большой энергетической эффективностью. Универсальность структуры и функции РЦ всех известных фотосинтезирующих организмов заключается в том, что первичное разделение зарядов в этих РЦ происходит между синглетно-возбуждённым первичным донором электрона Р и производными хлорофилла.

Охватить в рамках одной публикации все стороны такого грандиозного и уникального природного явления, как фотосинтез, не представляется возможным. Мы остановились на обсуждении некоторых ключевых проблем, которые имеют многолетнюю историю изучения, но до сих пор не потеряли актуальности. Мы ограничились рассмотрением первичной (физической) стадии разделения зарядов в РЦ фотосинтезирующих бактерий, которые изучены наиболее полно. Этот процесс происходит в пико- и фемтосекундном диапазонах и заключается в переносе электрона по активной цепи пигментов.

В разделе 2 приведены общие данные о структуре и функции РЦ и разделении в них зарядов. Эта информация является общеизвестной и приводится здесь с ознакомительной целью, чтобы подготовить читателя к рассмотрению более специальных вопросов, представленных в разделах 3–5. Впрочем, подготовленный читатель может обратиться непосредственно к любому из трёх разделов. Читать их можно в любом порядке, так как каждый раздел, по сути, является независимым обзором. Ряд общих вопросов обсуждается сначала в разделе 2, а затем более подробно — в разделах 3–5.

Рентгеноструктурный анализ кристаллов ряда РЦ дал исчерпывающую информацию о их пространственном строении. Традиционные физико-химические методы изучения РЦ дополнились такими новыми методами, как фемтосекундная спектроскопия генетически модифицированных объектов. На рисунке 1 показано строение РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides*, которая является классическим объектом изучения. Разделение зарядов в этих РЦ происходит вдоль фотоактивной А-цепи пигментов и заключается в переносе электрона от возбуждённого димера бактериохлорофилла P^* на бактериофеофитин H_A примерно за 3 пс и далее с H_A на хинон Q_A в течение около 200 пс. Квантовая эффективность разделения зарядов в РЦ близка к 100 %.

Раздел 3 посвящён некоторым аспектам изучения роли неактивной В-цепи пигментов. Как показано на рис. 1, РЦ имеют две симметричные цепи пигментов, однако разделение зарядов происходит практически

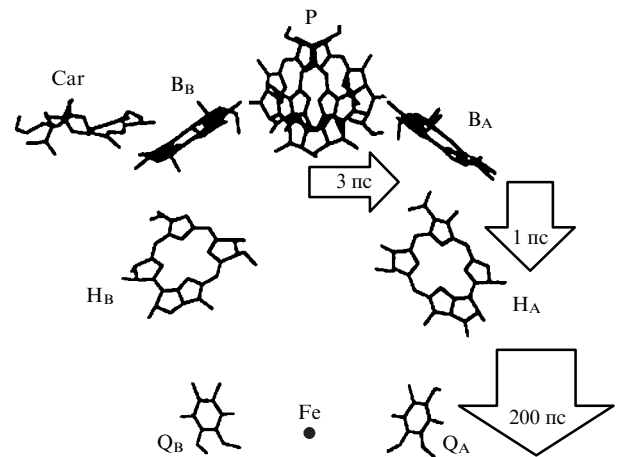


Рис. 1. Пространственная структура РЦ *Rba. sphaeroides* согласно банку данных PDB, файл 1AIJ. Показаны молекулы BChl P_A и P_B , образующие димер Р, молекулы мономерного BChl B_A и B_B , молекулы BPheo H_A и H_B , молекулы хинона Q_A и Q_B , атом железа, молекула каротиноида Car. Стрелками схематически показан путь переноса электрона.

только в одной, активной, цепи. Это загадочное несоответствие является объектом пристального внимания исследователей на протяжении многих лет. Основным подходом здесь является активация переноса электрона по В-цепи с помощью направленного мутагенеза РЦ. Выявлен ряд предпосылок неактивности В-цепи, а именно: положение уровня $P^+V_B^-$ значительно выше уровня P^* , большая величина электронного сопряжения между P^* и V_A по сравнению с таковой для P^* и V_B , значительно больший положительный потенциал А-цепи по сравнению с потенциалом В-цепи. Кроме того, возможен обратимый когерентный перенос электрона в В-цепь, вызванный движением колебательного волнового пакета. Этот перенос возникает на несколько десятков фемтосекунд раньше, чем аналогичный когерентный перенос электрона в фотоактивной А-цепи. Возникновение когерентного переноса электрона в В-цепи не зависит от наличия или отсутствия условий для обычного, некогерентного, переноса и определяется в основном динамикой волнового пакета.

Раздел 4 посвящён некоторым сторонам такой многоплановой проблемы, как влияние окружения пигментов РЦ на разделение зарядов. Изображённые на рис. 1 пигменты вмонтированы в белковую матрицу, состоящую из аминокислотных остатков, объединённых в белковые субъединицы. Кроме белка в окружении пигментов находится несколько сотен молекул воды. Пространственная структура РЦ поддерживается благодаря многочисленным взаимодействиям Ван-дер-Ваальса между пигментами и белком, а также с помощью нескольких водородных связей. Помимо того, ближайшее окружение молекул пигментов влияет на первичное разделение зарядов, воздействуя на энергетические характеристики реакций переноса электрона или являясь составной частью пути переноса электрона.

Из многочисленных молекул окружения две представляют, как нам кажется, наибольший интерес: молекула тирозина (Tyr) M210 и молекула связанной воды НОН55 (обозначения молекул даны для РЦ *Rba. sphaeroides*),

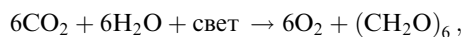
расположенные вблизи V_A . Отсутствие этих молекул приводит к значительному замедлению разделения зарядов в РЦ. Многочисленные данные указывают на ключевую роль тирозина M210 в стабилизации разделённых зарядов в состоянии $P^+V_A^-$, которая обеспечивается наличием полярной ОН-группы в составе тирозина M210 и реориентацией этой группы под действием разделённых зарядов. Вода НОН55 может быть включена в одну из пространственных троп эффективного переноса электрона по цепи полярных групп атомов, соединяющей димер Р и мономер V_A . В отсутствие воды НОН55 перенос электрона происходит по иным, менее эффективным, пространственным путям.

Раздел 5 посвящён проблеме участия молекулы мономерного бактериохлорофилла V_A в первичном разделении зарядов. Эта тематика имеет многолетнюю историю и логично следует из положения V_A между Р и H_A согласно рентгеноструктурным данным (см. рис. 1). Первые косвенные указания на возможность переноса электрона на V_A были получены более 30 лет назад, однако затем в течение длительного времени не удавалось получить убедительных доказательств прямого участия V_A в разделении зарядов. Результаты пико- и фемтосекундной спектроскопии постепенно привели к пониманию основной сложности обнаружения состояния $P^+V_A^-$, которая обусловлена его малой заселённостью. Другая сложность связана с тем, что в видимом диапазоне, где проводилось подавляющее большинство измерений, спектр состояния $P^+V_A^-$ сильно замаскирован спектрами других состояний. Получить убедительное доказательство существования состояния $P^+V_A^-$ удалось в результате перехода в ближний инфракрасный (ИК) диапазон, где анион V_A^- имеет слабую полосу поглощения при длине волны 1020 нм. Сначала эта полоса исследовалась в химически модифицированных РЦ, в которых блокирование переноса электрона на H_A приводило к накоплению состояния $P^+V_A^-$ в пикосекундном диапазоне. В настоящее время схема двухступенчатого переноса электрона $P^* \rightarrow P^+V_A^- \rightarrow P^+H_A^-$, в которой вторая реакция в несколько раз быстрее первой, считается общепринятой.

2. Общие сведения о процессах при фотосинтезе

2.1. Элементарные представления о фотосинтезе

Обобщённая реакция фотосинтеза растений, цианобактерий и эукариотических водорослей схематически выглядит так:



причём O_2 выделяется из молекул воды. Простота приведённого выражения обманчива. Реальный фотосинтез — это самый сложный процесс, физическую основу которого составляет перенос энергии и заряда. Фотосинтез начинается с поглощения света в светособирающих комплексах, состоящих из молекул хлорофилла (бактериохлорофилла). Количество этих молекул варьирует от объекта к объекту от нескольких десятков до нескольких тысяч.

Энергия возбуждения мигрирует внутри комплекса до тех пор, пока не попадает в реакционный центр

фотосинтеза (см. раздел 2.2). Характерное время миграции энергии составляет от нескольких десятков до нескольких сотен пикосекунд. В РЦ за несколько пикосекунд происходит первичное разделение зарядов (электрона и дырки). Покинув РЦ, электрон попадает в электронно-транспортную цепь, где его энергия расходуется при синтезе химических соединений. Таким образом, при фотосинтезе световая энергия превращается в энергию химических связей конечных продуктов (глюкозы).

Процессы разложения воды и ассимиляции CO_2 происходят отдельно друг от друга в хлоропластах клеток растений. В разложении воды важную роль играет перенос электрона в РЦ и по цепи его переносчиков внутри мембран хлоропласта. Результатом отрыва электрона от воды является восстановление окисленной формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата ($НАДФ^+$) и синтез аденозинтрифосфата (АТФ). Далее с помощью восстановленного НАДФ (обозначаемого $НАДФН$) и АТФ происходят ассимиляция CO_2 и синтез углеводов.

У фотосинтезирующих бактерий источником электрона является более сильный, чем вода, донор электрона (например, H_2S). В отличие от бактерий, растения и водоросли имеют два типа фотосистем: коротковолновую (фотосистема II) и длинноволновую (фотосистема I) и соответственно два типа РЦ с пигментами Р680 и Р700. Согласно так называемой Z-схеме электрон поднимается в направлении, противоположном направлению термодинамического градиента, при последовательном поглощении двух квантов света двумя фотосистемами. Фотосистема II отвечает за реакцию разложения воды. Пигмент Р680 при возбуждении отдаёт электрон пластохинону и далее в цепь мембранных переносчиков электрона. Один из этих переносчиков, пластоцианин, донирует электрон пигменту Р700, который при возбуждении передаёт электрон ферредоксину и далее на $НАДФ^+$. При бактериальном фотосинтезе электрон передаётся от возбуждённого димера бактериохлорофилла убихинону. Затем электрон может вернуться назад на окисленный димер (циклический транспорт при отсутствии внешнего донора электронов) или восстановить пул убихинона (при наличии внешнего донора).

Восстановление $НАДФ^+$ происходит у бактерий в результате обратного переноса электрона и сопровождается гидролизом молекул АТФ. Синтез АТФ осуществляется в результате образования градиента концентрации протонов на двух сторонах клеточной мембраны, в которую погружены РЦ. Эти протоны переносятся сквозь мембрану и освобождаются внутри неё. При восстановлении $НАДФ^+$ на внешней стороне мембраны происходит поглощение внутренней частью мембраны около двух протонов на один электрон.

Отметим, что у высших растений светособирающие комплексы, РЦ и компоненты цепи переноса электрона располагаются в толще образованной липидами тилакоидной мембраны, находящейся в гранах хлоропластов. У бактерий фотосинтетический аппарат образован втягиванием внутренней клеточной мембраны.

2.2. Структура бактериальных реакционных центров

Реакционный центр бактериального фотосинтеза представляет собой пигмент-белковый комплекс, который отвечает за преобразование световой энергии в энергию разделённых зарядов в результате серии быстрых реак-

ций переноса электрона. Структура, функция и механизм разделения зарядов наиболее подробно изучены в РЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий. Соответствующую информацию вместе с подробной библиографией можно найти в многочисленных обзорах, сборниках и монографиях (см., например, [1–13]).

РЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий имеют в своём составе следующие хромофоры, участвующие в поглощении света и переносе электрона: четыре молекулы бактериохлорофилла (BChl), две молекулы бактериофеофитина (BPheo), две молекулы хинона (Q) (убихинона или менахинона). Структурной основой молекул BChl и BPheo является плоское тетрапиррольное кольцо. В молекуле BChl четыре атома азота пиррольных колец лигандируют центральный атом Mg^{2+} . В молекуле BPheo вместо атома Mg^{2+} присутствуют два атома водорода. На периферии тетрапиррольного кольца в молекуле BChl располагаются различные заместители, включая циклопентановое кольцо и гидрофобную цепь (фитол). РЦ пурпурных бактерий, содержащих BChl а-типа (BChla) и BChl b-типа (BChlb) [14], образованы тремя субъединицами белка (лёгкой L, средней M и тяжёлой H) с молекулярной массой от 24 до 32 кДа, которые включают в себя четыре молекулы BChl, две молекулы BPheo, две молекулы Q и один атом железа. Молекулы BChl, BPheo и Q находятся в L- и M-субъединицах белка [15–17]. В состав РЦ некоторых бактерий входит цитохром, содержащий одну субъединицу белка и четыре гема [16, 17]. РЦ зелёных бактерий *Chloroflexus (Cfx.) aurantiacus* имеют в своём составе две белковые субъединицы массой ≈ 26 кДа [18], три молекулы BChl, три молекулы BPheo [19] и две молекулы менахинона [20].

Полученные данные о первичной последовательности L- и M-субъединиц [21] и рентгеноструктурного анализа кристаллов РЦ [16, 17, 22–27] позволили выяснить полную пространственную структуру РЦ (см. рис. 1). L- и M-субъединицы РЦ *Blastochloris (Blc.) viridis* включают в себя 273 и 223 аминокислотных остатка соответственно. Профиль гидрофобности L- и M-субъединиц показывает пять участков, пересекающих мембрану. Эти участки образуют α -спирали a, b, c, d и e, которые являются примерно параллельными друг другу и формируют структуру с C_2 -симметрией. Со стороны периплазмы LM-комплекс закрывается цитохромом, а со стороны цитоплазмы — H-субъединицей. Молекулы BChl и BPheo располагаются в области α -спиралей c, d и e в L- и M-субъединицах. Первичный донор электрона, димер BChl P, образован двумя молекулами, P_L и P_M , в которых центральный атом магния лигандируется молекулами гистидина (His) L173 и M200. Эти молекулы гистидина находятся в α -спиралях ближе к области, закрываемой белком цитохрома. Плоскости макроциклов BChl P расположены друг над другом с перекрытием орбиталей первых пиррольных колец, причём минимальное расстояние между этими плоскостями составляет всего около 3 Å. Такое сближение создаёт условия для сильного экситонного взаимодействия с энергией около 600 см^{-1} [28–30], что обуславливает специфические спектральные и окислительно-восстановительные свойства P.

Две молекулы мономерного BChl, V_L и V_M , лигандируются соответственно His L153 и His M180, которые находятся в области цепей, соединяющих α -спирали c и d. Минимальное расстояние между макроциклами $V_{L,M}$ и P составляет 3,5 Å, а расстояние между центрами P и

$V_{L,M}$ — около 13 Å. В центре гидрофобной области белка между α -спиралями c и e находятся молекулы BPheo H_L и H_M . Расстояние между центрами P и $H_{L,M} \approx 17$ Å, а расстояние между $V_L(V_M)$ и $H_L(H_M) \approx 11$ Å. Конечные акцепторы Q_A (в M-субъединице) и Q_B (в L-субъединице) находятся между α -спиралями c и e, ближе к области, которая закрывается H-субъединицей белка РЦ. Q_A находится в контакте с молекулой триптофана (Trp) M252, а Q_B — с молекулой фенилаланина (Phe) L216, которые располагаются в области цепей, соединяющих α -спирали d и e, одновременно проникая в область α -спиралей симметричных субъединиц. Между Q_A и Q_B находится атом железа, который лигандируется His L190, L230, M217 и M264 α -спиралей d и e L- и M-субъединиц. Эти His-молекулы находятся ближе к области, которая закрывается H-субъединицей. Ближайшими к Q_A и Q_B хромофорами являются H_L и H_M соответственно.

Таким образом, в РЦ имеются две симметричные цепи кофакторов: $P_L/V_L/H_L/Q_A$ и $P_M/V_M/H_M/Q_B$, которые соединяются как в области перекрытия орбиталей P_L и P_M , так и в области мостика, образованного между Q_A и Q_B атомом железа (см. рис. 1). Жёсткий каркас для цепей кофакторов образуют α -спирали белка. В такой структуре расстояние и взаимодействие между простетическими группами не зависят существенно от температуры.

Суммарный заряд для M- и L-субъединиц со стороны периплазмы равен -8 , а со стороны цитоплазмы — $+6$. С учётом заряда атома Fe^{2+} общий заряд со стороны цитоплазмы равен $+8$. Расположение этих зарядов таково, что оно может благоприятствовать переносу электрона от P к Q_A .

Общее распределение аминокислотных остатков вокруг P способствует смещению электрона к P_L вследствие несимметричного расположения полярных и неполярных остатков.

Молекулы V_L и V_M находятся в ван-дер-ваальсовом контакте как с P, так и с молекулами H_L и H_M . Молекулы His L153 и His M180 лигандируют атомы Mg^{2+} в V_L и V_M соответственно. Кроме того, молекулы V_L и V_M находятся в многочисленных ван-дер-ваальсовых контактах без образования H-связей.

Молекулы BChl в P расположены в плоскостях, образующих между собой угол около 10° . Угол между линиями, соединяющими атомы азота N_1 и N_2 в каждом из двух BChl в P, составляет $\approx 140^\circ$, что обеспечивает оптимальное перекрытие первых пиррольных циклов этих BChl. Расстояние между пиррольными циклами двух молекул BChl в P около 3,5 Å.

В РЦ *Rba. sphaeroides*, как и в РЦ *Blc. viridis*, молекула V_L расположена между P и H_L , а молекула V_M — между P и H_M . Перекрытие Ван-дер-Ваальса для орбиталей V_L и P_M в 1,5 раза больше, чем для V_M и P_L , что является одним из факторов, определяющих перенос электрона в основном по A-цепи.

2.3. Первичное разделение зарядов в реакционных центрах

Первичным донором электрона в РЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий является димер бактериохлорофилла (BChl) P. Основная полоса поглощения P находится при 865–885 нм в *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides*, *Rba. capsulatus*, *Chromatium vinosum* и *Thermochroma-*

tium tepidum, содержащих ВChla, и при ≈ 960 нм — в *Blastochloris (Blc.) viridis*, содержащих ВChlb. При возбуждении Р переходит в первое возбуждённое синглетное состояние P^* , из которого электрон передаётся молекуле бактериофеофитина (ВРheо) с образованием состояния $P^+H_A^-$. Далее электрон переходит с H_A^- на хинон (Q_A). С Q_A^- электрон переходит на вторичный хинон Q_B . Окисленный P^+ получает электрон от цитохрома с-типа, и процесс трансмембранного переноса электрона повторяется. При комнатной температуре перенос электрона от P^* к H_A занимает 3–5 пс в РЦ *Rba. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* и около 2 пс в РЦ *Blc. viridis* [31–44]. Перенос электрона от H_A^- на Q_A занимает примерно 200 пс [45–47]. Константа времени переноса электрона от цитохрома на P^+ изменяется от 0,5 до 50 мкс, в зависимости от типа РЦ.

Согласно общей теории разделения зарядов (см. [1–13]) константа скорости переноса электрона k_{DA} от донора D к акцептору A определяется коэффициентом пропускания $\sigma(r)$, показывающим вероятность для электрона перейти от D^* на A за один подход к области пересечения потенциальных поверхностей D^*A и D^+A^- при фиксированном расстоянии r . Этот коэффициент изменяется приблизительно как $\exp[-\beta(r-r_0)]$, где β лежит в диапазоне от 1 до 2 \AA^{-1} , r_0 — расстояние, при котором $\sigma(r) \nu = 10^{13} \text{ с}^{-1}$, ν — частотный фактор. Кроме того, в выражение для k_{DA} входит экспоненциальный фактор $\exp[-E_a/(k_B T)]$, где E_a — свободная энергия активации, k_B — постоянная Больцмана, T — температура:

$$k_{DA} = \sigma(r) \nu \exp\left(-\frac{E_a}{k_B T}\right). \quad (1)$$

Скорость обратной реакции k_{AD} выражается как $k_{AD} = k_{DA} \exp[\Delta G/(k_B T)]$, где ΔG — свободная энергия реакции. Если энергия состояния D^+A^- меньше, чем энергия D^*A , то $\Delta G < 0$ и $k_{AD} < k_{DA}$.

Когда имеется значительное электронное сопряжение двух состояний (адиабатическая реакция), значение $\sigma(r)$ приближается к единице. В этом случае ν приобретает смысл эффективной частоты для ядерного движения вдоль координаты реакции.

Если $\sigma(r) \ll 1$ (неадиабатический случай), то выражение для константы скорости переноса электрона находится согласно квантово-механическим вычислениям. В этом случае константа скорости переноса электрона (k) в первом приближении в пределе высоких температур выражается как

$$k = 2\pi\hbar^{-1} V^2 (4\pi E_r k_B T)^{-0,5} \exp\left(-\frac{E_a}{k_B T}\right), \quad (2)$$

где \hbar — постоянная Планка, V — матричный элемент электронного сопряжения, E_r — энергия реорганизации реакции. Энергия активации E_a связана с энергией реорганизации E_r и свободной энергией реакции ΔG соотношением

$$E_a = 0,25E_r \left(1 + \frac{\Delta G}{E_r}\right)^2. \quad (3)$$

Из выражения (3) видно, что активационный барьер равен нулю при $\Delta G = -E_r$, т.е. когда потенциальная кри-

вая D^+A^- пересекает аналогичную кривую D^*A в её минимуме. В этом случае скорость реакции максимальна.

Формула (2), несмотря на её приближённый характер, широко используется при оценках скорости реакций разделения и переноса зарядов. Для первичной реакции $P^* \rightarrow P^+H_A^-$ в РЦ *Rba. sphaeroides* при $\Delta G \approx -500 \text{ см}^{-1}$ и $E_r \approx 650 \text{ см}^{-1}$ имеем очень малый барьер — $E_a \approx 9 \text{ см}^{-1}$. Полагая $V \approx 20 \text{ см}^{-1}$, имеем $k \approx 1/(3 \text{ пс})$ при $T = 293 \text{ К}$ и $k \approx 1/(1,7 \text{ пс})$ при $T = 90 \text{ К}$, что близко к экспериментальным значениям. Для реакции $P^+H_A^- \rightarrow P^+H_A^-$ в РЦ *Rba. sphaeroides* барьер также очень мал: при $\Delta G \approx -1500 \text{ см}^{-1}$ и $E_r \approx 1500 \text{ см}^{-1}$ величина $E_a \approx 0$. Для этой реакции расчётная константа $k \approx 1/(0,3 \text{ пс})$ при $T = 90 \text{ К}$, близкая к экспериментальной, получается при $V \approx 40 \text{ см}^{-1}$.

В нативных РЦ в переносе электрона участвует только А-цепь кофакторов [48–57]. В РЦ дикого типа перенос электрона от P^* к H_B не регистрируется, о чём говорят данные спектроскопии полосы поглощения H_B , которая отличается от аналогичной полосы H_A . Спектральное различие этих полос обусловлено тем, что водородная связь с протонированным остатком Glu (глутаминовая кислота) смещает Q_x - и Q_y -полосы поглощения H_A в длинноволновую сторону относительно аналогичных полос H_B [58]. Здесь и далее Q_x и Q_y — спектроскопические обозначения длинноволновых молекулярных переходов, поляризованных вдоль взаимно перпендикулярных осей x и y . Эти оси обычно выбирают таким образом, чтобы они лежали в плоскости тетрапиррольного кольца молекулы хлорофилла или бактериохлорофилла.

Высокая скорость первичных реакций переноса электрона может объясняться малым расстоянием (порядка 3–4 Å) между некоторыми атомами π -системы V_A и атомами Р и H_A . Квантовый выход разделения зарядов близок к единице [59–61]. С понижением температуры скорость переноса электрона возрастает [33, 34, 41, 44, 62–67]. При температуре 20 К константа времени образования $P^+H_A^-$ составляет около 1,2 пс в РЦ *Rba. sphaeroides* и около 0,9 пс в РЦ *Blc. viridis*. Перенос электрона от H_A^- на Q_A также ускоряется с понижением температуры примерно в два раза [68–70].

