

Фемтосекундная абсорбционная спектроскопия восстановленной и окисленной форм цитохром *c* оксидазы: возбужденные состояния и релаксационные процессы в гемовых центрах *a* и *a*₃

© И.В. Шелаев¹, Ф.Е. Гостев¹, Т.В. Выгодина², С.В. Лепешкевич³, Б.М. Джагаров^{3,†}

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
119991 Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия

³ Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси,
220072 Минск, Беларусь

† e-mail: b.dzhagarov@ifanbel.bas-net.by

Поступила в редакцию 13.03.2019 г.

В окончательной редакции 13.03.2019 г.

Принята к публикации 11.06.2019 г.

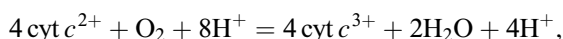
Методом фемтосекундной абсорбционной спектроскопии исследованы возбужденные электронные состояния и внутригемовые релаксационные процессы в окисленной и восстановленной формах митохондриальной цитохром *c* оксидазы, выделенной из сердечной мышцы быка. Измерения спектрально-кинетических характеристик короткоживущих интермедиатов были выполнены во временном интервале 80 fs–20 ps после акта фотовозбуждения. Обнаружено, что электронная безызлучательная релаксация энергии возбуждения в геме *a* как в окисленной Fe(III)*a*, так и в восстановленной форме Fe(II)*a* осуществляется последовательно в виде трех процессов, по завершению которых гем *a* оказывается в основном состоянии с большим запасом колебательной энергии. Последующая колебательная релаксация („остывание гема“) длится несколько пикосекунд. Для восстановленного гема *a*₃ (Fe(II)*a*₃) было обнаружено, что электронная релаксация осуществляется в результате двух последовательных стадий, которые сменяются колебательной релаксацией в основном состоянии. Дан анализ механизма и динамики преобразования энергии электронного возбуждения в цитохром *c* оксидазе.

Ключевые слова: цитохром *c* оксидаза, фемтосекундная абсорбционная спектроскопия, возбужденные электронные состояния, релаксационные процессы, спектральные интермедиаты.

DOI: 10.21883/OS.2019.10.48381.99-19

Введение

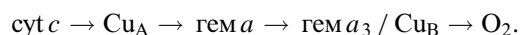
Цитохром *c* оксидаза (ЦО) является терминальным элементом дыхательной цепи митохондрий и дышащих бактерий. ЦО катализирует четырехэлектронное восстановление молекулярного кислорода до воды. Данная реакция сопряжена с захватом восьми протонов (8H⁺) с внутренней стороны мембраны, из которых 4H⁺ (субстратные) идут на образование двух молекул H₂O, а другие 4H⁺ (помповые) переносятся на внешнюю сторону мембраны. Общий вид данной реакции представляется следующим образом:



где cyt *c* обозначает цитохром *c*, который является поставщиком электронов. Cyt *c*²⁺ и cyt *c*³⁺ — соответственно восстановленная и окисленная формы данного гемобелка [1–3].

Перенос электронов в ЦО осуществляется четырьмя редокс-центрами: двумя гемами (низкоспиновый гем *a* и высокоспиновый гем *a*₃) и двумя атомами меди Cu_A и Cu_B. Химическая структура гемов *a* и *a*₃ одинаковая.

Они представляют собой комплекс иона железа с порфириновым макроциклом. В высокоспиновом геме *a*₃ атомы Fe и Cu_B расположены примерно в 4–5 Å друг от друга и образуют бинуклеарный каталитический сайт, в котором собственно и происходит восстановление O₂ до H₂O. Последовательность этапов переноса электрона может быть представлена в виде следующей схемы:



Несмотря на многолетние интенсивные исследования с привлечением всевозможных физических и химических экспериментальных методов и теоретических подходов механизм обсуждаемого цикла реакций до сих пор до конца не расшифрован.

В настоящей работе мы используем фемтосекундную абсорбционную спектроскопию для обнаружения и изучения возникающих и релаксирующих интермедиатов во временном интервале 80 fs–20 ps. Использование кинетической спектроскопии представляется необходимым, так как принципиально важным моментом является установление путей и скоростей переноса электрона

внутри данной биоэнергетической системы. Действительно, в процессе функционирования ЦО должны реализовываться как межгемовые, так и внутригемовые переносы электрона между Fe и π -сопряженной системой порфирина, т.е. переносы π -электронов на d -орбитали и переносы d -электронов на низшие незаполненные π -орбитали. При этом необходимо учитывать, что эти процессы переноса электронов быстропротекающие.

