

мембрана. Однако, как указано выше (см. стр. 286), величина свободной энергии фосфорилирования не равна нулю — необходим специальный механизм сопряжения, покрывающий дефицит свободной энергии. Соответственно, Митчелл далее вводит представление о синтезе в мембране предшественника АТФ — неизвестного пока вещества X с меньшим энергосодержанием (около 4,5 ккал/моль). Энергия нескольких молекул X передается одной молекуле АДФ при ее фосфорилировании. Это положение теории остается недоказанным. В целом пока нет полного ответа на основной вопрос — достаточно ли энергия протонов для фосфорилирования АДФ. Предположение об одновременном участии в синтезе АТФ других ионов в принципе может улучшить ситуацию, но проверка его связана с большими трудностями. Теория Митчелла в целом согласуется с представлением о квазиравновесии в сопряженных митохондриальных процессах. Однако из всего изложенного следует, что эта теория является феноменологической и не рассматривает молекулярные механизмы окислительного фосфорилирования. Она не учитывает, несомненно, наличествующих в системе электронно-конформационных взаимодействий (ЭКВ), ответственных в конечном счете за все ферментативные процессы в митохондриях. Мы еще мало знаем о сущности ЭКВ в цитохромах и других ферментах, участвующих в окислительном фосфорилировании. Между тем, именно при исследовании этого процесса концепция ЭКВ (см. [3], гл. 6) должна быть особенно эффективной, так как митохондриальная система реализует транспорт электронов.

§ 6.6. ЭЛЕКТРОННО-КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Самые общие соображения показывают, что перенос электрона, сдвиг электронной плотности в конденсированной среде должны сопровождаться изменениями положений атомов, атомных ядер среды. Все степени свободы молекулярной системы, т. е. системы, состоящей из ядер и электронов, взаимосвязаны. В биополимерной системе наименьших затрат энергии требуют повороты атомных групп, т. е. конформационные движения. Следовательно, в такой системе электронный транспорт сопряжен с конформационными движениями, и должны реализоваться *электронно-конформационные взаимодействия* (ЭКВ) (см. [3], § 6.7, [72]). Конформационные перестройки должны сопровождать и перемещение ионов. Движение электрона (и зарядовой плотности) в биополимерной системе, в частности, в мембране, сопряженное с конформационными движениями, может трактоваться как перемещение квазичастицы — *конформона* [73]. В надмолекулярной системе конформационные перестройки могут

приводить к механическому движению на макроскопическом уровне.

Эти общие представления, в той или иной форме фигурирующие в научной литературе, применяются рядом авторов к рассмотрению процессов, протекающих в митохондриальных мембранах. В работах Грина и Джи [26, 27] предложена так называемая электромеханохимическая модель структуры и функции митохондрий, исходящая из рассмотрения конформационных свойств элементарных частиц митохондрий (ЭЧМ, см. стр. 308). Предполагается, что ЭЧМ может существовать в различных конформационных состояниях — в основном неэнергизованном состоянии и в возбужденном, метастабильном энергизованном состоянии. Свободную энергию данного состояния можно представить в виде суммы химической, электрической и механической энергий

$$G = G_{\text{хим}} + G_{\text{эл}} + G_{\text{мех}}. \quad (6.67)$$

При переходе из основного состояния в энергизованное, не сопровождаемом суммарным изменением свободной энергии, $\Delta G = 0$ и, следовательно,

$$\Delta G_{\text{хим}} + \Delta G_{\text{эл}} + \Delta G_{\text{мех}} = 0. \quad (6.68)$$

Отдельные вклады в этой сумме могут изменяться, т. е. имеется электромеханохимическое сопряжение — один вид энергии превращается в другой. Элементарную модель системы с взаимопревращением трех видов энергии можно представить двумя противоположно заряженными телами, соединенными пружиной. При колебаниях такой системы происходят взаимные превращения электростатической, потенциальной и кинетической энергий.

Грин и Джи считают, что ЭЧМ характеризуется направленным разделением зарядов при энергизации. Энергизация является результатом каталитической конверсии химической энергии субстрата в энергию супермолекулы, т. е. ЭЧМ. Возникающее вследствие энергизации электрическое поле индуцирует дополнительное поле в других структурных компонентах ЭЧМ. Энергизованное состояние стабилизируется электростатическими взаимодействиями. В этом метастабильном состоянии оказывается возможной эндергоническая химическая реакция (фосфорилирование), происходит дезэнергизация, и система релаксирует в конечное состояние, конформационно сходное с начальным. Триггером деполяризации системы являются локальные конформационные перестройки в активных центрах. Окисление происходит в нижней части супермолекулы (в подставке ЭЧМ), фосфорилирование — в ее верхней части (в головке ЭЧМ).

