

АЛГОРИТМ ИЗВЛЕЧЕНИЯ КИНЕТИКИ СЛАБЫХ ПОЛОС В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ СПЕКТРАХ ПОГЛОЩЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ *Rhodobacter sphaeroides**

© 2019 Р.А. Хатыпов^{1**}, А.М. Христин¹,
Л.Г. Васильева¹, В.А. Шувалов^{1,2}

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: rgreen1@rambler.ru

² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.02.2019

После доработки 21.03.2019

Принята к публикации 21.03.2019

Предложен способ построения кинетики ион-радикальных полос на фоне интенсивного поглощения в дифференциальных спектрах реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides* при фемтосекундном возбуждении первичного донора электрона. Построенные предложенным методом кинетика полосы поглощения при 1020 нм и кинетика выцветания полосы при 545 нм удовлетворительно описываются кинетическими уравнениями для последовательного переноса электрона от возбужденного первичного донора на молекулу мономерного бактериохлорофилла (V_A) и затем – на молекулу бактериофеофитина, который служит акцептором электрона (H_A), с константами скоростей $3,5 \pm 0,2$ и $0,8 \pm 0,1$ пс соответственно. В кинетике полосы поглощения бактериохлорофилла при 600 нм наблюдается как сверхбыстрое выцветание димера P_{870} , так и более медленное выцветание мономера V_A , обусловленное переходом его в анион-радикальную форму. Построенные кинетики ион-радикальных полос согласуются с профилями концентраций состояний с разделенными зарядами, полученными нами методом глобального анализа экспериментальных данных в рамках модели последовательного переноса электрона в реакционных центрах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фемтосекундная спектроскопия; бактериальные реакционные центры; перенос электрона.

DOI: 10.1134/S0320972519060083

Фотосинтетические реакционные центры *Rhodobacter sphaeroides* представляют собой трансмембранные белковые комплексы, состоящие из трех субъединиц L, M и H и десяти кофакторов переноса электрона, в которых происходят начальные сверхбыстрые фотофизические стадии процесса преобразования световой энергии в энергию состояний с разделенными заря-

дами. Кофакторами переноса электрона являются два бактериохлорофилла (БХл), образующих димер первичного донора электрона (P), два мономерных бактериохлорофилла (V_A и V_B), два бактериофеофитина (H_A и H_B), два хинона (Q_A и Q_B), атом негемового железа и молекула каротина. Кофакторы организованы в две псевдосимметричные цепи A и B, из которых активной является только цепь A [1, 2].

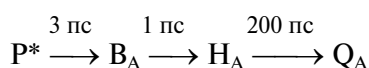
Известно, что под действием света в реакционных центрах происходит трансмембранный перенос электрона от возбужденного донора P^* на молекулу хинона Q_A . В настоящее время общепринято, что трансмембранный перенос электрона осуществляется через серию сверхбыстрых реакций, включающих молекулы V_A и H_A активной цепи кофакторов в качестве промежуточных акцепторов электрона. Существует значительная экспериментальная сложность обнаружения состояния $P^+V_A^-$, связанная с тем, что

Принятые сокращения: PC – реакционный центр; P – первичный донор электрона; БХл – бактериохлорофилл; V_A – мономерный БХл в активной цепи кофакторов; H_A – бактериофеофитин, который служит акцептором электрона; Q_A – первичный хинонный акцептор; Q_B – вторичный хинонный акцептор; фс – фемтосекунда; ΔA – изменение поглощения; $\Delta Gauss$ – изменение доли гауссовой полосы поглощения.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimija>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 19-039, 06.05.2019.

** Адресат для корреспонденции.

скорость переноса электрона на молекулу V_A меньше скорости переноса электрона с V_A^- на H_A [3, 4]. Это приводит к малой заселенности состояния $P^+V_A^-$, которая не превышает нескольких десятков процентов. Другая сложность связана с тем, что спектр состояния $P^+V_A^-$ замаскирован спектрами других состояний, включая P^* . Обнаружение минорной полосы анион-радикала V_A^- при 1020 нм в дифференциальных спектрах поглощения послужило основанием для обоснования четырехкомпонентной модели, в которой первичным акцептором электрона является молекула V_A [5, 6]. Согласно этой модели, трансмембранный перенос электрона осуществляется от возбужденного донора P^* на молекулу V_A с константой скорости ~ 3 пс, затем на молекулу H_A с константой скорости ~ 1 пс и на молекулу Q_A с константой скорости ~ 200 пс.



В последнее время исследователи первичных процессов разделения зарядов в реакционном центре (РЦ) фотосинтеза все чаще используют глобальный анализ массива дифференциальных спектров поглощения, измеренных с фемтосекундным (фс) временным разрешением [7], который позволяет описать весь набор спектральных данных с использованием математической и кинетической модели.

Этот метод позволяет аппроксимировать экспериментальные данные с помощью разных моделей: 1) модели последовательного переноса электрона [8–11]; 2) модели переноса электрона с учетом обратимости реакций разделения зарядов [8–10]; 3) модели разделения зарядов по двум каналам дезактивации в гетерогенном белковом окружении кофакторов в РЦ [10]. Следует отметить, что разделение короткоживущих состояний методом глобального анализа затруднено, если длительность возбуждающего импульса достаточно мала и наблюдаются когерентные эффекты. Таким образом, использование глобального анализа требует от исследователя привлечения дополнительной информации о процессах разделения зарядов для предложения адекватной физической модели.