Необходимо отметить, что исследования ЦО исключительно сложны из-за перекрытия спектров поглощения гема a и гема a_3 , что крайне затрудняет определение их индивидуальных спектральных характеристик [4–6]. Как отмечалось ранее, химическая структура гемов a и a_3 одинакова. Однако атомы железа различаются в них спиновыми состояниями и степенью заполнения координационной сферы. Атом железа в геме a шестикоординирован четырьмя атомами азота пиррольных колец и двумя аксиальными гистидинами, а в геме a_3 пятикоординирован четырьмя атомами азота и одним гистидином, и имеет свободное координационное положение для присоединения O_2 . Это положение могут занимать и другие малые лиганды: CO, CN. Из-за различного заполнения координационной сферы d -орбитали в гемах заполняются различным способом, и в результате различаются спиновыми состояниями. Атом железа в геме a является низкоспиновым (спин $S = 1/2$ в состоянии Fe^{3+} и $S = 0$ в состоянии Fe^{2+}). Fe в геме a_3 — высокоспиновый (спин $S = 5/2$ в состоянии Fe^{3+} и $S = 2$ в состоянии Fe^{2+}).

Различаются у гемов и спектры поглощения [4–6]. Максимумы поглощения полос Soret в геме a и геме a_3 расположены соответственно при 426 и 414 nm и формируют общий пик в спектре при 421 nm (рис. 1). В длинноволновой области спектра слабый пик при 600 nm. В восстановленной форме ЦО полосы в спектре поглощения перекрываются гораздо сильнее, образуя общий максимум при 444 nm с короткоживущим плечом при ~ 425 nm (рис. 1), который вызван поглощением гема a_3 . Менее интенсивный максимум при 605 nm обусловлен в основном поглощением гема a^{2+} [4–6].

Таким образом, настоящая работа посвящена изучению внутригемовой энергетики в гемах a и a_3 . Настоящая работа в известной степени продолжает наши предыдущие исследования, результаты которых были представлены в работе [7], посвященной изучению полностью восстановленной формы ЦО, т.е. такой формы, у которой ион железа находится в состоянии $Fe(II)$, как в геме a , так и в геме a_3 . Цель настоящей работы заключалась в изучении, во-первых, полностью окисленной формы ЦО, у которой ионы железа находятся в состоянии $Fe(III)$, во-вторых, в проведении дополнительных исследований восстановленной ЦО в спектральном диапазоне 425 ± 5 nm. В этом случае мы исходили из следующих соображений. Поглощение в этой спектральной области в большей степени принадлежит гему a_3 , поскольку согласно реконструкции абсолютного спектра восстановленного гема a , основанной

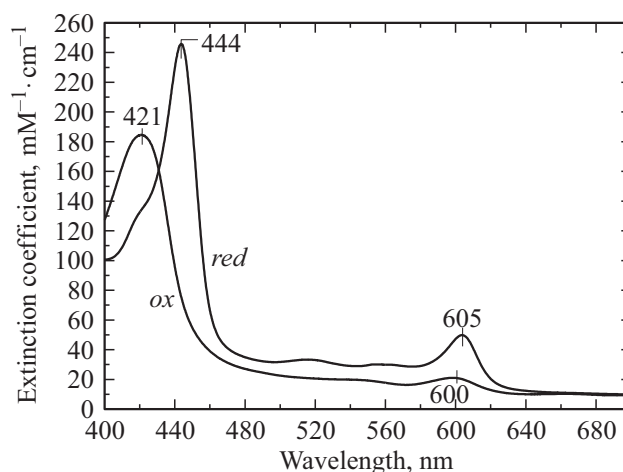


Рис. 1. Спектр поглощения восстановленной (red) и окисленной (ox) цитохром с оксидазы.

на спектральном сдвиге, вызываемом ионами Ca^{2+} [5], его максимум 447 nm сдвинут в более длинноволновую область по сравнению с максимумом 443 nm, характеризующим полосу поглощения восстановленной ЦО (рис. 1), которая отражает поглощение обоих гемов. Таким образом, появляется возможность в ходе исследований получить индивидуальные спектрально-кинетические характеристики возбужденных состояний гемов a и a_3 для восстановленной формы ЦО.

Экспериментальная часть

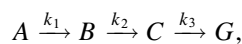
Объекты исследований. Цитохром с оксидазу выделяли из сердечной мышцы быка по методу, описанному в работе [8] (модифицированный метод Фаулера и др. [9]), следуя протоколу, любезно предоставленному доктором Мусатовым (Институт экспериментальной физики, Словацкая академия наук, г. Кошице, Словакия). Основные измерения выполнялись с образцами ЦО с концентрацией $50 \mu M$, которая определялась на основании разностного спектра поглощения (восстановленный дитионитом образец минус окисленный) с использованием значения $\Delta\epsilon = 27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, характерного для двух длин волн 605/630 nm. В качестве буферного раствора использовался 0.1 M Tris-Hepes буфер pH 8.0, 0.05% ДДМ (додецил мальтозид), 0.1 mM ЭГТА (этиленбис(оксиэтилен-нитрило)-тетрауксусная кислота). Спектры поглощения для двух изучаемых в работе форм цитохром с оксидазы представлены на рис. 1.

