

Моделирование конформационного перехода в фотосинтетическом реакционном центре бактерии *Rb. sphaeroides*

П. А. Мамонов^{1,a}, П. М. Красильников^{1,b}, П. П. Нокс^{1,c}, А. Б. Рубин^{1,d}

¹ Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова,
кафедра биофизики,
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12

E-mail: ^a piton@erg.biophys.msu.ru, ^b krapam@mail.ru, ^c knox@biophys.msu.ru, ^d rubin@biophys.msu.ru

Получено 22 апреля 2009 г.,
после доработки 1 июля 2009 г.

Методом квантово-химического моделирования исследован возможный конформационный переход в локальном окружении первичного хинона в фотосинтетическом реакционном центре (РЦ) бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, сопровождающий процесс переноса электрона. Исходя из представления о наличии двух устойчивых конформационных состояний РЦ, предложена кинетическая модель, хорошо описывающая экспериментальные температурные зависимости скорости реакции рекомбинации $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$. Результаты квантово-химического моделирования сайта связывания первичного хинона позволяют предложить на роль указанного конформационного изменения небольшое смещение кольца убихинона, приводящее к разрыву водородной связи, образуемой 4-C=O группой убихинона с гистидином M^{219} , и образованию новой водородной связи с гидроксильной группой треонина M^{222} . Значения параметров модели, полученные с помощью квантово-химических расчетов, качественно согласуются со значениями параметров кинетической модели, используемых для описания реакции рекомбинации.

Ключевые слова: *Rhodobacter sphaeroides*, фотосинтетический центр, конформационный переход, реакция рекомбинации

Modelling of conformational change within photosynthetic reaction center of *Rb. sphaeroides* bacteria

P. A. Mamonov¹, P. M. Krasilnikov¹, P. P. Knox¹, A. B. Rubin¹

¹ Biophysics dept., the Faculty of Biology of MSU, Building 12, house 1, Vorobyovy Gory Str., Moscow, Russia, 119991

Abstract. — A possible conformational change, which accompanies electron transport in *Rb. sphaeroides* photosynthetic reaction center (RC), was studied using quantum-chemical approach. A kinetic model which takes into account two conformational states of RC is proposed. The model quantitatively describes experimental temperature dependencies of recombination reaction rate $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$. Quantum-chemical modeling of primary quinone (Q_A) binding site permits one to propose a minor shift of Q_A as a conformational change of interest. The shift is accompanied by break of a hydrogen bond between 4-C=O group of Q_A and histidine M^{219} , and formation of a new hydrogen bond between Q_A and hydroxyl group of threonine M^{222} . Characteristics of this conformational change were obtained from quantum-chemical calculations and match parameters of kinetic model in qualitative fashion.

Keywords: *Rhodobacter sphaeroides*, photosynthetic reaction center, conformational change, reaction of recombination

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2009, vol. 1, no. 4, pp. 437–448 (Russian).

© 2009 П. А. Мамонов, П. М. Красильников, П. П. Нокс, А. Б. Рубин

Введение

Проблема поиска структурно-функциональных взаимосвязей в белках является актуальной задачей, решение которой имеет фундаментальное значение и также способствует развитию таких областей, как поиск новых лекарств, конструирование белков *de novo*, создание нанотехнологических конструкций. В частности, представляет интерес исследование механизмов электронно-конформационных взаимодействий в белках. Именно этот тип взаимодействий является ключевым для слаженного функционирования белка как цельной молекулярной машины.

В настоящей работе мы решаем частную проблему идентификации структурных изменений в фотосинтетическом реакционном центре (РЦ) бактерии *Rb. sphaeroides*, сопровождающих фотоадаптацию РЦ и регулирующих скорость переноса электрона между первичным хиноном (Q_A) и димером бактериохлорофилла (P).

Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* представляет собой трансмембранный пигмент-белковый комплекс, преобразующий энергию света в разность электрохимических потенциалов на мембране бактерии. РЦ состоит из двух мембранных (L, M) и цитоплазматической (H) субъединиц (рис. 1). Субъединицы РЦ связаны с молекулами кофакторов, организованными в две цепи переноса электрона (L и R), из которых активной является только L-цепь. Поглощение кванта света димером бактериохлорофилла (P) инициирует процесс разделения зарядов в реакционном центре, и через 200 пс приводит к одноэлектронному восстановлению молекулы первичного хинона Q_A . Далее электрон переносится на молекулу вторичного хинона (прямой перенос). В случае блокирования прямого переноса или экстракции вторичного хинона Q_B из РЦ электрон возвращается обратно на димер бактериохлорофилла в результате реакции рекомбинации $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$.

Представляют интерес различия в характерах температурных зависимостей скорости реакции рекомбинации (рис. 2) в РЦ замороженных в темноте и на свету. Скорость рекомбинации в РЦ замороженных в темноте практически не зависит от температуры в области 5–190 К и резко падает в районе 195 К. В случае РЦ замороженных на свету скорость рекомбинации практически равна скорости при комнатных температурах, и почти в шесть раз меньше скорости рекомбинации в темноадаптированных РЦ. Она также слабо меняется с температурой в области 5–110 К и резко возрастает, достигая значений, соответствующих темноадаптированным РЦ в районе 195 К. В области температур 195–300 К обе кривые совпадают.

Такое поведение кривых свидетельствует о наличии у РЦ по меньшей мере двух конформационных состояний, заселенность которых меняется при освещении РЦ. Причем в темновой конформации скорость рекомбинации существенно выше, чем в конформации, заселенной на свету.