Имеются поучительные черты сходства и различия этой модели и топливного элемента. В топливном элементе химические реакции, протекающие как при поляризации, так и при деполяризации, имеют характер окисления и восстановления, в модели ЭЧМ такова лишь реакция в нижней, но не в верхней части. В топливном элементе обе реакции относятся к экзергоническим, в модели ЭЧМ поляризация является экзергонической, а деполяризация — эндергонической реакцией. В топливном элементе происходит реальный перенос электронов, в модели ЭЧМ нет переноса электронов между участком окисления и участком фосфорилирования, и дело сводится к возникновению и действию электрического поля.

В процессе энергизации при гидролизе АТФ происходит конформационная поляризация головки ЭЧМ, что индуцирует поляризацию основания.

Согласно изложенным выше идеям, изменение свободной энергии в ходе фосфорилирования складывается из изменений химической и электромеханической энергий, причем два таких вклада дополняют друг друга.

В работе [26] предлагается далеко идущая детализация структуры ЭЧМ и локализация в них различных стадий окислительного фосфорилирования. Такая детализация (октетная структура головки и т. д.) реальных оснований не имеет. Равным образом нельзя считать аргументированными конкретные представления о конформационных состояниях ЭЧМ, различающихся выдвиганием головки на 50 Å. Укажем в связи с этим на еще не вполне опровергнутые сомнения в самом существовании таких структур (см. стр. 290).

Грин и Джи считают электромеханохимическую модель альтернативной хемиосмотической модели Митчелла. В последней модели мембранный потенциал генерируется вследствие перемещения протонов в пространстве между кристами и ионов OH^- в матриксе, вызванного перемещением электронов и переносчиков водорода во внутренней мембране. В электромеханохимической модели мембранный потенциал возникает непосредственно в результате окислительно-восстановительного процесса в ЦПЭ. Разделение зарядов в электронно-транспортной системе объясняется локализацией переносчиков электронов в одной части внутренней мембраны и переносчиков протонов — в другой ее части. Другое различие состоит в том, что в модели Грина и Джи протоны, отделенные от окисляемого субстрата, не покидают мембранную фазу. Изменение рН во внешней среде считается результатом конформационных перестроек белков вблизи разделенных зарядов и воздействия этих перестроек на состояние внешней среды и матрикса.

В действительности между двумя моделями нет принципиальных противоречий. В сущности, их трудно сравнивать. Хемосмотическая теория является феноменологической, ее основные постулаты и выводы не зависят от локализации стадий окислительного фосфорилирования. Модель Грина и Джи существенна в том отношении, что в ней в явной форме фигурируют конформационные перестройки мембранной структуры, несомненно происходящие в действительности. Недостаток модели — чрезмерная ее детализация, лишенная достаточно строгих оснований. Поэтому конкретный механизм электромеханохимического сопряжения, предлагаемый Грином и Джи, имеет умозрительный характер. Согласно модели с рядом опытных фактов (см. [26, 27]) нельзя считать ее доказательством.

Конформационная концепция Грина, из которой исходит электромеханохимическая модель, формулируется им как универсальная [74]. Грин подчеркивает четыре основных принципа биоэнергетики: 1) конверсия тепловой энергии в электромеханохимическую, осуществляемая белком, 2) способность энергизованного фермента поляризовать чувствительные связи в молекуле субстрата, выполняющей цикл поляризации и деполяризации, 3) сопряжение переноса групп, 4) энергетическое сопряжение посредством комплементарных, векторных потоков зарядов в центрах экзергонических и эндергонических реакций. Фермент считается упругой трехмерной средой, совершающей колебания как целостная система. Молекулы белка периодически переходят из растянутого состояния в сжатое и обратно с частотами порядка 10^3 — 10^6 с⁻¹, отвечающими частотам ферментативных реакций. В ходе этих колебаний происходит переход одной формы энергии в другую, возникает конформация, соответствующая выполнению специфической работы, и понижается активационный барьер реакции превращения субстрата в продукт. Фермент есть машина, превращающая тепловую энергию в электромеханохимическую в фазе энергизации и выполняющая обратное превращение в фазе дезэнергизации. Грин возлагает надежды на исследования медленных колебаний ферментов методом комбинационного рассеяния с использованием лазерной техники.