Фемтосекундная установка. Разрешенные во времени дифференциальные спектры наведенного поглощения $\Delta A(\lambda, t)$ измерялись методом „возбуждение–зондирование“ с помощью фемтосекундной абсорбционной установки, подробно описанной в работе [10]. Для возбуждения объектов исследования использовались гауссовы импульсы с частотой следования 60 Hz, длительностью 23 fs, с энергией 350 mJ, с максимумом

излучения при 600 nm. Эти импульсы фокусировались в пятно диаметром 180 μm . Импульсы белого континуума фокусировались в пятно диаметром 120 μm и использовались в качестве зондирующего света. Поляризации импульсов накачки и зондирования были ориентированы под магическим углом 54.7° друг к другу. Суперконтинуум диспергировался с помощью полихроматора (Action SP300) и регистрировался с помощью CCD-камеры (Roper Scientific SPEC 10). Коррекция нулевого времени задержки между импульсом накачки и спектральной компонентой λ импульса зондирования выполнялась, следуя процедуре, описанной ранее [11].

Дифференциальные транзистентные спектры поглощения $\Delta A(\lambda, t) = A(\lambda, t) - A_0(\lambda)$, возникающие при импульсном фотовозбуждении, являются разностью двух спектров исследуемых образцов ЦО: $A(\lambda, t)$ при времени задержки t и исходного спектра поглощения раствора ЦО без возбуждения $A_0(\lambda)$. Дифференциальные спектры $\Delta A(\lambda, t)$ были записаны в спектральном диапазоне 390–700 nm. Измеренные спектры подвергались коррекции, учитывающей дисперсию групповой скорости континуума, следуя процедуре, описанной в работе [7,12]. Эксперименты выполнялись при температуре 21°C в 0.5 mm оптической кювете.

Анализ временных характеристик транзистентных дифференциальных спектров осуществлялся с помощью кинетического моделирования на основе сингулярного разложения (SVD) матрицы полученных данных. Используемый подход предполагает рассмотрение всего массива экспериментальных значений $\Delta A(\lambda, t)$, где ΔA , как отмечалось выше, отображает фотоиндуцированные изменения оптической плотности исследуемого образца (просветление и наведенное поглощение). Таким образом, при анализе результатов использовалась в основном схема, включающая в себя три последовательных интермедиата (A , B , C) и стационарное состояние объекта исследования G , т.е. его состояние до возбуждения, а также после завершения всех фотоиндуцированных изменений при условии отсутствия необратимых фотохимических реакций. В результате последовательность нестационарных интермедиатов записывалась в виде



где k_i — константы скоростей переходов между интермедиатами. Матрица $\Delta A(\lambda, t)$ представляется в виде

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i=1}^4 K_i(t) S_i(\lambda),$$

где $S_i(\lambda)$ — спектры промежуточных состояний, $K_i(t)$ — заселенности этих состояний как функции времени. Глобальная экспоненциальная подгонка данных позволяет найти k_1 , k_2 и k_3 , при которых модельные данные максимально приближены к экспериментальным. В специально оговоренном случае последовательность релаксационных процессов записывалась в виде $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} G$,

так как анализ экспериментальных данных полностью „укладывался“ в эту схему, и следовательно, после фотовозбуждения в объекте образовывались только два интермедиата.

Результаты и обсуждение

Представление и обсуждение результатов начнем с экспериментальных данных, полученных для окисленной формы ЦО. На рис. 2 и 3 приведены дифференциальные спектры поглощения ΔA , измеренные в спектральном диапазоне от 390 до 560 nm при различных временных задержках. Некоторые спектры, полученные при одной и той же задержке, приводятся на обоих рисунках. В про-

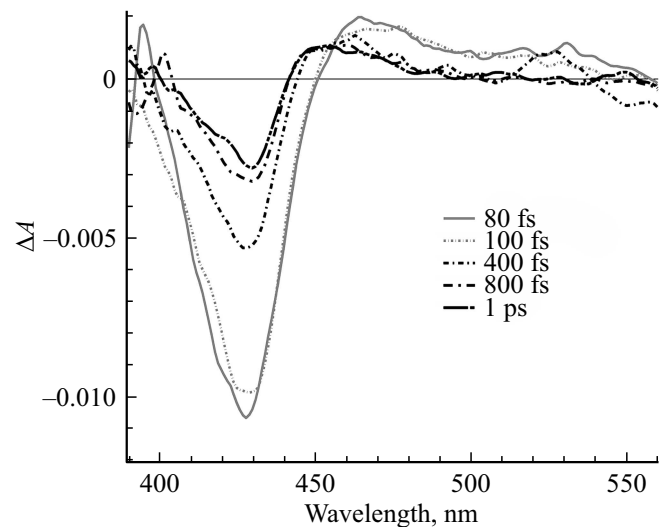


Рис. 2. Спектры дифференциального поглощения ЦО на временах задержки от 80 fs до 1 ps при возбуждении импульсом при 600 nm, длительностью 23 fs и энергией 350 пJ.

