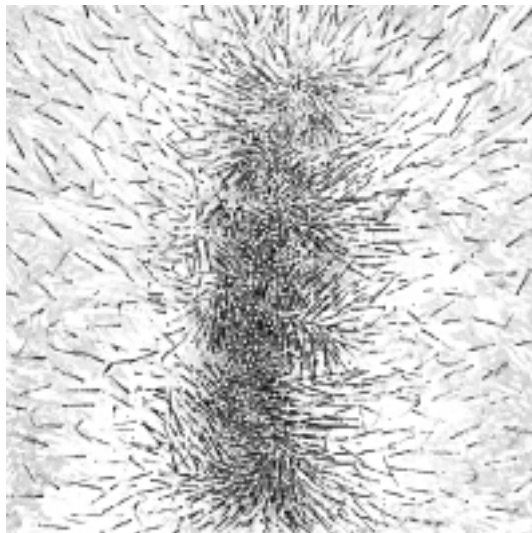


# **Биофизика фотобиологических процессов**

## **IX Первичные процессы фотосинтеза**



## **XXVII Трансформация энергии в первичных процессах фотосинтеза**

## **XXVIII Электронно-конформационные взаимодействия в первичных процессах фотосинтеза**

Фотобиология изучает действие света на различные биологические системы. Современный этап развития этой области биологии характеризуется глубоким проникновением в молекулярные механизмы первичных реакций, выяснением внутренней организации фотоэнергетических и фоторецепторных систем. Проблемы фотобиологии оказались в центре внимания серьезных биофизических исследований, а их результаты во многом обогатили современную молекулярную биофизику и, в частности, способствовали раскрытию механизмов электронно-конформационных взаимодействий. Существуют разнообразные фотобиологические процессы, к важнейшим из которых относятся фотосинтез, зрение, фоторецепторные реакции, деструктивное действие ультрафиолетового света.

Во всех фотобиологических процессах энергия света необходима для преодоления активационных барьеров химических превращений. Однако в фотосинтезе при этом происходит непосредственное запасаение световой энергии и в виде энергии химических связей, конечных продуктов (глюкоза), поскольку последние обладают большим запасом свободной энергии по сравнению с исходными веществами ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ). В остальных фотобиологических процессах свет также индуцирует фотохимические реакции, но в их продуктах не содержится избытка свободной энергии по сравнению с исходными веществами. Тем не менее и в этих случаях в последующих за фотохимической стадией темновых процессах могут инициироваться сложные физиолого-биохимические превращения, в ходе которых мобилизуются большие количества свободной энергии, ранее запасенной в биоструктурах. Конечные результаты такого рода превращений (например, стимулирующее действие света на морфогенез, биосинтез пигментов, фотостимуляция дыхания) по общему энергетическому эффекту могут быть весьма велики, хотя непосредственного запасаения энергии света при этом и не происходит. Последовательность превращений в фотобиологических процессах может включать следующие стадии: поглощение света хромофорной группой и образование электронно-возбужденных состояний → миграция энергии электронного возбуждения → первичный фотофизический акт и появление первичных фотопродуктов → промежуточные стадии, включая перенос заряда, → образование первичных стабильных химических продуктов → физиолого-биохимические процессы → конечный фотобиологический эффект. □

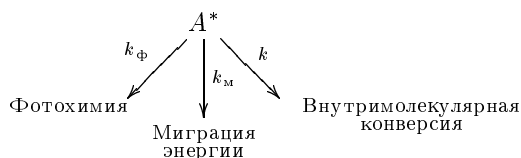
Выяснение механизмов и путей регуляции начальных этапов трансформации энергии электронного возбуждения и сопровождающих ее молекулярных превращений, включая изменения в хромофорных группах, их белковых носителях и окружающей мембране, представляет собой одну из основных задач биофизики. Эта проблема связана с выяснением роли и механизмов участия электронно-возбужденных состояний в биологических процессах. Специфическая особенность фотобиологических процессов, отличающая их от других темновых биохимических реакций, состоит в том, что источником электронного возбуждения здесь являются кванты света. Однако, несмотря на это отличие, биофизические исследования в области фотобиологии привели к установлению ряда закономерностей, имеющих общеприкладное значение.

# Трансформация энергии в первичных процессах фотосинтеза



## § 1. Общая характеристика начальных стадий фотобиологических процессов

В гл. X, XII было показано, что при поглощении кванта света один из электронов, находящийся на нижнем энергетическом уровне на связывающей орбитали, переходит на верхний энергетический уровень, заполняя нижнюю разрыхляющую орбиталь и переводя тем самым молекулу в возбужденное электронное состояние (синглетное  $S_1$  или триплетное  $T$ , см. рис. X.5). Существуют различные пути трансформации энергии возбуждения, включающие внутримолекулярную конверсию, безызлучательную передачу энергии возбуждения другой молекуле (миграция энергии) и использование энергии возбуждения в каких-либо фотохимических реакциях:



где  $k_\phi$ ,  $k_m$ ,  $k$  — константы скоростей соответствующих процессов, причем  $k$  представляет собой суммарную вероятность внутримолекулярной дезактивации возбужденного состояния [см. (X.2.8)]:  $k = p + q + r$  где  $p$ ,  $q$ ,  $r$  — частоты переходов в единицу времени с синглетного возбужденного уровня  $S_1$  на основной с испусканием света флуоресценции  $p$ , тепловой дезактивации состояния  $S_1(q)$ , конверсии  $S_1 \rightarrow T(r)$ .

Согласно (X.2.10), выход флуоресценции без учета миграции энергии  $k_m$  равен

$$B = p/(p + q + r) = p/k, \quad (\text{XXVII.1.1})$$

а при учете фотохимического процесса

$$B_1 = p/(k + k_\phi). \quad (\text{XXVII.1.2})$$

Так как, согласно (X.2.8),

$$\tau = 1/(p + q + r) = 1/k, \quad (\text{XXVII.1.3})$$

то

$$B = p\tau. \quad (\text{XXVII.1.4})$$

При фотохимической дезактивации возбужденного состояния

$$\tau_1 = 1/(k + k_{\Phi}). \quad (\text{XXVII.1.5})$$

Аналогично получим, что

$$B_1 = 1/\tau_1 \quad (\text{XXVII.1.6})$$

или

$$\tau_1 = (1/p)B = \tau_0 B, \quad (\text{XXVII.1.7})$$

где  $p = 1/\tau_0$  — вероятность флуоресценции.

Таким образом, время жизни  $\tau_1$  пропорционально величине выхода флуоресценции  $B$ . Квантовая эффективность  $\Phi$  фотохимического процесса связана с выходом флуоресценции  $B$ . Очевидно,

$$\Phi = k_{\Phi}/(k + k_{\Phi}). \quad (\text{XXVII.1.8})$$

Комбинируя уравнения (XXVII.1.1)–(XXVII.1.7), найдем

$$\Phi = 1 - B_1/B \quad \text{или} \quad \Phi = 1 - \tau_1/\tau. \quad (\text{XXVII.1.9})$$

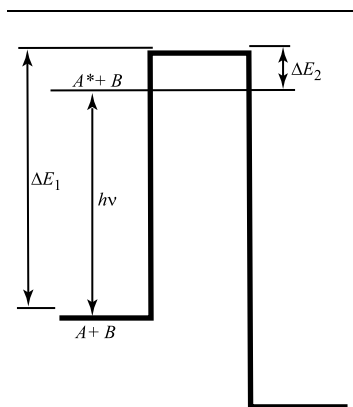


Рис. XXVII.1.

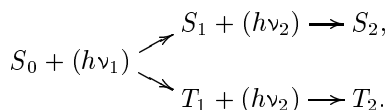
Энергетическая схема фотохимического процесса  $A^* + B \rightarrow P$

$\Delta E_1$  — энергия активации темновой реакции  $A + B \rightarrow P$ ;  $\Delta E_2$  — энергия активации фотохимической реакции  $A^* + B \rightarrow P$  ( $\Delta E_1 > \Delta E_2$ )

неспаренными электронами, приобретая тем самым свойства анион-радикала на время существования возбуждения. Известно, что в реакционноспособных анион-радикалах, полученных путем восстановления нейтральных молекул, присоединенный электрон занимает нижнюю вакантную разрыхляющую орбиталь, но не может понизить свой энергетический уровень и перейти в систему связывающих орбиталей, поскольку последние полностью заполнены в нейтральной молекуле.

Собственно фотохимические превращения проходят, как правило, в виде одно-квантовых фотохимических процессов. Исключение представляют условия мощного светового лазерного возбуждения, когда за время возбужденного состояния молекула успевает поглотить второй квант, так что становится возможным двухфотонное

возбуждение одной молекулы и переход ее на верхние возбужденные уровни:

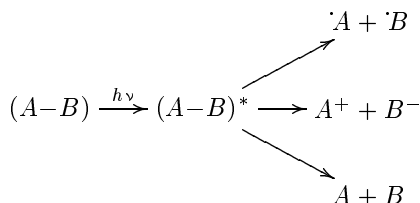


Механизмы одноквантовых фотохимических процессов весьма различны. Очевидно, что бимолекулярная фотореакция произойдет, когда второй реагент успеет достичь возбужденной молекулы до того, как она дезактивировалась.

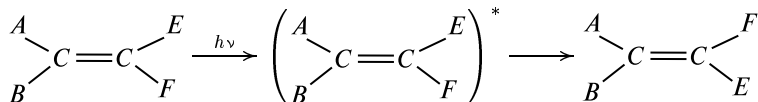
При этом должно выполняться соотношение  $1/k_{\Phi} \lesssim \tau$ , где  $\tau$  — время жизни соответствующего состояния  $S_1$  или  $T$ .

Как правило, диффузионные процессы в конденсированных средах, которыми являются биологические мембраны, не успевают обеспечить высокую частоту встреч реагентов за время жизни  $S_1$  состояния. Это затруднение, однако, несущественно для триплетного состояния. Оно также облегчается, если молекула образует комплекс со вторым реагентом в основном или возбужденном состоянии — эксиплекс. В этом случае возможна реакция присоединения, например образование димеров:  $A + h\nu \rightarrow A^* + A \rightarrow (A^* \dots A) \rightarrow A-A + h\nu_{\text{фл.}}$

Возбужденные молекулы обычно реагируют мономолекулярно, т. е. диссоциируют с образованием ионов, радикалов:



или изомеризуются (фотоперегруппировка):



Фотохимическим путем может происходить перенос протона: его присоединение  $A^* + BH \rightarrow AH^+ + B^-$  или отдача  $(AH)^* + B \rightarrow A^- + H^+B$ , а также фотоперенос электрона по типу окислительно-восстановительных реакций:  $A^* + B \rightarrow A^+ + B^-$ ;  $A^* + C \rightarrow A^- + C^+$ .

В биологических системах диффузионные процессы, как правило, ограничены по сравнению с растворами; константы скоростей обычных ферментативных процессов не превышают  $10^2$ – $10^3$  с<sup>-1</sup>. Это делает наиболее вероятным осуществление начальных стадий фотобиологических процессов по типу внутрикомплексных превращений. Иными словами, реакционный комплекс, включающий поглощающую свет молекулу-сенситизатор и молекулы других реагентов, исходно уже образован. Эта принципиальная особенность биологических систем накладывает глубокий отпечаток на механизмы трансформации и использования в них энергии электронного возбуждения. □

## § 2. Общая схема первичных процессов фотосинтеза

Сущность фотосинтеза составляет происходящее в клетках фототрофных организмов превращение световой энергии в биохимически доступную форму энергии, за счет чего в конечном итоге в клетках синтезируются органические соединения.

Уникальность фотосинтеза как физико-химического процесса связана с индуцируемым светом переносом электрона против градиента термодинамического потенциала от соединений с высоким окислительным потенциалом к соединениям с высокой восстановительной силой. Результатом этих — первичных — процессов фотосинтеза, определяющих в основном его специфику, является фотосинтетическое фосфорилирование и фотосинтетическое восстановление пиридиннуклеотидов.

Обобщенное уравнение фотосинтеза можно представить следующим образом:



где  $\text{H}_2\text{A}$  — донор электронов,  $\langle \text{CH}_2\text{O} \rangle$  — элементарное звено углевода.

Различные организмы отличаются природой донора электронов, необходимого для функционирования фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

Эволюция фотосинтеза включала переход от анаэробных бактериальных организмов, утилизирующих в качестве донора различные соединения серы, азота, простейшие органические соединения, к цианобактериям, водорослям и высшим растениям, перешедшим к использованию  $\text{H}_2\text{O}$  в качестве источника электронов



В основе первичных процессов фотосинтеза ППФ лежит сложная совокупность окислительно-восстановительных реакций переноса электрона между компонентами электрон-транспортной цепи ЭТЦ. Наибольший интерес представляют механизмы трех основных стадий трансформации энергии в ППФ: поглощение света фотосинтетическими пигментами и миграция энергии электронного возбуждения на РЦ фотосинтеза; первичное разделение зарядов и трансформация энергии в РЦ; перенос электрона по ЭТЦ и сопряженные с ним процессы, приводящие к образованию первичных стабильных продуктов (НАДФ и АТФ), используемых в дальнейших темновых реакциях фиксации  $\text{CO}_2$  и образования конечных продуктов фотосинтеза.

Рассмотрим общие особенности функционирования и организации ППФ. В фотосинтезе высших растений перенос электрона от воды (окислительно-восстановительный потенциал полувосстановления,  $E_{1/2}$ , при pH 7 равен +0,82 В) к НАДФ ( $E_{1/2} \approx -0,32$  В) осуществляется при затрате энергии двух квантов света с участием соответственно двух функционально сопряженных и работающих последовательно фотосистем (ФС II и ФС I). Схема взаимодействия фотосистем и промежуточных переносчиков в ЭТЦ фотосинтеза высших растений показана на рис. XXVII.2; там же даны соответствующие значения  $E_{1/2}$  компонентов ЭТЦ.

Некоторые общие особенности функционирования этой системы были установлены еще до расшифровки деталей ее организации.

В 30-е годы известными опытами Р. Эмерсона и В. Арнольда с прерывистым освещением было измерено количество кислорода, выделяемого клетками хлореллы

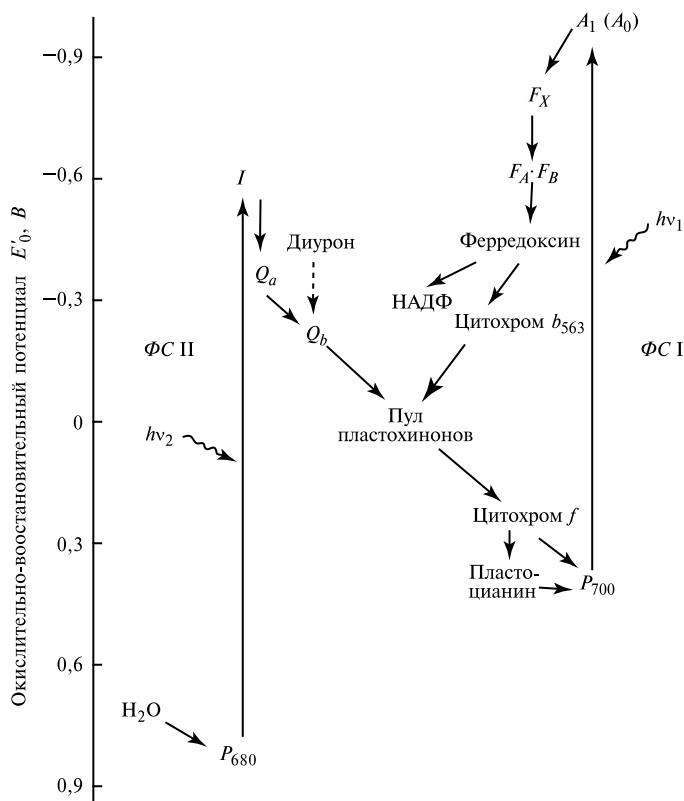


Рис. XXVII.2.

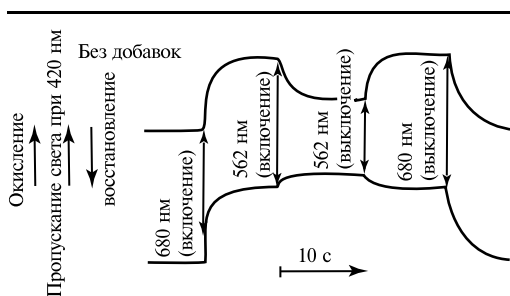
Первичные процессы фотосинтеза высших растений:

$J$  — первичный акцептор ФС II;  $A_0, A_1, F_X, F_A, F_B$  — акцепторы ФС I

В соответствии с представлениями о последовательном взаимодействии двух фотосистем (ФС I и ФС II) в так называемой Z-схеме фотосинтеза восстановленные продукты ФС II служат донорами электронов для ФС I. Возбуждение светом, который в основном поглощается ФС II, приводит к восстановлению промежуточных переносчиков, а возбуждение ФС I, наоборот, к их окислению

под действием вспышек света длительностью  $10^{-5}$  с. Величина темнового интервала ( $\sim 0,02$  с) между вспышками, необходимого для использования поглощенной световой энергии и выделения  $O_2$ , ясно указывала на участие ферментов, лимитирующих общую скорость ППФ. При относительно большом числе промежуточных стадий переноса (рис. XXVII.2) это, очевидно, свидетельствует о больших скоростях отдельных этапов транспорта электрона. Было также показано, что ферментативная

система, ответственная за выделение одной молекулы  $O_2$ , обслуживается одновременно несколькими сотнями молекул хлорофилла. Комплекс светособирающих пигментных молекул, передающих энергию на один фотоактивный центр (ФС I и ФС II), получил название фотосинтетической единицы (ФСЕ).



При добавлении диурана  $Cu^{2+}$  не восстанавливается

Рис. XXVII.3.

Окисление и восстановление цитохрома  $f$ : при действии дальнего красного  $\lambda > 680$  нм и красного  $\lambda \sim 562$  нм света, соответственно

тивно возбуждать фотосистемы: отдельно ФС I ( $\lambda > 680$  нм) и вместе ФС I+ФС II ( $\lambda < 680$  нм).

Опытами Л. Н. М. Дюйзенса (1961) на водорослях методами абсорбционной дифференциальной спектрометрии показано, что длинноволновый свет ( $\lambda > 680$  нм) вызывает окисление цитохрома  $f$  (регистрировалось по уменьшению поглощения при 420 нм). Использование коротковолнового освещения ( $\lambda \sim 562$  нм) приводило к частичному восстановлению цитохрома  $f$  (рис. XXVII.3). Ингибитор фотосинтеза ДХММ (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина), или диурон, снимал восстанавливающее действие коротковолнового света. Согласно Z-схеме (см. рис. XXVII.2), дальний красный свет окисляет цитохром, отбирая от него электроны для восстановления первичного окислителя, образуемого ФС I. Коротковолновый свет восполняет убыль электронов на цитохроме за счет восстановления его ФС II. Диурон блокирует этот процесс, что приводит к ингибированию выделения  $O_2$ . Объект можно освещать двумя последовательными вспышками света: вначале красного ( $\lambda < 680$  нм), затем дальнего красного света ( $\lambda > 680$  нм). Тогда электроны, освобожденные в ФС II в ответ на первую вспышку, достигнут через определенное время цитохрома  $f$ , который затем окислится фотосистемой ФС I под действием второй вспышки. Варьирование интервала времени между вспышками позволяет определить время, необходимое для переноса электрона на цитохром от ФС II; оно составляет  $\sim 5 \cdot 10^{-3}$  с.

Роль донора электронов для ФС I, видимо, играет пластоцианин — медь-содержащий белок ( $E_{1/2} \sim +0,37$  В). Электроны от первичных акцепторов ФС II принимают на себя пластохиноны ( $E_{1/2} \sim +0,06$  В), единственные двухэлек-

Оставалось, однако, неясным, отражает ли понятие ФСЕ реальную молекулярную организацию фотосинтетических мембран, когда каждый светособирающий пигментный комплекс обслуживает «свой» РЦ (уницентральная модель). Другая возможность состоит в том, что РЦ как бы вкраплены в светособирающую антенну, а перенос энергии возбуждения носит статистический характер и не имеет никаких топографических ограничений (мультицентриальная модель).

Пигментные системы, входящие в состав ФС I и ФС II, отличаются по своим спектральным свойствам, а хлорофилл ФС I поглощает в более длинноволновой области по сравнению с хлорофиллом ФС II. Это позволяет селек-



тронные переносчики в ЭТЦ, которые при восстановлении одновременно присоединяют протоны. Помимо цитохрома  $f$ , существуют цитохромы  $b$  (цит.  $b_6$ ,  $E_{1/2} \sim -0,03$  В), которые контактируют с ФС I и участвуют в циклическом электронном транспорте. Цитохром  $b_6$  связан с ФС II, так что на каждый РЦ приходится 1–2 молекулы этого цитохрома. Такова последовательность донорно-акцепторных актов, сопровождающих перенос электрона по ЭТЦ в хлоропластах (см. рис. XXVII.2).

Важнейшая особенность топографической организации ППФ состоит в том, что отдельные переносчики ЭТЦ в хлоропластах объединены в единые электронно-транспортные макромолекулярные комплексы, локализованные в фотосинтетических мембранах. Наибольшее значение имеют следующие из них: светособирающий пигмент-белковый комплекс (ССПБК), от которого энергия возбуждения направляется на РЦ; комплексы фотосистем ФС II (ПБК II) и ФС I (ПБК I), включающие помимо светособирающего, или антенного, хлорофилла  $a$  фотохимически активные пигменты  $P_{680}$  и  $P_{700}$  соответственно, а также непосредственные доноры и акцепторы электронов для РЦ фотосистем; цитохромный комплекс  $b_6-f$ , который состоит из пяти белковых субъединиц и включает цитохром  $f$ , два цитохрома  $b_6$ , а также железосерный белок Рiske. Цитохромный комплекс ответствен за последовательный перенос электрона между фотосистемами и циклический транспорт электронов вокруг ФС I. АТФазный сопрягающий комплекс  $CF_0 - CF_1$  был рассмотрен в гл. XXIV. □

На рис. XXVII.4 схематически показано расположение этих комплексов в фотосинтетической мембране тилакоида. Как видно, электрон на своей пути пересекает мембрану, проходя через комплекс  $b_6-f$  от ее внутренней стороны, где расположена донорная часть ФС II, на наружную сторону к акцепторному участку ФС I. Взаимодействие между макромолекулярными комплексами ФС I,  $b_6-f$  и ФС II осуществляется при посредстве подвижных переносчиков — пластоцианина Пц и пластохинона Пх, причем молекулы последнего образуют пул, содержащий не менее 10 молекул Пх на один Пц. Другой подвижный переносчик — ферредоксин — акцептирует электроны у ФС I, осуществляя связь ППФ с темновыми процессами. Своеобразное сочетание обычных диффузионных и внутрикомплексных реакций в ЭТЦ накладывает свой глубокий отпечаток на кинетику и физические механизмы переноса электрона.

Приведенная на рис. XXVII.4 схема показывает асимметричный характер поперечного расположения донорных и акцепторных компонентов ФС I и ФС II в мембране тилакоида. В последние годы стало ясно (Дж. Андерсон, Дж. Барбер), что и латеральное расположение комплексов в плоскости мембраны носит явно выраженный гетерогенный характер (рис. XXVII.5). Как видно из рисунка, пигментные системы ФС II и ФС I пространственно разобщены, что затрудняет миграцию энергии электронного возбуждения между ними.

Важным фактором, регулирующим этот процесс, становится конформационное состояние мембраны тилакоида и белковой части ССПБК, а также движения комплексов, от которых зависят расстояния между молекулами пигментов, входящих в состав ФС II и ФС I. Одновременно возрастает и роль подвижных переносчиков, обеспечивающих перенос электрона между этими комплексами.

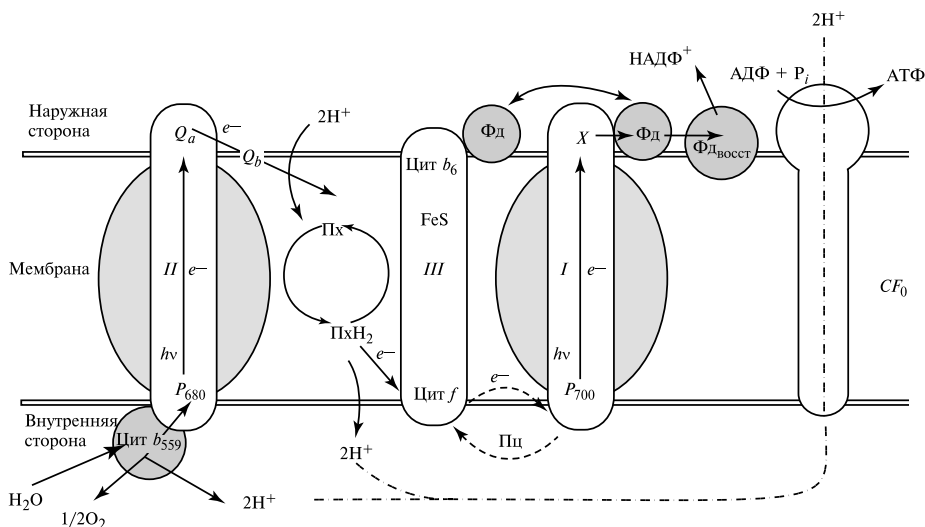


Рис. XXVII.4.

Электрон-транспортная цепь фотосинтеза и сопрягающий комплекс в мембране тилакоида:

*I* — комплекс ФС I, *II* — комплекс ФС II, *III* — цитохромный *b*<sub>6</sub>-*f*, *CF*<sub>1</sub> + *CF*<sub>0</sub> — сопрягающий комплекс, Фд — ферредоксин, Фд<sub>восст</sub> — ферредоксин-НАДФ-редуктаза; пути электронного транспорта обозначены стрелками (остальные объяснения в тексте)

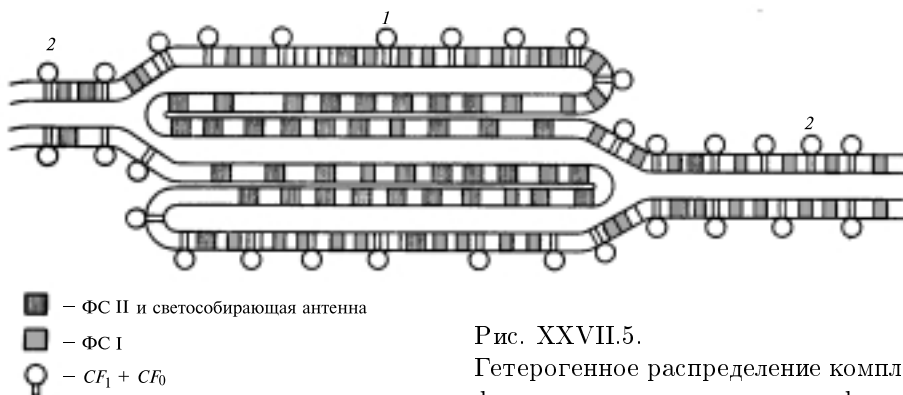


Рис. XXVII.5.

Гетерогенное распределение комплексов фотосистем и сопрягающего фактора в латеральном плане мембран: 1 — мембраны гран, 2 — мембраны стромы

Гранальная часть, включающая мембраны контактирующих тилакоидов, содержит комплексы ФС II и светособирающий пигмент-белковый комплекс (ПБК). В то же время стромальная часть тилакоида (ламеллы, соединяющие граны тилакоида) содержит в основном комплексы ФС I и только 10–20% общего количества комплексов, содержащих РЦ ФС II и светособирающего комплекса ССПКБ. Здесь же одновременно присутствуют ферредоксин-НАДФ-редуктаза и сопрягающий фактор *CF*<sub>0</sub>

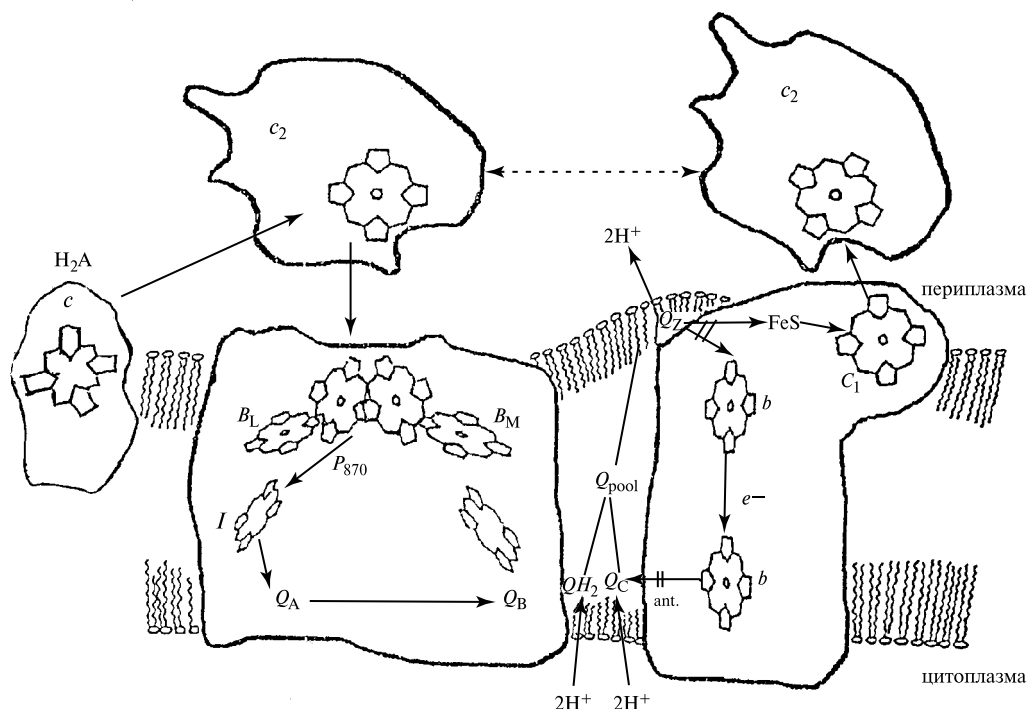


Рис. XXVII.6.

Циклический электронный транспорт и его компоненты у пурпурных бактерий.

В верхней части пространство периплазмы (показан цитохром  $c_2$ , способный диффундировать в пространство периплазмы), внизу пространство цитоплазмы, и между ними фотосинтетическая мембрана. В мембране слева показан реакционный центр с первичным донором электронов  $P_{870}$  и вспомогательные молекулы бактериохлорофилла  $B_L$ ,  $B_M$ , первичный акцептор электрона бактериофеофитин  $I$ , а также первичный и вторичный хиноны  $Q_A$  и  $Q_B$ . Справа в мембране показан убихинон-цитохром  $c$  оксидоредуктаза с двумя цитохромами  $c_1$ ,  $b$ . Точная локализация цитохрома  $c$  и белка  $Fe-S$  Риска еще не известна. Цитохром  $c$  — низкопотенциальный, обеспечивает нециклический транспорт электрона от внешнего донора  $H_2A$  через  $c_2$ . Идентифицированы четыре убихина:  $Q_A$  и  $Q_B$  в реакционном центре,  $Q_C$  и  $Q_Z$  на оксидоредуктазе. Места действия ингибиторов миксотиазола  $myx$  и антимицина  $ant$  показаны двойными стрелками.

В фотосинтезе бактериального типа источником электронов служат внешние доноры водорода (простые органические молекулы, сероводород).

Ключевым компонентом бактериальной фотосинтетической цепи являются цитохромы типа  $b$  и  $c$ . В цитохромах типа  $c$  гем ковалентно связан с белком, а в цитохромах типа  $b$  — нековалентно. На рис. XXVII.6 приведена упрощенная схема электронного транспорта в фотосинтезе бактериального типа, где формально объединены компоненты разных типов бактерий.

Впервые участие цитохромов в фотосинтезе было обнаружено в 1954 г. Л. Н. М. Дюйзенсом, который обнаружил соответствующие спектральные изменения в клетках бактерий *Rhodospirillum rubrum*, освещенных красным светом.

С тех пор было показано, что цитохромы *b* и *c* участвуют в циклическом и нециклическом фотосинтетическом электронном транспорте. У пурпурных бактерий было обнаружено два функционально и структурно отличающихся класса цитохромов *c*: водорастворимые подвижные высокопотенциальные цитохромы ( $E_{1/2} \sim +300$  мВ), структура и функции которых аналогичны митохондриальным цитохромам *c*; мультигемовые низкопотенциальные ( $E_{1/2} \sim +10$  мВ) цитохромы *c*, прочно связанные с мембраной и фотосинтетическим реакционным центром. Через них осуществляется медленный нециклический транспорт от внешнего донора для восполнения убыли электронов в циклической цепи переноса.

В ходе циклического транспорта растворимый цитохром *c* переносит электрон от убихинола:цитохром *c* оксидоредуктазы на фотоокисленный фотосинтетический реакционный центр. Можно выделить 3 стадии этого процесса: 1) диффузия вдоль внутриплазматической мембраны или в периплазматическом пространстве (на рис. XXVII.6 показана пунктирной стрелкой); 2) электростатическое связывание с реакционным центром; 3) собственно электронный перенос. В настоящее время считается, что этот перенос происходит по туннельному механизму с участием некоторых ароматических аминокислотных остатков полипептидной цепи белка реакционного центра (подробнее см. главу XXVIII).

Перенос электрона с участием мультигемового мембранно-связанного цитохрома включает в себя лишь третью стадию, поскольку цитохромная субъединица находится в устойчивом связанном состоянии в мембране.

В состав фотосинтетической цепи переноса электронов включены также цитохромы *c* третьего типа ( $c_1$ ), которые служат хромофорной группой убихинол:цитохром *c* оксидоредуктазы.

Биохимические реакции, контролируемые диффузией, характеризуются временами порядка 100 мкс и более. Собственно акт переноса электрона от связанного цитохрома на окисленный реакционный центр занимает несколько микросекунд, причем реакция может протекать не только при комнатной, но и при криогенных температурах. Исследование температурных зависимостей фотоиндуцированного окисления мембранно-связанных цитохромов позволяет исследовать физические механизмы переноса электронов в биологических системах (см. гл. XXVIII).

### § 3. Строение фотосинтетического пигментного аппарата и миграция энергии

**Структурная организация пигмент-белковых комплексов антенны.** Структурная организация светособирающих пигмент-белковых комплексов (ССПБК) определяет их функционирование в фотосинтетической мембране. Эти комплексы являются основными компонентами, обеспечивающими перенос энергии к РЦ фотосинтеза и ее перераспределение между фотосистемами.

В последние годы удалось расшифровать детали структурной организации некоторых светособирающих комплексов (ССК), а также обнаружить ряд новых ССК и высказать предположение об их функциональной роли.