В ряде случаев по-прежнему остается актуальным анализ кинетики изменения поглощения ΔA на заданной длине волны. Однако такой анализ бывает осложнен вкладом различных перекрывающихся спектральных компонентов. В качестве возможного подхода для решения этой проблемы в работе Carter et al. [12] был проведен экспоненциальный анализ сложной кинетики изменения поглощения ΔA при 600 нм для

оценки квантового выхода образования состояния $P^+H_B^-$ в мутантных РЦ *Rba capsulatus*. Другим подходом для решения проблемы перекрывающихся полос было построение кинетики анион-радикала V_A^- при 1020 нм с использованием аппроксимации спектральной подставки линией на широком интервале длин волн [13]. В данной работе мы предлагаем иной способ извлечения кинетики отдельных, в частности, короткоживущих, слабых полос поглощения и анализируем эти кинетики в рамках модели последовательного переноса электрона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реакционные центры *Rba sphaeroides* выделяли согласно описанной ранее методике [14]. Затем РЦ были суспендированы в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 0,1% (v/v) Тритон X-100, и сконцентрированы до поглощения 0,5 при 870 нм (длина оптического пути 1 мм). Спектры поглощения реакционных центров измеряли на спектрофотометре UV1800 («Shimadzu», Япония).

Подробное описание фемтосекундного лазерного спектрометра приведено ранее [15]. Фемтосекундные импульсы света (~ 35 фс, ~ 3 мДж) получали с помощью фемтосекундного лазера MaiTai SP с регенеративным усилителем Spitfire Ace («Spectra-Physics», США). Для возбуждения первичного донора электрона при 870 нм из континуума, полученного на сапфире, светофильтром RG850 («Newport», США) выделяли длины волн >850 нм. Измерительный луч делили на зондирующий и опорный. После вращающейся кюветы с образцом (толщина 1 мм) зондирующий и опорный импульсы направляли сначала в спектрограф Spectra Pro 2300i, а затем на CCD, Pixis 400BR («Princeton Instruments», США) для регистрации спектров в диапазонах 450–720 или 750–1100 нм. Относительная поляризация импульса возбуждения была параллельна измерительному импульсу. Частота вращения кюветы и частота возбуждения (10 Гц) подбирались таким образом, чтобы каждый возбуждающий импульс освещал новую часть РЦ. Интенсивность возбуждающих импульсов ослабляли так, чтобы возбуждались менее 20% реакционных центров в образце. Все измерения проводили при комнатной температуре.

Глобальный анализ массива разрешенных во времени дифференциальных спектров поглощения проводили с помощью программы Glotaran [16].

Алгоритм извлечения кинетики спектральных полос. При фемтосекундном возбуждении первичного донора электрона в дифференциальных

спектрах на разных задержках времени можно наблюдать появление полос поглощения компонентов электронного транспорта. Пусть поглощение компонента проявляется в виде симметричной гауссовой полосы. Эволюцию этого спектрального компонента во времени отражает кинетика изменений поглощения ΔA в максимуме полосы поглощения. С другой стороны, в окрестности максимума поглощения всегда можно найти точки A и B , равноудаленные от максимума на интервал длин волн δ (рис. 1, кривая 1). Очевидно, что в силу симметричности полосы среднее значение длин волн в точках A и B есть длина волны максимума поглощения, а среднее значение поглощения в точках A и B есть середина отрезка AB . Разность оптической плотности в максимуме поглощения и в середине отрезка AB есть доля амплитуды гауссовой полосы, кинетика изменений которой $\Delta Gauss$ такая же, как кинетика изменений поглощения ΔA в максимуме полосы, но кратно меньшая по амплитуде.

В области любой полосы поглощения всегда вносят вклад другие спектральные компоненты, которые образуют меняющуюся во времени спектральную подставку. Поэтому на любой задержке времени оптическая плотность в максимуме полосы поглощения есть сумма оптической плотности полосы поглощения и ее подставки. Вследствие этого кинетика изменений поглощения ΔA в максимуме полосы поглощения включает как кинетику самой полосы, так и кинетику изменения спектральной подставки. Пусть на некотором интервале длин волн спек-

тральная подставка линейна. Если на некоторой произвольной задержке времени, обозначив подставку прямой линией, провести прямую, параллельную подставке, то она пересечет гауссовую полосу поглощения в точках A^I и B^I , равноотстоящих от максимума полосы поглощения. Легко увидеть, что на разных задержках времени отрезок $A^I B^I$ всегда остается параллельным подставке, а когда полоса отсутствует, он лежит на подставке (рис. 1, кривая 2). Если из кинетики ΔA в максимуме полосы поглощения вычесть векторную полусумму кинетики ΔA в точках A^I и B^I , то в итоговой векторной разности мы получим одну и ту же долю спектральной полосы на каждой задержке времени. В этом случае кинетика $\Delta Gauss$, построенная предложенным выше способом, является кинетикой доли спектральной полосы, независимо от того с какой константой скорости изменяются амплитуда и угол наклона линейной подставки.

Если на некотором интервале длин волн спектральная подставка имеет кривизну, не меняющуюся во времени, то эта кривизна не влияет на кинетику $\Delta Gauss$, а только смещает ее на шкале оптической плотности. И только в том случае, когда кривизна подставки меняется во времени, она вносит искажения в кинетику $\Delta Gauss$, но искажения существенно меньшие, чем вклад всей спектральной подставки в целом.