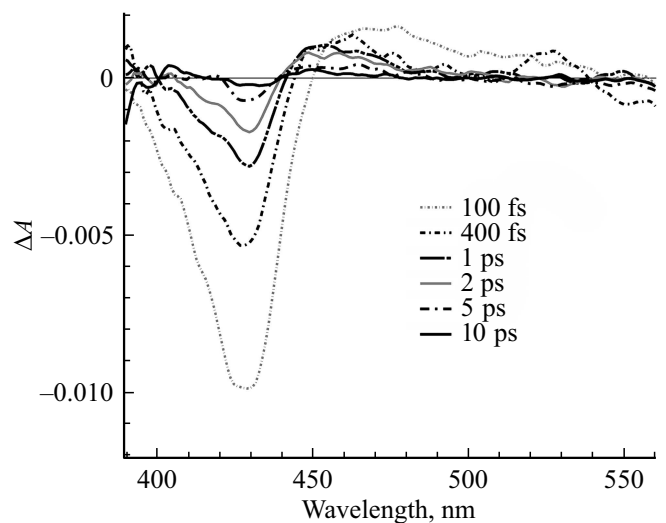


Рис. 3. Спектры дифференциального поглощения ЦО на временах задержки от 100 fs до 10 ps при возбуждении импульсом при 600 nm, длительностью 23 fs и энергией 350 пJ.

водимых экспериментах дифференциальные спектры измерялись в более широком спектральном диапазоне, а именно вплоть до 700 nm. Обнаруженные спектральные изменения в спектральной области 625–700 nm мы не приводим, так как они были незначительны. В этой области не наблюдались максимумы в спектрах и происходило монотонное уменьшение сигналов фотоиндуцированного поглощения по мере продвижения в красную область спектра.

Наиболее значительные и характерные спектральные изменения заключались в просветлении полосы Core и в появлении нового наведенного поглощения с длинноволновой и коротковолновой сторон спектра от этой полосы. Рассмотрение представленных на рис. 2 и 3 спектров указывает на сложную эволюцию фотоиндуцированных разностных спектров, что свидетельствует о наличии нескольких короткоживущих форм, которые формируют и трансформируют общий вид разностного спектра. Происходит смещение положений максимумов и изобестических точек в коротковолновую область спектра. Следует указать, что положение максимумов не соответствует их истинному положению в нестационарных спектрах интермедиатов, так как величина ΔA прямо пропорциональна разности коэффициентов экстинкции ЦО в определенном возбужденном и основном состояниях в случае наведенного поглощения, а в случае просветления — разности коэффициентов поглощения в основном и возбужденном состояниях. Изобестические точки на спектрах расположены при длинах волн, на которых эти коэффициенты равны. Как указывалось в экспериментальной части, результаты измерений анализировались в рамках схемы, предполагающей наличие трех нестационарных интермедиатов *A*, *B* и *C*. Аналогичный подход использовался нами в работе [7], в которой проводились исследования восстановленной формы ЦО. Следует специально отметить, что как для окисленной формы ЦО, так и для восстановленной обнаруживается присутствие пяти различных интермедиатов. Самый короткоживущий — длительностью ≤ 50 fs. Мы не рассматриваем его при глобальном анализе данных, который начинается с момента времени 80 fs. В наших экспериментальных условиях установить точный вид спектра, соответствующего этому интермедиату, и его длительности было невозможно. Необходимо указать, однако, что спектр поглощения данного интермедиата охватывал весь спектральный диапазон, в котором проводились измерения. Мы полагаем, что данное поглощение с длительностью ≤ 50 fs относится к S_1-S_i -поглощению ЦО, т.е. поглощению из первого синглетного возбужденного состояния в более высокоэнергетические состояния. Подробное обсуждение данного спектра для восстановленной ЦО дано в работе [7]. Мы полагаем, что в случае окисленной формы ЦО мы имеем дело с полностью аналогичной ситуацией. Нами были также обнаружены спектрально-кинетические доказательства существования пятого *D*-интермедиата, самого долгоживущего, который проявляется при больших задержках,

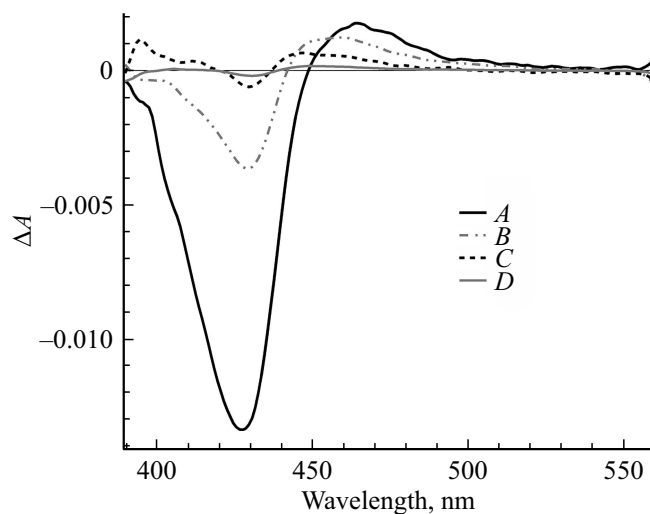


Рис. 4. Дифференциальные спектры интермедиатов *A*, *B*, *C* и *D*. Константы скоростей дезактивации интермедиатов: $k_1 = 4.0 \pm 0.5 \text{ ps}^{-1}$ ($\tau_1 = 250 \text{ fs}$), $k_2 = 0.54 \pm 0.10 \text{ ps}^{-1}$ ($\tau_2 = 1.85 \text{ ps}$) и $k_3 = 0.32 \pm 0.08 \text{ ps}^{-1}$ ($\tau_3 = 3.12 \text{ ps}$).

