

Комаревська Т. В., Кишякіна С. І., Заболотний М. А.

## СТРУКТУРНІ ЗМІНИ МАКРОМОЛЕКУЛ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ РЕАКЦІЙНИХ ЦЕНТРІВ RB SPHAROIDES

У роботі за допомогою методу голографічної інтерферометрії з використанням фототермопластичних реструючих середовищ досліджувалися плівки фотосинтетичних реакційних центрів (РЦ) RB Spharoides. Плівки були отримані шляхом природного сушіння водних розчинів РЦ при температурі 4 °С, їх товщина становила 0,3–0,5 мкм. Встановлено, що при освітленні плівок РЦ відбувається зменшення контрасту інтерференційних смуг без зміни їх положення. Швидкість зменшення контрасту інтерференційних смуг збільшується зі збільшенням інтенсивності освітлення плівок. Зроблено припущення, що цей ефект може бути обумовлений утворенням у плівці кластерів, що мають розміри порядку довжини хвилі. Цей ефект може бути викликаний зміною взаємодії між білково-пігментними комплексами РЦ у результаті фотоіндукованих структурних перебудов у комплексі РЦ.

### Вступ

Молекулярний комплекс РЦ є трисубодиночною М<sub>2</sub>L<sub>2</sub>N-глобулою з кофакторами (чотири бактеріохлорофіли, два бактеріофосфетини, два хінони та один високоспіновий атом заліза Fe<sup>2+</sup>). Відомо [1, 2], що при поглинанні кванта світла в РЦ відбувається фотоокиснення первинного донора електрона – димера бактеріохлорофілу (P). Збуджений електрон через ряд проміжних переносників потрапляє на первинний (Q<sub>a</sub>) хінонний акцептор, а потім на кінцевий (Q<sub>b</sub>). Структура молекулярного комплексу РЦ та схема фотоперенесення електрона представлена на рис. 1а, 1б.

На кожному з кофакторів ланцюга перенесення електрона його стабілізація викликана структурно-динамічною організацією молекулярного

комплексу РЦ. Так, процес локалізації електрона на хінонних акцепторах визначається станом усередині білкових водневих зв'язків (що утворюються в тому числі й за участі молекул води розчину), протонуванням йоногенними групами найближчих амінокислотних залишків та, можливо, супроводжується перебудовами структури молекулярного комплексу РЦ. З наведеної схеми видно, що найбільше часу в фотоактивованому стані електрон знаходиться на редокс кофакторі Q<sub>b</sub>. При цьому димер бактеріохлорофілу залишається додатньо зарядженим, потенціальний рівень кінцевого акцептора (Q<sub>b</sub>) знижується, а рівень первинного акцептора (Q<sub>a</sub>) залишається постійним. Це викликає сповільнення процесу інактивації електрона, оскільки його повернення з (Q<sub>b</sub>) на (P) відбувається через (Q<sub>a</sub>).