Гипотеза о существовании нескольких конформаций в РЦ была выдвинута давно и может считаться достаточно обоснованной [1, 2]. Однако на сегодняшний день все еще нет единого мнения относительно механизма конформационного регулирования скорости реакции рекомбинации и, в частности, не ясно, какие именно структурные изменения сопровождают фотоадаптацию РЦ.

В настоящей работе мы пытаемся подойти к решению этой проблемы, комбинируя методы кинетического моделирования и вычислительной квантовой химии. Метод кинетического моделирования мы используем для интерпретации экспериментальных данных по температурной зависимости скорости реакции рекомбинации и определения микроскопических параметров этого процесса. Используя методы вычислительной квантовой химии, мы исследуем поверхность потенциальной энергии фрагмента РЦ, в котором, предположительно, происходят интересующие нас конформационные изменения. Это исследование включает в себя нахождение стабильных конформаций фрагмента, а также путей перехода между ними, что дает нам энергии конформаций и энергии активации переходов между ними. Сравнительный анализ значений параметров кинетической модели и результатов квантово-химических расчетов позволяет сделать вывод об адекватности предлагаемого конформационного изменения в структуре РЦ.

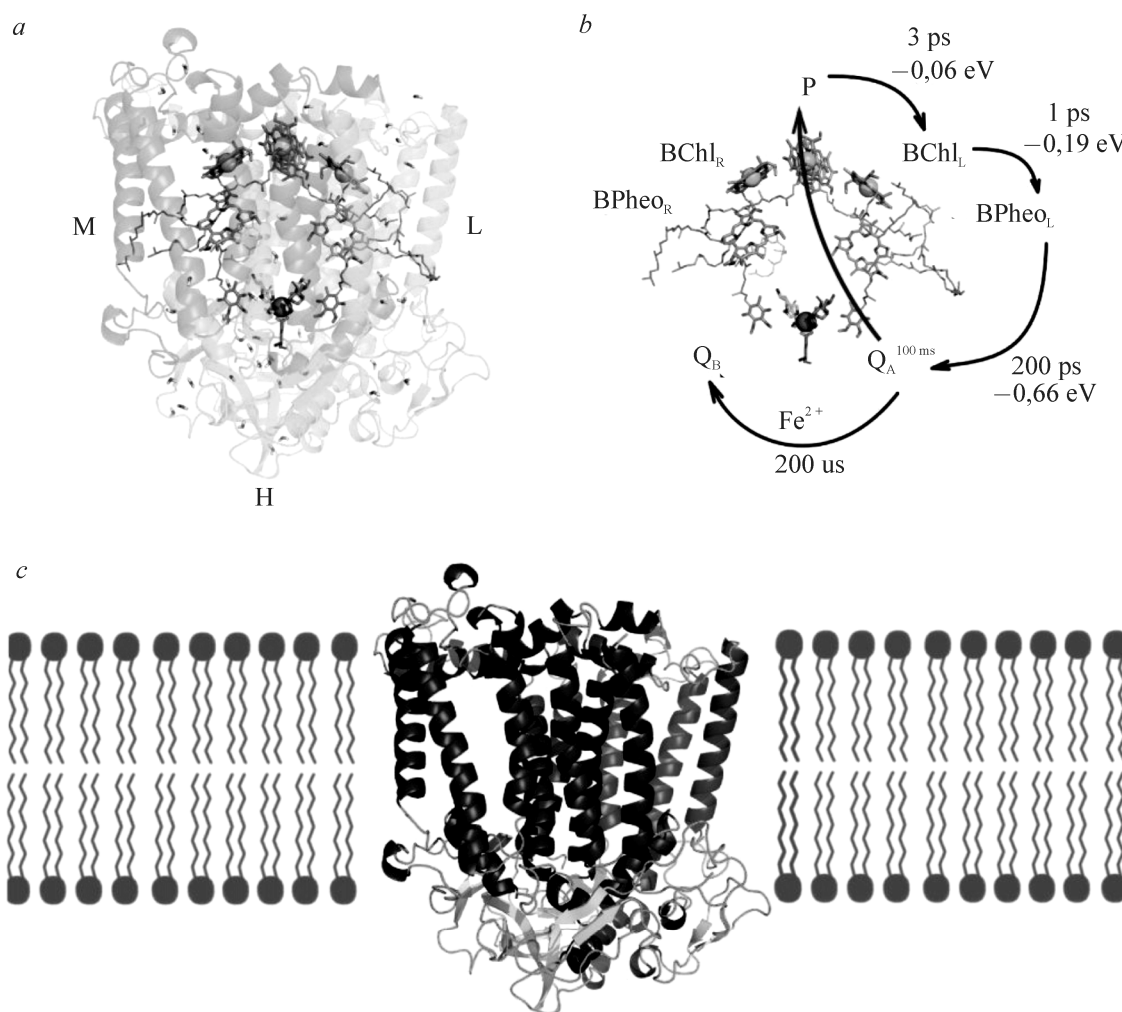


Рис. 1. Структура фотосинтетического реакционного центра бактерии *Rb. sphaeroides* по данным рентгено-структурного анализа [3]. (a) Субъединичный состав комплекса и кофакторы электронного транспорта. (b) Кофакторы электронного переноса, организованные в две цепи. Активной является L-цепь. На схеме указаны характерные времена переноса и относительные среднеточечные потенциалы кофакторов. В случае, если перенос электрона с Q_A на Q_B заблокирован, наблюдается реакция рекомбинации $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ с характерным временем при комнатной температуре 100 мс. (c) Вторичная структура РЦ и схема расположения в мембране

Ключевой проблемой при построении квантово-химической модели является выбор фрагмента РЦ, в котором происходит искомое конформационное изменение. Так как оно инициируется перераспределением электронной плотности кофакторов в результате их окисления либо восстановления, то вполне вероятно, что эта перестройка происходит в непосредственном окружении кофакторов, участвующих в реакции рекомбинации. В настоящей работе мы предположили, что интересующее нас конформационное изменение происходит в окружении первичного хинона.