вплоть до 20 ps (рис. 4). Однако вклад этой спектральной формы в общую картину не превышает 2–3%, и мы исключаем ее из детального рассмотрения и ограничиваемся лишь констатацией ее присутствия. Следует отметить, что интермедиат *D* имеет ту же природу, что и интермедиат *C*, который будет обсуждаться далее.

На рис. 4 представлены дифференциальные спектры интермедиатов. Основной вопрос при анализе и интерпретации полученных спектров — какой вклад вносят в их формирование гем *a* и гем *a*₃. Действительно, индивидуальный вклад каждого из гемов определяется главным образом двумя факторами: количеством фотонов, поглощенных каждым из них в отдельности, и соотношением величин коэффициентов экстинкции гема в основном и возбужденном состояниях. Как известно, что на длине волны возбуждения $\lambda = 600 \text{ nm}$ коэффициент экстинкции у гема *a* примерно в пять раз больше, чем у гема *a*₃ [4,6]. Следовательно, при анализе нестационарных спектров необходимо учитывать, что они формируются в результате вклада обоих гемов в примерном соотношении 5 : 1.

Приступим к анализу и интерпретации трех обнаруженных интермедиатов *A*, *B* и *C*.

Интермедиат *A*. Дифференциальный спектр его наведенного поглощения охватывает весь видимый диапазон (рис. 4). Максимум в этом спектре расположен при 464 nm, хотя необходимо отметить, что спектр носит достаточно „размытый характер“. Положение этого максимума отличается от истинного расположения в спектре поглощения интермедиата. Этот максимум располагается вблизи изобестической точки спектров поглощения интермедиата *A* и ЦО в основном состоянии. Изобестическая точка расположена при 448–449 nm. Нахождение точного расположения максимума интерме-

диата на данном этапе представляется исключительно сложным, так как оно требует специальных экспериментов, при которых все молекулы ЦО переводятся в это возбужденное состояние. Мы относим поглощение этого интермедиата к триплет-триплетному $\pi\pi^*$ -поглощению ЦО, так как общий вид этого спектра очень близок к спектрам T_1-T_i -поглощения у металлопорфиринов, в том числе и у комплексов Zn и Cd с протопорфирином IX. Из-за очень короткого времени жизни интермедиата А невозможно выполнить полное доказательство того, что это именно T_1-T_i -поглощения, так как контрольный тест (тушение молекулярным кислородом этого возбужденного состояния) из-за очень короткого времени жизни интермедиата невозможен. Кроме того, у данного соединения, как и у всех гембелков, отсутствует фосфоресценция и флуоресценция. Мы уже отмечали, что имеем дело с результирующим спектром, однако мы полагаем, что основной вклад в наблюдаемый спектр интермедиата А дает низкоспиновый гем а. Действительно, максимальное просветление наблюдается при $\lambda = 428 \text{ nm}$, что очень близко к значению максимума в индивидуальном спектре поглощения гема а, расположенного при $\lambda = 426 \text{ nm}$ [4].

Рассмотрим следующий кинетический интермедиат В (рис. 4), время жизни которого составляет 1.85 ps. Максимум в дифференциальном спектре интермедиата В претерпевает синий сдвиг на несколько нанометров в сравнении со спектром интермедиата А. Происходит также смещение изобестической точки. В результате они располагаются соответственно при 459 и 442 nm. Следует отметить, что положение максимума в известной степени приблизительно, так как спектр интермедиата достаточно размыт. Максимальное просветление полосы Sore наблюдается при 430 nm. Таким образом, спектр интермедиата имеет главный максимум, расположенный в области полосы Sore. Точное положение максимума мы установить не можем, так как экспериментальные условия не позволяют перевести все молекулы ЦО в это состояние. Мы полагаем, что данный максимум располагается в 2–3 nm от изобестической точки ($\lambda = 430 \text{ nm}$), смещенный либо в красную, либо в синюю область спектра, а спектр интермедиата В есть результат поглощения света ЦО в возбужденном πd -состоянии, т.е. в состоянии, при котором принадлежащий порфируну π -электрон претерпевает внутримолекулярный перенос на вакантное место на d -орбитале Fe, т.е. образуется короткоживущий π -катион-радикал гема. Главный довод в пользу такой интерпретации основан на данных спектроскопии магнитного кругового дихроизма [6]. В этой работе в спектре МКД было зафиксировано поглощение с максимумом при 1600 nm, которое авторы отнесли к $\pi-d$ -переносу электрона. Кроме того, наличие низкоэнергетических состояний $\pi-d$ -природы обнаружено для целого ряда низкоспиновых окисленных гембелков [13]. Уместно отметить также, что для ряда комплексов порфиринов с ионами переходных металлов спектры поглощения π -катион-радикалов хорошо извест-

