

Исследование динамики релаксации комплекса LH2 из фотосинтезирующей пурпурной бактерии *Thiorhodospira sibirica* при фемтосекундном возбуждении и зондировании в ближней ИК области спектра

А.П.Разживин, В.О.Компанец, Р.Ю.Пищальников,
А.А.Москаленко, З.К.Махнева, В.С.Козловский, С.В.Чекалин

Методом возбуждения-зондирования исследованы фотоиндуцированные изменения оптического поглощения комплекса LH2 (B800-830-850) из Thiorhodospira sibirica (Trs. sibirica), обладающего аномальным спектром с тремя пиками в ближней ИК области ($\lambda = 793, 826.5$ и 846.5 нм). При комнатной температуре зарегистрирован уход энергии возбуждения из полосы B800 с постоянной времени $\tau_1 \sim 0.5$ пс, из полосы B830 – с $\tau_2 \sim 2.5$ пс и из полосы B850 – с τ_3 порядка сотен пикосекунд. Быстрый (по сравнению с длительностью дезактивации возбуждений в полосе B850) уход энергии из полосы B830 ($\tau_2 \ll \tau_3$) свидетельствует о принадлежности всех трех полос одному комплексу (о гомогенности препарата LH2 из Trs. sibirica). Более медленный (в 3–5 раз) уход энергии из полосы B830 комплекса LH2 из Trs. sibirica по сравнению с уходом из полосы B800 комплексов LH2 (B800-850 и, особенно, B800-820) из других пурпурных бактерий указывает на существенное различие электронных структур ансамбля молекул бактериохлорофилла в этих комплексах.

Ключевые слова: метод возбуждения-зондирования, фемтосекундная спектроскопия, перенос возбуждений, пурпурные бактерии.

1. Введение

Структурной основой фотосинтетического аппарата пурпурных бактерий являются пигмент-белковые комплексы реакционного центра и светособирающей антенны (прицентровый комплекс LH1 и периферический комплекс LH2). Обычно спектры поглощения комплексов LH2 имеют две полосы поглощения с максимумами вблизи $\lambda = 800$ и 850 нм. Полоса на $\lambda = 850$ нм обусловлена поглощением молекул бактериохлорофилла (БХл), образующих кольцо из 16 или 18 молекул, а полоса на $\lambda = 800$ нм определяется поглощением молекул БХл расположенного над ним второго кольца из 8 или 9 молекул. Часто первое кольцо обозначается B850, а второе – B800. Молекулы БХл в кольце B850 достаточно сильно сближены, что приводит к экситонному взаимодействию и делокализации возбуждения по кольцу (энергия парных взаимодействий между соседними молекулами БХл составляет несколько сотен обратных сантиметров). Энергия взаимодействия между молекулами БХл в кольце

B800 и между кольцами не превышает примерно 30 см^{-1} , поэтому молекулы БХл в первом приближении можно рассматривать как мономеры (подробнее см. обзоры [1, 2]).

Недавно была описана новая фотосинтезирующая пурпурная бактерия *Thiorhodospira sibirica* (Trs. sibirica) [3]. Комплекс LH2 этой бактерии имеет аномальный трехгорбый спектр (который можно обозначить B800-830-850). Для объяснения оптических свойств этого комплекса нами была предложена модель его строения [4], основанная на двух предположениях. Во-первых, принимается, что диполь перехода каждой второй молекулы БХл кольца B850 повернут на 90° относительно его направления в предыдущей молекуле БХл, и, во-вторых, полагается, что расстояние между кольцами B850 и B800 составляет лишь примерно 10 \AA , а не 17 \AA [1].

Кинетика переноса энергии от полосы B800 к полосе B850 в комплексе LH2 из разных бактерий при различных условиях исследовалась в ряде работ (см., напр., обзор [2]). При комнатной температуре постоянная времени переноса энергии возбуждения от полосы B800 к B850 меняется в пределах $0.65 - 1.2$ пс [5–8], а от полосы B800 к B820 – в пределах $0.75 - 0.9$ пс [6, 9]. В препаратах выделенного комплекса LH2, в отличие от хроматофоров, канал ухода возбуждений из полосы B850 (или B820) отсутствует, поэтому время жизни возбуждений в полосе B850 (B820) составляет не менее 600 пс [5, 6, 10].