Основные пики в спектрах поглощения невозбуждённых РЦ *Rba. sphaeroides*, соответствующие Q_y - и Q_x -переходам, принадлежат Р (длина волны $\lambda = 865$ нм при температуре 293 К), $V_{A,B}$ (800 нм) и $H_{A,B}$ (760 нм). Полоса при 595 нм имеет вклад как Р, так и $V_{A,B}$. Полоса при 540 нм образована $H_{A,B}$. При низких температурах полоса Р смещается к 890 нм, становясь примерно в 1,5 раза уже, а в полосе при 540 нм становятся различимы полоса H_B при 533 нм и полоса H_A при 546 нм. В широкой полосе Сорэ выделяют вклад Н в её коротковолновой части и вклад Р в её длинноволновой части [71]. Молекула каротиноида, выполняющая функции светособирания и фотозащиты, имеет слабый пик при 500 нм [72]. Флуоресценция и вынужденное излучение P^* имеют пик при 915–920 нм. При замене ВРheо растительным феофитином а-типа полосы при 760 нм исчезают, а вместо них возникает полоса растительного феофитина при 670 нм. При образовании катион-радикала P^+ исходные полосы поглощения Р при 865 и 590 нм исчезают, а на их месте появляется широкая полоса в ИК-части спектра с максимумом при 1250 нм. При появлении анион-радикала H_A^- полосы при 762 и 546 нм исчезают и возникают широкие полосы при 650, 920 и 960 нм. Образование H_A^- для РЦ с

ВChlb регистрируется также по изменениям поглощения в диапазоне длин волн 790–830 нм. При образовании анион-радикала V_A^- полосы поглощения V_A при 800 и 595 нм исчезают и возникает слабая полоса при 1020 нм. При химической или генетической модификации РЦ характерные полосы поглощения сдвигаются, однако установить общие закономерности этих сдвигов не удаётся [73]. Воздействие на Н-связь с кето-группой H_A приводит к сдвигам полосы поглощения при 760 нм [58]. Полоса поглощения Р может смещаться в коротковолновую сторону примерно на 15 нм в результате мутаций, затрагивающих Н-связь с ацетильной группой. Значительные изменения в спектре поглощения РЦ наблюдаются при замене кофакторов в результате мутаций [74, 75].

Подобно РЦ пурпурных бактерий, РЦ термофильных зелёных бактерий *Cfx. aurantiacus* состоят из димера ВChI в качестве первичного донора электронов, ВРheо в качестве промежуточного акцептора электронов и двух молекул менахинона, Q_A и Q_B [18, 20, 76–81]. Трёхмерная структура этих РЦ до сих пор неизвестна. Сравнение структуры полипептидов, спектроскопических данных и результатов расчётов в рамках теории экситонов показывает, что кофакторы в РЦ *Cfx. aurantiacus* образуют две цепи пигментов, как и в РЦ *Rba. sphaeroides* [80, 82–88].

Найдено, что скорость переноса электрона на H_A в РЦ *Cfx. aurantiacus* меньше таковой для *Rba. sphaeroides* [89, 90]. При температуре 296 К распад P^* происходит с постоянной времени 7 пс, а при температуре 10 К в кинетике этого распада выделяют две компоненты — с постоянными времени 2 и 24 пс. Квантовый выход первичного разделения зарядов при температуре 280 К [91] и комнатной температуре [92] близок к единице. Предполагается, что дополнительная молекула ВChI V_A участвует в переносе электрона от P^* к H_A в качестве медиатора [86, 92]. Дальнейший перенос электрона от H_A^- к первичному хинону Q_A с образованием состояния $P^+Q_A^-$ происходит в РЦ *Cfx. aurantiacus* с константой времени ~ 320 пс при температуре 280 К [79].

РЦ *Cfx. aurantiacus*, несмотря на их схожесть с бактериальными РЦ по расположению хромофоров и фотохимии, имеют ряд существенных отличий по составу белков и кофакторов (см. обзор [76]). Некоторые аминокислотные остатки, входящие в состав РЦ пурпурных бактерий, отсутствуют в РЦ *Cfx. aurantiacus*. Например, вместо тирозина (Tyr) M210 в РЦ *C. aurantiacus* находится лейцин (Leu), чем может объясняться замедление первичной реакции разделения зарядов.

Отметим, что В-цепь в РЦ *Cfx. aurantiacus* содержит две молекулы ВРheо, Φ_V и H_V , причём Φ_V находится в положении V_V [19, 79]. В пурпурных бактериях уровень свободной энергии состояния $P^+V_V^-$ лежит на 0,24 эВ выше уровня энергии P^* , а уровень $P^+V_A^-$ — немного ниже уровня P^* [93, 94]. Считается, что эта разница в уровнях свободной энергии является важным фактором, определяющим функциональную неактивность В-цепи.

Средноточечный потенциал редокс-пары ВРheо/ВРheо $^-$ *in vitro* на 0,23–0,30 эВ больше, чем для пары ВChI/ВChI $^-$ [95, 96], что облегчает восстановление ВРheо-а Φ_V по сравнению с восстановлением ВChIа V_V . С другой стороны, средноточечный потенциал пары Р/Р $^+$ в РЦ *Cfx. aurantiacus* находится ниже на 70–90 мВ, чем в РЦ *Rba. sphaeroides* [77, 86]. Таким образом, уровень энергии $P^+\Phi_V^-$ в РЦ *Cfx. aurantiacus* может быть близок к уровню

P^* или даже быть ниже его, что даёт возможность переноса электрона в В-цепь.

В [97] при объяснении низкотемпературных кинетик флуоресценции в РЦ *Cfx. aurantiacus* с восстановленным Q_A сделан вывод о возможности быстрого обратимого переноса электрона между P^* и ВРheо в В-цепи. Однако данные разностной спектроскопии поглощения в полосе Q_x молекул ВРheо и близкий к единице квантовый выход первичного разделения зарядов в РЦ *Cfx. aurantiacus* указывают на перенос электрона преимущественно по А-цепи [91, 92, 98].

При прямом возбуждении V_A или H_A наблюдается последовательность первичных реакций [99–101]. Аналогичный эффект возникает при многофотонном возбуждении РЦ [102] или при возбуждении их синим светом [103]. Поскольку уровень энергии V_A^* выше, чем у P^* , имеется возможность прямой реакции $V_A^* \rightarrow P^+V_A^-$, которая регистрируется наиболее явно в РЦ мутанта YM210F при низких температурах, когда реакция $P^* \rightarrow P^+V_A^-$ значительно замедлена. Кроме того, V_A^* передаёт энергию возбуждения Р с константой времени ~ 100 фс. При определённых условиях может идти прямая реакция $V_A^* \rightarrow P^+H_A^-$. С другой стороны, в ряде работ ставится под сомнение возможность значительной роли состояния V_A^* в быстром переносе электрона [104–106].

Первичное разделение зарядов в РЦ сопровождается потерей энергии электрона. Так, энергия состояния $P^+H_A^-$ меньше примерно на 0,2 эВ энергии P^* , а для состояния $P^+Q_A^-$ эта разница увеличивается приблизительно до 0,65 эВ, что составляет около 50 % от исходной энергии поглощённого кванта света. В разных типах РЦ энергетическая эффективность первичного разделения зарядов достигает 50–60 %. Эта величина заметно выше, чем энергетический коэффициент полезного действия (к.п.д.) современных искусственных преобразователей солнечной энергии на полупроводниках, хотя и не является рекордно высокой. Энергия состояния $P^+V_A^-$, которое образуется раньше $P^+H_A^-$, меньше энергии P^* примерно на 0,07 эВ (подробнее см. раздел 5). Избыток энергии поглощается окружением пигментов РЦ.

По данным субпикосекундной спектроскопии феофитин-модифицированных РЦ *Rba. sphaeroides* время рекомбинации $P^+V_A^-$ составляет ≈ 1 нс, что примерно в три раза больше времени жизни P^*V [107]. Время рекомбинации $P^+H_A^-$ составляет 15 нс при $T = 293$ К и 20 нс при $T = 77$ К, т.е. рекомбинация $P^+H_A^-$ почти в 20 раз медленнее рекомбинации $P^+V_A^-$ [108]. Время рекомбинации $P^+Q_A^-$ составляет 30 мс при $T = 77$ К и 100 мс при $T = 293$ К, а время рекомбинации $P^+Q_B^-$ достигает нескольких секунд [2, 7].

Таким образом, в РЦ каждый новый этап переноса электрона сопровождается потерей энергии исходно поглощённого кванта в обмен на увеличение времени диссипации запасённой энергии при постепенном его возрастании на каждом этапе разделения зарядов. Согласно рентгеноструктурной модели РЦ [16, 17, 22] каждый этап переноса электрона сопровождается увеличением расстояния от P^+ до следующего акцептора: 11 Å (между центрами) для $P^+V_A^-$, 16 Å для $P^+H_A^-$ и 25 Å для $P^+Q_A^-$. В этом случае удаление электрона сопровождается уменьшением энергии взаимодействия неспаренных электронов, а скорость движения электрона назад по вакантным орбитальным резко уменьшается вследствие воздействия фактора Больцмана, препятствующего пере-

ходу электрона в более высокое энергетическое состояние.

В кинетике стимулированного излучения P^* наряду с основной компонентой (константа времени около 3–4 пс при температуре 293 К) присутствует небольшая более медленная компонента (константа времени ~ 10 –20 пс при $T = 293$ К) [43, 109–116]. Происхождение этой медленной компоненты объясняют статической или динамической гетерогенностью реакции [66, 89, 117–120], релаксацией окружения диполя $P^+H_A^-$ [34, 42, 115, 121, 122], релаксацией P^* [65, 116] или обратимым переносом электрона в В-цепь [112]. Остаётся неясным, отвечают ли эти две компоненты в кинетике P^* двум разным процессам или одному неэкспоненциальному процессу.

Экспериментальные данные по выжиганию провалов не подтверждают идеи о значительной гетерогенности РЦ [123–125]. Наблюдаемые ширина и форма провала в спектрах РЦ при их возбуждении вблизи 0–0-перехода при низких температурах соответствуют времени затухания P^* около 1 пс, что близко к данным кинетических измерений. Не наблюдаются и более узкополосные провалы, которые отвечали бы более медленному спаду P^* . Расчёты показывают, что ширина выжигаемого провала и соответствующая скорость переноса электрона изменяются незначительно при варьировании длины волны возбуждающего света в области гетерогенного распределения 0–0-переходов [123, 124]. Отсутствие корреляции между кинетикой переноса электрона и энергией 0–0-перехода означает отсутствие гетерогенности РЦ. С помощью фемтосекундной ИК-спектроскопии обнаружена внутренняя релаксация P^* с константой времени 0,2 пс при температуре 285 К в иное состояние, которое предположительно отвечает разделению зарядов внутри P^* [126]. Эксперименты по выжиганию провалов при низких температурах не подтверждают наличия перехода P^* в иное состояние с характерным временем, существенно меньшим 1 пс [124, 127–129].

При возбуждении РЦ световыми импульсами с длительностью ≤ 30 фс в стимулированном и спонтанном излучении P^* наблюдаются осцилляции [109, 110, 113, 130–139]. Основным механизмом возникновения этих осцилляций считается движение ядерного волнового пакета по поверхности потенциальной энергии состояния P^* . Волновой пакет формируется в результате одновременного возбуждения нескольких колебательных подуровней в состоянии P^* . Вследствие смещения поверхностей потенциальных энергий P^* и Р движение волнового пакета визуализируется в виде изменения формы спектра вынужденного излучения P^* [109, 110, 130–137]. Спектр этого движения включает в себя ряд частот в диапазоне 10–400 см^{-1} . Верхний предел наблюдаемых частот осцилляций, по-видимому, определяется шириной спектра возбуждающего импульса. Теоретические расчёты показывают, что осцилляции возможны и в состояниях с разделёнными зарядами [140, 141].

Осцилляции в $P^+V_A^-$ можно объяснить не только обратными переносами электронной плотности на P^* , но и быстрыми переходами в $P^+H_A^-$ на фоне более медленного накопления $P^+V_A^-$ [140, 141]. Вклад определённых типов движений молекул ВСН1 и белкового окружения в осцилляции P^* и $P^+V_A^-$ до сих пор полностью не определён. Эксперименты по резонансному комбинационному рассеянию и расчёты нормальных мод колебаний для маркированного изотопами ВСН1 показывают, что вне-

плоскостная деформация С2 ацетильных групп имеет сильную моду при 35 см^{-1} , а ряд деформаций макроциклических колец имеет моду при 130 см^{-1} [142]. Молекулы белка также обладают низкочастотными модами движения [139].

Характерное время жизни волнового пакета составляет 1–2 пс, причём высокочастотные моды его движения затухают быстрее низкочастотных [133]. При низких температурах это время примерно равно времени жизни P^* в нативных РЦ. В мутантных РЦ с замедленным разделением зарядов время жизни волнового пакета остаётся прежним — около 1–2 пс. Время жизни волнового пакета может отражать колебательную релаксацию P^* , которая может включать в себя как дефазировку колебательных подуровней из-за флуктуаций их энергии, так и передачу избытка колебательной энергии этих подуровней во внешнее окружение. Если колебательная релаксация $P^+V_A^-$ и $P^+H_A^-$ происходит с тем же характерным временем 1–2 пс, что и релаксация P^* , то она может лимитировать общую скорость разделения зарядов [34, 42, 121, 122, 143–145]. Расчёты методом матриц плотности вероятностей показывают, однако, что колебательная релаксация различных состояний РЦ достаточно быстра для того, чтобы не лимитировать скорость разделения зарядов, а её дальнейшее ускорение может привести к обратному эффекту замедления разделения зарядов [140, 141].

Фемтосекундная спектроскопия РЦ в области длины волны 280 нм выявила изменения поглощения, возникающие сразу после возбуждения и затухающие с характерными временами 3, 10 и 190 пс, которые не изменяются при различных мутациях [116]. Было предположено, что компоненты с характерными временами 3 и 10 пс отражают диэлектрическую релаксацию белка вокруг P^* , а компонента с характерным временем 190 пс связана с переносом электрона $H_A^- \rightarrow Q_A$. Изменения поглощения при 280 нм могут отражать влияние изменяющихся локальных электрических полей на аминокислотные остатки Trp (триптофан) вблизи Р, V_A и H_A .

2.4. Эффективность первичного акта фотосинтеза

Многочисленные эксперименты по измерению квантовой эффективности (или, по другой терминологии, квантового выхода) первичных фотохимических процессов Φ_p в РЦ, выполненные с помощью различных методик, дают удивительный результат: $\Phi_p \sim 1$ (см. обзоры и дискуссии в [1–13]). Это означает, что на один поглощённый квант света приходится примерно один перенесённый электрон. Даже самые ранние измерения скорости выцветания полосы поглощения димера Р, проведённые ещё в 1970-е годы, дали минимальное значение $\Phi_p \approx 0,98$. С точки зрения накопленных к настоящему времени данных этот результат уже не удивляет, хотя и продолжает восхищать как пример совершенства живой природы.

Рассмотрим данный вопрос подробнее на примере РЦ пурпурной фотосинтезирующей бактерии *Rba. sphaeroides*, которая является классическим объектом изучения ввиду доступности и простоты проведения методических процедур. По определению, квантовая эффективность реакции разделения зарядов — это отношение числа перенесённых электронов к числу поглощённых молекулами донора квантов света. При стационарном освещении оперируют числом частиц в единицу времени.

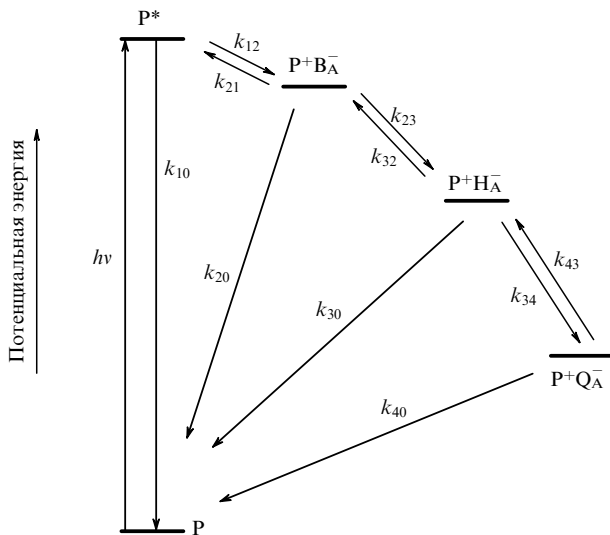


Рис. 2. Схема уровней энергии и переходов между ними для состояний РЦ бактерий. (См. пояснение в тексте.)

Согласно закону фотохимической эквивалентности каждый поглощённый квант света приводит к возбуждению одной молекулы (в отсутствие многофотонных процессов). Если реакция проходит в одну стадию, то её квантовый выход можно представить так:

$$\Phi_p = \frac{K_r}{K_r + \sum k}, \quad (4)$$

где K_r — скорость реакции, $\sum k$ — сумма скоростей всех других процессов, конкурирующих с разделением зарядов. Если разделение зарядов происходит намного быстрее, чем все прочие процессы, то $K_p \gg \sum k$ и $\Phi_p \approx 1$.

Согласно современным данным разделение зарядов в РЦ бактерий имеет три последовательные стадии, в которых участвуют четыре состояния (рис. 2). Каждая стадия характеризуется прямой скоростью переноса электрона $k_{i,i+1}$, обратной скоростью $k_{i,i-1}$ и скоростью потерь $k_{i,0}$, $i = 1-4$. В РЦ *Rba. sphaeroides* эти скорости определены экспериментально с хорошей точностью (см. таблицу).

Предположим, что в РЦ поглощается стационарный поток квантов света I . Стационарные заселённости состояний P^* (N_1), $P^+B_A^-$ (N_2), $P^+H_A^-$ (N_3) и $P^+Q_A^-$ (N_4) можно найти, решив следующую систему кинетических уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dN_1}{dt} &= I + k_{21}N_2 - (k_{10} + k_{12})N_1 = 0, \\ \frac{dN_2}{dt} &= k_{12}N_1 + k_{32}N_3 - (k_{21} + k_{23} + k_{20})N_2 = 0, \\ \frac{dN_3}{dt} &= k_{23}N_2 - (k_{32} + k_{34} + k_{30})N_3 = 0, \\ \frac{dN_4}{dt} &= k_{34}N_3 - (k_{43} + k_{40} + k_{\text{био}})N_4 = 0. \end{aligned} \quad (5)$$

Таблица. Скорости (в с^{-1}) переходов в РЦ *Rba. sphaeroides*

k_{10}	k_{20}	k_{30}	k_{40}	k_{12}	k_{21}	k_{23}	k_{32}	k_{34}	k_{43}
$1,2 \times 10^9$	10^9	7×10^7	10^1	$3,3 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{10}$	10^{12}	$5,4 \times 10^8$	5×10^9	$1,2 \times 10^2$

В последнем уравнении $k_{\text{био}}$ — это условная скорость биохимической стадии фотосинтеза. В лабораторных условиях при работе с изолированными РЦ биохимическая стадия отсутствует. В этом случае важно предотвратить накопление состояния $P^+Q_A^-$, приводящее к окислению РЦ и потере его функции. Препятствовать накоплению состояния $P^+Q_A^-$ можно посредством добавления химических соединений, которые поддерживают РЦ в так называемом открытом состоянии. Для открытого состояния можно считать, что $N_4 = 0$, и не рассматривать последнее уравнение. Потери k_{10} являются суммой излучательных и безизлучательных потерь. Для квантового выхода $P^+Q_A^-$ получаем выражение:

$$\Phi_{1-3} = \frac{k_{34}N_3}{I} = \frac{k_{34}XY}{Z}, \quad (6)$$

где $X = k_{23}/(k_{32} + k_{34} + k_{30})$, $Y = k_{12}/(k_{21} + k_{23} + k_{20} - Xk_{32})$, $Z = k_{10} + k_{12} - k_{21}Y$. Обратные реакции связаны с прямыми следующим образом: $k_{21} = k_{12} \exp[-\Delta E_{12}/(k_B T)]$, $k_{32} = k_{23} \exp[-\Delta E_{23}/(k_B T)]$, $k_{43} = k_{34} \exp[-\Delta E_{34}/(k_B T)]$, где ΔE — разности потенциальных энергий соответствующих состояний.

Рассуждая аналогично, получим следующее выражение для квантового выхода $P^+H_A^-$:

$$\Phi_{1-2} = \frac{k_{23}N_2}{I} = \frac{k_{23}\hat{Y}}{k_{10} + k_{12} - k_{21}\hat{Y}}, \quad (7)$$

где $\hat{Y} = k_{12}/(k_{21} + k_{23} + k_{20})$.

Для квантового выхода $P^+B_A^-$ имеем простое выражение:

$$\Phi_1 = \frac{k_{12}N_1}{I} = \frac{k_{12}}{k_{12} + k_{10}}. \quad (8)$$

Подставляя значения скоростей из таблицы, находим $\Phi_{1-3} = 0,98$, $\Phi_{1-2} = 0,995$, $\Phi_1 = 0,996$. Все три стадии разделения зарядов имеют квантовый выход, близкий к единице. Наибольшие квантовые потери (около 2%) даёт третья, самая медленная, стадия. Этот результат не является неожиданным, так как из таблицы видно, что все прямые скорости намного превосходят как скорости потерь, так и обратные скорости.

Обсудим подробнее события, происходящие в РЦ. Как отмечалось, первичным донором электрона является димер бактериохлорофилла, основная полоса поглощения которого находится в ближнем ИК-диапазоне при длине волны 870 нм (11494 см^{-1}). В природе энергия возбуждения поступает в РЦ из светособирающей антенны, состоящей из различных молекул бактериохлорофилла. В лабораторных условиях изолированные РЦ возбуждаются непосредственно светом. При возбуждении электрон, находящийся на связывающей орбитали основного энергетического уровня, переходит на нижнюю разрыхляющую орбиталь возбуждённого синглетного уровня S1. Образовавшееся возбуждённое состояние P^* проявляет сильную неустойчивость и существует только около 3 пс. Одним из основных факторов, определяющих неустойчивость состояния P^* , является

сильный сдвиг электронной плотности к одной из двух молекул, образующих димер (к молекуле P_B). Этот сдвиг происходит в течение $\sim 0,1$ пс после возбуждения и представляет собой частичное разделение зарядов внутри димера P . Тем не менее реальное разделение зарядов начинается тогда, когда электрон окончательно покидает димер P . Этот процесс занимает примерно 3 пс, т.е. ровно столько, сколько длится возбуждение димера P .

Итак, через 3 пс электрон покидает возбуждённый димер P (который при этом окисляется до P^+) и появляется на молекуле мономерного бактериохлорофилла V_A (восстанавливая её до V_A^-). Для выяснения этого, казалось бы, простого факта потребовались интенсивные исследования на протяжении последних 35 лет (подробнее см. раздел 5). Расстояние в несколько ангстремов между молекулами P и V_A электрон проходит, двигаясь по цепочкам атомов белковой матрицы, заполняющих пространство между P и V_A . Таких пространственных троп переноса электрона может быть несколько, и их идентификация к настоящему времени не завершена (подробнее см. раздел 4). Состояние P^* таким образом переходит в первичное состояние с разделёнными зарядами $P^+V_A^-$ со скоростью $k_{12} = 1/(3 \text{ пс}) = 3,3 \times 10^{11} \text{ с}^{-1}$. Состояние $P^+V_A^-$ в свою очередь является ещё более неустойчивым, чем состояние P^* , и за ~ 1 пс (скорость $k_{23} = 1/(1 \text{ пс}) = 10^{12} \text{ с}^{-1}$) переходит в состояние $P^+H_A^-$. При этом электрон переходит с молекулы V_A на молекулу бактериофеофитина H_A , двигаясь вдоль соответствующей цепочки атомов. Этот переход увеличивает расстояние между разделёнными зарядами (положительный заряд на P^+ и отрицательный на H_A^-) более чем в два раза. Состояние $P^+H_A^-$ намного стабильнее, чем предыдущее состояние $P^+V_A^-$, характерное время жизни $P^+H_A^-$ составляет примерно 200 пс. За это время электрон покидает молекулу H_A и переходит со скоростью $k_{34} = 1/(200 \text{ пс}) = 5 \times 10^9 \text{ с}^{-1}$ на молекулу убихинона Q_A , которая отстоит от димера P ещё дальше, чем молекула H_A . При этом образуется первое метастабильное состояние $P^+Q_A^-$ с характерным временем жизни 0,1 с. Считается, что с образованием $P^+Q_A^-$ первичная фаза разделения зарядов в РЦ заканчивается. Далее электрон переходит на молекулу вторичного хинона Q_B с участием атома железа (см. рис. 1) и покидает РЦ, вовлекаясь в длинную цепь биохимических реакций.

Таким образом, прямые скорости различных стадий разделения зарядов изменяются в диапазоне $5 \times 10^9 - 10^{12} \text{ с}^{-1}$. Сами по себе эти величины не являются рекордно высокими, поскольку огромное количество разнообразных химических реакций протекает в том же временном диапазоне.

