

СПЕКТРЫ ОПТИЧЕСКОГО ПОГЛОЩЕНИЯ И КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА СВЕТОСОБИРАЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ *Rhodopseudomonas acidophila*, РАССЧИТАННЫЕ НА ОСНОВЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫХ ДАННЫХ

© 2003 г. Р.Ю. Пищальников, А.П. Разживин

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, ГСП-2, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 17.09.02 г.

Рассчитаны спектры оптического поглощения и кругового дихроизма двух форм периферического светособирающего комплекса из фотосинтезирующей пурпурной бактерии *Rhodopseudomonas acidophila*. Вычисления проводили на основе теории экситонов для кольцевых агрегатов молекул бактериохлорофилла и рентгеноструктурных данных для этих комплексов. Показано, что теоретические спектры поглощения хорошо аппроксимируют экспериментальные при одинаковых величинах энергии возбуждения, однородного и неоднородного уширений и ширине полосы для всех молекул бактериохлорофилла в комплексах. Для аппроксимации спектров кругового дихроизма комплексов необходимо было изменить ориентации и величины моментов перехода Q_y молекул относительно их ориентации, определенной на основе рентгеноструктурных данных.

Ключевые слова: экситоны, круговой дихроизм, оптическая спектроскопия, *Rhodopseudomonas acidophila*, LH2 (B800–850), LH3 (B800–820), пурпурные бактерии.

Светособирающая антенна фотосинтезирующих пурпурных бактерий представлена двумя типами комплексов – прицентровым комплексом LH1, который связан с реакционным центром, и периферическим комплексом. При выращивании бактерий в нормальных условиях или в условиях стресса (на слабом свете и/или при пониженной температуре и т.д.) можно получить два вида периферического комплекса с различными спектральными свойствами [1]. Эти модификации комплекса обозначают как LH2 (норма) и LH3 (стресс) или, в соответствии с максимумами длинноволновых пиков, B800–B850 и B800–B820.

К настоящему времени получены рентгеноструктурные данные с разрешением $\sim 3,0$ Å для периферических комплексов, выделенных из двух бактерий *Rhodopseudomonas acidophila* и *Rhodospirillum rubrum* [2]. Для *Rps. acidophila* данные получены как для комплекса LH2

[3], так и для комплекса LH3 [4]. В общих чертах все комплексы имеют одинаковую структуру. Так, в случае *Rps. acidophila* белковый скелет образуют девять пар $\alpha\beta$ -гетеродимеров, расположенных в форме цилиндра, внешний радиус которого равен 34 Å, а внутренний 18 Å. Каждый белковый $\alpha\beta$ -гетеродимер связывает три молекулы бактериохлорофилла (БХл) и одну молекулу каротиноида. Молекулы БХл сформированы в два кольца, которые обозначают соответственно их пикам поглощения B800 и B850. Кольцо B850 состоит из 18 молекул БХл (9α и 9β), связанных с соответствующими α - и β -полипептидами. Остальные девять молекул БХл образуют кольцо B800. Более подробное описание комплексов можно найти в обзорах (см., например, [5,6]).

Несмотря на сходство структурной организации, периферические комплексы, выделенные из разных бактерий или из одной, но выращенной в различных условиях, несколько отличаются по своим спектральным свойствам [7,8]. Спектральные свойства комплексов могут меняться также под действием детергентов и растворителей [9,10], давления и температуры [11,12] и вследствие других причин.

Сокращения: КД – круговой дихроизм; БХл – бактериохлорофилл; LH2 (B800–B850) – периферический светособирающий комплекс с пиками поглощения при 800 и 850 нм; LH3 (B800–B820) – периферический светособирающий комплекс с пиками поглощения при 800 и 820 нм.

Современное описание спектрально-кинетических свойств комплексов базируется на экситонной теории. Предложенное еще до появления рентгеноструктурных данных описание возбуждений в антенне как экситонов, делокализованных по молекулам БХл, образующим симметричные кольцевые структуры [13,14], в настоящее время является общепризнанным. В частности, только в рамках этой теории можно объяснить большие величины выплывания антенны в пересчете на один поглощенный квант света, полученные в экспериментах по дифференциальной абсорбционной спектроскопии с высоким временным разрешением [15–17].