Каталитическое действие фермента определяется поляризацией субстрата: фермент служит поляризующим агентом, а субстрат — поляризуемым веществом. В окислительных реакциях взаимодействие фермент — субстрат включает перенос электронов.

Эти качественные представления согласуются с неоднократно высказывавшимися идеями (см. [3], § 6.7, а также [75—77]). В общем виде они не могут вызвать возражений, однако истинная физика электронно-конформационных взаимодействий

требует количественных теоретических и экспериментальных исследований. При этом вряд ли можно рассчитывать на прямое изучение медленных колебаний ферментов методом комбинационного рассеяния, так как медленные колебания несомненно существуют и в окружающей среде и их наблюдение весьма затруднительно.

Говоря о митохондриальных мембранах, необходимо прежде всего экспериментально установить наличие в них конформационных превращений. В § 3.8 уже были приведены некоторые данные такого характера, относящиеся к возбудимым мембранам. Здесь мы остановимся на результатах, полученных с помощью молекулярных меток, или зондов, — люминесцентных [78] и главным образом спиновых. Исследования биомембран митохондрий, меченных иминоксильными радикалами, методом электронного парамагнитного резонанса были проведены в работах Блюменфельда, Кольтовера и др. [79—84]. С помощью спиновых меток была изучена сорбция воды мембранами лиофилизированных СМЧ (а также хлоропластов, см. гл. 7). Время корреляции τ , определенное из спектра ЭПР и характеризующее подвижность метки, оказалось немонотонно зависящим от содержания сорбированной воды — с его увеличением τ проходит вначале через минимум, затем достигает максимума, после чего монотонно убывает. Эти результаты можно считать указанием на структурные переходы у молекул в мембране, имеющие кооперативный характер. При переходе увеличивается число гидрофильных групп, контактирующих с водой и, следовательно, сорбирующая поверхность мембраны. Переходы происходят при концентрациях воды в препарате, равных 8—12 и 18—23%. Авторы связывают первый переход с гидратацией, второй — с изменением фазового состояния липидов в мембране. Такое толкование нельзя считать однозначным, но наличие переходов установлено.

Установлено также, что восстановление дыхательной цепи СМЧ сукцинатом или НАД-Н изменяет анизотропию спектра ЭПР спиновой метки. Более четкие результаты дали работы с гидрофобными метками. Оказалось, что добавление АТФ к суспензии незергизованных СМЧ вызывает значительные изменения спектра ЭПР — АТФ улучшает растворимость гидрофобной метки в мембранах СМЧ. По-видимому, такое изменение определяется конформационными изменениями структуры мембраны. Сходное влияние АТФ наблюдается и в интактных митохондриях. ДНФ и олигомицин в концентрациях более 1 мкг на 1 мг белка ингибируют этот процесс. При малых концентрациях (0,1—0,2 мкг на 1 мг белка) олигомицин подобно аллостерическим активаторам усиливает индуцированные АТФ конформационные переходы в СМЧ. Изучение мицелл фосфолипидов, по-

лученных из митохондриальных мембран, показало, что разобщители вызывают конформационные изменения липидов.

Зависимость параметра сольубилизации гидрофобной метки в мембране от концентрации АТФ имеет S-образную форму. Это свидетельствует о кооперативности перехода (см. [3], § 7.5).

Параметр Хилла для такой кривой равен 6, в присутствии олигомицина он убывает до 5 и даже до 4. Разность свободных энергий оценена в 1,8 ккал/моль. Примерно такие же величины получаются при обработке данных по действию ингибитора антимицина на скорость дыхания [85]. Кривая зависимости ингибирования восстановления цитохрома *b* в СМЧ [86] характеризуется параметром Хилла, равным 4,5, и $\Delta G = 2,3$ ккал/моль независимо от природы донора электронов. Высокая кооперативность этих процессов указывает на олигомерное строение мембран.