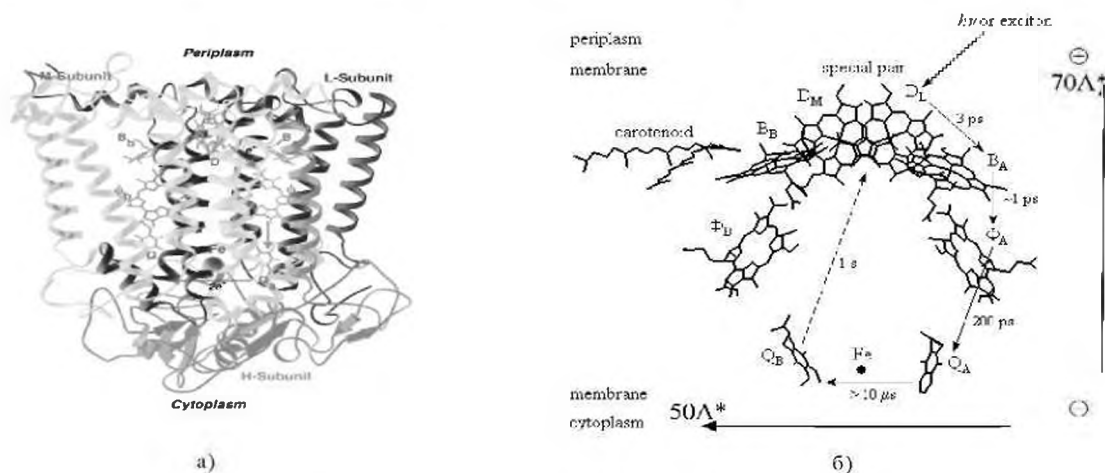


Рис. 1. Структура молекулярного комплексу РЦ (а) та схема фотоперенесення електрона (б)

Чим більше часу електрон знаходиться на ( $O_b$ ), тим більше просідає його рівень та тим більше ускладнюється процес інактивації електрона, тим більше часу молекулярний комплекс РЦ знаходиться під дією внутрішньомолекулярного електростатичного поля.

### Матеріали та методика

У роботі [3] показано, що при освітленні водного розчину молекулярного комплексу РЦ відбувається зменшення молекулярного об'єму комплексу РЦ на  $20\text{Å}^3$ , яке фіксувалося за зменшенням відстані між інтерференційними смугами, що збігалось з даними робіт [4–6]. У даній роботі продовжено вивчення фотоіндукованих змін у молекулярному комплексі плівок РЦ методом голографічної інтерферометрії з використанням фототермопластичних реєструючих середовищ. Оптична схема використаної установки представлена на рис. 2.

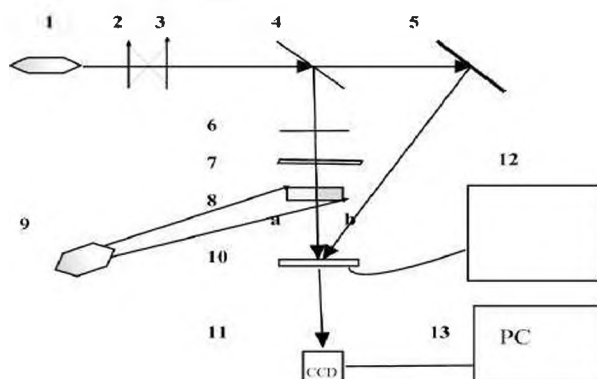
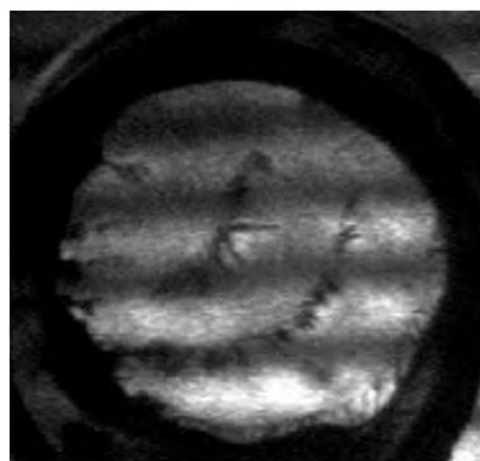


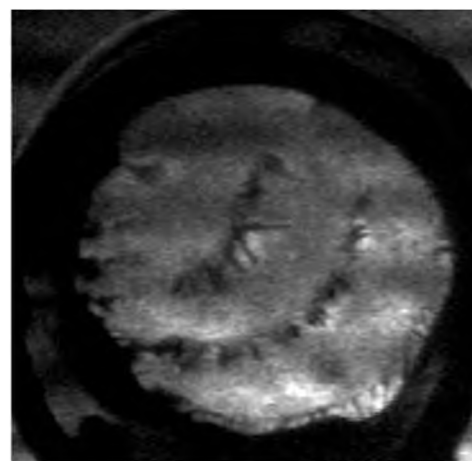
Рис. 2. Оптична схема установки: 1 – лазер ЛЛТ-79-1, 2, 3 – коліматор, 4 – напіввірозорне дзеркало, 5 – відбиваче дзеркало, 6 – плоскопаралельна пластина, 7 – дифузний розсіювач, 8а – кювета з буфером, 8б – кювета з розчином РЦ, 9 – джерело світла, що освітлює кювету, 10 – пластина з ФТП реєструючим середовищем, 11 – ПЗС-камера, 12 – блок керування процесом реєстрації голограм, 13 – ПК