В фотосинтетических мембранах основным ССПБК служит комплекс, в состав которого входят субъединицы с М.м. 28, 27 и 25 кДа. Наиболее тяжелые субъединицы формируют периферическую (внешнюю) антенну ФС II и представлены тримерами. Эти белки могут фосфорилироваться с помощью протеинки-

назы, активируемой восстановлением пластохинона, и мигрировать в стромальную область, перераспределяя энергию в пользу ФС I (см. далее). Белки с М.м. 25 кДа более прочно связаны с кор-комплексом ФС II (ПБК II) и, по-видимому, представлены мономерами. Кроме основного ССПБК существуют специфические для каждой из фотосистем антенные белки, непосредственно взаимодействующие с кор-комплексом ФС II (ПБК II) и ФС I (ПБК I). В случае ФС II это белки с М.м. 24, 26 и 29 кДа (CP24, CP26, CP29). Эти антенные комплексы связывают основную массу ССПБК с ядром (или кор-комплексом) ФС II и непосредственно передают энергию на ПБК II, а также могут участвовать в процессе нефотохимического тушения энергии возбуждения. Специфическими светособирающими комплексами, связанными с кор-комплексом ФС I, служат белки с М.м. от 20 до 25 кДа четырех типов.

Все перечисленные выше светособирающие комплексы несут в своем составе хл. *a* и хл. *b* различных соотношениях, а также каротиноиды, и являются полипептидами, кодируемыми ядерными генами.

Светособирающие комплексы отличаются своими спектральными свойствами и содержат различные пулы определенным образом организованных молекул пигментов, имеющие характерные спектральные компоненты (полосы) поглощения и флуоресценции и называемые ранее формами пигментов. В ряде случаев определенный ансамбль одинаковых молекул пигмента может иметь несколько полос поглощения, как, например, в случае кластеров с экситонным взаимодействием между молекулами.

Наиболее хорошо изученным в структурном отношении является основной ССПБК, субъединицы которого формируют тримеры, образующие внешнюю антенну ФС II. Каждый мономер представлен тремя трансмембранными  $\alpha$ -спиралями *A*, *B* и *C*, длина которых составляет 43 Å, 51 Å и 32 Å, соответственно. Центральные *A*- и *B*-спирали расположены под углами 25° и 31° относительно нормали к плоскости мембраны и слегка переплетены, а *C*-спираль — под углом 9° и локализована со стороны *B*-спирали. В составе мономера была обнаружена также короткая спираль *D*, расположенная на границе мембраны в люменальной области. В пределах трансмембранных спиралей локализованы 12 молекул хлорофилла (7 хл. *a* и 5 хл. *b*) и 2 молекулы лютеина. Все порфириновые кольца ориентированы почти перпендикулярно к плоскости мембраны и расположены на двух уровнях у наружной и внутренней поверхности тилакоидной мембраны. Расстояния между молекулами пигментов составляют 9–14 Å, что приводит к экситонным взаимодействиям между ними. В таких системах делокализация экситона происходит за  $10^{-13}$ – $10^{-14}$  с.

«Функциональное ядро» или кор-комплекс ФС II (ПБК II) включает два антенных белка с М.м. 40–45 и 45–51 кДа (CP 43 и CP 47) и комплекс РЦ ФС II ( $D_1$ – $D_2$ –цит.  $b_{559}$  комплекс РЦ ФС II). Антенные белки связывают 13–15 молекул хл. *a* и по две молекулы  $\beta$ -каротина. Пигменты здесь так же, как и в субъединице ССПБК, по-видимому, организованы в кластеры с экситонным взаимодействием между молекулами (энергия взаимодействия около  $100\text{ см}^{-1}$ , см. XIII, § 3). Если перенос энергии в пределах кластера осуществляется по экситонному механизму, то перенос энергии между кластерами на разных мономерах или между кластерами на разных тримерах во внешней антенне происходит по индуктивно-резонансному механизму Фёрстера (XIII, § 8) вследствие больших расстояний между хромофорами.

Антенные комплексы ядра ФС II контактируют с комплексом РЦ, причем СР 47 взаимодействует с ним более сильно. В последнее время получены данные о том, что кор-комплекс ФС II в фотосинтетических мембранах формирует димеры.

На рис. XXVII.7 приведена модель структурной организации ФС II. Тримеры основного светособирающего комплекса формируют периферическую и внутреннюю антенну; более плотно связанная с кором антенна образована мономерами СР 24, СР 26 и СР 29; кор-комплекс содержит комплексы СР 43, СР 47 и комплекс РЦ ФС II, в состав которого входят  $D_1$ ,  $D_2$  белки и цит.  $b_{559}$ . На рисунке обозначены также М.м. не содержащих пигментов белковых субъединиц, входящих в состав ФС II. Функции некоторых из этих субъединиц пока не выяснены.

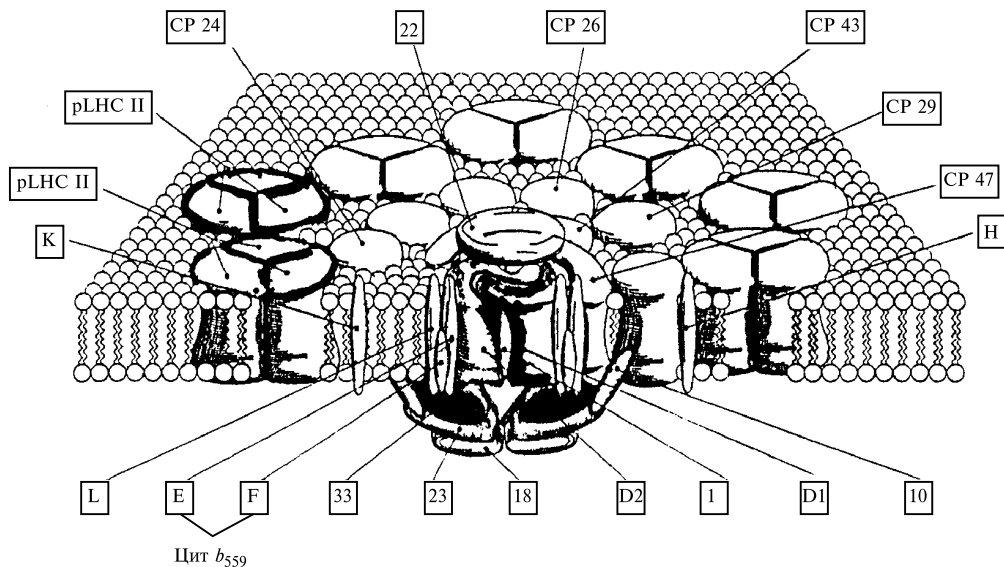


Рис. XXVII.7.

Модель структурной организации белковых компонентов ФС II (по Н.-Е. Åkerlund, 1993)

pLHC II и LHC II — внешний и внутренний основной ССПБК, образующий тримеры. Мономерные ССК: СР24, СР26, СР29. Антенные белки кор-комплекса: СР43 и СР47.  $D_1$ – $D_2$ –цит.  $b_{559}$  — белки комплекса РЦ ФС II. Показаны не содержащие пигментов белки с определенными значениями М.м. и белки — продукты соответствующих генов.

На рис. XXVII.8 представлена схема организации ФС II с учетом димерной структуры кор-комплекса. Димер окружен мономерными ССК (СР 24, СР 25, СР 26 и СР 29), которые в свою очередь контактируют с тримерами основного ССПБК.

Кор-комплекс ФС I представляет собой гетеродимер, образованный большими белковыми субъединицами с М.м. 82,5 и 83,2 кДа, в состав которых входят как компоненты РЦ ФС I, так и антенные пигменты (около 100 молекул хл.  $a$  и 12–16 молекул  $\beta$ -каротина). Антенные пигменты кор-комплекса ФС I формируют по крайней мере два кластера — коротковолновый ( $\lambda_{\text{полгл}} < 700$  нм) и длинноволновый (так

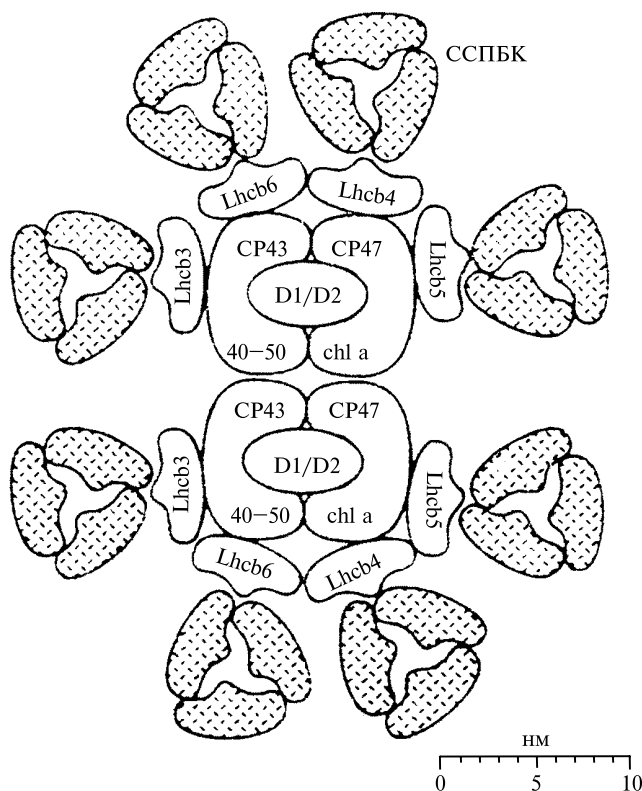


Рис. XXVII.8.

Схема организации ФС II с димерной структурой кор-комплекса (по S. Jansson, 1994)

Показан тример SSPBK и мономеры Lhcb3, Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6 (SSPBK 25, CP29, CP26 и CP24). Каждый кор-комплекс содержит антенные CP43 и CP47 и  $D_1$ - $D_2$ -цит.  $b_{559}$  комплекс РЦ ФС II.

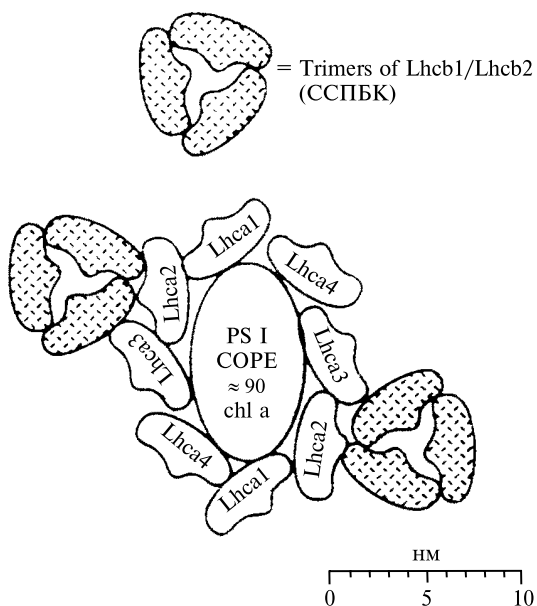


Рис. XXVII.9.

Схема организации ФС I (по S. Jansson, 1994)

Показан тример SSPBK и светособирающие мономеры Lhca1, Lhca2, Lhca3, Lhca4, которые представляют 4 разных типа ССК ФС I (LHCI' 730, LHCI' 680, LHCI'' 730, LHCI'' 680). Кор-комплекс (CORE) содержит 90-100 молекул хлорофилла *a*.

называемые «зацентрированные» формы,  $\lambda_{\text{погл}} > 700$  нм), которые участвуют в переносе энергии на РЦ ФС I.

На рис. XXVII.9 представлена схема организации ФС I. Кор-комплекс окружен мономерами светособирающих комплексов четырех типов, с которыми контактируют тримеры основного ССПКБ.

В хроматофорах пурпурных фотосинтезирующих бактерий имеется два типа антенных комплексов, связанных с мембранными белками. Они также образуют внешнюю и внутреннюю антенны. Внутренняя антенна представляет собой ансамбль светособирающих комплексов, в которые включены молекулы бактериохлорофилла, поглощающие свет при 890 нм. В некоторых видах бактерий в ССК I могут присутствовать формы Бхл 870, Бхл 875. Они окружают РЦ, образуя кор-комплекс ССК<sub>1</sub> Бхл 870–РЦ, в котором энергия возбуждения передается непосредственно фотоактивному пигменту P890.

Внешняя антенна образована светособирающими комплексами ССК<sub>2</sub> — Бхл 800–850, куда входят молекулы бактериохлорофилла, поглощающие свет при 800 и 850 нм. По данным кругового дихроизма Бхл 800 находится в мономерном состоянии, а Бхл 850 представлен формой тесно взаимодействующих молекул. Недавно была расшифрована кристаллическая структура антенного комплекса Бхл 800–850 (Macdermot, 1995). Белковый носитель ССК<sub>2</sub> — Б 800–850 состоит из трансмембранных 9 спиралей  $\alpha$ -апобелков, упакованных в цилиндр радиусом 1,8 нм. Другие 9 спиралей  $\beta$ -апобелка образуют вокруг него внешний цилиндр радиусом 3,4 нм. Между внешней и внутренней стенками этих цилиндров расположено 18 молекул Бхл 850, тесно упакованных и взаимодействующих друг с другом (рис. XXVII.10, А).

Плоскости порфириновых колец расположены перпендикулярно к плоскости мембраны. Остальные 9 мономерных отдельных молекул Бхл 800 упакованы между спиралью  $\beta$ -апобелка внешнего цилиндра с плоскостями порфириновых колец параллельно плоскости мембраны (рис. XXVII.10, Б). Молекулы каротиноидов геометрически тесно «сплетены» с фитольными хвостами Бхл.

$\alpha$ - и  $\beta$ -апобелки связаны друг с другом гидрофобными силами и водородными связями, которые образуются ароматическими остатками триптофана и тиразина.

Молекулы Бхл 850 находятся в гидрофобной среде и образуют Ван-дер-Ваальсовские связи с аминокислотами  $\alpha$ -апобелка. В противоположность этому Бхл 800 образует сильные водородные связи в полярной среде со своим окружением в  $\beta$ -апобелке.

Отметим, что молекулы каротиноидов помимо светособирающей и защитной функции выполняют роль стабилизаторов структуры пигмент-белковых комплексов фотосинтезирующих бактерий, высших растений и водорослей.

**Пути миграции энергии возбуждения.** Доставка энергии электронного возбуждения к РЦ фотосистем I и II высших растений и РЦ бактериального фотосинтеза осуществляется за счет миграции энергии в светособирающей антенне. Миграция энергии в фотосинтезе — наиболее изученный тип безизлучательного переноса энергии электронного возбуждения в биологических системах (см. § 9–11, гл. XIII). Ее функциональное биологическое значение состоит в повышении эффективности использования поглощенных световых квантов. Действительно, среднее время, необходимое для утилизации энергии кванта света (выделение молекулы O<sub>2</sub>), соста-



влетает всего 0,01–0,02 с. Время регенерации фотоактивного пигмента РЦ намного меньше этой величины ( $\leq 10^{-6}$  с). Интенсивность дневного солнечного света достигает  $10^{15}$ – $10^{16}$  квант  $\cdot$  см $^2$   $\cdot$  с $^{-1}$ . Сечение поглощения молекулы пигмента составляет  $10^{-15}$ – $10^{-16}$  см $^2$ . Следовательно, каждая отдельная молекула хлорофилла будет поглощать не более 1–10 квант  $\cdot$  с $^{-1}$ , а при обычных интенсивностях света — еще

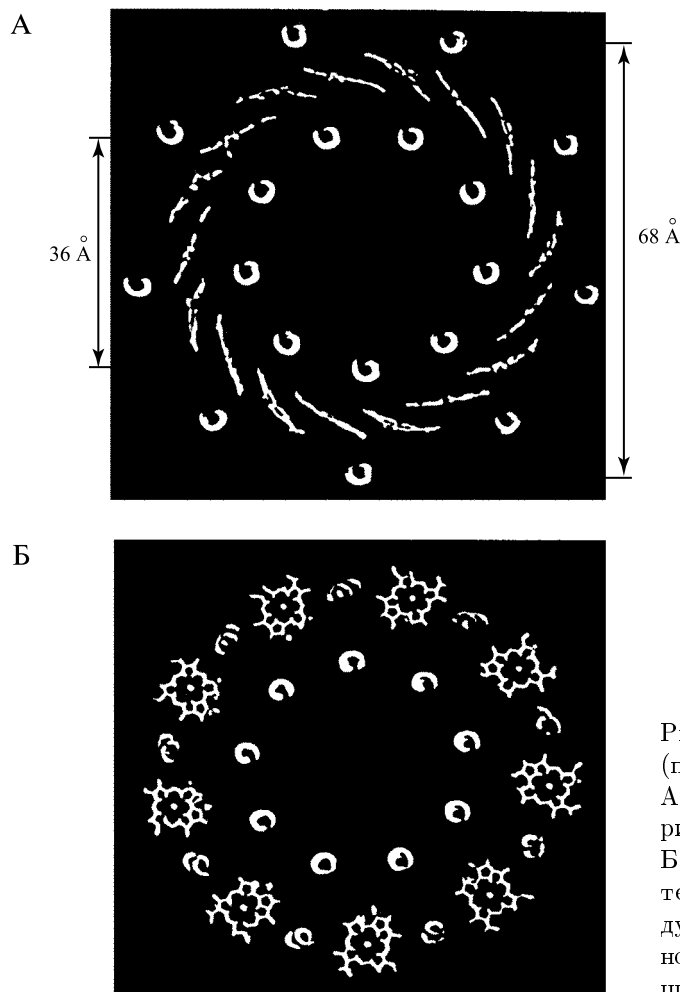


Рис. XXVII.10.

(по G. McDermont et al., 1995)

А — Кольцо молекул бактериохлорофилла *a* Б 850;Б — Положение молекул бактериохлорофилла *a* Б 800 между спиралями  $\beta$ -апопротеинов, образующих наружную цилиндрическую стенку комплекса

меньше. В этом случае РЦ, практически лишенный собственной светособирающей антенны и включающий в свой состав фотоактивный пигмент, будет значительную часть времени «простаивать». Объединение многих десятков молекул пигментов в так называемую фотосинтетическую единицу (ФСЕ), обслуживающую фотоактивный пигмент, предотвращает такого рода потери.

Эффективность и направленность миграции энергии по фотосинтетической пигментной матрице зависит как от характера локализации молекул пигмента в пределах данного пигмент-белкового комплекса (ПБК) (т. е. от расстояния между молекулами и их ориентации), так и от взаиморасположения различных ПБК в фотосинтетической мембране. Эти факторы в сочетании с различными условиями светового возбуждения могут привести к тому, что перенос энергии между разными группами пигментов будет происходить по разным физическим механизмам (см. § 9–11 гл. XIII) в пределах одной ФСЕ. Физические механизмы и пути миграции энергии связаны с особенностями молекулярной организации ПБК в фотосинтетических мембранах. Прогресс в изучении этих механизмов был достигнут на пути совершенствования препаративных методов выделения таких комплексов.

Исследования динамики переноса энергии возбуждения в наиболее изученном в структурном отношении ССПБК методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии позволили выявить различные кинетические компоненты и интерпретировать характерные времена миграции. Так, перенос энергии между соседними молекулами хлорофилла, находящимися на расстояниях около  $10 \text{ \AA}$  в субъединице, происходит в субпикосекундном диапазоне (150–300 фс). Обнаружены и другие компоненты с временами 2–6 пс и 14–36 пс, которые приписываются переносу энергии между отдельными пигментными кластерами и мономерами в тримере ССПБК, соответственно. Эти данные коррелируют с предположением об экситонном взаимодействии между молекулами в субъединице комплекса и быстрой делокализации возбуждения в пигментном кластере. Перенос энергии между мономерами в тримере или между соседними тримерами, когда расстояния между ближайшими молекулами хлорофилла превышает  $10\text{--}15 \text{ \AA}$ , требует уже единиц и десятков пикосекунд и может осуществляться по механизму Фёрстера.

Перенос энергии между ССПБК и другими ССК наружной антенны ФС II еще мало изучен вследствие недостаточной информации о структуре и свойствах таких комплексов. Имеются данные о том, что ССПБК может непосредственно передавать энергию как на субъединицу кор-комплекса CP 43, так и на CP 47.

Динамика переноса энергии в кор-комплексе ФС II непосредственно связана с процессами захвата энергии возбуждения реакционным центром ФС II (см. § 4 гл. XXVII). Было установлено, что в случае «открытых» РЦ кинетика релаксации возбужденных состояний в антенне кор-комплекса характеризуется компонентами с временами 30–60 пс и 150–250 пс, а для «закрытых» центров времена возрастают и составляют 200–250 пс и 1300 пс (по другим данным, 100 пс, 500 пс и 1500 пс). В настоящее время нет общепринятых представлений о том, с какими именно конкретными процессами переноса энергии в кор-комплексе ФС II связаны эти компоненты.

Исследование кинетики дезактивации возбужденных состояний в кор-комплексе ФС I позволило обнаружить характерные компоненты в диапазоне 20–40 пс. Впоследствии было установлено, что в течение этого времени энергия возбуждения достигает РЦ ФС I и захватывается им, а за 5–20 пс успевает перераспределиться между коротковолновым и длинноволновым антенными пулами пигментов. В литературе имеются данные о том, что время, необходимое для попадания энергии возбуждения из антенны в РЦ ФС I с последующим «захватом», составляет около 70–80 пс. В кинетике затухания флуоресценции препаратов ФС I, содержащих кор-

комплекс совместно с хл. *a*/хл. *b*-светособирающим комплексом ФС I, был обнаружен компонент с характерным временем 80–120 пс. Этот компонент, по-видимому, связан с наличием дополнительной антенны и увеличением пути миграции энергии со светособирающего на кор-комплекс ФС I.

Совокупность полученных экспериментальных данных показывает, что во всех случаях свет поглощается большой массой антенных пигментов и энергия возбуждения быстро передается на реакционные центры. Перенос энергии возбуждения между ближайшими молекулами пигментов антенны происходит за 0,2–5 пс. Процесс несколько замедляется при переносе энергии между различными ПБК, отличающимися взаиморасположением. Время между поглощением фотонов антенной и фотохимическим захватом энергии составляет для фотосистемы I и бактериальных комплексов 50–100 пс, в то время как для ФС II — около 300 пс. Такая разница во времени связана со структурной организацией фотосистем, благодаря которой ФС II обладает более «мелкой» энергетической ловушкой по сравнению с ФС I. Это означает, что первичный донор ФС II Р 680 (см. § 4, гл. XXVII) энергетически ближе к антенным компонентам, донирующим энергию непосредственно на РЦ, чем первичный донор ФС I Р 700. Расчеты показывают, что энергетический зазор между Р 680 и максимумом поглощения антенных компонентов ФС II составляет около  $0,5 kT$ , в то время как для ФС I — около  $2,5 kT$ . Кроме того, процесс захвата энергии РЦ ФС II в отличие от РЦ ФС I обратим и таким образом необходимое для такого захвата время 300 пс оказывается больше, чем время для первого попадания энергии возбуждения в РЦ ФС II и больше, чем требуется для захвата возбуждения РЦ ФС I. Это может означать, что энергия возбуждения достигает первичного донора обеих фотосистем примерно с одинаковой скоростью (за 50–100 пс).

**Перераспределение энергии возбуждения.** Известно, что при одновременном возбуждении объекта (хлорелла) коротковолновым и длинноволновым красным светом скорость фотосинтеза выше, чем суммарная скорость, складывающаяся из скоростей раздельного возбуждения двумя длинами волн (эффект Эмерсона). Отсюда следует вывод о необходимости одновременного функционирования в фотосинтезе обеих фотосистем. Очевидно, между пигментными системами ФС II и ФС I происходит непосредственное перераспределение поглощенной энергии в зависимости от интенсивности и спектрального состава освещения. Показано, что освещение дальним красным светом ФС I вызывает такое изменение фотосинтетического аппарата, при котором большая часть квантов передается в фотосистему II. Это приводит к повышению флуоресценции, выход которой у ФС II больше, чем у ФС I. Свет с меньшей длиной волны дает обратный эффект. Состояние с более высоким выходом флуоресценции, индуцированное освещением дальним красным светом, называется состоянием 1, а состояние с низким выходом флуоресценции — состоянием 2. Перераспределение квантов между двумя фотосистемами может быть обусловлено как увеличением миграции на ПБК I из ССПБК, так и перераспределением квантов, уже попавших на ФС II, и их миграцией на ФС I. Последнее явление получило название спilloвер (от англ. *spillover* — переливание через край).

Комплексы ФС I и ФС II латерально разделены в тилакоидной мембране вследствие разной плотности их поверхностных зарядов. Большая плотность поверхностного заряда в комплексе ФС I обуславливает выталкивание их в стромальную часть из области контакта тилакоидов, которая имеет малую плотность поверхностных

зарядов. Слипание соседних мембран тилакоидов в граны за счет ван-дер-Ваальсовых сил притяжения гидрофобных участков происходит в присутствии менее заряженных комплексов ФС II и ССПБК. Изменение зарядового состояния комплексов ФС I, ФС II и ССПБК влияет на их взаимное расположение вследствие электростатических взаимодействий и тем самым может оказывать регуляторное воздействие на распределение энергии между ними. На этом и основан механизм «спилловера».

Он носит сложный характер и в основном связан с конформационным состоянием фотосинтетических мембран, от которого зависят как взаимные расстояния и ориентации пигментных комплексов ФС I и ФС II, так и их связь с ССПБК. В свою очередь, это определяется присутствием ионов, pH среды и в особенности степенью фосфорилирования белков светособирающего ПБК. Фосфорилирование белков ССПБК приводит к увеличению миграции энергии к ФС I, т.е. переводит систему в состояние 2. Аналогичные результаты получают и при инкубации мембран тилакоидов с АТФ на свету. При низкой концентрации катионов ( $Mg^{2+}$ ) обеспечивается максимальный перенос энергии от ФС II к ФС I. В то же время высокая концентрация  $Mg^{2+}$  снижает эффективность спилловера. Если мембранные белки тилакоидов фосфорилированы и в среде отсутствуют ионы Mg, то 75% общего числа поглощенных квантов направляется к ФС I. Переходы  $1 \rightleftharpoons 2$  сопровождаются структурными изменениями в мембранах, в частности, уменьшением степени слипания мембран тилакоидов в состоянии 2.

Основной причиной конформационных изменений в мембранах тилакоидов и перераспределения энергии возбуждения между ФС II и ФС I является изменение заряда ССПБК. Даже в отсутствие фосфорилирования светособирающего комплекса, но при низкой концентрации положительных ионов, отрицательные заряды, находящиеся на поверхности мембранных белков, создают высокий поверхностный электрический потенциал на тилакоидных мембранах и препятствуют слипанию тилакоидов. В этих условиях ФС I и ССПБК равномерно распределены в плоскости мембраны, благодаря чему возможна эффективная миграция энергии от ФС II к ФС I. Фосфорилирование ССПБК приводит к появлению на нем дополнительного отрицательного заряда, что вызывает переход ССПБК в стромальный участок мембраны и возрастание переноса энергии от него к ФС I. Фосфорилирование ССПБК осуществляется с помощью протеинкиназы, находящейся в гранальных участках мембраны. Добавление в среду 100 мМ одновалентных катионов или 1 мМ двухвалентных катионов частично экранирует отрицательные заряды белка, препятствуя выталкиванию ССПБК в строму, и снижает эффективность «спилловера». Обратная реакция дефосфорилирования ССПБК, оказавшегося в стромальной части вблизи ФС I, осуществляется другим ферментом — протеинфосфатазой, которая находится в стромальном участке мембраны.

Протеинфосфатаза, которая дефосфорилирует ССПБК, вызывает тем самым возвращение его в гранальную мембрану. Протеинкиназа активируется при восстановлении пластохинона, переносящего электроны между ФС I и ФС II, и переходит в неактивное состояние при его окислении. Активность протеинфосфатазы сохраняется постоянной. Таким образом, пластохинон служит «датчиком» для сохранения баланса энергии возбуждения между фотосистемами. Избыточное возбуждение

ФС II вызывает перевосстановление пластохинона и активацию протеинкиназы. Тогда при фосфорилировании переход части ССПБК из гран в стромальные мембраны уменьшает поток возбуждений в ФС II и увеличивает его в ФС I. В результате выравниваются скорости возбуждения ФС I и ФС II, а степень восстановления пластохинона опять уменьшается. Напротив, избыточное окисление пластохинона при преимущественном возбуждении ФС I вызывает инактивацию протеинкиназы и возвращение ССПБК в граны вследствие дефосфорилирования его протеинфосфатазой. □

Перераспределение энергии между фотосистемами отражает большую роль факторов физиолого-биохимической регуляции в тилакоидной мембране, которые имеют важное значение наряду с обычными физическими факторами, определяющими миграцию энергии (см. § 9–10 гл. XIII). Значение этой регуляции заключается в возможности изменять соотношение между нециклическим и циклическим электронными потоками, преимущественно ускоряя последний при фосфорилировании ССПБК. Было установлено также, что в хлоропластах присутствуют два типа ФС II, которые различаются по местам локализации и размерам их антенных комплексов: ФС II<sub>α</sub> и ФС II<sub>β</sub>. Из них ФС II<sub>α</sub> обладает большой антенной и поэтому насыщается при более высокой интенсивности света, проявляя и более высокую фотосинтетическую активность. ФС II<sub>β</sub> соответственно обладает меньшей антенной и раньше насыщается при увеличении интенсивности света.

Локализация большей части ФС II (ФС II<sub>α</sub>) в гранальной области обеспечивает основной нециклический поток электронов, восстанавливающий молекулы пластохинона, которые затем диффундируют в стромальную область, отдавая электроны ФС I. Меньшая часть ФС II (ФС II<sub>β</sub>), обладающая и меньшей частью ССПБК II в стромальной области, обеспечивает более слабый поток, взаимодействующий с интенсивным циклическим потоком ФС I — источником энергии для синтеза АТФ.

Итак, характер расположения и взаимодействия главных макромолекулярных комплексов меняется в зависимости от конформационного состояния тилакоидной мембраны. Организация фотосинтетической единицы (см. § 2 гл. XXVII), видимо, также тесно связана с состоянием мембран тилакоидов, которое определяет степень обособленности отдельных частей ССПБК и контактирующих с ними РЦ фотосистем. В зависимости от степени слипания отдельных участков мембраны возможны и различные переходы от уницентральной до мультицентральной организации ФСЕ. Такие факторы, как температура, ионный состав, рН среды, состояние липидной фазы, определяют архитектуру и вязкость мембран, а следовательно и латеральную подвижность комплексов. С этой точки зрения ясно, что приведенная на рис. XXVII.2 Z-схема фотосинтеза отражает основную направленность процессов переноса электрона. В пределах этой схемы скорости и соотношения между потоками электронов на отдельных участках цепи меняются в зависимости от физиолого-биохимического состояния клеток фотосинтезирующего организма. □

#### § 4. Механизмы миграции энергии в фотосинтетической мембране

**Захват энергии возбуждения в РЦ.** Первичная трансформация энергии в фотосинтезе осуществляется, когда энергия электронного возбуждения, мигрируя по светособирающей матрице, захватывается фотоактивным пигментом реакционного

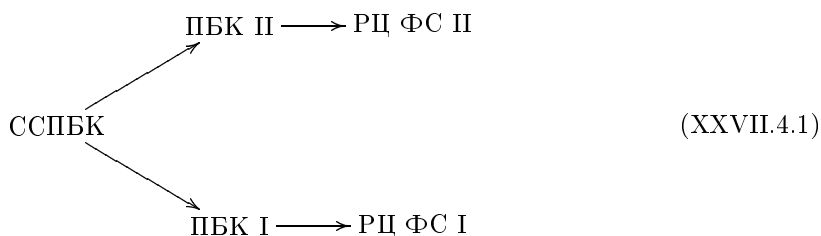
центра. Первые измерения длительности и выхода флуоресценции (см. § 2 гл. X) пигментов (хлорофилл, бактериохлорофилл) в растворе ( $\tau$  и  $B$ ) и в клетках фотосинтезирующих организмов ( $\tau_1$  и  $B_1$ ) показали (С. Броди, А. Н. Теренин), что эти величины составляют:  $\tau \simeq 5$  нс,  $B \simeq 0,3$ ,  $\tau_1 \simeq 0,3$  нс,  $B_1 \simeq 0,02$ .

Квантовый выход первичных процессов фотосинтеза достаточно высок. Поэтому указанное сокращение длительности и выхода флуоресценции пигментов в живых системах должно быть главным образом обусловлено не тепловыми потерями, а процессом «фотохимической» дезактивации синглетного возбуждения состояния  $S_1$  в реакционных центрах фотосинтеза. Независимо от механизма этого процесса РЦ следует рассматривать как естественные фотохимические тушители флуоресценции молекул пигментов светособирающей матрицы. Можно оценить эффективность этого тушения, считая, что в фотосинтетической мембране значения констант  $p$ ,  $q$ ,  $r$  (см. § 1 гл. XXVII) сохраняются неизменными, а процесс тушения флуоресценции при захвате энергии реакционными центрами эквивалентен фотохимической дезактивации  $k_f$  состояния  $S_1$  молекул антенны. Тогда, подставляя величины  $\tau$ ,  $B$ ,  $\tau_1$ ,  $B_1$  в формулы (XXVII.1.1)–(XXVII.1.9), найдем, что эффективность использования возбуждения реакционными центрами составляет  $\Phi \simeq 0,93 \div 0,95$  (Борисов А. Ю.).

Сами РЦ обладают высокой фотохимической активностью, величина квантовой эффективности первичного фотохимического процесса в них близка к единице. Отсюда и из (XXVII.1.9) следует, что в самом РЦ длительность возбужденного состояния молекулы фотоактивного пигмента, в течение которого должен произойти первичный акт фотосинтеза, не превышает  $\tau_1 \simeq 10^{-11}$  с.

Таким образом, после поглощения света в фотосинтетической мембране на первом этапе происходит миграция энергии электронного возбуждения по светособирающей матрице и захват ее реакционными центрами за времена порядка 0,2–0,3 нс. На втором этапе уже непосредственно в реакционных центрах энергия электронного возбуждения используется в первичном фотохимическом акте за время  $\sim 10^{-11}$  с.  $\square$

Какие факторы влияют на длительность и выход флуоресценции пигментов в фотосинтетической мембране? Организация фотосинтетической мембраны носит явно выраженный гетерогенный характер, где группы пигментов объединены в соответствующие ПБК. Отдельные ПБК, передающие энергию возбуждения по общей схеме



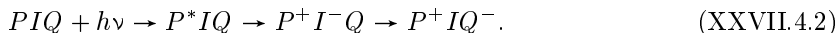
могут характеризоваться и различными временами жизни флуоресценции в зависимости от характера их взаимодействия и расстояния между белковыми носителями и фиксированными на них молекулами пигментов. Соответственно могут различаться механизмы миграции энергии между молекулами пигментов в случае

переноса между разными ПБК или при миграции в пределах одного и того же ПБК. Эти особенности должны проявляться в наличии нескольких компонентов затухания флуоресценции разных групп пигментов, передающих друг другу энергию и отличающихся по спектральному составу флуоресценции. Можно ожидать также и проявления зависимости длительности флуоресценции от температуры, например, при миграции энергии по механизму некогерентного экситона, которая носит активационный характер (см. § 11 гл. XIII).