Анализ температурной зависимости параметров спектров ЭПР спиновых и флуоресцентных меток в СМЧ (а также в хлоропластах и в микросомах) показал существование термических структурных переходов в мембранах вблизи 20 и 40 °С. При таких температурах происходят скачкообразные изменения энергии и энтропии активации ферментативных процессов.

Ограничимся этими немногими фактам. Все они (а также ряд других результатов) указывают на наличие конформационных превращений в митохондриальных мембранах, в частности, возникающих при их энергизации. Таким образом, исходное положение электромеханохимической гипотезы можно считать вполне приемлемым. Однако физика соответствующей модели действия сопрягающих мембран не может еще считаться разработанной.

Блюменфельд [79, 83] выдвинул гипотезу релаксационных конформационных переходов в митохондриальных мембранах. Допустим, что элементарный акт состоит в присоединении электрона к активному центру макромолекулы (скажем, к группе гема цитохрома при его восстановлении). Нейтральной форме макромолекулы соответствует определенная равновесная конформация I, заряженной (восстановленной) — другая равновесная конформация II, заметно отличающаяся от исходной. Электронный перенос, т. е. восстановление, происходит значительно быстрее конформационного изменения. Следовательно, при протекании элементарного химического акта образуется неравновесное конформационное состояние — электрон перешел, но конформация не успела подстроиться к новой ситуации. В этом состоянии структура макромолекулы напряжена, она обладает повышенной конформационной энергией. Затем происходит медленная релаксация конформации макромолекулы к равновесному состоянию II. Переход можно представить схемой

(минус обозначает электрон)



Энергия, выделяемая в элементарном акте, запасается в форме конформационной энергии в течение времени релаксации. Согласно [79, 83] в этом и состоит сущность первичного макроэрга. За время релаксации конформационная энергия трансформируется в химическую. Можно думать, что в пункте сопряжения существует лабильный комплекс между переносчиком и какой-либо группой в активном центре фермента сопряжения, роль которой скорее всего играет аденин связанного АДФ [87]. При релаксации $I^- \rightarrow II^-$ в какой-то момент энергетический уровень, на котором находится электрон, понижается до акцепторного уровня аденина. Уровни переносчика и аденина оказываются разделенными барьером, но в такой системе возможен туннельный переход электрона на аденин [88]. В работе [89] (см. также [79]) показано, что увеличение электронной плотности на аденине сопровождается резким повышением основности аминокислотной группы. Если в состав активного центра фермента сопряжения АТФ-синтетазы входит электрофильная группа, например, карбоксил, то аденин реагирует с ней, образуя амидную связь. В следующий момент релаксации уровень переносчика оказывается ниже уровня аденина. Электронная плотность переходит с аденина обратно на редокс-группу того же или следующего переносчика электрона ЦПЭ, и связь аденина с карбоксиллом лабильзуется. На основе той же модели рассмотрено действие разбавителей.

В работах Блюменфельда и Чернавского [90—92] (см. также [79, 111]) дано обобщение этой концепции применительно к трактовке элементарного акта любой ферментативной реакции. Формулируется «постулат, согласно которому конформационное изменение субстрат-ферментного комплекса, следующее за присоединением субстрата к активному центру фермента, включает в себя кроме разрыва старых и образования новых вторичных связей в макромолекуле белка также химические изменения субстрата, превращающие молекулу субстрата в молекулу или молекулы продукта. Таким образом, элементарный акт ферментативной реакции заключается в конформационном изменении макромолекулы (фермент-субстратного комплекса), и скорость превращения субстрат—продукт определяется скоростью этого конформационного изменения». На рис. 6.19 приведена схема энергетических изменений на разных стадиях каталитического разрыва некоторой связи А—В субстрата. В быстрой стадии I присоединения субстрата к ферменту происходит выделение свободной энергии ΔG_1 . Конформация белка не

успеваеt перестроиться и остается напряженной. На стадии 2 происходит медленная релаксация комплекса к новому равновесию и превращение субстрата в продукт (\tilde{E} — новая конформация фермента). Свободная энергия понижается на величину ΔG_2 . Далее, в стадии 3 комплекс распадается на фермент и продукт, но фермент остается в напряженной конформации E,

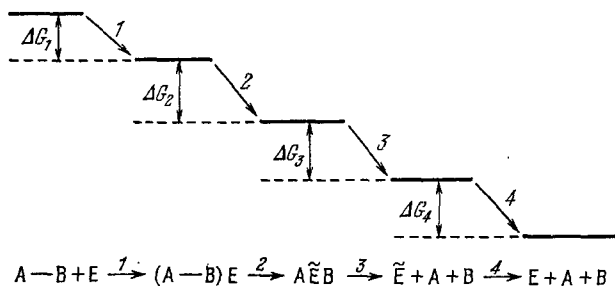


Рис. 6.19. Энергетические изменения в последовательных стадиях каталитического процесса.