У ролі об'єктів використовувалися плівки товщиною 0,3–0,5 мм з білково-пігментних комплексів РЦ, які були виділені з мембран клітин *Rhodobacter sphaeroides*. Плівки РЦ були отримані з водних розчинів 0,01М Na-фосфатного буферу з рН 7,2, який містив 0,05% детергенту. Концентрація молекул РЦ у розчині становила  $\sim 10^{-7}$  М. Розчин наливали в циліндричну кювету об'ємом  $4\text{ см}^3$  та сушили при температурі  $4^\circ\text{C}$  до повного висихання. Поверхня плівки не була дзеркальною. Підкладку з плівкою РЦ розміщували на голографічному столі, витримували в темряві протягом 2 годин та реєстрували голограму плівки РЦ (час реєстрації голограми становив 1 сек, інтенсивність об'єктного променя –  $0,5\text{ мкВт/см}^2$ , опорного променя –  $50\text{ мкВт/см}^2$ ).

Після реєстрації голограми вводили фазовий зсув в об'єктному промені, повертаючи пластинку 6. У площині підкладки з плівкою РЦ виникали інтерференційні смуги, які реєструвалися за допомогою ПЗС камери та ПК. ПЗС камера була сфокусована на поверхню плівки РЦ, її положення під час експериментів не змінювалося. Типовий знімок інтерференційної картини наведено на рис. 4. Точність вимірювання положення інтерференційних смуг дорівнює 0,025 їх ширини.



а)



б)

Рис. 3. а) темновий стан плівки РЦ, б) стан плівки РЦ після дії світла

### Результати

Спочатку (рис. 3а) інтерференційні смуги вкривають усе зображення підкладки. Площина їх локалізації знаходиться на поверхні плівки РЦ. Контраст смуг постійний у часі при відсутності засвічення плівок РЦ. Контраст смуг (видність) визначається як:

$$K = (I_{\max} - I_{\min}) / (I_{\max} + I_{\min}). \quad (1)$$

де  $I_{\max}$  – інтенсивність світлої смуги,  $I_{\min}$  – інтенсивність темної смуги.

При освітленні плівок РЦ збуджуючим світлом контраст інтерференційних смуг зменшувався без зміни відстані між смугами. Швидкість зміни контрасту залежала від інтенсивності освітлення РЦ. Зі збільшенням інтенсивності освітлення плівок РЦ швидкість зменшення контрасту інтерференційних смуг зростає. При цьому поляризація світла, яке пройшло через плівку РЦ, не змінюється. Також встановлено, що після зменшення інтенсивності освітлення повторний запис голограми плівки РЦ повертає контраст інтерференційних смуг до початкової величини. Повторне освітлення плівок РЦ знову приводить до зменшення контрасту інтерференційних смуг. Результати типових експериментів наведено на рис. 4, де спочатку плівка РЦ була засвічена світлом з інтенсивністю  $1 \text{ мкВт/см}^2$ , потім голограма плівки була перезаписана, а плівка РЦ була знову засвічена світлом з інтенсивністю  $100 \text{ мкВт/см}^2$ .