Длительность флуоресценции групп ПБК, обслуживающих непосредственно реакционные центры, должна также зависеть и от эффективности самого процесса захвата энергии возбуждения в РЦ, т. е. от процесса «фотосинтетического» тушения флуоресценции. Последнее обстоятельство определяется не только взаимодействием между РЦ и принадлежащим ему ПБК, но и состоянием самого РЦ. Очевидно, активные РЦ, эффективно трансформирующие энергию электронного возбуждения, дают начало электронному потоку в ЭТЦ фотосинтеза и одновременно являются активными тушителями флуоресценции ПБК. Наоборот, РЦ, которые по каким-либо причинам не могут передавать электроны в цепь фотосинтеза, не в состоянии утилизировать энергию электронного возбуждения, которая, следовательно, остается в ПБК неиспользованной и может высвечиваться в виде флуоресценции с большим временем жизни. □

Указанные выше закономерности относятся не только к длительности, но и выходу флуоресценции, величины которых связаны между собой соотношением (XXVII.1.4). Однако экспериментальное определение длительности флуоресценции имеет определенные преимущества, так как оно дает непосредственную информацию о кинетике процессов дезактивации электронных возбужденных состояний [см. (X.2.9)]. В то же время определение выхода флуоресценции сопряжено с необходимостью учитывать энергию, поглощенную именно данной группой пигментов, что весьма затруднительно в гетерогенной фотосинтетической мембране.

**Фотосинтетические реакционные центры.** Основной принцип работы РЦ состоит в том, что возбуждение фотоактивного пигмента приводит к отрыву от него электрона и восстановлению первичного акцептора, который затем передает электрон следующему акцептору и далее в ЭТЦ. Общая схема работы РЦ имеет вид



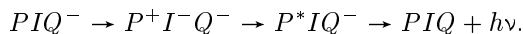
□

Последующее восстановление  $P^+$  происходит от доноров электрона в ЭТЦ в соответствии с рис. XXVII.2 и XXVII.6. В схеме (XXVII.4.2) символом  $PIQ$  обозначены компоненты РЦ:  $P$  — фотоактивный пигмент,  $I$  — первичный акцептор,  $Q$  — следующий за ним акцептор. Роль  $I$  в РЦ выполняют порфириновые молекулы пигментов (хлорофилл в РЦ ФС I, феофитин в РЦ ФС II, бактериофеофитин в РЦ пурпурных бактерий). В качестве вторичного акцептора выступают молекулы хинона (РЦ пурпурных бактерий), пластохинона (РЦ ФС II) или железосерные белки (РЦ ФС I). Эффективность отрыва электрона от  $P^*$  и перенос его на  $I$  и далее на  $Q$  зависят от состояния компонентов РЦ. Так, если  $I$  исходно восстановить в темноте, например за счет создания достаточно низкого окислительно-восстановительного

потенциала  $E_h$  в среде, то на свету отрыв электрона от  $P$  уже не может произойти. Точно так же химическое окисление фотоактивного пигмента отнимает у него электрон и тем самым мешает его способности отдавать электрон на свету первичному акцептору  $I$ . Реакционные центры, находящиеся в активном состоянии  $PIQ$ , где перенос электрона от  $P^*$  совершается нормально, называются открытыми центрами. РЦ не может отдавать электроны в фотосинтетическую ЭТЦ, если он находится в закрытом состоянии ( $P^+I^-Q$ ,  $P^+IQ^-$ ,  $P^+IQ$ ,  $PIQ^-$  или  $PI^-Q$ ).

Очевидно, в тех закрытых состояниях, где  $P$  исходно окислен в темноте ( $P^+$ ), в ЭТЦ отсутствует первичный донор электрона. В случае, когда в темноте исходно восстановлены переносчики в акцепторной части, вакантные места для переноса электрона заняты и  $P^*$  также не может дать начало электронному потоку. Очевидно, в этих условиях возрастает выход  $\beta$  и длительность  $\tau$  флуоресценции хлорофилла, энергия электронного возбуждения которого не может использоваться в первичных процессах фотосинтеза. Однако значения  $\tau$  и  $\beta$  при закрытых РЦ не достигают величин, характерных для разбавленных растворов пигментов, где отсутствует фотосинтез. Дело в том, что ион-радикал  $P^+$ , образованный в окисленных РЦ, обладает собственным спектром поглощения, который частично перекрывается со спектром флуоресценции пигментов ПБК. В результате этого происходит миграция энергии возбуждения от молекул ПБК на  $P^+$  или диссипация в тепло на  $P^+$ . В РЦ в состоянии  $PIQ^-$  появление отрицательного заряда на  $Q^-$  препятствует первичному разделению зарядов и появлению электрона на  $I$  ( $PIQ^- \rightarrow P^+I^-Q^-$ ) в силу электростатического отталкивания.

Поэтому восстановление  $Q$  уменьшает тушение флуоресценции антенны реакционными центрами и увеличивает ее выход и длительность. Кроме того, электроны, даже появившиеся в этих условиях на  $I$ , не в состоянии переходить дальше на  $Q^-$  и возвращаются назад на  $P^+$ , давая начало замедленному рекомбинационному свечению РЦ:



**Длительность флуоресценции пигментов.** Значения длительности флуоресценции пигментов в клетке были впервые получены методом фазовой флуорометрии. Метод основан на измерениях сдвига фазы между синусоидально модулированным возбуждающим световым потоком и возникающим под его действием потоком флуоресценции в образце. Сдвиг фазы появляется вследствие задержки поглощенных квантов перед высвечиванием их флуоресцирующими молекулами. Метод дает хорошие результаты, когда в системе имеется лишь один вид молекул с одним общим средним временем экспоненциального затухания флуоресценции. В случае нескольких компонентов флуоресценции, количество, времена и законы затухания которых заранее не известны, возможности метода фазовой флуорометрии становятся ограниченными.

В последние годы благодаря развитию лазерной техники и, в частности, получению пикосекундных ( $10^{-12}$  с) и субпикосекундных ( $\sim 10^{-13}$  с) световых импульсов, появились методы импульсной пикосекундной спектрофлуорометрии. Флуоресценция образца здесь возбуждается импульсом света, длительность которого намного меньше времени жизни флуоресцентного состояния исследуемых молекул. Кинетика затухания флуоресценции регистрируется при разных длинах волн в спектре испус-



кания, а также при различных длинах волн возбуждающего лазерного импульса. В результате исследований (1975–1982) удалось доказать, что кинетика затухания флуоресценции включает несколько компонентов с различными временами жизни и спектральным составом, которые соответствуют гетерогенному характеру организации пигментного аппарата и характеризуют свечение его отдельных частей.

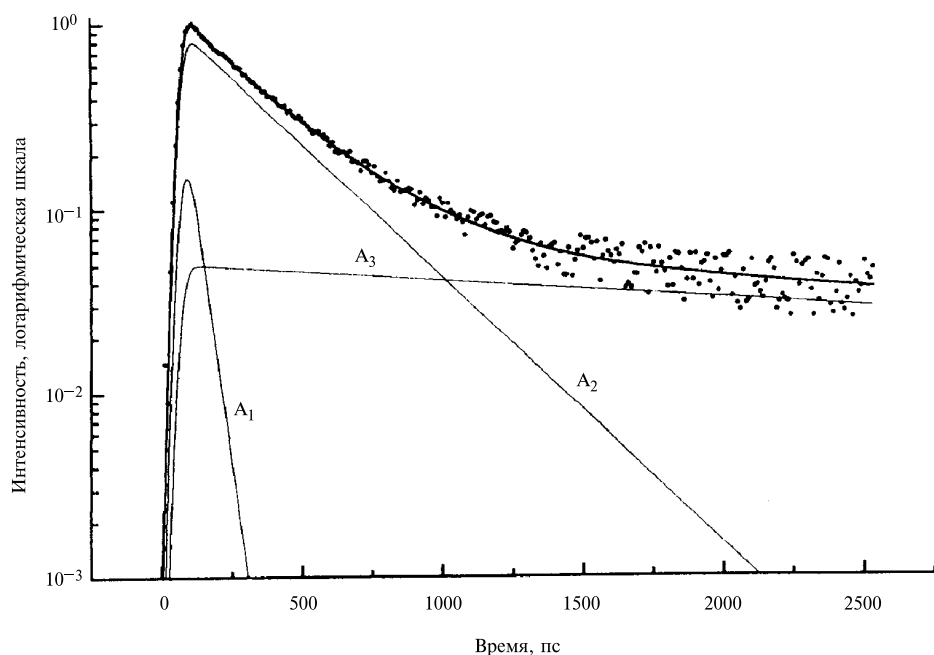


Рис. XXVII.11.

Кинетика затухания флуоресценции хлоропластов гороха

● — экспериментальные точки; — — модельная кривая, приближающая кинетику флуоресценции по методу наименьших нелинейных квадратов Марквардта согласно выражению:

$$\Phi(t) = \int_{-\infty}^{\infty} K(t-t') (A_1 \exp(-t'/\tau_1) + A_2 \exp(-t'/\tau_2) + A_3 \exp(-t'/\tau_3)) dt',$$

где  $K(t)$  — аппаратная функция системы регистрации. Для параметров  $A_1, \tau_1, A_2, \tau_2, A_3, \tau_3$  были получены следующие значения:  $A_1 = 0,15, \tau_1 = 41$  пс;  $A_2 = 0,8, \tau_2 = 310$  пс;  $A_3 = 0,05, \tau_3 = 4,6$  нс. Предэкспоненциальные коэффициенты  $A_1, A_2, A_3$  пропорциональны вкладу соответствующего компонента в кинетику затухания флуоресценции (аппроксимирующая кривая и компоненты показаны на рисунке сплошными линиями).

Как правило, при комнатной температуре обнаруживаются несколько компонент свечения с временами жизни, варьирующими в широких пределах в зависимости от состояния и природы объекта.

На рис. XXVII.11 приведена в качестве примера запись кинетики затухания флуоресценции хлоропластов, содержащая три компонента с временами  $\tau_1 \simeq 40$  пс,

$\tau_2 \simeq 300$  пс,  $\tau_3 \simeq 4500$  пс. В других опытах значения  $\tau$  компонентов затухания составляли 100, 400 и 1100 или 180, 500, 1400 пс. В настоящее время существует общепринятое представление о том, что кинетику затухания флуоресценции в интактных системах (хлоропласты высших растений, целые клетки зеленых водорослей) присутствуют по крайней мере три компонента  $\tau_1 = 80 \div 300$  пс,  $\tau_2 = 400 \div 1500$  пс и  $\tau_3 = 1500 \div 4000$  пс.

Природа долгоживущих компонент флуоресценции довольно сложна. Во-первых, молекулы хлорофилла, по тем или иным причинам не связанные с ФСЕ, обладают флуоресценцией с временем жизни  $\tau_3$ , близким к  $\tau$  флуоресценции растворов пигментов (5 нс). Во-вторых, попадание энергии возбуждения в закрытый реакционный центр  $PIQ^-$  вызывает восстановление первичного акцептора и переход РЦ в состояние  $P^+I^-Q^-$ . Поскольку дальнейший перенос электрона от  $I^-$  на  $Q^-$  невозможен, будет происходить рекомбинация зарядов между  $P^+$  и  $I^-$  с переводом  $P$  в возбужденное состояние  $P^*$ . Возникающая замедленная флуоресценция с  $S_1$ -уровня характеризуется увеличенным временем жизни, соответствующим времени рекомбинации разделенных зарядов в РЦ в состоянии  $P^+I^-Q^-$  (Климов).

Остается однако открытым вопрос, насколько велик вклад этого рекомбинационного свечения в общий выход флуоресценции при закрытых центрах. Поскольку квантовый выход разделения зарядов в состоянии  $PIQ^-$  мал из-за электростатического отталкивания электронов на  $I^-$  и  $Q_A^-$ , возможен также обратный перенос энергии от  $P^*$  в антенну с испусканием флуоресценции. В целом считается, что затухание флуоресценции антенны ФС I характеризуется временем  $\tau \sim 100$  пс, а для ФС II это составляет  $\tau \sim 300$  пс. Обнаруживаемая короткоживущая компонента  $\tau \sim 10$  пс отражает процесс миграции экситона в пределах одного пигмент-белкового комплекса.

Выделение препаратов ПБК в нативном состоянии делает возможным непосредственное измерение величин  $\tau$  и соответствующих констант миграции энергии. Выделенные в чистом виде препараты ССПБК с основным максимумом низкотемпературной флуоресценции при 680–681 нм, не содержащие ФС I и ФС II, характеризуются значением  $\tau_{LH} \approx 2,5$  нс, которое близко к значению  $\tau$  для разбавленных растворов пигментов. Следовательно можно полагать, что сокращение  $\tau$  флуоресценции пигментов в фотосинтезирующих организмах до 0,3 нс вызвано фотохимической дезактивацией в РЦ, а не бесполезным для фотосинтеза концентрационным тушением флуоресценции с переводом энергии в теплоту. Для выделенных частиц ФС II, включающих ССПБК + ПБК II РЦ ФС II, значения  $\tau_{\text{ФС II}}$  составляли 450 пс, что отражает миграцию энергии от ССПБК на ФС II. Для целых хлоропластов (ССПБК + ПБК II РЦ ФС II + ПБК I РЦ ФС I) величина  $\tau$  была еще меньше ( $\tau_{\text{ФС II}+\text{ФС I}} \simeq 350$  пс вследствие одновременного тушения флуоресценции ССПБК обоими типами тушащих центров ФС II и ФС I. Легко показать, что

$$1/\tau_{\text{ФС II}} - 1/\tau_{\text{ПБК}} = k_{\text{м}}^{\text{II}}; \quad 1/\tau_{\text{ФС II}+\text{ФС I}} - 1/\tau_{\text{ПБК}} - k_{\text{м}}^{\text{II}} = k_{\text{м}}^{\text{I}}, \quad (\text{XXVII.4.3})$$

где  $k_{\text{м}}^{\text{I}}$  и  $k_{\text{м}}^{\text{II}}$  — константы скорости миграции энергии от ССПБК на ПБК ФС I и ПБК ФС II соответственно. Оценки по формуле (XXVII.4.3) показывают, что для хлоропластов с активными РЦ  $k_{\text{м}}^{\text{II}}$  и  $k_{\text{м}}^{\text{I}}$  составляют величины порядка  $(1 \div 2) \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$ . Такие же значения  $k_{\text{м}}^{\text{I}}$  получены на хлоропластах из мутантов гороха,

лишенных РЦ ФС II, где  $\tau_{\text{ПБК}+\text{ФС I}}$  также меньше  $\tau_{\text{ПБК}}$  (1,3 и 2,5–3 нс, соответственно).

Для выяснения роли отдельных пулов Хла в флуоресценции ФС I регистрацию  $\tau$  проводили при разных длинах волн свечения. При измерении температурной зависимости значений  $\tau$  для препаратов ПБК I, обогащенных РЦ ФС I с отношением  $P_{700} : \text{Хл} \simeq 1 : 100$ , значения  $\tau$  при комнатной температуре и 77 К составляют  $< 30$  пс для  $\lambda = 694$  нм, что соответствует скорости переноса возбуждения от  $\text{Хл} a_{690}^{694}$  на РЦ ФС I с константой  $k_{\text{мПБК I}} \simeq 3 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$ . При понижении температуры значения  $\tau$  и  $k_{\text{мПБК I}}^{\text{ФС I}}$  константы скорости захвата возбуждения РЦ ФС I от  $\text{Хл} a_{690}^{694}$  практически не менялись, однако они увеличивались до 60 пс при химическом окислении РЦ. Из величин  $\tau_{694}$  и  $k_{\text{мПБК I}}$  можно оценить константу скорости разделения зарядов в РЦ ФС I:

$$\text{Хл} a_{690}^{694} \xrightleftharpoons[k_{\text{мПБК I}}^{\text{ФС I}}]{k_{\text{обр}}} P_{700} I Q \xrightarrow{k_e^I} P_{700}^+ I^- Q^-.$$

Здесь  $k_{\text{обр}} = k_{\text{мПБК I}}^{\text{ФС I}} \exp(\Delta E/k_B T)$ , где  $\Delta E$  — энергия активации обратного переноса от  $P_{700}$  на  $\text{Хл} a_{690}^{694}$ , соответствующая разности максимумов поглощения  $P_{700}$  и  $\text{Хл} a_{690}^{694}$  и равная  $\sim 0,03$  эВ. Отсюда  $k_{\text{обр}} \simeq 0,6 k_{\text{мПБК I}}^{\text{ФС I}}$ . Учитывая, что квантовый выход разделения зарядов в РЦ ФС I близок к единице, можно оценить  $k_e^I \simeq 10 k_{\text{обр}} = 10 \cdot 0,6 \cdot 3 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1} = 1,8 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$ , т. е.  $\tau_{\text{РЦ I}}^{\text{ФС I}} \simeq 5,6$  пс.

В других работах на частицах ФС I, где отношение  $\text{Хл} a : P_{700} \simeq 8 \div 10$ , были найдены более короткие компоненты затухания флуоресценции в области 680 нм ( $\tau \sim 70$  пс) и 694 нм ( $\tau \simeq 10$  пс). Эти времена соответствуют переносу энергии от  $\text{Хл} a_{676}^{680}$  на  $\text{Хл} a_{694}^{694}$  (70 пс) и далее от  $\text{Хл} a_{694}^{694}$  на  $P_{700}$  ФС I ( $\simeq 10$  пс).

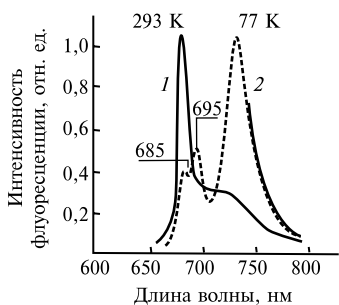


Рис. XXVII.12.

Спектры флуоресценции хлоропластов при комнатной (1) и низкой (2) температурах

По оси ординат — относительная интенсивность флуоресценции

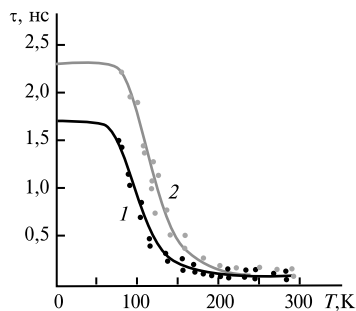


Рис. XXVII.13.

Температурная зависимость  $\tau$  флуоресценции при 720 нм (1) и 732 нм (2) (по В. З. Пашенко, А. Б. Рубину, 1981)

Какова роль длинноволновых «зацётровых» пигментных пулов (или форм)  $\text{Хл} a_{702}^{720}$  и  $\text{Хл} a_{712}^{740}$  в переносе энергии, дающих основной вклад в низкотемпературную длинноволновую полосу флуоресценции хлоропластов (рис. XXVII.12)? С понижением температуры свечение при 735 нм характеризуется увеличением  $\tau$  до значений

2,0–2,5 нс при 77 К. Возможно, что увеличение происходит в основном за счет долгоживущего компонента флуоресценции, вклад которого возрастает при понижении температуры.

Температурная зависимость  $\tau$  флуоресценции при 720 и 732 нм приведена на рис. XXVII.13. Роль этих «зацентрированных» форм ( $\text{Хл } a_{702}^{720}$  и  $\text{Хл } a_{712}^{740}$ ), видимо, состоит в передаче возбуждения на РЦ ФС I с энергией активации переноса  $\sim 0,05 \div 0,07$  эВ. При температуре ниже 180 К обнаруживается разгорание флуоресценции длинноволновых полос ( $\tau_{\text{разг}} \simeq 50 \div 150$  пс), которое отражает перенос энергии возбуждения от ПБК I на зацентрированные формы. На основании приведенных выше данных

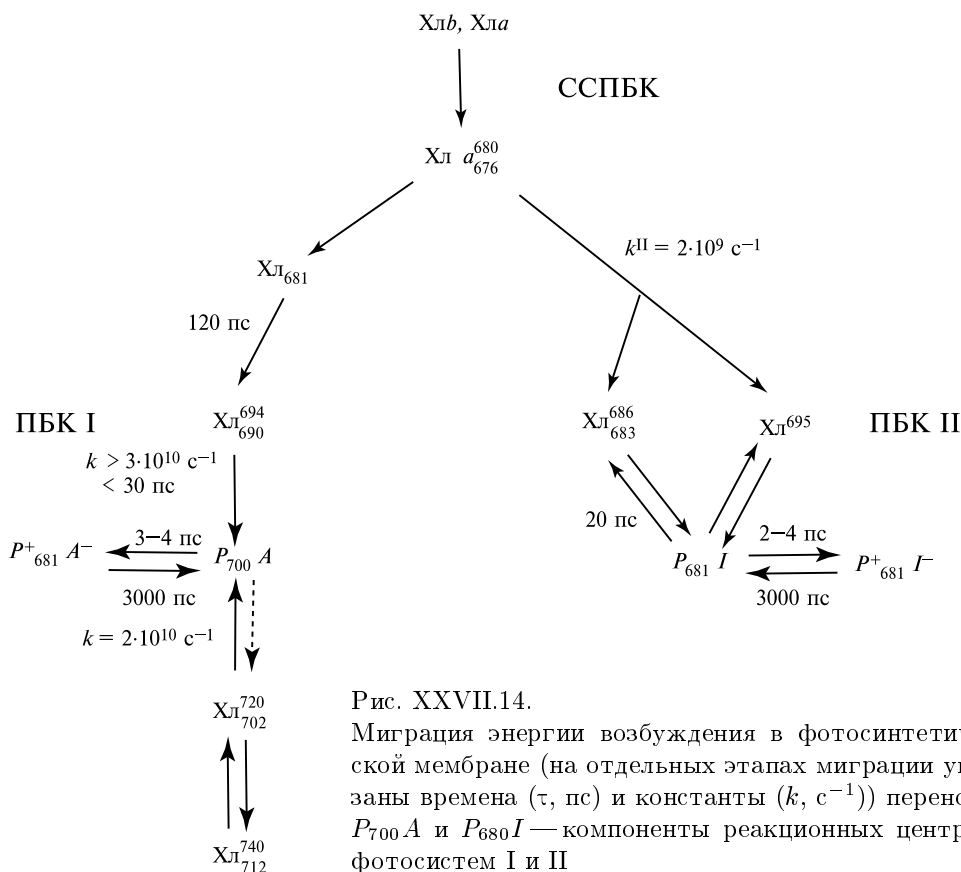


Рис. XXVII.14.

Миграция энергии возбуждения в фотосинтетической мембране (на отдельных этапах миграции указаны времена ( $\tau$ , пс) и константы ( $k$ ,  $\text{c}^{-1}$ )) переноса  $P_{700}A$  и  $P_{680}I$  — компоненты реакционных центров фотосистем I и II

можно составить общую схему миграции энергии без учета всех типов ССК внешней антенны, где указаны времена отдельных стадий переноса электронного возбуждения по пигментному аппарату в фотосинтетической мембране высших растений (рис. XXVII.14). При поглощении света энергия возбуждения, попадающая в ССПБК, направляется двумя потоками к ПБК I и ПБК II.

Как видно из значений констант переноса, миграция энергии между ССПБК и кор-комплексами обеих фотосистем осуществляется по механизму индуктивного резонанса (см. § 9 гл. XIII). В пределах пигментных кластеров ПБК миграция энергии происходит по экситонному типу.

**Флуоресценция пигментов и захват возбуждения в РЦ.** Времена жизни и кинетика затухания флуоресценции дают важную информацию о функционировании фотосинтетического аппарата и, в частности, о тушении флуоресценции антенны реакционными центрами.

Прежде всего необходимо еще раз подчеркнуть, что сокращение длительности и выхода флуоресценции пигментов в фотосинтетической мембране происходит в результате захвата энергии электронного возбуждения антенны в реакционных центрах. Измерение времени затухания флуоресценции выделенных светособирающих комплексов или в мутантах, лишенных РЦ, дало значения  $\tau$ , в общем близкие к значениям, характерным для разбавленных растворов пигментов. Это справедливо как для высших растений ( $\tau \sim 2,5$ –4 нс), так и для фотосинтезирующих бактерий ( $\tau \sim 1$  нс).

Отсюда ясно, что в нормальной фотосинтетической мембране отсутствуют эффективные виды бесполезного для организма тушения возбуждения. Рассмотрим соотношение между различными процессами, определяющими эффективность захвата энергии электронного возбуждения антенны в реакционных центрах.

В первоначальных моделях захвата возбуждения РЦ предполагалось, что процесс захвата возбуждения в ловушке РЦ намного эффективнее, чем обратная реакция возврата возбуждения в антенну (Батлер, 1977). РЦ в этих моделях играли роль «воронки», куда необратимо стекалась энергия возбуждения. Однако в последние годы накопились сведения о том, что «узким местом» в утилизации возбуждения является процесс его захвата и разделения зарядов, который протекает обратимо.

Как было показано выше, для РЦ ФС I

$$k_m = k_{обр} \exp(-\Delta E/k_B T),$$

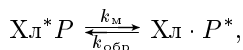
где  $\Delta E \sim 0,03$  эВ — энергия активации обратного переноса от  $P_{700}$  на  $Xл_{690}^{694}$ , т. е.  $k_m \simeq 1,6k_{обр}$ . Как видно, константы  $k_m$  и  $k_{обр}$  одного порядка, и, следовательно, процесс захвата действительно обратим. В захвате возбуждения ловушкой важную роль играет число  $N$  молекул, непосредственно окружающих  $P$ . С увеличением числа  $N$  растет время существования экситона в антенне до его захвата ловушкой РЦ. Так, время затухания флуоресценции антенны частиц ФС II увеличивалось от 80 пс до 200 пс при соответствующем увеличении в препаратах ФС II количества молекул  $Xл$  в антенне от 80 до 250, приходящихся на одну молекулу  $P_{680}$ .

Из анализа модели случайных блужданий возбуждения следует, что для того, чтобы в процессе случайного блуждания экситон попал в ловушку РЦ, окруженную антенной из  $N = 80$  молекул  $Xл$ , необходимо около 120 прыжков возбуждения. Считая, что энергия взаимодействия между молекулами хлорофилла в антенне составляет  $E_{вз} \sim 100$  см<sup>-1</sup> ( $\sim 0,01$  эВ  $\sim 4,6 \cdot 10^{-21}$  Дж), можно оценить время  $\tau_m$  одного прыжка (XIII.11.4) как  $\tau_m \sim \hbar/E_{вз} \sim 10^{-13}$ – $10^{-14}$   $\sim 50$  фс ( $\sim 0,05$  пс). Следовательно, время, необходимое для однократного попадания в ловушку, составляет  $120 \cdot 50$  фс = 6 пс, а общее число попаданий, которые экситон успевает совершить за время 80 пс до эффективного захвата ловушкой, будет равно  $80$  пс /  $6$  пс  $\sim 13$ .

Следовательно, «узким местом» является не миграция возбуждения в антенне, а его захват ловушкой РЦ.

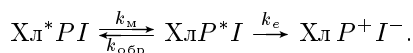
Именно поэтому может произойти возврат энергии возбуждения обратно молекулам антенны, непосредственно окружающим РЦ. Иными словами, РЦ представляют собой неглубокую ловушку для возбуждения, откуда оно может «выбраться» назад в антенну. Заметим, что в силу этого для эффективного захвата необходимо несколько попаданий в РЦ экситона за время жизни возбуждения в антенне.

В процессе миграции распространение возбуждения по антенне происходит намного скорее (на порядок), чем достигается окончательное разделение и стабилизация зарядов в РЦ (Холцварт, 1990). Прямым экспериментальным доказательством этого явилась обнаруженная Холцвартом компонента разгорания флуоресценции длинноволновой формы ( $\lambda_{\text{фл}} \sim 720$  нм) ФС I со временем 10–15 пс. Это соответствует времени распространения экситонного возбуждения от антенны до молекул пигмента, непосредственно принадлежащих РЦ ФС I. Как говорилось выше, общее время затухания флуоресценции или время жизни экситона в антенна ФС I намного больше ( $\tau \geq 80$  пс). Это значит, что оно определяется не быстрым процессом миграции энергии и диффузией экситона в антенне, а более медленным процессом захвата возбуждения и разделения зарядов в ловушке реакционного центра. Это будет справедливо только если возбуждение, попавшее в  $P_{700}$ , может вернуться назад в антенну РЦ:



где  $k_M$  и  $k_{\text{обр}}$  — константы захвата ловушкой и возвращения возбуждения в антенну.

После локализации возбуждения на  $P^*$  происходит акт элементарного разделения зарядов в РЦ с константой  $k_e$



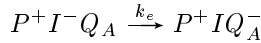
Вычисленные на основе данных по кинетике затухания флуоресценции значения константы разделения зарядов  $k_e$  зависят от быстрого обратимого обмена возбуждения между Хл антенны и  $P$ .

В опытах Холцварта полученная таким образом кажущаяся константа разделения зарядов, включающая процесс обратимого захвата возбуждения ( $k_M$  и  $k_{\text{обр}}$ ), составляла  $k_e \sim 10$  пс<sup>-1</sup>.

Очевидно, когда количество окружающих молекул антенны сведено к минимуму, возрастает вероятность прямого попадания возбуждения на  $P$ . В этих условиях вычисленная по затуханию флуоресценции константа  $k_e$  элементарного разделения зарядов приближается к значениям  $k_e$ , непосредственно измеренным методами абсорбционной фемтосекундной спектроскопии (см. ниже) на изолированных РЦ, где она составляет  $\tau_e \sim 1/k_e \sim 2$ –4 пс.

Таким образом короткоживущая компонента разгорания флуоресценции  $\tau_1$  ( $\tau_1 \sim 10$ –15 пс) соответствует распространению и тушению экситона антенны пигментами РЦ, а долгоживущая ( $\tau_2 \sim 100$ –200 пс) компонента затухания флуоресценции отражает дезактивацию возбуждения антенны в процессе обратимого разделения зарядов в РЦ. Кроме того, более медленному этапу стабилизации

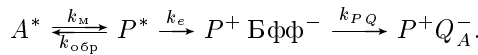
зарядов и восстановления  $Q_A$



также соответствует отдельная более длительная компонента затухания флуоресценции антенны  $\tau_3 \sim 500$  пс. Восстановление  $Q_A$  и закрытие РЦ ( $PIQ_A$ ) вызывает вследствие электростатического отталкивания уменьшение константы  $k_e$  первичного разделения зарядов и увеличение длительности флуоресценции. Величины  $\tau_2$  и  $\tau_3$  возрастают в 1,5–3 раза, а короткоживущая компонента  $\tau_1$  тушения экситона остается неизменной. Возникающее при этом долгоживущее свечение в принципе может частично носить рекомбинационный характер  $P^+I^- \rightarrow P^*I \rightarrow PI + h\nu$ . Однако в основном оно связано с увеличением флуоресценции антенны и уменьшением, а не увеличением, скорости образования ион-радикальной пары  $P^+I^-$ . В то же время сама по себе миграция экситона в антенне мало изменяется при восстановлении  $Q_A$ .

Заметим также, что два типа комплексов фотосистемы ФС  $\Pi_\alpha$  и ФС  $\Pi_\beta$  отличаются друг от друга по значению  $\tau$  компонент затухания флуоресценции, которые остаются, однако, в пределах  $\tau_1 \sim 10$ –20 пс и  $\tau_2 \sim 100$ –200 пс. Детальные измерения длительности флуоресценции в зависимости от состояния РЦ были проведены на фотосинтетических мембранах бактерий и выделенных из них препаратах РЦ.

В интактных хроматофорах, где присутствуют оба светособирающих комплекса ССПБК II и ССПБК I с активными реакционными центрами, обнаруживаются две основные компоненты затухания флуоресценции с временами  $\tau_1 \sim 50$ –70 пс и  $\tau_2 \sim 250$  пс. В отсутствие РЦ собственное время флуоресценции антенны составляет 700–1000 пс. Вместе с тем время одного акта переноса возбуждения между соседними молекулами в антенне здесь, как и в хлоропластах, также невелико ( $\sim 10^{-13}$  с). Это значит, что общее время, необходимое для распространения экситона в антенне и достижения РЦ должно быть намного меньше измеренного экспериментально времени жизни флуоресценции в хроматофорах. Так же, как и в хлоропластах, это означает, что возбуждение, попавшее в РЦ, может вернуться назад в антенну. Схема процессов представляется здесь в виде



Здесь  $k_M = 1/\tau_1$  — константа тушения флуоресценции антенны ( $A^* \rightarrow P$ ),  $k_{обр}$  соответствует возвращению возбуждения в антенну,  $k_e$  — константа реакций разделения зарядов в РЦ и перенос электрона от  $P$  на Бфф ( $k_e^{-1} \sim 3$  пс),  $k_{PQ}$  — константа переноса электрона на первичный хинон.

Проведенный анализ (Фрейберг, 1996) показал, что при изменении константы  $k_e$  соблюдается линейная зависимость

$$\tau_I = k_M^{-1} + (I + k_{обр}/k_M)\tau_e,$$

где  $\tau_e = k_e^{-1}$  — время разделения зарядов в РЦ, а величины  $k_M$  и  $k_{обр}$  оказались одного порядка:  $k_M \sim k_{обр}$ .

Поведение второй компоненты  $\tau_2$  отражает в основном реакцию стабилизации зарядов в переносе электрона на первичный хинон:

$$\tau_2^{-1} = k_{PQ} + \frac{k_{обр} \cdot k_e}{k_e + k_{обр}}.$$

Следовательно, в хроматофорах, как и в хлоропластах, происходит быстрое распространение возбуждения ( $\sim 10\text{--}20$  пс) по антенне в каждом из комплексов ССПБК II Б800–850, ССПБК I Б890, причем время «прыжка» возбуждения между соседними молекулами не превышает 1–2 пс, а миграция энергии между комплексами занимает 30–40 пс. Узким местом является тушение флуоресценции в РЦ, которое носит обратимый характер ( $k_1 \sim k_{-1}$ ).

Следует обратить внимание на возможное влияние белка на процессы флуоресценции пигментов. Наличие различных форм пигментов с разными максимумами флуоресценции может быть связано с участием белковых компонент в релаксационных электронно-колебательных взаимодействиях, сопровождающих флуоресценцию (гл. X). В этом случае модификация белка в фотосинтетических мембранах может оказывать регуляторное воздействие на миграцию энергии как за счет изменения межпигментных расстояний и взаимной ориентации, так и за счет более тонкого влияния на внутримолекулярные релаксационные процессы, и тем самым на соотношение полос флуоресценции и поглощения пигментов в пигмент-белковых комплексах.

**Структура ФСЕ и захват возбуждения в РЦ.** Большое значение для эффективного затрата возбуждения в РЦ имеют топографические особенности организации молекул пигментов в антенне. Мы видели, что при больших размерах антенны и, соответственно, увеличении количества случайных прыжков, необходимых для попадания возбуждения в РЦ, эффективность захвата падает.