Результаты квантово-химического моделирования сайта связывания первичного хинона позволяют предложить на роль указанного конформационного изменения небольшое смещение кольца убихинона, приводящее к разрыву водородной связи образуемой 4-C=O группой убихинона с гистидином M^{219} , и образованию новой водородной связи с гидроксильной группой треонина M^{222} . Значения параметров модели, полученные с помощью квантово-химических расчетов, согласуются со значениями параметров кинетической модели, используемых для описания реакции рекомбинации.

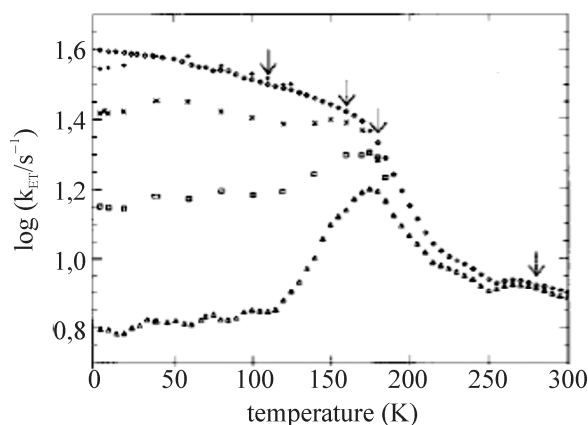


Рис. 2. Температурные зависимости скорости рекомбинации зарядов между первичным хиноном и димером бактериохлорофилла ($P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$) [4]. Верхняя кривая получена для образцов, замороженных в темноте. Нижняя кривая соответствует образцам, замороженным на свету

Материалы и методы

Кинетическое моделирование. Для описания экспериментальных температурных зависимостей скорости реакции рекомбинации [4] была предложена кинетическая схема (рис. 3), учитывающая наличие двух конформационных состояний, разделенных потенциальным барьером.

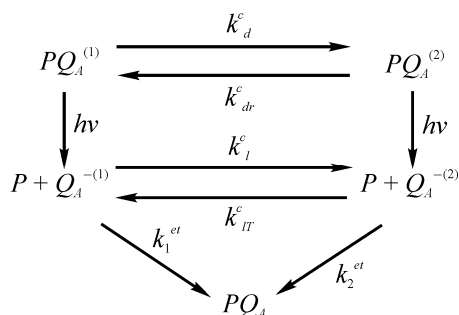


Рис. 3. Кинетическая модель описывающая температурные зависимости скорости реакции рекомбинации. Конформационное состояние обозначено верхним индексом в круглых скобках

В состоянии с неразделенными зарядами в РЦ могут происходить переходы между двумя конформационными состояниями $PQ_A^{(1)} \leftrightarrow PQ_A^{(2)}$. Эта система реакций описывается следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dn_1}{dt} = -k_d^c n_1 + k_{dr}^c n_2, \\ n_1 + n_2 = 1, \end{cases} \quad (1)$$

где n_1, n_2 — заселенности первого и второго конформационных состояний соответственно. Константы скоростей прямого k_d^c и обратного k_{dr}^c конформационных переходов зависят от температуры по Аррениусу:

$$k_d^c = A_d e^{\frac{-\Delta H_d^*}{RT}},$$

$$k_{dr}^c = A_{dr} e^{\frac{-(\Delta H_d^* - \Delta H_d)}{RT}},$$

где ΔH_d — энтальпия прямого конформационного перехода в состоянии с неразделенными зарядами, ΔH_d^* — энтальпия активации прямого конформационного перехода в состоянии с неразделенными зарядами, A_d и A_{dr} — размерные множители констант скоростей прямой и обратной реакций.

Аналогичные переходы происходят и в состоянии с разделенными зарядами. Если образцы РЦ находятся под действием насыщающего света, можно полагать, что система все время находится в состоянии с разделенными зарядами и рекомбинация эффективно не происходит. Такие условия реализуются при замораживании образцов РЦ на свету. В этом случае наблюдаются только переходы между конформациями $P^+Q_A^{-(1)} \leftrightarrow P^+Q_A^{-(2)}$, описываемые системой уравнений, аналогичной (1):

$$\begin{cases} \frac{dn_1}{dt} = -k_l^c n_1 + k_{lr}^c n_2, \\ n_1 + n_2 = 1. \end{cases} \quad (2)$$

Константы конформационных переходов в состоянии с разделенными зарядами описываются аналогично таковым в состоянии с неразделенными зарядами и независимо от них:

$$k_l^c = A_l e^{\frac{-\Delta H_l^*}{RT}},$$

$$k_{lr}^c = A_{lr} e^{\frac{-(\Delta H_l^* - \Delta H_l)}{RT}},$$

где ΔH_l — энтальпия прямого конформационного перехода в состоянии с разделенными зарядами, ΔH_l^* — энтальпия активации (высота потенциального барьера) прямого конформационного перехода в состоянии с неразделенными зарядами, A_l и A_{lr} — размерные множители констант скоростей прямой и обратной реакций в состоянии с разделенными зарядами.