В настоящей работе исследовался перенос энергии возбуждения между полосами поглощения комплекса LH2 из *Trs. sibirica* при возбуждении его фемтосекундными импульсами с $\lambda = 800$ нм при комнатной температуре.

А.П.Разживин, Р.Ю.Пищальников, В.С.Козловский. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, Россия, 119992 Москва, Воробьевы горы; факс: (095) 939 31 81, e-mail: razjivin@belozersky.msu.ru
В.О.Компанец, С.В.Чекалин. Институт спектроскопии РАН, Россия, 142190 Троицк, Московская обл.; факс: (095) 334 08 86, e-mail: chekalin@isan.troisk.ru
А.А.Москаленко, З.К.Махнева. Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Россия, 142290 Пущино, Московская обл.; e-mail: andrey-mos@issp.serpukhov.su

Поступила в редакцию 22 сентября 2004 г.

2. Экспериментальная часть

Для регистрации динамики разностных спектров фотоиндуцированных изменений оптического поглощения образца использовалась фемтосекундная лазерная установка Центра коллективного пользования Института спектроскопии РАН. Установка состоит из фемтосекундного лазера Tsunami HP, регенеративного усилителя Spitfire HP и широкополосной системы регистрации. Накачка фемтосекундного лазера осуществлялась на $\lambda = 532$ нм непрерывным твердотельным Nd:YVO₄-лазером Millennia-V мощностью 4.5 Вт, усилитель накачивался импульсным твердотельным Nd:YLF-лазером Evolution-X ($\lambda = 527$ нм), средняя мощность которого при частоте повторения импульсов 1 кГц составляла 8 Вт. Энергия фемтосекундных импульсов с $\lambda = 800$ нм на выходе усилителя могла достигать 1 мДж при длительности импульса 45 фс и частоте повторения 1 кГц. Спектральная ширина импульсов на полувысоте составляла ~ 20 нм. Излучение после усилителя разделялось на два канала с помощью светоделительной пластинки (рис.1). В один из каналов помещалась управляемая компьютером оптическая линия задержки, минимальный временной шаг которой составлял 1.37 фс, а также кварцевая пластинка и поляризатор, позволяющие поворачивать плоскость поляризации излучения в диапазоне углов 0–90°.

Ослабленные импульсы излучения этого канала использовались в качестве возбуждающих, для чего они фокусировались в пятно диаметром 0.5 мм на кювете с образцом. Зондирование проводилось излучением другого канала, преобразованным в импульсы фемтосекундного суперконтинуума с широким спектром (400–1100 нм) при фокусировке в пятимиллиметровую кювету с водой. Во избежание теплового искажения пространственного распределения пучка при прохождении его через кювету применялась принудительная ламинарная прокачка воды. Далее зондирующее излучение делилось кварцевой клиновидной пластиной 4 на два равных пучка (сигнальный, проходящий через область возбуждения образца, и опорный, проходящий через образец вне области возбуждения). Оба зондирующих пучка фокусировались ахроматической линзой с фокусным расстоянием 80 мм в пятно диаметром 0.15 мм на кювете с образцом,

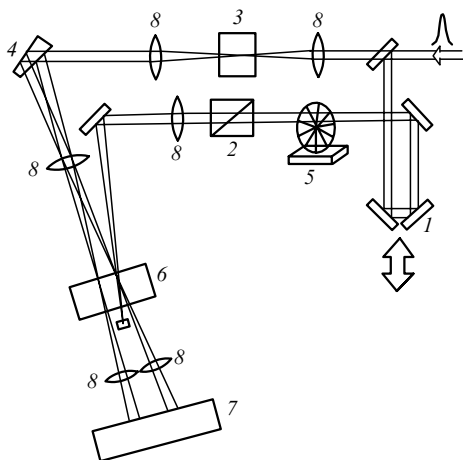


Рис.1. Схема эксперимента:

1 – линия задержки; 2 – вращатель поляризации; 3 – кювета для генерации суперконтинуума; 4 – клиновидная пластина; 5 – оптический модулятор; 6 – кювета с образцом; 7 – спектрометр; 8 – ахроматические линзы.