Модель последовательного переноса электронов в реакционных центрах. В рамках последовательной модели разделения зарядов в комплексах реакционных центров пурпурных бактерий под действием света на пикосекундной шкале

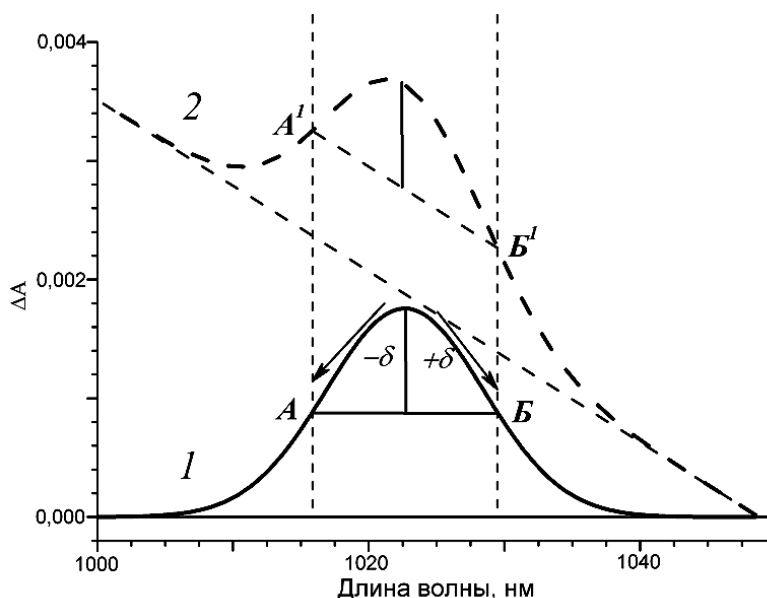
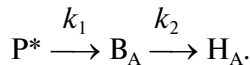


Рис. 1. Модель симметричной гауссовой полосы в дифференциальном спектре поглощения: 1 – без подставки, 2 – на фоне линейной спектральной подставки

времени происходит перенос электрона от возбужденного первичного донора P^* на молекулу B_A с константой скорости k_1 , а затем от молекулы B_A на бактериофеофитин H_A с константой скорости k_2 :



В начальный момент времени $[P^*] = a$, $[B_A^-] = 0$, $[H_A^-] = 0$. Поскольку в элементарном акте разделения зарядов происходит перенос одного электрона, то уравнение материального баланса: $[P^*] + [B_A^-] + [H_A^-] = a$.

Система дифференциальных уравнений для компонентов переноса электрона имеет вид:

$$\frac{d[P^*]}{dt} = -k_1[P^*].$$

$$\frac{d[B_A^-]}{dt} = k_1[P^*] - k_2[B_A^-].$$

$$\frac{d[H_A^-]}{dt} = k_2[B_A^-].$$

Решение этой системы уравнений позволяет получить уравнения кинетических кривых для концентраций P^* , B_A^- и H_A^- :

$$[P^*] = a \cdot \exp(-k_1 t), \quad (1)$$

$$[B_A^-] = \frac{k_1 \cdot a}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)), \quad (2)$$

$$[H_A^-] = a \cdot \left\{ 1 + \frac{k_1 \exp(-k_2 t) - k_2 \exp(-k_1 t)}{k_2 - k_1} \right\}. \quad (3)$$

Из приведенных уравнений видно, что при последовательном переносе электрона концентрация P^* с течением времени экспоненциально убывает, концентрация B_A^- сначала нарастает до максимума, а затем убывает до нуля, а концентрация H_A^- нарастает до значения a .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены кинетика изменений поглощения ΔA и кинетика изменений доли амплитуды полосы $\Delta Gauss$ в области поглощения анион-радикала B_A^- в РЦ *Rba. sphaeroides*. Кинетику изменений поглощения ΔA_{1020} (рис. 2, а) трудно приписать промежуточному акцептору электрона, поскольку она не затухает на шкале времени до нескольких наносекунд (данные не приведены) [4]. Это связано с тем, что в области 1020 нм существенный вклад вносят другие спектральные компоненты, которые образуют подставку [17]. Действительно, на задержках времени менее одной пикосекунды в этой кинетике наблюдаются отрицательные изменения поглощения, обусловленные стимулированным излучением при 935 нм, а на задержках времени в десятки пикосекунд – положительные изменения, обусловленные поглощением катион-радикала первичного донора электрона.

Эволюция полосы поглощения при 1020 нм происходит на фоне меняющейся во времени спектральной подставки (рис. 2, а, вставка). На задержках времени до десятков фемтосекунд эта подставка обусловлена положительным поглощением при 1100 нм и отрицательным поглощением стимулированного излучения при 935 нм.