При проведении измерений скорости рекомбинации, процесс разделения зарядов в РЦ инициируется короткой мощной вспышкой, после чего система подвергается лишь действию слабого зондирующего светового потока. В этих условиях помимо конформационных переходов наблюдается процесс рекомбинации зарядов. Эта система реакций описывается следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dn_1}{dt} = -(k_l^c + k_1^{et}) n_1 + k_{lr}^c n_2, \\ \frac{dn_2}{dt} = -(k_{lr}^c + k_2^{et}) n_2 + k_l^c n_1. \end{cases} \quad (3)$$

В этой системе уравнений переменные n_1 и n_2 описывают заселенности первой и второй конформаций РЦ в состоянии с разделенными зарядами и не включают заселенности соответствующих конформаций РЦ, в которых произошла рекомбинация. Таким образом, сумма $(n_1 + n_2)$ есть заселенность состояния РЦ с разделенными зарядами. Рекомбинация зарядов в модели происходит по двум независимым каналам: из первого конформационного состояния с константой скорости k_1^{et} и из второго конформационного состояния с константой скорости k_2^{et} . В модели учтен эффект теплового расширения белковой глобулы путем введения следующей температурной зависимости констант скоростей k_1^{et} и k_2^{et} :

$$k_1^{et} = k_{10}^{et} e^{-\beta dcT},$$

$$k_2^{et} = k_{20}^{et} e^{-\beta dcT},$$

где d — расстояние между димером бактериохлорофилла и первичным хиноном (25 Å), c — коэффициент линейного теплового расширения ($6,4 \cdot 10^{-5} K^{-1}$), β составляет $1,4 \text{ Å}^{-1}$ для α -спи-

ральных белков. Данная формула основана на эмпирической зависимости вероятности туннелирования электрона от расстояния между донором и акцептором [6].

Процедура расчета эффективной скорости рекомбинации состоит из нескольких этапов, моделирующих протокол реальных измерений [4]. Первый этап моделирует процесс замораживания образцов. На первом шаге рассчитываются равновесные заселенности конформаций в состоянии с неразделенными зарядами при 300 К. Далее, используя полученные величины в качестве начальных значений, выполняется численное интегрирование по времени уравнений (1), описывающих темновые реакции. При этом температура, входящая в выражения для констант скоростей конформационных переходов, линейно падает от 300 до 5 К. Таким образом рассчитываются заселенности конформационных состояний в образцах РЦ, замороженных в темноте. В случае образцов, замораживаемых на свету, первый шаг также состоит в численном интегрировании уравнений (1), описывающих конформационные переходы в состоянии с неразделенными зарядами. Однако температура при этом понижается лишь до 280 К, т. е. до температуры, при которой в эксперименте начиналось освещение образцов. Полученные на этом шаге заселенности используются в качестве начальных значений при численном интегрировании уравнений (2), описывающих конформационные переходы в состоянии с разделенными зарядами. Температура при этом линейно падает от 280 до 5 К. Этот шаг, соответственно, моделирует замораживание образца РЦ под действием насыщающего света.

Следующий этап расчетов моделирует нагревание образцов от 5 К до температуры, при которой производились измерения, а также пятиминутное термостатирование перед измерением. На первом шаге выполняется численное интегрирование уравнений (1), описывающих конформационные переходы в состоянии с неразделенными зарядами. При этом температура линейно растет от 5 К до температуры проведения измерений. После этого выполняется расчет заселенностей конформационных состояний после пяти минут термостатирования, используя в качестве начальных значений заселенности, полученные на предыдущем этапе.

На заключительном этапе рассчитывается кинетика распада состояния с разделенными зарядами в результате световых реакций, описываемых системой уравнений (3). При этом в качестве начальных значений используются заселенности конформационных состояний, полученные на предыдущем этапе. Суммарная заселенность обоих состояний с разделенными зарядами в начале реакции принимается равной единице. Решение этой системы является линейной комбинацией двух экспонент:

$$(n_1(t) + n_2(t)) = C_1 e^{-\lambda_1 t} + C_2 e^{-\lambda_2 t},$$

где предэкспоненциальные множители C_1, C_2 и коэффициенты в показателях экспонент λ_1, λ_2 выражаются через константы скоростей $k_l^c, k_b^c, k_1^{et}, k_2^{et}$ и начальные заселенности конформационных состояний $n_1(0), n_2(0)$. Для расчета эффективной скорости рекомбинации использовалось следующее выражение:

$$\log \langle k^{et} \rangle = C_1 \log \lambda_1 + C_2 \log \lambda_2,$$

являющееся дискретным аналогом выражения

$$\log \langle k^{et} \rangle = \int f(k) \log k \, d \log k,$$

использованного в [4] для вычисления эффективной скорости реакции рекомбинации.

Поясним механизм работы кинетической модели (см. рис. 4). Здесь и далее мы полагаем, что первое конформационное состояние заселено в состоянии с неразделенными зарядами, и ему соответствует большая константа скорости рекомбинации. Рассмотрим ситуацию с темноадаптированным образцом. После замораживания образца заселенность первого конформационного состояния близка к равновесной заселенности в состоянии с неразделенными зарядами (кривая 1). Изменения скорости рекомбинации с температурой в этом случае обусловлены релаксационными процессами в состоянии с разделенными зарядами (кривая 4). В ходе измерений, в состоянии с разделенными зарядами, заселенность первого конформационного состояния стремится релаксировать

к равновесному значению в состоянии с разделенными зарядами (кривая 2). Нагревание образца приводит к тому, что в какой-то момент скорость конформационного перехода $P^+Q_A^{-(1)} \rightarrow P^+Q_A^{-(2)}$ сравнивается со скоростью реакции рекомбинации из первого конформационного состояния $P^+Q_A^{-(1)} \rightarrow PQ_A$, что приводит к существенному падению заселенности первого конформационного состояния за время протекания реакции рекомбинации и уменьшению ее эффективной скорости.