Ранее мы показали [18], что изменения спектров поглощения и КД комплекса LH2 из *Chromatium minutissimum* под влиянием детергента тритона X-100 могут быть следствием некоторого изменения пространственной структуры комплекса, приводящего к повороту молекул БХл спектральной формы B850 на угол, равный около 20°, относительно оси, перпендикулярной плоскости кольца. В этой связи значительный интерес представляют появившиеся рентгеноструктурные данные для комплекса LH3 (B800-B820), спектральные свойства которого близки к свойствам комплекса B800-B850 из *Chromatium minutissimum* в присутствии детергента. Однако оказалось, что пространственное положение молекул БХл в комплексах B800-B820 и B800-B850 из *Rps. acidophila* практически одинаковое [4].

Одним из основных параметров теории является момент перехода из основного в возбужденное синглетное состояние. Момент перехода определяется как вектор в системе координат, связанной с положением ядер атомов, и, следовательно, форма молекулы непосредственным образом влияет на направление и величину момента перехода. Величины и направления моментов перехода в первое и второе возбужденные состояния могут быть определены теоретически [19]. Для молекулы БХл они традиционно обозначаются как Q_y и Q_x , их направления показаны на вставке рис. 3.

Полная информация о пространственном расположении всех атомов в комплексах B800-B850 и B800-B820 из *Rps. acidophila* доступна в файлах 1KZU и 1JJD базы данных the Brookhaven Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>).

В данной работе рассчитаны спектры оптического поглощения и кругового дихроизма (КД) комплексов B800-B850 B800-B820 из *Rps. acidophila* на основе рентгеноструктурных дан-

ных и определены значения параметров, дающие наилучшую аппроксимацию экспериментальных спектров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Специализированная программа ExCInAnt для моделирования спектров оптического поглощения и КД написана авторами на языке программирования Visual C++. Встроенный графический редактор позволяет генерировать и редактировать пространственное распределение моментов перехода молекул БХл или создавать это распределение на основе данных, считываемых из файла в формате PDB. Лежащая в основе программы теоретическая модель описана ниже.

Процедуры выращивания клеток фотосинтезирующей бактерии *Rps. acidophila* и выделения периферических комплексов LH2 (B800-B850) и LH3 (B800-B820), а также регистрации спектров оптического поглощения и КД при 77 К описаны в [8].

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Предполагается, что в рассматриваемой области спектры оптического поглощения и КД определяются молекулами БХл. Для моделирования в длинноволновой части спектра достаточно считать молекулу БХл двухуровневой, с дипольным моментом перехода из состояния S_0 в S_1 , равным $\vec{\mu}_n$, и магнитным моментом $\vec{m}_n$. Тогда гамильтониан для кольцевого агрегата, состоящего из N пигментов, будет:

$$H = \sum_{n=1}^N (\epsilon_n + \Delta) |e_n\rangle \langle e_n| + \sum_{n,m} J_{nm} |e_n\rangle \langle e_m|,$$

где $|e_n\rangle$ – вектор состояния возбужденной молекулы с энергией ϵ_n ; Δ – величина неоднородного уширения; J_{nm} – энергия взаимодействия между n и m молекулами, которая вычисляется в диполь-дипольном приближении следующим образом:

$$J_{nm} = v \left[\frac{(\vec{\mu}_n \vec{\mu}_m)}{R_{nm}^3} - \frac{3(\vec{\mu}_n R_{nm}^2)(\vec{\mu}_m R_{nm}^2)}{R_{nm}^5} \right],$$

где R_{nm} – расстояние между диполями, а v выбирается таким образом, чтобы взаимодействие между ближайшими молекулами кольца давало наблюдаемый в эксперименте спектральный сдвиг для полосы поглощения этого кольца.

После диагонализации гамильтониана, описывающего комплекс B800-B850, получается набор собственных векторов $|c_k\rangle$ и собственных значений энергии E_k , с помощью которых вычисляются матричные элементы дипольного и магнитного моментов:

$$\vec{\mu}_k = \sum_n |c_k\rangle \langle c_n | \mu_n \rangle,$$

$$\vec{m}_k = \sum_n |c_k\rangle \langle c_n | m_n \rangle,$$

где $k = 0, \dots, N$; $N = 27$.