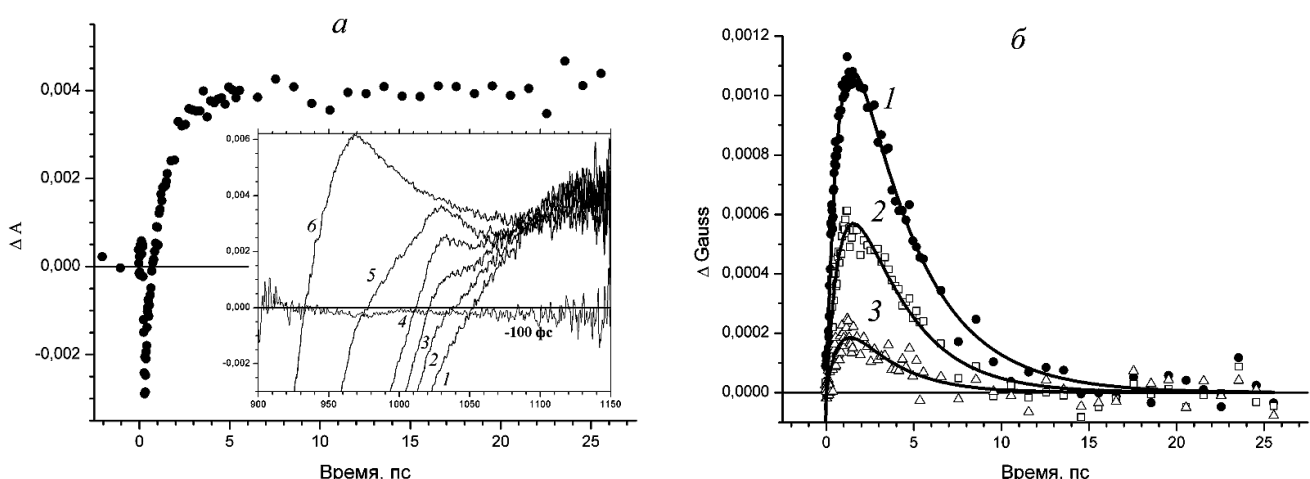


Рис. 2. а – Кинетика изменений поглощения ΔA при 1020 нм. Вставка: дифференциальные спектры поглощения, измеренные на задержках времени 0,3 пс (1), 0,53 пс (2), 0,85 пс (3), 1,5 пс (4), 3,7 пс (5) и 10,6 пс (6). б – Кинетика доли спектральной полосы $\Delta Gauss$ при 1020 нм, построенная на интервалах длин волн $\delta = \pm 15$ нм (кривая 1), $\delta = \pm 10$ нм (кривая 2), $\delta = \pm 5$ нм (кривая 3). Сплошными линиями показана аппроксимация кинетики уравнением 2

На небольшом интервале длин волн в окрестности 1020 нм сумму положительной и отрицательной гауссовых функций, образующих подставку, можно, в первом приближении, представить, как прямую линию. На задержках времени до десятков пикосекунд амплитуды этих спектральных полос уменьшаются, что приводит к изменению угла наклона подставки, и появляется поглощение катион-радикала первичного донора электрона, которое увеличивает амплитуду подставки. При таком рассмотрении эволюция полосы поглощения анион-радикала V_A^- происходит на линейной подставке, угол наклона и амплитуда которой существенно изменяются во времени. На рисунке 2, б представлены кинетики изменения доли спектральной полосы поглощения ($\Delta Gauss$) при 1020 нм, построенные для интервалов длин волн $\delta = \pm 15$ нм (кривая 1), $\delta = \pm 10$ нм (кривая 2) и $\delta = \pm 5$ нм (кривая 3). Уменьшение δ приводит к уменьшению соотношения сигнал–шум. Показано (рис 2, б), что вид построенной кинетики $\Delta Gauss$ не зависит от уровня экспериментального шума, неизбежного при измерении дифференциальных спектров поглощения. При всех значениях δ кинетика $\Delta Gauss$ представляет собой кинетику, характерную для промежуточного акцептора электрона. Однако уменьшение соотношения сигнал–шум приводит к увеличению погрешности в определении временных констант. Эта кинетика удовлетворительно аппроксимируется уравнением (2) для промежуточного акцептора электрона, который принимает электрон с константой скорости $3,5 \pm 0,2$ пс и отдает электрон с константой скорости $0,8 \pm 0,1$ пс, что хорошо согласуется с константами скоростей для молекулы V_A в модели

последовательного переноса электрона [8, 11].

На рис. 3 сравниваются кинетика изменений поглощения ΔA и кинетика изменения полосы $\Delta Gauss$ в области Q_x перехода БХл при 600 нм. В кинетике изменений поглощения ΔA_{600} при фемтосекундном возбуждении P_{870} происходит быстрое увеличение поглощения, обусловленное поглощением возбужденного первичного донора электрона, которое, по-видимому, превышает по амплитуде выцветающую полосу поглощения при 600 нм (рис. 3, а). Далее на пикосекундной шкале времени в кинетике ΔA наблюдается экспоненциальный спад со временем жизни $\sim 3,5$ пс, обусловленный уменьшением концентрации возбужденного первичного донора электрона P_{870}^* . В то же время на вставке к рис. 3, а видно, что в дифференциальных спектрах поглощения полоса при 600 нм полностью выцветает за время $\sim 0,1$ пс. Таким образом, в кинетике изменений поглощения ΔA в области Q_x -перехода БХл при 600 нм преобладают изменения поглощения, обусловленные эволюцией возбужденного первичного донора электрона.

Кинетика изменения полосы $\Delta Gauss$ при 600 нм, построенная для интервала длин волн $\delta = \pm 10$ нм, отражает эволюцию спектральной полосы при 600 нм без вклада возбужденного первичного донора электрона (рис. 3, б). В кинетике наблюдается быстрое (~ 60 фс) выцветание Q_x -полосы поглощения димера P_{870} , связанное с переходом первичного донора в возбужденное состояние. Далее на пикосекундной шкале времени и до 2,5 нс (рис. 3, б, вставка) амплитуда выцветания $\Delta Gauss$ не изменяется, поскольку возбужденный первичный донор электрона отдает электрон в активную цепь кофакторов с квантовым

