

Отчет о выполнении проекта № 19-14-00366 «Первичные процессы преобразования энергии в фотосинтетических реакционных центрах первого и второго типа: сравнительный анализ.» за 2019 год

Фотосистема 1 (ФС1) цианобактерий представляет собой пигмент-белковый комплекс из 12 отдельных субъединиц. Первичное разделение зарядов в ФС1 происходит в реакционном центре, который представляет собой гетеродимер, в его состав входит специальная пара молекул хлорофилла P700 и две симметричные ветви редокс-кофакторов А и В: первичный акцептор димер хлорофилла A0 (A0A и A0B) и вторичный акцептор филлохинон A1 (A1A и A1B). Помимо шести молекул хлорофилла, принимающих непосредственное участие в реакциях переноса электрона, в состав ФС1 входит также 90 молекул хлорофилла *a* и 22 молекулы β-каротина, которые служат антенными пигментами. Светособирающая антенна интегрирована с реакционным центром в один большой пигмент-белковый комплекс, что сильно усложняет изучение фотохимических процессов в ФС1. Помимо специальной пары P700, в ФС1 цианобактерий *Thermosynechococcus elongatus* и *Arthrospira platensis* было обнаружено несколько длинноволновых форм хлорофилла. ФС1 из *Synechocystis* 6803 содержит меньше красных форм хлорофилла, поэтому перенос энергии из антенны в реакционный центр в этом виде происходит быстрее, чем в двух других комплексах.

Методами фемтосекундной лазерной спектроскопии были исследованы процессы передачи энергии и разделения зарядов в комплексах ФС1, выделенных из *Thermosynechococcus elongatus* посредством обычной солюбилизации с применением детергента N-додецил-β-D-мальтозида (ДМ-ФС1) и нового метода без детергентов с использованием сополимеров стирола и малеиновой кислоты (СМК-ФС1). В обычных препаратах ДМ-ФС1, возбуждаемых импульсами в дальней красной области 740 нм, возбуждение оставалось локализованным на длинноволновых формах хлорофилла до 20 пс и не сопровождалось окислением специальной пары хлорофилла P700. Образование ион-радикальной пары P700(+)A1(-) происходило с характерным временем 40 пс, реакция была кинетически лимитирована процессом передачи энергии от красных форм хлорофилла к P700. В препаратах СМК-ФС1, выделенных без использования детергента, при возбуждении длинноволновыми импульсами 740 нм наблюдалось сверхбыстрое (<100 фс) разделение зарядов в половине комплексов, в остальной части комплексов передача энергии к P700 происходила со временем 40 пс аналогично препаратам ДМ-ФС1. Оба метода выделения позволяют получить тримерную форму ФС1, однако, использование детергента приводит к нарушению сверхбыстрого пути разделения заряда, сохраняющегося в препаратах СМК-ФС1, выделенных с использованием сополимеров стирола и малеиновой кислоты.

Спектральная динамика комплексов ДМ-ФС1 и СМК-ФС1, индуцированная возбуждением импульсами 670 нм в максимум поглощения светособирающей антенны, имела очень схожий характер: энергия мигрировала от пигментов, поглощающих при 670 нм, к длинноволновым формам хлорофилла в область 710-730 нм с характерным временем 1-3 пс. Миграция возбуждения выглядит как многоэтапный процесс, в котором энергия последовательно передается от высокоэнергетических форм хлорофилла к пигментам с низкой энергией. Разделение заряда происходило в этих условиях преимущественно со временем 40 пс, аналогично случаю прямого дальнего красного возбуждения импульсами центрированными на 740 нм.