Следует отметить одну из ключевых особенностей РЦ: отсутствие прямого контакта между молекулами пигментов P , V_A , H_A и Q_A , которые жёстко фиксированы белковой матрицей на определённых расстояниях друг от друга. Это означает, что молекулы матрицы принимают участие в переносе электрона, образуя эффективные электронные тропы. Хорошо известно, что скорость движения электрона по этим тропам такова, что расстояние величиной в несколько ангстремов, характерной для расстояний между пигментами РЦ, электрон проходит менее чем за 0,1 пс. Наличие электронных троп приводит к тому, что потенциальный барьер первичных реакций разделения зарядов становится пренебрежимо малым. Это означает максимальную скорость реакций

при заданных температуре, энергии реорганизации и энергии электронного сопряжения (см. формулы (2), (3)). С другой стороны, отсутствие контакта между молекулами пигментов затрудняет рекомбинацию разделённых зарядов.

Подчёркнём, что рассмотрение первичных процессов фотосинтеза в терминах отдельных состояний является серьёзным упрощением, хотя и широко применяется ввиду его наглядности и простоты. Как показывают многие исследования (см. обзоры в [1–13]), в действительности самый ранний этап разделения зарядов характеризуется образованием смешанных состояний $P^*(P^+V_A^-)$, $P^+V_A^-(P^+H_A^-)$ и, по-видимому, $P^*(P^+V_A^-)(P^+H_A^-)$. Квантово-механическое смешение приводит к тому, что электрон может одновременно находиться с некоторой вероятностью в каждом из этих состояний, т.е. принадлежать молекулам P , V_A и H_A . Казалось бы, это облегчает и ускоряет процесс переноса электрона, однако нельзя забывать, что такой чисто квантовый процесс является осциллирующим (с частотой $\sim (4V^2 + (\Delta E)^2)^{0,5}/\hbar$, где V — энергия электронного сопряжения, ΔE — разность энергий состояний), т.е. обратимым. С увеличением ΔE эта обратимость и степень перемешивания состояний уменьшаются. По-видимому, оптимальной будет ситуация, в которой разделение зарядов завершается одновременно с окончанием первого полупериода осцилляций.

Рассмотрим различные каналы потерь при разделении зарядов. Прежде всего, потеря возбуждения может происходить в результате флуоресценции $P^* \rightarrow P$. Для хлорофиллов (бактериохлорофиллов) в растворе синглетное состояние S_1 имеет радиационное время жизни от 10 до 40 нс, что даёт соответствующую скорость радиационного распада состояния P^* $k_f \sim 10^8 \text{ с}^{-1}$. Для РЦ это время оценивается в пределах от нескольких долей наносекунды до 1 нс, что даёт верхнюю границу $k_f \sim 10^9 \text{ с}^{-1}$. Мы видим, что скорость k_f меньше скорости k_{12} более чем на два порядка. Константа скорости безызлучательного перехода $P^* \rightarrow P$ имеет намного меньшую величину: $k_q \sim 10^6 \text{ с}^{-1}$. Константа скорости образования триплетных состояний (интеркомбинационная конверсия) в РЦ оценивается величиной $k_{tr} \sim 2 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$. Таким образом, суммарные потери состояния P^* оцениваются как $k_{10} = k_f + k_q + k_{tr} \sim 1,2 \times 10^9 \text{ с}^{-1}$. Характерные времена рекомбинации состояний с разделёнными зарядами составляют ~ 1 нс ($k_{20} \sim 10^9 \text{ с}^{-1}$) для реакции $P^+V_A^- \rightarrow PV$, ~ 15 нс ($k_{30} \sim 7 \times 10^7 \text{ с}^{-1}$) для реакции $P^+H_A^- \rightarrow PH$ и $\sim 0,1$ с ($k_{40} \sim 10 \text{ с}^{-1}$) для реакции $P^+Q_A^- \rightarrow PQ$.

Отдельно рассмотрим проблему обратных реакций. Скорость обратной реакции находится умножением скорости прямой реакции на фактор Больцмана $B = \exp[-\Delta E/(k_B T)]$, где ΔE — разность энергий начального и конечного состояний. При комнатной температуре $k_B T \approx 200 \text{ см}^{-1}$. Для реакции $P^* \rightarrow P^+V_A^-$ разность энергий $\Delta E \sim 500 \text{ см}^{-1}$ и $B = 0,08$. Тогда для обратной реакции $P^+V_A^- \rightarrow P^*$ имеем скорость $k_{21} = 0,08k_{12} \sim \sim 0,27 \times 10^{11} \text{ с}^{-1}$. В изолированной двухуровневой системе отношение равновесных заселённостей начального и конечного состояний равно B . Если бы разделение зарядов заканчивалось на стадии образования $P^+V_A^-$, то при комнатной температуре примерно 8% возбуждённых РЦ не принимало бы участия в разделении зарядов. Наличие следующей ступени, $P^+V_A^- \rightarrow P^+H_A^-$, снимает

эту проблему, эффективно опустошая оба состояния, P^* и $P^+B_A^-$. Для реакции $P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$ имеем $\Delta E \sim 1500 \text{ см}^{-1}$ и $B = 5,4 \times 10^{-4}$. Отсюда для обратной реакции $P^+H_A^- \rightarrow P^+B_A^-$ получим скорость $k_{32} = 5,4 \times 10^{-4} k_{23} = 5,4 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$. Для следующей реакции, $P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$, разность энергий $\Delta E \sim 3500 \text{ см}^{-1}$ и $B = 2,4 \times 10^{-8}$. Для обратной реакции $P^+Q_A^- \rightarrow P^+H_A^-$ скорость $k_{43} = 2,4 \times 10^{-8} k_{34} = 120 \text{ с}^{-1}$. Как видно, обратные реакции намного медленнее прямых, что предотвращает обратное заселение состояния P^* , приводящее к возрастанию выхода флуоресценции.

Как отмечалось выше, в каждой из трёх последовательных реакций скорость переноса электрона намного превышает скорости всех других вместе взятых процессов, приводящих к потерям. В этом и состоит главная причина высокой квантовой эффективности разделения зарядов в РЦ. Абсолютные величины скоростей переноса электрона при этом не являются рекордно высокими. Безусловно, первопричина всех уникальных свойств РЦ кроется в их структурной организации (см. раздел 2.2).

Несмотря на успехи в изучении трёхмерной структуры РЦ с помощью рентгеноструктурного анализа, исследования по установлению всех логических связей между структурой и функционированием РЦ ещё далеки от завершения. В частности, до сих пор активно обсуждается удивительный факт: при понижении температуры вплоть до температуры жидкого гелия скорость разделения зарядов возрастает в 2–3 раза, что приводит к ещё большей квантовой эффективности. Одно из объяснений состоит в усилении роли такого квантового эффекта, как туннелирование электрона сквозь потенциальный барьер (см. формулы (2), (3)).

Отметим ещё раз, что энергетическая эффективность первичного разделения зарядов заметно меньше 100 %. Прямые потери энергии можно оценить, разделив разность энергий начального и конечного состояний на величину кванта энергии поглощённого света: $\Delta E/(\hbar\omega)$. Так, для реакции $P^* \rightarrow P^+B_A^-$ потери энергии составляют $\sim 500 \text{ см}^{-1}/(11494 \text{ см}^{-1}) = 0,044$. Для реакции $P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$ находим потери энергии $\sim 1500 \text{ см}^{-1}/(11494 \text{ см}^{-1}) = 0,13$, а для реакции $P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$ потери энергии будут $\sim 3500 \text{ см}^{-1}/11494 \text{ см}^{-1} = 0,3$. Суммарные потери энергии составляют $\sim 0,474$, т.е. около 50 %. При поглощении света с длиной волны 800 нм (полоса мономерных бактериохлорофиллов $B_{A,B}$) или 760 нм (полоса бактериофеофитинов $H_{A,B}$) в РЦ образуются соответствующие возбуждённые состояния V^* или H^* , которые затем передают возбуждение димеру Р в течение 0,1–0,2 пс. В этом случае суммарные потери энергии несколько больше: $\sim 0,52$ и $\sim 0,54$ для света с длинами волн 800 и 760 нм соответственно.

Подчеркнём, что последовательное понижение уровня энергии промежуточных продуктов реакций совершенно необходимо для минимизации обратных реакций. Избыток энергии эффективно поглощается белковым окружением пигментов РЦ. Важную роль в отводе тепла играют также молекулы каротиноидов, входящие в состав РЦ.

Для того чтобы оценить важность понижения энергии состояний с разделёнными зарядами, рассмотрим гипотетическую ситуацию, в которой все состояния, изображённые на рис. 2, имеют одинаковую энергию. В этом случае, согласно формуле (3), энергия активации E_a каждой реакции существенно увеличится и составит

одну четверть от соответствующей энергии реорганизации E_r . Согласно формуле (2) величины прямых скоростей уменьшатся в $\exp[E_a/(k_B T)]$ раз по сравнению с их максимальными значениями, а скорости обратных и прямых реакций будут одинаковыми. Используя известные значения $E_r = 650 \text{ см}^{-1}$, 1500 см^{-1} и 3000 см^{-1} для реакций $P^* \rightarrow P^+B_A^-$, $P^+B_A^- \rightarrow P^+H_A^-$ и $P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$ соответственно, получим $k_{12} = k_{21} = 1,5 \times 10^{11} \text{ с}^{-1}$, $k_{23} = k_{32} = 1,5 \times 10^{11} \text{ с}^{-1}$, $k_{34} = k_{43} = 1,5 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$, что даёт величину квантового выхода $\Phi_{1-3} = 0,13$ (см. формулу (6)). Таким образом, в системе с одинаковыми энергиями промежуточных состояний невозможно достичь высокого квантового выхода.

Отметим, что процесс разделения зарядов в РЦ подчиняется второму закону термодинамики [7]. Эффективность запасаения энергии ϕ в РЦ определяется как $\phi = 1 - \Delta E/\Delta H$, где ΔE — потери энергии, $\Delta H = \hbar\omega$ — увеличение внутренней энергии. Разность энергий между начальным (P^*) и конечным ($P^+Q_A^-$) состояниями входит в выражение для отношения вероятностей заселения этих состояний $W_{\text{ini}}/W_{\text{fin}} = \exp[-\Delta E/(k_B T)]$, откуда $\Delta E = k_B T \ln(W_{\text{fin}}/W_{\text{ini}})$. Тогда $\phi = 1 - k_B T \ln(W_{\text{fin}}/W_{\text{ini}})/(\hbar\omega)$. С другой стороны, изменение энтропии S в системе находится как $\Delta S = S_{\text{fin}} - S_{\text{ini}} = k_B \ln(W_{\text{fin}}/W_{\text{ini}})$. Подставляя выражение для ΔS в соотношение для ϕ , получим $\phi = 1 - T\Delta S/(\hbar\omega) = (\Delta H - T\Delta S)/\Delta H$. Последнее выражение совпадает с таковым для к.п.д. тепловой машины в классической термодинамике.

3. Когерентный и некогерентный перенос электрона в В-цепи

3.1. Активация В-цепи с помощью направленного мутагенеза

Поскольку в нативных РЦ В-цепь практически неактивна, для исследования переноса электрона в этой цепи применяется её искусственная активация с помощью направленного мутагенеза (обзор более ранних работ дан в [146]).

РЦ *Rba. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* имеют близкие значения скоростей переноса электрона между различными состояниями, однако ряд структурных отличий приводит к тому, что активировать В-цепь в РЦ *Rba. sphaeroides* труднее, чем в *Rba. capsulatus* [147, 148]. Квантовый выход $P^+H_B^-$ более 30 % может быть достигнут с использованием β -мутаций, которые заменяют H_A бактериохлорофиллом $BChl$, что повышает уровень энергии $P^+\beta^-$ по сравнению с уровнем энергии $P^+H_A^-$ и тормозит перенос электрона в А-цепи [147–150]. Небольшие изменения уровней энергии $P^+H_A^-$ и $P^+H_B^-$ не отражаются на выходе В-переноса [147].

Скорость реакции $P^+H_B^- \rightarrow P^+Q_B^-$ сравнима со скоростью рекомбинации $P^+Q_B^-$ и намного меньше скорости реакции $P^+H_A^- \rightarrow P^+Q_A^-$ [149, 150]. Факторами, определяющими разницу этих скоростей, являются различия в энергиях реорганизации указанных реакций, взаимном расположении уровней энергии состояний, а также величине электронного сопряжения [149, 151]. Различия в электронном сопряжении вызваны разным взаимодействием хинонов с ближайшими аминокислотными остатками (Trp (триптофан) M252 в РЦ *Rba. sphaeroides* и Trp M250 в РЦ *Rba. capsulatus* вблизи Q_A и Phe (фенилаланин) L216 вблизи Q_B).

При блокировании переноса в А-цепи становится возможным перенос в В-цепи вплоть до Q_B [152]. Этого можно достичь, например, удаляя Q_A из структуры РЦ [55, 151, 153, 154]. Выход Q_B^- при заблокированном А-переносе зависит от того, какие мутации введены дополнительно [155–157]. Мутации EL212A и DL213A в РЦ *Rba. sphaeroides* вводят остатки с меньшей полярностью, что увеличивает выход Q_B^- при В-переносе из-за изменения как редокс-потенциала, так и энергии реорганизации [155]. Согласно результатам теоретических расчётов, реакция рекомбинации $P^+Q_B^-$ имеет существенно большую энергию реорганизации, чем аналогичная реакция $P^+Q_A^-$, что приводит к более чем 10-кратной разнице в скоростях этих реакций [158].

Расчёты молекулярной динамики показывают, что уровень $P^+B_B^-$ в РЦ *Rba. sphaeroides* находится на ~ 4 ккал моль $^{-1}$ выше уровня P^* , и это является одной из основных причин крайне низкой активности В-цепи [93, 159, 160]. Разница в рассчитанных уровнях энергии $P^+B_B^-$ и $P^+B_A^-$ частично объясняется наличием тирозина (Tyr)M210 в РЦ *Rba. sphaeroides* (Tyr)M208 в РЦ *Blc. viridis* и *Rba. capsulatus*), который способствует стабилизации B_A^- [93, 161]. Подробнее роль TyrM210 рассмотрена в разделе 4.

Гомологичный остаток в В-цепи, которым является Phe 181, по-видимому, не способен стабилизировать B_B^- таким же образом. Замена тирозина M210 другим аминокислотным остатком замедляет разделение зарядов, вероятно, из-за увеличения энергии активации реакции [64, 65, 114, 162–164]. В РЦ мутанта YM208F/FL181Y *Rba. capsulatus* обнаружено формирование состояния $P^+H_B^-$ с небольшим квантовым выходом, 15–30 % [49, 50]. В аналогичном мутанте *Rba. sphaeroides*, однако, состояния $P^+H_B^-$ не зарегистрировано [163].

Для понижения уровня энергии $P^+B_B^-$ с целью активации переноса электрона в В-цепи создано большое количество мутантов [49, 50, 54–56, 74, 75, 145–148, 165–172]. Формирование состояния $P^+H_B^-$ с квантовым выходом 70 % было достигнуто блокированием переноса электрона в А-цепи за счёт обмена аминокислотными остатками в D-спиралях между L- и M-субъединицами и последующим введением мутаций FL181Y, NM195F и HL168F, понижающих уровень $P^+B_B^-$ [172]. Таким образом, положение уровня энергии $P^+B_A^-$ ниже уровня P^* и положение уровня $P^+B_B^-$ выше уровня P^* в нативных РЦ играют важную роль в асимметрии А- и В-цепей относительно переноса электрона.

Теоретически показано, что матричный элемент электронного сопряжения (V) между P^* и B_A значительно больше такового для P^* и B_B , что также может быть причиной неактивности В-цепи [173–176]. Если V много меньше разности уровней энергий донора и продукта, то скорость переноса электрона является пропорциональной V^2 и уменьшается экспоненциально с увеличением расстояния между донором и акцептором [177–182]. Если величина V сравнима с разностью энергий донора и продукта, то зависимость скорости переноса электрона от V незначительна [140, 141].

Показано, что флуктуации расстояния между донором P^* и акцепторами электрона (например, B_A и B_B) нивелируют разницу в значениях V [178]. Различие диэлектрических свойств белка в А- и В-цепях может быть ещё одной причиной неактивности В-цепи [183]. Однако расчёты показывают, что энергии реорганизации реак-

ций $P^* \rightarrow P^+B_A^-$ и $P^* \rightarrow P^+B_B^-$ и вклады индуцированных диполей в величины свободной энергии $P^+B_A^-$ и $P^+B_B^-$ различаются незначительно [93].

В ряде теоретических работ рассматривается зависимость величины электронного сопряжения V от расстояния между донором и акцептором при условии однородности белкового окружения [184–186]. Эта зависимость является приближённо экспоненциальной. Из пространственной симметрии двух ветвей РЦ следует примерная сопоставимость величин V для различных стадий переноса электрона по двум ветвям, что было показано в результате исследований мутантов с активированным переносом по В-ветви [56, 187]. Тем не менее из сопоставления разницы в скоростях реакций $P^* \rightarrow P^+H_A^-$ и $P^* \rightarrow P^+H_B^-$ и разницы в уровнях свободной энергии $P^+H_A^-$ и $P^+H_B^-$ следует, что медленный перенос в В-цепи мутантных РЦ объясняется не только разными энергетическими характеристиками, но и разным значением V [49, 188].

Расчёты электростатических потенциалов для РЦ *Blc. viridis* показывают, что А-ветвь имеет значительно больший положительный потенциал, чем В-ветвь, что является ещё одной причиной переноса электрона преимущественно по А-ветви [94]. В расчётах показано, что ориентация 13^2 -эфирной группы BChl оказывает сильное влияние на электростатические потенциалы [189]. Расчёты подтверждают хорошо известный экспериментальный факт: потенциал E_m для первичного донора электронов фотосистемы II P680 намного больше, чем для Р в бактериальных РЦ [190]. Расчёты методами молекулярной динамики также дают значения потенциалов, согласующиеся с преимущественным переносом электрона по А-ветви. Экспериментальные оценки напряжённости электрических полей внутри РЦ с помощью спектроскопии Штарка дают значения порядка 10^6 В см $^{-1}$ вблизи Р [191]. Изменение этой величины на $\approx 10\%$ при удалении молекулы каротиноида из РЦ не приводит к изменению скорости переноса электрона [192].

Сравнительное исследование переноса электрона в РЦ А- и В-сторонних гетеродимерных мутантов позволяет выявить разницу в электронном сопряжении между Р и H_A , с одной стороны, и Р и H_B , с другой стороны [188]. Комбинируя различные мутации, удаётся достичь одинакового расположения уровней энергии первичных состояний с разделёнными зарядами в А- и В-сторонних гетеродимерных мутантах. Обнаруженное в этом случае четырёхкратное превышение выхода переноса электрона в В-цепи в В-стороннем гетеродимерном мутанте над выходом аналогичного переноса в А-стороннем мутанте можно объяснить разницей в электронном сопряжении Р и $H_{A,B}$. Электронное сопряжение в А-цепи больше, что является одним из факторов преимущественного переноса электрона в А-цепь.

Найдено, что при возбуждении РЦ голубым светом в полосе поглощения Core димера Р происходит образование состояния $B_B^+H_B^-$, которое распадается за несколько пикосекунд при температуре 293 К, но при низких температурах существует значительно дольше [103, 193]. Эти данные позволили сделать вывод о важной роли В-цепи в быстром тушении избытка возбуждающей энергии с участием молекулы каротиноида, расположенной вблизи В-цепи [71, 72, 103].

Таким образом, с помощью направленного мутагенеза удаётся существенно активировать перенос элект-

рона в В-цепи. Перенос электрона на H_B лимитируется высокой энергией уровня $P^+B_B^-$ и небольшим электронным сопряжением H_B и P^* . Перенос электрона далее на Q_B наблюдается только при блокировании переноса в А-цепи. Выход Q_B^- лимитируется в основном высокой энергией реорганизации реакции, приводящей к образованию Q_B^- .

3.2. Когерентный перенос электрона в В-цепи

Когерентный перенос электрона в В-цепи сравнительно мало изучен. Исследования когерентного переноса электрона при первичном разделении зарядов в В-цепи проводились в РЦ мутанта NM182L [194] и в РЦ *Cfx. aurantiacus* [195]. В этих РЦ имеется возможность переноса электрона от P^* в В-цепь. Мутация NM182L заменяет молекулу бактериохлорофилла B_B в В-цепи РЦ *Rba. sphaeroides* молекулой бактериофеофитина Φ_B [74]. Уровень $P^+\Phi_B^-$ оказывается ниже уровня P^* на $\sim 0,16$ эВ в мутанте NM182L, что приводит к некогерентному переносу электрона на Φ_B с небольшим квантовым выходом ($\sim 12\%$) при температуре 77 К и характерным временем ~ 8 пс [56, 187]. Состояние $P^+\Phi_B^-$ рекомбинирует в основное состояние с константой времени ~ 200 пс при комнатной и криогенной температурах [56, 74, 187].

Дальнейшее разделение зарядов в РЦ, содержащих Φ_B вместо B_B , с образованием состояния $P^+H_B^-$ не происходит, поскольку уровень свободной энергии $P^+\Phi_B^-$ находится ниже уровня $P^+H_B^-$ [56, 187]. В В-цепи РЦ *Cfx. aurantiacus* также имеется молекула Φ_B в положении B_B , что сближает эти РЦ с РЦ мутанта NM182L [18, 19]. Оценки уровня энергии $P^+\Phi_B^-$ в РЦ *Cfx. aurantiacus* дают его положение вблизи или даже ниже уровня P^* , что открывает теоретическую возможность переноса электрона в В-цепь в этих РЦ. В [97] при объяснении низкотемпературных кинетик флуоресценции в РЦ *Cfx. auran-*

tiacus с восстановленным Q_A сделан вывод о возможности быстрого обратимого переноса электрона между P^* и B_P в В-цепи. Однако данные разностной спектроскопии поглощения в полосе Q_A молекул B_P и близкий к единице квантовый выход первичного разделения зарядов в РЦ *Cfx. aurantiacus* указывают на перенос электрона в основном по А-цепи [91, 92, 98].

В РЦ мутанта NM182L имеется слабая полоса поглощения B_A^- при длине волны 1020 нм, что даёт возможность исследовать самый ранний этап разделения зарядов в А-цепи [194]. Формирование состояния $P^+B_A^-$ в мутанте NM182L при фемтосекундном возбуждении происходит качественно так же, как и в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26, т.е. сопровождается выраженными осцилляциями как в полосе вынужденного излучения P^* , так и в полосе поглощения B_A^- . Эти осцилляции синфазны, а их первый, наиболее интенсивный, максимум наблюдается с задержкой около 120 фс относительно момента возбуждения. В мутанте NM182L наблюдается также небольшое динамическое выцветание полосы поглощения Φ_B при 785 нм. Это выцветание, которое регистрируется только в диапазоне задержек 0–80 фс относительно момента возбуждения, указывает на обратимый перенос электрона в В-цепь с формированием состояния $P^+\Phi_B^-$. Кинетика ΔA полосы поглощения Φ_B при 785 нм имеет вид одиночного пика с максимумом при ≈ 40 фс, тогда как первый пик осцилляций в полосе B_A^- и P^* появляется на ≈ 80 фс позднее (рис. 3). Отметим, что при задержке 40 фс полоса поглощения B_A^- ещё полностью отсутствует.

В РЦ *Cfx. aurantiacus* при фемтосекундном возбуждении обнаружены затухающие осцилляции в полосах поглощения Φ_B при 748 и 785 нм [195] (см. рис. 3). Выцветание полосы 785 нм начинается с очень малой задержкой (≈ 10 фс) после возбуждения и достигает пер-

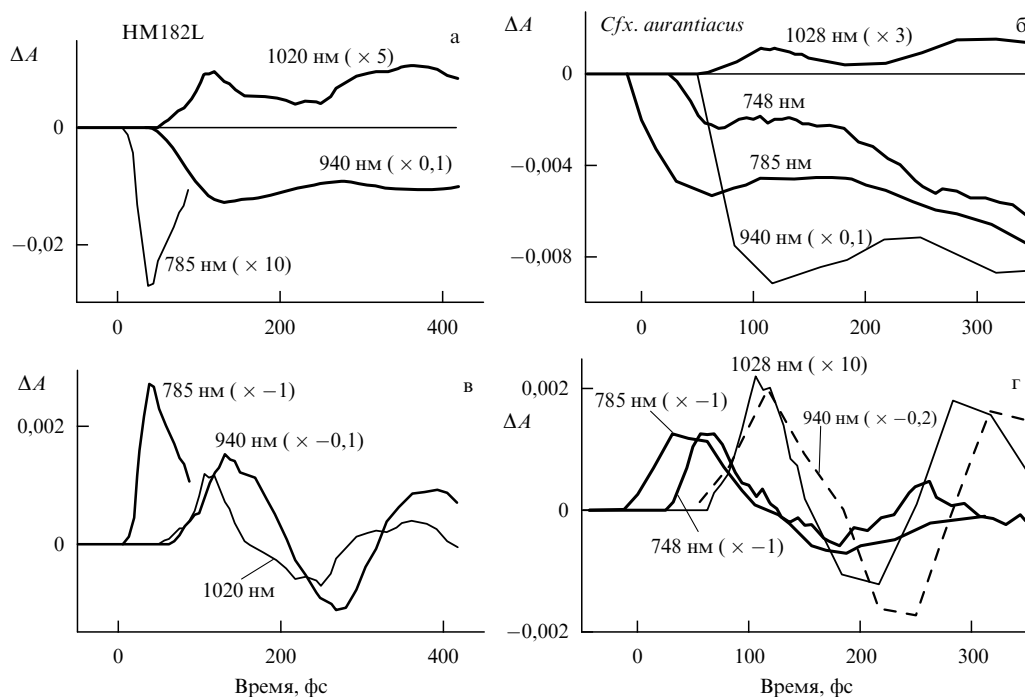


Рис. 3. Кинетики ΔA (а, б) и их осциллирующая часть (в, г) полос поглощения Φ_B при 785 и 748 нм, полосы поглощения B_A^- при 1020–1028 нм и полосы вынужденного излучения P^* при 940 нм в РЦ мутанта NM182L *Rba. sphaeroides* (а, в) и в РЦ *Cfx. aurantiacus* (б, г) [194, 95]. РЦ возбуждались при температуре 90 К 20-фемтосекундными импульсами с длиной волны 870 нм.