Интенсивности полос спектра поглощения и КД пропорциональны величинам $\vec{\mu}_k^2$ и $\vec{\mu}_k \vec{m}_k$ соответственно.

При описании формы спектральных линий различают вклады однородного и неоднородного уширений. Неоднородное уширение является следствием различий ближайшего окружения молекулы. По своей природе это уширение имеет исключительно статистический характер и не связано с динамикой процессов, происходящих в молекулах. Однородное уширение является следствием взаимодействия молекулы с термостатом и отражает скорость флуктуаций в ее ближайшем окружении. В приближении термостата броуновским осциллятором [20] однородное уширение описывается распределением Лоренца с шириной на полувысоте (FWHM), равной 2Γ , а неоднородное – распределением Гаусса.

В данной работе учёт неоднородного уширения производился методом Монте-Карло, причем усреднение гамильтониана происходило по большому числу испытаний, а величины Δ^1 и Δ^2 на каждой итерации случайным образом выбирались генератором нормального распределения. Значения диполей и магнитных моментов рассчитываются с использованием данных файлов 1KZU и 1IJD из the Brookhaven Protein Data Bank.

Таким образом, формулы для расчёта формы линии спектров имеют вид:

$$I_{abs}(E) = \sum_k \frac{I_k^{abs} \Gamma^2}{\pi(\Gamma^2 + (E_k - E)^2)},$$

$$I_{cd}(E) = \sum_k \frac{I_k^{cd} \Gamma^2}{\pi(\Gamma^2 + (E_k - E)^2)},$$

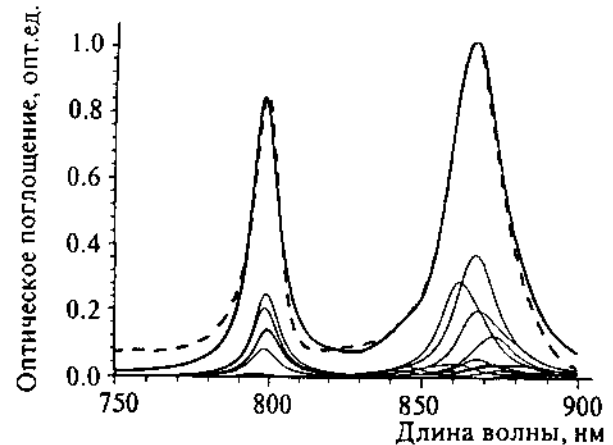


Рис. 1. Экспериментальный (пунктирная кривая) спектр оптического поглощения LH2 комплекса (B800-B850) из *Rps. acidophila*, снятый при 77 К. Соответствующий теоретический спектр показан жирной сплошной кривой, а его экситонные компоненты – тонкими линиями.

где 2Γ – ширина на полувысоте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соотношение между геометрической структурой периферической антенны и ее электронными свойствами не является однозначным. Не существует прямой зависимости спектральных свойств антенны от расположения пигментов. Несмотря на то, что координаты атомов молекул, образующих комплексы LH2 и LH3, известны с точностью, достаточной для определения взаимного пространственного расположения и ориентации молекул БХл, для адекватного моделирования спектров поглощения и КД необходимы дополнительные предположения относительно значений энергий возбуждения, направления и величины диполей, неоднородного и однородного уширения.

Прежде всего, выбираются значения энергии возбуждения, величины однородного и неоднородного уширений и оценивается энергия взаимодействия между пигментами. Принимаемая величина энергии возбуждения влияет на положение полосы поглощения, а однородное и неоднородное уширение – на профиль полосы. В литературных источниках нет единства мнений относительно значений расчетных параметров для комплексов LH2 и LH3. Например, энергию взаимодействия между ближайшими пигментами для кольца B850 принимают в пределах $200 - 800 \text{ см}^{-1}$ [21].