Было проведено сравнение фотохимических процессов в ФС1 трех видов цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus elongatus* и *Arthrospira platensis*, содержащих различное количество длинноволновых форм хлорофилла в

светособирающей антенне. Оптическая динамика, индуцированная импульсами с центрировкой на 670-740 нм, регистрировались в спектральном диапазоне 400-900 нм с временным разрешением 0.1-500 пс. В препаратах ФС1 из цианобактерий *Thermosynechococcus elongatus* и *Arthrospira platensis* при облучении импульсами в дальней красной области 740 нм возбуждение оставалось локализованным на длинноволновых формах хлорофилла, образование ион-радикальной пары P700(+)/A1(-) происходило с характерным временем 40 и 100 пс, соответственно, и было кинетически лимитировано передачей энергии к P700. В препаратах ФС1 из *Synechocystis* sp. PCC 6803 при возбуждении длинноволновыми импульсами 720 нм происходило сверхбыстрое (<100 фс) разделение зарядов в большей части комплексов. При облучении ФС1 импульсами 670-680 нм миграция возбуждения от высокоэнергетического хлорофилла антенны к длинноволновым формам хлорофилла происходила в интервале времени 1-3 пс во всех трех исследованных видах цианобактерий. Обнаружено три механизма фотохимической генерации катиона P700+. Первый механизм наблюдался в комплексах ФС1 из *Synechocystis* sp. PCC 6803, в которых при облучении в дальней красной области 720 нм происходило прямое возбуждение специальной пары и сверхбыстрое образование ион-радикального состояния (P700A0)* → P700(+)/A0(-). Второй путь разделения заряда связан с миграцией энергии от длинноволновых форм хлорофилла к P700 в комплексах ФС1 из *Thermosynechococcus elongatus* и *Arthrospira platensis* с характерным временем 40-100 пс. Наконец, третий путь состоит в миграции энергии от высокоэнергетических форм хлорофилла антенны Ap* к длинноволновым формам хлорофилла со временем несколько пикосекунд. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о наличии альтернативной прямой передачи энергии от Ap* к P700.

Диэлектрические свойства окружения молекул хлорофилла и его химические лиганды существенно влияют на термодинамику и кинетику процессов переноса электрона по ветвям кофакторов ФС1. В ходе выполнения проекта были проанализированы фемтосекундные и стационарные дифференциальные спектры комплексов ФС1 с точечными заменами аминокислотных остатков в ближней координационной сфере второй пары молекул хлорофилла Хл2А и Хл2В. Мутации состояли из трех пар взаимных замен PsaA-N604 ⇒ L / M / H и PsaB-N591 ⇒ L / M / H, обозначенные как ANL, ANM, ANH и BNL, BNM, BNH соответственно. Наличие в этих спектрах плеча в длинноволновой области 700-720 нм указывает на возможное участие низкоэнергетических электронных состояний с разделенными зарядами.

Для интерпретации полученных экспериментальных данных необходимы спектральные характеристики перового возбужденного состояния (S1) хлорофилла как в видимой, так и в ближней инфракрасной области. Была проведена регистрация оптической динамики хлорофилла *a* в растворе N,N-диметилформамида. Дифференциальный спектр возбужденного состояния хлорофилла представляет собой суперпозицию спектра поглощения перового возбужденного состояния S1 (положительный), спектра выцветания основного состояния S0 (отрицательный), и спектра стимулированного излучением обратного перехода S1→S0 (отрицательный). Переходный спектр был нормирован по линейному спектру поглощения хлорофилла *a* полосы Core (430 нм). Спектр поглощения перового возбужденного состояния S1 был получен вычитанием из переходного спектра линейного спектра хлорофилла в N,N-диметилформамиде и полосы поглощения Q_Y, с помощью которой учитывался вклад стимулированного излучения. Полученный спектр состояния S1 имеет две особенности, которые не были отмечены ранее в литературе: наличие широкой полосы поглощения в дальней красной области 750-850 нм, и выраженной полосы поглощения с максимумом около 635 нм в красной области.