вого максимума при задержке ≈ 25 фс. Выцветание полосы 748 нм начинается с несколько большей задержкой (30 фс), достигая первого максимума при задержке около 60 фс. Далее осцилляции в обеих полосах развиваются синхронно со средним периодом 200–220 фс. Фурье-анализ осцилляций выявляет характерные частоты 79 и 108 см^{-1} в осцилляциях полосы 785 нм и 73 и 154 см^{-1} в осцилляциях полосы 748 нм. Синхронные осцилляции вынужденного излучения P^* при 940 нм и поглощения V_A^- при 1028 нм в РЦ *Cfx. aurantiacus* развиваются заметно позднее. Первый максимум этих осцилляций наблюдается с задержкой около 110 фс, а на временах менее 50 фс после момента возбуждения они отсутствуют.

Таким образом, в РЦ мутанта НМ182L и РЦ *Cfx. aurantiacus* перенос электрона в В-цепь сопровождается осцилляциями в состоянии с разделёнными зарядами. Эти осцилляции начинаются на несколько десятков фемтосекунд раньше, чем осцилляции, сопровождающие перенос электрона в А-цепь. В РЦ мутанта НМ182L осцилляции в В-цепи имеют вид одиночного пика, а в РЦ *Cfx. aurantiacus* — это быстрозатухающие осцилляции. Полученные данные позволяют детализировать когерентные процессы, сопровождающие первичное разделение зарядов в РЦ при фемтосекундном возбуждении. Возбуждение Р 18–20-фемтосекундными импульсами с широким спектром формирует ядерный волновой пакет, который начинает осциллирующее движение по поверхности P^* вдоль двух независимых координат, соответствующих реакциям $P^* \rightarrow P^+V_A^-$ и $P^* \rightarrow P^+F_B^-$. Сразу после формирования волновой пакет находится на коротковолновом склоне поверхности P^* и излучает свет с длиной волны около 900 нм. Тот факт, что осцилляции в полосе поглощения первичного акцептора электронов в В-цепи возникают сразу после возбуждения, указывает на близость области пересечения поверхностей P^* и $P^+F_B^-$ к области формирования волнового пакета. Временной ход этих осцилляций указывает на обратимость когерентного переноса электрона в В-цепи под действием волнового пакета.

С задержкой в ≈ 100 –120 фс относительно момента возбуждения волновой пакет достигает области пересечения поверхностей P^* и $P^+V_A^-$ на длинноволновом склоне кривой P^* . В этой области волновой пакет излучает с длиной волны 930–940 нм. Появление волнового пакета в области пересечения поверхностей P^* и $P^+V_A^-$ приводит к возникновению осцилляций в полосе поглощения V_A^- , которые синфазны осцилляциям излучения P^* при 940 нм. После отражения волнового пакета в области пересечения поверхностей и его ухода в обратную сторону поглощение в полосе V_A^- резко уменьшается, что указывает на обратимость когерентной реакции $P^* \rightarrow P^+V_A^-$ и отсутствие стабилизации разделённых зарядов при этой задержке.

Таким образом, когерентные компоненты реакций переноса электрона в А- и В-цепях разделены во времени, причём в В-цепи перенос начинается на 60–80 фс раньше, чем в А-цепи. Это указывает на различие в оптимальных конфигурациях ядер для переноса электрона по двум цепям. С задержкой ≈ 200 –250 фс относительно момента возбуждения волновой пакет снова оказывается на левом склоне поверхности P^* вблизи области пересечения поверхностей P^* и $P^+F_B^-$. В РЦ *Cfx. aurantiacus* это приводит к появлению второго пика

осцилляций в полосе поглощения F_B^- . В мутанте НМ182L аналогичные пики отсутствуют, что указывает на уменьшение к этому времени энергии волнового пакета, которая становится недостаточной для преодоления потенциального барьера. С задержкой ≈ 350 фс волновой пакет вновь оказывается на правом склоне поверхности P^* вблизи области пересечения поверхностей P^* и $P^+V_A^-$, что приводит к появлению второго максимума в осцилляциях продукта при 1020 нм и излучения P^* с длиной волны 940 нм. Волновой пакет при своём движении быстро расплывается вследствие дефазировки и диссипации, поэтому регистрируется всего несколько периодов осцилляций.

Таким образом, при фемтосекундном возбуждении РЦ *Cfx. aurantiacus* и мутантных по сайту М182 РЦ *Rba. sphaeroides* происходит обратимый перенос электрона от P^* в малоактивную В-цепь, который целиком определяется движениями ядерного волнового пакета. Этот перенос начинается практически сразу после фотовозбуждения димера Р, раньше на 60–80 фс аналогичного переноса в А-цепи. Перенос электрона в В-цепь определяется наличием волнового пакета на коротковолновом склоне потенциальной поверхности P^* вблизи её пересечения с потенциальной поверхностью первичного состояния с разделёнными зарядами в В-цепи.

4. Влияние окружения на разделение зарядов

4.1. Последствия точечных изменений в окружении пигментов

Для выяснения влияния окружения на перенос электрона в РЦ широко используется направленный мутагенез, результатом которого кроме замены аминокислотных остатков, координирующих кофакторы, может быть замена самих кофакторов.

Так, в гетеродимерном мутанте в результате замены одного из лигандов центрального атома магния в Р происходит замена одной из двух молекул ВChI в Р молекулой ВPheo. Этот эффект даёт замена His L173 и His M202 лейцином в *Rba. sphaeroides*, а также замена лейцином His L173 и His M200 в *Rba. capsulatus* [38, 58, 101, 106, 196, 197]. Подобная замена возможна для обеих молекул ВChI в Р, однако одновременная замена этих двух молекул ВChI молекулами ВPheo делает димер Р нестабильным.

Другим примером является мутант НМ182L *Rba. sphaeroides*, в РЦ которого вместо V_B оказывается ВPheo, причём аналогичная мутация в А-части не даёт подобного эффекта [74, 75]. В мутанте LM214Н *Rba. sphaeroides* (LM212Н в *Rba. capsulatus*), наоборот, N_A заменяется бактериохлорофиллом [198]. В мутанте LL185Н *Rba. sphaeroides* появление His вблизи N_B приводит к замене N_B бактериохлорофиллом [199]. Изменение лигандов атома железа в мутанте НМ266С *Rba. sphaeroides* приводит к замене атома железа атомом цинка [200].

Некоторые из кофакторов РЦ могут быть удалены из их структуры. Характерным примером является штамм *Rba. sphaeroides* R-26, в РЦ которого отсутствует молекула каротиноида. Хиноны могут быть удалены из РЦ при обработке детергентами. Биосинтез Q_A можно блокировать заменой аминокислотных остатков, формирующих посадочный карман Q_A . Это происходит при изъятии Trp M252 в *Rba. sphaeroides* (M250 в *Rba.*

capsulatus), находящегося в ван-дер-ваальсовом контакте с Q_A , или при замене остатка меньшего размера триптофаном в мутанте AM260W *Rba. sphaeroides* [153]. Ряд мутаций вблизи Р приводит к потере функционирующего Р в РЦ. Это происходит в мутантах VL157R, HL153E, HL153L, HL153Q, HL153Y, HL173E, NM202E *Rba. sphaeroides* [75, 201, 202]. Одним из последствий крупномасштабных изменений в D_{LL} -мутанте, в результате которых D-трансмембранная последовательность из М-субъединицы (M192–M217 в *Rba. capsulatus*) заменяется симметричным сегментом из L-субъединицы (L165–L190 в *Rba. capsulatus*), является потеря H_A [53, 203]. Аналогично мутация AM149W в *Rba. sphaeroides* приводит к потере H_B [199]. Потеря BChl в Р происходит в мутанте IL177H *Rba. sphaeroides* в результате структурных и электростатических изменений остатка, находящегося между V_B и Р [204].

В результате ряда мутаций наблюдается значительное изменение среднеточечного редокс-потенциала E_m пары Р/Р⁺, который в нативных РЦ *Rba. sphaeroides* составляет около 500 мВ. Так, в гетеродимерном мутанте этот потенциал увеличивается на 130 мВ [197]. Большинство мутаций, затрагивающих Р, приводят к умеренным изменениям E_m Р/Р⁺ — на величину ≤ 50 мВ [205]. Добавление Н-связи между Р и его окружением увеличивает E_m на 60–120 мВ, а удаление существующей Н-связи уменьшает E_m на ≈ 80 мВ [206–210]. Комбинируя различные мутации, влияющие на количество Н-связей димера, удаётся изменять E_m в широких пределах, от –80 до 260 мВ, относительно исходной величины [211].

Как правило, увеличение количества Н-связей димера Р замедляет разделение зарядов в РЦ. Добавление Н-связи к В не приводит к заметным изменениям в первичном разделении зарядов [212]. Наличие водородных связей $H_{A,B}$ с окружением облегчает их восстановление, что отражается на скорости переноса электрона. Н-связь между 13¹-кетогруппой H_A и остатком Glu L104 имеется в нативных РЦ *Rba. sphaeroides* и *Rba. capsulatus*, а аналогичная связь с H_B создаётся в мутантах VM131D *Rba. sphaeroides* и VM133D *Rba. capsulatus* [58, 147, 213]. Введение или удаление ионизируемых остатков в локациях L135, L155, L164, L170, L247 и M199 в РЦ *Rba. sphaeroides* приводят к уменьшению E_m димера на ≤ 60 мВ в случае отрицательного заряда и к увеличению E_m на ≤ 50 мВ в случае положительного заряда [214–216]. Влияние вносимых зарядов на E_m уменьшается из-за экранирования зарядовых взаимодействий белком окружения.

Энергии $V_{A,B}$ изменяются в результате мутаций YM210F *Rba. sphaeroides* (YM208F *Rba. capsulatus*) и FL181Y, что регистрируется по изменению скорости переноса электрона [64, 66, 162], а также с помощью спектроскопии Штарка [217]. Теоретические расчёты показывают, что указанные мутации приводят к изменению электростатических полей вблизи $V_{A,B}$, что влияет на уровни энергии состояний Р⁺ $V_{A,B}^-$ [94, 218].

Измерения и результаты расчётов электрон-спиновой плотности неспаренного электрона в РЦ с окисленным Р⁺ показывают значительный сдвиг этой плотности от R_M к R_L [28–30]. Добавление Н-связи к R_M делает сдвиг электрон-спиновой плотности ещё более асимметричным вследствие понижения уровня энергии R_M и увеличения разности энергий молекулярных орбиталей R_L и R_M . Добавление Н-связи к R_L , напротив, делает распре-

деление электрон-спиновой плотности между R_L и R_M более симметричным. Учёт колебательных состояний в теоретических расчётах позволяет оценить влияние Н-связей с R_L и R_M на оптические спектры поглощения РЦ [30, 219, 220].

Ряд мутаций оказывает слабое влияние на энергетические характеристики первичных реакций, тогда как ряд других приводит к серьёзным изменениям в структуре РЦ. Так, замена остатка His M202 в РЦ *Rba. sphaeroides*, координирующего Р, лейцином приводит к появлению гетеродимера, а замена этого же His остатком глутаминовой кислоты (Glu) почти не влияет на свойства РЦ благодаря введению воды в качестве лиганда вместо His [221]. Замена His L153, координирующего V_A , остатком меньшего размера (серином (Ser) или глицином в *Rba. sphaeroides*, треонином (Thr) или серином в *Rba. capsulatus*, Cys в *Blc. viridis*) почти не изменяет свойств РЦ, тогда как замена этого же His лейцином приводит к изменению состава пигментов в РЦ [75, 222–225].

Н-связи промежуточных акцепторов электрона с белком окружения также влияют на энергетические характеристики переноса электрона. Так, удаление Н-связи между остатком Glx L104 (Glx — остаток или глутамин, или глутаминовой кислоты) и 13¹-кетогруппой H_A в РЦ *Rba. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* приводит к небольшому уменьшению скорости разделения зарядов, что согласуется с уменьшением разности свободной энергии уровней Р⁺ и Р⁺ H_A^- [226].

В результате ряда мутаций удаётся создать РЦ с вторичным донором электронов, таким как тирозин или атом марганца, что сближает эти мутантные РЦ с РЦ фотосистемы II. Так, добавление Н-связей к димеру Р увеличивает его потенциал и создаёт возможность передачи электрона на Р⁺ от тирозина, введённого в локацию, аналогичную локациям тирозина Y_Z в РЦ фотосистемы II [227–230]. Аналогичная передача электрона на Р⁺ происходит от введённого в РЦ в результате серии мутаций атома марганца, находящегося вблизи Р [231, 232].

В результате большого количества генетических манипуляций был сделан вывод о большой устойчивости бактериальных РЦ к различным мутациям. В РЦ мутантов, имеющих полный набор пигментов, фотовосстановление H_A имеет высокий квантовый выход, несмотря на повышение уровня Р⁺ V_A^- и связанное с этим замедление разделения зарядов [53, 145, 170, 203]. Мутации, которые меняют знак заряда на Arg L135 и M164, ближайших к Р ионизируемых остатках, почти не влияют на кинетику состояния Р⁺ H_A^- [233]. Мутации, изменяющие количество водородных связей между переносчиками электрона и белком, также оказывают умеренное влияние на разделение зарядов в РЦ [44, 67, 207]. Только комбинируя несколько мутаций, удаётся значительно активировать перенос электрона по В-цепи [49, 50, 145, 170, 172, 234]. Даже мутации, замедляющие первичное разделение зарядов в А-цепи в 10 и более раз в результате значительного повышения уровня Р⁺ V_A^- , не могут полностью заблокировать перенос электрона в А-цепи при низких температурах [65, 67].

В целом, организмы с разными типами реакционных центров, каждый в своей природной нише, одинаково успешны в смысле выживания. Варьирование характерного времени первичной стадии разделения зарядов от нескольких пикосекунд до нескольких долей пикосекунды не влияет на последующие биохимические стадии

фотосинтеза в природных культурах. Только в некоторых мутантных культурах, полученных искусственно с помощью комбинации из нескольких мутаций, можно проследить корреляцию между замедлением первичного разделения зарядов (в несколько десятков раз) и замедлением роста биомассы. Вырастить эти мутантные культуры, как правило, намного сложнее.

4.2. Роль тирозина M210

в стабилизации разделённых зарядов

Согласно данным о пространственной структуре РЦ *Rba. sphaeroides*, кислород тирозина M210 локализован симметрично между P_A и B_A и находится на расстоянии $\approx 5 \text{ \AA}$ как от углерода C-N(IV) P_A , так и от азота N(II) B_A (банк данных PDB (Protein Data Bank), файл 1AIJ) (рис. 4). Известно, что замена тирозина M210 триптофаном в мутанте YM210W или лейцином в мутанте YM210L приводит к очень сильному увеличению времени жизни P^* — в несколько десятков раз [65, 66, 112, 114, 133, 164]. Данный факт не может быть объяснён относительно небольшим увеличением редокс-потенциала P/P^+ в этих мутантах (на 55 мВ в YM210W и на 30 мВ в YM210L) [114], что заставляет предположить иной механизм влияния тирозина M210 на разделение зарядов в РЦ. Для сравнения, только намного большее увеличение среднеточечного редокс-потенциала P/P^+ , на 260 мВ, в тройном мутанте LL131H/LM160H/FM197H по сравнению с редокс-потенциалом нативных *Rba. sphaeroides* приводит к схожему эффекту сильного замедления разделения зарядов в РЦ [235]. Рентгеноструктурный анализ кристаллов РЦ мутанта YM210W показал отсутствие заметных изменений в структуре РЦ вне

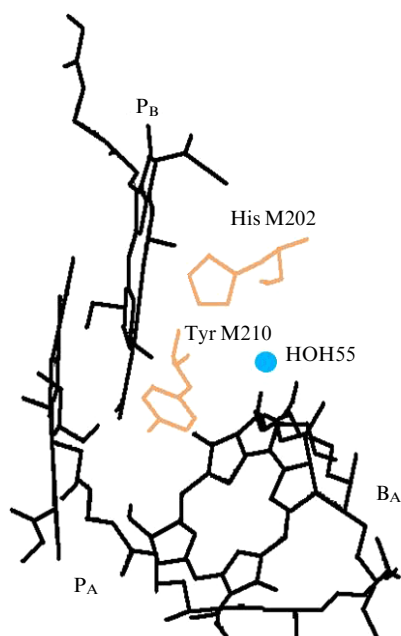


Рис. 4. (В цвете онлайн.) Фрагмент пространственной структуры РЦ *Rba. sphaeroides* (банк данных PDB, файл 1AIJ). Показаны молекулы BChl P_A и P_B , мономера BChl B_A (чёрные линии), His M202, Tyr M210 (светло-коричневые линии) и HOH55 (синий кружок). Кислород тирозина M210 локализован симметрично между P_A и B_A и отделён от углерода C-N(IV) P_A и от азота N(II) B_A расстоянием около 5 \AA . Вода HOH55 находится на расстоянии образования водородной связи от кислорода 13^1 -кетокарбонильной группы B_A и от атома азота в гистидине M202.

области мутации [236]. В мутанте YM210W присутствие триптофана приводит к небольшому наклону макроцикла B_A , воздействуя главным образом на положение пиррольных циклов II и III [236]. Механизм влияния тирозина M210 на разделение зарядов исследован спектроскопически с разрешением 20 фс в ряде мутантных по тирозину РЦ *Rba. sphaeroides* [237–239].

Кинетики ΔA мутанта YM210W при 935–940 нм демонстрируют очень медленное затухание вынужденного излучения P^* в пикосекундном диапазоне, сопровождаемое отчётливыми осцилляциями сложной формы [237] (рис. 5). Время жизни P^* мутантов YM210W(L) в несколько десятков раз больше, чем в нативных РЦ, в соответствии с полученными ранее данными. Амплитуда осцилляций вынужденного излучения P^* в РЦ мутантов близка к амплитуде аналогичных осцилляций в нативных РЦ. В отличие от осцилляций в нативных РЦ, осцилляции вынужденного излучения P^* в РЦ мутантов сохраняются в течение $\approx 1,5 \text{ пс}$ ($\approx 0,5 \text{ пс}$ в нативных РЦ), что позволяет увидеть до семи пиков осцилляций. Первый, самый интенсивный, пик осцилляций наблюдается при задержке $\approx 120 \text{ фс}$ относительно возбуждения. Фурье-спектр осцилляций вынужденного излучения P^* мутанта YM210W содержит широкую доминирующую полосу сложной формы с центром при частоте $\approx 150 \text{ см}^{-1}$, что соответствует основному периоду осцилляций $\approx 230 \text{ фс}$. В мутанте YM210L/FM197Y наблюдается низкочастотный сдвиг основной полосы фурье-спектра осцилляций вынужденного излучения P^* от 150 см^{-1} к 100 см^{-1} , что указывает на увеличение эффективной массы некоторой части согласованно осциллирующих (вследствие фемтосекундного возбуждения) молекулярных групп благодаря присоединению к ним новых групп через водородную связь [238]. В мутанте YM210L/HL168L фурье-спектр осцилляций вынужденного излучения P^* содержит две основные перекрывающиеся полосы, при 117 и 152 см^{-1} , а сами осцилляции затухают несколько быстрее, чем в других указанных мутантах [239].

В спектрах всех перечисленных мутантов присутствует очень слабая полоса поглощения аниона B_A^- при 1020 нм. Появление этой полосы однозначно указывает на участие B_A в первичном переносе электрона от P^* в указанных мутантах. К такому же выводу приводят данные по фемтосекундной спектроскопии мутанта YM210W в среднем ИК-диапазоне [240]. Форма и спектральное положение данной полосы идентичны таковым для полосы в нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26. Кинетика ΔA при 1020 нм исследованных мутантов показывает практически полное отсутствие стабилизации состояния $P^+B_A^-$ в РЦ мутантов YM210W (см. рис. 5) и YM210L/FM197Y и очень слабую стабилизацию состояния $P^+B_A^-$ (в форме постоянной компоненты в кинетике) в РЦ мутанта YM210L/HL168L [238, 239]. В РЦ этих мутантов обнаружены осцилляции полосы поглощения B_A^- как целого без изменения её формы и положения, подобные аналогичным осцилляциям в нативных РЦ. Обнаруженные осцилляции примерно синхронны осцилляциям в вынужденном излучении P^* . Характер осцилляций в полосе 1020 нм указывает на почти полностью обратимый перенос электрона между P^* и B_A , вызванный движением ядерного волнового пакета вблизи пересечения потенциальных поверхностей P^* и $P^+B_A^-$. Амплитуда осцилляций полосы поглощения B_A^- мутантных РЦ в несколько раз меньше, чем в нативных и феофитин-

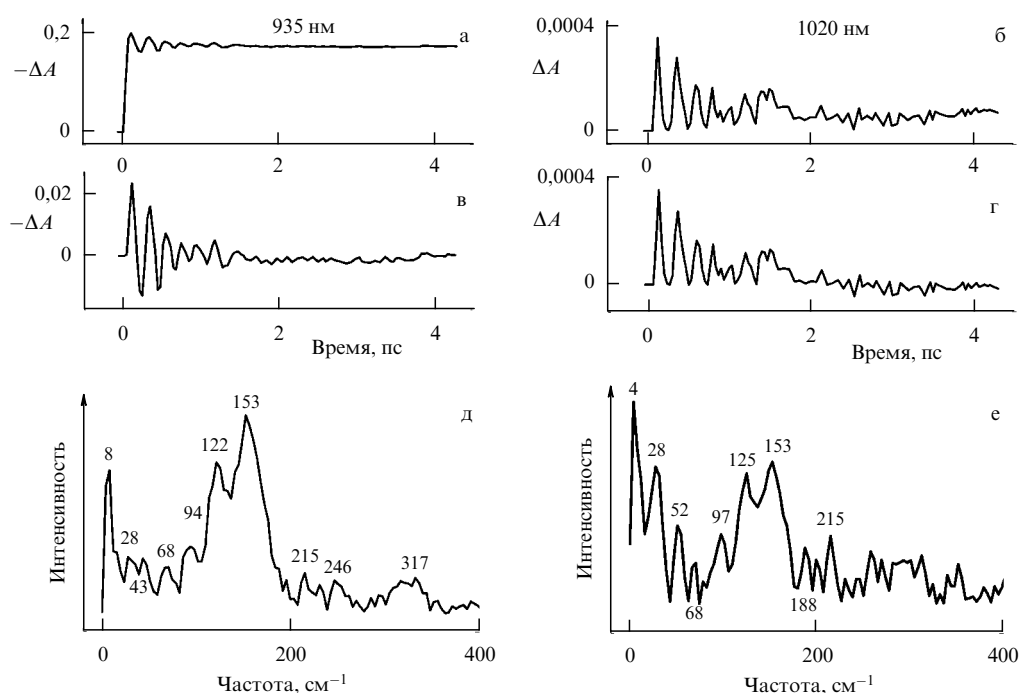


Рис. 5. Кинетики ΔA (а, б), их осциллирующая часть (в, г) и спектр фурье-преобразования осциллирующей части (д, е) полосы вынужденного излучения P^* при 935 нм (а, в, д) и полосы поглощения V_A^- при 1020 нм (б, г, е) РЦ мутанта YМ210W *Rba. sphaeroides* [237]. РЦ возбуждались при температуре 90 К 20-фемтосекундными импульсами с длиной волны 870 нм. Числами на рис. д, е указаны частоты максимумов фурье-спектра.