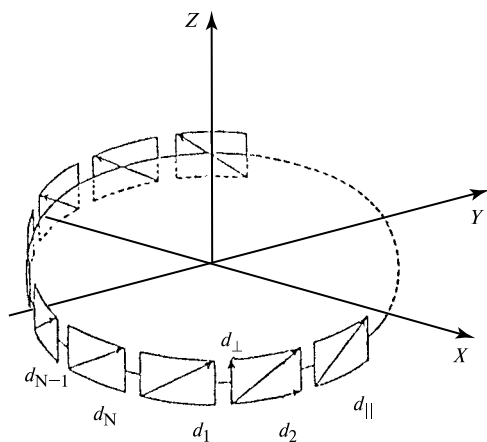


Рис. XXVII.15.

Модель светособирающей антенны (по V. I. Novoderezhkin, A. P. Razjivin, 1995)

Общее число молекул бактериохлорофилла —  $N$ ;  $d$  — дипольный момент перехода  $n$ -ой молекулы;  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  — единичные векторы системы координат.

Максимальные величины эффективности  $\phi$  достигаются при небольшом числе молекул  $N$  в антенне  $N \lesssim 50$ . Между тем экспериментальные значения  $\phi$  приближаются к 90% для таких по размерам антенн, где число молекул пигментов намного больше ( $300 < N \leq 1000$ ). Это сопоставление показывает, что для достижения высоких квантовых выходов передачи возбуждения от антенны к РЦ структура ФСЕ должна быть на самом деле жестко оптимизирована и тем самым отличаться от расположения молекул в растворе или изотропном кристалле.



Среди структурных факторов, которые могут влиять на эффективность передачи возбуждения, наибольшее значение имеют кластерный характер решетки ФСЕ, избирательная анизотропия межмолекулярных расстояний для обеспечения выбранного направления миграции и определения ориентации векторов дипольных моментов переходов молекул ФСЕ. Эти предположения подтвердились в результате исследований передачи энергии электронного возбуждения на зеленых серных бактериях (Фетисова). Оказалось, что в клетках этих бактерий существуют специальные хлоросомы (большие природные антенны), где критерии оптимизации находят свое выражение в олигомеризации (кластеризации) молекул пигментов при сильных взаимодействиях между ними. Причем максимальное ускорение передачи энергии к РЦ достигается при образовании кластеров — цепочек, расположенных поперек длинной оси вытянутой ФСЕ. Векторы дипольных моментов  $Q_y$  — перехода антенных молекул — параллельны друг другу и направлены вдоль длинной оси хлоросомы.

Другой характерный пример специальной структурной организации светообирающей антенны пурпурных бактерий был представлен на рис. XXVII.10, а, б). Эта структура кристаллизованных препаратов ССПБК полностью подтверждает теоретические расчеты, проведенные независимо ранее (Новодережкин, Разживин) на основе модели делокализованных экситонов.

Известно, что поглощение кванта света молекулами светособирающей антенны приводит к тому, что за время существования возбуждения и перехода на первый синглетный возбужденный уровень (рис. X.5)  $S_0 \rightarrow S_1$  происходит обеднение основного уровня  $S_0$ . Вследствие этого наблюдается уменьшение поглощения в основной полосе и появление отрицательного максимума в длинноволновой области дифференциального спектра поглощения при световом возбуждении (выцветание основной полосы поглощения). Однако, кроме этого, при возбуждении появляются также положительные максимумы в коротковолновой области спектра. Затухание этих индуцированных абсорбционных изменений происходит, во-первых, в изолированных комплексах Бхл 875 за времена  $\tau_1 \sim 15$  пс вследствие ухода возбуждения к другим группам пигментов (Бхл 875  $\rightarrow$  Бхл 896) и, во-вторых, при дезактивации состояния  $S_1$  всего комплекса и перехода его на основной уровень  $S_1 \rightarrow S_0$  за время  $\tau_2 \sim 600$  пс. Как видно, эти времена  $\tau_1$  и  $\tau_2$  соответствуют компонентам затухания флуоресценции в ССПБК пурпурных бактерий. Большие величины абсорбционных изменений показывают, что в них должны участвовать несколько молекул Бхл, выцветающих на время существования возбуждения.

Для объяснения этих эффектов была предложена и проанализирована модель теоретического циркулярного расположения  $N$  молекул в антенне, изображенная на рис. XXVII.15. Такой агрегат при сильном экситонном взаимодействии ведет себя как единая супермолекула. Дипольный момент перехода в такой коллективной системе увеличивается, как показывают расчеты, в  $\sqrt{N}$  раз по сравнению с мономерной формой.

Это приводит к 3–4-кратному увеличению фотоиндуцированных абсорбционных изменений (выцветанию полосы) в длинноволновой области. Однако в коротковолновой области также возникают новые положительные изменения поглощения. Они вызваны дипольным моментом перехода на новый высокий экситонный уровень возбуждения, появившийся в супермолекуле.

Эффективность взаимодействий с РЦ и передача на него энергии повышается, поскольку такой агрегат ведет себя как единая супермолекула с делокализованным на ней экситоном. В других экспериментах на хроматофорах и хлоропластах при высокой интенсивности лазерного импульса возбуждения (до  $10^{15 \div 17}$  фотон/см<sup>2</sup>) было обнаружено такого рода дополнительное поглощение, нелинейно зависящее от интенсивности возбуждающего света (Пащенко, Фогель). Нелинейные эффекты возникают в агрегате молекул антенны ( $N > 5$ ) и отражают электронные переходы между экситонными уровнями коллективного возбуждения, возникающего при сильном межпигментном взаимодействии в светособирающей антенне.

## § 5. Реакционные центры пурпурных фотосинтезирующих бактерий

Первичный акт фотосинтеза, приводящий к разделению зарядов и восстановлению первичного акцептора, осуществляется в реакционных центрах. В настоящее время благодаря развитию методов препаративной биохимии удалось выделить в нативном состоянии РЦ фотосинтезирующих бактерий, который представляет собой отдельный пигмент-белковый комплекс.

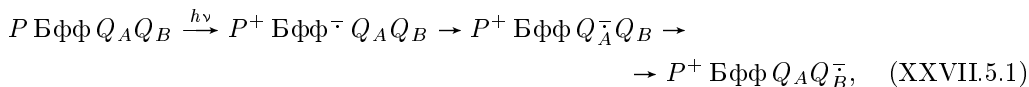
**Компоненты РЦ.** РЦ пурпурных бактерий можно рассмотреть на примере хорошо изученных препаратов из *Rhodospseudomonas sphaeroides*, штамм R-26, содержащих три белковые субъединицы с молекулярной массой  $19 \cdot 10^3$ ,  $22 \cdot 10^3$  и  $28 \cdot 10^3$ . Их обозначают как L, M, H (легкая, средняя и тяжелая соответственно). Белок РЦ гидрофобен и нерастворим в воде в отсутствие детергента. Детергент переводит РЦ в водный раствор, делая гидрофильной поверхность белка, которую он покрывает. В состав РЦ входят четыре молекулы бактериохлорофилла Бхл, две молекулы бактериофеофитина Бфф, одна или две молекулы убихинона Q, атом железа Fe, а также цитохромный комплекс. Последний присутствует не у всех видов бактерий, в частности, он обнаружен у *Rps. viridis*, но его нет у *Rb. sphaeroides*. В качестве простатических групп, на которых локализуется электрон, либо необходимых для обеспечения его высокоэффективного переноса, в состав реакционного центра входят 6 порфириновых центров (4 бактериохлорофилла и 2 бактериофеофитина), 2 хинона и 1 атом негемового железа. С комплексом реакционного центра может быть также ассоциирована 1 молекула каротиноида, но с белками, выделенными из бескаротиноидных штаммов бактерий, каротиноиды не ассоциированы. Поскольку квантовая эффективность первичных реакций фотосинтеза и константы скоростей этих реакций в реакционных центрах, выделенных из бескаротиноидных мутантов или штаммов дикого типа, практически идентичны, можно заключить, что каротиноиды реакционного центра не принимают непосредственного участия в процессах электронного транспорта.

Природа первичного фотохимического акта была выяснена в работах Л. Н. М. Дюйзенса, который обнаружил небольшие обратимые изменения поглощения  $\Delta A$  при освещении хроматофоров *Rhodospirillum rubrum*. Эти изменения характеризовались выцветанием полосы поглощения при 870 нм и сдвигом в синюю область полосы при 800 нм. Подобные небольшие (около 2%) изменения поглощения были получены и при химическом окислении РЦ. Это указывает на окисление под действием света небольшой части активного Бхла, принадлежащего РЦ, которая составляет лишь около 2% от общего содержания Бхла и представляет собой

реакционноспособный пигмент  $P_{870}$ . Фотоокисление  $P_{870}$  происходит с квантовой эффективностью, достигающей 100%, и осуществляется также с большой квантовой эффективностью при 1 К. На рис. XXVII.16, А приведен спектр поглощения препаратов РЦ бескаротиноидного штамма бактерий *R. sphaeroides*, R-26, на котором обозначены максимумы поглощения, принадлежащие пигментам Бхл и Бфф. При поглощении света происходит выцветание полос при 870, 600 нм и сдвиг в синюю область полосы 800 нм, принадлежащих  $P_{870}$ , с одновременным появлением новой полосы поглощения около 1250 нм.

На рис. XXVII.16, Б приведены дифференциальные спектры поглощения (свет минус темнота) при образовании  $P^+$  с положительными максимумами 435, 1250 нм и отрицательными максимумами, соответствующими выцветанию полос поглощения при 600, 870 нм, а также сдвигу и выцветанию полосы при 800 нм. Все эти изменения характерны для образования катион-радикала димера фотоактивного Бхл<sup>+</sup>. Выцветание полос при 545 и 760 нм свидетельствует о превращении Бфф, а положительный максимум при 670 нм — о появлении при этом анион-радикала Бфф<sup>-</sup>. Кроме того, увеличение поглощения при 670 нм характерно также и для анион-радикала Бхл. Выцветание полосы при 275 нм обусловлено образованием восстановленного убихинона и образованием убисемихинона. После выключения света эти спектральные изменения исчезают, что вызвано рекомбинацией между  $P^+$  и  $Q^-$ .

При использовании спектральных эффектов установили последовательность прямых реакций переноса электрона между указанными компонентами РЦ:



где  $P$  — димер бактериохлорофилла,  $Q_A$ ,  $Q_B$  — первичный и вторичный акцепторы хинонной природы (убихиноны).

Поскольку переносчики обладают различными окислительно-восстановительными потенциалами, то, меняя окислительно-восстановительный потенциал среды, можно восстановить хинонные акцепторы химическим путем в темноте, т. е. приготовить РЦ в исходном состоянии  $P \text{ Бфф } Q_A^- Q_B^-$ . Тогда освещение РЦ в присутствии соответствующих доноров электрона, которые восстанавливают  $P$ , будет приводить к накоплению состояния  $P \text{ Бфф }^- Q_A^- Q_B^-$ . Измеряя дифференциальные спектры «свет минус темнота» для таких образцов, т. е. разницу в поглощении между состояниями  $P \text{ Бфф }^- Q_A^- Q_B^-$  и  $P \text{ Бфф } Q_A^- Q_B^-$ , можно регистрировать спектральные изменения, сопровождающие фотовосстановление бактериофеофитина. Именно таким путем были получены экспериментальные доказательства участия Бфф в качестве промежуточного переносчика электрона между  $P$  и  $Q_A$  (рис. XXVII.16).

Первичный фотоактивный донор электрона  $P$  представляет собой димер (Бхл)<sub>2</sub>, в котором в состоянии  $P^+$  оставшийся неспаренный электрон обобществлен. Одноэлектронное окисление  $P$  приводит к появлению сигнала ЭПР, у которого  $g$ -фактор равен 2,0026, так же как и для катион-радикала Бхл<sup>+</sup>. Однако для  $P^+$  ширина сигнала составляет  $\Delta H = 0,94$  мТл, что в  $\sqrt{2}$  уже, чем для мономерного катиона Бхл<sup>+</sup> ( $\Delta H = 1,2$  мТл). Напомним, что сужение линии ЭПР пропорционально  $\sqrt{n}$ , где  $n$  — число молекул, обобществляющих неспаренный электрон (в данном

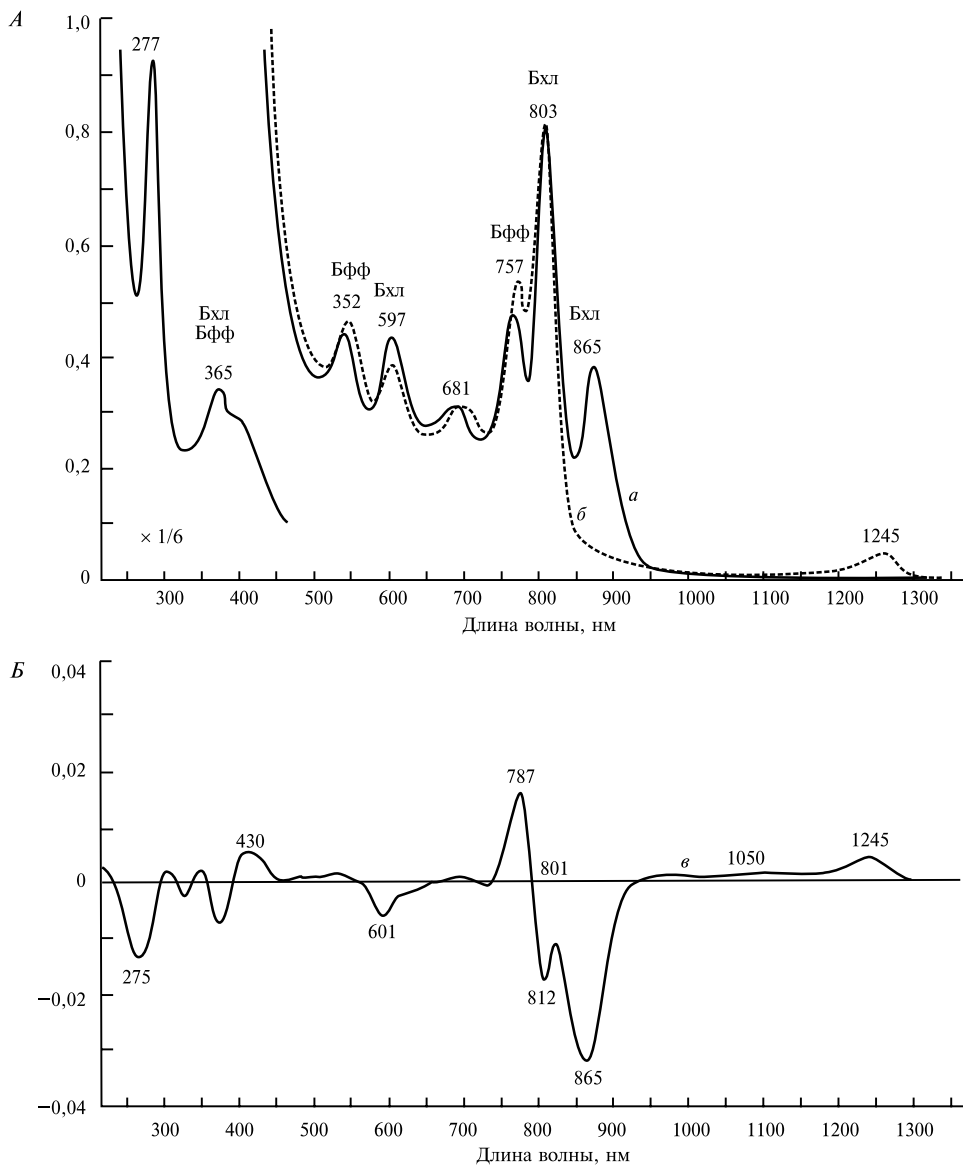


Рис. XXVII.16.

Спектр поглощения ( $A$ ) реакционных центров РЦ и дифференциальный спектр поглощения (свет минус темнота) ( $B$ ):

$a$  — спектр РЦ в темноте,  $b$  — спектр освещенных РЦ,  $v$  — разность между  $a$  и  $b$

Полосы спектра поглощения ( $A$ ) в диапазоне длин волн короче 450 нм имеют очень большую амплитуду, поэтому на рисунке показаны в шестикратном уменьшении

случае  $n = 2$ ). Величина  $E_{1/2}$  пары  $P/P^+$  составляет около +450 мВ и не зависит от рН среды, т. е. отрыв электрона от  $P$  не сопровождается протонированием.

Димерная структура фотоактивного Бхл в бактериальных РЦ вызывает интерес исследователей, тем более, что есть указания на подобное «устройство» первичного донора электрона и у высших растений. Возможно, что такое строение фотоактивного пигмента обеспечивает какие-то определенные преимущества в первичном акте фотосинтеза. Так, высказываются предположения, что димерная структура  $P$  способствует эффективному первичному захвату фотовозбуждения до отрыва электрона и переноса его в цепь переносчиков. Это происходит благодаря сверхбыстрому разделению зарядов в самом димерном комплексе с быстрой (за сотни фемтосекунд) сопутствующей поляризацией ближайшего белкового окружения. Имеются и доводы в пользу прочной стабилизации во времени положительного заряда на  $P$ , образованного при его фотоокислении, в результате делокализации «дырки» по структуре димера. Это способствует замедлению бесполезных обратных рекомбинационных процессов. Последнему благоприятствует в димере наличие большого числа степеней свободы для небольших структурных изменений, которые сопровождают фоторазделение зарядов (см. гл. XXVIII).

Первичный хинон  $Q_A$  — одноэлектронный переносчик, хотя в определенных условиях он присоединяет два электрона. Вторичный хинон  $Q_B$  в отличие от  $Q_A$  в обычных условиях может функционировать как двухэлектронный переносчик. Fe входит в состав комплекса  $Q_A Q_B$ , который можно схематически представить как  $Q_A Fe Q_B$ . Измерение спектров эффекта Мессбауэра показало, что Fe не меняют свою валентность и остается в высокоспиновом  $Fe^{2+}$ -состоянии независимо от переноса электрона в акцепторном хинонном комплексе. Однако удаление Fe нарушает перенос электрона между  $Q_A$  и  $Q_B$ . Очевидно, сам атом железа не является акцептором электрона, а только облегчает его перенос между первичным и вторичным хинонами.

В последнее время благодаря успехам в получении кристаллических препаратов белков фотосинтетических РЦ пурпурных бактерий удалось расшифровать трехмерную структуру расположения компонентов РЦ (рис. XXVII.17, А).

Одним из наиболее выдающихся достижений молекулярной биофизики последних лет явилась расшифровка трехмерной пространственной структуры белка реакционного центра методом рентгеноструктурного анализа.

В отличие от водорастворимых белков, таких как цитохром  $c$ , миоглобин и другие, легко образующих крупные кристаллы, дающие четкие рентгеновские дифрактограммы, гидрофобные мембранные белки до последнего времени кристаллизовать не удавалось, вследствие чего их пространственную структуру можно было изучать лишь на основании косвенных данных.

Первым белком подобного рода, который удалось кристаллизовать и подвергнуть рентгеноструктурному анализу, явился четырехсубъединичный комплекс собственно РЦ и цитохрома  $c$  (физиологического донора электронов для фотоокисленного  $P$ ) из бактерии *Rhodospseudomonas viridis*. Рентгеноструктурный анализ кристаллических препаратов этих комплексов позволил установить пространственную картину взаимного расположения 4-х гемов цитохромной субъединицы и протетических групп РЦ, представленную на рис. XXVII.17, А. Данный комплекс явился по существу одним из первых сложных гидрофобных мембрано-связанных белков,

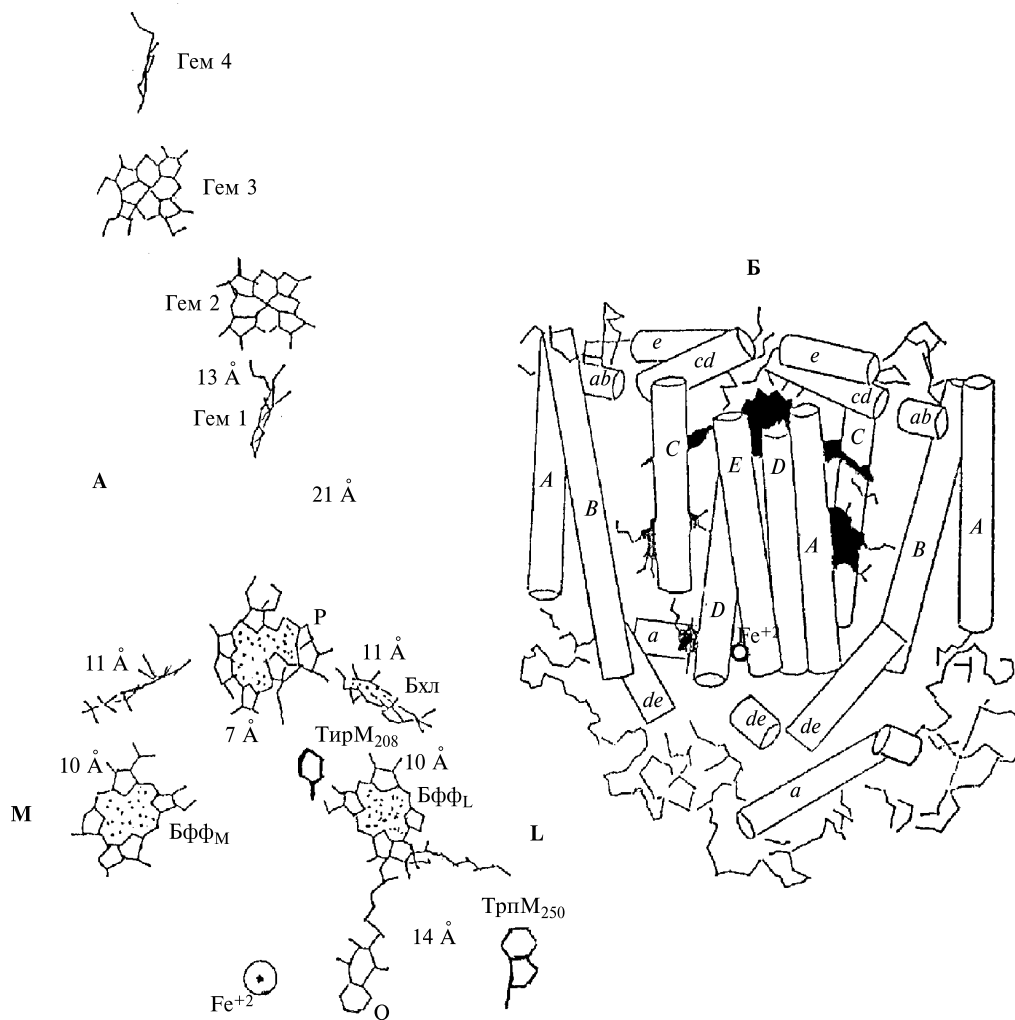


Рис. XXVII.17.

А — Схема расположения протетических групп и расстояния между ними в цитохром-РЦ комплексе *Rps. viridis*; Б — модель строения РЦ *Rps. sphaeroides* по данным рентгеноструктурного анализа (по J. Deisenhofer, H. Michel, 1989; J. P. Allen et al., 1987)

На рисунке Б цилиндрами изображены спиральные тяжи, протетические группы зачернены, точка с кружком указывает локализацию негемового железа, место связывания  $Q_A$  закрыто белком. Ароматические аминокислоты ТирМ<sub>208</sub> и ТирМ<sub>250</sub> служат мостиками для переноса на участках  $P \rightarrow \text{БФФ}$  и  $\text{БФФ} \rightarrow Q_A$

для которых установлена детальная пространственная структура. За эту фундаментальную работу группа немецких исследователей (Михель, Дейзенхофер, Хубер) получила в 1988 г. Нобелевскую премию. В настоящее время уже детально расшифрована пространственная структура также для собственно РЦ из бактерий *Rb. sphaeroides* R-26, на которых выполнено подавляющее большинство кинетических и других функциональных измерений первичных процессов фотосинтеза. Строение фотосинтетического РЦ из бактерий *Rb. sphaeroides*, согласно данным рентгеноструктурного анализа, показано на рис. XXVII.17, Б.

Основные черты последней структуры таковы. Она содержит 11  $\alpha$ -спиральных гидрофобных участков (по 22–31 аминокислот), организованных в близкие к параллельные тяжи, имеющие в хроматофорах трансмембранную направленность. В дополнение к трансмембранным  $\alpha$ -спиралям белок РЦ содержит и более короткие  $\alpha$ -спиральные участки, которые образуют, в частности, «карманы» вокруг мест локализации молекул хинонов. В целом структура белка РЦ образует жесткий каркас, с которым связаны две симметричные цепи молекул пигментов с общим для обеих цепей димером Бхл  $P$ :  $P$ –Бхл–Бфф– $Q$ . Локализация пигментов на рис. XXVII.17, Б зачернена. Кружком показано положение иона  $Fe^{2+}$ . Структура белка РЦ достаточно плотно прикрывает место связывания  $Q_A$ , но в области связывания  $Q_B$  в этих структурах имеется полость, через которую  $Q_B$  может диффундировать в пул мембранных хинонов, связывая электрон-транспортную цепь РЦ с другими мембранными переносчиками электрона. Несмотря на наличие в структуре бактериальных РЦ двух «ветвей» ( $L$  и  $M$ ) переносчиков, образующих две электронные тропы, индуцируемый светом транспорт электрона идет преимущественно только по одной из них — по цепи  $L$ . Это связано, по-видимому, в первую очередь с асимметрией белкового окружения и особенно распределения ароматических аминокислот, играющих роль электронных мостиков (XIII, § 7) в двух цепях. Определенное значение здесь, вероятно, принадлежит и водородным связям, формируемым кофакторами электронного переноса с белковым окружением, которые играют роль в стабилизации электрона при туннелировании (XIII, § 6). Показана неэквивалентность водородных связей и ароматических остатков для двух ветвей. Так, образованная ветвь  $L$  отличается от ветви  $M$  наличием водородных связей между пирольным кольцом Бфф и Глю 104, а также присутствием остатков тирозина в белковом окружении кофакторов переноса. Ниже мы увидим, что белковая среда в соответствии с современной концепцией электронно-конформационных взаимодействий (гл. XIII) играет решающую роль в регуляции электронного переноса в РЦ. Роль неактивной цепи пока не совсем ясна. Возможно, что компоненты этой цепи обеспечивают перенос и диссипацию триплетного состояния молекулы бактериохлорофилла  $P$  на молекулу входящего в структуру РЦ специфического каротиноида.

**Перенос электрона в РЦ.** Кинетика электронного транспорта в РЦ пурпурных бактерий была детально расшифрована с помощью методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии высокого временного разрешения вплоть до  $10^{-13}$  с. Возбуждение РЦ лазерным импульсом индуцирует характерные изменения поглощения редокс-кофакторов (см. рис. XXVII.16), времена нарастания и исчезновения которых соответствуют переносу электрона между отдельными редокс-компонентами РЦ.

Поглощение света фотохимически-активным пигментом  $P$  переводит его в синглетное возбужденное состояние  $P^*$  с последующим отрывом электрона. Этот процесс завершается за время короче 10 пс и сопровождается выцветанием полосы  $P$  при 870 нм, выцветанием полос Бфф при 545, 760 нм и появлением полосы поглощения Бфф при 670 нм. Таким образом, в результате возбуждения световым импульсом в РЦ образуется ион-радикальная пара с разделенными между  $P$  и Бфф зарядами и локализацией электрона на БФФ:  $(R^+ \text{ Бфф}^-)$ . Применение методов фемтосекундной спектроскопии показало, что время нарастания изменений поглощения Бфф при 545 и 670 нм, отвечающее переносу на Бфф, составляет около 4 пс.

Регистрация спектров с временным разрешением  $< 30$  пс обнаруживает также отличающийся от описанного выше спектр, с изменениями поглощения при 800 нм. На основании этого высказано предположение об участии промежуточного переносчика электронов между  $P$  и Бфф — молекулы Бхл, поглощающей при 800 нм (Шувалов В. А.).

Оказалось, однако, что далеко не всегда удается изменение при 800 нм надежно характеризовать даже при более высоких временном разрешении (до  $10^{-13}$  с). Тем не менее, вопрос об участии Бхл в переносе электрона остается в центре внимания и в настоящее время, поскольку он тесно связан с фундаментальными механизмами транспорта электрона в биомакромолекулярных системах. Мы обсудим эту проблему подробно в гл. XXVIII, а сейчас отметим два возможных механизма этого процесса.

Считается, что мономерная молекула Бхл принимает участие в переносе электрона между  $P$  и Бфф. Эта роль может быть связана с прямым восстановлением Бхл и образованием  $\text{Бхл}^-$ . Однако при большой общей скорости потока электронов ( $\tau < 3$  пс) образующаяся популяция  $\text{Бхл}^-$  очень мала и в обычных условиях не может быть достаточно точно детектирована спектроскопически даже с помощью фемтосекундной техники.

Другой — обменный — механизм предполагает, что молекула Бхл играет роль посредника, который усиливает взаимодействие между  $P$  и Бфф, но не претерпевает истинного окислительно-восстановительного превращения. В гл. XIII, § 7 мы видели, что перенос электрона по белковой цепи зависит от перекрывания молекулярных орбиталей донора и акцептора с молекулярными орбиталями звеньев полипептидной цепи — медиатора переноса электрона (XIII.7.7).

Аналогичную роль медиатора переноса электрона между  $P$  и Бфф выполняет Бхл. В простейшем случае скорость переноса между  $P$  и Бфф зависит от попарного перекрывания орбиталей ( $P$  и Бхл) и (Бхл и Бфф), или соответственно от матричных элементов (XIII.4.2) их попарных взаимодействий  $V_{P \text{ Бхл}}$  и  $V_{\text{Бхл} \cdot \text{Бфф}}$ . Константа скорости переноса  $P \rightarrow \text{Бфф}$  соответственно зависит от:

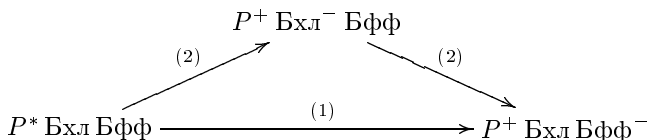
$$k_{P \text{ Бфф}} \sim \frac{2\pi}{h} \frac{|V_{P \text{ Бхл}} \cdot V_{\text{Бхл} \cdot \text{Бфф}}|^2}{(\Delta E)^2},$$

где  $\Delta E$  — разность энергетических уровней состояния  $P^*$  и  $P^+ \text{ Бхл}^-$ . При больших  $\Delta E$  и низких температурах, когда обычный активационный процесс восстановления Бхл практически невозможен, обменный механизм обеспечивает транспорт электрона с участием виртуального уровня Бхл. Химическое восстановление Бхл ста-



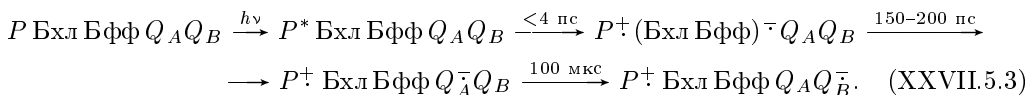
новится эффективным при нормальных температурах и при небольших (или отрицательных)  $\Delta E$ . Обычно  $\Delta E$  лежит в области значений  $-300 \text{ см}^{-1} < \Delta E < 600 \text{ см}^{-1}$ . Однако эти пределы могут варьировать в мутантных образцах с модифицированным аминокислотным составом белка, входящего в структуру РЦ.

Наиболее вероятная схема участия Бхл включает два параллельных пути: обменный перенос (1) и двухступенчатый окислительно-восстановительный перенос (2):



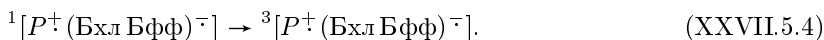
В двустороннем механизме на первой стадии (за 3,5 пс) происходит восстановление Бхл, а его окисление на второй стадии (Бхл → Бфф) осуществляется гораздо быстрее (за 0,9 пс), что и предотвращает его накопление в РЦ. Вопрос о соотношениях двух механизмов участия Бхл решается в настоящее время путем изучения кинетики переноса электрона методами фемтосекундной спектроскопии.

В настоящее время принято считать, что образующееся за 4–7 пс первичное состояние РЦ с разделенными зарядами ( $P^+ I^-$ ) представляет собой смесь состояний  $P \text{ Бхл}$  и  $P \text{ Бфф}$ , находящихся в равновесии, причем не менее  $\sim 60\%$  электронной плотности неспаренного электрона локализуется на Бфф. Через 150–200 пс после образования  $\text{Бфф}^-$  восстанавливается первичный хинон  $Q_A$ , который далее отдает электрон на  $Q_B$  уже за время  $\simeq 10^{-4}$  с. Таким образом, прямые реакции переноса электрона и их времена в РЦ можно представить как

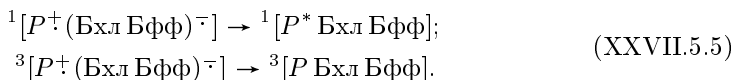


□

Если перед возбуждением восстановить  $Q_A$  химическим путем, т. е. перевести РЦ в состояние  $[P(\text{Бхл Бфф})Q_A^-]$ , то образующееся под действием света состояние  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-Q_A^-]$  живет намного дольше (до  $\sim 10$  нс). Очевидно, в этих условиях  $\text{Бфф}^-$  не может отдать электрон на  $Q_A^-$  и распад состояния  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-Q_A^-]$  должен осуществляться другими путями. Действительно, в спектре фотоиндуцированных изменений состояния  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-Q_A^-]$  с течением времени возникают спектральные полосы нового типа, свойственные триплетному состоянию фотоактивного димера бактериохлорофилла  $^T P$  (или  $^3 P$ ). Анализ показывает, что в данном случае триплетное состояние  $^3 P$  образуется не в результате непосредственного перехода из синглетного возбужденного состояния  $^1 P^*$ . Оно появляется вследствие конверсии спинов за время существования радикальной пары  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-]$  при переходе спинов неспаренных электронов на  $P^-$  и  $\text{Бфф}^-$  в параллельную триплетную ориентацию:



Если в темноте исходно восстановить Бфф и химически перевести РЦ в состояние  $[P(\text{Бхл Бфф})^- Q_A^-]$ , то при освещении триплетное состояние уже не образуется. Это также доказывает, что триплеты появляются в ходе рекомбинации  $P^+$  и Бфф $^-$  в радикальной паре. Таким образом, в состоянии  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-]$  возможны два пути рекомбинации радикалов  $P^+$  и Бфф $^-$ :



Появление  $P^*$  в ходе реакций в состоянии  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-]$  является причиной увеличения флуоресценции, когда перенос электрона от Бфф на  $Q_A^-$  блокирован.