На рис. 1–4 приведены экспериментальные спектры поглощения и КД комплексов LH2 и LH3 из *Rps. acidophila*, полученные при 77 К,

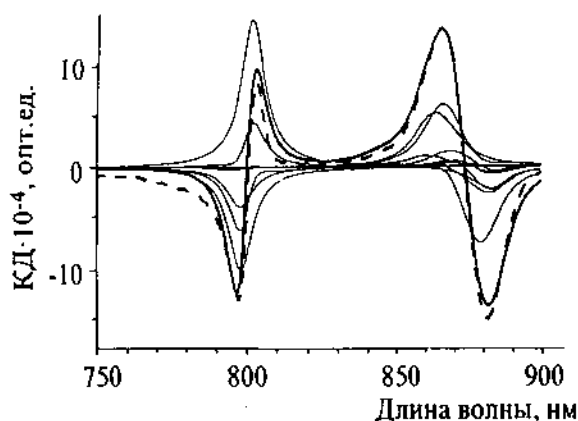


Рис. 2. Экспериментальный спектр кругового дихроизма комплекса LH2 (B800-B850) из *Rps. acidophila*, снятый при 77 К (жирная пунктирная кривая). Соответствующий теоретический спектр показан жирной сплошной кривой, а его экситонные компоненты – тонкими линиями.

и теоретические спектры, рассчитанные с помощью программы ExCInAnt. Численные значения параметров, использованные при расчетах спектров, представлены в таблице.

Видно, что теоретические спектры достаточно хорошо аппроксимируют экспериментальные спектры в центральной части полос. Коротковолновые и длинноволновые крылья полос экспериментальных спектров описываются несколько хуже.

Энергия перехода ϵ ($S_0 \rightarrow S_1$) принималась одинаковой для всех молекул БХЛ комплекса (т.е. как для молекул спектральной формы B800, так и формы B850 или B820). Следует отметить, что значения ϵ для LH2 и LH3 почти не различались (спектральный сдвиг составил 30 см^{-1} или около 2 нм). По-видимому, в расчетах можно принимать одно значение ϵ для всех молекул БХЛ всех комплексов из одного вида бактерий. В данной работе это не было сделано потому, что в экспериментальном спектре полоса B800 имеет выраженную несимметричную форму. При выборе единой ϵ для всех комплексов пик полосы B800 комплекса LH2 оказывается сдвинутым примерно на 2 нм.

Три других задаваемых параметра (Δ^1 , Δ^2 , и Γ) принимались одинаковыми для полос комплексов обоих типов потому, что они характеризуют температурно-зависимые свойства окружающей хромофоры среды.

Перечисленные выше четыре параметра теории являются определяющими для спектров оптического поглощения комплексов. Разумеется,

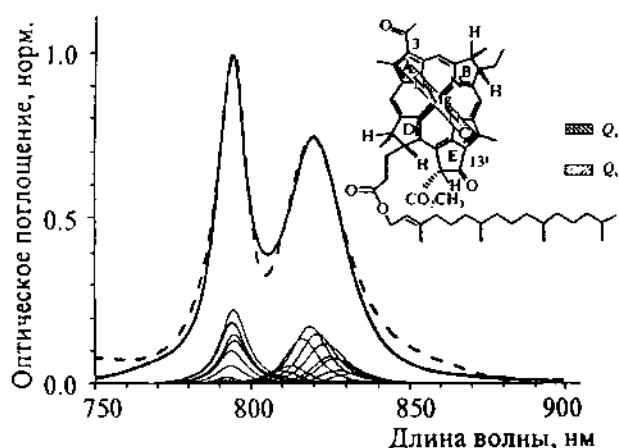


Рис. 3. То же, что на рис. 1, но для комплекса LH3 (B800-B820). На вставке приведены направления моментов перехода Q_y и Q_x в молекуле БХЛ.

эти параметры влияют и на спектры КД комплексов. Однако для описания спектров КД необходимо рассмотрение дополнительных переменных.

При использовании ориентаций моментов перехода Q_y молекул БХЛ из базы данных PDB вид расчетных спектров КД комплексов существенно отличается от экспериментальных. Точная аппроксимация спектров КД невозможна без варьирования ориентации момента перехода Q_y и его эффективной величины. Различное микроокружение молекул БХЛ в местах связывания в комплексах LH2 и LH3 может до некоторой степени влиять на пространственное распределение молекулярных орбиталей, искажать их и вызывать незначительные изменения направления и величины моментов переходов. Однако оно не влияет на расположение атомов молекул, формально определяющее направление диполя момента перехода.