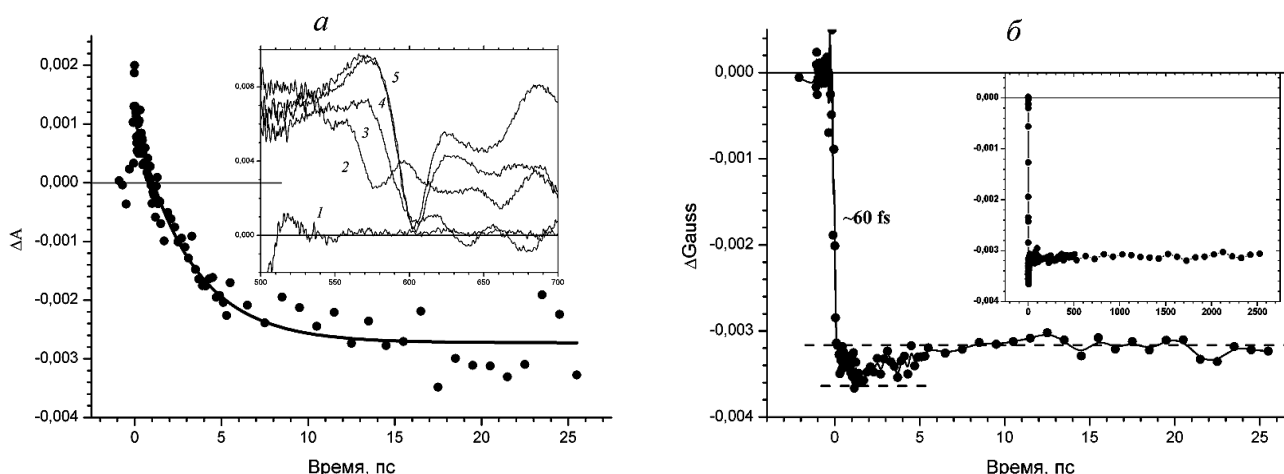


Рис. 3. а – Кинетика ΔA при 600 нм, измеренная от -2 до $27,5$ пс. Сплошной линией показана экспоненциальная аппроксимация кинетики. Вставка: дифференциальные спектры поглощения, измеренные на задержках времени $-0,5$ пс (1), $-0,15$ пс (2), $-0,05$ пс (3), $0,05$ пс (4) и $0,1$ пс (5). б – Кинетика изменения доли спектральной полосы $\Delta Gauss$ при 600 нм (интервал длин волн $\delta \pm 10$ нм), построенная от -2 до $27,5$ пс. На вставке показана кинетика $\Delta Gauss$ при 600 нм, построенная от -20 до $2,5$ нс

выходом, близким к единице, и переходит в катион-радикальную форму P_{870}^+ .

Обращает на себя внимание, что на ранних задержках времени в кинетике ΔGauss наблюдается дополнительный всплеск выцветания (рис. 3, б, вставка). Поскольку уровень выцветания полосы при 600 нм на наносекундной шкале времени обусловлен поглощением двух молекул бактериохлорофилла специальной пары, то этот всплеск, по-видимому, принадлежит третьей молекуле БХл. Если допустить, что дипольные силы Q_X -переходов четырех молекул бактериохлорофилла в РЦ соизмеримы, можно оценить, что эта третья молекула БХл выцветает только на ~20% в отличие от первых двух молекул. Всплеск выцветания достигает максимума на задержке времени 1,6 пс и затем спадает в течение ~10 пс (рис. 3, б). Кинетика этого дополнительного компонента воспроизводит кинетику спектральной полосы при 1020 нм (рис. 2, б) и, по-видимому, обусловлена выцветанием Q_X -полосы поглощения молекулы V_A при переходе ее в анион-радикальную форму. Сравнение рис. 3, а и 3, б позволяет заключить, что в кинетике ΔA при 600 нм фемтосекундное выцветание полосы поглощения первичного донора электрона и пикосекундное выцветание молекулы V_A , связанное с переносом на нее электрона, скрыто изменениями поглощения возбужденного первичного донора электрона, а в кинетике ΔGauss эти изменения наблюдаются в явном виде.

Кинетика изменений поглощения ΔA в области Q_X -перехода бактериофеофитина при 545 нм представлена на рис. 4, а. В этой кинетике на-

блюдается быстрое увеличение поглощения, обусловленное поглощением возбужденного первичного донора электрона. На пикосекундной шкале времени происходит уменьшение поглощения, связанное как с уменьшением концентрации возбужденного P_{870}^* , так и с выцветанием полосы поглощения бактериофеофитина H_A (рис. 4, а, вставка) [18].

В кинетике изменения полосы ΔGauss при 545 нм никаких быстрых процессов не наблюдается (рис. 4, б). На пикосекундной шкале времени происходит выцветание полосы при 545 нм, обусловленное тем, что молекула H_A принимает электрон и переходит в анион-радикальную форму H_A^- . На ранних задержках времени в кинетике выцветания полосы при 545 нм наблюдается слабый перегиб, который отличает ее от экспоненциальной кинетики. Действительно, эта кинетика хорошо описывается уравнением (3) для вторичного электронного акцептора с константами скоростей $3,4 \pm 0,2$ и $0,7 \pm 0,1$ пс. Все это позволяет заключить, что молекула H_A проявляет свойства не первичного, а вторичного акцептора электрона. Обращает на себя внимание то, что на задержках времени >15 пс можно наблюдать появление слабой релаксации, связанной с переносом электрона на следующий хинонный акцептор Q_A .