медленно релаксирующей к равновесию в стадии 4. Общее понижение свободной энергии равно

$$\Delta G = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_4. \quad (6.68a)$$

Это — термодинамическая модель. Кинетика процесса в цитированных выше работах фактически не рассматривается. Блюменфельд считает уравнение Аррениуса или Эйринга неприменимым к ферментативным реакциям [79, 91]. Утверждается, что система не характеризуется свободной энергией активации в обычном смысле слова — все молекулы субстрата, образовавшие надлежащий комплекс с ферментом, релаксирующим к новому конформационному состоянию, претерпевают химическое превращение. Влияние температуры на скорость реакции определяется не изменением числа молекул, способных преодолеть некоторый активационный барьер, но изменением исходной конформации и, следовательно, пути и скорости последующей релаксации [92] (см. также [79, 111]).

Для построения кинетической теории необходимо исследовать относительную роль двух механизмов переноса электрона — надбарьерный переход по Эйрингу (см. [3], § 6.1) и туннельный эффект (см. [79, 92, 111]). Туннельный эффект при переносе электрона в биологической системе был впервые рассмотрен Чансом применительно к бактериальному хлорофиллу [114—116].

Константа скорости активационного перехода равна

$$k_1 = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{F^\ddagger}{k_B T}\right), \quad (6.69)$$

где F^\ddagger — свободная энергия активации. Число актов туннельного перехода в единицу времени равно

$$k_2 = \nu_0 \exp\left[-\frac{2L}{h} \sqrt{2m(U-E)}\right], \quad (6.70)$$

где ν_0 — частота «колебаний электрона» в молекуле, участвующей в цепи переноса, скажем, в цитохроме *c* — величина порядка

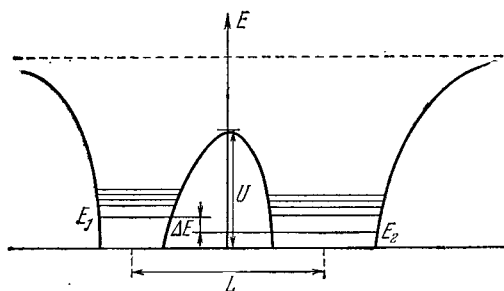


Рис. 6.20. Две несимметричные потенциальные ямы, разделенные барьером.

10^{17} с^{-1} , L — ширина барьера, U — его высота, E — уровень энергии электрона, m — его масса. На рис. 6.20 показана схема потенциальных ям двух соседних переносчиков.

Полная скорость переноса определяется суммой k_1 и k_2 . При высоких температурах преобладает первый член, при низких — второй. Можно предположить, что F^\ddagger и U совпадают. Согласно имеющимся оценкам $L \approx 10\text{--}20 \text{ \AA}$, $U \approx 1\text{--}2 \text{ эВ}$ [111]. При этих значениях $k_2 \gg k_1$. Отсюда следует, что реальные переходы должны быть практически независимы от температуры, что противоречит опыту. Однако туннельный переход электрона должен сопровождаться излучением фононов, возбуждением колебаний молекул, конформационными переходами [92, 93, 112], что приводит к сильной температурной зависимости.

Молекулярная система ЦПЭ содержит «проводящие группы», в которых π -электроны делокализованы. Это ароматические группы белков, простетические группы и коферменты. К проводящим группам следует отнести и атомы переходных металлов. Размеры таких групп порядка нескольких ангстрем. Проводящие группы отделены друг от друга диэлектрическими молекулами

белков и липидов; соответственно, ширины барьеров L порядка размеров этих молекул, т. е. $10\text{--}20 \text{ \AA}$.