Поскольку дипольный момент находится в плоскости молекул БХЛ как для пигментов B800, так и для B850, то достаточно малые изменения его ориентации, например поворот на несколько градусов вокруг оси, перпендикулярной плоскости молекулы, приводят к существенному изменению вида КД. Например, поворот на 7 градусов момента перехода в плоскости молекулы БХЛ B850 приводит к фактически полному исчезновению полосы B850 в спектре КД. Полоса B850 спектра КД слабее реагирует на варьирование направления диполя Q_y , чем полоса B800, хотя отношению амплитуд положительного и отрицательного пиков этой полосы также может сильно меняться. Интересной особенностью полосы КД B850 является длинноволновый сдвиг точки пе-

Параметры расчета спектров поглощения и КД периферических комплексов LH2 и LH3

Задаваемые параметры	Комплекс LH2	Комплекс LH3
ϵ – энергия перехода $S_0 \rightarrow S_1$ БХл, см^{-1}	12575	12605
Δ^1 – неоднородное уширение БХл В800, см^{-1}	20	20
Δ^2 – неоднородное уширение БХл В850/В820, см^{-1}	190	190
Γ – полуширина полосы на полувысоте, см^{-1}	80	80
$\text{В850}_\alpha(z)$, град	10	7
$\text{В850}_\alpha(x)$, град	0	3
$\text{В850}_\beta(z)$, град	0	0
$\text{В850}_\beta(x)$, град	0	3
$\text{В800}(z)$, град	10	0
Расчетные параметры		
Энергия взаимодействия В850_α - В850_β , см^{-1}	464	247
Энергия взаимодействия В800 - В800 , см^{-1}	45	17
Энергия взаимодействия В800 - В850_α , см^{-1}	43	20
Энергия взаимодействия В800 - В850_β , см^{-1}	0,6	0,1

рассечения нулевой линии спектра по отношению к максимуму поглощения, составляющий примерно 6 нм. В работе [8] для моделирования этого сдвига предполагается наличие разницы энергий между БХл В850 $_\alpha$ и В850 $_\beta$, равное 300 см^{-1} . Однако наши вычисления показали, что для хорошего совпадения модельного спектра с экспериментальным такое допущение не нужно.

При моделировании спектров комплекса LH3 хорошие результаты получаются, если длину момента перехода Q , полосы В850 уменьшить в 1,2 раза, – это означает уменьшение коэффициента экстинкции образца. При этом удаётся с большой точностью описать существенное уменьшение интенсивности поглощения полосы В820 по сравнению с В850. Уместно предположить, что уменьшение длины диполя также связано с некоторым изменением белкового окружения БХл в LH3 по сравнению с LH2 [4].

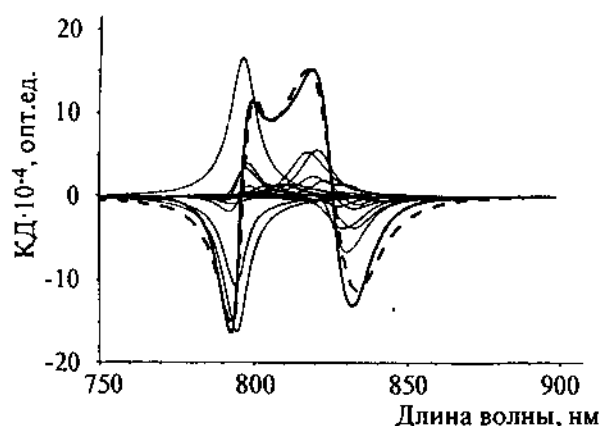


Рис. 4. То же, что на рис. 2, но для комплекса LH3 (В800-В820).

Варьирование направлений моментов перехода молекул БХл при моделировании спектров поглощения и КД комплексов LH2 и LH3 применялось и в работе [8].

Во второй части таблицы приведены энергии взаимодействия для комбинаций трех разных молекул БХл комплексов LH2 и LH3. В нашем случае эти величины не являлись параметрами, а рассчитывались.