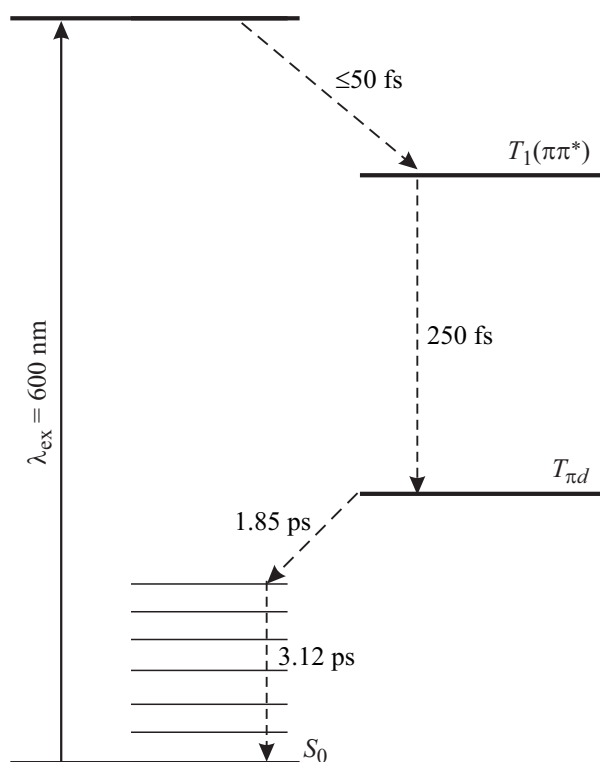


Рис. 5. Схема энергетических уровней и релаксационные процессы в геме а.

ны и близки по форме к обсуждаемому спектру [14,15]. Заселение состояния с $\pi-d$ -переносом, мы полагаем, происходит из триплетного состояния, которое должно располагаться ниже синглетного S_1 -состояния примерно на $\approx 3500 \text{ cm}^{-1}$, что характерно для комплексов порфиринов с ионами переходных металлов. Отсутствие собственной фосфоресценции у гема а и гема а₃, как и у любых других гемов, не позволяет непосредственно установить энергию состояния. Состояние с переносом заряда ($\pi-d$) располагает энергией $\approx 6000 \text{ cm}^{-1}$.

Интермедиат С. Данный интермедиат возникает из интермедиата В и имеет время жизни 3.12 ps. Его спектр претерпевает „синий“ сдвиг по отношению к спектру интермедиата В. Максимум в его спектре и изобестическая точка форм С и G располагаются соответственно при 446 и 437 nm. Максимальное просветление полосы Sore наблюдается при 430 nm. Спектр интермедиата имеет симметричный S-образный „красный“ сдвиг по отношению к спектру поглощения в основном состоянии. Аналогичный характер спектров наблюдается практически во всех гембелках [16,17]. Данный спектр мы относим к поглощению окисленного гема а₃ в основном G-состоянии с избытком колебательной энергии, т.е. реализуется процесс „остывания“ гема — „heme-cooling“. Как правило, этот процесс носит биэкспоненциальный характер: основной вклад (90–95%) дает быстрая составляющая (несколько ps); более медленная длится $\sim 20 \text{ ps}$. Для восстановленной

формы ЦО биэкспоненциальный процесс наблюдался и обсуждался в работах [7,18,19]. В данной работе мы не исследовали длительную компоненту, на присутствие которой указывает интермедиат D , о котором шла речь ранее. Таким образом, для окисленной формы гема a цитохром c оксидазы ($\text{Fe(III)}a$) наблюдается следующая последовательность релаксационных электронных и колебательных процессов. Электронные релаксационные процессы включают в себя три последовательные стадии (рис. 5). Первая, длительность которой ≈ 50 fs, представляет собой интеркомбинационный переход $S_1(\pi\pi^*) \rightarrow T_1(\pi\pi^*)$. Нельзя полностью исключить присутствие внутренней конверсии $S_1 \rightarrow S_0$, так как мы не производили измерений квантового выхода интеркомбинационной конверсии. Однако известно, что интеркомбинационная конверсия для комплексов порфиринов с металлами (Zn, Cu, Cd, Pd) — основной канал дезактивации $S_1(\pi\pi^*)$ -состояния [20,21]. Вторая, более длительная, стадия длительностью 250 fs есть результат дезактивации триплетного $\pi\pi^*$ -состояния в результате $T_1(\pi\pi^*) \rightarrow CT(\pi d)$ -перехода. В результате этого заселяется $CT(\pi d)$ -состояние, которое в свою очередь дезактивируется за счет перехода в основное $S_0(G)$ -состояние. Длительность этого процесса 1.85 ps. После завершения трех процессов электронной релаксации молекула гема a_3 оказывается в основном состоянии с избытком колебательной энергии. Дальнейшая колебательная релаксация („остывание гема“) длится 3.12 ps. На рис. 5 представлена схема электронных возбужденных состояний и соответствующих релаксационных процессов. Представленная схема имеет упрощенный вид, так как не указаны состояния, связанные с возбуждением d -электронов, которые расположены выше S_1 -состояния. Таким образом, в случае окисленного гема a мы имеем картину, очень похожую на ту, которая наблюдается для восстановленной формы гема a и которая была представлена нами в работе [7], с той лишь разницей, что в восстановленной форме гем a из триплетного $\pi\pi^*$ -состояния переходит в низколежащее dd -состояние, т.е. происходит перенос энергии с органической части молекулы на металл, в результате чего происходит $d-d$ -переход и реализуется короткоживущее возбужденное состояние, связанное с возбуждением d -электрона Fe. В упомянутой нами работе [7] обсуждался также вопрос о релаксации энергии в восстановленной форме гема a_3 , для которого несмотря на отсутствие прямых спектральных доказательств, предполагалось, что у него присутствуют лишь первые две стадии электронной релаксации, а самая длительная отсутствует.