Поведение электрона при его туннелировании зависит от соотношения между разностью электронных уровней ΔE (см. рис. 6.20) и величиной резонансного расщепления

$$\Delta E_r = E \exp\left[-\frac{L}{\hbar} \sqrt{2m(U-E)}\right]. \quad (6.71)$$

Если $\Delta E \gg \Delta E_r$, то туннельного перехода не будет. При $\Delta E \leq \Delta E_r$ переход произойдет за время $\tau_r = \hbar/\Delta E_r$. При $L \approx 20 \text{ \AA}$, $U-E \approx 2 \text{ эВ}$, $\Delta E_r \sim 10^{-6} \text{ эВ}$. Реальные значения ΔE в ЦПЭ должны быть много больше, и такой идеальный переход невозможен. Туннелирование становится, однако, возможным вследствие диссипации энергии, обеспечивающей сближение электронных уровней. Именно ЭКВ создают возможность такой диссипации. Чернавская и Чернавский [111] рассматривают случай потенциальных ям, защищенных от ионной среды неполярной оболочкой. Вблизи места локализации электрона можно выделить лишь несколько заряженных групп, сильно связанных с электроном. Рассматривается в качестве предельного случая лишь одна колебательная степень свободы. В этой ситуации возможно возбуждение колебательного кванта E_k , причем

$$\Delta E = \hbar\omega_k = E_k, \quad (6.72)$$

или увеличении энергии уже присутствующего кванта

$$\Delta E = \Delta E_k = \hbar \Delta\omega_k. \quad (6.73)$$

Значения E_k и ΔE_k порядка $0,1 \text{ эВ}$. Вероятность туннельного перехода при условии (6.72) выражается формулой

$$\omega = \frac{E^2}{\pi\hbar} \rho(\Delta E) g^2 \exp\left[-\frac{2L}{\hbar} \sqrt{2m(U-E)}\right]. \quad (6.74)$$

Здесь $\rho(\Delta E)$ — плотность уровней конечного состояния, $g^2 = 10^{-2}\text{--}10^{-4}$ — константа, характеризующая «силу связи». Если имеет место случай (6.73), то

$$\omega = \frac{E^2}{\pi\hbar} \rho(\Delta E - \Delta E_k) \exp\left(-\frac{\hbar\omega_k}{k_B T}\right) \exp\left[-\frac{2L}{\hbar} \sqrt{2m(U-E)}\right]. \quad (6.75)$$

Функцию ρ можно представить либо в лорентцовой, либо в гауссовой форме. Последняя имеет вид

$$\rho(\Delta E) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \Gamma_k} \exp\left[-\left(\frac{\Delta E - \Delta E_k}{2\Gamma_k}\right)^2\right]. \quad (6.76)$$

Она имеет резкий максимум при $\Delta E = \Delta E_k$ и быстро убывает при $\Delta E - \Delta E_k \gg \Gamma_k$. Ширина резонансной области Γ_k порядка 10^{-2} эВ .

Электронно-конформационные взаимодействия (по терминологии Чернавского электронно-конформационные переходы, ЭКП) могут трактоваться именно таким способом. Как указано в цитированных выше работах (см. [3], § 6.5, а также [72, 73, 111]), ЭКВ происходят при попадании электрона в поляризуемую среду, образованную группами макромолекулы. Среда поляризуется, и образуется самосогласованное поле, эквивалентное потенциальной яме для электрона. Такое образование в физике твердого тела называется *поляроном*. Если поляризационная деформация приводит к состоянию, отделенному от исходного энергетическим барьером, то мы имеем дело с нелинейным поляроном. В биополимерах поляризация приводит к движению по конформационным степеням свободы — нелинейный полярон является *конформоном*.

Чернавская и Чернавский дают грубую оценку энергии и размеров конформона [111]. В среде, содержащей равномерно распределенные ионы массы M , взаимодействующие по закону Кулона, имеем согласно теореме вириала

$$\frac{1}{2} Mv^2 \approx e^2/r. \quad (6.77)$$

Скорости v и расстоянию r соответствует частота колебаний

$$\omega_k = \frac{v}{r} = \sqrt{\frac{8\pi}{3} \frac{e^2}{M}} n, \quad (6.78)$$

где $n = (4/3\pi r^3)^{-1}$ — число ионов в единице объема. Взаимодействуя с колебаниями ионов, электрон приобретает энергию $\hbar\omega_k$ и импульс $q = \sqrt{2m\hbar\omega_k} \equiv \sqrt{4m^2\hbar^2\omega_k^2}$, где m — масса электрона. Согласно соотношению неопределенностей соответствующий размер электронного облака равен

$$\lambda = \frac{\hbar}{q} = \sqrt{\frac{\hbar}{2m\omega_k}} = \sqrt[4]{\frac{3}{32\pi}} \sqrt[4]{\frac{\hbar^2 M}{m^2 e^2 n}}.$$