На вставке к рис. 4, б представлена кинетика ΔGauss при 545 нм, построенная на шкале времени до 2,5 нс. На этой шкале времени видно, что молекула H_A также является промежуточным акцептором электрона от возбужденного донора P^* на хинонный акцептор Q_A . Кинетика

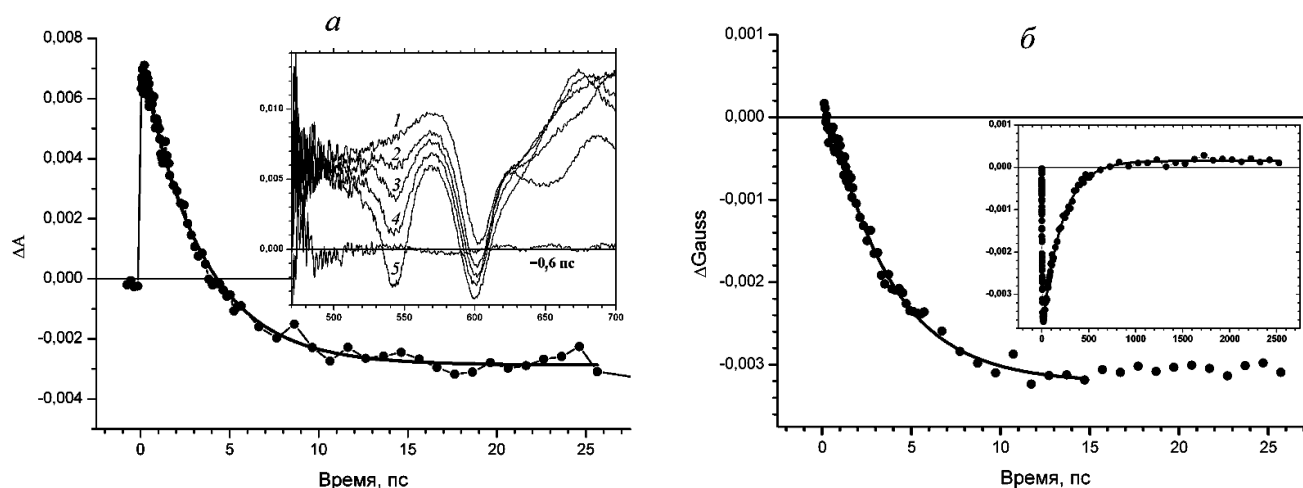


Рис. 4. а – Кинетика ΔA при 545 нм, измеренная от -2 до 27,5 пс. Вставка: дифференциальные спектры поглощения, измеренные на задержках времени 0,1 пс (1), 1,0 пс (2), 2,0 пс (3), 3,0 пс (4) и 8,0 пс (5). б – Кинетика изменения доли спектральной полосы ΔGauss при 545 нм (интервал длин волн $\delta \pm 10$ нм), построенная от -2 до 27,5 пс. Сплошной линией показана аппроксимация кинетики уравнением 3. На вставке показана кинетика ΔGauss при 545 нм, построенная от -20 до 2,5 нс

на вставке к рис. 4, б удовлетворительно описывается уравнением (2) с константами скоростей $3,5 \pm 0,4$ и 210 ± 10 пс.

Полученные в работе результаты позволяют построить зависимость концентраций состояний P^* , $P^+V_A^-$ и $P^+H_A^-$ от времени, то есть получить экспериментально измеренные кинетические кривые состояний с разделенными зарядами (рис. 5, а). Кинетика изменений поглощения ΔA при 930 нм (рис. 5, а, кривая 1), обусловленная затуханием стимулированного излучения, отражает эволюцию возбужденного состояния первичного донора электрона. Кинетика спектральной полосы $\Delta Gauss$ при 545 нм (рис. 5, а, кривая 3) отражает эволюцию состояния $P^+H_A^-$. Мы нормировали эти кинетические кривые на единицу, поскольку квантовый выход разделения зарядов $P^+H_A^-$ в РЦ близок к единице. Кинетика спектральной полосы $\Delta Gauss$ при 1020 нм (рис. 5, а, кривая 2) отражает эволюцию состояния $P^+V_A^-$. Эту кинетику мы нормировали на 0,2, так как Q_X -полоса поглощения молекулы V_A при 600 нм выцветает только на ~20%.

В то же время мы провели глобальный анализ экспериментального массива данных в рамках нескольких кинетических моделей: 1) модели переноса электрона с последовательно убывающими константами скоростей $k_1 > k_2 > k_3$ [9]; 2) модели переноса электрона с константами скоростей прямых реакций $k_{12} < k_{23} > k_{34}$ с учетом реакций рекомбинации зарядов состояния $P^+H_A^-$ через молекулу V_A с константами скоростей рекомбинации $k_{21} = 1/12$ пс и $k_{32} = 1/21$ пс [8, 10] и 3) для последовательной модели переноса электрона с константами скоростей реакций $k_1 < k_2 > k_3$ без учета обратных реакций [11]. В рам-

ках этих моделей мы построили модельные профили концентраций состояний P^* , $P^+V_A^-$ и $P^+H_A^-$. Обнаружили, что в случае переноса электрона с последовательно убывающими константами скоростей профиль концентрации состояния $P^+V_A^-$ в максимуме достигает не 20, а ~60%. Для модели переноса электрона с учетом обратных реакций заселенность состояния $P^+V_A^-$ длительно сохраняется, и это состояние можно наблюдать на шкале времени до нескольких сотен пикосекунд. И только для последовательной модели переноса электрона с константами 3, 1 и 200 пс без учета обратных реакций получаемые профили изменения концентраций состояний с разделенными зарядами имеют большое сходство с измеренной нами кинетикой слабых полос поглощения.