разнесенные на расстояние 8 мм. Угол между пучками накачки и зондирования составлял 25°. После прохождения через образец исследуемая часть спектра суперконтинуума (750–1050 нм) вырезалась решеточным монохроматором и регистрировалась двумя быстродействующими диодными ПЗС-линейками (1024 пикселя). Для получения разностных спектров возбуждающее излучение модулировалось прерывателем 5 с частотой 500 Гц, изменение оптической плотности для каждой длины волны определялось по формуле

$$\Delta A = -\lg \left[\frac{I_1/I_2}{I_1^0/I_2^0} \right],$$

где $I_{1,2}$ и $I_{1,2}^0$ – интенсивности зондирующего и опорного импульсов при наличии возбуждения ($I_{1,2}$) и в его отсутствие ($I_{1,2}^0$). Образец помещался в пятимиллиметровую кварцевую кювету объемом 1 см³. Для предотвращения деградации образца кювета перемещалась в вертикальном направлении с частотой 150 Гц. Для этого она крепилась на головку звукового динамика, на которую подавался сигнал от генератора низкой частоты.

Число квантов, падающих на кювету с образцом, составляло $(1 - 2) \times 10^{14}$ на 1 см² за импульс, что соответствует возбуждению примерно каждого третьего комплекса LH2 при поглощении импульса излучения с $\lambda = 800$ нм.

3. Результаты и их обсуждение

На рис.2 представлен спектр оптического поглощения комплекса LH2 (B800-830-850) из *Trs. sibirica*. Теоретический спектр этого комплекса и его экситонные компоненты были рассчитаны, как в [4]. Видно, что импульсы с $\lambda = 800$ нм не обеспечивают селективного возбуждения самой коротковолновой полосы поглощения с максимумом около 793 нм. Хотя основная часть энергии возбуждения поглощается на длинноволновом крае полосы B800, все же некоторая часть этой энергии должна поглощаться и на коротковолновом крае полосы B830. Согласно расчету экситонных компонентов (рис.2) прямое возбуждение полосы B830 импульсами с $\lambda = 800$ нм может быть достаточно сильным. Тем более, что спектральная ширина возбуждающего импульса достигает ~ 20 нм на полувысоте.

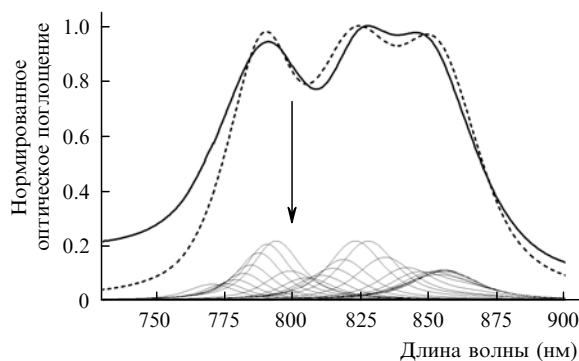


Рис.2. Спектр оптического поглощения комплекса LH2 из *Trs. sibirica*, снятый при комнатной температуре в ближней ИК области (жирная сплошная кривая), теоретический спектр этого комплекса (штриховая кривая) и экситонные компоненты теоретического спектра (тонкие сплошные кривые). Стрелкой указана длина волны возбуждающего УКИ.

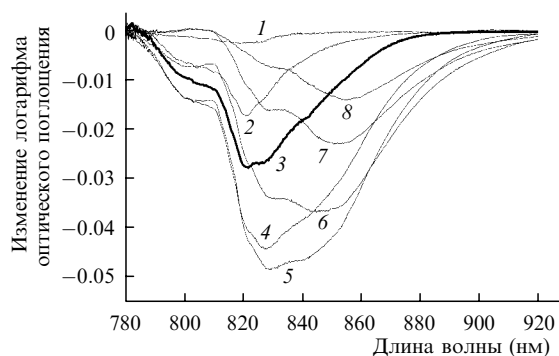


Рис.3. Спектры фотоиндуцированных изменений оптического поглощения комплекса LH2 из *Trs. sibirica* в зависимости от временной задержки (или опережения) зондирующего импульса относительно возбуждающего. Кривые 1 и 2 – время опережения 822 и 137 фс, кривая 3 – спектр, соответствующий нулевому моменту времени (максимумы возбуждающего и зондирующего импульсов совпадают), кривые 4–8 – время задержки 274, 493, 1178, 4192 и 12522 фс соответственно.