модифицированных РЦ. Осцилляции в полосе поглощения V_A^- мутантов прекращаются примерно через 1,5 пс после возбуждения. Как и в осцилляциях P^* , в осцилляциях полосы V_A^- насчитывается до семи пиков. Фурье-спектр осцилляций в полосе V_A^- исследованных мутантов содержит полосы, характерные для аналогичных осцилляций P^* , а также ряд узких низкочастотных полос в диапазоне 10–70 см^{-1} , среди которых выделяется полоса при 28–33 см^{-1} .

Анализ экспериментальных данных приводит к выводу, что наличие тирозина М210 в РЦ является необходимым фактором, обеспечивающим стабилизацию разделённых зарядов в состоянии $P^+V_A^-$. В мутантах, не содержащих тирозина М210, необратимый перенос электрона от P^* к V_A практически отсутствует, а время жизни P^* больше в несколько десятков раз по сравнению с таковым в нативных РЦ, содержащих тирозин М210. Наличие обратимого фемтосекундного переноса электрона между P^* и V_A в мутантах, не содержащих тирозина М210, означает, что в этих мутантах стабилизация первичного состояния с разделёнными зарядами $P^+V_A^-$ отсутствует.

Можно выделить два аспекта стабилизации $P^+V_A^-$ в РЦ. Во-первых, электрон может быть перенесён от P^* на высокий колебательный уровень потенциальной энергетической поверхности $P^+V_A^-$ с последующей колебательной релаксацией на более низкий уровень. Для эффективной стабилизации $P^+V_A^-$ за счёт колебательной релаксации необходимо, чтобы потенциальная поверхность $P^+V_A^-$ находилась заметно ниже поверхности P^* . Характерное время колебательной релаксации является фактором, ограничивающим скорость разделения зарядов между P^* и V_A . В двойном мутанте YМ210L/HL168L вторая мутация понижает редокс-потенциал пары P^+/P на 123 мВ [205], что может привести к значительному

понижению уровня $P^+V_A^-$ относительно уровня P^* и увеличить роль колебательной релаксации в процессе стабилизации состояния $P^+V_A^-$. Отсутствие заметной стабилизации состояния $P^+V_A^-$ в двойном мутанте YМ210L/HL168L указывает на важность наличия тирозина М210 для осуществления этой стабилизации и на её иной механизм. Присутствие тирозина М197 в двойном мутанте YМ210L/FМ197Y также не исправляет ситуацию, на что указывает отсутствие стабилизации состояния $P^+V_A^-$ в этом мутанте.

Во-вторых, стабилизация состояния $P^+V_A^-$ может осуществляться в результате переориентации окружающих полярных групп под действием разделённых зарядов P^+ и V_A^- . В нативных РЦ ядерная конфигурация может быть изменена переориентацией окружающих полярных групп типа $O^{\delta-}H^{\delta+}$ тирозина М210. Движение $H^{\delta+}$ в направлении V_A^- уменьшает энергию $P^+V_A^-$ относительно энергии P^* и, таким образом, стабилизирует состояние $P^+V_A^-$. $H^{\delta+}$ группы ОН тирозина М210 может занимать два характерных положения относительно P_A и V_A . В первом положении диполь $O^{\delta-}H^{\delta+}$ тирозина М210 перпендикулярен линии, проходящей между углеродом C-N(IV) P_A и азотом N(II) V_A , которые являются ближайшими соседями тирозина М210 и имеют максимальные соответственно положительный и отрицательный заряды в состоянии $P^+V_A^-$ [241]. Это положение реализуется в нейтральном состоянии PV_A или P^*V_A . Во втором положении $H^{\delta+}$ группы ОН тирозина М210 располагается на линии, соединяющей кислород $O^{\delta-}$ группы ОН тирозина М210 и азот N(II) V_A . Это положение реализуется, когда $P^+V_A^-$ стабилизируется благодаря движению $H^{\delta+}$ в направлении V_A под действием притяжения к V_A^- и отталкивания от P_A^+ . Оценка энергии электростатического взаимодействия даёт энергетическую разницу между двумя положениями $\sim 900 \text{ см}^{-1}$. Эксперимен-

тальное значение разницы в энергии между P^* и $P^+B_A^-$ для стабильного состояния $P^+B_A^-$ в феофитин-модифицированных РЦ составляет около 550 см^{-1} (см. раздел 5).

Таким образом, энергия, затрачиваемая на переориентацию группы ОН тирозина M210, достаточна для стабилизации состояния $P^+B_A^-$. Важно, что притяжение и отталкивание $H^{\delta+}$ зарядами B_A^- и P_A^+ соответственно имеет место только при образовании $P^+B_A^-$ и отсутствует в нейтральном состоянии P^*B . Экспериментально наблюдаемое возрастание времени стабилизации с увеличением температуры согласуется с предложенным механизмом, так как взаимодействие $H^{\delta+}$ группы ОН тирозина M210 с фонами среды способно индуцировать некоторые дополнительные движения $H^{\delta+}$, приводящие к увеличению времени стабилизации.

В РЦ *Cfx. aurantiacus* отсутствует тирозин M210, но присутствует другой, локализованный между P и B_A , тирозин M195 [77], который может отвечать за стабилизацию $P^+B_A^-$ в этих РЦ. Стабилизация $P^+B_A^-$ в РЦ *Cfx. aurantiacus* при температуре 90 К занимает большее время (≈ 5 пс), чем в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 ($\approx 1,5$ пс) [195]. Это согласуется с несимметричным положением тирозина M195 по отношению к P_A и B_A (в противоположность тому, что наблюдается для тирозина M210).

Существенное уменьшение амплитуды осцилляций населённости состояния $P^+B_A^-$ в мутантных РЦ по сравнению с таковой в нативных РЦ означает, что значительная часть волнового пакета не достигает пересечения потенциальных поверхностей P^* и $P^+B_A^-$ в мутантных РЦ. Это происходит, если место пересечения поверхностей P^* и $P^+B_A^-$ находится достаточно высоко по шкале энергии, т.е. поверхность $P^+B_A^-$ лежит выше поверхности P^* , а энергия активации реакции $P^* \rightarrow P^+B_A^-$ сравнима с энергией волнового пакета. Сравнительно медленное затухание осцилляций в мутантах, не содержащих тирозина M210, указывает на отсутствие некогерентных изменений в ядерной конфигурации при обратимом перемещении волнового пакета по поверхности P^* и его периодическом появлении вблизи пересечения поверхностей P^* и $P^+B_A^-$.

Экспериментальные данные для мутантных по тирозину РЦ *Rba. sphaeroides* согласуются с результатами расчётов в рамках молекулярной динамики. Эти расчёты показывают, что присутствие тирозина M210 понижает уровень энергии полностью стабилизированного состояния $P^+B_A^-$ на величину более чем 1000 см^{-1} благодаря совместному действию двух механизмов: статического перераспределения зарядов в прилегающей области и динамического эффекта реориентации полярной ОН-группы Туг M210 [161]. Если процесс стабилизации разделённых зарядов P^+ и B_A^- не завершён, то понижение уровня $P^+B_A^-$ оказывается меньшим. Расчёты в рамках молекулярной динамики позволяют оценить характерное время реориентации ОН-группы Туг M210, которое оказывается близким к времени жизни P^* .

Анализ результатов расчётов молекулярной динамики приводит к выводу о существенном вкладе реориентации ОН-группы Туг M210 в стабилизацию состояния $P^+B_A^-$. Расчётный спектр автокорреляционной функции флуктуаций стохастических поворотов ОН-группы Туг M210 состоит из нескольких пиков в частотном диапазоне от 270 до 390 см^{-1} с двумя главными пиками при 356 и 368 см^{-1} [10]. Эти пики отсутствуют в аналогичном расчётном спектре мутантных РЦ, лишённых

тирозина M210, а также в спектре резонансного комбинационного рассеяния тирозина. Важным является то, что точно такие же пики присутствуют в фурье-спектре автокорреляционной функции флуктуаций электростатической энергии ΔV_{elec} в состоянии PB и $P^+B_A^-$, но отсутствуют в аналогичном спектре флуктуаций электростатической энергии прямого взаимодействия P^+ и B_A^- V_{QQ} . Это ещё раз указывает на принадлежность пиков при частотах 356 и 368 см^{-1} к окружению P и B_A . Экспериментальный спектр фурье-преобразования для осцилляций в полосе поглощения B_A^- при 1020 нм и в полосе вынужденного излучения P^* при $935-940 \text{ нм}$ нативных и феофитин-модифицированных РЦ *Rba. sphaeroides* содержит слабые полосы в частотном диапазоне $300-400 \text{ см}^{-1}$, близкие к расчётным при 356 и 368 см^{-1} [242, 243].

Таким образом, данные фемтосекундной спектроскопии указывают на ключевую роль тирозина M210 в стабилизации электрона на B_A при первичном разделении зарядов в РЦ. Отсутствие тирозина M210 в мутантных РЦ препятствует стабилизации разделённых зарядов в состоянии $P^+B_A^-$, что сопровождается сильным замедлением процесса первичного разделения зарядов. Состояние $P^+B_A^-$ стабилизируется благодаря присутствию полярной ОН-группы в составе тирозина M210 вблизи B_A и реориентации этой группы под действием разделённых зарядов.

4.3. Роль связанной воды в первичном разделении зарядов

Согласно рентгеноструктурным данным в РЦ *Rba. sphaeroides* находится более 300 молекул воды, которые сосредоточены в основном на обеих сторонах мембраны. Небольшая часть этих молекул находится вблизи димера P и хинонов $Q_{A,B}$, а также в центральной части РЦ. Полярная молекула воды может образовывать водородные связи с окружением и донировать протон, поэтому её присутствие вблизи пигментов может влиять на разделение зарядов в РЦ.

Ещё в 1981 г. была выдвинута оригинальная гипотеза о светоиндуцированной переориентации молекул воды, структурно связанных с димером P, при возникновении комплекса с переносом заряда внутри димера [244]. В работе [244] предполагалось, что энергия P^* может понижаться на $\sim 0,03 \text{ эВ}$ в течение $1-2$ пс вследствие разворота молекул воды в поле диполя $P_A^+P_B^-$. Как полагали Фок и Борисов [244], такое понижение энергии P^* могло бы привести к переносу электрона от P^* на эти молекулы воды с последующим переносом на бактериофеофитин. Идея о роли молекул связанной воды как возможных промежуточных акцепторов электрона получила развитие в более поздних работах, которые опирались на известную структуру РЦ [245, 246].

В отношении механизма разделения зарядов в первичной реакции чрезвычайно интересным является выбор между электронным туннелированием по близлежащим атомам от P^* к B_A и переносом электрона по цепи связанных атомов (и самим существованием этой цепи). В связи с этим особый интерес вызывает кристаллографически определённая молекула воды, расположенная в структуре РЦ между P_B и B_A [27, 247] (см. рис. 4). В соответствии с нумерацией структурной модели *Rba. sphaeroides* R-26 (файл 1AIJ PDB), эта молекула обозначается как HON55 [248]. В B-цепи РЦ находится симмет-

рично расположенная молекула воды НОН30. Важной особенностью является то, что вода НОН55 находится на расстоянии образования водородной связи как от кислорода 13^1 -кетокарбонильной группы V_A , так и от атома азота остатка His M202, который обеспечивает аксиальное лигандирование атома магния в BChl P_B [27, 247, 248]. Таким образом, кристаллографические данные указывают на прямую пространственную связь между P_B и V_A через НОН55 и His M202.

Наиболее прямой способ установить предполагаемую функциональную роль НОН55 состоит в применении когерентной фемтосекундной спектроскопии к мутантным РЦ, которые лишены этой молекулы воды, но обнаруживают только незначительные структурные изменения по сравнению с таковыми РЦ дикого штамма. Среди РЦ пурпурных бактерий, исследованных рентгеноструктурно, этим критериям удовлетворяет двойной мутант FM197R/GM203D *Rba. sphaeroides*. В РЦ этого мутанта одна из молекул карбоксильного кислорода в остатке аспарагиновой кислоты (Asp), который замещает Gly M203, занимает часть пространства, принадлежащего воде НОН55 в диком штамме РЦ, что приводит к стерическому удалению этой молекулы воды [249]. Такое же структурное изменение предполагается и в РЦ однократного мутанта GM203D [249]. Известно, что в этом мутанте время жизни P^* почти в три раза больше, чем в РЦ дикого штамма [207].

В настоящее время нет общего мнения о причинах, лежащих в основе наблюдаемого замедления первичной реакции переноса электрона в РЦ мутанта GM203D. Первоначально мутация GM203D проектировалась для добавления водородной связи к 13^1 -кетокарбонильной группе V_A , что могло бы понизить уровень свободной энергии состояния $P^+V_A^-$ [207], однако результаты исследований ряда РЦ *Rba. capsulatus* с мутацией GM201D (которая эквивалентна мутации GM203D в *Rba. sphaeroides*) скорее согласуются с тем, что уровень свободной энергии $P^+V_A^-$ в этом мутанте немного выше уровня свободной энергии P^* [165, 169]. Согласно измерениям вынужденного комбинационного рассеяния, Asp M201 может быть депротонирован и отрицательно заряжен (по крайней мере, при комнатной температуре) [171]. Поэтому был сделан вывод, что внедрение Asp M201 сопровождается понижением среднеточечного редокс-потенциала пары V_A/V_A^- (E_m), приводящего к увеличению уровня свободной энергии $P^+V_A^-$ и, следовательно, к возрастанию времени жизни P^* [171]. Альтернативное объяснение состоит в том, что из-за стерического исключения воды НОН55 мутация GM203D (GM201D) препятствует взаимодействию по водородной связи с 13^1 -кетокарбонильной группой в V_A . Это взаимодействие может стабилизировать V_A^- в нативных РЦ, особенно когда Р окисляется при разделении зарядов [249].

Иной путь для выяснения роли воды НОН55 предоставляет мутант GM203L *Rba. sphaeroides* [245, 246]. Рентгеноструктурный анализ кристаллов РЦ этого мутанта показал, что замена Gly M203 лейцином приводит к удалению воды НОН55 без заметных изменений в структуре белка вне непосредственной близости M203 [246]. Это происходит потому, что Leu M203 занимает часть объема, принадлежащего воде НОН55 в нативных РЦ. Мутация GM203L немного влияет на конформацию His M202, поворачивая его на несколько градусов от Leu M203 вокруг оси, примерно определяемой связью

C–C (CG–CB), соединяющей углерод-4 в имидазольном кольце с бета-углеродом боковой цепи. Этот поворот не оказывает заметного влияния на длину связи, соединяющей азот NE1 в His M202 и Mg в P_B [246]. Отсутствие воды НОН55 в мутанте GM203L также подтверждается измерениями резонансного комбинационного рассеяния, согласно которым в РЦ мутанта GM203L отсутствует взаимодействие по H-связи с 13^1 -кетокарбонильной группой в V_A , так как частота растяжения этой карбонильной группы в окисленных феррицианидом реакционных центрах (в которых роль P играет P^+) увеличивается от 1676 см^{-1} до 1704 см^{-1} [246]. Важно, что в РЦ этого мутанта не может быть влияния ионизации остатка M203 на начальную реакцию переноса электрона, что могло бы усложнить анализ результатов.

Анализ кинетик ΔA в РЦ мутанта GM203L показывает, что при температуре 90 К спад стимулированного излучения P^* в его длинноволновом максимуме при 940 нм имеет основную константу времени $\sim 4,3$ пс (рис. 6), которая почти в четыре раза больше таковой для нативных РЦ [245]. Таким образом, мутация GM203L приводит к существенному увеличению времени жизни P^* . Спад излучения P^* сопровождается четко выраженными осцилляциями. Фурье-спектр этих осцилляций в мутантных РЦ отличается от такового для нативных РЦ подавлением моды при 125 см^{-1} .

В мутанте GM203L обнаружена полоса поглощения V_A^- при 1020 нм, которая возникает с задержкой 113 фс после возбуждения P в ответ на перенос электрона от возбужденного состояния P^* на V_A (рис. 6, 7). Этот процесс переноса электрона происходит обратимо, и при задержке 206 фс поглощение V_A^- существенно уменьшается. Следующее увеличение полосы поглощения при 1020 нм наблюдается через 331 фс после возбуждения P. Как и в нативных РЦ, полоса при 1020 нм в РЦ мутанта GM203L существует не более 2–3 пс.

В кинетике ΔA полосы поглощения V_A^- при 1020 нм мутантных РЦ на фоне сильных осцилляций можно выделить фазы подъема и спада, как и в нативных РЦ. Этот факт говорит в пользу двухступенчатого механизма переноса электрона в РЦ мутанта GM203L по схеме $P^* \rightarrow V_A \rightarrow N_A$. В мутантных РЦ эти фазы замедлены по сравнению с таковыми в нативных РЦ. Основное отличие спектров Фурье для осцилляций в полосе V_A^- мутантных РЦ (см. рис. 6, 7) от таковых для нативных РЦ состоит в отсутствии мод с частотами 32 и 127 см^{-1} . Эти моды являются доминирующими в спектрах Фурье нативных РЦ для полосы V_A^- . Другие моды спектра Фурье осцилляций в полосе 1020 нм мутантных РЦ с частотами 25, 41, 64, 95 и 153 см^{-1} практически совпадают с таковыми для осцилляций стимулированного излучения P^* с точностью 2–4 см^{-1} . Кинетики ΔA при 760 нм для РЦ мутанта GM203L и нативных РЦ, отражающие перенос электрона от V_A^- на N_A , качественно схожи. Характерное время накопления состояния $P^+N_A^-$ в мутантных РЦ в несколько раз больше, чем в нативных РЦ. Выцветание полосы N_A в мутантных РЦ сопровождается слабыми осцилляциями, как и в нативных РЦ. В фурье-спектре осцилляций при 760 нм РЦ мутанта отсутствует полоса при 32 см^{-1} , характерная для аналогичных спектров нативных РЦ. Похожие изменения наблюдаются и в кинетиках перечисленных выше полос для сухих плёнок РЦ *Rba. sphaeroides* R-26.

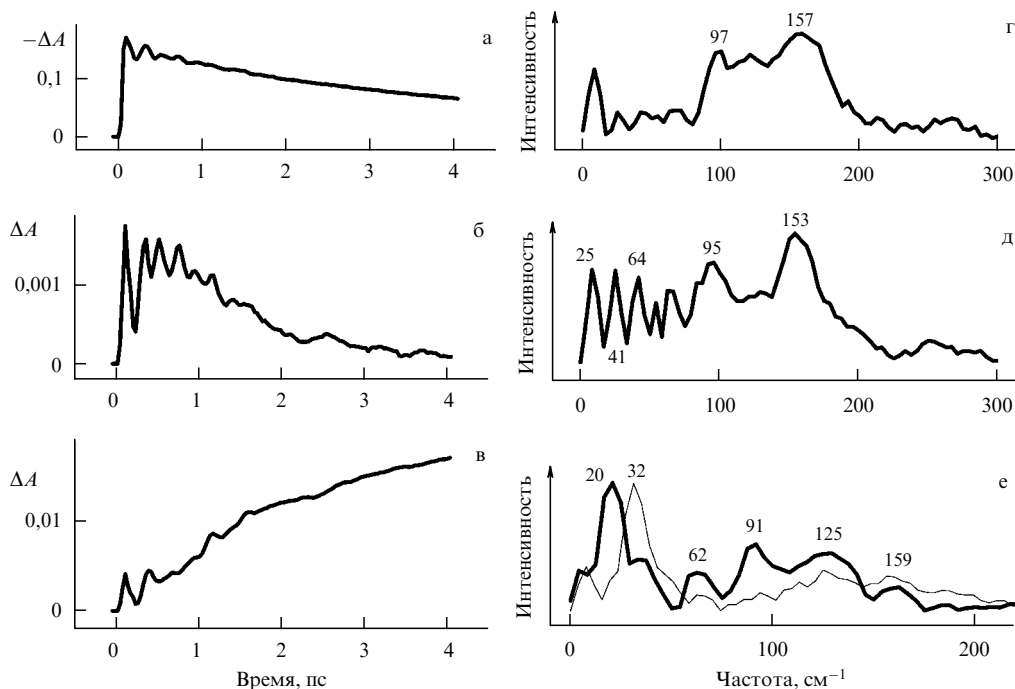


Рис. 6. Кинетики ΔA (а, б, в) и спектры фурье-преобразования осцилляций в этих кинетиках (г, д, е) в РЦ мутанта GM203L *Rba. sphaeroides* для полосы вынужденного излучения P^* при 940 нм (а) и полосы поглощения V_A^- при 1020 нм (б) и в дейтерированных феофитин-модифицированных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 для полосы поглощения V_A^- при 1020 нм (в) [245]. Тонкая линия на рис. е — аналогичный спектр Фурье для недейтерированных РЦ. РЦ возбуждались 18–20-фемтосекундными импульсами на длине волны 870 нм при температуре 90 К. Числа на рис. г–е — частоты максимумов фурье-спектра.

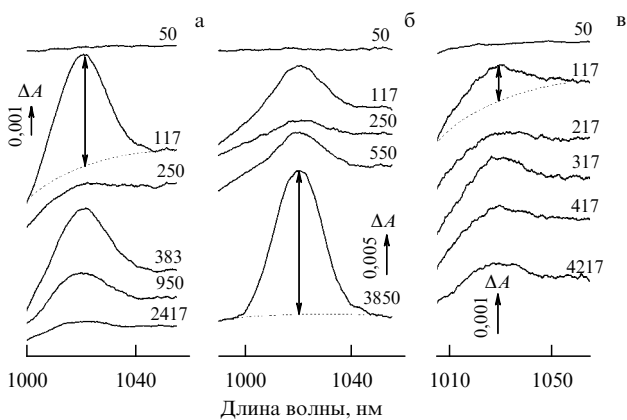


Рис. 7. Разностные (свет – темнота) спектры поглощения при некоторых фемтосекундных задержках от момента возбуждения для нативных (а) и феофитин-модифицированных (б) РЦ *Rba. sphaeroides* R-26, а также РЦ *Cfx. aurantiacus* (в), возбуждаемых при температуре 90 К 25-фемтосекундными импульсами с длиной волны 870 нм [242, 243]. Двойными стрелками показаны амплитуды полос, которые использовались при построении кинетик. Числа над кривыми — задержка в фемтосекундах относительно начала возбуждения. Для наглядности кривые смещены по вертикали.

Перейдём к результатам, полученным в дейтерированных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 при температуре 90 К [245]. Дейтерированию подвергались как нативные, так и феофитин-модифицированные РЦ. Замена НОН-буфера DOD-буфером не привела к деструктивным изменениям в структуре РЦ. Об этом говорит неизменность как формы и спектрального положения полосы поглощения V_A^- при 1020 нм и полосы поглощения H_A при 760 нм, так и характерных констант времени спада стимулирован-

ного излучения P^* , выцветания полосы H_A и динамики полосы V_A^- .

В дейтерированных РЦ первичное разделение зарядов сопровождается осцилляциями во всех перечисленных спектральных полосах. Амплитуда и характерные времена затухания этих осцилляций схожи с таковыми для РЦ в НОН-буфере. Основным результатом дейтерирования РЦ заключается в изменении спектров Фурье этих осцилляций. В дейтерированных РЦ, т.е. РЦ в DOD-буфере, наблюдается общее понижение частот всех характерных полос в фурье-спектрах осцилляций в диапазоне 50–200 cm^{-1} по сравнению с аналогичными частотами для РЦ в НОН-буфере, что соответствует увеличению периода осцилляций (рис. бв, е для полосы поглощения V_A^-). Этот сдвиг имеет коэффициент $\approx 1,4–1,6$ в нативных и феофитин-модифицированных РЦ. Поскольку узкая интенсивная полоса при 32 cm^{-1} доминирует в фурье-спектрах осцилляций поглощения V_A^- и H_A в недейтерированных РЦ, её низкочастотный сдвиг при дейтерировании РЦ особенно заметен. Сдвиг других полос в фурье-спектрах осцилляций вынужденного излучения P^* и поглощения V_A^- и H_A может маскироваться изменением их относительных амплитуд. Сдвиг центра широкой полосы при 130 cm^{-1} в фурье-спектрах осцилляций P^* и V_A^- при дейтерировании РЦ имеет тот же коэффициент, что и сдвиг полосы при 32 cm^{-1} .

Таким образом, при удалении воды из РЦ или замене её тяжёлой водой изменения касаются в первую очередь моды 32 cm^{-1} осцилляций в полосе поглощения V_A^- при 1020 нм и ряда более высокочастотных мод в осцилляциях вынужденного излучения P^* при 940 нм и поглощения V_A^- при 1020 нм. В нативных РЦ этот ряд мод имеет частоты, очень близкие к частотам, кратным 32 cm^{-1} , что

указывает на их принадлежность к обертонам фундаментальной моды 32 см^{-1} . При удалении воды мода 32 см^{-1} и кратные ей моды исчезают в РЦ мутанта GM203L, а при дейтерировании РЦ все указанные моды смещаются вниз по шкале частот примерно с одинаковым коэффициентом. Так как вода НОН55 определённо отсутствует в мутанте GM203L, исчезновение моды 32 см^{-1} и кратных ей мод в кинетиках РЦ этого мутанта означает принадлежность данной моды молекуле воды НОН55.