В настоящей работе мы представляем результаты дополнительных исследований восстановленной формы цитохром c оксидазы, выполненных в спектральной области 420 ± 5 nm, в которой поглощает в основном состоянии гем a_3 [5]. Было обнаружено, что в этой области кинетика спектральных изменений указывает на то, что число интермедиатов меньше на единицу.

Последовательность релаксационных процессов записывается в виде $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} G$. Биэкспоненциальная аппроксимация позволила для интермедиатов A и B установить следующие времена жизни 182 ± 8 fs и 9.1 ± 0.6 ps. Измерения были выполнены на длине волны возбуждения $\lambda = 423$ nm, на которой наблюдается наибольший спектр. Эти кинетические характеристики относятся к интермедиатам восстановленной формы гема a_3 . В связи с тем, что вся совокупность измерений была проведена в узком спектральном интервале, мы не располагаем дифференциальными спектрами интермедиатов гема a_3 . Поэтому отнесение измеренных времен жизни к определенному возбужденному состоянию вызывает серьезные трудности. Окончательное нахождение этих спектров станет возможным в будущем после проведения специальных fs -измерений при возбуждении в области $\lambda \approx 420$ nm, т.е. при таких экспериментальных условиях, когда будет возбуждаться гем a_3 . Вместе с тем мы полагаем, что интермедиат A со временем 182 fs представляет собой гем a_3 в триплетном $\pi\pi^*$ -состоянии. На это указывает то, что очень близким временем жизни триплетного состояния обладает восстановленный гем a (200 fs) [7]. Интермедиат B со временем жизни 9.1 ps, как и в случае интермедиата C в геме a , представляет собой гем a_3 в основном состоянии с избытком колебательной энергии, т.е. мы наблюдаем колебательную релаксацию (heme cooling) длительностью 9.1 ps, которая близка по значению к длительности соответствующего процесса в геме a (7.6 ps) [7]. Уместно отметить, что в работе [19] обсуждалась возможность того, что данный процесс в геме a_3 более длителен в сравнении с гемом a . Таким образом, в геме a_3 электронная релаксация включает два процесса: $S_1 \rightarrow T_1$ ($\tau \leq 50$ fs) и $T_1 \rightarrow S_0$ (182 fs). Следует отметить, что таким образом высокоспиновый гем a_3 в этом смысле аналогичен высокоспиновому дезоксигемоглобину Hb [16]; у обоих гембелков $S = 2$. Для этих двух гембелков характерно наличие в спектре поглощения полосы при $\approx 760-780$ nm, которая имеет перенос-зарядовую природу $\pi-d$. Однако заселение этого состояния в процессе дезактивации энергии $T_1(\pi\pi^*)$ -состояния не происходит.

Заключение

Методом фемтосекундной абсорбционной спектроскопии исследован терминальный белок дыхательной цепи цитохром c оксидазы. В результате обнаружены и изучены спектры фотоиндуцированного поглощения в спектральном диапазоне 390–560 nm и во временном интервале 80 fs–20 ps. Несмотря на принципиальные трудности при анализе экспериментальных данных, обусловленные сильным перекрытием спектров поглощения гемов a и a_3 , мы полагаем, что в окисленной и восстановленной формах гема a процессы электронной и колебательной релаксации в гемовом центре имеют общие черты. В них присутствует заселение и дезактивация

триплетного $\pi\pi^*$ -состояния, приводящие к заселению и последующей дезактивации более низкоэнергетического возбужденного электронного состояния, которое, однако, имеет у гема *a* разную орбитальную природу в окисленной и восстановленной формах. После завершения стадий электронной релаксации молекула гема *a* оказывается в основном состоянии с избытком колебательной энергии. Последующая колебательная релаксация длится несколько пикосекунд. В восстановленной форме гема a_3 реализуется электронная релаксация в результате последовательности двух процессов заселения и дезактивации триплетного $\pi\pi^*$ -состояния с последующей колебательной релаксацией в основном состоянии.