Выход триплетных молекул  ${}^3P$  увеличивается от 10–20% при комнатной температуре до 90–100% при 20 К, причем при комнатной температуре он понижается в 1,5–2 раза при действии внешнего магнитного поля ( $H \sim 0,1\text{--}0,2$  мТл). Существуют различные механизмы, вызывающие переориентацию спинов в радикальной паре и переход ее в триплетное состояние. Основную роль играют здесь дипольные магнитные взаимодействия между электронами (спин-спиновый обмен). Значение обменного спин-спинового интеграла ( $I$ ) определяет расщепление синглетного и триплетного уровней радикальной пары  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-]$  на величину энергетического зазора между синглетным и триплетным состояниями  ${}^1[P^+(\text{Бхл Бфф})^+]$  и  ${}^3[P^+(\text{Бхл Бфф})^+]$ .

Величина  $I$  задается выражением

$$I = 2\epsilon^2 I_{\text{int}} / (\Delta E)^2, \quad (\text{XXVII.5.6})$$

где  $\Delta E$  — разность энергетических уровней состояний  $[P^* \text{Бхл Бфф}]$  и  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-]$ ;  $I_{\text{int}}$  — величина энергетического расщепления синглетного и триплетного уровней, димера бактериохлорофилла  $P$ ;  $\epsilon^2$  — интервал перекрывания волновых функций состояний  $[P^* \text{Бхл Бфф}]$  и  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-]$ , определяющий эффективность туннельного переноса электрона с образованием радикальной пары (см. § 3, гл. XIII). Таким образом, величина  $I$  связана с константой скорости  $k$  туннельного переноса электрона от  $P^*$  на Бфф. Значение константы скорости переноса электрона между  $P^*$  и Бфф равно величине, обратной времени разделения зарядов  $k = 1/\tau$  ( $\tau \sim 5 \cdot 10^{-12}$  с), и составляет  $k \sim 2 \cdot 10^{11}$  с $^{-1}$ . Отсюда можно приблизительно оценить  $\epsilon^2 \sim 2000$  см $^{-2}$ . Принимая, что  $I_{\text{int}} \sim 2500$  см $^{-1}$ ,  $\Delta E \sim 3000$  см $^{-1}$ , находим из (XXVII.5.5) величину обменного спин-спинового взаимодействия, которая должна составить  $I = 1$  см $^{-1}$ . Однако на расстояниях 0,9–1,0 нм между молекулами  $P$  и Бфф значения  $I$ , определенные экспериментально, в действительности на три порядка меньше и не превышают  $10^{-3}$  см $^{-1}$ .

Очевидно, большая величина обменного взаимодействия, необходимая для обеспечения высокой константы скорости переноса электрона, характеризует обменное взаимодействие на меньших расстояниях в промежуточном положении между  $P^+$  и (Бхл Бфф) $^-$ . Это положение электрон занимает в комплексе  $[P^+(\text{Бхл Бфф})^-]$ , частично локализуясь на Бхл.

Эффективное смещение синглетных и триплетных состояний обеспечивается малой величиной энергетического зазора между ними. Если за время существования радикальной пары произойдет обращение спина электрона, то осуществляется

переход  $S \rightarrow T$  на один из подуровней триплетного состояния. В нулевом магнитном поле энергетическое расщепление между подуровнями радикальных пар весьма мало и переход происходит на любой из трех подуровней  $T_{+1}$ ,  $T_0$ ,  $T_{-1}$ . Однако во внешнем магнитном поле триплетные уровни радикальной пары расщепляются на три подуровня  $T_{+1}$ ,  $T_0$ ,  $T_{-1}$  в соответствии со значением спинового квантового

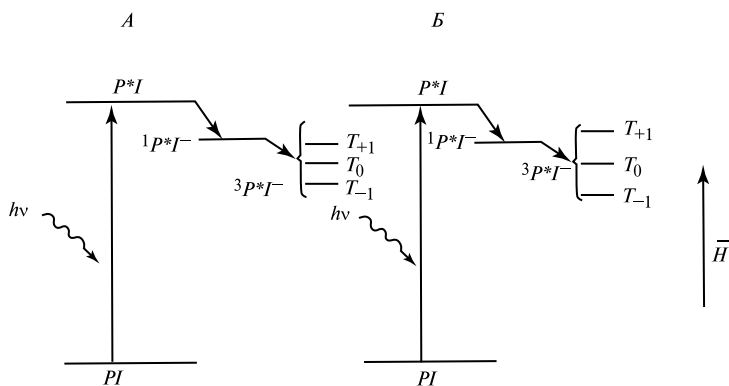


Рис. XXVII.18.

Энергетические уровни радикальной пары в отсутствие внешнего магнитного поля (А) и во внешнем магнитном поле (Б)

Расстояние между подуровнями определяется величиной энергии Зеемана  $g\beta H$ , где  $\beta$  — магнетон Бора [см. (X.2.15)]. При достаточно больших значениях  $H$  подуровни  $T_{+1}$  настолько расходятся, что только один уровень  $T_0$  остается близким к синглетному уровню для обеспечения  $S \rightarrow T$ -перехода. В этом случае заселенность состояний  $^3[P^{\dagger}(\text{Бхл Бфф})Q_A]$  падает, что проявляется в уменьшении выхода образования триплетных молекул  $^3P$  при действии внешнего магнитного поля

числа  $m_s = 0, \pm 1$  (см. § 1, гл. XII), определяющего величины проекций суммарного магнитного момента электронов на направление внешнего поля  $\mathbf{H}$  (рис. XXVII.18).

Рекомбинация зарядов в радикальной паре, находящейся в синглетном состоянии  $[P^{\dagger}(\text{Бхл Бфф})^-]$ , приводит к переходу ее в основное  $[P \text{ Бхл Бфф}]$  либо возбужденное  $^1[P^* \text{ Бхл Бфф}]$  состояние. В последнем случае рекомбинация сопровождается появлением замедленной флуоресценции с временем жизни в несколько наносекунд (в обычных условиях, когда  $Q_A$  не восстановлен, квантовый выход флуоресценции РЦ составляет всего 0,03–0,04%). Восстановление  $Q_A$  в темноте приводит к повышению выхода свечения до 0,12–0,15% в основном за счет увеличения замедленной флуоресценции. Понижение температуры уменьшает выход рекомбинационного свечения. Наоборот, действие внешнего магнитного поля, замедляющего переход  $S \rightarrow T$  и тем самым увеличивающего заселенность синглетного состояния радикальной пары, увеличивает выход рекомбинационного свечения до 3–5% при напряженностях  $\mathbf{H}$  от 10 до 50 мТл.

На рис. XXVII.19 представлена схема переноса электрона в РЦ пурпурных бактерий. Как видно, прямые реакции переноса электрона по направлению  $P \rightarrow (\text{Бхл, Бфф}) \rightarrow Q_B$  происходят за времена намного короче, чем времена обратных реакций рекомбинаций или диссипаций соответствующих промежуточных

состояний. В этом состоит принцип кинетической организации переноса электрона, согласно которому высокая эффективность функционирования РЦ обеспечивается тем, что на каждом участке цепи прямые реакции идут на 2–3 порядка скорее, чем обратные, ведущие к снижению общего квантового выхода первичных стадий электронного транспорта.  $\square$

Следует еще раз подчеркнуть, что триплетные состояния бактериохлорофилла в РЦ выявляются лишь когда  $Q_A$  исходно восстановлен в темноте, а прямой перенос электрона затруднен. В том случае, когда  $P_{890}$  исходно окислен химически, возбуждение не тушится в РЦ и остается в антенне. В результате триплетные состояния Бхл в РЦ отсутствуют, но вместо них появляются триплетные состояния Бхл в антенне.

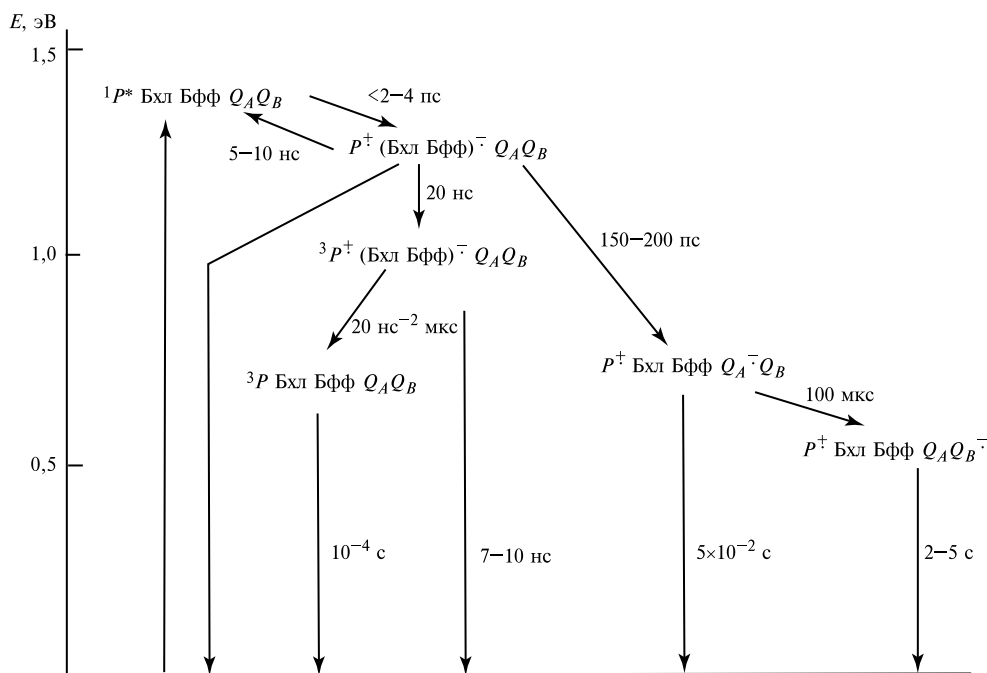
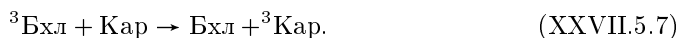


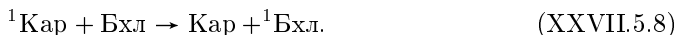
Рис. XXVII.19.  
Перенос электрона в РЦ пурпурных бактерий

В присутствии каротионидов (Кар) происходит миграция энергии триплетного состояния за 20 нс на 1 молекулу Кар:



Этот процесс идет намного быстрее, чем реакция триплетных молекул Бхл с кислородом ( $10^{-4}$  с), которая может приводить к деструкции фотосинтетической мембраны на свету за счет образования при этом активного окислителя — синглетного кислорода (см. § 3 гл. XVI). Тем самым каротиноиды выполняют защитную

функцию, предохраняя компоненты мембраны от фотоокисления. Миграция энергии синглетного состояния, которое в отличие от триплетного у Кар лежит выше, чем у Бхл, происходит от Кар к молекулам Бхл антенны:



## § 6. Реакционные центры фотосистемы I зеленых растений

Все фотосинтезирующие организмы, способные под действие света выделять кислород — от цианобактерий до высших растений — содержат реакционные центры фотосистемы ФС I и фотосистемы II. Характерно, что, несмотря на большие таксономические и экологические различия между растениями этих групп, структура реакционных центров ФС I или ФС II у них весьма сходна.

Первичный донор  $P_{700}$  электронов в ФС I был открыт в одном из первых экспериментов по применению дифференциальной оптической спектроскопии для исследования фотосинтетических мембран.

Б. Кок (1956) обратил внимание на небольшие изменения поглощения при 700 нм, возникающие при действии света на суспензию хлоропластов (рис. XXVII.20). Химические окислители вызывают аналогичный спектральный эффект, на основании чего было высказано предположение об окислении светом небольшой фракции молекул хлорофилла в мембране. Б. Кок назвал эту фракцию  $P_{700}$  ( $P$  — от англ. *pigment*, 700 нм — экстремум в дифференциальном спектре) и это обозначение прочно закрепилось в научной литературе. По аналогии с  $P_{700}$  называют и фотохимически активные компоненты реакционных центров других фотосистем:  $P_{680}$  в фотосистеме II,  $P_{870}$  или  $P_{960}$  — у фотосинтезирующих бактерий,  $P_{840}$  — у зеленых фотосинтезирующих бактерий и т. д.

До настоящего времени не удалось препаративно выделить  $P_{700}$  в чистом виде из фотосинтезирующей мембраны. В связи с этим абсолютный спектр  $P_{700}$  не зарегистрирован. В то же время хорошо изучен дифференциальный спектр  $P_{700}$  («свет минус темнота»), который может быть измерен и при наличии в среде других пигментов (при условии, что они не изменяют своих спектральных свойств под действием света). Этот спектр включает интенсивную «отрицательную» полосу выцветания при 700 нм ( $\pm 3$  нм) и при 430 нм, а также небольшие «положительные» полосы при 810 нм и 450 нм (рис. XXVII.20).

В хлоропластах растений 1 моль  $P_{700}$  приходится на  $\sim 400$  молей светособирающего хлорофилла антенны. Разработаны препаративные методы, позволяющие получать мембранные фракции, существенно более обогащенные фотосистемой I. В таких фракциях, сохраняющих основные фотохимические реакции ФС I, 1 моль  $P_{700}$  приходится на  $\sim 50$ –100 молей хлорофилла. Природа первичного донора ФС I

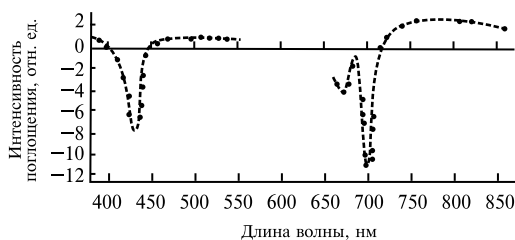


Рис. XXVII.20.

Дифференциальный спектр (свет минус темнота) для субхлоропластных, частиц, содержащих фотосистему I

интенсивно исследовалась спектроскопическими методами. Положение полос дифференциального спектра  $P_{700}$  характерно для хлорофилла  $a$ , который в обогащенных ФС I мембранных фракциях является практически единственным тетрапиррольным пигментом.

При окислении  $P_{700}$  образуется катион-радикал, сигнал ЭПР которого характеризуется  $g$ -фактором 2,0026, а полуширина приблизительно в  $\sqrt{2}$  раз меньше, чем полуширина сигнала ЭПР катион-радикала мономера Хла в растворе. Это свидетельствует в пользу того, что  $P_{700}$  может представлять собой димер Хла, в котором электронная плотность делокализуется между двумя молекулами хлорофилла  $a$ , образующими  $P_{700}$ .

В соответствии с димерной структурой  $P_{700}$ , были искусственно синтезированы модельные соединения, некоторые из которых обладали спектральными свойствами, весьма сходными с  $P_{700}$ .

Поглощение кванта света реакционным центром ФС I переводит  $P_{700}$  в нижнее синглетное возбужденное состояние. Структурная и функциональная организация реакционного центра такова, что вероятность переноса электрона с возбужденного уровня на так называемый первичный фотохимический акцептор намного превышает вероятность излучательной или безизлучательной диссипации энергии этого возбужденного состояния. Локализовавшись на первичном акцепторе, электрон затем проходит по цепи переносчиков (вторичных акцепторов), окислительно-восстановительные потенциалы которых образуют нисходящую «лестницу» (соответствующую увеличению  $E$ , т. е. снижению восстановительной способности).

Наиболее подробно изучены конечные акцепторы электронов ФС I. Такими акцепторами у всех кислород-выделяющих фотосинтезирующих организмов (от цианобактерий и одноклеточных водорослей до высших растений) являются водорастворимые ферредоксины. Эти сравнительно небольшие белки с молекулярной массой около 10 кДа содержат железо-серные кластеры (типа  $2\text{Fe}-2\text{S}$ ) и имеют довольно низкий окислительно-восстановительный потенциал ( $E_m \simeq 400$  мВ). Водорастворимый ферредоксин сорбируется тилакоидной мембраной в локусе локализации ФС I, а после восстановления электронами, поступающими от ФС I, включается в нециклический электронный поток на НАДФ<sup>+</sup> (реакция катализируется ферментом ферредоксин/НАДФ-редуктазой), либо в циклический электронный поток в ФС I.

Этот растворимый  $2\text{Fe}, 2\text{S}$ -ферредоксин получает электроны от связанных с мембраной железо-серных белков А ( $F_A$ ) и В ( $F_B$ ), являющихся терминальными акцепторами электрона в составе реакционного центра ФС I. Эти белки не удается выделить из фотосинтетической мембраны, не денатурируя их. Поэтому их точная структура и молекулярные характеристики подробно не изучены. Однако, поскольку эти белки обладают характерными спектрами ЭПР, многие особенности их строения и функционирования удалось изучить непосредственно в составе фотосинтетической мембраны.

Было показано, что активным центром этих белков является  $4\text{Fe}, 4\text{S}$ -кластер. Величины окислительно-восстановительных потенциалов  $F_A$  и  $F_B$  у шпината составляют  $-540$  мВ и  $-590$  мВ. Для других видов растений эти величины могут несколько отличаться, причем центры  $F_B$  могут быть более восстановительными, как у шпината, или менее восстановительными, как у ячменя, чем центры  $F_A$ . При освещении фотосинтетических мембран малоинтенсивным светом сначала вос-

становливаются центр  $F_A$ , а затем центр  $F_B$ . При низких температурах перенос электронов между  $F_B$  и  $F_A$  блокирован, однако при комнатной температуре возможность такого переноса не исключена. Можно предположить как последовательное, так и параллельное включение центров  $F_A$ ,  $F_B$  в электронный перенос. В случае параллельного включения на уровне этих центров может происходить разветвление циклического и нециклического электронного транспорта.

Центры  $F_A$ ,  $F_B$  не являются первичными акцепторами электрона в ФС I. Если эти центры предварительно восстановить в темноте химическим путем, то последующее освещение вызывает обратимое окисление  $P_{700}$ , наблюдаемой и при низких температурах. Наряду с окислением  $P_{700}$  при этом возникает новый сигнал ЭПР, характерный для железосерных белков с центрами  $2Fe, 2S$ . Этот сигнал соответствует фотовосстановлению акцептора  $F_X$  (или  $A_2$ ), величина окислительно-восстановительного потенциала которого составляет  $-705$  мВ. Сигнал от этого акцептора можно наблюдать лишь в условиях, когда центры  $F_A$  и  $F_B$  восстановлены. Если же хотя бы один из этих центров окислен, то электроны с  $F_X$  быстро переносятся на окисленный центр  $F_A$  или  $F_B$ , и фотостационарная концентрация восстановленного  $F_X$  становится пренебрежимо малой. Однако и центр  $F_X$  не является первичным акцептором, получающим электроны непосредственно с возбужденного уровня  $P_{700}$ .

Считается, что между  $P_{700}$  и  $F_X$  располагается еще как минимум 2 акцептора, называемых  $A_0$  и  $A_1$ . Указания на существование этих акцепторов были получены из данных сверхбыстрой пикосекундной спектроскопии комплексов ФС I с химически восстановленными или инактивированными центрами  $F_X$ .

Наиболее близким к  $P_{700}$  непосредственным акцептором электронов от первичного донора служит, по-видимому, мономер хлорофилла  $a$ , полоса поглощения которого находится при  $693-695$  нм (Хл  $695$ ). Перенос электрона от  $P_{700}$  на  $A_0$  осуществляется быстрее чем за  $10$  пс и сопровождается выцветанием полосы Хл  $695$ . После этого электрон за  $20-50$  пс переходит на акцептор  $A_1$ , который, по-видимому, представляет собой филлохинон (витамин  $K_1$ ). С каждым реакционным центром ФС I ассоциированы две молекулы филлохинона, одна из которых связана более прочно, чем другая.

Время переноса электрона с  $A_1$  на  $F_X$  по разным оценкам находится в пределах от  $200$  пс до  $20-50$  нс, а время переноса с  $F_X$  на  $F_A$  и далее на  $F_B$  составляет  $170$  нс. В кинетике переноса электрона от пластоцианина на  $P_{700}$  различают две фазы — быструю и медленную с временами  $12-14$  мкс и  $200$  мкс, которые связывают с существованием, соответственно, двух популяций молекул пластоцианина вблизи первичного донора ФС I.

Кинетика переноса электрона на ферредоксин, согласно современным данным, может быть представлена тремя компонентами с характерными временами  $500$  нс,  $13-20$  мкс и  $100-123$  мкс, что связано с возможным образованием трех типов комплексов ФС I с ферредоксином (см. схему переноса электрона в ФС I на рис. XXVII.21).

Данные биофизических методов, методов молекулярной генетики и биохимии белков в сочетании с последними результатами рентгеноструктурного анализа с разрешением  $4,5$  Å (группа Крауса и Витта) позволили получить информацию о структуре РЦ ФС I.

Субъединицы *PsaA* и *PsaB* формируют гетеродимер и содержат по 11 транс-мембранных  $\alpha$ -спиралей и еще четыре спирали, параллельные плоскости мембраны. Эти субъединицы связывают около 100 молекул хлорофилла *a*, 12–16 молекул  $\beta$ -каротина, две молекулы филлохинона и один 4Fe, 4S кластер  $F_X$ , расположенный в месте контакта субъединиц. Периферическая небольшая субъединица *PsaC* (М.м. 8,9 кДа), расположенная со стромальной стороны, несет в своем составе два терминальных 4Fe, 4S кластера ( $F_A$  и  $F_B$ ). Функции всех других белков, не несущих в своем составе пигментов, еще полностью не расшифрованы, однако известно, что белки *PsaD* и *PsaF* необходимы для взаимодействия с ферредоксином и пластоцианином, соответственно, *PsaL* играет важную роль при образовании тримеров ФС I (см. рис. XXVII.22).

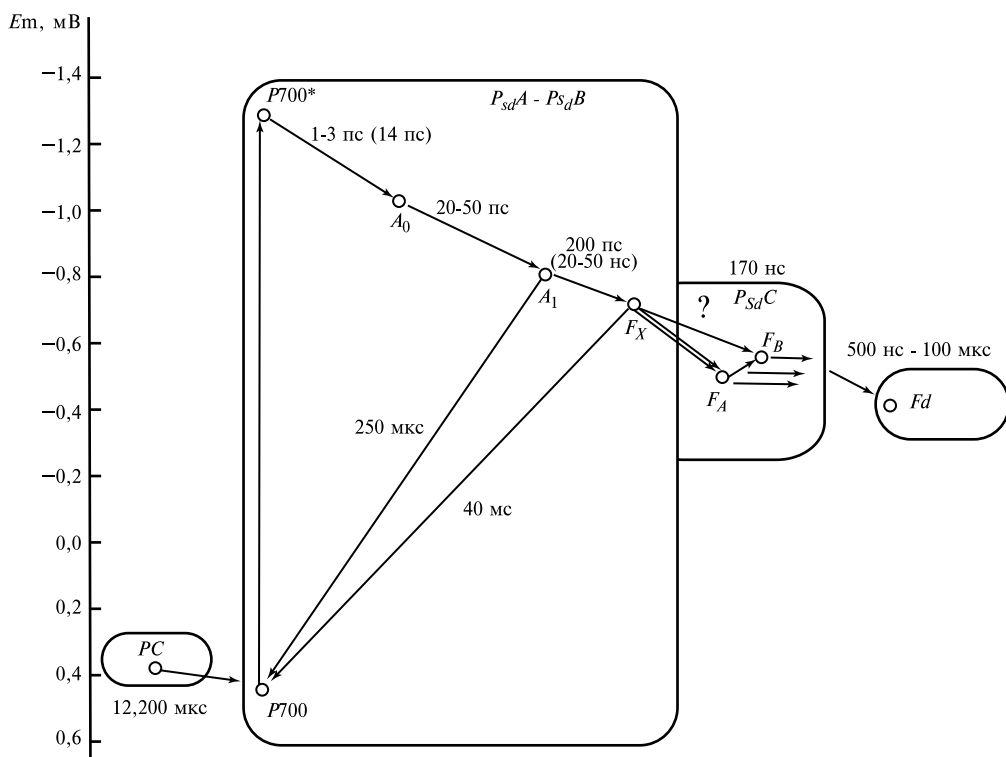


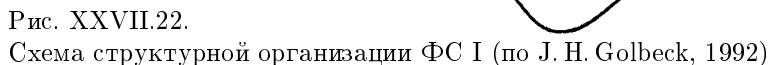
Рис. XXVII.21.

Перенос электрона в РЦ ФС I (по P. R. Chitnis, 1996)

Представлены средноточечные потенциалы и времена переноса. Вариации в оценках определяются данными, полученными в различных лабораториях. *PC* — пластоцианин, *Fd* — ферредоксин.

Около люменальной поверхности в пределах субъединиц *PsaA* и *PsaB* локализируются две молекулы хлорофилла *a*, расстояние между центрами которых составляет 7-9 Å. Такому димеру приписывается роль первичного донора электронов ( $P_{700}$ )

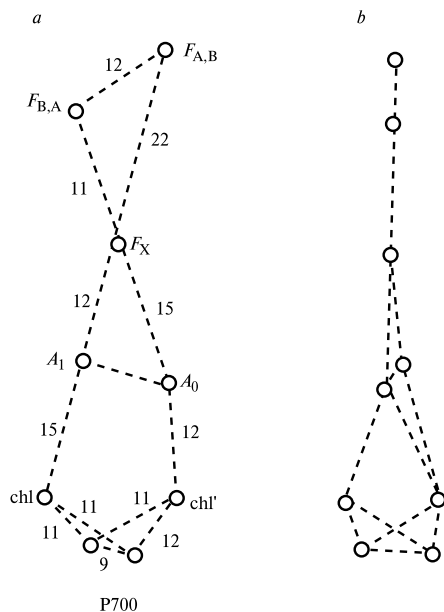




Кружками показаны геометрические центры молекул переносчиков электронов, цифры — расстояния между центрами в Å. Плоскость, образованная при соединении центров  $F_X$ ,  $F_{AB}$  и  $F_{BA}$ , перпендикулярна плоскости мембраны

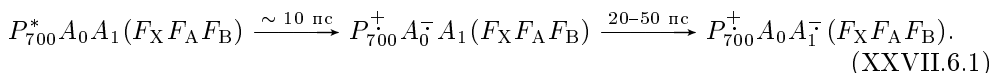
$a$  — вид в направлении, перпендикулярном плоскости  $F_X$ ,  $F_{AB}$ ,  $F_{BA}$ .

$b$  — тот же вид при повороте на  $90^\circ$  вокруг вертикали (оси 2-го порядка), проходящей через  $F_X$ .



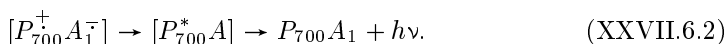
в ФС I. На расстоянии 12 Å от димера обнаружены еще две молекулы хлорофилла *a*, которые спектрально не выявляются. Далее следует еще пара молекул хлорофилла *a*, одна из которых, по-видимому, служит в качестве переносчика электронов  $A_0$ . Молекула филлохинона даже при разрешении 4,5 Å не идентифицируется.  $F_X$  локализован в центре гетеродимера таким образом, что служит точкой, через которую можно провести ось симметрии второго порядка  $C_2$ . Локализация кофакторов РЦ ФС I показана на рис. XXVII.22а.

Таким образом, последовательность переноса электрона в ФС I имеет вид



Восстановление  $P_{700}$  происходит в цепи цит *f* → пластоцианин →  $P_{700}^+$  за время  $\approx 200$  мкс, а также частично непосредственно от цит *f* (цит *f* →  $P_{700}^+$ ) за 15 мкс (см. рис. XXVII.2).

Аналогично РЦ пурпурных бактерий, в РЦ ФС I происходит образование триплетных и синглетных состояний радикальной пары  $[P_{700}^+ A_1^-]$ . После восстановления в темноте железосерного белкового комплекса  $(F_X F_A F_B)$  последующее освещение вызывает появление замедленной люминесценции (0,1–0,2 мкс) в результате рекомбинации зарядов в радикальной паре:



При действии магнитного поля переходы  $S \rightarrow T$  в радикальной паре затрудняются, и в результате возрастает заселенность синглетного состояния  $^1[P_{700}^+ A_1^-]$ . Как следствие, происходит усиление замедленной рекомбинационной люминесценции в РЦ и увеличение флуоресценции ближайших к РЦ молекул хлорофилла антенны.

## § 7. Реакционные центры фотосистемы II зеленых растений

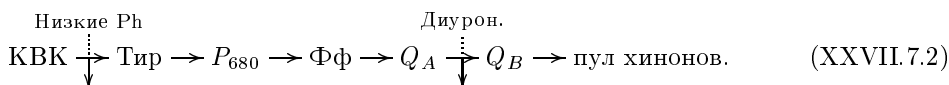
Основная функция РЦ ФС II состоит в акцептировании электронов от кислородвыделяющего комплекса КВК и дальнейшей передаче их в цепь переносчиков по направлению в ФС I. Первичным донором электрона в ФС II является фотоактивный пигмент  $P_{680}$ , названный так по аналогии с  $P_{700}$ . Освещение вызывает выцветание полосы при 680–690 нм и некоторое увеличение поглощения при 820 нм, характерное для катион-радикала хлорофилла. Характер возникающего сигнала ЭПР указывает на то, что  $P_{680}^+$  может представлять собой димер хлорофилла. Однако существуют и другие соображения о природе  $P_{680}$ , в которых учитывается, что красный сдвиг в спектре поглощения  $P_{680}$  по сравнению с мономерной формой хлорофилла намного меньше, чем соответствующий сдвиг в случае  $P_{890}$  специальной пары димер Бхл<sub>2</sub> в РЦ пурпурных бактерий. Спектральные свойства  $P_{680}$  связаны с экситонным взаимодействием фотоактивного хлорофилла с другими шестью молекулами хлорофилла, расположенными в РЦ на расстояниях больших, чем в димере. По-видимому,  $P_{680}$  представляет собой своего рода «мультимер», состоящий из нескольких слабо взаимодействующих пигментов (Тетенькин, Гуляев). Любое воздействие, нарушающее их экситонные взаимодействия, приводит к резкому уменьшению длинноволнового сдвига полосы поглощения  $P_{680}$ .

Поскольку  $P_{680}$  окисляет молекулу воды, его окислительно-восстановительный потенциал  $E_{1/2}$  должен превышать +810 мВ. Это означает, что  $P_{680}^+$  — сильный окислитель, который может окислять соседние молекулы пигментов, если восстанавливающий его «нормальный» донор в цепи не имеет электронов. Именно поэтому исследования  $P_{680}^+$  затруднены, так как накопить  $P_{680}^+$  в достаточном количестве можно только в сильно окислительных условиях и при ингибировании КВК.

Большое внимание уделяют изучению природы первичного акцептора, расположенного между  $P_{680}$  и первичным пластохиноном. Оказалось, что дифференциальные спектры фотоиндуцированных изменений поглощения субхлоропластных фрагментов, обогащенных ФС II и измеренных в восстановительных условиях, соответствуют спектру фотовосстановления феофитина (Фф). Выцветание полос поглощения при 408–410, 422–428, 685 нм, а также полос при 518 и 545 нм, появление широких полос при 450 и 650 нм, узкой полосы при 675 нм, характерны для появления Фф в реакции:



Общая схема переноса имеет вид



Как видно, восстановление  $P_{680}^+$  обеспечивается вторичным донором тирозином, который получает электроны от КВК. Роль первичного акцептора играет феофитин (Климов).

**Состав реакционного центра.** Кроме 6 молекул хлорофилла, в РЦ ФС II содержатся по 2 молекулы Фф и  $\beta$ -каротина и одна молекула цит  $b_{559}$ . Две из шести молекул хлорофилла непосредственно связаны с субъединицей кор-комплекса CP 47 и служат «воротами» для приема энергии возбуждения в РЦ из внутренней антенны ФС II. Структурной основой РЦ являются интегральные белки  $D_1$  и  $D_2$ , несколько периферических полипептидов меньшей молекулярной массы (около 10 кДа), а также цит  $B_{559}$ .

Белок  $D_1$  несет на себе первичный акцептор Фф и вторичный донор для РЦ ФС II YZ (или Z) — молекулу Тир 161, а также молекулу Гис, берущего электроны от КВК. На белке  $D_2$  расположены неактивный Тир 160 (Тир Д) и первичный хинон  $Q_A$ , берущий электрон от Фф и передающий на  $Q_B$ , который локализован на белке  $D_1$ .

На рис. XXVII.23 приведена схема структурной организации РЦ ФС II, где показан путь переноса электрона от  $H_2O$  на хиноны, Mn-содержащий комплекс разложения воды и выделения кислорода (см. ниже), а также обозначены молекулярные веса субъединиц белков, связанных с РЦ ФС II.

Цитохром  $b_{559}$  играет важную роль, обеспечивая защиту реакционного центра от фотоингибирования.

В акцепторной части молекулы хинонов  $Q_A$ ,  $Q_B$  представляют собой пластохиноны. Перенос электрона между первичным и вторичным пластохинонами  $Q_A$  и  $Q_B$  блокируется диуроном, действием низкой температуры. При низких значениях pH и пониженных температурах прерывается восстановление  $P_{680}^+$ . Одним

из методов исследования реакций, протекающих в ФС II, является регистрация флуоресценции Хла антенны, зависящей от состояния РЦ ФС II. Очевидно, тушение флуоресценции должно происходить в состоянии  $P_{680}Q_A$ , когда центр открыт (см. § 4 гл. XXVII). Восстановление  $Q_A$  переводит центры в закрытое состояние  $P_{680}Q_A^-$ , где тушение флуоресценции ослаблено, и соответственно ее интенсивность возрастает.  $\square$

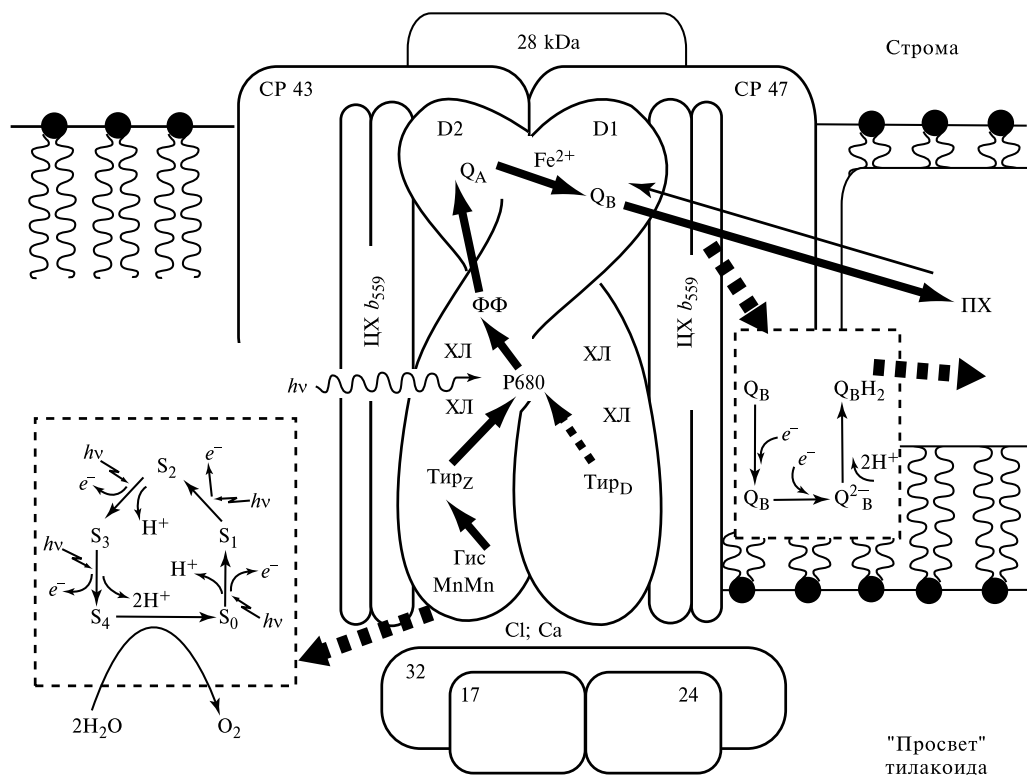


Рис. XXVII.23.