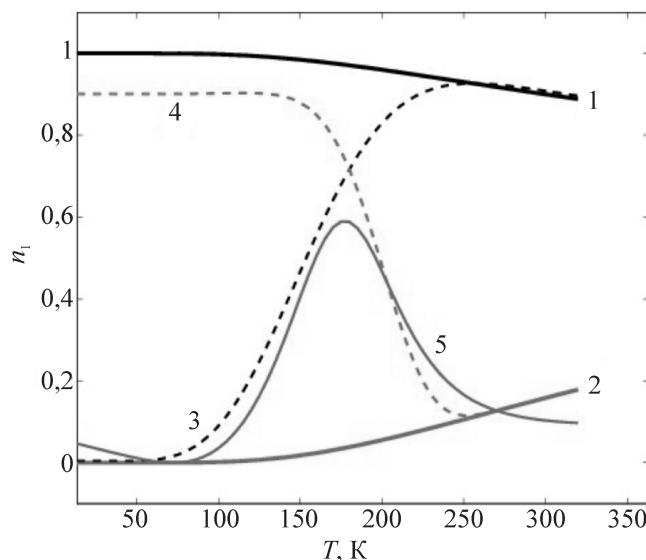


Рис. 4. Температурные зависимости заселенности 1-го конформационного состояния РЦ. (1) Равновесная заселенность в состоянии с неразделенными зарядами. (2) Равновесная заселенность в состоянии с разделенными зарядами. (3) Релаксация в темноте светоадаптированного образца. (4) Релаксация на свету темноадаптированного образца. (5) Нормированная эффективная скорость рекомбинации

В случае светоадаптированных образцов наблюдается обратная ситуация. Замороженные РЦ практически полностью находятся во втором конформационном состоянии (кривая 3). При нагревании образца в темноте заселенность первого конформационного состояния стремится релаксировать к равновесному значению в состоянии с неразделенными зарядами (кривая 1). При некоторой температуре скорость конформационного перехода $PQ_A^{(1)} \rightarrow PQ_A^{(2)}$ становится достаточной для того, чтобы за время термостатирования образца произошло существенное увеличение заселенности первого конформационного состояния, что приводит к росту эффективной скорости рекомбинации. Дальнейшее увеличение температуры, однако, приводит к ускорению конкурирующего процесса в состоянии с разделенными зарядами (см. выше) и снижению эффективной скорости рекомбинации (кривая 5).

Предложенная кинетическая модель была реализована средствами программного комплекса *MatLab*. Параметры модели были оптимизированы методом Нелдера–Мида [7]. В результате оптимизации удалось достичь значения среднеквадратичного отклонения от экспериментальных точек $0,7 \text{ с}^{-1}$ (рис. 6). Оптимизированные значения параметров модели приведены в таблице 1.

Квантово-химическое моделирование. Молекулярная модель сайта связывания первичного хинона (рис. 5, а) основывается на данных рентгеноструктурного анализа [3], PDB ID: 1AIG. В модель (рис. 5, б) были включены: первичный хинон, треонин M^{22} , триптофан M^{252} , пептидная связь, образуемая аланином M^{260} , а также лиганды негемового железа Fe^{2+} : глутамат M^{234} , гистидины L^{190} , L^{230} , M^{266} , M^{219} . Атом негемового железа в модель включен не был, ввиду ограничений использованного для расчетов метода. Для поиска стабильных конформаций модели выполнялась следующая процедура: координаты атомов модели изменялись вручную, с тем чтобы геометрия системы максимально соответствовала предполагаемой стабильной конформации. Затем выполнялась процедура оптимизации геометрии системы. В ходе подготовки стартовой конформации

системы, а также при ее оптимизации координаты части атомов фиксировались (см. рис. 5, b), с тем чтобы не допустить конформаций, не реализующихся в реальной системе. Поверхность потенциальной энергии модели была исследована в состоянии РЦ с разделенными зарядами (полный заряд модели равен $-1e$) и в состоянии с неразделенными зарядами (заряд модели равен $-2e$). Ненулевой заряд модели в состоянии с неразделенными зарядами связан с наличием в модели депротонированного остатка глутамата M^{234} , участвующего в образовании комплекса с атомом негемового железа.