Полученные экспериментальные данные были проанализированы с помощью квантовой модели эксиплекса. В простейшем случае эксиплекс представляет собой два хлорофилловых мономера А и В, связанных в эксимер АВ. Электронная структура такого комплекса в возбужденном состоянии представляет собой комбинацию вкладов локально возбужденного (эксимер) и ионного (перенос заряда) состояний. В рамках этой модели было получено решение секулярного уравнения для трех возбужденных состояний и рассчитаны дипольные моменты соответствующих оптических переходов. Спектр чистого эксимера содержит только две полосы, наличие вклада с разделенными зарядами приводит к тому, что в спектре появляются три полосы выцветания и отличная от них полоса поглощения возбужденного состояния (ее энергия максимальна), что проявляется в виде характерного синего электрохромного сдвига. Был проведен анализ оптических спектров интермедиатов генетически модифицированных комплексов ФС1, полученных с помощью фемтосекундной спектроскопии, и стационарных дифференциальных спектров P700(+)/P700.

Было проведено определение скорости реакции переноса электрона в комплексах ФС1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, в которых сайты связывания филлохинона A_{1A} и A_{1B} содержали пластохинон или различные производные нафтохинона и антрахинона (2,3-Дихлор-1,4-нафтохинон, пластохинон, филлохинон, 1-аминоантрахинон, 2-аминоантрахинон, 1,2-диаминоантрахинон и 1,5-диаминоантрахинон). Скорость реакции переноса электрона от первичного акцептора A_0 к вторичному акцептору A_1 в ФС1 с замещенными хинонами определяли с помощью глобального разложения спектральной динамики на экспоненциальные компоненты. Экспериментально определенная зависимость скорости переноса электрона в десятичных логарифмических координатах от движущей силы реакции $-\Delta G$ оказалась очень слабой: при увеличении движущей силы реакции от -0.43 до -1.0 эВ скорость переноса электрона возрастала всего в два раза. В неадиабатическом приближении теории переноса электрона Маркуса-Догонадзе в высокотемпературном пределе зависимость логарифма скорости от движущей силы имеет вид параболы, максимум которой соответствует энергии реорганизации ($\Delta G = -\lambda$). По литературным данным энергия реорганизации реакции переноса электрона от A_0 к A_1 не превышает 1.1 эВ, при этом крутизна параболической зависимости уменьшается с увеличением величины λ . Показано, что механизм изучаемой реакции не может быть описан в высокотемпературном приближении и требует рассмотрения квантовых колебательных (фононных) мод. Была рассчитана модель двух фононных мод в приближении Джортнера: квантовая мода (частота 1200 см^{-1} , энергия реорганизации 1.02 эВ) и медленная мода (30 см^{-1} и 0.10 эВ). Приближение Джортнера значительно лучше описывает наблюдаемую зависимость, однако, имеет ряд существенных расхождений с экспериментом, что свидетельствует о необходимости более сложной многофононной модели, которая включает континуум низкочастотных и несколько высокочастотных квантовых мод.

Методами фемтосекундной спектроскопии «возбуждение-зондирование» были проведены измерения оптической динамики в ядерных комплексах и в D1D2 комплексах фотосистемы 2 (ФС2) высших растений при температуре 77 и 283 К. Возбуждение осуществлялось фемтосекундными импульсами в области 700-710 нм длительностью 25 фс. Показано, что в ядерных комплексах выцветание полосы в области 545 нм происходило с кинетикой медленнее 1 пс, тогда как в D1D2 комплексах выцветание этой полосы имело место уже на минимальных задержках менее 100 фс. Была определена динамика выцветания полосы поглощения феофитина QX в реакционном центре ФС2 в области 545 нм. В ядерных комплексах ФС2 при комнатной температуре выцветания полосы 545 нм происходило со временем около 15 пс. В ядерных комплексах при температуре 77 К, а в D1D2 комплексах во всем температурном диапазоне наблюдалось сверхбыстрое (≤ 100 фс) выцветание полосы феофитина 545 нм. Имеющиеся данные,

однако, не позволяют идентифицировать, является ли это выцветание результатом восстановления феофитина в ходе реакции разделения зарядов, или это следствие прямого возбуждения феофитина длинноволновым импульсом с максимумом на 700 нм.