Схема структурной организации фотосистемы II

Однако тушение флуоресценции происходит и в том случае, когда центры находятся в закрытом состоянии  $P_{680}^+$ , где фотоактивный пигмент окислен. Причина этого состоит в том, что спектр поглощения катион-радикала  $Хла^+$  обладает широкой полосой в красной и ближней инфракрасной областях (600–850 нм). Это обеспечивает резонансный перенос (см. § 9 гл. XIII) энергии возбуждения от молекул антенны на  $Хла^+$  ( $P_{680}^+$ ), перевод его на нижний возбужденный электронный уровень около 820 нм с последующей деградацией энергии, не связанной уже с фотосинтезом. Таким образом, увеличение выхода флуоресценции антенны происходит

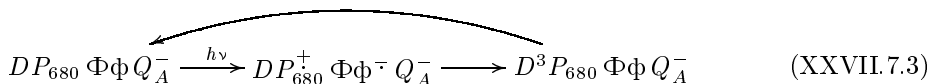
только в состоянии  $P_{680}Q_A^-$ . Если затем  $Q_A^-$  отдает электрон на  $Q_B$ , а  $P_{680}$  остается в восстановленной форме ( $P_{680}Q_A^-Q_B \rightarrow P_{680}Q_AQ_B^-$ ), то флуоресценция уменьшается.

Кинетику переноса электрона в ФС II исследовали с помощью флуоресцентных методов в условиях действия ингибиторов (диурон, низкий pH среды) и с помощью измерения флуоресценции после каждой вспышки света при действии серии последовательных вспышек. Так, давая последовательные вспышки света и варьируя темновой интервал между ними, можно измерить время, необходимое для переноса электрона от  $Q_A$  на  $Q_B$ . Кинетику появления и исчезновения  $P_{680}^+$  измеряли непосредственно в максимуме поглощения при 680 или 820 нм.  $\square$

Восстановление первичного пластохинона  $Q_A$  в опытах с двумя последовательными вспышками регистрировали по изменению поглощения при 320 нм. Было установлено, что понижение температуры или действие диурона приводит к замедлению переноса электрона на пластохинон. Как и в пурпурных бактериях, эта реакция сопровождается другими изменениями поглощения, в частности при 550 нм (эффект C-550). Этот эффект представляет собой электрохромный сдвиг полосы поглощения  $\beta$ -каротина и является индикатором восстановления  $Q_A$ , подобно тому, как в РЦ пурпурных бактерий восстановление  $Q_A$  сопровождается электрохромным сдвигом полосы поглощения бактериофеофитина.

В последнее время появились данные о гетерогенном характере первичного акцептора  $Q_A$ . В присутствии диурона, когда не происходит повторного окисления  $Q_A$  за счет дальнейшего переноса электрона на  $Q_B$ , выход флуоресценции является мерой общего количества фотовосстанавливающихся молекул  $Q_A$ . Обычно кинетика фотовосстановления носит двухфазный характер: быстрая  $\alpha$  и медленная  $\beta$  экспоненциальные фазы, регистрируемые по индукционной кривой нарастания флуоресценции. Если перед освещением препараты инкубировать при определенном значении окислительно-восстановительного потенциала среды, то последующее фотоиндуцированное увеличение флуоресценции будет тем меньше, чем больше молекул  $Q_A$  химически восстановлено в темноте. Кривая окислительно-восстановительного титрования флуоресценции хлоропластов в присутствии диурона имеет явно выраженный двухфазный характер с двумя компонентами:  $E_{1/2} \approx -250$  мВ ( $Q_A^L$ ) и  $E_{1/2} \approx 0$  мВ ( $Q_A^H$ ). Быстрая  $\alpha$ -фаза восстановления  $Q_A$  соответствует высокопотенциальному  $Q_A^H$ , а более медленная  $\beta$ -фаза — низкопотенциальному  $Q_A^L$  в соответствии с наличием двух типов фотосистем: ФС II $_{\alpha}$  и ФС II $_{\beta}$ , возможно, локализованных в разных частях тилакоида.

С помощью метода ЭПР при температуре жидкого Не был обнаружен сигнал, соответствующий триплетному состоянию  $^3P_{680}$ . Так же как и в препаратах бактериальных РЦ, триплетный сигнал появляется только при освещении РЦ, у которых в темноте исходно восстановлен первичный пластохинон. Если в исходном состоянии перед освещением ФФ находился в восстановленном состоянии, то амплитуда триплетного сигнала резко уменьшалась. Происходящие в РЦ ФС II процессы образования радикальной пары и триплетных состояний можно суммировать на схеме:

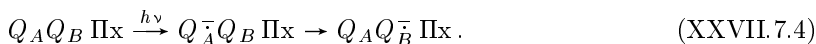




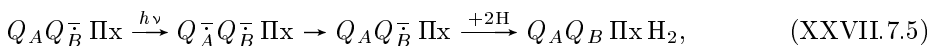
ющем первичный и вторичный хинонные акцепторы  $Q_A$  и  $Q_B$ . Изучение этого процесса дает важную информацию о физических механизмах переноса электрона в ЭТЦ (см. гл. XXVIII).

Большая часть экспериментальных данных по кинетике переноса электронов в хинонном комплексе была получена с помощью освещения короткими световыми вспышками хлоропластов или изолированных РЦ, хромофоров и целых клеток пурпурных бактерий.

В хлоропластах в ответ на первую вспышку индуцируется перенос



В ответ на вторую



где Пх — пул пластохинонов. Здесь не отображены фотохимические реакции  $P_{680}$ , который окисляется на каждую вспышку  $P_{680} \rightarrow P_{680}^+$ , отдавая электрон на  $Q_A$ , и быстро восстанавливается от  $D_1$ . Известно, что семихиноны  $Q^-$  характеризуются поглощением в спектральной области 320–450 нм (появление такого поглощения ясно указывает на образование семихинона). Поэтому если осветить РЦ одиночной вспышкой света, то возникает поглощение при 320–450 нм, которое не изменяется при переходе  $Q_A^- Q_B \xrightarrow{200-500 \text{ мкс}} Q_A Q_B^-$ , так как число семихинонов при этом остается тем же. Состояние может сохраняться в темноте в течение нескольких секунд. Однако после второй вспышки света происходит уже образование дважды восстановленного хинона  $Q_B^{2-}$  и исчезновение полосы поглощения семихинона. Молекула  $Q_B^{2-}$  протонируется из внешнего окружения и обменивается с одной молекулой хинона из пула Пх, занимая ее место. Система возвращается в исходное состояние с той лишь разницей, что одна молекула пула теперь протонирована:  $\text{ПхH}_2$ . Третья вспышка опять приводит к образованию семихинонных радикалов и соответствующему увеличению поглощения. Колебания оптического поглощения в области 320–450 нм соответствуют образованию и распаду семихинонного радикала, что сопровождается аналогичными колебаниями сигнала ЭПР ( $g = 1,82$ ).

В препаратах хромофоров и РЦ пурпурных бактерий перенос электронов в пул убихинонов происходит аналогичным образом и также приводит к появлению осцилляций (рис. XXVII.25). Двухтактные колебания наблюдаются, как правило, в хромофорах, к которым добавляется медиатор  $M$ , быстро восстанавливающий фотоокисленный пигмент перед очередной вспышкой света.

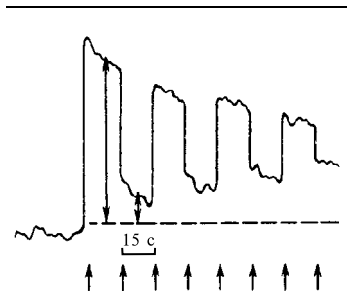
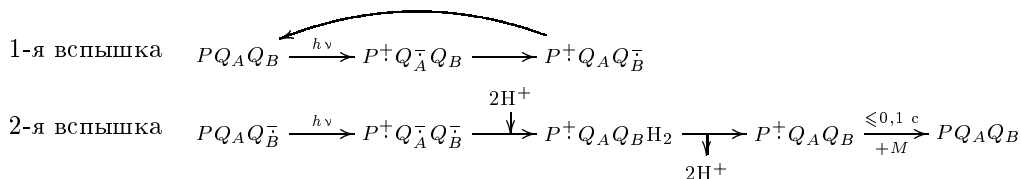


Рис. XXVII.25.

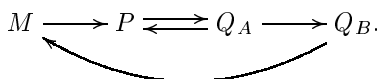
Изменение поглощения  $\Delta A$  семихинонной формы вторичного хинонного акцептора под действием последовательных вспышек света

Общая схема процесса имеет вид



Образованный дважды восстановленный вторичный хинон  $Q_B H_2$  быстро окисляется при достаточно высоких окислительно-восстановительных потенциалах среды. Наоборот, семихинонный вторичный акцептор  $Q_B^-$  более стабилен и медленно окисляется за счет реакции с окисленной формой медиатора. Стабильность связи семихинонной формы  $Q_B^-$  с белком РЦ по сравнению с  $Q_B H_2$  может быть обусловлена сильным электростатическим взаимодействием положительно заряженной имидазольной группы гистидинового остатка или  $Fe^{2+}$  белка с отрицательно заряженным  $Q_B^-$ . Ингибитор переноса электрона *o*-фенантролин обратимо вытесняет  $Q_B$  с места специфического связывания на белке, однако не оказывает ингибирующего действия на перенос электрона от  $Q_A$  к семихинонной форме  $Q_B^-$ , прочно связанной с белком РЦ.

Упрощенная схема взаимодействия в акцепторной части РЦ пурпурных бактерий с медиатором имеет вид



На рис. XXVII.26 (Feher G.) показаны наиболее вероятные протон-транспортные пути из цитоплазматического пространства в интерьер  $Q_B$  с аминокислотными остатками серин L 223 и глутамат L 212 в качестве конечных звеньев проведения соответственно первого и второго протонов путем эстафетной передачи по цепочкам водородных связей по механизму Гротгуса (XXII, § 4). Данная схема была построена на основе анализа рентгеноструктурных данных и результатов по влиянию на протонный транспорт замены конкретных аминокислотных остатков в окружении  $Q_B$  методами направленного точечного мутагенеза (см. § 8). При замене полярного остатка аспарат L 213 с группой  $COO^-$  на неполярный аспаратин L 213 перенос протона блокируется, что указывает на роль электростатических взаимодействий в стабилизации протона. Интересно, что функциональную активность можно вновь восстановить путем замены аспарагин M 44 на аспарат M 44 в другой M-субъединице. Очевидно, влияние электростатических взаимодействий может передаваться по белковой глобуле в силу кооперативных свойств.

**Выделение кислорода.** Окисление воды катализируется КВК, представляющим собой один из главных компонентов ФС2. Вода является источником электронов и протонов для синтеза фотосинтетическим аппаратом высокоэнергетических соединений (НАДФ и АТФ), используемых затем в темновых реакциях. В результате фотолиза воды образуется также побочный продукт — молекулярный кислород, выделяющийся в наружную среду. Поскольку эта реакция является практически единственным источником кислорода на нашей планете, важность ее трудно переоценить.



Каталитическим центром КВК является четырехъядерный кластер марганца, осуществляющий окисление в каждом каталитическом акте 2-х молекул воды и синтез одной молекулы кислорода, при этом во внутритилакоидное пространство

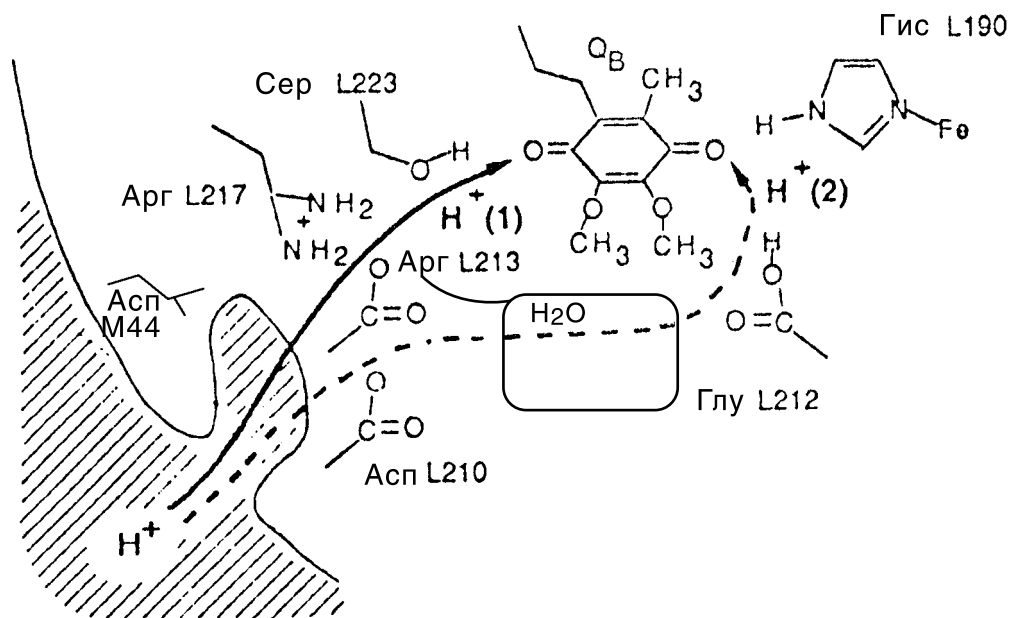


Рис. XXVII.26.

Вероятные пути переноса первого  $H^+$  (1) и второго  $H^+$  (2) протонов к восстанавливаемому вторичному хинону в РЦ пурпурных бактерий. Штриховкой указана область локализации пула связанных в структуре РЦ вблизи  $Q_B$  молекул воды (по М. У. Okamura, G. Feher, 1992)

выделяются четыре протона, а по фотосинтетической электрон-транспортной цепи на восстановление НАДФ $^+$  уходят четыре электрона. Для обеспечения этой реакции необходимо последовательное поглощение 4-х квантов света. Поглощение реакционным центром кванта света сопровождается разделением зарядов — восстановлением феофитина и окислением первичного донора  $P_{680}$ . Окисленный первичный донор  $P_{680}^+$  обладает уникально высоким для биологических соединений окислительно-восстановительным потенциалом (около 1,2 В), достаточным для окисления воды, и окисляет вторичный донор электронов, которым является редокс-активный остаток тирозина  $Y_Z$ , расположенный в позиции 161 в аминокислотной последовательности интегрального полипептида D1 (33 кДа). Полипептид D1 совместно с полипептидом D2 (33 кДа) формируют реакционный центр ФС II. В свою очередь окисленный переносчик электронов  $Y_Z$  (редокс-потенциал пары  $Y_Z/Y_Z\cdot$  около 1 в) окисляет марганцевый кластер. Последовательное поглощение 4-х квантов света сопровождается последовательным удалением из марганцевого кластера 4-х электронов, после

чего окисленный марганцевый кластер окисляет две молекулы воды и восстанавливается до исходного редокс-состояния, завершая тем самым каталитический цикл. Этот каталитический цикл носит название *S*-цикла и показан на рис. XXVII.27, А.

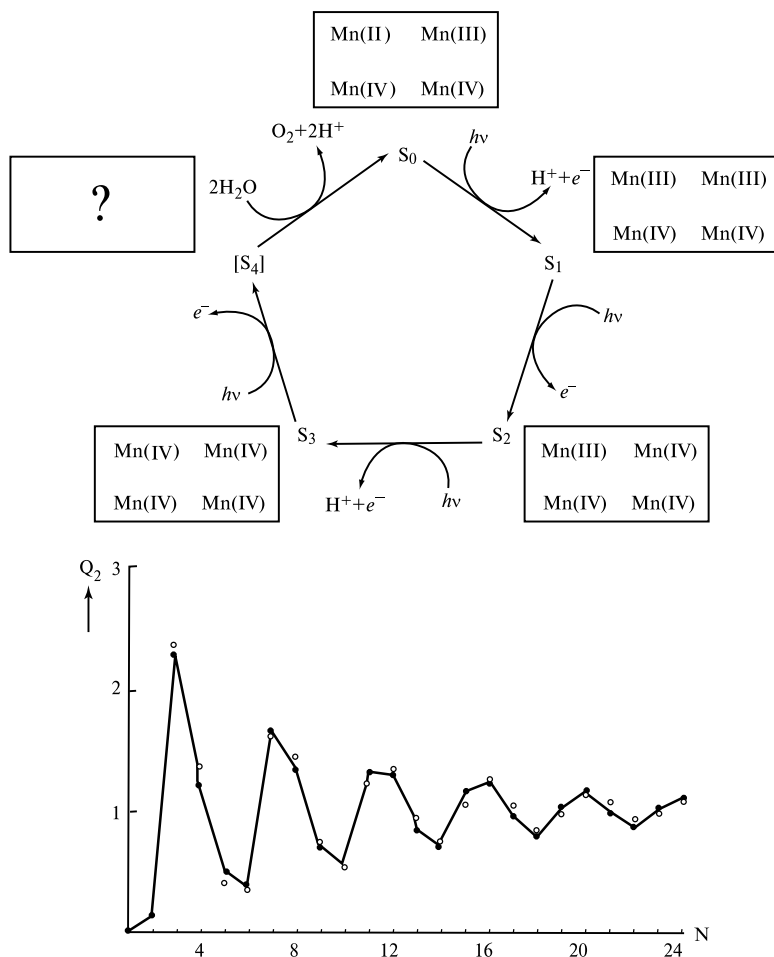


Рис. XXVII.27.

А) Цикл *S*-состояний марганцевого кластера КВК. В рамках показан состав кластера для каждого из *S*-состояний. Б) Выделение  $O_2$  в зависимости от номера  $N$  вспышки

*S*-цикл состоит из 5-ти *S*-состояний  $S_0$ – $S_4$ . Каждому *S*-состоянию соответствует определенная степень окисленности катионов, образующих марганцевый кластер (показано в рамках на рис. XXVII.27). Поглощение реакционным центром каждого из 4-х квантов света сопровождается одноэлектронным окислением катионов марганца и последовательным переходом кластера от низшего состояния  $S_0$  к высшему

состоянию  $S_4$ . По-видимому, в этом процессе имеется одно исключение, а именно, при переходе из состояния  $S_2-S_3$  имеет место окисление не катиона марганца, а остатка гистидина, входящего в состав координационной сферы марганцевого кластера. После последовательной экстракции из марганцевого кластера 4-х электронов кластер переходит в нестабильное состояние  $S_4$ , из которого без влияния света кластер возвращается в интервале 1 мс в исходное состояние  $S_0$  за счет восстановления электронами из воды; при этом выделяется молекула кислорода. Окисление воды и, по-видимому, ее связывание с марганцевым кластером имеют место только в состоянии  $S_4$ . Выделение протонов в процессе  $S$ -цикла происходит при переходе  $S_0-S_1$  (один протон),  $S_2-S_3$  (один протон) и  $S_4-S_0$  (два протона).

Функционирование КВК успешно изучают по кинетике выделения  $O_2$  на одиночные световые вспышки (1–10 мкс). Выход  $O_2$  на отдельную вспышку зависит от номера вспышки в серии из нескольких последовательных вспышек. Эта зависимость проявляется в виде затухающих колебаний в выделении  $O_2$  на каждую вспышку с периодом в четыре вспышки: максимальный выход наблюдается на 3, 7, 11 и т. д. вспышку (рис. XXVII.27, Б).

Темновая дезактивация более окисленных состояний в менее окисленные происходит по одноступенчатому механизму ( $S_3-S_2-S_1$ ). После длительного освещения постоянным светом устанавливается равномерное распределение по состояниям  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  (25% в каждом из состояний). В результате последующей темновой адаптации и перехода  $S_3-S_1$  и  $S_2-S_1$  устанавливается такое распределение: 25%  $S_0$ , 75%  $S_1$  и 0%  $S_2$  и  $S_3$ , поскольку состояния  $S_2$  и  $S_3$  в темноте нестабильны и в интервале от нескольких секунд до нескольких минут переходят в состояние  $S_1$ . Для активации КВК, адаптированного к темноте, и перевода его в состояние  $S_3$  необходимо дать две вспышки, которые переведут 75% из состояния  $S_1$  в  $S_3$ . Третья по счету вспышка вызовет переход  $S_3-S_4$  и интенсивное выделение  $O_2$ , что и наблюдается в опытах. Характерные времена переходов между состояниями  $S_0-S_1$ ,  $S_1-S_2$ ,  $S_2-S_3$  находятся в пределах 200–500 мкс, что близко к временам преноса  $Q_A-Q_B$ , тогда как переход  $S_3-S_0$  занимает несколько мс.

Помимо марганца необходимым компонентом КВК являются катион кальция и один или несколько анионов хлора. Роль этих кофакторов в механизме окисления воды неясна, однако в их отсутствии кислород не выделяется. Кальций расположен в непосредственной близости от марганцевого кластера и связан с ним мостиком, роль которого играет карбоксильная группа аспарагиновой или глутаминовой аминокислоты. По видимому, этот катион обеспечивает либо доступ воды к марганцевому кластеру, либо отток протонов, образующихся при депротонировании воды, от марганцевого кластера в наружную среду. Анион хлора, возможно, связан с одним из катионов марганца.

В последнее время с привлечением современных методов рентгеновской абсорбционной спектроскопии (EXAFS, extended X-ray absorption spectroscopy fine structure) удалось достичь больших успехов в изучении структуры марганцевого кластера. Согласно предложенной на основании этих данных модели, марганцевый кластер состоит (рис. XXVII.28) из двух димеров, в каждом из которых катионы марганца расположены относительно друг друга на расстоянии 2,7 Å и соединены между собой двумя кислородными мостиками. В свою очередь димеры расположены относительно друг друга на расстоянии 3,3 Å и соединены между собой

кислородным мостиком и одной или двумя карбоксильными группами. В состав лигандов катионов марганца входят остатки гистидина и карбоксильные группы аспарагиновой и/или глутаминовой аминокислот. Результаты точечного мутагенеза указывают на то, что эти аминокислотные остатки принадлежат полипептидам D1 и D2, образующим реакционный центр ФС II, и расположены с внутренней стороны тилакоидной мембраны.

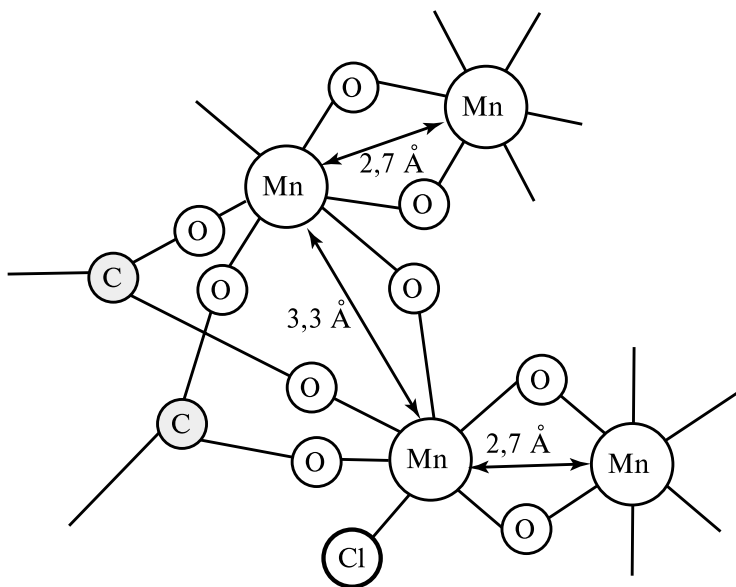
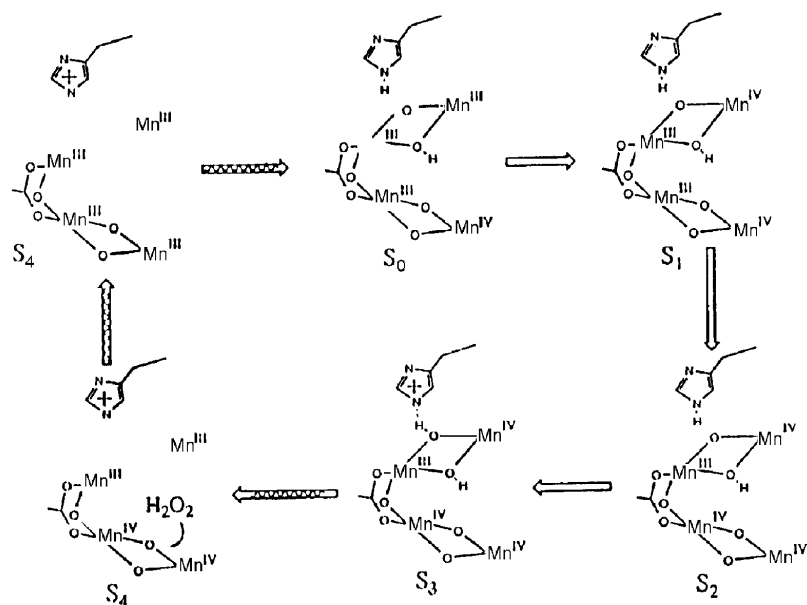


Рис. XXVII.28.

Модель марганцевого кластера КВК, предложенная на основании данных рентгеновской спектроскопии (по Yachandra et al., 1993)

На основе этой модели был предложен механизм окисления воды, схематически показанный на рис. XXVII.29. Согласно предложенной схеме в одном из димеров в процессе окисления марганцевого кластера происходит образование молекулы перекиси водорода, которая выделяется и разлагается с образованием молекулы кислорода с участием второго димера марганца. Образование перекиси водорода происходит следующим образом. В фотолизе воды принимает участие редокс-активный остаток гистидина, который окисляется при переходе из состояния  $S_2$  в состояние  $S_3$ . Окисление гистидина сопровождается изменением его рК, в результате чего образуется водородная связь между гистидином и кислородом, формирующим мостик в одном из димеров марганца. Дальнейшее одноэлектронное окисление марганцевого кластера ( $S_3 \rightarrow S_4$ ) сопровождается образованием связи между двумя протонированными атомами кислорода — мостиками в димере — и формированием молекулы перекиси водорода. Перекись водорода высвобождается и разлагается с участием второго димера марганца.

A



B

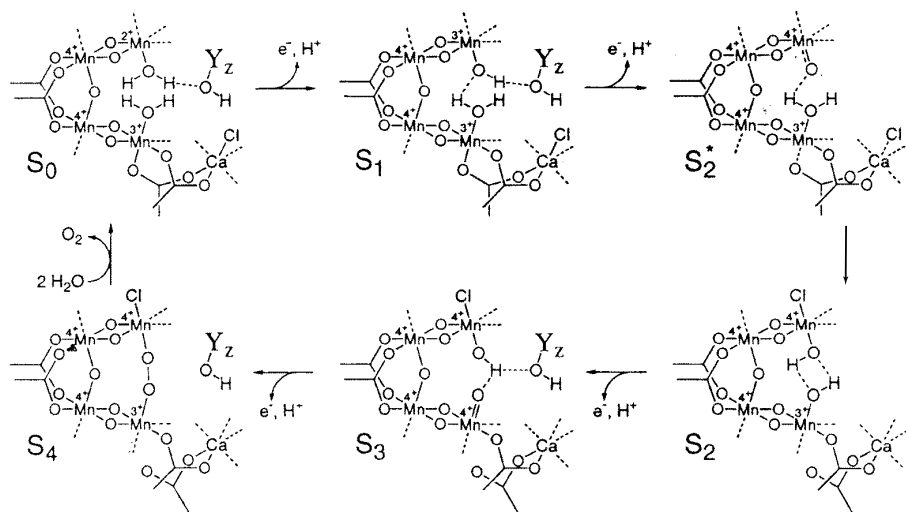


Рис. XXVII.29.

Гипотетический механизм фотоллиза воды в ФС II

A) с участием гистидина (по V. L. Pecoraro)

B) с участием тирозина (по C. Tommos, G. T. Babcock, 1998)

Как уже отмечалось выше, окисление марганцевого кластера осуществляется окисленным вторичным донором  $Y_Z$ . Однако, роль этого компонента в функционировании донорного участка может быть более сложной. По-видимому, он не только участвует в переносе электронов от марганцевого кластера к  $P_{680}^+$ , но и является, наряду с ионами марганца, кальция и хлора, составным элементом КВК, участвуя в депротонировании воды в процессе ее окисления.

Таким образом, согласно современным представлениям КВК, осуществляющий фотолиз воды, состоит (рис. XXVII.30) из четырехъядерного кластера марганца, образованного двумя димерами, катиона кальция, связанного с марганцевым кластером карбоксильной группой глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, аниона хлора, входящего в координационную сферу марганцевого кластера, редокс-активного остатка гистидина, связанного с одним из катионов  $Mn$ , и редокс-активного остатка тирозина ( $Tyr_Z$ ), участвующего не только в переносе электрона от марганцевого кластера к первичному донору  $P_{680}^+$ , но и, по-видимому, в депротонировании воды в процессе ее окисления.

## **§ 8. Использование направленного мутагенеза для изучения первичных процессов фотосинтеза**

Мы видели, что активность фотосинтетических систем существенно зависит от сбалансированного взаимодействия между белками и редокс-активными простетическими группами, входящими в состав этих комплексов.

Первичная аминокислотная последовательность большинства структурных белков хорошо изучена. Для ряда белков реакционных центров определена и трехмерная пространственная структура. Однако структурно-функциональные соотношения в таких сложных системах не всегда очевидны. Именно поэтому направленная модификация структуры белка с параллельным контролем фотосинтетической активности является одним из наиболее мощных инструментов исследования механизмов процесса фотосинтеза.

Модификация структуры белка может быть достигнута, например, путем мутации гена, кодирующего его биосинтез.

Условно можно выделить 2 типа мутагенеза:

- а) случайные мутации,
- б) направленный, или специфический мутагенез.

Самопроизвольные или индуцированные случайные мутации — явление достаточно широко известное. Среди наиболее распространенных мутагенных факторов можно отметить ионизирующее излучение, ультрафиолет, некоторые химические мутагены и др. С помощью мутагенных воздействий были получены и выделены мутанты фотосинтезирующих организмов, дефицитные по тем или иным комплексам (реакционный центр, фотосистемы I или II, светособирающая антенна и др.) или отдельным компонентам комплексов (каротиноиды, некоторые полипептиды).

При изучении подобных мутантов были получены очень интересные и показательные результаты. Однако, случайный характер возникновения мутаций, плеiotропный, а в некоторых случаях скрытый, характер их проявления существенно ограничивает возможности использования классического мутагенеза.

В последнее время в молекулярной генетике все большее применение начинают получать методы сайт-специфического или направленного мутагенеза. Уже первые опыты их применения для исследования первичных процессов фотосинтеза дали очень интересные и многообещающие результаты. Остановимся кратко на этих данных и на особенностях направленного мутагенеза фотосинтезирующих организмов.

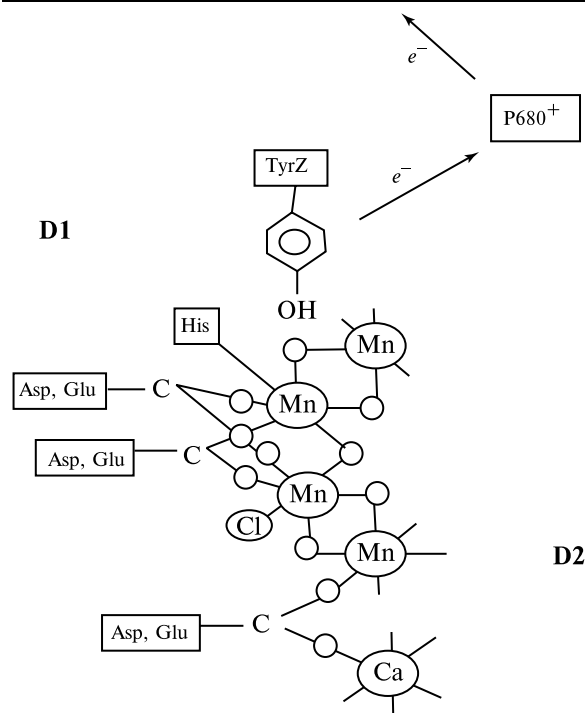


Рис. XXVII.30.

Схема организации КВК в ФС II

Обычно направленный мутагенез включает стадии выделения гена, интересующего экспериментатора, модификации (in vitro) с последующим повторным введением модифицированного гена в исходный организм.

Гомологичная рекомбинация ДНК, необходимая для введения генов в клетку, эффективно протекает, как правило, только у прокариотов. Именно поэтому круг фотосинтезирующих организмов, подвергнутых направленному мутагенезу, в настоящее время ограничен бактериями и некоторыми одноклеточными водорослями.

Выделяют 3 основных методических подхода к направленному мутагенезу:

1. Делеция или инактивация гена.
2. Замена нативного гена на гомологичный ген из другого организма.
3. Сайт-специфичный мутагенез, при котором происходит точечная замена только одного из оснований в молекуле ДНК.

Наиболее мощным и направленным методом воздействия на структуру белка является сайт-специфичный мутагенез, успешно применявшийся для изучения биосинтеза белков синтетического аппарата цианобактерии *Synechocystis*.

Благодаря точечным мутациям оснований в молекуле ДНК происходит направленная замена одних аминокислот в структуре белка на другие.

Направленным мутагенезом гена *psbA*, кодирующего биосинтез белка D1 фотосистемы II цианобактерии *Synechocystis*, замещали остаток Тир 169 этого белка на Фен. Фототрофный рост бактерий при этом подавляется, а по характеристикам электрон-транспортных реакций (сигналы ЭПР, спектры поглощения) можно заключить, что остаток Тир 161 служит непосредственным донором электронов для  $P_{680}^{+}$  в фотосистеме II. Аналогичные исследования, выполненные на фотосинтезирующих бактериях *Rb. sphaeroides*, показали, что остаток Тир 162 субъединицы *L* белка реакционного центра участвует в переносе электрона от цитохрома *c* на  $P_{870}$ .