Сравнение рис. 5, а и 5, б показывает, что кинетика слабых полос поглощения $\Delta Gauss$ при 1020 и 545 нм и кинетика ΔA при 930 нм, построенные без предварительного привлечения каких-либо моделей, с хорошей точностью воспроизводят профили концентраций состояний с разделенными зарядами для последовательной четырехкомпонентной модели переноса электрона в РЦ.

Это позволяет утверждать, что кинетические кривые, построенные предложенным в работе алгоритмом, относительно мало искажены вкладом сопутствующих спектральных компонентов и достаточно точно отражают эволюцию концентраций состояний с разделенными зарядами. Полученные данные подтверждают результаты, полученные нами ранее [6, 13] и недавней работы Dominguez et al. [11], согласно которым в РЦ происходит именно последовательный гомо-

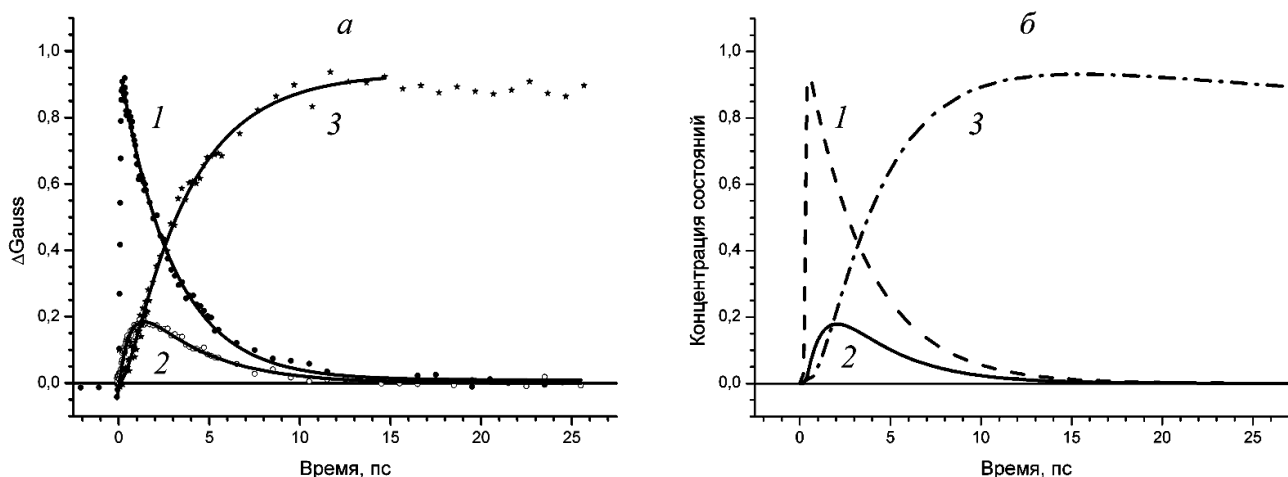


Рис. 5. а – Кинетика ΔA при 928 нм (кривая 1) и кинетики $\Delta Gauss$ при 1020 нм (кривая 2) и 545 нм (кривая 3), построенные от –2 до 27,5 пс. б – Профили концентраций состояний P^* (кривая 1), $P^+V_A^-$ (кривая 2), $P^+H_A^-$ (кривая 3), полученные методом глобального анализа экспериментальных данных

генный перенос электрона, включающий молекулу B_A в качестве первичного акцептора [19]. Это согласуется и с тем фактом, что и кинетика полосы при 1020 нм, и профиль концентрации состояния $P^+B_A^-$ в этой модели затухают на интервале времени до ~ 10 пс. В то время, как в модели обратимого переноса электрона, заселенность состояния $P^+B_A^-$ сохраняется на шкале времени до нескольких сотен пикосекунд [8, 10]. Полученные данные свидетельствуют также о том, что при возбуждении донора электрона импульсами света длительностью ~ 30 фс в РЦ при комнатной температуре происходит разделение зарядов по не адиабатическому механизму.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания № АААА-А17030110140-5 и при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 17-00-00207 и № 17-00-00209 КОМФИ).