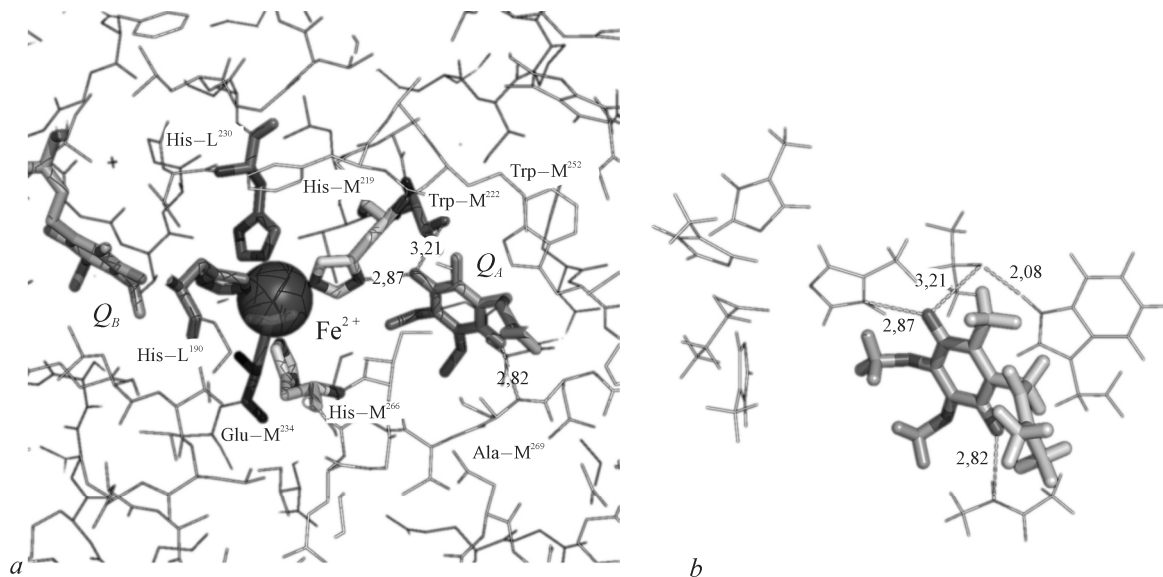


Рис. 5. (a) Сайт связывания первичного хинона. (b) Модель сайта связывания, использованная для расчетов. На схеме обозначены атомы, координаты которых фиксировались при подготовке исходных конформаций и оптимизации геометрии

Для оценки сверху энергии активации переходов между найденными конформационными состояниями использовалась процедура линейного смещения атомов, известная в англоязычной литературе под аббревиатурой LLM (Linear Least Motion). Разности потенциальных энергий в максимуме и минимумах полученной кривой являются оценкой сверху величин энергий активации соответствующих конформационных переходов.

Все квантово-химические расчеты были выполнены при помощи полуэмпирического метода PM3. Для расчетов использовался пакет программ PC GAMESS [8].

Результаты и обсуждение

В настоящей работе мы пытаемся подойти к решению проблемы поиска конформационного перехода в фотосинтетическом РЦ бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, комбинируя методы кинетического моделирования и вычислительной квантовой химии. Первый подход мы используем для интерпретации экспериментальных данных по температурной зависимости скорости реакции рекомбинации и определения микроскопических параметров этого процесса. С этой целью была предложена модель, учитывающая наличие двух конформационных состояний в РЦ, различающихся константой скорости рекомбинации $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$. Константы скоростей конформационных переходов зависят от температуры по Аррениусу и различны в состояниях с неразделенными и разделенными зарядами, что отражает изменения поверхности потенциальной энергии молекулярной системы при изменении ее электронной структуры. Указанные механизмы обуславливают перераспределение заселенностей конформационных состояний и, соответственно, изменение эффективной скорости рекомбинации с температурой, а также в зависимости от освещенности при замораживании образцов РЦ. Модель детально учитывает протокол проведения реального

эксперимента. Оптимизация параметров модели позволила достичь среднеквадратичного отклонения от экспериментальных точек [4] $0,7 \text{ с}^{-1}$ (рис. 6).

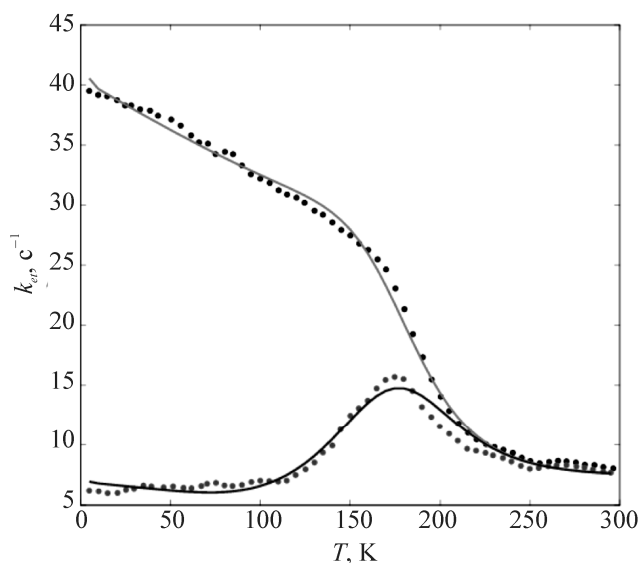


Рис. 6. Результаты фитирования параметров кинетической модели. На рисунке представлены экспериментальные точки из [4] и кривые температурной зависимости, предсказываемые кинетической моделью. Верхняя кривая соответствует состоянию темноадаптированным РЦ, нижняя кривая — светоадаптированным

В результате кинетического моделирования были определены константы скоростей реакции рекомбинации в обоих конформационных состояниях, энтальпии и энтальпии активации конформационных переходов, а также предэкспоненциальные множители констант скоростей конформационных переходов с состояний РЦ с разделенными и неразделенными зарядами. Физический смысл последней группы параметров требует отдельного пояснения. Предэкспоненциальные множители констант скоростей прямых и обратных конформационных переходов независимы, что пришлось допустить с целью лучшего соответствия модели экспериментальным данным. Не сложно показать, что логарифм отношения предэкспоненциальных множителей, домноженный на универсальную газовую постоянную, имеет смысл энтропии:

$$k_1 = A_1 e^{-\frac{\Delta H_1^*}{RT}},$$

$$k_{-1} = A_{-1} e^{-\frac{\Delta H_{-1}^*}{RT}},$$

$$\Delta H - T\Delta S = \Delta G = -RT \ln \frac{k_1}{k_{-1}},$$

$$\Delta H - T\Delta S = (\Delta H_1^* - \Delta H_{-1}^*) - RT \ln \frac{A_1}{A_{-1}},$$

$$\Delta H - T\Delta S = \Delta H - T \left(R \ln \frac{A_1}{A_{-1}} \right),$$

$$\Delta S = R \ln \frac{A_1}{A_{-1}},$$

где $\Delta H_{1,-1}^*$ — энтальпии активации прямой и обратной реакций.