С несколько иной целью метод направленного мутагенеза был применен при исследовании структуры первичного донора в бактериальном фотосинтетическом реакционном центре. Известно, что аксиальными лигандами атомов Mg в димере бактериохлорофилла служат остатки Гис 173 и Гис 200. При замене Гис 200 на Phe или Leu происходит выпадение Mg и феофитинизация одной из молекул бактериохлорофилла в димере. Такая модификация реакционного центра и образование гетеродимера не ингибирует фотохимической активности, но изменяет кинетические и спектральные характеристики процессов переноса электрона. Так, величина квантового выхода первичного разделения зарядов у мутанта уменьшена в 2 раза по сравнению с контролем, а константа скорости этой реакции упала до  $k = 1/30 \text{ пс}^{-1}$  по сравнению с  $k = 1/4 \text{ пс}^{-1}$  у интактных центров.

Аналогичные исследования проводятся по изучению роли аминокислотных остатков белков в других сайтах, фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

Увеличение числа водородных связей при замене Фен или Лей на Гис, наоборот, замедляет процесс разделения зарядов за счет уменьшения скорости релаксационных процессов в РЦ (см. гл. XXVIII).

Следует особо подчеркнуть, что само по себе изменение эффективности процесса переноса электрона при замене путем точечной мутации одной аминокислоты на другую не всегда говорит о непосредственном участии данного аминокислотного остатка в механизме изучаемой реакции. Обнаруживаемая при этом корреляция может иметь и опосредованный характер в силу изменения общих структурных особенностей белков РЦ при их модификации. Уместно провести в этих случаях аналогию с аллостерическим эффектом ингибирования ферментов, который достигается вследствие взаимодействия ингибитора с белковой глобулой в месте, удаленном от активного центра. Причина этого состоит в кооперативных свойствах белка, в результате чего локальные структурные изменения могут распространяться по всей глобуле, влияя на функциональные свойства белка.

## § 9. Методы исследования сверхбыстрых процессов в реакционных центрах фотосинтеза

В предыдущих разделах мы рассматривали процессы переноса электрона в реакционных центрах фотосинтеза.

На рис. XXVII.31 представлена обобщенная схема транспорта электрона в РЦ бактериального фотосинтеза и фотосистем I и II. Как видно, между тремя типа-



ми РЦ существует определенное сходство в отношении кинетики основных стадий переноса электрона. Быстрое начальное разделение заряда ( $\tau \lesssim 3$  пс) и восстановление первичным фотоактивным донором ( $P_{870}$ ,  $P_{700}$ ,  $P_{680}$ ) первичного акцептора порфириновой природы (Бфф, Хл, Фф) сопровождается последующим более медленным ( $\tau \sim 150$  пс) переносом заряда на вторичные акцепторы хинонной природы  $Q_A$  (убихинон, филлохинон, пластохинон), а затем далее за  $\tau \sim 100$  мкс — на  $Q_B$  (убихинон, пластохинон) или железо-серные центры (ФС I).

Окисленный фотоактивный донор  $P$  восстанавливается (за  $\sim 2$  мкс) от вторичного донора  $D$ , роль которого выполняет цитохром  $c$ , пластохинон или тирозин. Обратные реакции переноса электрона происходят намного медленнее прямых ( $\tau \sim 1\text{--}10$  нс), что обеспечивает высокую эффективность общего потока электронов.

Расшифровка деталей этой кинетической картины стала возможной благодаря применению новых методов лазерной пикосекундной и фемтосекундной спектроскопии. Ниже на конкретных примерах мы рассмотрим характер экспериментальных данных, анализ которых лежит в основе модели первичных процессов в РЦ. Этот материал полезен также в качестве иллюстрации принципиальной роли биофизических методов как источника новой информации о молекулярных механизмах сверхбыстрых ( $\tau \leq 10^{-12}$  с) процессов в интактных биологических объектах.

Напомним, что применение спектральных абсорбционных методов в фотосинтезе основано на том, что возникающее при приеме и отдаче электрона редокс-состояние промежуточных переносчиков отличаются друг от друга спектрами

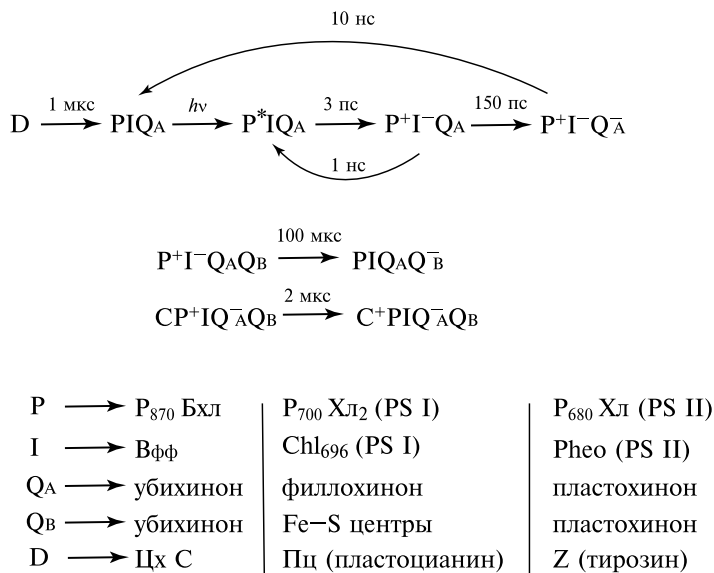


Рис. XXVII.31.

Обобщенная схема транспорта электрона в РЦ бактериального фотосинтеза и фотосистем I и II

поглощения, которые обладают характерными максимумами. Поэтому кинетика изменения поглощения при определенных длинах волн соответствует кинетике окислительно-восстановительных превращений того или иного переносчика, т. е. отражает реакции прихода и ухода электрона.

На рис. XXVII.32, а, приведен спектр поглощения РЦ пурпурных бактерии (*Rb. sphaeroides*), на котором обозначены максимумы поглощения отдельных форм пигментов. Как видно, Бфф имеет максимум при 545 нм и 750 нм, мономерный Бхл — при 600 нм, 800 нм, а димер Бхл<sub>2</sub> фотоактивного пигмента — при 890 нм ( $P_{890}$ ). На рис. XXVII.32, б показан абсорбционный дифференциальный спектр, получающийся в результате образования восстановленного Бфф при освещении. Он представляет собой разность спектров поглощения на свету и в темноте («свет минус темнота») (ср. рис. XXVII.16). На спектре обозначены отрицательные (545 нм, 750 нм) максимумы, соответствующие появлению анион-радикала Бфф в результате исчезновения нейтрального Бфф ( $\text{Бфф} \rightarrow \text{Бфф}^-$ ). Видно также, что  $\text{Бфф}^-$  характеризуется и появлением положительного максимума в районе 665–675 нм. Кроме того, появление отрицательного заряда на Бфф приводит вследствие электрохромного эффекта к сдвигу в коротковолновую область полосы поглощения мономерного Бхл, что проявляется в характерных полосах в дифференциальном спектре при 600 нм и 800 нм.

Образование катион-радикала  $P_{890}^+$  видно на рис. XXVII.32, в, где обозначены полоса выцветания при 890 нм и положительные изменения в области 1100–1300 нм, характерные для окисленного димера Бхл<sub>2</sub><sup>+</sup>. Положения этих максимумов сильно зависит от вида бактерий и от условий эксперимента: интенсивности освещения, температуры, редокс-потенциала среды, наличия экзогенных доноров и акцепторов электронов в среде, содержащей РЦ. Это подчас представляет определенные трудности для правильной интерпретации формы дифференциальных спектров. Тем не менее по изменению во времени амплитуды максимумов при определенных длинах волн под действием коротких вспышек света можно судить о кинетике и о последовательности актов переноса электрона на отдельных участках цепи в РЦ. Мы рассмотрим сущность этого подхода на примере изучения транспорта электрона в РЦ пурпурных бактерий на акцепторном участке  $P_{890}$  Бхл Бфф  $Q_A$  (§ 5).

Посмотрим, каким образом изучается перенос электрона между  $P^*$  и Бфф. Поскольку  $P^*$  теряет оптический возбужденный электрон, отдавая его Бфф, он не поглощает больше в основной длинноволновой полосе  $Q_Y$  перехода.

Кинетика выцветания поглощения основного максимума  $P$  будет соответствовать образованию катион-радикала  $P^+$ . Одновременно надо знать и изменение во времени образования катион-радикала  $\text{Бфф}^-$ . Для этого измеряют поглощение при длинах волн (545 нм, 675 нм) максимумов в спектре поглощения анион-радикала  $\text{Бфф}^-$ . Затем проводят сравнение двух кинетических кривых: выцветание длинноволновой полосы поглощения  $P^+$  и изменение поглощения в спектре анион-радикала  $\text{Бфф}^-$ . Совпадение характерных времен обоих спектральных изменений, т. е. совпадение во времени появления  $P^+$  с образованием  $\text{Бфф}^-$  и будет основой для заключения о непосредственном взаимодействии переносчиков  $P$  и Бфф в переносе электрона  $P^* \text{Бфф} \rightarrow P^+ \text{Бфф}^-$ .

Как мы увидим ниже, в ряде случаев удается зарегистрировать также изменение в области спектра, характерной для образования анион-радикала мономерного

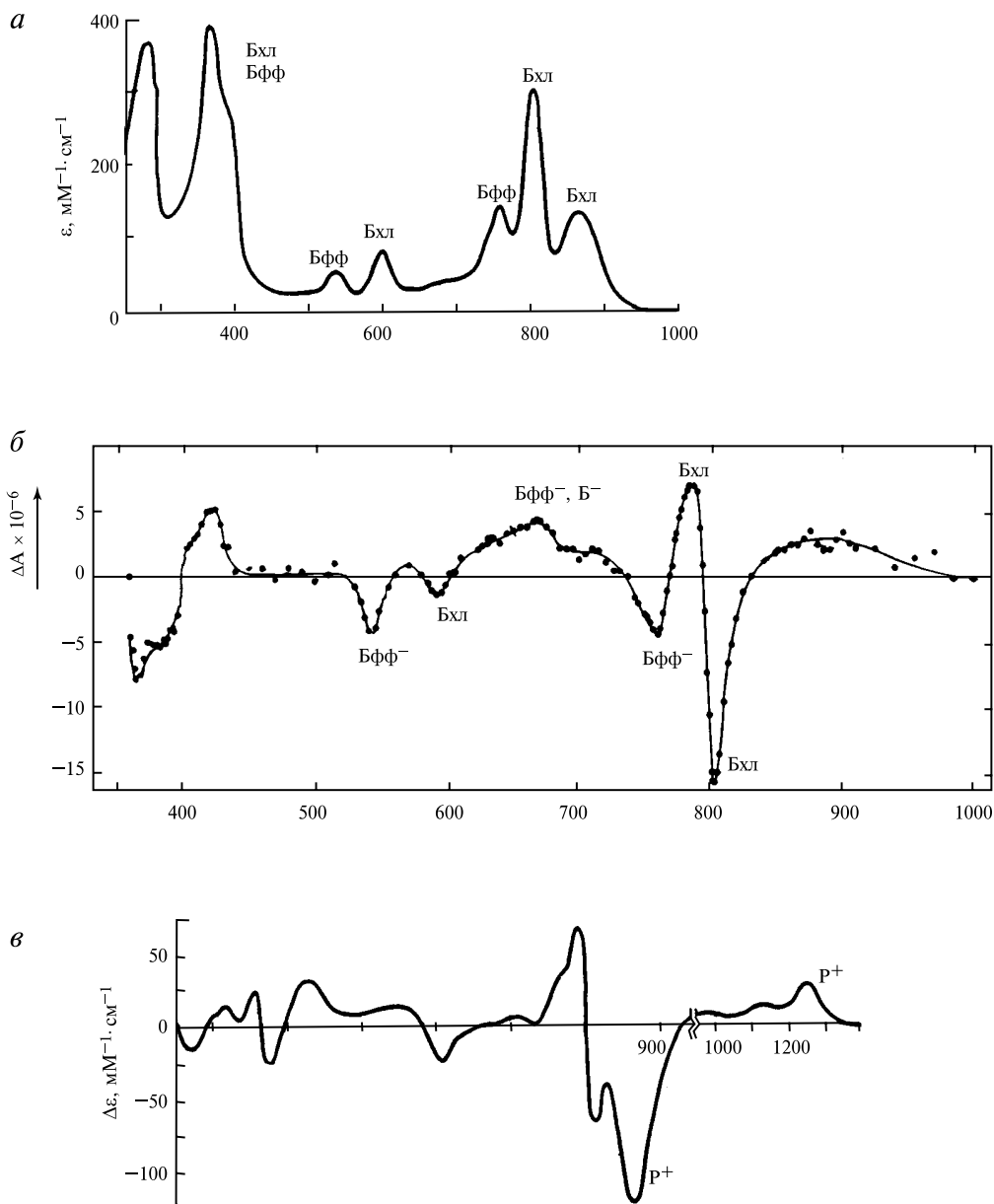
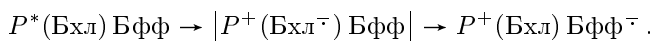


Рис. XXVII.32.

Спектр поглощения (а) и дифференциальные спектры поглощения (б, в) реакционных центров бактерий (объяснения в тексте) ((а) и (в) по R. Clayton, 1980; (б) по V. A. Shuvalov, V. V. Klimov, 1976).

Бхл. Это указывает на возможное участие Бхл в качестве промежуточного переносчика в транспорте электрона (§ 5)



Понятно, что такой же подход может применяться и для изучения кинетики переноса электрона на других этапах, где спектральные эффекты определяются только образованием и исчезновением анион-катион-радикалов переносчиков.

Однако на участке  $P \text{Бхл} \text{Бфф} Q_A$  начальное возникновение электронного возбуждения состояния  $P^*$  является причиной того, что на коротких временах ( $\tau \sim 10^{-12}$ – $10^{-13}$  с) в спектральные изменения дают свой вклад и другие процессы.

Объединение основного уровня поглощения за счет перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  и образования  $P_{890}^*$  сопряжено с появлением новых полос поглощения, характерных для возбужденного состояния и переходов  $S_1 \rightarrow S_2$  на высшие возбужденные синглетные уровни. Это новое фотоиндуцированное поглощение возникает одновременно с исчезновением (фотовыцветанием) основной полосы поглощения  $P$ . Оно существует только в течение времени сохранения возбужденного состояния  $S_1$  в  $P^*$ . Оно исчезает со временем, равным времени дезактивации синглетного возбужденного состояния или тушения флуоресценции фотоактивного димера  $P^*$ .

Поскольку основной вклад в тушение возбуждения  $P^*$  дают процессы ухода электрона от  $P$  на следующий акцептор, то время затухания флуоресценции  $P^*$  должно совпадать со временем отрыва электрона от димера Бхл в РЦ. Помимо фотовыцветания основной полосы поглощения, которое наблюдается одновременно с переходом  $S_0 \rightarrow S_1$  в  $P$ , дальнейший уход электрона от  $P^*$  приводит к образованию вследствие этого катион-радикала  $P^{\cdot+}$  и соответственно к появлению новых положительных изменений поглощения в спектре при 1200–1350 нм. Время нарастания этих изменений равно времени переноса электрона от  $P^*$  на соседний акцептор. Восстановление поглощения основной полосы происходит позднее ( $\tau \sim 2$  мкс) от вторичного донора электрона  $D$ .

Очевидно, наибольшие спектральные эффекты достигаются, когда возбуждение РЦ осуществляется в области основной полосы поглощения  $P$ . Однако это создает экспериментальные трудности в регистрации эффекта фотовыцветания максимума  $P_{890}$  из-за перекрывания длин волн действующей лазерной вспышки и сканирующего измеряющего луча света.

Поэтому в ряде случаев применяется метод так называемого стимулированного, или вынужденного свечения. Если освещать возбужденные молекулы в состоянии  $S_1$  светом, который обычно поглощается этой молекулой на основном уровне  $S_0$ , то в результате резонансного взаимодействия будут индуцироваться переходы возбужденного уровня  $S_1$  на основной уровень  $S_0$ , которые сопровождаются испусканием света флуоресценции (ср. гл. X, § 2, (X.2.16)). Интенсивность этого индуцированного свечения очевидно зависит от заселения возбужденного уровня  $S_1$  в момент действия измерительного света. По мере уменьшения количества возбужденных молекул в состоянии  $S_1$  вследствие их дезактивации в РЦ интенсивность индуцированного свечения падает. Таким образом, регистрируя после лазерной вспышки изменение во времени интенсивности индуцированного зондирующим светом свечения с длиной волны в основной полосе поглощения  $P$ , можно судить о кинетике дезактивации возбуждения  $P^*$  в РЦ, связанной с отрывом электрона от  $P$ .

В реальных измерениях появление вынужденного излучения приводит к кажущемуся уменьшению поглощения в РЦ измеряющего света, что регистрируется как дополнительное фотовыцветание основной полосы поглощения. Можно, однако, проводить регистрацию вынужденного излучения и при других длинах волн в полосе флуоресценции, где нет перекрывания с длиной волны измерительного света.

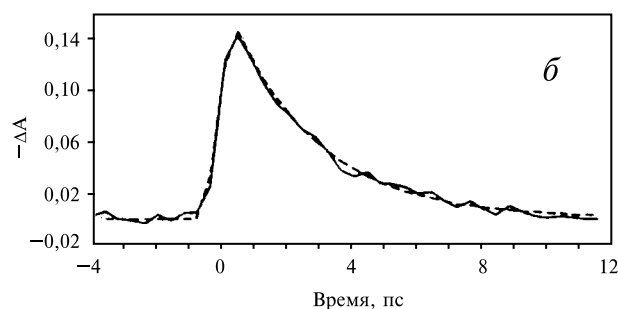
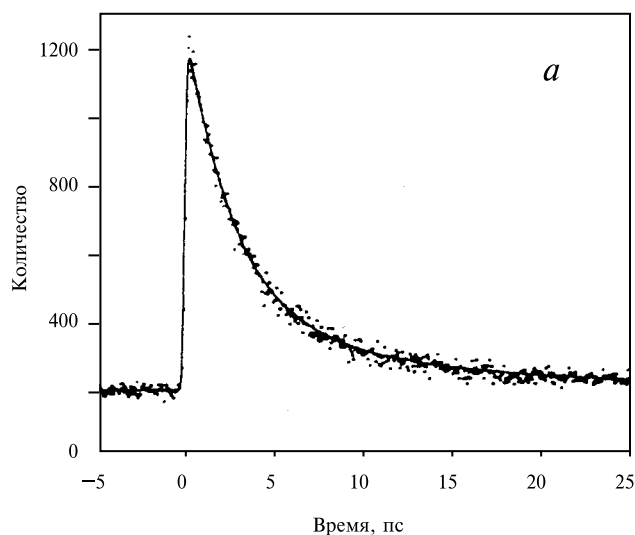


Рис. XXVII.33.

*а* — Затухание самопроизвольного излучения от  $P^*$  в *Rb. sphaeroides* R26 при возбуждении при 850 нм и люминесценции при 940 нм (по M. Du et al., 1992)

*б* — Затухание вынужденного излучения от  $P^*$  в *Rb. sphaeroides* R26 регистрировалось при 926 нм, возбуждение при 870 нм.

Приведем экспериментальные кинетические кривые рассмотренных выше спектральных изменений, сопровождающих перенос электрона в РЦ. На рис. XXVII.33, *а* приведена запись кинетики затухания спонтанной флуоресценции  $P^*$  при  $\lambda = 940$  нм в РЦ при возбуждении светом  $\lambda = 850$  нм. Видно, что кривая затухания флуоресценции, отражающая кинетику отрыва электрона от  $P^*$ , включает две компоненты с временами  $\tau_1 = 2,7$  пс и  $\tau_2 = 12,1$  пс. Короткая компонента спонтанной флуоресценции затухания совпадает с моноэкспоненциальной кривой затухания индуцированного свечения (рис. XXVII.33, *б*).

В других случаях затухание вынужденного свечения (образование  $P^*$ ) также характеризуется двумя экспонентами с временами 2,9 пс и 12 пс, что может быть обусловлено личной конкуренцией между двумя путями переноса электрона от  $P^*$  на Бфф с участием мономерного Бхл (см. § 5). Мы рассмотрим этот вопрос в свете конкретных экспериментальных данных.

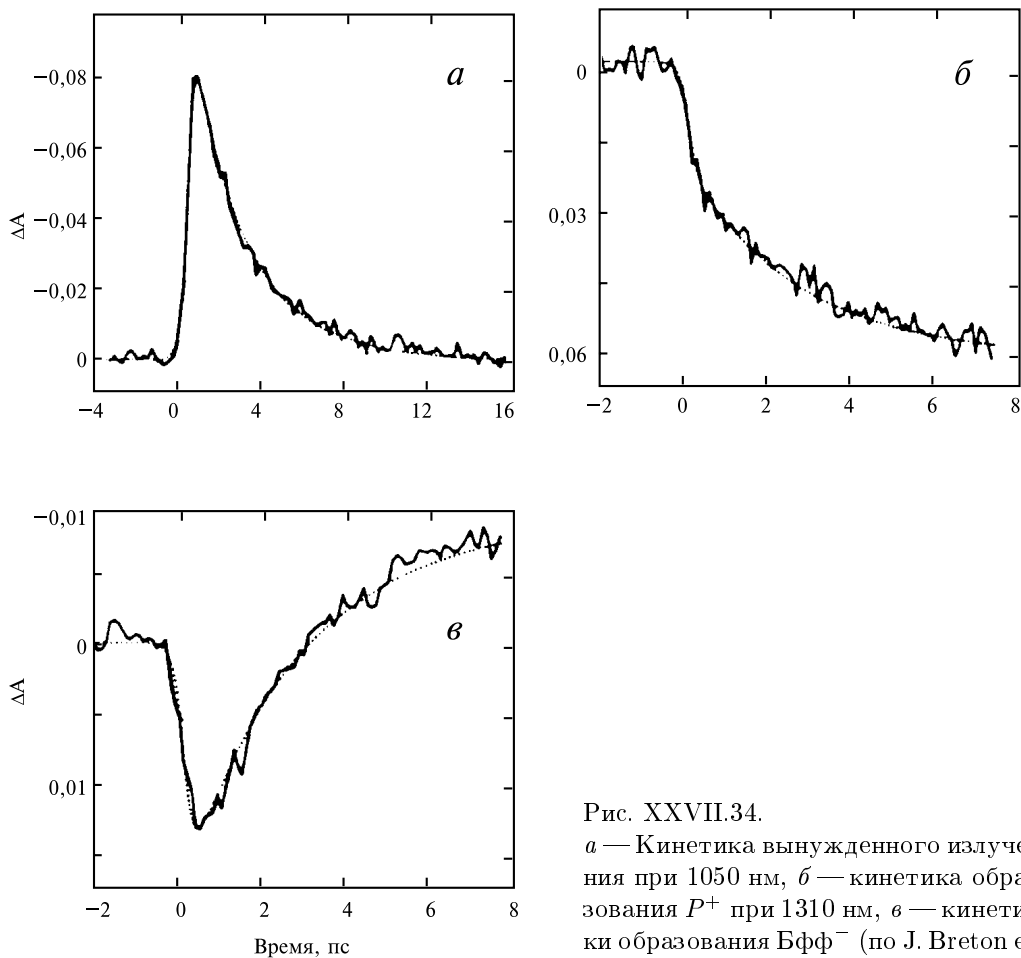


Рис. XXVII.34.

*a* — Кинетика вынужденного излучения при 1050 нм, *б* — кинетика образования  $P^+$  при 1310 нм, *в* — кинетики образования Бфф<sup>-</sup> (по J. Breton et al. 1986)

В ранних работах Бретона (1986) методами фемтосекундной спектроскопии получены данные о кинетике переноса электрона на Бфф. На рис. XXVII.34 кинетическая кривая (*a*) вынужденного излучения  $P^*$  при  $\lambda = 1050$  нм характеризуется моноэкспоненциальным затуханием с временем  $\tau = 2,8$  пс. Это совпадает с кривой (*б*) появления катион-радикала  $P^+$  (увеличение поглощения при 1310 нм) и восстановленного Бфф (кривая (*в*), выцветание при  $\tau = 545$  нм). Обращает на себя внимание

«мгновенное» ( $t < 50$  фс) увеличение абсорбции на кривых (б) и (в) немедленно вслед за действием лазерной вспышки. Эти изменения приписываются поглощению РЦ в состоянии  $P^*$ , которое и образуется немедленно при поглощении света. Как видно, времена отрыва электрона от  $P^*$  и восстановления Бфф совпадают. Это привело авторов к выводу о том, что мономерный Бхл не является химическим акцептором электрона на пути от  $P^*$  к Бфф, а выступает в роли виртуального переносчика («суперобменный» механизм переноса, § 5).

В более поздних работах было улучшено временное разрешение, что позволило зарегистрировать более тонкие детали кинетики переноса электрона (Зинт, 1993). Оказалось, что процессы образования  $P^+$  и восстановления Бфф происходят за 3,5 пс. Одновременно появляются изменения, характерные для восстановленного мономера Бхл, в области 785 нм, которые быстро исчезают через 0,9 пс. На последнем этапе происходит восстановление  $Q_A$  в реакции  $\text{Бфф}^- Q_A \rightarrow \text{Бфф} Q_A^-$ , которое занимает около 200 пс и сопровождается восстановлением исходного поглощения при 545 нм, характерного для нейтрального Бфф.

Последовательность актов переноса в РЦ имеет следующий вид

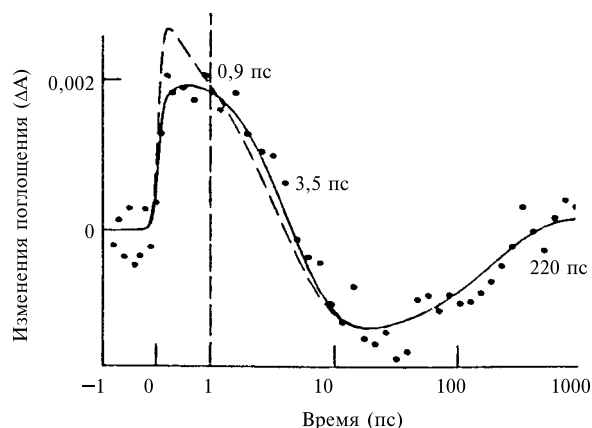
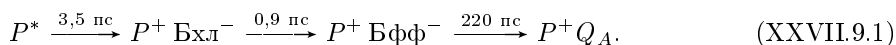


Рис. XXVII.35.

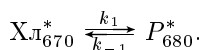
Временная зависимость фотоиндуцированного изменения поглощения РЦ (по U. Finkle et al., 1992) *Rb. sphaeroides* при 545 нм. Обозначены времена отдельных кинетических компонент.

Характерным временам в цепи соответствует форма кинетической кривой абсорбционных изменений Бфф при 545 нм (Зинт, 1993), приведенная на рис. XXVII.35. Как видно, эти данные говорят о непосредственном участии Бхл в качестве переносчика электрона в РЦ.

Возможность регистрировать быстрые изменения абсорбции ( $\tau < 50$  фс) используется для непосредственного изучения миграции энергии возбуждения между пигментами светособирающей антенны. Рассмотрим, например, перенос энергии в ССК II пурпурных бактерий  $\text{Бхл}_{800} \rightarrow \text{Бхл}_{850}$ . При возбуждении и образовании  $\text{Бхл}_{800}^*$  происходит обеднение основного уровня этой формы и, как следствие, уменьшение поглощения (выцветание) ее полосы при 800 нм. По мере миграции

возбуждения на  $\text{Бхл}_{850}$  молекулы  $\text{Бхл}_{800}$  возвращаются на основной уровень и поглощение при 800 нм вновь увеличивается. Следовательно, кинетика изменения поглощения основной полосы 800 нм отражает распространение экситона между этими формами. Отсюда, в частности, было найдено время миграции  $\text{Бхл}_{800}^* \rightarrow \text{Бхл}_{850}$ , равное  $\tau \sim 1\text{--}2$  пс.

В ССК I на этапе  $\text{Бхл}_{870} \rightarrow P_{890}$  возбуждение  $\text{Бхл}_{870}^*$  вызывает появление отрицательного максимума при 870 нм в дифференциальном спектре свет–темнота. Эти изменения нарастают и достигают насыщения за  $\sim 300$  фс (Ван-Грондель, 1995), что соответствует времени распространения возбуждения в антенне ( $\text{Бхл}_{870}$ ). Одновременно нарастает степень фотовыцветания полосы 890 нм за счет процесса  $|P_{890}^* \rightarrow P_{890}^+|$ . Кинетика восстановления Бфф и появление  $P_{890}^+$  измеряются по вынужденному излучению  $P^+$  или появлению положительных изменений при 1200–1300 нм. Подобные измерения были сделаны и для РЦ ФС II высших растений и фокусирующей кор-антенны (Барбер, Портер, 1993):



Авторы регистрировали эффекты увеличения поглощения при 680 нм и 670 нм при уходе возбуждения от этих форм. На это накладываются эффекты выцветания полосы при 680 нм вследствие образования  $P_{680}^+$  и исчезновения при этом вынужденного излучения  $P_{680}^*$ . Основным результат состоял в том, что между  $\text{Хл}_{670}$  и  $P_{680}$  происходит обратимая миграция энергии при  $k_1 \sim k_{-1} \sim (200 \text{ фс})^{-1}$ .

Принципиально новые возможности открывает применение методов фемтосекундной спектроскопии для изучения движения ядер в молекулах, находящихся в электронном возбужденном состоянии. В Т. I, гл. X (рис. X.2) мы видели, что электронные переходы при поглощении и испускании кванта света молекулой сопровождаются изменением кинетической энергии ядер. Избыток колебательной энергии, образующейся при электронном переходе, быстро диссипатирует в тепло при переходе ядер на нижние колебательные уровни за время 1–5 пс).

В стационарных условиях ядра совершают колебания, амплитуда которых соответствует положению ядерного колебательного уровня на диаграмме рис. X.2. Большую часть времени ядра проводят в крайних точках поворота, координаты которых соответствуют пересечению линии колебательного уровня с кривой электронной энергии молекулы  $U^*(R)$ . За время ( $\tau \sim 10^{-12}\text{--}5 \cdot 10^{-12}$  с) нахождения в этих точках ядер происходит быстрое ( $10^{-15}\text{--}10^{-16}$  с) испускание света при практически неподвижных ядрах, согласно принципу Франка–Кондона. Время сохранения самого электронного возбуждения в молекуле  $S_1$  перед испусканием кванта света намного больше ( $\tau \sim 5\text{--}10$  нс) времени ядерной релаксации (1–5 пс).

Возбуждая молекулу фемтосекундными ( $\tau < 50$  фс) вспышками, можно изучать кинетику последующего испускания света флуоресценции в субпикосекундном диапазоне. Кинетика затухания флуоресценции должна очевидно зависеть от характера колебаний ядер. Это можно наблюдать, используя явление вынужденного излучения при соответствующем временном разрешении. Для этого, дополнительно освещая возбужденные лазерной вспышкой молекулы измерительным светом в полосе поглощения, индуцируют вынужденное резонансное испускание света. Интенсивность этого вынужденного излучения будет изменяться во времени в соответствии с ча-



стотой колебаний ядер, которые периодически меняют свое положение между крайними точками поворота. Действительно, в работах Мартена (1993) были обнаружены колебания интенсивности вынужденного излучения, которые регистрировались при различных длинах волн в спектре флуоресценции (рис. XXVII.36).

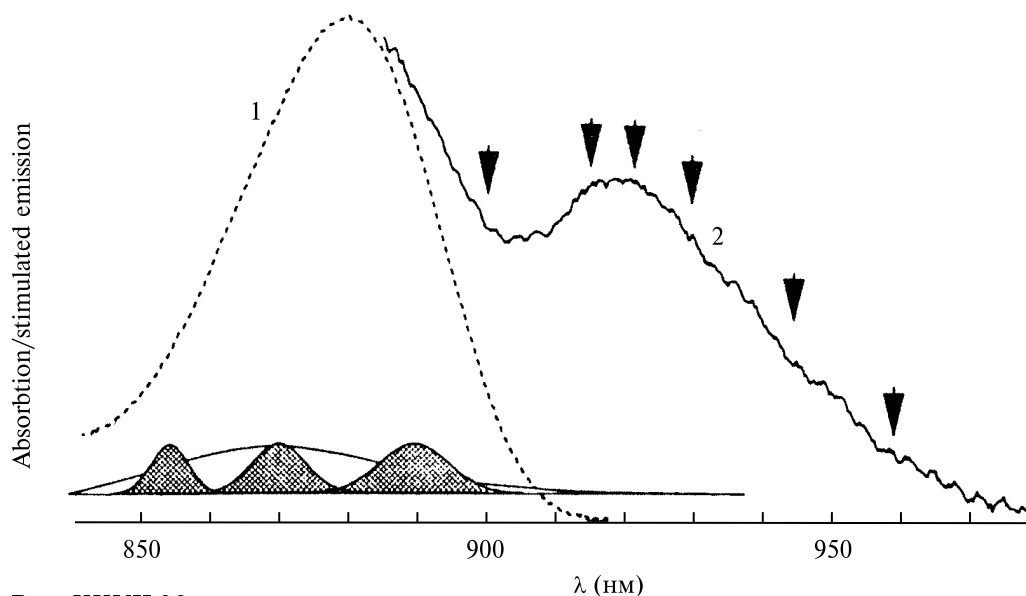


Рис. XXVII.36.

Спектр поглощения РЦ (1) и вынужденного излучения (2). Регистрация происходит при длинах волн, указанных стрелками (по М. Н. Vos et al., 1993)

На рис. XXVII.37 показана диаграмма движения волнового ядерного пакета между крайними точками на потенциальной кривой синглетного возбужденного состояния  $P^*$ . В крайних точках поворота происходит испускание света флуоресценции. Оно имеет место также и при прохождении ядер над дном потенциальной ямы, но с меньшей интенсивностью и удвоенной частотой.

На рис. XXVII.38 приведена запись колебаний интенсивности вынужденного излучения при разных длинах волн. Фурье-анализ показал, что две основные компоненты вынужденного излучения имеют модуляцию  $15$  и  $77\text{ см}^{-1}$  ( $\sim 2\text{ пс}$  и  $\sim 0,4\text{ пс}$ ).

На рис. XXVII.37 показано также пересечение потенциальных кривых состояний  $P^*$  и  $P^+$ . Точка пересечения соответствует ядерной координате, где происходит отрыв электрона от  $P$  и образование  $P^+$ . Характерное время ядерных колебаний в  $P$  реакционного центра совпадает по величине с характерными временами первичного акта переноса электрона  $P^*I \rightarrow P^+I^-$  ( $\tau \sim 1\text{--}3\text{ пс}$ ).