Благодарности. Авторы выражают благодарность А.Я. Шкуропатову и А.А. Забелину за помощь в работе и обсуждение результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kirmaier, C., and Holten, D. (1987) Primary photochemistry of reaction centers from the photosynthetic purple bacteria, *Photosynth. Res.*, **13**, 225–260, doi: 10.1007/BF00029401.
- Woodbury, N.W., and Allen, J.P. (2004) In *Anoxygenic photosynthetic bacteria* (Blankenship, R.E., Madigan, M.T., and Bauer, C.E., eds) Kluwer Academic Publishers, New York, 527–557, doi: 10.1007/0-306-47954-0_24.
- Holzzapfel, W., Finkle, U., Kaiser, W., Oesterhelt, D., Scheer, H., Stolz, H.U., and Zinth, W. (1989) Observation of a bacteriochlorophyll anion radical during the primary charge separation in a reaction center, *Chem. Phys. Lett.*, **160**, 1–7, doi: 10.1016/0009-2614(89)87543-8.
- Arlt, T., Schmidt, S., Kaiser, W., Lauterwasser, C., Meyer, M., Scheer, H., and Zinth, W. (1993) The accessory bacteriochlorophyll: a real electron carrier in primary photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11757–11761, doi: 10.1073/pnas.90.24.11757.
- Kennis, J.T., Shkuropatov, A.Y., van Stokkum, I.H.M., Gast, P., Hoff, A.J., Shuvalov, V.A., and Aartsma, T.J. (1997) Formation of a long-lived $P^+B_A^-$ state in plant pheophytin-exchanged reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26 at low temperature, *Biochemistry*, **36**, 16231–16238, doi: 10.1021/bi9712605.
- Yakovlev, A.G., Shkuropatov, A.Y., and Shuvalov, V.A. (2000) Nuclear wavepacket motion producing a reversible charge separation in bacterial reaction centers, *FEBS Lett.*, **466**, 209–212, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01081-4.
- Van Stokkum, I., Larsen, D., van Grondelle, R. (2004) Global and target analysis of time-resolved spectra, *Biochim. Biophys. Acta*, **1657**, 82–104, doi: 10.1016/j.bbabi.2004.04.011.
- Holzwarth, A.R., and Muller, M.G. (1996) Energetics and kinetics of radical pairs in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: a femtosecond transient absorption study, *Biochemistry*, **35**, 11820–11831, doi: 10.1021/bi9607012.
- Kakitani, Y., Hou, A., Miyasako, Y., Koyama, Y., and Nagae, H. (2010) Rates of the initial two steps of electron transfer in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* as determined by singular-value decomposition followed by global fitting, *Chem. Phys. Lett.*, **492**, 142–149, doi: 10.1016/j.cplett.2010.03.071.
- Zhu, J., van Stokkum, I.H.M., Paparelli, L., Jones, M.R., and Groot, M.L. (2013) Early bacteriochlorophyll reduction in charge separation in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*, *Biophys. J.*, **104**, 2493–2502, doi: 10.1016/j.bpj.2013.04.026.
- Dominguez, P., Himmelstoss, M., Michelmann, J., Lehner, F., Gardiner, A.T., Cogdell, R.J., and Zinth, W. (2014) Primary reactions in photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* – time constants of the initial electron transfer, *Chem. Phys. Lett.*, **601**, 103–109, doi: 10.1016/j.cplett.2014.03.085.
- Carter, B., Boxer, S.B., Holten, D., and Kirmaier, C. (2012) Photochemistry of a bacterial photosynthetic reaction center missing the initial bacteriochlorophyll electron acceptor, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 9971–9982, doi: 10.1021/jp305276m.
- Yakovlev, A.G., Shkuropatov, A.Y., and Shuvalov, V.A. (2002) Nuclear wavepacket motion between P^* and $P^+B_A^-$ potential surfaces with subsequent electron transfer to H_A in bacterial reaction centers. 1. Room temperature, *Biochemistry*, **41**, 2667–2674, doi: 10.1021/bi0101244.
- Shuvalov, V.A., Shkuropatov, A.Ya., Kulakova, S.M., Ismailov, M.A., and Shkuropatova, V.A. (1986) Photochemical reactions of bacteriochlorophylls and bacteriochlorophylls in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and *Chloroflexus aurantiacus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **849**, 337–346, doi: 10.1016/0005-2728(86)90145-3.
- Khatypov, R.A., Khristin, A.M., Fufina, T.Yu., and Shuvalov, V.A. (2017) An alternative pathway of light-induced transmembrane electron transfer in photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 692–697, doi: 10.1134/S0006297917-060050.
- Snellenburg, J.J., Liptonok, S.P., Seger, R., Mullen, K.M., and van Stokkum, I.H.M. (2012) Glotaran: a Java-based graphical user interface for the R package TIMP, *J. Stat. Soft.*, **49**, 1–22, doi: 10.18637/jss.v049.i03.
- Sporlein, S., Zinth, W., and Wachtveilt, J. (1998) Vibrational coherence in photosynthetic reaction centers observed in the bacteriochlorophyll anion band, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 7492–7496, doi: 10.1021/jp9817473.
- Heller, B., Holten, D., and Kirmaier, C. (1996) Effects of Asp residues near the L-side pigments in bacterial reaction centers, *Biochemistry*, **35**, 15418–15427, doi: 10.1021/bi961362f.
- Shuvalov, V.A., and Duysens L.N.M. (1986) Primary electron transfer reactions in modified reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1690–1694, doi: 10.1073/pnas.83.6.1690.

**THE METHOD OF EXTRACTING THE KINETICS
OF WEAK BANDS IN THE TRANSIENT ABSORPTION
SPECTRA OF *Rhodobacter sphaeroides*
REACTION CENTERS**

**R. A. Khatypov^{1*}, A. M. Khristin¹, L. G. Vasilyeva¹,
and V. A. Shuvalov^{1,2}**

¹ *Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian
Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia;
E-mail: rgreen1@rambler.ru*

² *Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia*

Received February 15, 2019

Revised March 21, 2019

Accepted March 21, 2019

An algorithm to plot kinetics of ion-radical bands on the strong absorption background in transient absorption spectra of *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers upon femtosecond excitation of primary electron donor is proposed. The rising kinetics of transient absorption band at 1020 nm and the band bleaching kinetics at 545 nm built by the proposed method are fitted adequately by kinetic equations for sequential electron transfer from an excited primary donor to B_A molecule of bacteriochlorophyll monomer and then to bacteriopheophytin H_A molecule with time constants of 3.5 ± 0.2 and 0.8 ± 0.1 ps, respectively. In the kinetics of bacteriochlorophyll absorption band at 600 nm, both an ultrafast bleaching of P₈₇₀ dimer and slower bleaching of the B_A monomer due to its transition to anion-radical are observed. The plotted kinetics of ion-radical bands are consistent with the concentrations' profiles of the charge separated states fitted by the global target analysis of experimental data with use of the model of sequential electron transfer in reaction centers.

Keywords: femtosecond spectroscopy, bacterial reaction centers, electron transfer