Оптимизированные значения параметров модели приведены в таблице 1. Как видно из таблицы, константа скорости рекомбинации в первом конформационном состоянии (k_{10}) больше константы скорости рекомбинации во втором конформационном состоянии. Первое конформацион-

ное состояние также ниже второго по энергии в состоянии с неразделенными зарядами, несмотря на положительную энтропию прямого перехода ($\Delta S_d = 2,13 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ К}^{-1}$), которая при 300 К дает вклад в свободную энергию порядка $0,6 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$, что существенно меньше энтальпии прямого перехода ($\Delta H_d = 2,76 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$). Таким образом, в темноадаптированных образцах преимущественно оказывается заселенным первое конформационное состояние, что обуславливает высокую скорость рекомбинации. Обратная ситуация имеет место в случае светоадаптированных образцов. Отрицательная энергия прямого конформационного перехода в состоянии с разделенными зарядами приводит к тому, что в светоадаптированных образцах оказывается заселенным второе конформационное состояние, которому соответствует меньшая скорость рекомбинации. С повышением температуры «размораживается» конформационный переход в состоянии с неразделенными зарядами $PQ_A^{(2)} \rightarrow PQ_A^{(1)}$. Благодаря длительному термостатированию образцов перед измерением это приводит к росту заселенности первого конформационного состояния в светоадаптированных РЦ и увеличению эффективной скорости рекомбинации в области 120–175 К. Дальнейшее увеличение температуры, приводит к увеличению скорости конформационного перехода $P^+Q_A^{-(1)} \rightarrow P^+Q_A^{-(2)}$ в состоянии с разделенными зарядами. При температурах выше 175 К его скорость оказывается достаточной, для того чтобы существенно снизить заселенность первого конформационного состояния за время жизни состояния с разделенными зарядами ($\frac{1}{k_1}$). Это приводит к снижению эффективной скорости рекомбинации как в случае темноадаптированных, так и светоадаптированных образцов.

Оптимизированные значения параметров кинетической модели

Параметр	Значение
ΔH_d^*	$3,67 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$
ΔH_d	$2,76 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$
A_d	$25,76 \text{ с}^{-1}$
A_{dr}	$8,76 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$
ΔH_l^*	$0,20 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$
ΔH_l	$-1,17 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$
A_l	$9,08 \text{ с}^{-1}$
A_{lr}	$13,23 \text{ с}^{-1}$
k_{10}^{et}	$38,95 \text{ с}^{-1}$
k_{20}^{et}	$5,94 \text{ с}^{-1}$

Таким образом, предлагаемая кинетическая модель удовлетворительно описывает наблюдаемые температурные зависимости скорости реакции рекомбинации, что позволяет нам использовать оптимизированные значения параметров модели для поиска соответствующего конформационного изменения в структуре РЦ. Наиболее вероятной областью этих структурных изменений является сайт связывания первичного хинона. Исследование поверхности потенциальной энергии квантово-химической модели сайта связывания первичного хинона показало наличие двух стабильных конформаций (рис. 7). Обе конформации стабильны как в нейтральном, так и восстановленном состояниях первичного хинона, и отличаются небольшим смещением кольца убихинона, приводящим к разрыву водородной связи, образуемой 4–C=O группой убихинона с гистиридином M^{219} , и образованию новой водородной связи с гидроксильной группой треонина M^{222} . Используя процедуру линейного смещения атомов, для каждой пары конформаций был получен профиль потенциальной энергии соответствующего конформационного изменения (рис. 8). Полученный профиль не является истинной координатой реакции конформационного перехода, однако позволяет оценить величину энергии прямого и обратного переходов сверху.

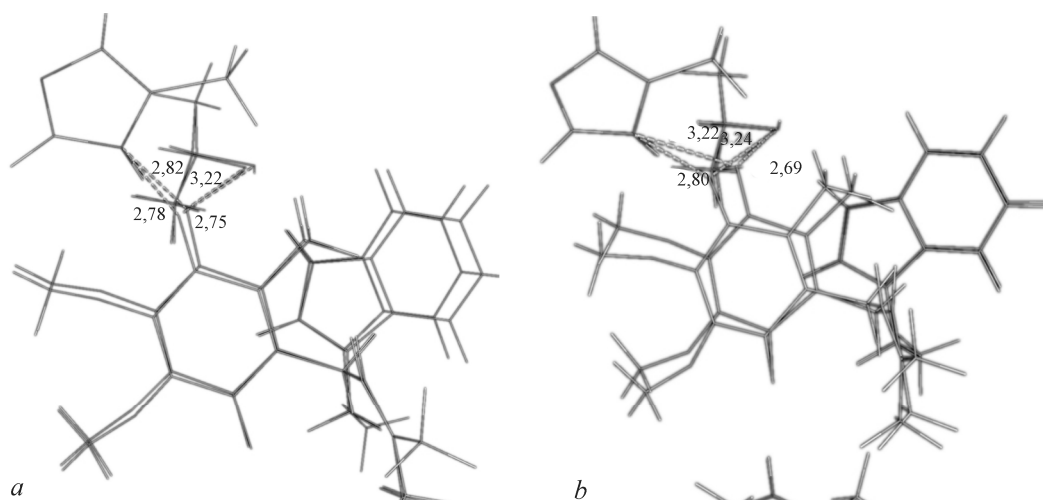


Рис. 7. Стабильные конформации модели сайта связывания первичного хинона. (a) В состоянии с неразделенными зарядами. (b) В состоянии с разделенными зарядами