Спектры фотоиндуцированных изменений оптического поглощения комплекса LH2 представлены на рис.3. Видно, что вначале развивается выцветание в длинноволновой части полосы В800 и одновременно в коротковолновой части полосы В830 (пик вблизи $\lambda = 821$ нм). Степень выцветания вблизи $\lambda = 821$ нм оказывается существенно больше, чем, например, на $\lambda = 800$ нм, хотя, как видно из рис.2, поглощение в полосе В800 на $\lambda = 800$ нм существенно превышает поглощение коротковолнового края полосы В830 на этой длине волны. Относительно малая по сравнению с полосой В830 степень выцветания в полосе В800 может объясняться быстрым (сопоставимым с длительностью свертки возбуждающего и зондирующего импульсов) уходом возбуждений из полосы В800. Этот уход энергии будет приводить также к дополнительному выцветанию в полосе В830 во время действия возбуждающего импульса.

Затем выцветание начинает доминировать в длинноволновой части полосы В830, что приводит к появлению широкого пика вблизи $\lambda = 835$ нм. Позже пик выцветания сдвигается в область $\lambda = 855$ нм и остается там до исчезновения возбуждения в комплексе. Отметим, что при большой временной задержке пик на $\lambda = 835$ нм не исчезает полностью, а превращается в «плечо» на коротковолновом крае пика с максимумом вблизи $\lambda = 855$ нм.

Сигнал на $\lambda = 780$ нм обусловлен, по-видимому, когерентным откликом среды [11] и может рассматриваться как свертка возбуждающего и зондирующего импульсов (время релаксации менее 50 фс, в противном случае была бы видна асимметрия кривой свертки). Длительность возбуждающего импульса с $\lambda = 800$ нм определялась с помощью автокоррелятора и составляла ~ 50 фс. Однако длительность свертки импульсов возбуждения и зондирования существенно больше (~ 550 фс). Это было обусловлено большой толщиной кюветы с образцом (5 мм), большой длительностью суперконтинуума, большими диаметрами возбуждающего и зондирующего пучков (0.5 и 0.15 мм соответственно) и большим углом (25°) между направлениями этих пучков.

Кинетические кривые изменений оптического поглощения при разных длинах волн зондирования в полосах В800, В830 и В850 приведены на рис.4. Наибольшие изменения оптической плотности регистрируются в полосе В830 в первые 2–3 пс после прохождения возбуждающего импульса.

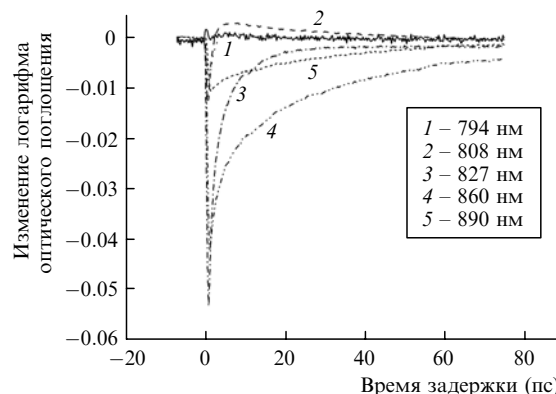


Рис.4. Кинетические кривые фотоиндуцированных изменений оптического поглощения комплекса LH2 из *Trs. sibirica* для разных длин волн зондирующего импульса (возбуждение на $\lambda = 800$ нм).

При всех длинах волн кинетические кривые отличаются от моноэкспоненциальных. Учитывая спектральное перекрытие полос В800 и В830, а также В830 и В850, следовало ожидать, что кинетические кривые в каждом случае будут отражать временную зависимость изменения поглощения как в одной, так и в другой полосе практически при любой длине волны зондирования. Исключением может быть лишь длинноволновый край полосы В850.

В диапазоне 810–900 нм время задержки зондирующего импульса относительно возбуждающего импульса с $\lambda = 800$ нм (спектральная дисперсия) практически линейно увеличивается с ростом длины волны (5.625 фс/нм). В диапазоне 790–810 нм (область возбуждающего импульса) зависимость времени задержки от длины волны существенно отклоняется от линейной. Это связано с быстрой релаксацией фотоиндуцированного изменения оптического поглощения (выцветания) в этой спектральной области. Однако в области $\lambda > 810$ нм релаксация относительно слабо влияет на кинетическую кривую нарастания фотоиндуцированных изменений оптического поглощения. Поэтому в данном случае можно сравнивать между собой фронты кинетических кривых. Для наглядности на рис.5 кривые расположены так, что все они проходят через одну точку на уровне 0.1 от максимума. Видно, что фронты кинетических кривых для $\lambda = 810$ и 830 нм практически совпадают, а запаздывание (по