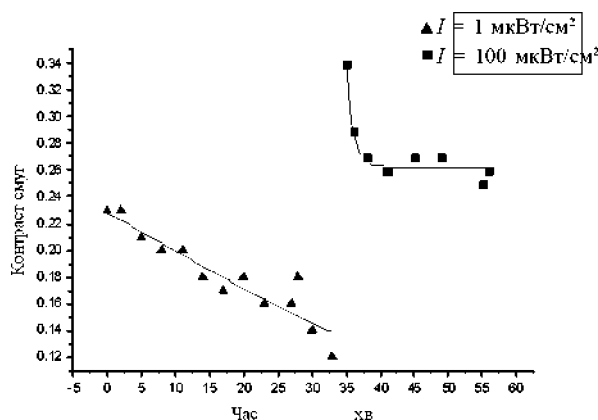


Рис. 4. а) плівки РЦ, засвічені світлом інтенсивністю  $100 \text{ мкВт/см}^2$ , б) плівки РЦ, засвічені світлом інтенсивністю  $1 \text{ мкВт/см}^2$

### Обговорення результатів

Розглянемо інтерференцію світла в деякій точці простору, в яку приходять світлові промені від точкового джерела та промені, розсіяні шорсткою поверхнею об'єкта в його недеформованому та деформованому станах [7]. Вважаємо, що існує дві в середньому гладкі поверхні. Одна – недеформована поверхня  $A$ , на якій положення точок  $P$  задано радіус-вектором  $\rho$ . Реальна поверхня  $A^*$  з точками  $P^*$  має мікропрофіль, що хаотично відхиляється від середньої поверхні  $A$ . Таким чином, розглянемо сукупність недеформованих поверхонь, що мають те саме положення, але різну мікроструктуру, та поряд з цим сукупність деформованих поверхонь, мікроструктура яких однакова з мікроструктурою недеформованих поверхонь. Описуючи проходження світла через плівку РЦ за допомогою випадкової

комплексної функції  $G(\rho)$ , при цьому не враховуючи, що інтенсивність світла, яке пройшло, може бути різною для різних напрямків, та нехтуючи неоднорідністю профілю поверхні плівки, вважаємо, що дійсна та уявна частини функції  $G(\rho)$  незалежні та мають нульові середні значення –  $E$ , тобто:

$$E[G(\rho)] = 0 \quad (2)$$

для будь-якої точки простору. Для малих зміщень об'єкта можна вважати, що світлові промені, що відповідають одній і тій же точці на недеформованій та деформованій поверхнях об'єкта, відрізняються тільки фазовим множником. Тоді величини, що характеризують стан деформованої поверхні, виявляються вираженими як функції величин, що характеризують стан недеформованої поверхні, яка є поверхнею порівняння. Повна комплексна амплітуда  $U_i(\rho)$  у точці  $K$ , обумовлена суперпозицією амплітуд світлових полів, розсіяних недеформованою  $U(\rho)$  та деформованою поверхнями  $U'(\rho)$ :

$$U_i(\rho) = U(\rho) + U'(\rho). \quad (3)$$

Інтенсивність сумарного поля з урахуванням (2) дорівнює:

$$J(\rho) = 1/2(E[UU^*] + E[U'U'^*] + E[U^*U'] + E[U'U'^*]) \quad (4)$$

$$J(\rho) = I + I' + \Gamma + \Gamma'^* \quad (5)$$

Можна показати, що  $I = I'$  і  $\Gamma = \Gamma'^*$ :

$$\Gamma = 1/2E[U^*U'] = |\Gamma| \exp[-2\pi i/\lambda (D_K)] \quad (6)$$

де  $D$  – фаза світлових променів деформованого стану об'єкта.

$$I_{\max} = 2(I + |\Gamma|), \quad I_{\min} = 2(I - |\Gamma|),$$

Контраст смуг дорівнює:

$$K = |\Gamma|/I \quad (7)$$

Таким чином, контраст смуг залежить від характеристик двох станів об'єкта, апертури системи спостереження та від положення  $\rho$  точки  $K$ , в якій спостерігаються смуги. Вважається, що смуги локалізовані в тих точках  $K$ , у яких їх контраст є максимальним.