На рис. 8 представлены результаты квантово-химических расчетов энтальпий переходов и энтальпий активации переходов между обнаруженными стабильными конформациями модели сайта связывания первичного хинона. Под расчетными значениями приведены величины, определенные из параметров кинетической модели. Квантово-химические расчеты предсказывают изменение знака энергии прямого конформационного перехода в результате одноэлектронного восстановления первичного хинона. Так, в нейтральном состоянии расчетная энергия прямого конформационного перехода составляет $3,9 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$, а в восстановленной модели $-0,4 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Соответствующие значения, полученные из кинетической модели, составляют 1,2 и $-1,4 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. Таким образом, квантово-химическая модель предсказывает качественно те же изменения поверхности потенциальной энергии сайта связывания первичного хинона, что и кинетическая модель. Качественное согласие результатов квантово-химических расчетов с результатами кинетического моделирования позволяет нам предположить, что указанная конформационная перестройка может являться механизмом регуляции скорости рекомбинации зарядов в фотосинтетическом РЦ бактерии *Rb. sphaeroides*.

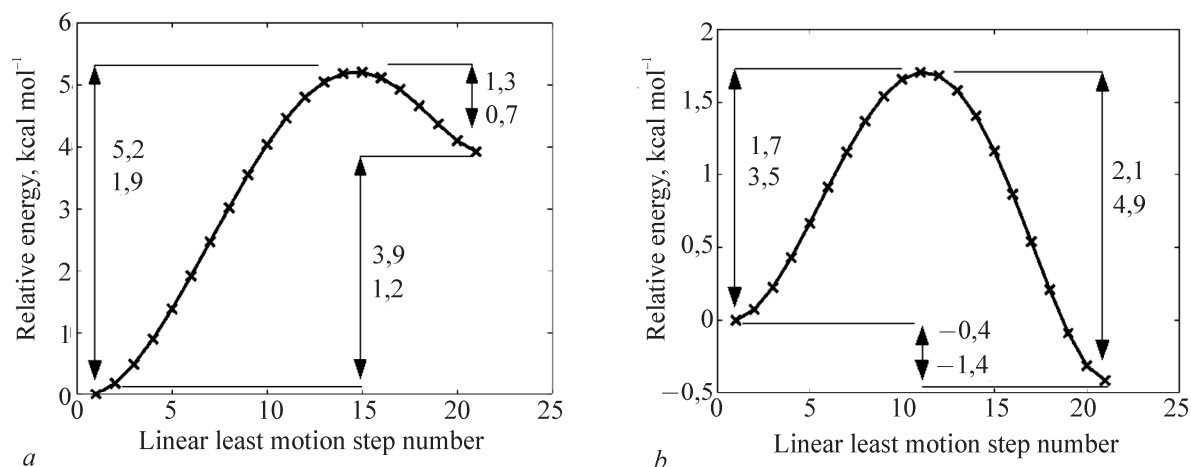


Рис. 8. Потенциальные кривые, полученные методом линейного смещения для модели сайта связывания первичного хинона. На графиках указаны разности энергий конформационных состояний, а также энергии активации конформационных переходов. Первое значение является расчетным значением, второе — оптимизированным параметром кинетической модели. (a) Состояние с неразделенными зарядами. (b) Состояние с разделенными зарядами

Заключение

В настоящей работе предпринята попытка идентификации конформационного перехода в фотосинтетическом РЦ бактерии *Rb. sphaeroides*, регулирующего скорость переноса электрона между первичным хиноном и димером бактериохлорофилла. Предложенная в работе кинетическая модель описывает экспериментальные температурные зависимости скорости реакции рекомбинации, позволяя извлечь из этих данных микроскопические характеристики соответствующего конформационного перехода. Исследование поверхности потенциальной энергии квантово-механической модели сайта связывания первичного хинона выявило наличие в этой системе двух стабильных конформационных состояний, отличающихся структурой водородных связей. Энергетические характеристики переходов между этими конформациями качественно согласуются с результатами кинетического моделирования. Этот факт позволяет нам предположить, что указанная конформационная перестройка может являться механизмом регуляции скорости рекомбинации зарядов в фотосинтетическом РЦ бактерии *Rb. sphaeroides*.

Список литературы

1. McElroy J. D., Mauserall D. C., Feher G. ВВА, 1974, 333, 261–277.
2. Петров Э. Г. Физика переноса зарядов в биосистемах. Киев: Наукова Думка, 1984.
3. Stowell M. H., MCPhillips T. M., Rees D. C., Soltis S. M., Abresch E., Feher G. Science, 1997, 276, 812.
4. McMahon B. H., Muller J. D., Wraight C. A., Nienhaus G. U. Bioph. J. 1998, 74, 2567–2587.
5. Xu Q., Baciou L., Sebban P., Gunner M. R. Biochemistry, 2002, 41, 10021–10025.
6. Moser C. C., Keske J. M., Warncke K., Farid R. S., Dutton P. L. Nature, 1992, 355, 796–802.
7. Nelder A., Mead R. Computer Journal, 1965, 7, 308–313.
8. Немухин А. В., Григоренко Б. Л., Грановский А. А. Вестник Московского университета. Сер. Химия, 2004, т. 45, № 2, с. 75.