Появление высоких гармоник в осцилляциях (вплоть до седьмой) характерно скорее для вращательных мод, чем для колебательных. Известно, что молекула воды в газовой фазе имеет три типа вращения с характерными частотами 20, 32 и 52 см^{-1} [250]. Частота вращения 32 см^{-1} в точности соответствует частоте наблюдаемой экспериментально моды осцилляций, а разность двух других частот также равна 32 см^{-1} .

Оценить величину изотопического сдвига проще всего для узкой интенсивной моды 32 см^{-1} , которая наиболее удалена от колебательной полосы 130 см^{-1} . Экспериментальная величина этого сдвига составила $\approx 1,6$, что больше расчётной величины для сдвига колебательных полос молекулярных групп, содержащих протон (1,375), но меньше расчётной величины 1,8 для сдвига вращательных полос этих молекулярных групп. Такое расхождение указывает на неполное дейтерирование или его отсутствие в некоторой части РЦ. Присутствие глицерина, содержащего ОН-группы, в буфере РЦ при низкотемпературных измерениях увеличивает вероятность получения молекул ДОН (изотопический коэффициент 1,422) вместо DOD. Совокупность полученных данных указывает на то, что мода 32 см^{-1} , регистрируемая в осцилляциях продуктов P^+V_A^- и P^+H_A^- , соответствует одной из вращательных частот молекулы воды.

Существенное замедление спада стимулированного излучения P^* в РЦ мутанта GM203L является наиболее ярким следствием удаления воды НОН55 из этих РЦ. Сравнение результатов рентгеновского анализа структуры РЦ мутанта GM203L и нативных РЦ исключает существенное изменение их конформации вследствие данной мутации. В РЦ мутанта GM203L величина среднего потенциала E_m пары P/P^+ такая же, как и в нативных РЦ [246]. Можно ожидать, что отсутствие водородной связи между кетокarbонильной группой V_A и водой НОН55 в мутанте GM203L изменит величину E_m пары V_A/V_A^- , однако никаких данных относительно этого пока нет. Отсутствуют также данные о том, происходит ли образование водородной связи между V_A и НОН55 в течение времени жизни состояния P^+V_A^- или нет. Таким образом, нельзя исключить вероятность того, что мутация GM203L вызывает изменение энергетических характеристик первичной реакции разделения зарядов.

Время жизни P^* в РЦ мутанта GM203L (4,3 пс) совпадает с временем жизни минорной компоненты (её амплитуда составляет 15–20 % от амплитуды основной компоненты) кинетики вынужденного излучения P^* в нативных РЦ. Исчезновение основной компоненты переноса электрона с временем жизни 1,2 пс (обеспечивающей 80–85 % переноса электронов в нативных РЦ) при исключении воды НОН55 из структуры РЦ указывает на удаление наиболее вероятного пути переноса электрона. Более медленная компонента (4,3 пс) может отражать другие, менее эффективные, пути электронного транспорта от P^* к V_A . Положение молекулы воды

НОН55 таково, что она входит в состав следующей цепи полярных атомов: $\text{N}-\text{Mg}(\text{P}_B)-\text{N}-\text{C}-\text{N}(\text{His M202})-\text{НОН55}-\text{O}=(\text{V}_A)$, которая соединяет P и V_A и может участвовать в переносе электрона (см. рис. 4). С этой точки зрения увеличение времени жизни P^* в мутанте GM203L означает нарушение целостности указанной цепи из-за исключения воды НОН55.

Согласно квантово-механическим расчётам максимальная плотность π -электронов в состоянии P^* локализована на атомах азота, соединённых с центральным атомом Mg в молекуле P_B [241]. Это означает, что атом азота в His M202, лигандирующий атом Mg , также очень близок (около 2 \AA) к области максимальной спиновой плотности в P_B . Указанная выше цепь полярных групп обеспечивает основной (80–85 %) путь переноса электрона с высокой скоростью ($1/1,2 \text{ пс}^{-1}$) в нативных РЦ. Когда эта цепь разорвана из-за отсутствия НОН55, скорость электронного транспорта сильно уменьшается ($1/4,3 \text{ пс}^{-1}$) и он происходит по другим ("неспецифическим") путям электронного туннелирования. Доля этого более медленного транспорта не превышает 15–20 % в нативных РЦ, но становится основной в РЦ мутанта GM203L. Необходимо отметить, что указанный мост из полярных групп имеет большую длину, чем кратчайший путь туннелирования электрона через пространство между P_A/P_B и V_A (около $8,5 \text{ \AA}$ по сравнению с $3,5-5,5 \text{ \AA}$). Большую скорость переноса электрона по этому мосту можно объяснить тем, что цепь полярных групп создаёт более эффективную среду для туннелирования электрона, чем вакуум, компенсируя тем самым разницу в расстоянии. Так, водородная связь создаёт среду, которая почти в три раза эффективнее вакуума при туннелировании электрона [251].

Анализ полученных в [245] данных приводит к выводу о том, что, вне зависимости от причины замедления спада P^* в РЦ GM203L, вращение воды НОН55, следующее за фемтосекундным возбуждением РЦ, влияет на динамику переноса электрона от P^* к V_A . Водородная связь между водой НОН55 и V_A силой $\approx 4 \text{ ккал моль}^{-1}$ отчётливо регистрируется в окисленных РЦ *Rba. sphaeroides* методами спектроскопии комбинационного рассеяния, но не регистрируется в нейтральных РЦ [246]. Это означает, что данная связь устанавливается в процессе разделения зарядов в ответ на появление положительного заряда P^+ и отрицательного заряда V_A^- , которые разворачивают диполь воды. После одного-трёх оборотов с частотой 32 см^{-1} вращение воды прекращается. Установление Н-связи между НОН55 и V_A способствует стабилизации состояния P^+V_A^- . Вращение воды вызывает периодический перенос электрона от P_B на V_A и обратно с частотой 32 см^{-1} . Периодическое появление дополнительной электронной плотности на V_A^- на ранней стадии разделения зарядов, когда населённости состояний P^* и P^+V_A^- примерно равны, может также способствовать стабилизации состояния V_A^- . Эта стабилизация происходит быстрее, чем относительно медленная релаксация окружающих молекул к новой электронной конфигурации.

Таким образом, молекула кристаллографической воды НОН55, входящая в состав РЦ *Rba. sphaeroides*, играет важную роль в переносе электрона от первичного донора электрона P^* к первичному акцептору V_A . Согласно данным рентгеноструктурного анализа реакционных центров вода НОН55 может быть включена в одну из

пространственных троп эффективного переноса электрона по цепи полярных групп атомов, соединяющей димер Р и мономер V_A . При фемтосекундном возбуждении РЦ может происходить вращение молекулы НОН55, что приводит к модуляции населённости первичных состояний с разделёнными зарядами $P^+V_A^-$ и $P^+H_A^-$.

5. Участие мономера бактериохлорофилла V_A в первичном разделении зарядов

5.1. Положение уровня энергии $P^+V_A^-$

Для определения участия V_A в прямом переносе электрона ключевым вопросом является положение уровня свободной энергии состояния $P^+V_A^-$ относительно уровня свободной энергии возбуждённого состояния P^* . Если уровень $P^+V_A^-$ находится ниже уровня P^* , то возможен обычный перенос электрона от P^* на V_A . Однако если уровень $P^+V_A^-$ находится выше уровня P^* , то возможно только виртуальное участие вакантного электронного уровня V_A в переносе электрона от Р на H_A по квантовому механизму суперобмена [252]. Существует несколько способов определения уровня энергии $P^+V_A^-$.

Для определения свободной энергии $P^+V_A^-$ можно использовать вычисления энергии сольватации $VChl^-$ и $VPhe^-$ в растворе и аналогичной энергии $P^+V_A^-$ и $P^+H_A^-$ в РЦ с учётом измеренных значений средноточечного редокс-потенциала для $VChl$ и $VPheo$ в растворе [93, 159, 253–255]. Вычисленная энергия сольватации включает в себя электростатическое взаимодействие донора и акцептора, а также влияние окружения. Энергию $P^+V_A^-$ в газовой фазе также можно вычислить квантовыми методами [94, 173, 256–262]. В расчётах диэлектрическое экранирование в белке учитывается в рамках уравнения Пуассона–Больцмана с макроскопическими диэлектрическими константами [94, 263] или в рамках представлений о микроскопических диполях Ланжевена [93, 254, 264]. Для расчётов используется сферически-симметричная [159, 264–267] или периодическая [268, 269] модели расположения диполей. Методы молекулярной динамики с применением вычислительных методов возмущения свободной энергии позволяют рассчитать влияние изменений в белковом окружении на энергию $P^+V_A^-$ [159, 160, 253–255]. С привлечением данных о кристаллической структуре РЦ *Rba. sphaeroides* [27] расчёты молекулярной динамики дают значение разности свободных энергий P^* и $P^+V_A^-$ порядка -2 ккал моль $^{-1}$ и величину энергии реорганизации реакции $P^* \rightarrow P^+V_A^- \sim 2$ ккал моль $^{-1}$ [159, 160]. Близкий результат получен в расчётах для РЦ *Ble. viridis* [93, 218, 254, 270, 271]. Невысокая точность этих расчётов, ± 2 ккал моль $^{-1}$, не исключает того, что уровень $P^+V_A^-$ может немного превышать уровень P^* . В ряде теоретических работ получено, что уровень $P^+V_A^-$ находится намного выше уровня P^* [94, 258, 259, 261]. Тщательный анализ этих вычислений выявил ряд неточностей при учёте эффектов диэлектрического экранирования [218, 254, 269].

Оценки уровня свободной энергии $P^+V_A^-$ на основе экспериментальных данных по фемтосекундной спектроскопии феофитин-модифицированных РЦ дают величину $\sim -0,06$ эВ (или $-1,4$ ккал моль $^{-1}$) относительно уровня P^* [272, 273]. Сравнивая скорости переноса электрона в мутантных и нативных РЦ при известном (из экспериментов или расчётов) изменении уровня $P^+V_A^-$

в результате мутации, можно найти абсолютное значение энергии $P^+V_A^-$ из теоретического выражения для скорости переноса, в которое эта энергия входит в виде параметра [43, 44, 65–67, 207, 208, 223, 274–281]. Выражение для скорости переноса может быть получено на основе классических или квантово-механических представлений. Результаты подобных сравнений показывают, что уровень $P^+V_A^-$ находится или близко к уровню P^* , или немного ниже его.

Ещё одним способом определения разницы энергий P^* и $P^+V_A^-$ является измерение замедленной флуоресценции, появляющейся при рекомбинации $P^+V_A^-$ с образованием P^* . Для этого лучше всего подходят феофитин-модифицированные РЦ *Rba. sphaeroides* R-26, в которых H_A заменён растительным феофитином ФФА, вследствие чего состояние $P^+V_A^-$ становится долгоживущим [282]. Было найдено, что температурная зависимость флуоресценции феофитин-модифицированных РЦ с предвосстановленными хинонами имеет значительный полностью обратимый подъём с возрастанием температуры в диапазоне 95–200 К [282]. Меньший подъём флуоресценции с возрастанием температуры наблюдается в феофитин-модифицированных РЦ без восстановителя. В нативных РЦ температурная зависимость флуоресценции не имеет подъёма с возрастанием температуры. В рамках теоретической модели разделения зарядов в нативных и феофитин-модифицированных РЦ с учётом обратных переходов, рекомбинации и "быстрой" флуоресценции получены температурные зависимости выхода флуоресценции. Аппроксимация экспериментальных температурных зависимостей теоретическими позволяет сделать вывод о том, что в феофитин-модифицированных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 уровень $P^+V_A^-$ находится ниже уровня P^* на ~ 550 см $^{-1}$ [282]. Поскольку данная модификация не затрагивает молекул V_A и Р, есть основания считать, что полученная оценка справедлива и для нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26.

Разность свободных энергий P^* и $P^+H_A^-$ можно получить из измерений константы равновесия этих состояний в РЦ с предвосстановленным Q_A или в РЦ с отсутствующим Q_A . В этих условиях флуоресценция P^* затухает с основной константой времени 10–20 нс, которая совпадает с константой затухания состояния $P^+H_A^-$ [42, 283–293]. Минорные, более быстрые, компоненты флуоресценции P^* могут быть связаны с релаксацией $P^+H_A^-$. По относительной амплитуде основной, медленной, компоненты флуоресценции P^* найдено, что уровень свободной энергии релаксировавшего состояния $P^+H_A^-$ находится существенно ниже такового для P^* — на 0,21–0,26 эВ.

Другим способом определения свободной энергии $P^+H_A^-$ является нахождение константы равновесия состояния $P^+H_A^-$ и возбуждённого триплетного состояния Р (3P). В РЦ *Rba. sphaeroides* с блокированной реакцией $H_A^- \rightarrow Q_A$ состояние 3P образуется из $P^+H_A^-$ с квантовым выходом $\sim 30\%$ при температуре 295 К [294]. По измерениям спектра фосфоресценции [295] и найденному значению энергии активации для эффекта теплового заселения возбуждённого синглетного состояния [108] было установлено, что уровень 3P находится на 0,42 эВ ниже уровня P^* . Распад состояния 3P происходит в основном благодаря обратному переходу в состояние $P^+H_A^-$ под действием тепла и последующей рекомбинации в основное состояние. Внешнее магнитное поле

влияет на формирование и распад 3P , поскольку эти процессы протекают с участием синглетной и триплетной форм $P^+H_A^-$, в которых разность уровней энергии пропорциональна напряжённости магнитного поля [296–299]. Изучение влияния магнитного поля и температуры на кинетику затухания $P^+H_A^-$ привело к выводу о том, что уровень $P^+H_A^-$ находится ниже уровня P^* на $0,25–0,26$ эВ [291, 295, 300–302].

Суммируя результаты экспериментальных и теоретических исследований, можно заключить, что уровень $P^+V_A^-$ находится ниже уровня P^* на $\sim 0,04–0,07$ эВ [54, 65, 165, 167, 168, 272, 273, 275, 276, 282] и выше уровня $P^+H_A^-$ на $\sim 0,2–0,3$ эВ. Это означает, что молекула V_A действительно может участвовать в переносе электрона от P^* на H_A .

5.2. Участие молекулы V_A в первичном разделении зарядов

Проблема участия молекулы мономерного бактериохлорофилла V_A в качестве промежуточного акцептора в первичном разделении зарядов, имеющая многолетнюю историю (см. обзоры в [2, 7]), логично следует из положения V_A между P и H_A согласно рентгеноструктурным данным (см. рис. 1) [22, 27]. В течение длительного времени не удавалось получить убедительных доказательств непосредственного участия V_A в разделении зарядов.

Первое экспериментальное указание на возможность появления электрона на V_A было получено в пикосекундных измерениях в РЦ *R. rubrum* [303] и позднее — в РЦ *Rba. sphaeroides* [304]. В указанных работах с задержкой около $1,5$ пс относительно момента возбуждения наблюдалось выцветание полосы P и частичное выцветание полосы V , что интерпретировалось как образование состояния $P^+V_A^-$, смешанного с состоянием P^* .

Одно из первых фемтосекундных измерений в области $700–900$ нм в модифицированных РЦ *Rba. sphaeroides* с удалённой молекулой V_M было проведено в [305, 306]. Тщательный анализ кинетик и спектров ΔA в этих работах привёл к выводу о возможности формирования состояния $P^+V_A^-$, которое имеет примерно такую же заселённость, что и состояние $P^+H_A^-$, благодаря быстрому обмену электроном между V и H . Тем не менее в целом ряде работ измерение и анализ кинетик ΔA с фемтосекундным разрешением в этой области спектра не показали образования состояния $P^+V_A^-$ [33, 35, 36].

Результаты пико- и фемтосекундной спектроскопии постепенно привели к пониманию основной сложности обнаружения состояния $P^+V_A^-$, которая связана с тем, что время образования $P^+V_A^-$ в несколько раз превышает время его распада из-за переноса электрона с V_A^- на H_A [39, 307]. Это приводит к малой заселённости состояния $P^+V_A^-$ в течение всего времени его существования, которое не превышает нескольких пикосекунд. Другая сложность связана с тем, что в видимом диапазоне, где проводилось подавляющее большинство измерений, спектр состояния $P^+V_A^-$ сильно замаскирован спектрами других состояний. При фемтосекундном возбуждении P в стимулированном излучении P^* была обнаружена быстрая компонента, которая могла бы указывать на двухэтапный перенос электрона от P^* на H_A [39–41, 163]. Тем не менее выделить этот эффект на фоне осцилляций, связанных с движением ядерного волнового пакета, и временных смещений полосы излучения P^* не удалось.

Сложность первых попыток обнаружения состояния $P^+V_A^-$ привела к идее о виртуальном, а не реальном участии V_A в переносе электрона по механизму суперобмена [252, 308]. При этом образуется квантово-механическое смешение состояния $P^+V_A^-$ с обоими состояниями, P^* и $P^+H_A^-$. Анализ кинетических измерений в области 1020 нм выявил указание (в пределах ошибки измерений) на наличие слабой полосы поглощения, которая могла принадлежать аниону V_A^- [307, 309]. Эта полоса впервые была идентифицирована в растворе аниона $VChl^-$ в [96]. В РЦ *Rba. sphaeroides* при комнатной температуре перенос электрона от P^* на V_A может проходить с константой $\sim 3,5$ пс, а перенос от V_A^- на H_A — с константой $\sim 0,9$ пс [307]. Если предположить, что обе реакции обратимы, то получаются константы $\sim 1–3$ пс как для реакции $P^* \rightarrow V_A$, так и для реакции $V_A^- \rightarrow H_A$ [43, 309].

Наиболее убедительное доказательство реального участия V_A в двухступенчатом переносе электрона от P^* на H_A получено в РЦ *Rba. sphaeroides*, в которых бактериофеофитин H_A был заменён растительным феофитином (Pheo-a) [107, 272, 273, 310] или бактериохлорофиллом [167, 168]. Поскольку редокс-потенциалы Pheo и $VChl$ смещены в отрицательную сторону относительно редокс-потенциала $VPhe$, указанные замены приводили к увеличению амплитуды и длительности времени изменений поглощения, связанных с образованием состояния $P^+V_A^-$. Иными словами, в этих модифицированных РЦ происходит накопление состояния $P^+V_A^-$ в пикосекундном диапазоне.

Впервые прямая регистрация полосы поглощения V_A^- при 1020 нм была проведена именно в Pheo-модифицированных РЦ при температуре 5 К [107]. Замена аминокислотного остатка Phe вблизи H_A аспарагиновой кислотой, увеличивающая свободную энергию $P^+H_A^-$ при условии ионизации Asp, приводила к схожему эффекту замедления реакции $V_A^- \rightarrow H_A$ [166, 280]. Мутации, повышающие уровень энергии $P^+V_A^-$, также замедляли первичное разделение зарядов вследствие замедления реакции $P^* \rightarrow V_A^-$ [64–67, 75, 114, 163, 164, 280]. При замене $VChl$ V_A бактериофеофитином H ($VPhe$) в мутантах наблюдается долгоживущее состояние P^+VPhe^- , что соответствует понижению свободной энергии этого состояния по сравнению со свободной энергией исходного состояния $P^+V_A^-$ [224].

В нативных РЦ вопрос о реальном участии молекулы V_A в переносе электрона исследован в работах [242, 243, 311], где были измерены спектры ΔA в волновых диапазонах $900–1070$ нм (полоса вынужденного излучения P^* и полоса поглощения аниона V_A^-) и $730–790$ нм (полоса поглощения H_A) в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 и *Cfx. aurantiacus* при температуре 90 К (см. рис. 7). Контрольные измерения проводились для феофитин-модифицированных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26, в которых происходит известное накопление состояния $P^+V_A^-$ в пикосекундном диапазоне времени. Была обнаружена слабая полоса поглощения V_A^- с центром при 1020 нм в РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 и при 1028 нм в РЦ *Cfx. aurantiacus*, которая по форме идентична полосе поглощения V_A^- в феофитин-модифицированных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26.

Форма и спектральное положение обнаруженной полосы остаются неизменными в пикосекундном диапазоне, однако её амплитуда изменяется во времени сложным осциллирующим образом (см. рис. 7). Первый, наиболее интенсивный, максимум в осцилляциях

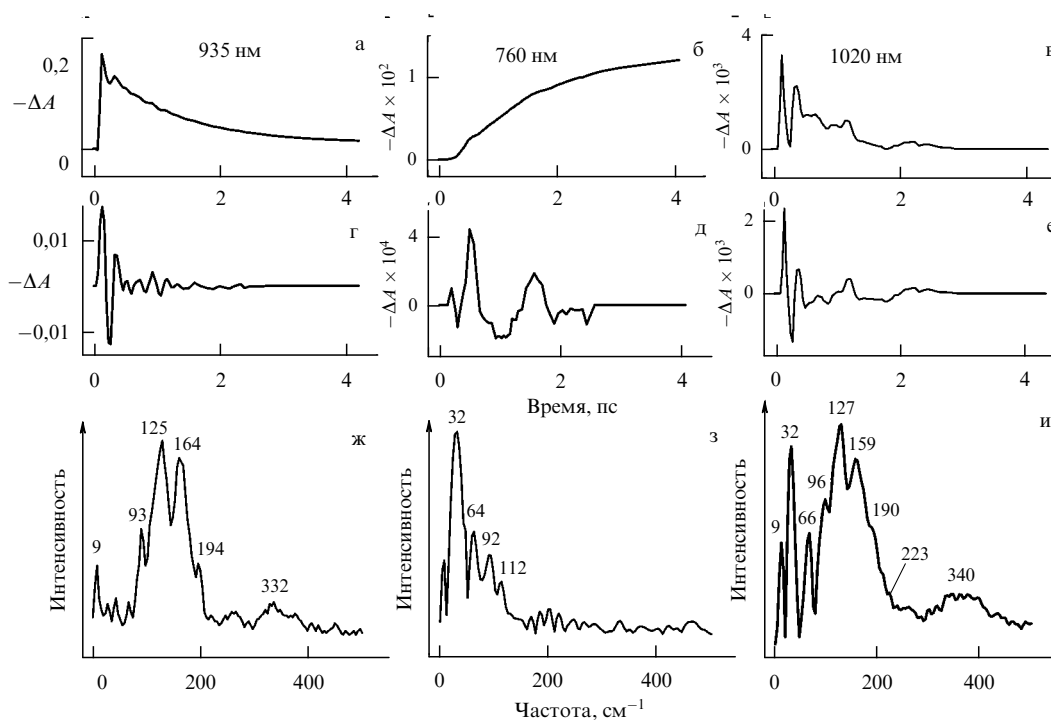


Рис. 8. Кинетики ΔA (а–в), их осциллирующая часть (г–е) и спектр фурье-преобразования осциллирующей части (ж–и) полос поглощения V_A^- при 1020 нм, вынужденного излучения P^* при 935 нм и поглощения H_A при 760 нм нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26, возбуждаемых при температуре 90 К 25-фемтосекундными импульсами с длиной волны 870 нм [242, 243]. Числа на рис. ж–и — частоты максимумов фурье-спектра.

амплитуды полосы V_A^- наблюдается с задержкой 120 фс, за ним следует ряд менее интенсивных максимумов. Полоса поглощения V_A^- полностью исчезает при задержках $\geq 2,5$ пс, что указывает на дальнейший переход электрона с V_A^- на H_A .

После математического выделения осцилляций в неосциллирующей части кинетики ΔA при 1020 нм можно увидеть фазу возрастания с константой времени $\sim 0,2$ пс, за которой следует фаза убывания с константой времени $\sim 0,8$ пс. В феофитин-модифицированных РЦ наблюдается отражающее накопление состояния $P^+V_A^-$ монотонное возрастание полосы поглощения V_A^- , которое сопровождается затухающими осцилляциями. Это обстоятельство облегчает исследование осцилляций при задержках > 1 пс. Спад вынужденного излучения P^* при 935 нм в нативных и феофитин-модифицированных РЦ имеет основную константу времени $\sim 1,2$ пс при температуре 90 К и также сопровождается быстрозатухающими осцилляциями (рис. 8). Эти осцилляции находятся в фазе с осцилляциями в полосе поглощения V_A^- . Выцветание полосы поглощения H_A при 760 нм в нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 отражает появление электрона на H_A с константой времени $\sim 1,2$ пс при температуре 90 К (рис. 8). Кинетика ΔA при 760 нм имеет небольшой временной лаг ($\sim 0,2$ пс) при температуре 90 К, который указывает на задержку появления электрона на H_A из-за его более раннего появления на V_A^- . Выцветание полосы поглощения H_A при 760 нм сопровождается слабыми осцилляциями, которые примерно соответствуют интегрировано по времени осцилляциям полосы V_A^- , что указывает на эффективный перенос электрона от V_A^- на H_A .