Таким образом, движение ядер неразрывно связано с электронными переходами в РЦ-фотоинтезе, что накладывает свой глубокий отпечаток на сверхбыстрые механизмы транспорта электронов (см. гл. XIII и ниже гл. XXVIII). Как мы увидим ниже, здесь уже несправедливо обычное приближение, используемое для разделения электронных и релаксационных процессов ( $\tau_{\text{рел}} \ll \tau_{\text{эл}}$ ) (гл. XIII, § 4, 5).

**Метод выжигания провалов** был развит в последние годы для изучения процессов дезактивации возбужденных состояний  $P^*$  в РЦ. Рассмотрим кратко сущность этого метода, обладающего большим временным разрешением. Образцы РЦ вначале облучаются при низкой температуре (1,5–10 К) «выжигающим» лазерным светом,

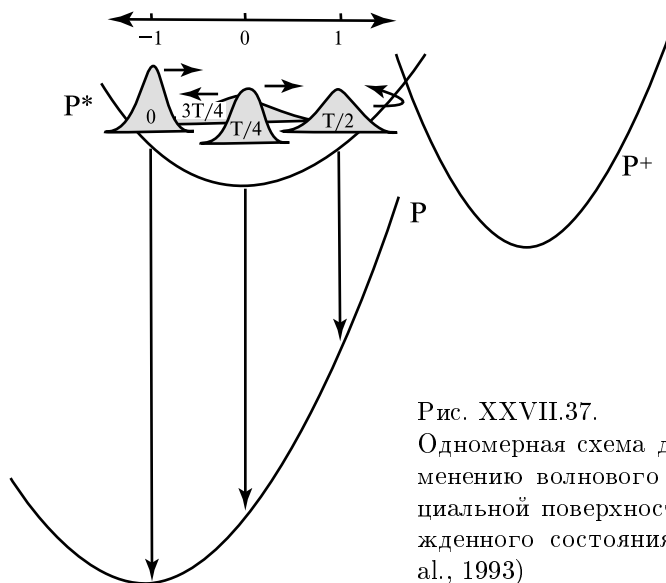


Рис. XXVII.37.

Одномерная схема движения ядер (по изменению волнового пакета) вдоль потенциальной поверхности синглетного возбужденного состояния  $P^*$  (по М. Н. Vos et al., 1993)

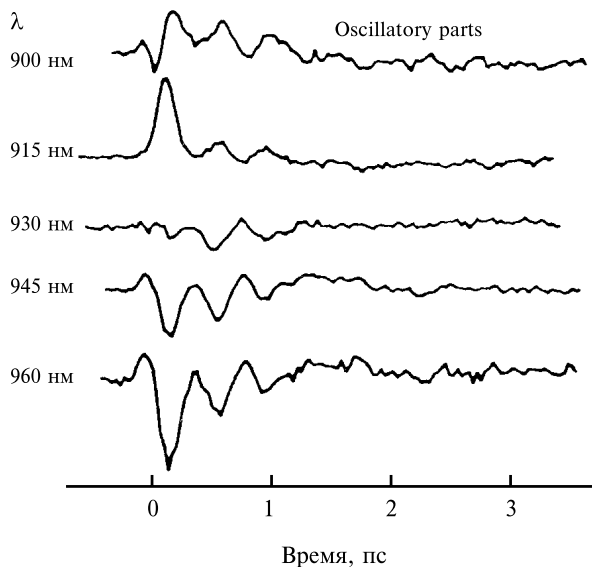


Рис. XXVII.38.

Колебания интенсивности вынужденного излучения  $P^*$  при разных длинах волн регистрации (по М. Н. Vos et al., 1993)

который возбуждает  $P$ :  $P \rightarrow P^*$  с последующей за этим быстрой дезактивацией  $P^*$  и разделением зарядов:  $P^* \rightarrow P^+ \text{Бфф}^-$ . При низких температурах радикальная пара  $P^+ \text{Бфф}^-$  стабилизируется в этом состоянии. Это позволяет исследовать спектр выпетания основной полосы поглощения  $P$ , являющийся результатом обеднения основного уровня  $S_0$  молекул  $P$ . Очевидно, свой вклад в спектр «выжженного» спектрального провала дадут молекулы  $P$ , находящиеся в соответствующих электронно-колебательных (вибронных) состояниях, которые принимают участие в первичном разделении зарядов в РЦ.

Рассмотрим характер информации, которую при этом можно получить о процессах дезактивации возбужденных молекул  $P^*$ . Форма и ширина спектра поглощения сложных молекул зависят от спектра их колебательных подуровней и вероятности перераспределения энергии между нормальными колебаниями (рис. X.4). За время существования электронного возбуждения  $\tau$  достигается полное тепловое равновесие вследствие релаксационных процессов в колебательной подсистеме, отвечающее температуре опыта. В сложных молекулах идет эффективный обмен колебательной энергией, и тепловое равновесие быстро устанавливается при возбуждении в области частоты 0–0-перехода  $\nu_{00}$  (рис. X.4).

Выяснение природы релаксационных процессов связано с определением частоты поглощения и ширины уровня нулевого вибрационного перехода  $\nu_{00}$ .

Для обычных молекул, помещенных в кристаллическую и стеклообразную матрицу при криогенных температурах, наблюдается, по крайней мере, одна узкая линия выжигания провала в области 0–0-перехода. Действительно, для порфиринов в стеклах или для хлорофилла, введенного в структуру миоглобина, наблюдается узкий провал шириной  $1 \text{ см}^{-1}$ . Однако, в противоположность этому, в РЦ в полосе поглощения  $P$  узкие провалы в области 0–0-перехода наблюдаются не всегда. Вместо этого появляются широкие провалы с шириной, почти равной ширине полной полосы поглощения  $P$ . В последнее время в ряде работ удалось наблюдать на фоне широкой полосы также слабые и узкие линии провалов в длинноволновой части полосы поглощения  $P$  в РЦ (рис. XXVII.39).

Напомним, что однородная ширина полосы поглощения, или ширина энергетического уровня  $\Gamma$  состояния  $P$ , возникающего при поглощении света, связана с временем  $\tau$  существования данного состояния соотношением неопределенностей для энергии (X.2.20)

$$\Gamma \cdot \tau \sim \hbar. \quad (\text{XXVII.9.2})$$

Как было показано в (X.2.21), ширина уровня зависит от двух процессов: дезактивации электронного возбужденного состояния  $P^*$  (тушение флуоресценции  $P^*$  за время  $\tau \sim T_1$ ), и колебательной релаксации (время  $T_2$ ), ведущей к потере когерентности фазы исходных колебательных состояний, возникших при поглощении света:

$$\Gamma = 1/2\tau + 1/T_2. \quad (\text{XXVII.9.3})$$

Величина  $T_2$  определяется взаимодействием электронно-возбужденного состояния  $P^*$  с тепловыми фононами и сильно зависит от температуры. Так, при комнатной температуре ширина  $\Gamma = 1/T_2$  равна  $\approx kT \approx 200 \text{ см}^{-1}$ . Однако при низких температурах влияние процессов сбоя фазы на ширину линии становится минимальным.

На первый план выступают процессы дезактивации возбужденного состояния  $P^*$ . Какие же процессы связаны с узкими и широкими линиями провалов в полосе поглощения РЦ?

Оказалось, что ширина узких линий провалов в РЦ соответствует низкотемпературным значениям времени жизни состояния  $P^*$ , т. е. времени образования ион-радикалов  $P^+$  и Бфф $^-$  и затухания вынужденного излучения с уровня  $P^*$  в

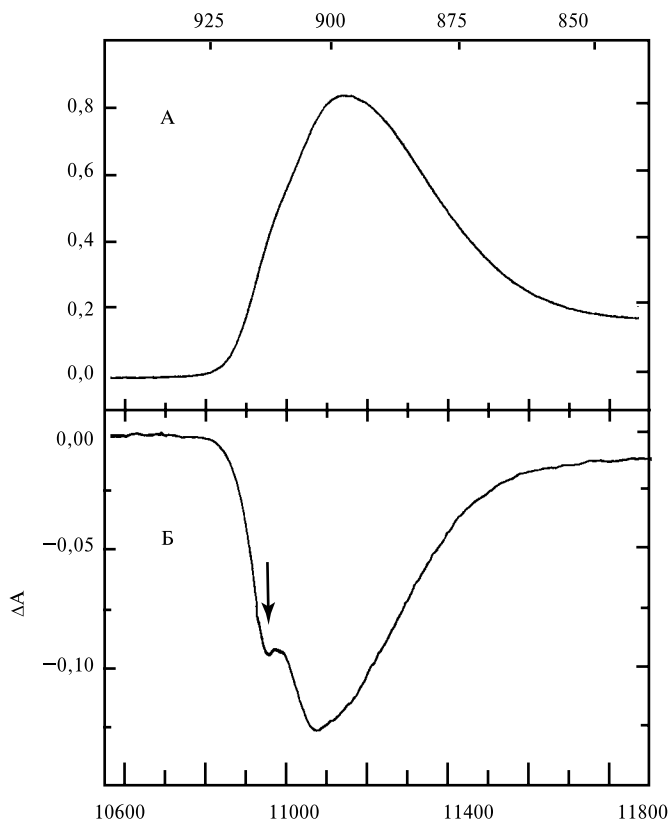


Рис. XXVII.39.  
Спектры поглощения (А) и фотохимического выжигания провалов (Б) для нижнего электронного перехода в РЦ *Rb. sphaeroides* (по R. Jankowiak, G. J. Small, 1993)

процессе переноса электрона  $P^* \rightarrow$  Бфф $^-$ . Отсюда, казалось бы, следует вывод об отсутствии каких-либо процессов быстрой ( $\sim 20$ – $200$  фс) дезактивации собственно электронного состояния  $P^*$  перед стадией отрыва электрона. А именно такая предварительная дезактивация  $P^*$  и могла бы вести к сокращению времени жизни  $P^*$  и, следовательно, к наблюдаемому уширению общей полосы выжигания провала.

Вместе с тем, мы уже говорили (см. выше), что за время существования  $P^*$  наблюдаются колебания ядерного волнового пакета с временами  $\sim 100$  фс. Это может указывать на участие выделенных локальных мод ближайшего белкового окружения  $P$  в эволюции состояния  $P^*$  перед отрывом электрона и переходом  $P^* \rightarrow P^+$  Бфф $^-$ . Иными словами, электронно-колебательные взаимодействия, ведущие к наблюдаемым в экспериментах широким полосам выжигания провалов, могут быть связаны

с определенными быстрыми «структурными» изменениями в РЦ при разделении зарядов (см. следующую главу XXVIII).

Таким образом, метод выжигания провалов, а также другие методы исследования сверхбыстрых процессов являются важным источником информации о структурных перестройках, сопровождающих начальные стадии переноса электрона в РЦ.

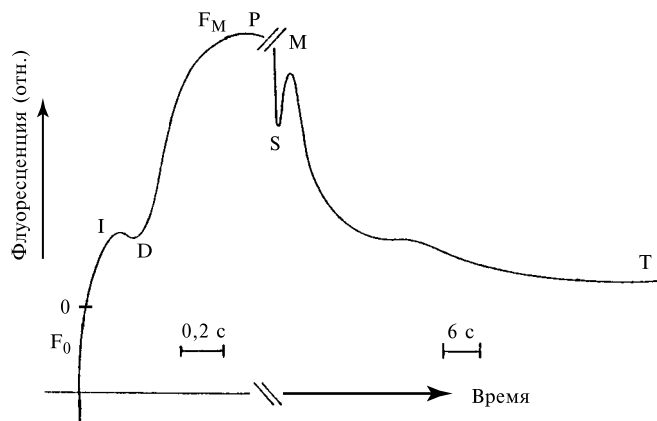


Рис. XXVII.40.

Типичная временная зависимость интенсивности переменной флуоресценции хлорофилла для выдержанных в темноте образцов (по С. Büchel, С. Wilhelm, 1993)

## § 10. Переменная и замедленная флуоресценция

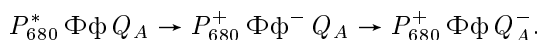
Основной вклад в флуоресценцию хлорофилла в хлоропластах дает ФС II. Вследствие высокой эффективности дезактивации возбужденного состояния  $P_{680}^*$  и разделения зарядов в РЦ, флуоресценция ФС II характеризуется низкими значениями квантового выхода (1–3%) и времени затухания (100–200 пс). Однако по изменению этих величин можно судить об эффективности основного «фотосинтетического» запасаения энергии электронного возбуждения  $P_{680}^*$  в различных условиях. В настоящее время параметры флуоресценции как показатель состояния и эффективности функционирования фотосинтетического аппарата широко используются в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Основная идея состоит в том, что уменьшение эффективности запасаения энергии света в фотосинтезе по тем или иным причинам приводит к тому, что интенсивность флуоресценции хлорофилла должна соответственно возрасти.

В нормальных физиологических условиях при интактных фотосинтетических мембранах изменение флуоресценции ФС II обусловлено интенсивностью переноса электрона по цепи переносчиков, степенью их во восстановления и характером других энергопреобразующих процессов, сопряженных с электронным транспортом.

**Переменная флуоресценция.** Типичные изменения флуоресценции ФС II в зависимости от состояния ЭТЦ фотосинтеза отражена в так называемых индукционных кинетических кривых. Кинетика изменения флуоресценции хлоропластов при освещении предварительно адаптированных к темноте клеток представлена на рис. XXVII.40.

Начальные стадии миграции энергии возбуждения в антенне и ее захват в РЦ, происходящие в наносекундном временном диапазоне (§ 3, 4) не отражены на этой кривой в силу малого временного разрешения. Основная информация связана с медленными изменениями флуоресценции, начиная с ее исходного низкого уровня  $F_0$  (точка 0 на кривой). Величина  $F_0$  определяется флуоресценцией хлорофилла, когда все РЦ находятся в «открытом» рабочем состоянии и способны тушить флуоресценцию антенны. Все молекулы переносчика первичного хинона  $Q_A$  в открытых РЦ окислены и готовы к принятию электрона от  $P_{680}^*$ :



При этом происходит так называемое фотохимическое туннелирование  $q_P$  флуоресценции открытыми РЦ. В закрытых РЦ  $Q_A$  восстановлен и поэтому в силу электростатического отталкивания перенос электрона от  $P_{680}$  на  $\Phi\Phi^-$  в присутствии  $Q_A^-$  не может произойти. Поэтому энергия электронного возбуждения состояния  $P_{680}^*$  в основном возвращается в антенну, а уровень флуоресценции становится максимальным  $F_M$ . На кривой (рис. XXVII.40) видно, что после достижения уровня  $F_0$  флуоресценция растет в миллисекундном диапазоне, и после прохождения промежуточного максимума ID достигает величины  $F_M$ . Очевидно, участок 0I соответствует начальному восстановлению  $Q_A$  фотосистемы II после включения света с последующим его частичным окислением фотосистемой I на участке ID. Затем в процессе освещения и «работы» ЭТЦ (ФС II) накапливаются молекулы  $Q_A$ , а на кривой достигается точка  $P$ . Разница между  $F_M$  и  $F_0$ , равная  $F_M - F_0$ , называется переменной флуоресценцией

$$F_V = F_M - F_0.$$

Заметим, что истинную величину  $F_M$  (XXVII.7.2) можно определить, освещая образцы в присутствии диурана, блокирующего перенос электрона в цепи между фотосистемами после места расположения  $Q_A$ . После достижения пика в точке  $P$  наступает более медленное изменение и постепенное снижение уровня флуоресценции, вызванные в основном физическими причинами.

На участке  $PS$  уровень флуоресценции падает от  $F_M$  до более низких значений. Здесь происходит так называемое нефотохимическое тушение флуоресценции  $q_N$ , которое включает следующие процессы: энергизационное рН-зависимое нефотохимическое тушение  $q_E$ ; тушение флуоресценции по механизму «спилlover»  $q_T$  вследствие фосфорилирования ССПБК и его перехода за несколько минут в мембране от ФС II к ФС I (§ 3), тушение флуоресценции  $q_I$  из-за фотоингибирования компонентов ФС II под действием света (XXVI, § 3) —  $q_E, q_T, q_I$ .

Все эти виды тушения приводят к уменьшению  $F_M$  в условиях, когда  $Q_A$  остается в восстановленном состоянии, и именно поэтому называются нефотохимическими  $q_N$ .

При этом падение  $F_M$  происходит за счет уменьшения  $F_V$ , а уровень исходной флуоресценции  $F_0$  меняется очень мало. На более поздних стадиях (участок SMT) свою роль играют соотношения между реакциями восстановления конечных продуктов световой стадии и их потреблением в темновом цикле фиксации  $CO_2$ . Нефотохимическое тушение  $q_N$  имеет важное регуляторное значение, изменяя активность ФС II в различных физиологических условиях. Однако молекулярные механизмы

этого явления остаются во многом неясны, особенно в случае рН-зависимого уменьшения флуоресценции  $q_E$ .

Изменение флуоресценции  $q_E$  зависит от энергизации мембран тилакоидов и образования трансмембранной разности концентраций ионов водорода  $\Delta Ph$  (XXIV, § 3). Степень  $\Delta_{ph}$  независимого тушения линейно растет с увеличением концентрации  $H^+$  внутри тилакоида. Это происходит из-за увеличения вероятности тепловой дезактивации возбужденного состояния ХЛ в присутствии ионов водорода. Такого рода эффекты известны в фотохимии красителей, квантовый выход флуоресценции зависит от Ph среды.

Наряду с этим в энергизационном тушении флуоресценции антенны может участвовать каротиноид зеаксантин, который образуется из виолоксантина и, как показали опыты, дезактивирует возбужденный Хл антенны. Предполагается также (Хортон), что протонирование остатков глутамата и аспартата белковых субъединиц  $CP_{29}$  и  $CP_{24}$  светособирающего комплекса ФС II вызывает такие конформационные перестройки пептидной части, которые переводят в нефлуоресцирующее состояние расположенные на них плотно упакованные слои хлорофилла антенны. При этом, в основном, усиливается безызлучательное тушение возбуждения в реакционном центре ФС II и тушится только переменная флуоресценция, а выход флуоресценции открытых центров ( $F_0$ ) не изменяется. Соответственно снижается отношение  $F_V/F_M$  и эффективность разделения зарядов в РЦ. После выключения действующего света выход переменной флуоресценции возвращается к исходному значению за время порядка десятков секунд, необходимое для релаксации протонного градиента. Считается, что этот механизм обеспечивает тушение избыточной энергии возбуждения, приходящей в ФС II при насыщающей интенсивности света.

Тушение  $q_I$  при фотоингибировании реакционных центров ФС II происходит при длительном воздействии света, интенсивность которого значительно выше той, при которой происходит световой насыщение фотосинтеза. При этом, так же как и в случае  $q_E$ , подавляется, в основном, переменная флуоресценция  $F_V = F_M - F_0$ , и уменьшается квантовая эффективность реакций фотосистемы II. В отличие от энергизационного тушения, увеличение выхода переменной флуоресценции в темноте после прекращения действия интенсивного света происходит за время порядка часа. Установлено, что фотоингибирование связано с необратимой инактивацией полипептида D1 в реакционном центре фотосистемы II, являющегося местом посадки пластохинона. Длительное восстановление фотоингибированных центров обусловлено необходимостью ресинтеза этого полипептида. Предполагают, что подобный механизм, вызывающий безызлучательное тушение возбуждения, уменьшает вероятность перехода молекул хлорофилла в триплетное состояние, энергия которого может передаваться молекулам кислорода (образование синглетного кислорода) с последующей деструкцией клеточных структур (XVI, § 3).

Измерение значений  $F_M$ ,  $F_0$  и  $F_V = F_M - F_0$  особенно важно, поскольку дает возможность определить абсолютную квантовую эффективность разделения зарядов в РЦ. Напомним (XXVII, § 1), что судьба энергии возбуждения в РЦ определяется соотношением констант скорости трех конкурирующих процессов реактивации возбужденных молекул хлорофилла в антенне реакционного центра:

$$P^* \xrightarrow{k_f + k_d + k_{ph}} P, \quad (XXVII.10.1)$$

где  $P$  и  $P^*$  — основное и возбужденное состояния молекулы хлорофилла  $a$ ;  $k_f$ ,  $k_d$  и  $k_{ph}$  — константы скорости излучательной (флуоресценция), безизлучательной (тепловая диссипация) и фотохимической (в реакционном центре) дезактивации возбуждения.

Квантовые выходы первичного разделения зарядов  $q\Phi$  в фотосинтезе и флуоресценции  $qF_0$  равны, соответственно,

$$q\Phi = \frac{k_{ph}}{k_f + k_d + k_{ph}} \quad \text{и} \quad qF_0 = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_{ph}}. \quad (\text{XXVII.10.2})$$

Константа  $k_{ph}$  отражает скорость захвата возбуждения реакционным центром ФС II в реакции первичного разделения зарядов и переноса электрона от возбужденной молекулы пигмента реакционного центра на молекулу феофетина. Затем следует серия вторичных процессов переноса электрона, обеспечивающих стабилизацию разделенных зарядов (§ 7):

$$P_{680}^* = P_{680}^+ I^- = P_{680}^+ I Q_A^- = D^+ P_{680} I Q_A^- = D^+ P_{680} I Q_A Q_B^-. \quad (\text{XXVII.10.3})$$

(1)                      (2)                      (3)                      (4)                      (5)

При окисленном первичном хинонном акцепторе  $Q_A$  (состояние 1), когда реакционный центр находится в так называемом открытом состоянии, константа  $k_{ph}$  является наибольшей из этих трех констант. Поэтому здесь энергия возбуждения используется в реакциях фотосинтеза с квантовым выходом  $q\Phi$ , близким к единице, и только небольшая часть возбуждений (около 0,3%) теряется в виде флуоресценции за время переноса возбуждения к реакционному центру.

Процесс преобразования энергии в реакционном центре (переход из состояния 1 в состояние 5) занимает около 1 мс. В течение этого времени (так называемое время оборота реакционного центра) первичные продукты фотохимической реакции еще не использованы в дальнейших реакциях и реакционный центр находится в закрытом состоянии, в котором он не способен использовать следующие порции энергии.

Поскольку состояние 4 является наиболее долгоживущим, то в стационарном состоянии и на временах более 10 мкс именно оно определяет изменения выхода флуоресценции под действием света. Через 10 мкс после короткой насыщающей вспышки света или при насыщающей интенсивности постоянного света все реакционные центры фотосистемы II оказываются в состоянии 4 и флуоресценция постигает максимального значения  $F_M$ :

$$q\Phi = 0, \quad k_{ph} = 0, \quad qF_M = k_f / (k_f + k_d). \quad (\text{XXVII.10.4})$$

Таким образом, увеличение выхода флуоресценции при полном закрывании реакционных центров ( $F_V = F_M - F_0$ ) обусловлено той частью световой энергии, которая использовалась в первичных реакциях фотосинтеза при открытых реакционных центрах. Легко найти, что отношение выходов переменной и максимальной флуоресценций равно квантовому выходу первичной фотохимической реакции разделения зарядов в фотосинтетических реакционных центрах:

$$\frac{qF_M - qF_0}{qF_M} = \frac{k_{ph}}{k_f + k_d + k_{ph}} = q\Phi. \quad (\text{XXVII.10.5})$$



Таким образом, измерение интенсивностей флуоресценции хлорофилла  $F_0$  и  $F_M$  в относительных единицах позволяет получить абсолютную величину квантовой эффективности разделения зарядов, в фотосинтетических реакционных центрах.

Измерение параметров индукционных кривых проводятся не только в лабораторных, но и в природных условиях, где с их помощью определяют состояние фотосинтетического аппарата листьев и фитопланктона. Один из способов измерения величин  $F_0$ ,  $F_M$ , а также параметров тушения  $q_P$ ,  $q_N$  состоит в освещении

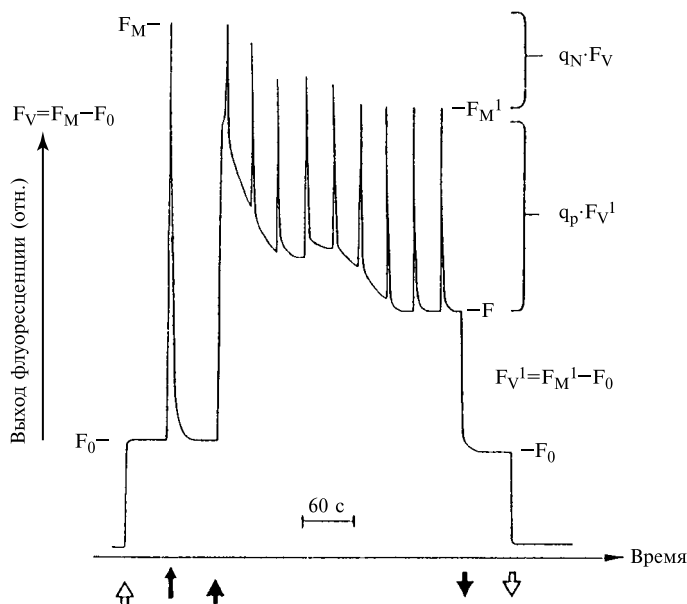


Рис. XXVII.41.

Кинетика индукции флуоресценции, измеренная под действием возбуждающих вспышек света на фоне постоянного освещения (по С. Büchel, С. Wilhelm, 1993)

Открытые стрелки — включение и выключение измеряющего света, короткие стрелки — соответственно начало и конец непрерывного освещения, длинная стрелка — соответствует первой короткой вспышке света насыщающей интенсивности.

объектов постоянным светом, на фоне которого после прохождения максимального уровня  $F_M$  в процессе индукции даются короткие вспышки насыщающего света (рис. XXVII.41). При этом каждая вспышка переводит  $Q_A$  в полностью восстановленное состояние. Однако эти вспышки не возвращают флуоресценцию к исходному уровню  $F_M$ , поскольку в ФС II уже развились процессы нефотохимического тушения  $q_N$ . Величины  $F_M'$  после каждой насыщающей вспышки соответствуют степени восстановленности  $Q_A$  в данный момент или фотохимическому тушению  $q_P$ . Разность между величинами  $F_M$  начального пика на индукционной кривой и  $F_M'$  говорит о степени развития нефотохимического тушения  $q_N$  в системе. При этом

происходит уменьшение  $F_V$  — исходной переменной флуоресценции:

$$F'_V = F'_M - F_0 = F_V - q_N F_V.$$

Определяя исходные величины  $F_V = F_M - F_0$  и  $q_N$  в разные моменты времени, а также величину  $F'_V = F'_M - F_0$ , можно соответственно найти и коэффициенты тушения

$$q_P = \frac{F'_M - F_0}{F_V} \quad \text{и} \quad q_N = \frac{F_V - F'_V}{F_V}. \quad (\text{XXVII.10.6})$$

**Замедленная флуоресценция.** Быстрая флуоресценция обусловлена потерями энергии возбуждения в процессе захвата ее фотосинтетическими реакционными центрами. Однако, стабилизация первичных разделенных зарядов в реакционных центрах также не является абсолютно совершенной, т.е. разделенные заряды могут рекомбинировать. Это приводит к регенерации синглетного возбужденного состояния реакционного центра, а следовательно, и к возможности излучательной потери энергии этого вторичного возбуждения в виде так называемой замедленной флуоресценции хлорофилла. Время затухания этого свечения может на много порядков превосходить собственное время жизни синглетного возбужденного состояния молекулы хлорофилла.

Несмотря на столь большую разницу во времени жизни, различие между быстрой и замедленной флуоресценцией является в какой-то мере условным, поскольку в обоих случаях излучение происходит при переходе из синглетного возбужденного в основное состояние хлорофилла, и эти процессы отражают динамику возбужденного состояния в одном и том же пуле пигментов фотосистемы II. Замедленная флуоресценция ЗФ дает важную информацию о механизмах переноса электрона в ППФ. Она была открыта Б. Л. Стрелером и В. Арнольдом (1951) при изучении фотофосфорилирования и впоследствии обнаружена практически у всех фотосинтезирующих организмов. Существует строгая корреляция между ЗФ и функционированием РЦ, выражающаяся в подавлении ЗФ при ингибировании РЦ. У мутантных штаммов, лишенных РЦ, полностью отсутствует и замедленная флуоресценция. ЗФ полностью отсутствует в препарате ССПБК и отчетливо выражена у частиц ФС II (ССПБК + ПБК II) с активными РЦ. Совпадение спектра ЗФ со спектром флуоресценции хлорофилла и бактериохлорофилла доказывает, что ЗФ обусловлена излучательной активацией первого синглетного возбужденного состояния этих пигментов. Спектры возбуждения флуоресценции и ЗФ также совпадают между собой и сходны со спектром действия фотосинтеза. Очевидно, что ЗФ возникает в процессах обратной рекомбинации первичных фотоокисленных и фотовосстановленных продуктов начальных стадий фотосинтеза в РЦ:



В схеме (XXVII.10.7) восстановление  $P^+$  вторичными донорами  $D_1$  и окисление  $\Phi f^-$  последующими акцепторами должно уменьшать концентрацию  $P^+$  и  $\Phi f^-$ , а следовательно, ингибировать свечение. В реальных условиях количество компонентов ЗФ и их длительность определяются временами жизни восстановленных и окисленных фотопродуктов, которые сложным образом зависят от кинетики реакций прямого и обратного переноса электрона в ближайшем донорно-акцепторном

окружении ФС II. Так, обработка хлоропластов при низких значениях  $\text{pH} = 4$ , замедляющая восстановление  $P_{680}^+$ , одновременно способствует и возникновению более долгоживущих компонентов послесвечения. Аналогично, в пурпурных бактериях ЗФ не возникает в области низких окислительно-восстановительных потенциалов среды, при которых вторичный донор (цитохром  $c$ ) находится в восстановленном состоянии, поскольку в этих условиях происходит быстрое ( $\sim 1$  мкс) восстановление  $P_{980}^+$ . Повышение окислительно-восстановительного потенциала среды приводит к окислению цитохрома и возникновению миллисекундного послесвечения в присутствии *o*-фенантролина, который блокирует реакцию переноса  $Q_A^- \rightarrow Q_B$ .

Согласно рекомбинационной гипотезе, интенсивность послесвечения  $L$  пропорциональна количеству РЦ, находящихся в состоянии  $[P^+Q_A^-]$ . Величина  $L$  зависит также от константы скорости излучательной рекомбинации зарядов, ведущей к образованию  $P^*$  и вероятности излучательной дезактивации синглетного возбужденного состояния  $P^*$ , образованного в результате рекомбинации.  $\square$

Интенсивность послесвечения пропорциональна вероятности нахождения центров в состоянии  $P^+Q_A^-$

$$L = Nk^*\varphi[P^+Q_A^-], \quad (\text{XXVII.10.8})$$

где  $N$  — концентрация РЦ,  $\varphi$  — квантовый выход излучательной дезактивации состояния  $P^*$ , квадратные скобки обозначают вероятность данного состояния. При низкой интенсивности возбуждающего света все РЦ находятся в открытом состоянии, когда эффективно происходит отток электронов от  $Q^-$ . Однако в присутствии диурана даже при низкой интенсивности возбуждающего света центры переходят в закрытое состояние и, поскольку отток электронов от  $Q^-$  уже прекращен, интенсивность ЗФ становится пропорциональной общему количеству РЦ.

Как и в случае переменной флуоресценции, процесс, влияющий на выход ЗФ, — энергизация фотосинтетической мембраны и образование протонного градиента. Однако механизм влияния здесь другой. Разница между уровнями возбужденного хлорофилла  $P^*$  и первичных восстановленных фотопродуктов составляет около 0,6 эВ, что соответствует энергии активации обратных процессов рекомбинации и объясняет, почему квантовый выход ЗФ очень мал и не превышает  $10^{-5}$ – $10^{-7}$ . Однако энергия активации может быть снижена за счет электростатического поля, направленного параллельно образуемому дипольному моменту  $[P^+Q^-]$ . Так как рекомбинирующие заряды  $P^+$  и  $Q^-$  расположены на противоположных сторонах мембраны, то разница электрических потенциалов  $\Psi_M$  сторон мембраны изменяет величину энергетического барьера для послесвечения. В этом случае уравнение (XXVII.10.8) для скорости рекомбинации, ведущей к ЗФ, имеет вид

$$L = Nk_P^*\varphi[P^+Q^-] \exp\left(-\frac{\Delta E - F\Psi_M}{RT}\right), \quad (\text{XXVII.10.9})$$

где  $\Delta E$  — энергия активации в отсутствие поля,  $F$  — число Фарадея.

Согласно (XXVII.10.9) с увеличением  $\Psi_M$  растет интенсивность ЗФ. Это действительно наблюдается в опытах при создании диффузионной разности электрических потенциалов на мембране путем добавления солей или в присутствии, например, валиномицина, избирательно увеличивающего проницаемость мембраны

для  $K^+$ . Замечено, что искусственно созданный трансмембранный градиент протонов  $\Delta pH$  индуцирует всплеск люминесценции. Стимулирующий эффект  $\Delta pH$  на ЗФ определяется изменением поверхностного электрического потенциала наружной поверхности тилакоида при закислении среды. Аналогично электрической составляющей  $\Psi_M$  электрохимического потенциала, значения градиента  $pH$  можно включить в уравнение (XXVII.10.9), учитывая, что рекомбинирующие донор и акцептор участвуют в протонном равновесии, изменяя энергию активации процесса рекомбинации:

$$L = N k_P^* \varphi [P^+ Q_A^-] \exp \left( - \frac{\Delta E (F \Psi_M - \lg [RT (\Delta pH)])}{k_B T} \right). \quad (XXVII.10.10)$$

∇ Выражение в квадратных скобках в (XXVII.10.10) пропорционально протон-движущей силе, поэтому можно после калибровки использовать интенсивность ЗФ для определения значения этой силы, составляющего около 100 мВ. □

Понижение температуры до  $-30...-40^\circ\text{C}$  ингибирует выделение  $O_2$  и прямые электрон-транспортные реакции, в результате чего обратная рекомбинация становится преобладающей. Однако долгоживущие компоненты, указывающие на участие в рекомбинации отдаленных от РЦ восстановленных продуктов, исчезают при охлаждении. При достаточно низких температурах наблюдаются только два компонента свечения: 1–2 и 30 мс, причем первый может соответствовать обратной реакции между  $P_{680}^+$  и  $Q^-$ . Повышение температуры активирует ЗФ. Это позволяет оценить энергию активации для различных компонентов свечения (от 0,15 до 0,9 эВ). Образующиеся на свету продукты — предшественники ЗФ — могут быть стабилизированы, если образец охладить до низкой температуры. Последующее нагревание образца в темноте приводит к появлению свечения, которое было названо термолюминесценцией. Очевидно, образованные на свету и стабилизированные при охлаждении образца фотопродукты активируются затем и рекомбинируют с хлорофиллом, приводя к свечению. Кривая зависимости интенсивности термовысвечивания от температуры объекта в процессе нагревания содержит несколько пиков, наблюдаемых при определенных характеристических температурах. Число и положение пиков термолюминесценции отражает различные стадии стабилизации энергии в ФС II и зависит от функционирования кислородвыделяющего комплекса.