Благодарности

Авторы благодарны А.А. Константинову и А.Ф. Чайковскому за проявленный интерес к работе и ценные замечания.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований Республики Беларусь „Фотоника, опто- и микроэлектроника 1.4.01“ (2016–2020), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00160а), а также за счет субсидии, выделенной Федеральному центру химической физики им. Н.Н. Семенова РАН на выполнения государственного задания 0082-2019-0001 (рег. номер АААА-А19-119012890064-7).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Kaila V.R.I., Verkhovskiy M.I., Wikström M. // Chem. Rev. 2010. V. 110. P. 7062.
- [2] Yoshikawa S., Shimada A. // Chem. Rev. 2015. V. 115. P. 1936.
- [3] Siletsky S.A., Konstantinov A.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. N 4. P. 476.
- [4] Vanneste W.H. // Biochemistry. 1966. V. 65. P. 838.
- [5] Dyuba A.V., Vygodina T.V., Konstantinov A.A. // Biochemistry (Moscow). 2013. V. 78. N 12. P. 1358.
- [6] Eglinton D.G., Johnson M.K., Thomson A.J., Gooding P.E., Greenwood C. // Biochem. J. 1980. V. 191. P. 319.
- [7] Шелаев И.В., Гостев Ф.Е., Выгодина Т.В., Лепешкевич С.В., Джагаров Б.М. // Химия высоких энергий. 2018. Т. 52. № 1. С. 31; Shelaev I.V., Gostev F.E., Vygodina T.V., Lepeshkevich S.V., Dzharagorov B.M. // High Energy Chemistry. 2018. V. 52. N 1. P. 45.
- [8] Vygodina T.V., Kirichenko A., Konstantinov A.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1837. N 7. P. 1188.
- [9] Fowler L.R., Richardson S.H., Hatefi Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1962. V. 64. N 1. P. 170.
- [10] Bukreev A., Mikhailov K., Shelaev I., Gostev F., Poleyaya Yu., Tyurin V., Beletskaya I., Umansky S., Nadtochenko V. // J. Phys. Chem. A. 2016. V. 120. N 12. P. 1961.
- [11] Ushakov E.N., Nadtochenko V.A., Gromov S.P., Veder-nikov A.I., Lobova N.A., Alfimov M.V., Gostev F.E., Petrukhin A.N., Sarkisov O.M. // Chem. Phys. 2004. V. 298. P. 251.
- [12] Shelaev I.V., Gostev F.E., Mamedov M.D., Sarkisov O.M., Nadtochenko V.N., Shuvalov V.A., Semenov A.Yu. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1797. P. 1410.
- [13] Makinen M.W., Churg A.K., Iron Porphyrins / Eds. Lever A.B.P., Gray H.B. Addison-Wesley, Reading, MA. 1983. Part 1. P. 141.
- [14] Fuhrhop J.-H. Porphyrins and Metalloporphyrins / Ed. Smith K.M. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 1976. Ch. 14. P. 593.
- [15] Dolphin D., Addison A.W., Cairns M., Dinello R.K., Farrell N.P., James B.R., Paulson D.R., Welborn C. // Int. J. Quantum Chem. 1979. V. 16. P. 311.
- [16] Kholodenko Y., Volk M., Gooding E., Hochstrasser R.M. // Chem. Phys. 2000. V. 259. P. 71.
- [17] Lim M., Jackson T.A., Anfinrud P.A. // J. Phys. Chem. 1996. V. 100. N 29. P. 12043.
- [18] Stoutland P.O., Lambry J.-C., Martin J.-L., Woodruff W.H. // J. Phys. Chem. 1991. V. 95. N 17. P. 6406.
- [19] Джагаров Б.М., Белянович Л.М., Константинов А.А., Руденок А.Н., Тихомиров С.А. // Докл. АН. 2000. Т. 375. № 1. С. 112; Dzharagorov B.M., Belyanovich L.M., Konstantinov A.A., Rudenok A.N., Tikhomirov S.A. // Dokl. AN. 2000. V. 373. P. 53.
- [20] Джагаров Б.М., Чирвоный В.С., Гуринович Г.П. Лазерная пикосекундная спектроскопия и фотохимия биомолекул / Под ред. Летохова В.С. М.: Наука, 1987. С. 181; Dzharagorov B.M., Chirvonyi V.S., Gurinovich G.P. Laser Picosecond Spectroscopy and Photochemistry of Biomolecules / Ed. Letokhov V.S. Bristol and Philadelphia: Adam Hilger. 1987. Ch. 3. P. 137.
- [21] Джагаров Б.М., Гуринович Г.П., Новиченков В.Е., Салохиддинов К.И., Шульга А.М., Ганжа В.А. // Химическая физика. 1987. Т. 6. № 8. С. 1069; Dzharagorov B.M., Gurinovich G.P., Novichenkov V.E., Salokhiddinov K.I., Shulga A.M., Ganzha V.A. // Khimicheskaya Fizika. 1987. V. 6. N 8. P. 1069.