Спектры преобразования Фурье для осцилляций при 935, 1020 и 760 нм содержат несколько полос и имеют

сложную форму (см. рис. 8). В фурье-спектре осцилляций вынужденного излучения P^* при 935 нм доминирует широкая полоса с центром при частоте 130 см^{-1} , в которой можно выделить несколько более узких полос, разделённых интервалами $25\text{--}35 \text{ см}^{-1}$. Этот спектр отражает главным образом колебательные движения внутри димера P с основным периодом около 250 фс [131–134]. В фурье-спектре осцилляций полосы V_A^- при 1020 нм широкая полоса при частоте 130 см^{-1} присутствует наряду с более низкочастотными полосами, среди которых выделяется интенсивная полоса при 32 см^{-1} , соответствующая периоду осцилляций ~ 1 пс. Мода с частотой 32 см^{-1} особенно выделяется в осцилляциях полосы V_A^- феофитин-модифицированных РЦ, где она является доминирующей. Фурье-спектр осцилляций полосы H_A при 760 нм содержит в основном ряд узких полос в частотном диапазоне $10\text{--}120 \text{ см}^{-1}$, среди которых выделяется полоса при 32 см^{-1} . Таким образом, мода ядерных движений 130 см^{-1} имеет сопряжение с реакцией $P^* \rightarrow P^+V_A^-$, а мода 32 см^{-1} — с реакцией $P^+V_A^- \rightarrow P^+H_A^-$.

В РЦ *Cfx. aurantiacus* динамика полосы вынужденного излучения P^* при 940 нм, поглощения V_A^- при 1028 нм и поглощения H_A при 750 нм качественно схожа с аналогичной динамикой для РЦ *Rba. sphaeroides* R-26. Фаза возрастания неосциллирующей части кинетики ΔA при 1028 нм имеет константу времени ~ 1 пс при температуре 90 К, а фаза убывания имеет константу времени около 5 пс. Время затухания P^* и выцветания H_A в РЦ *Cfx. aurantiacus* при температуре 90 К составляет ≈ 5 пс, что указывает на более медленное разделение зарядов по сравнению с таковым в РЦ *Rba. sphaeroides*. В полосе поглощения V_A^- при 1028 нм регистрируются очень слабые осцилляции, частотный спектр которых

имеет широкую полосу примерно при 150 см^{-1} и ряд более узких полос при $35, 52$ и 72 см^{-1} . Осцилляции в полосе поглощения H_A имеют похожий набор частот, а в осцилляциях полосы вынужденного излучения P^* преобладают частоты $\approx 150 \text{ см}^{-1}$.

Таким образом, полученные в [242, 243, 311] данные указывают на то, что первичное разделение зарядов в РЦ *Rba. sphaeroides* и *Cfx. aurantiacus* происходит по двухступенчатой схеме $P^* \rightarrow P^+V_A^- \rightarrow P^+H_A^-$ [287] с непосредственным участием V_A . Этот классический необратимый перенос электрона сопровождается обратимым осциллирующим переносом, который связан с движением ядерного волнового пакета.

5.3. Движение волнового пакета при разделении зарядов

Полученные данные позволяют конкретизировать движение волнового пакета по поверхностям потенциальной энергии различных состояний (рис. 9). В нативных РЦ *Rba. sphaeroides* R-26 уровень $P^+V_A^-$ находится ниже уровня P^* на $\sim 550 \text{ см}^{-1}$, а уровень $P^+H_A^-$ лежит ниже уровня P^* на $\sim 1500\text{--}2000 \text{ см}^{-1}$. Поверхность $P^+V_A^-$ пересекает поверхность P^* на её правом, длинноволновом, склоне недалеко от её дна, так что энергия активации реакции $P^* \rightarrow P^+V_A^-$ не превышает нескольких десятков см^{-1} . Аналогично поверхность $P^+H_A^-$ пересекает поверхность $P^+V_A^-$ вблизи её дна. В точках пересечения происходит расщепление поверхностей на верхние и нижние. Энергетическая щель между расщеплёнными поверхностями P^* и $P^+V_A^-$ составляет $\sim 10\text{--}30 \text{ см}^{-1}$ [177].

Волновой пакет, образованный несколькими колебательными подуровнями, возникает на левом, коротковолновом, склоне поверхности P^* , где его излучение имеет длину волны $\sim 900 \text{ нм}$. Затем пакет начинает движение по поверхности P^* в сторону длинноволнового склона и через $\sim 120 \text{ фс}$ достигает точки пересечения поверхностей P^* и $P^+V_A^-$. В этот момент волновой пакет излучает с длиной волны 935 нм . В точке пересечения часть волнового пакета переходит на поверхность $P^+V_A^-$ с сохранением когерентного движения, что сопровожда-

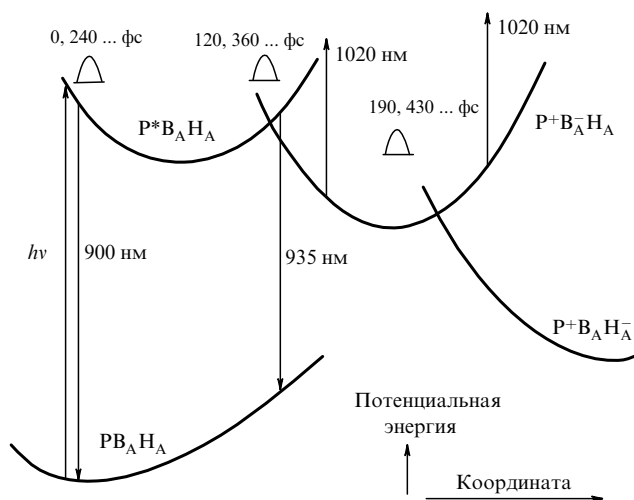


Рис. 9. Упрощённая однокоординатная схема движения ядерного волнового пакета по поверхностям потенциальной энергии основного состояния PV_AH_A , возбуждённого состояния P^*VAH_A и состояний с разделёнными зарядами $P^+V_A^-H_A$ и $P^+V_A^-H_A^-$. (В тексте также используются сокращённые обозначения $P, P^*, P^+V_A^-$ и $P^+H_A^-$.)

ется возникновением полосы поглощения V_A^- . С задержкой $\sim 190 \text{ фс}$ эта часть пакета, двигаясь по поверхности $P^+V_A^-$, достигает области её пересечения с поверхностью $P^+H_A^-$ и частично переходит на последнюю, вызывая увеличение выплывания полосы H_A . Основная часть пакета остаётся на поверхности P^* и, достигнув её края, начинает двигаться в обратную сторону. Точка поворота пакета находится вблизи точки пересечения поверхностей P^* и $P^+V_A^-$. С задержкой $\sim 360 \text{ фс}$ волновой пакет вновь оказывается вблизи этой точки пересечения, и события повторяются.

Циркуляция волнового пакета сопровождается его затуханием и расплыванием из-за процессов диссипации и релаксации. Реальное движение волнового пакета на каждой из поверхностей носит сложный характер и происходит одновременно в разных направлениях на нескольких частотах, среди которых можно выделить, как минимум, две основные моды, при частотах 130 и 32 см^{-1} . Относительный вклад различных мод в общую картину осцилляций в продукте определяется проекциями этих мод на направление первичной реакции $P^* \rightarrow P^+V_A^-$. Сложный характер движения пакета может быть следствием ангармоничности поверхностей или означать формирование многомодовых гиперповерхностей. Неизменность формы полосы поглощения V_A^- во времени свидетельствует об отсутствии смещения поверхностей $P^+V_A^-$ и $P^+(V_A^-)^*$ по координате. В этом случае движение волнового пакета по поверхности $P^+V_A^-$ не визуализируется, однако осцилляции в полосе поглощения H_A^- подтверждают его присутствие на поверхности $P^+V_A^-$. Характер осцилляций в полосе поглощения V_A^- указывает на существенную обратимость переноса электрона, вызванного движением пакета с частотой 130 см^{-1} .

В принципе коэффициент переноса волнового пакета с одной поверхности на другую зависит от времени его пребывания вблизи области переноса и от ширины его энергетического спектра. Чем меньше время пребывания и чем шире спектр пакета по сравнению с шириной энергетической щели в точке расщепления поверхностей, тем меньшая часть пакета перейдёт на другую поверхность. Для моды 130 см^{-1} характерное время пребывания волнового пакета вблизи пересечения поверхностей составляет $\sim 100 \text{ фс}$, а для моды 32 см^{-1} это время возрастает до $\sim 600 \text{ фс}$, что обуславливает увеличение необратимости переноса электрона на этой частоте. Поскольку скорость осциллирующего движения пакета пропорциональна частоте осцилляций, высокочастотные моды движения пакета имеют меньшую вероятность перехода, чем низкочастотные. Это означает, что в осцилляциях продукта доля низких частот будет выше, чем в осцилляциях донора, что полностью подтверждается в эксперименте. Особенно ярко фильтрация низких частот осцилляций проявляется в полосе поглощения вторичного продукта H_A^- .

На основе теории Редфилда [312] может быть проведено моделирование динамики переноса электрона для случая сильной связи электронных состояний P^* и $P^+V_A^-$ с двумя колебательными модами при 130 и 32 см^{-1} [313]. В принятой модели учитывались четыре электронных состояния: основное состояние первичного донора P , возбуждённое состояние P^* , первичное состояние с разделёнными зарядами $P^+V_A^-$ и возбуждённое состояние $P^+(V_A^-)^*$. Поверхности потенциальной энергии состояний P^* и $P^+V_A^-$ зависели от двух эффективных ядерных

координат. Первая координата реакции была связана со смещением состояния P^* относительно P , что привело к формированию неравновесного колебательного состояния при возбуждении P и когерентным колебаниям волнового пакета с частотой 130 см^{-1} . Смещение поверхности $P^+V_A^-$ вдоль второй координаты реакции вызывает колебательное движение с частотой 32 см^{-1} по этой координате. Такое дополнительное движение порождает осцилляции на частоте 32 см^{-1} в состоянии $P^+V_A^-$, которые накладываются на осцилляции с частотой 130 см^{-1} , проникающие в это состояние из состояния P^* .

Вследствие связи состояний P^* и $P^+V_A^-$ мода 32 см^{-1} проникает на поверхность P^* , создавая осцилляции на этой частоте в кинетике стимулированного излучения P^* . Расчёты показывают, что невысокий потенциальный барьер между состояниями P^* и $P^+V_A^-$ вдоль координаты реакции, соответствующей моде 130 см^{-1} , задаёт высокую скорость проникновения пакета в область продукта [313]. Смещение пакета вдоль второй координаты, соответствующей моде 32 см^{-1} , приводит к необратимому разделению зарядов. Из результатов расчётов [313] следует, что комбинация двух коллективных ядерных мод увеличивает скорость прямой реакции и уменьшает скорость обратной.

Эффективность переноса электрона, определяемая конфигурацией потенциальных поверхностей донора и продукта, практически одинакова в случае когерентного и некогерентного возбуждения. Наличие когерентных осцилляций в эксперименте лишь модулирует динамику переноса, но общая скорость остаётся такой же, как и в природном фотосинтезе (где волновые пакеты отсутствуют). Однако когерентные (и долгоживущие) осцилляции помогают визуализировать вклады различных коллективных ядерных мод на разных стадиях реакции и в конечном счёте дают возможность определить основные координаты реакции и конфигурацию соответствующих потенциальных поверхностей. Относительно большие времена жизни осцилляций связаны с переносом когерентности в процессе вибронной релаксации, включая перенос когерентности из одной моды в другую. Так, когерентные колебания вдоль первой координаты реакции, созданные импульсным возбуждением в области первичного донора, сохраняются и при движении вдоль второй координаты. Математически это связано с несекюлярными членами в релаксационном тензоре Редфилда [312], которые ответственны также за связь когерентностей с населённостями вибронных уровней.

Отметим, что осцилляции заселённости различных состояний РЦ могут отражать согласованные движения пигментов и их окружения. Недавние расчёты молекулярной динамики *ab initio* показали, что ряд колебательных мод ближайшего окружения P с частотами в диапазоне $30\text{--}100\text{ см}^{-1}$ оказывает влияние на первичное разделение зарядов в РЦ *Rba. sphaeroides* [314, 315]. Согласно этим расчётам, мода 100 см^{-1} отражает коллективное колебательное движение P и поворот гистидина M202. Эта мода участвует в разделении зарядов внутри димера P и находит своё отражение в динамике P^* . Мода $30\text{--}35\text{ см}^{-1}$ отражает коллективное движение молекулы воды и соседних с ней молекул (имеющих с молекулой воды водородные связи) вблизи димера P .

В работе [316] по молекулярной динамике димера P показано, что колебательные движения гистидинов 172 и

202 и белковых α -спиралей с частотами $30\text{--}120\text{ см}^{-1}$ влияют на формирование диполя $P_A^+P_B^-$ в РЦ *Rba. sphaeroides*. Как видим, некоторые низкие частоты колебаний ближайшего окружения P весьма близки к частотам осцилляций в кинетиках РЦ [130–135] и к частотам резонансного вынужденного комбинационного рассеяния для димера P [317, 318]. Этот факт может отражать коллективный характер указанных колебаний, когда некогерентные или когерентные движения внутри и вне димера P согласованы.

Таким образом, первичным акцептором электрона в РЦ является молекула V_A . Исследование фемтосекундной динамики полосы поглощения V_A^- при 1020 нм полностью подтверждает последовательную схему переноса электрона при первичном разделении зарядов в бактериальных реакционных центрах ($P^* \rightarrow P^+V_A^- \rightarrow P^+H_A^- \rightarrow \dots$), впервые предложенную более 30 лет назад в пионерских работах В.А. Шувалова с соавторами. Осциллирующий характер этой динамики указывает на перенос когерентности в форме волнового пакета по аналогичной схеме.

6. Заключение

Первичный акт фотосинтеза заключается в преобразовании энергии света в энергию разделённых зарядов, которая используется в дальнейших реакциях фотосинтеза. Этот первичный акт происходит в специальных пигмент-белковых комплексах (реакционных центрах) в пикосекундном диапазоне с предельно высокой ($\sim 100\%$) квантовой и довольно большой ($\sim 50\text{--}60\%$) энергетической эффективностями. Поглощение фотона в светособирающей антенне и в самих реакционных центрах приводит в итоге к возбуждению спецпары (димер бактериохлорофилла в реакционных центрах бактерий), которая выполняет функцию конечного акцептора энергии возбуждения и одновременно первичного донора электронов P .

Первичный перенос электрона в реакционных центрах происходит с высокой скоростью между кофакторами хлорофилловой природы, взаимное расположение которых обеспечивается структурой белка реакционных центров. Каждый новый этап переноса электрона сопровождается потерей энергии исходно поглощённого кванта в обмен на увеличение времени диссипации запасённой энергии при постепенном его возрастании на каждом этапе разделения зарядов. Эти потери можно считать платой за всё большую стабилизацию электрона на промежуточных акцепторах по мере удаления от димера. Удаление электрона от его первичного донора сопровождается уменьшением энергии взаимодействия неспаренных электронов, а скорость движения электрона назад по вакантным орбиталам также уменьшается вследствие увеличения фактора Больцмана. В результате время диссипации запасённой энергии увеличивается от $\sim 300\text{ пс}$ в состоянии P^* до $\sim 0,1\text{ с}$ в состоянии $P^+Q_A^-$.

Максимально высокая скорость прямых реакций переноса электрона, намного превышающая скорость процессов рекомбинации и релаксации, является ключевым фактором, обеспечивающим высокую эффективность работы реакционных центров и фотосинтеза в целом. Совокупность перечисленных выше факторов обеспечивает направленность переноса электрона в РЦ.

В реакционных центрах бактерий молекула дополнительного бактериохлорофилла B_A является первичным акцептором электрона и обеспечивает высокую скорость приёма электрона от первичного донора P^* и ещё большую скорость передачи электрона на следующий акцептор, бактериофеофитин H_A . Это достигается благодаря малости или отсутствию активационных барьеров реакций разделения зарядов и хорошему перекрытию электронных орбиталей участников этих реакций. Без прямого участия B_A в переносе электрона достижение максимально высокой скорости этого переноса невозможно. Ближайшее окружение молекулы B_A служит достижению той же цели, ускоряя перенос электрона. Ярким примером такого ускорения является влияние на первичный перенос электрона молекулы кристаллической воды НОН55 и молекулы тирозина М210. Отсутствие этих молекул в окружении B_A приводит к сильному замедлению переноса электрона. Механизмы влияния молекул окружения B_A на перенос электрона могут заключаться как в прямом влиянии этих молекул на энергетические характеристики реакций разделения зарядов, так и в их участии в процессе динамической стабилизации разделённых зарядов в состоянии $P^+B_A^-$ или непосредственной включённости молекул окружения в состав пространственной тропы переноса электрона. Отличительной особенностью молекул НОН55 и тирозина М210 является их полярность, которая позволяет настраивать механизмы влияния в ответ на появление разделённых зарядов, т.е. обеспечивает обратную связь между этими механизмами и процессом разделения зарядов.

В переносе электрона между реагентами активную роль играют колебания ядерной подсистемы. Возбуждение реакционных центров фемтосекундными световыми импульсами вызывает когерентное движение ядер в форме волнового пакета. Это состояние служит ценным источником информации о влиянии ядерных движений на перенос электрона в эксперименте. Результаты фемтосекундной спектроскопии показывают, что само возбуждение одного из электронов P не приводит к разделению зарядов. Только движение ядерной подсистемы вначале в самом P^* , а затем в его окружении, в которое входит и молекула B_A , приводит в итоге к переносу электрона с P^* на B_A с образованием первичного продукта $P^+B_A^-$. Это движение, вероятно, направлено на максимально возможное сближение P^* и B_A . Импульс, приобретённый в результате такого движения, может быть использован как для преодоления энергетического барьера переноса электрона с P^* на B_A , так и для дальнейшего движения, приводящего к разделению продуктов реакции P^+ и B_A^- в пространстве. Сопряжение движений ядерной и электронной подсистем, таким образом, важно для эффективного преобразования световой энергии в энергию разделённых зарядов при фотосинтезе. Это справедливо в отношении как активной А-цепи, так и малоактивной В-цепи реакционных центров бактерий.

Авторы выражают глубокую благодарность Л.Г. Васильевой, В.И. Новодерёжкину, А.Я. Шкуропатову за неоценимую помощь в работе. Авторы признательны Российскому фонду фундаментальных исследований за частичное финансирование работы (грант 14-04-00295а).

Список литературы

1. Рубин А Б, Шинкарев В П *Транспорт электронов в биологических системах* (М.: Наука, 1984)
2. Шувалов В А *Первичное преобразование световой энергии при фотосинтезе* (М.: Наука, 1990)
3. Deisenhofer J, Norris J R (Eds) *The Photosynthetic Reaction Center Vols 1, 2* (San Diego, CA: Academic Press, 1993)
4. Parson W W, in *Protein Electron Transfer* (Ed. D S Bendall) (Oxford: BIOS Sci. Publ., 1996) p. 125
5. Hoff A J, Deisenhofer J *Phys. Rep.* **287** 1 (1997)
6. Okamura M Y et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1458** 148 (2000)
7. Шувалов В А *Преобразование солнечной энергии в первичном акте разделения зарядов в реакционных центрах фотосинтеза* (Тимирязевские чтения, Вып. 60) (М.: Наука, 2000)
8. van Brederode M E, Jones M R, in *Enzyme-Catalyzed Electron and Radical Transfer* (Subcellular Biochemistry, Vol. 35, Eds A Holzenburg, N S Scrutton) (New York: Kluwer Acad./Plenum Publ., 2000) p. 621
9. Wraight C A *Front. Biosci.* **9** 309 (2004)
10. Parson W W, Warshel A, in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 28, Eds C N Hunter et al.) (Dordrecht: Springer, 2009) p. 355
11. Williams J C, Allen J P, in *The Purple Phototrophic Bacteria* (Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 28, Eds C N Hunter et al.) (Dordrecht: Springer, 2009) p. 337
12. Яковлев А Г *Первичный фотосинтез* (Saarbrücken: LAMBERT Acad. Publ., 2013)
13. Аллахвердиев С И, Рубин А Б, Шувалов В А (Ред.) *Фотосинтез: открытые вопросы и что мы знаем сегодня* (М.–Ижевск: Инст. компьютер. исслед., 2013)
14. Olson J M, Thornber J P, in *Membrane Proteins in Energy Transduction* (Ed. R A Capaldi) (New York: M. Dekker, 1979) p. 279
15. Feher G, Okamura M Y, in *The Photosynthetic Bacteria* (Eds R K Clayton, W R Sistrom) (New York: Plenum Press, 1978) p. 349
16. Deisenhofer J et al. *Nature* **318** 618 (1985)
17. Deisenhofer J, Michel H, Huber R *Trends Biochem.* **10** 243 (1985)
18. Blankenship R E et al. *J. Cell. Biochem.* **22** 251 (1983)
19. Pierson B K, Thornber J P *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** 80 (1983)
20. Hale M B, Blankenship R E, Fuller R C *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **723** 376 (1983)
21. Michel H et al. *EMBO J.* **5** 1149 (1986)
22. Deisenhofer J et al. *J. Mol. Biol.* **180** 385 (1984)
23. Chang C-H et al. *J. Mol. Biol.* **186** 201 (1985)
24. Chang C-H et al. *FEBS Lett.* **205** 82 (1986)
25. Allen J P et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** 5730 (1987)
26. Allen J P et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** 6162 (1987)
27. Ermler U et al. *Structure* **2** 925 (1994)
28. Plato M et al., in *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II: Structure, Spectroscopy, and Dynamics* (NATO ASI Ser. A, Vol. 237, Eds J Breton, A Verméglio) (New York: Plenum Press, 1992) p. 109
29. Artz K et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 13582 (1997)
30. Müh F et al. *J. Phys. Chem. B* **106** 3226 (2002)
31. Holten D et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **592** 461 (1980)
32. Paschenko V Z et al. *FEBS Lett.* **191** 245 (1985)
33. Woodbury N W et al. *Biochemistry* **24** 7516 (1985)
34. Woodbury N W et al. *Biochemistry* **33** 8101 (1994)
35. Breton J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** 5121 (1986)
36. Martin J-L et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** 957 (1986)
37. Wasielewski M R, Tiede D M *FEBS Lett.* **204** 368 (1986)
38. Kirmaier C, Holten D *Israel J. Chem.* **28** 79 (1988)
39. Holzapfel W et al. *Chem. Phys. Lett.* **160** 1 (1989)
40. Holzapfel W et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** 5168 (1990)
41. Lauterwasser C et al. *Chem. Phys. Lett.* **183** 471 (1991)
42. Peloquin J M et al. *Biochemistry* **33** 8089 (1994)
43. Holzwarth A R, Muller M G *Biochemistry* **35** 11820 (1996)
44. Huppman P et al. *Biophys. J.* **82** 3186 (2002)
45. Kaufmann K J et al. *Science* **188** 1301 (1975)