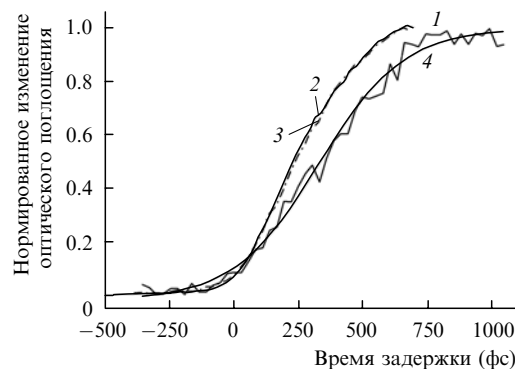


Рис.5. Запаздывание фронта нарастания фотоиндуцированных изменений оптического поглощения (по уровню 0.9) на длинноволновом крае полосы В850 (зондирование на $\lambda = 900$ нм, 1) относительно фронтов полос В800 ($\lambda = 810$ нм, 2) и В830 ($\lambda = 830$ нм, 3). Все кинетические кривые были сведены в одну точку по уровню 0.1. S-образная кривая 4 аппроксимирует кривую нарастания изменений поглощения на $\lambda = 900$ нм.

Табл.1. Коэффициенты при экспонентах для разных длин волн зондирования при моделировании кинетических кривых фотоиндуцированных изменений оптического поглощения комплекса LH2 из *Trs. sibirica* (коэффициенты нормированы так, что $A_1 + A_2 + A_3 = 1$).

Длина волны (нм)	A_1	A_2	A_3
810	0.50	0.43	0.07
815	0.40	0.49	0.11
825	0.33	0.49	0.18
835	0.24	0.43	0.33
840	0.24	0.37	0.39
855	0.19	0.26	0.55
870	0.16	0.25	0.59
880	0.10	0.21	0.69
890	0	0.23	0.77
900	0	0.20	0.80

уровню 0.9 от максимума) кинетической кривой для $\lambda = 900$ нм относительно кривых для $\lambda = 810$ и 830 нм составляет приблизительно 180 фс (рис.5). Это значение может служить оценкой минимального времени переноса энергии возбуждения от полосы В830 (или В800) к длинноволновому краю полосы В850 в комплексе LH2 из *Trs. sibirica*. Более точная оценка затруднена из-за большой величины свертки возбуждающего и зондирующего импульсов (длительность по полувысоте ~ 550 фс).

Из литературы известно [8, 12], что постоянная времени ухода энергии возбуждения из полосы В800 в комплексах LH2 из разных бактерий несколько меняется в зависимости от длины волны. Этот эффект не слишком велик [8, 12], поэтому при моделировании мы в первом приближении принимали, что кинетика дезактивации (переноса) возбуждений в пределах каждой полосы одинакова. Однако из-за перекрытия полос, из-за наложения полос поглощения из возбужденного состояния и быстрого переноса энергии возбуждения между полосами кинетические кривые имеют многокомпонентный характер. Лишь на самом длинноволновом крае полосы В850 (в области $\lambda = 900$ нм) кинетические кривые близки к моноэкспоненциальным (со слабой примесью второй экспоненты). При других длинах волн кривые моделируются тремя экспонентами.

Для моделирования описываемых кинетических кривых необходимо выбрать постоянные времена дезактивации возбуждений для всех трех полос. При правильном (самосогласованном) выборе этих постоянных моделирование кинетики при любой длине волны сводится к подбору коэффициентов при экспонентах (без варьирования постоянных времени). В нашем случае все кинетические кривые удалось достаточно хорошо описать, используя постоянные времена $\tau_1 = 0.5$ пс, $\tau_2 = 2.5$ пс и τ_3 порядка сотен пикосекунд. Коэффициенты A_1 , A_2 и A_3 при экспонентах для разных длин волн зондирующего импульса представлены в табл.1.