Авторы выражают благодарность проф. Р. ван Гронделю за предоставление спектров оптического поглощения и КД комплексов LH2 и LH3 из *Rps. acidophila* и И.К. Михайлюку за плодотворное обсуждение результатов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 00-04-48308).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cogdell R.G., Durant I., Valentine J., Lindsay J.G., Schmidt K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1983. V. 722. P. 427–455.
2. Koepke J., Hu X., Munke C., Schulten K., Michel H. // *Structure*. 1996. V. 4. P. 581–597.
3. McDermott G., Prince S., Freer A., Hawthornthwaite-Lawless A., Papiz M., Cogdell R., Isaacs N. // *Nature*. 1995. V. 374. P. 517–521.
4. McLuskey K., Prince S.M., Cogdell R.J., Isaacs N.W. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 8783–8789.
5. Hu X., Ritz T., Damjanovic A., Schulten K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 5935–5941.
6. Cogdell R.J., Isaacs N.W., Freer A.A., Arrelano J., Howard T.D., Papiz M.Z., Hawthornthwaite-Lawless A.M., Prince S. // *J. Prog. Biophys. Molec. Biol.* 1997. V. 68. P. 1–27.
7. Evans M.B., Hawthornthwaite A.M., Cogdell R. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1990. V. 1016. P. 71–76.

8. Georgakopoulou S., Frese R.N., Johnson E., Koolhaas C., Cogdell R.J., van Grondelle R., van der Zwan G. // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 2184–2197.
9. Sturgis J.N., Hagemann G., Tardos M.H., Robert B. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 10519–10524.
10. Москаленко А.А., Кузнецова Н.Ю., Ерохин Ю.Е., Торопыгина О.А. // *Биохимия*. 1996. Т. 61. С. 429–439.
11. Wu H.-M., Ratsep M., Jankowiak R., Cogdell R., Small G.J. // *J. Phys. Chem. B*. 1997. V. 101. P. 7641–7653.
12. Freiberg A., Ellervee A., Kukk P., Laisaar A., Tars M., Timpmann K. // *Chem. Phys. Lett.* 1994. V. 214. P. 10–16.
13. Novoderezhkin V.I., Razjivin A.P. // *FEBS Lett.* 1993. V. 330. P. 5–7.
14. Novoderezhkin V.I., Razjivin A.P. // *Biophys. J.* 1995. V. 68. P. 1089–1100.
15. Danielius R.V., Mureyev A.P., Razjivin A.P. // *FEBS Lett.* 1989. V. 250. P. 183–186.
16. Novoderezhkin V.I., Razjivin A.P. // *FEBS Lett.* 1995. V. 368. P. 370–372.
17. Новодережский В.И., Разживин А.П. // *Биофизика*. 1997. Т. 42, вып. 1. С. 164–168.
18. Razjivin A.P., Moskalenko A.A., Novoderezhkin V.I. // *IUBMB Life*. 2000. V. 50. P. 115–117.
19. Scherz A., Parson W.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 1987. V. 109. P. 6143.
20. Mukamel S. *Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy*. N.Y.: Oxford University Press, 1995. 523 p.
21. Chachisvilis M., Kuhn O., Pullerits T., Sundstrom V. // *J. Phys. Chem. B*. 1997. V. 101. P. 7275–7283.

Absorption and Circular Dichroism Spectra of Light-harvesting Complexes from *Rhodospseudomonas acidophila* Calculated on the Basis of X-ray Data

R.Yu. Pishchal'nikov and A.P. Razzhivin

Belozerskii Research Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119992 Russia

Absorption and circular dichroism spectra of two forms of the peripheral light-harvesting complex from photosynthetic purple bacteria *Rhodospseudomonas acidophila* were calculated. Calculations were carried out on the basis of exciton theory for circular aggregates of bacteriochlorophyll molecules and X-ray data for these forms of the complex. It was shown that theoretical spectra fit well experimental ones at the same values of excitation energy, homogeneous and inhomogeneous broadening, and bandwidth for all bacteriochlorophyll molecules of complexes. To approximate the circular dichroism spectra of complexes, it was necessary to change the orientations and the values of the moments of transition of Q_y molecules relative to their orientation determined on the basis of X-ray structure analysis data.

Key words: excitons, circular dichroism, optical spectroscopy, *Rhodospseudomonas acidophila*; B800-B850; B800-B820, LH2, LH3, purple bacteria