46. Rockley M G et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** 2251 (1975)
47. Holten D et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **501** 112 (1978)
48. Kirmaier C, Holten D, Parson W W *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **810** 49 (1985)
49. Kirmaier C, He C, Holten D *Biochemistry* **40** 12132 (2001)
50. Kirmaier C et al. *J. Phys. Chem. B* **108** 11827 (2004)
51. Kellog E C et al. *Photosynth. Res.* **22** 47 (1989)
52. Mar T, Gingras G *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1017** 112 (1990)
53. Robles S J, Breton J, Youvan D C *Science* **248** 1402 (1990)
54. Heller BA, Holten D, Kirmaier C *Science* **269** 940 (1995)
55. de Boer A L et al. *Biochemistry* **41** 3081 (2002)
56. Katilius E et al. *J. Phys. Chem. B* **106** 1471 (2002)
57. Haffa A L M et al. *J. Phys. Chem. B* **108** 4 (2004)
58. Bylina E J et al. *Nature* **336** 182 (1988)
59. Wraight C A, Clayton R K *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **333** 246 (1974)
60. Trissl H-W et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1015** 322 (1990)
61. Volk M et al. *J. Phys. Chem. B* **102** 735 (1998)
62. Breton J et al. *Biochemistry* **27** 8276 (1988)
63. Fleming G R, Martin J-L, Breton J *Nature* **333** 190 (1988)
64. Nagarajan V et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** 7888 (1990)
65. Nagarajan V et al. *Biochemistry* **32** 12324 (1993)
66. Jia Y et al. *J. Phys. Chem.* **97** 13180 (1993)
67. Haffa A L M et al. *J. Phys. Chem. B* **106** 7376 (2002)
68. Schenck C C et al. *Biophys. J.* **36** 479 (1981)
69. Kirmaier C, Holten D, Parson W W *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **810** 33 (1985)
70. Gunner M R, Dutton P L *J. Am. Chem. Soc.* **111** 3400 (1989)
71. Wang H, Lin S, Woodbury N W *J. Phys. Chem. B* **110** 6956 (2006)
72. Lin S et al. *J. Phys. Chem. B* **107** 14103 (2003)
73. Dahlbom M G, Reimers J R *Mol. Phys.* **103** 1057 (2005)
74. Katilius E et al. *J. Phys. Chem. B* **103** 7386 (1999)
75. Katilius E et al. *Photosynth. Res.* **81** 165 (2004)
76. Feick R, Shiozawa J A, Ertlmaier A, in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Advances in Photosynthesis, Vol. 2, Eds R E Blankenship, M T Madigan, C E Bauer) (Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995) p. 699
77. Bruce B D, Fuller R C, Blankenship R E *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** 6532 (1982)
78. Kirmaier C et al. *FEBS Lett.* **158** 73 (1983)
79. Kirmaier C, Blankenship R E, Holten D *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **850** 275 (1986)
80. Vasmel H, Amesz J *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **724** 118 (1983)
81. Venturoli G et al. *Eur. J. Biochem.* **202** 625 (1991)
82. Ovchinnikov Yu A et al. *FEBS Lett.* **231** 237 (1988)
83. Ovchinnikov Yu A et al. *FEBS Lett.* **232** 364 (1988)
84. Shiozawa J A et al. *Eur. J. Biochem.* **180** 75 (1989)
85. Parot P et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **809** 137 (1985)
86. Shuvalov V A et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **849** 337 (1986)
87. Vasmel H, Amesz J, Hoff A J *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **852** 159 (1986)
88. Scherer P O J, Fischer S F *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **891** 157 (1987)
89. Becker M et al. *Biochim Biophys Acta BBA Bioenerg.* **1057** 299 (1991)
90. Feick R et al., in *Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria. Feldafing-II-Meeting* (Springer Series in Biophysics, Vol. 6, Ed. M E Michel-Beyerle) (Berlin: Springer-Verlag, 1990) p. 181
91. Volk M et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1058** 217 (1991)
92. Wachtveitl J et al. *Spectrochim. Acta A* **54** 1231 (1998)
93. Parson W W, Chu Z-T, Warshel A *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1017** 251 (1990)
94. Gunner M, Nicholls A, Honig B *J. Phys. Chem.* **100** 4277 (1996)
95. Watanabe T, Kobayashi M, in *Chlorophylls* (Ed. H Scheer) (Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1991) p. 287
96. Fajer J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** 4956 (1975)
97. Schweitzer G et al. *Chem. Phys. Lett.* **190** 149 (1992)
98. Aumeier W et al., in *Current Research in Photosynthesis. Proc. of the VIIIth Intern. Congress on Photosynthesis, Stockholm, Sweden, August 6–11, 1989* (Ed. M Baltscheffsky) Vol. 1 (Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1990) p. 133
99. van Brederode M E et al. *Biochemistry* **36** 6855 (1997)
100. van Brederode M E et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** 2054 (1999)
101. van Brederode M E et al. *Biochemistry* **38** 7545 (1999)
102. Lin S et al. *J. Phys. Chem. B* **103** 4757 (1999)
103. Lin S et al. *Biochemistry* **40** 13767 (2001)
104. Zhou H, Boxer S G *J. Phys. Chem. B* **102** 9139 (1998)
105. Zhou H, Boxer S G *J. Phys. Chem. B* **102** 9148 (1998)
106. King B A et al. *J. Phys. Chem. B* **105** 1856 (2001)
107. Kennis J T M et al. *Biochemistry* **36** 16231 (1997)
108. Shuvalov V A, Parson W W *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** 957 (1980)
109. Vos M H et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** 8885 (1991)
110. Vos M H et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** 613 (1992)
111. Du M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** 8517 (1992)
112. Hamm P et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1142** 99 (1993)
113. Stanley R J, Boxer S G *J. Phys. Chem.* **99** 859 (1995)
114. Beekman L M P et al. *J. Phys. Chem.* **100** 7256 (1996)
115. Ogrodnik A et al. *Chem. Phys.* **244** 461 (1999)
116. Wang H W et al. *Science* **316** 747 (2007)
117. Kirmaier C, Holten D *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** 3552 (1990)
118. Wang Z et al. *Chem. Phys.* **176** 421 (1993)
119. Gehlen J N, Marchi M, Chandler D *Science* **263** 499 (1994)
120. Hartwich G et al. *J. Phys. Chem. B* **102** 3815 (1998)
121. Peloquin J M et al. *J. Phys. Chem.* **99** 1349 (1995)
122. Peloquin J M et al. *J. Phys. Chem.* **100** 14228 (1996)
123. Small G J, Hayes J M, Silbey R J *J. Phys. Chem.* **96** 7499 (1992)
124. Lyle P A, Kolaczowski S V, Small G J *J. Phys. Chem.* **97** 6924 (1993)
125. Small G J *Chem. Phys.* **197** 239 (1995)
126. Hamm P, Zinth W *J. Phys. Chem.* **99** 13537 (1995)
127. Johnson S G et al. *J. Phys. Chem.* **94** 5849 (1990)
128. Middendorf T R et al. *J. Phys. Chem.* **95** 10142 (1991)
129. Reddy N R S, Lyle P A, Small G J *Photosynth. Res.* **31** 167 (1992)
130. Vos M H et al. *Nature* **363** 320 (1993)
131. Vos M H et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** 12701 (1994)
132. Vos M H et al. *Biochemistry* **33** 6750 (1994)
133. Vos M H et al. *Biochemistry* **35** 2687 (1996)
134. Vos M H, Jones M R, Martin J-L *Chem. Phys.* **233** 179 (1998)
135. Vos M H et al. *Biochemistry* **39** 8353 (2000)
136. Martin J-L, Vos M H *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21** 199 (1992)
137. Vos M, Martin J-L *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1411** 1 (1999)
138. Spörlein S, Zinth W, Wachtveitl J *J. Phys. Chem. B* **102** 7492 (1998)
139. Rischel C et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 12306 (1998)
140. Parson W W, Warshel A *Chem. Phys.* **296** 201 (2004)
141. Parson W W, Warshel A *J. Phys. Chem. B* **108** 10474 (2004)
142. Czarnecki K et al. *J. Am. Chem. Soc.* **119** 415 (1997)
143. Kitzing E, Kühn H *J. Phys. Chem.* **94** 1699 (1990)
144. Lin S, Taguchi A K W, Woodbury N W *J. Phys. Chem.* **100** 17067 (1996)
145. Taguchi A K W et al. *Biochemistry* **35** 3175 (1996)
146. Wakeham M C, Jones M R *Biochem. Soc. Trans.* **133** 851 (2005)
147. Kirmaier C et al. *J. Phys. Chem. B* **106** 495 (2002)
148. Kirmaier C et al. *J. Phys. Chem. B* **106** 1799 (2002)
149. Kirmaier C et al. *Biochemistry* **42** 2016 (2003)
150. Kee H L et al. *Biochemistry* **45** 7314 (2006)
151. Paddock M L et al. *Biochemistry* **45** 14032 (2006)
152. Laible P D et al. *Biochemistry* **42** 1718 (2003)
153. Breton J et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1656** 127 (2004)
154. Paddock M L et al. *Biochemistry* **44** 6920 (2005)
155. Wakeham M C et al. *FEBS Lett.* **540** 234 (2003)
156. Wakeham M C et al. *Biochemistry* **43** 4755 (2004)
157. Frolov D et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1707** 189 (2005)
158. Allen J P et al. *Photosynth. Res.* **55** 227 (1998)

159. Parson W W, Warshel A, in *Biophysical Techniques in Photosynthesis* Vol. 2 (Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 26, Eds T J Aartsma, J Matysik) (Dordrecht: Springer, 2008) p. 401
160. Warshel A, Parson W W *Quart. Rev. Biophys.* **34** 563 (2001)
161. Alden R G et al. *J. Phys. Chem.* **100** 16761 (1996)
162. Finkele U et al. *Biochemistry* **29** 8517 (1990)
163. Chan C K et al. *Chem. Phys. Lett.* **176** 366 (1991)
164. Shochat S et al. *Photosynth. Res.* **40** 55 (1994)
165. Heller B A, Holten D, Kirmaier C *Biochemistry* **34** 5294 (1995)
166. Heller B A, Holten D, Kirmaier C *Biochemistry* **35** 15418 (1996)
167. Kirmaier C et al. *J. Phys. Chem.* **99** 8903 (1995)
168. Kirmaier C et al. *J. Phys. Chem.* **99** 8910 (1995)
169. Kirmaier C, Weems D, Holten D *Biochemistry* **38** 11516 (1999)
170. Lin S et al. *Biochemistry* **35** 3187 (1996)
171. Czarnecki K et al. *J. Phys. Chem. A* **103** 2235 (1999)
172. Chuang J I et al. *Biochemistry* **45** 3845 (2006)
173. Ivashin N et al. *J. Phys. Chem. B* **102** 5017 (1998)
174. Kolbasov D, Scherz A, in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects. Proc. of the XIth Intern. Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungary, August 17–22, 1998* Vol. 2 (Ed. G Garab) (Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1998) p. 719
175. Kolbasov D, Scherz A *J. Phys. Chem. B* **104** 1802 (2000)
176. Zhang L Y, Friesner R A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 13603 (1998)
177. Parson W W, Creighton S, Warshel A, in *Primary Processes in Photobiology. Proc. of the 12th Taniguchi Symp., Fujiyoshida, Yamanashi Prefecture, Japan, December 7–12, 1986* (Ed. T Kobayashi) (Berlin: Springer-Verlag, 1987) p. 43
178. Warshel A, Creighton S, Parson W W *J. Phys. Chem.* **92** 2698 (1988)
179. Moser C C et al. *Nature* **355** 796 (1992)
180. Gray H B, Winkler J R *Annu. Rev. Biochem.* **65** 537 (1996)
181. Newton M D *Theor. Chem. Acc.* **110** 307 (2003)
182. Skourtis S S et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 3552 (2005)
183. Steffen M A, Lao K Q, Boxer S G *Science* **264** 810 (1994)
184. Lin J, Beratan D N *J. Phys. Chem. B* **109** 7529 (2005)
185. Gray H B, Winkler J R *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 3534 (2005)
186. Noy D, Moser C C, Dutton P L *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1757** 90 (2006)
187. Katilius E et al. *J. Phys. Chem. B* **106** 12344 (2002)
188. Kirmaier C et al. *J. Phys. Chem. B* **109** 24160 (2005)
189. Ishikita H et al. *FEBS Lett.* **579** 712 (2005)
190. Ishikita H et al. *Biochemistry* **45** 2063 (2006)
191. Middendorf T R et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1143** 223 (1993)
192. Yanagi K et al. *J. Phys. Chem. B* **109** 992 (2005)
193. Haffa A L M et al. *J. Phys. Chem. B* **107** 12503 (2003)
194. Yakovlev A G et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1757** 369 (2006)
195. Yakovlev A G et al. *J. Bioinform. Comput. Biol.* **6** 643 (2008)
196. McDowell L M et al. *Biochemistry* **30** 8315 (1991)
197. Allen J P et al. *Biochemistry* **35** 6612 (1996)
198. Kirmaier C et al. *Science* **251** 922 (1991)
199. Watson A J et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1710** 34 (2005)
200. Williams J C et al. *Appl. Magn. Reson.* **31** 45 (2007)
201. Jackson J A et al. *J. Phys. Chem. B* **101** 5747 (1997)
202. Moore L J, Boxer S G *Photosynth. Res.* **55** 173 (1998)
203. Robles S J, Breton J, Youvan D C, in *Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria. Feldafing-II-Meeting* (Springer Series in Biophysics, Vol. 6, Ed. M-E Michel-Beyerle) (Berlin: Springer-Verlag, 1990) p. 283
204. Khatypov R A et al. *Biochemistry Moscow* **70** 1527 (2005)
205. Spiedel D, Jones M R, Robert B *FEBS Lett.* **527** 171 (2002)
206. Stocker J W et al. *Biochemistry* **31** 10356 (1992)
207. Williams J C et al. *Biochemistry* **31** 11029 (1992)
208. Murchison H A et al. *Biochemistry* **32** 3498 (1993)
209. Allen J P, Williams J C *J. Bioenerg. Biomembr.* **27** 275 (1995)
210. Allen J P, Williams J C, in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 25, Eds B Grimm et al.) (Dordrecht: Springer, 2006) p. 283
211. Lin X et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** 10265 (1994)
212. Chen L et al. *J. Phys. Chem. B* **108** 10457 (2004)
213. Müh F et al. *Biochemistry* **37** 13066 (1998)
214. Williams J C et al. *Biochemistry* **40** 15403 (2001)
215. Johnson E T, Parson W W *Biochemistry* **41** 6483 (2002)
216. Johnson E T et al. *J. Phys. Chem. B* **106** 11859 (2002)
217. Treynor T P, Yoshina-Ishii C, Boxer S G *J. Phys. Chem. B* **108** 13523 (2004)
218. Alden R G et al., in *Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria: Structure and Dynamics* (Ed. M-E Michel-Beyerle) (Berlin: Springer, 1996) p. 105
219. Reimers J R, Hush N S *J. Am. Chem. Soc.* **126** 4132 (2004)
220. Kanchanawong P et al. *J. Phys. Chem. B* **110** 18688 (2006)
221. Goldsmith J O, Boxer S G *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1276** 171 (1996)
222. Bylina E J et al. *Biochemistry* **29** 6203 (1990)
223. Arlt T et al. *J. Phys. Chem.* **100** 12060 (1996)
224. Arlt T et al. *Biochemistry* **35** 9235 (1996)
225. Katilius E et al. *J. Phys. Chem. B* **107** 12029 (2003)
226. Bylina E J, Youvan D C *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** 7226 (1988)
227. Kálmán L et al. *Nature* **402** 696 (1999)
228. Kálmán L et al. *Biochemistry* **42** 13280 (2003)
229. Narváez A J et al. *Biochemistry* **41** 15253 (2002)
230. Narváez A J et al. *Biochemistry* **43** 14379 (2004)
231. Thielges M et al. *Biochemistry* **44** 7389 (2005)
232. Kálmán L et al. *Biochemistry* **44** 13266 (2005)
233. Johnson E T et al. *Biochemistry* **42** 13673 (2003)
234. de Boer A L et al. *Photosynth. Res.* **71** 221 (2002)
235. Woodbury N W et al. *Chem. Phys.* **197** 405 (1995)
236. McAuley K E et al. *FEBS Lett.* **467** 285 (2000)
237. Yakovlev A G et al. *J. Phys. Chem. A* **107** 8330 (2003)
238. Яковлев А Г и др. *Биохимия* **74** 1479 (2009); Yakovlev A G et al. *Biochemistry Moscow* **74** 1203 (2009)
239. Яковлев А Г и др. *Биохимия* **75** 944 (2010); Yakovlev A G et al. *Biochemistry Moscow* **75** 832 (2010)
240. Pawlowicz N P et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12** 2693 (2010)
241. Plato M et al., in *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center: Structure and Dynamics* (NATO ASI Series A, Vol. 149, Eds J Breton, A Vermeglio) (New York: Plenum Press, 1988) p. 379
242. Yakovlev A G, Shkuropatov A Ya, Shuvalov V A *Biochemistry* **41** 14019 (2002)
243. Yakovlev A G, Shkuropatov A Ya, Shuvalov V A *Biochemistry* **41** 2667 (2002)
244. Фок М В, Борисов А Ю *Молекуляр. биология* **15** 575 (1981)
245. Yakovlev A G et al. *Chem. Phys.* **319** 297 (2005)
246. Potter J A et al. *J. Biol. Chem.* **280** 27155 (2005)
247. Deisenhofer J et al. *J. Mol. Biol.* **246** 429 (1995)
248. Stowell M H B et al. *Science* **276** 812 (1997)
249. Fyfe P K et al. *Biochemistry* **39** 5953 (2000)
250. Herzberg G *Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules* (New York: Van Nostrand, 1945); Пер. на русск. яз.: Герцберг Г *Колебательные и вращательные спектры многоатомных молекул* (М.: ИЛ, 1949)
251. de Rege P J F, Williams S A, Therien M J *Science* **269** 1409 (1995)
252. Bixon M, Jortner J, Michel-Beyerle M E *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1056** 301 (1991)
253. Creighton S et al. *Biochemistry* **27** 774 (1988)
254. Alden R G et al. *J. Am. Chem. Soc.* **117** 12284 (1995)
255. Warshel A et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1764** 1647 (2006)
256. Scherer P O J, Fischer S F *J. Phys. Chem.* **93** 1633 (1989)
257. Scherer P O J, Fischer S F *Spectrochim. Acta A* **54** 1191 (1998)
258. Thompson M A, Zerner M C, Fajer J J. *Am. Chem. Soc.* **113** 8210 (1991)
259. Marchi M et al. *J. Am. Chem. Soc.* **115** 4178 (1993)
260. Blomberg M R A, Siegbahn P H M, Babcock G T *J. Am. Chem. Soc.* **120** 8812 (1998)
261. Hasegawa J, Nakatsuji H *J. Phys. Chem. B* **102** 10420 (1998)
262. Hughes J M et al. *J. Am. Chem. Soc.* **123** 8550 (2001)
263. Gilson M K et al. *J. Mol. Biol.* **184** 503 (1985)
264. Warshel A, Russell S T *Quart. Rev. Biophys.* **17** 283 (1984)
265. Hunenberger P H, Mark A E, van Gunsteren W F *J. Mol. Biol.* **252** 492 (1995)
266. Figueirido F, Del Buono G S, Levy R M *J. Phys. Chem. B* **101** 5622 (1997)

267. Sham Y Y, Warshel A J. *Chem. Phys.* **109** 7940 (1998)
 268. Procacci et al. *J. Comp. Chem.* **18** 1848 (1997)
 269. Ceccarelli M, Marchi M J. *Phys. Chem. B* **107** 5630 (2003)
 270. Parson W W, Chu Z T, Warshel A. *Biophys. J.* **74** 182 (1998)
 271. Parson W W, Chu Z T, Warshel A. *Photosynth. Res.* **55** 147 (1998)
 272. Schmidt S et al. *Chem. Phys. Lett.* **223** 116 (1994)
 273. Schmidt S et al. *Spectrochim. Acta A* **51A** 1565 (1995)
 274. Egger R, Mak C H J. *Phys. Chem.* **98** 9903 (1994)
 275. Bixon M, Jortner J, Michel-Beyerle M E. *Chem. Phys.* **197** 389 (1995)
 276. Bixon M, Jortner J, Michel-Beyerle M E, in *The Reaction Center of Photosynthetic Bacteria: Structure and Dynamics* (Ed. M-E Michel-Beyerle) (Berlin: Springer, 1996) p. 287
 277. Sim E, Makri N J. *Phys. Chem. B* **101** 5446 (1997)
 278. Zusman L D, Beratan D N. *Spectrochim. Acta A* **54** 1211 (1998)
 279. Spörlein S et al. *Chem. Phys. Lett.* **322** 454 (2000)
 280. Roberts J A, Holten D, Kirmaier C J. *Phys. Chem. B* **105** 5575 (2001)
 281. Ivashin N, Larsson S J. *Phys. Chem. B* **106** 3996 (2002)
 282. Шувалов В А, Яковлев А Г. *Бюл. мембр.* **15** 459 (1998); Shuvalov V A, Yakovlev A G. *Biochemistry Moscow Suppl. A* **12** 563 (1998)
 283. Shuvalov V A, Klimov V V. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **440** 587 (1976)
 284. Godik V I, Borisov A Y. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **548** 296 (1979)
 285. Rademaker J, Hoff A J. *Biophys. J.* **34** 325 (1981)
 286. Godik V I, Kotova E A, Borisov A Y. *Photobiophys. Photobiophys.* **4** 219 (1982)
 287. Schenck C C, Blankenship R E, Parson W W. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **680** 44 (1982)
 288. Woodbury N W T, Parson W W. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **767** 345 (1984)
 289. Hörber J K H et al. *FEBS Lett.* **198** 273 (1986)
 290. Woodbury N W et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **851** 6 (1986)
 291. Goldstein R A, Boxer S G. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **977** 70 (1988)
 292. Ogrodnik A. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **1020** 65 (1990)
 293. Ogrodnik A et al. *J. Phys. Chem.* **98** 3432 (1994)
 294. Parson W W, Clayton R K, Cogdell R J. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **387** 265 (1975)
 295. Takiff L, Boxer S G. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **932** 325 (1988)
 296. Blankenship R E, Schaafsma T J, Parson W W. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **461** 297 (1977)
 297. Haberkorn R, Michel-Beyerle M E. *Biophys. J.* **26** 489 (1979)
 298. Hoff A J. *Quart. Rev. Biophys.* **14** 599 (1981)
 299. Boxer S G, Chidsey E D, Roelofs M G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **34** 389 (1983)
 300. Chidsey C E D et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** 6850 (1985)
 301. Ogrodnik A et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* **936** 361 (1988)
 302. Boxer S G et al. *J. Phys. Chem.* **93** 8280 (1989)
 303. Shuvalov V A et al. *FEBS Lett.* **91** 135 (1978)
 304. Shuvalov V A, Duysens L N M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** 1690 (1986)
 305. Chekalin S V et al. *FEBS Lett.* **216** 245 (1987)
 306. Матвеев Ю А и др. *ДАН СССР* **294** 1480 (1987)
 307. Arlt T et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 11757 (1993)
 308. Bixon M et al., in *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center: Structure and Dynamics* (NATO ASI Series A, Vol. 149, Eds J Breton, A Vermeglio) (New York: Plenum Press, 1988) p. 399
 309. van Stokkum I H M et al. *Biochemistry* **36** 11360 (1997)
 310. Shkuropatov A Y, Shuvalov V A. *FEBS Lett.* **322** 168 (1993)
 311. Yakovlev A G, Shkuropatov A Ya, Shuvalov V A. *FEBS Lett.* **466** 209 (2000)
 312. Redfield A G, in *Advances in Magnetic Resonance* Vol. 1 (Ed. J S Waugh) Vol. 1 (New York: Academic Press, 1965) p. 1
 313. Novoderezhkin V I et al. *J. Phys. Chem. B* **108** 7445 (2004)
 314. Eisenmayer T J et al. *J. Phys. Chem. Lett.* **3** 694 (2012)
 315. Eisenmayer T J et al. *J. Phys. Chem. B* **117** 11162 (2013)
 316. Milanovsky G E et al. *J. Phys. Chem. B* **119** 13656 (2015)
 317. Cherepy N J et al. *J. Phys. Chem.* **98** 6023 (1994)
 318. Cherepy N J et al. *Biochemistry* **36** 8559 (1997)

Physical stage of photosynthesis charge separation

A.G. Yakovlev

M.V. Lomonosov Moscow State University, Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology,
 Leninskie gory 1, str. 40, 119992 Moscow, Russian Federation
 Fax + 7 (495) 939 31 81
 E-mail: yakov@genebee.msu.ru

V.A. Shuvalov

M.V. Lomonosov Moscow State University, Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology,
 Leninskie gory 1, str. 40, 119992 Moscow, Russian Federation;
 Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences,
 ul. Institutskaya 2, 142292 Pushchino, Moscow region, Russian Federation
 Fax + 7 (496) 779 05 32
 E-mail: shuvalov@issp.serpukhov.su

An analytical review is given of the biophysical aspects of primary light-driven charge separation in photosynthesis reaction centers (RCs), which are special pigment-protein complexes residing in a cell membrane. The primary (physical) stage of charge separation occurs in the pico- and femtosecond ranges and consists in transferring an electron along the active A-branch of pigments. The review presents vast factual material both on the general issues of primary photosynthesis and some more specific topics, including 1) the role of inactive B-branch of pigments, 2) the effect of protein environment on the charge separation, and 3) the participation of monomeric bacteriochlorophyll B_A in primary electron acceptance. It is shown that the electron transfer and stabilization are strongly influenced by crystallographic water and tyrosine M210 molecules from the nearest environment of B_A. A connection between the collective nuclear motions and electron transfer at charge separation is shown. The nature of the high quantum efficiency of the primary charge separation reactions is discussed.

Keywords: photosynthesis, reaction center, charge separation, electron transfer

PACS numbers: 87.15.ht, 87.15.M-, 87.15.R-

Bibliography — 318 references

Received 19 October 2015, revised 28 January 2016

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **186** (6) 597–625 (2016)
 DOI: 10.3367/UFNr.2016.02.037701

Physics – Uspekhi **59** (6) (2016)
 DOI: 10.3367/UFNe.2016.02.037701