Об'єктом слугували плівки РЦ товщиною  $0,3\text{--}0,5 \text{ мм}$ . Інтерференційні смуги були локалізовані на поверхні об'єкта. У такому випадку напрям вектора зміщення поверхні об'єкта збігається з напрямом спостереження об'єкта, а зміщення поверхні об'єкта незначне. Оскільки відстань між інтерференційними смугами не змінювалась, то середнє значення оптичної густини плівок РЦ при

їх освітленні теж не змінювалась, тому зміну контрасту смуг згідно з виразом (6) можна пояснити зміною мікропрофілю ( $D$ ) поверхні плівок РЦ. Крім того, слід зазначити, що такі особливості поведінки контрасту інтерференційної картини є типовими для спекл-інтерферометрії, коли контраст голографічних інтерферограм зменшується при інтерференції двох світлових картин з нестационарними областями когерентності (коли з часом змінюються розміри областей когерентності об'єкта). Це також можна вважати непрямим підтвердженням припущення про те, що при освітленні плівок РЦ в них відбувається кластеризація або помітна зміна розмірів кластерів, що мають розміри порядку довжини хвилі світла.

### Висновки

Контраст інтерференційних смуг плівок РЦ

1. Рубин А. Б. Биопфизика.– М.: Изд-во Моск. ун-та, 2000.– Т. 2.– 468 с.
2. Щувалов В. А., Климов В. А. // Биопфизика.– 1987.– Т. 32, вып. 5.– С. 814–829.
3. Барабани Ю. М., Заболотный М. А., Соколов Н. И., Харкянен В. Н. // Исследование медленных фотоиндуцированных изменений в реакционных центрах Rb. Sphaeroides R-26 методом голографической интерферометрии // Биопфизика.– 2002.– № 6.– С. 152–160.
4. Malkin S., Churio M. S., Shochat S. and Brastavsky S. E. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology 23.– 1994.– P. 79–85.
5. J. M. Hou, V. A. Boichenko, Y. C. Wang, P. R. Chitnis and D. Mauzera // Biochemistry.– 2001.– 40.– P. 7109–7116.
6. J. M. Hou, V. A. Boichenko, B. A. Diner and D. Mauzerall // Biochemistry.– 2001.– 40.– P. 7117–7125.
7. W. Schuman, M. Dubas. Holographic Interferometry.– Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979.– 189 p.

зменшується при їх освітленні. Швидкість зменшення контрасту збільшується зі збільшенням інтенсивності світла, що освітлює плівку РЦ. Можна зробити припущення, що при цьому відбувається утворення кластерів (або зміна їх розмірів) у плівках РЦ. Розміри кластерів порядку довжини хвилі світла, що освітлює плівки РЦ. Це узгоджується з припущенням про фотоіндуковані зміни у структурі молекулярного комплексу РЦ та можливою зміною міжмолекулярної взаємодії у досліджуваних зразках, наприклад, за рахунок зміни кута між зв'язками бактеріохлорофіл, бактеріофеофетин – первинним, вторинним хінонними акцепторами. Висока ймовірність такого процесу визначається значним часом перебування нерівноважного електрона на

вторинному хінонному акцепторі.

Komarevska T. V., Kshnyakina S. I., Zabolotny M. A.

### STRUCTURAL CHANGES IN PHOTOSYNTHETIC CENTERS RB SPHAEROIDES' MACROMOLECULES

*In this work the films of photosynthetic reaction centers Rb Sphaeroides drawn by the air-seasoning of the aqueous solutions of RCs at 4 °C were studied using the method of holographic interferometry. The films were 0.3, 0.5 mm thick. It has been established that during the RC films' illumination the reduction of interference bands' contrast occurs without their location change. The rate of contrast reduction becomes higher with the increase of the films' illumination intensity. It has been supposed that this effect may be caused by the formation of clusters whose size is commensurable to the light's wavelength. This effect may be due to the change in protein-pigment RC complexes' interaction as a result of photoinduced structural rebuildings in the RC complex.*