Зависимости вкладов всех трех компонент дезактивации возбуждений от длины волны указывают на то, что долгоживущая компонента (τ_3) связана с полосой В850. Уход возбуждений из полосы В830 ($\tau_2 = 2.5$ пс) происходит за 2–3 пс. Остаточное долгоживущее выцветание в полосе В830 («плечо» в спектре при больших временных задержках, см. рис.3) обусловлено, по-видимому, обратным уходом возбуждений из полосы В850 (стационарным распределением энергии возбуждения между этими

полосами при комнатной температуре). Из этого следует, что в препарате LH2 из *Trs. sibirica* комплексы типа В800-830 отсутствуют, иначе время жизни возбуждений в полосе В830 составляло бы порядка сотен пикосекунд. Это свидетельствует в пользу гомогенности препарата LH2, все три полосы которого – В800, В830 и В850 – связаны переносом энергии.

Малое время жизни возбуждений в полосе В800 комплекса LH2 из *Trs. sibirica* ($\tau_1 = 0.5$ пс) примерно соответствует времени переноса возбуждений из полосы В800 в В850 или в В820 в обычных комплексах LH2 при комнатной температуре (0.6–0.9 пс [5–9]). Время жизни возбуждений в длинноволновой полосе этого комплекса (сотни пикосекунд) также согласуется с соответствующим временем для полос В850 или В820 комплексов LH2 из других бактерий [5, 10, 13].

Постоянная времени для центральной полосы (В830) комплекса LH2 из *Trs. sibirica*, равная примерно 2.5 пс, плохо согласуется с результатами измерений на комплексах LH2 из других пурпурных бактерий. Спектральное перекрытие полос В830 и В850 примерно такое же, как и полос В800 и В820 в комплексах В800-820 из *Chromatium vinosum* и *Rhodospseudomonas acidophila*. Однако для этих комплексов перенос энергии возбуждения из коротковолновой полосы в длинноволновую происходил за субпикосекундные времена [6, 9]. Примерно 4–5-кратное увеличение постоянной времени переноса энергии между полосами В830 и В850 в комплексе LH2 из *Trs. sibirica* по сравнению с таковой для комплексов В800-820, по-видимому, свидетельствует о существенном различии электронных структур ансамбля молекул БХл в этих комплексах и/или механизмов переноса энергии. В настоящее время не ясно, можно ли объяснить такое увеличение постоянной времени ухода энергии из полосы В830 в комплексе LH2 из *Trs. sibirica* на основе предложенной модели этого комплекса [4].

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты № 03-04-48848 и 03-02-16736).

1. Cogdell R.J., Isaacs N.W., Freer A.A., Arrelano J., Howard T.D., Papiz M.Z., Hawthornthwaite-Lawless A.M., Prince S. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **68**, 1 (1997).
2. Van Grondelle R., Novoderezhkin V. *Biochemistry*, **40**, 15057 (2001).
3. Bryantseva I., Gorlenko V.M., Kompantseva E.I., Imhoff J.F., Suling J., Mityushina L. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 697 (1999).
4. Пищальников Р.Ю., Москаленко А.А., Разживин А.П. *Биологические мембраны*, **20**, 386 (2003).
5. Jimenez R., Dikshit S.N., Bradford S., Fleming G.R. *J. Phys. Chem.*, **100**, 6825 (1996).
6. Kennis J.T.M., Streltsov A.M., Vulto S.I.E., Aartsma T.J., Nozawa T., Ames J. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 7827 (1997).
7. Herek J.L., Fraser N.J., Pullerits T., Martinsson P., Polivka T., Scheer H., Cogdell R.J., Sundstrom V. *Biophys. J.*, **78**, 2590 (2000).
8. Ihalainen J.A., Linnanto J., van Stokkum I.H.M., Mullyperkio P., Ucker B., Scheer H., Korppi-Tommola J.E.I. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 9849 (2001).
9. Ma Y.-Z., Cogdell R.J., Gillbro T. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 881 (1998).
10. Bergstrom H., Westerhuis W.H.J., Sundstrom V., van Grondelle R., Niederman R.A., Gillbro T. *FEBS Lett.*, **233**, 12 (2004).
11. Эйзенталь К. В кн.: *Сверхкороткие световые импульсы* (М.: Мир, 1981, с. 350).
12. Novoderezhkin V., Wendling M., van Grondelle R. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 11534 (2003).
13. Sundstrom V., van Grondelle R. *J. Opt. Soc. Am. B*, **7**, 1595 (1990).