Вводя боровский радиус $a_0 = \hbar^2/me^2 \approx 0,5 \text{ \AA}$, получаем

$$\lambda = \sqrt[4]{\frac{3}{32\pi}} \sqrt[4]{\frac{Ma_0}{mn}} = a_0 \sqrt[4]{\frac{3}{32\pi}} \sqrt[4]{\frac{M}{m} \frac{1}{na_0^3}}. \quad (6.79)$$

Размеры полярона (конформона) должны быть того же порядка. Энергия поляризации по порядку величины равна

$$E_p = e^2/\epsilon\lambda, \quad (6.80)$$

где ϵ — микроскопическая диэлектрическая проницаемость. Наконец, отношение E_p к энергии колебаний дает число квантов, участвующих в образовании полярона,

$$N = E_p/\hbar\omega_k. \quad (6.81)$$

Для белков среднее значение плотности зарядов $n \sim 10^{21} \text{ см}^{-3}$, т. е. расстояние между зарядами порядка 10 Å. Если заряды расположены на протонах, то $M = (6,2 \cdot 10^{23})^{-1} \text{ г}$. Величину ϵ можно считать равной 3. Получаем $\omega_k \approx 3,5 \cdot 10^{13} \text{ с}^{-1}$, размеры полярона $\lambda \approx 15 \text{ Å}$, т. е. поляризацией охвачена практически вся макромолекула. Энергия поляризации $E_p \approx 0,35 \text{ эВ}$, сдвиг уровней электрона того же порядка. Наконец, N примерно равно 15.

В кинетике электронно-конформационных переходов можно выделить четыре процесса [111].

1) Колебания электрона внутри одной ямы, размером в несколько ангстрем, с частотами порядка 10^{17} с^{-1} .

2) Колебания атомов с частотами порядка $k_B T / \hbar \sim 10^{13} \text{ с}^{-1}$ и с амплитудами порядка $10^{-1} - 10^{-2} \text{ Å}$; частоты упругих колебаний белковой глобулы как целого порядка $10^{-12} - 10^{-11} \text{ с}^{-1}$.

3) Туннелирование электрона; как уже сказано, ему отвечают времена порядка $10^{-7} - 10^{-6} \text{ с}$ и расстояния порядка $10 - 20 \text{ Å}$.

4) Конформационные переходы в макромолекуле с временами $10^{-3} - 10^{-1} \text{ с}$; возможны и значительно более медленные переходы (см. § 8.6).

Соответственно можно не рассматривать быстрые процессы 1), 2), 3) и пользоваться усредненными по времени значениями электронной плотности в ямах и усредненными положениями колеблющихся атомов. Именно такая процедура применена в описанной выше модели релаксационных ЭКП. Молекула — акцептор электрона, получив электрон, оказывается в неравновесной конформации, медленно превращающейся в равновесную. Поэтому для туннельного эффекта требуется не совпадение электронных уровней восстановленных донора и акцептора в их равновесных конформациях, но наличие надлежащим образом расположенного виртуального электронного уровня акцептора в окисленной конформации. Энергия, выделившаяся при туннелировании, диссипирует, но энергия, медленно выделяемая при конформационной релаксации к новому равновесному состоянию, может быть конвертирована в энергию макроэрга (ср. также [93]). Так как туннельный эффект связан с условиями резонанса электронных уровней энергии, он подвержен влиянию мембранного потенциала. Следовательно, возможен регуляторный процесс, состоящий в том, что мембранный потенциал, создаваемый активным транспортом ионов, зависит от скорости переноса электронов, которая, в свою очередь, регулируется мембранным потенциалом. Реализуется обратная связь, обеспечивающая автоматическое поддержание системы в условиях, близких к резонансным [79].

Изложенная концепция дает гипотетическое качественное описание электронно-конформационных взаимодействий в фер-

мент-субстратном комплексе. Однако мы не располагаем пока теорией, количественно объясняющей скорость ферментативной реакции, в частности, кинетику переноса электронов в митохондриальной системе. Задача такой теории состоит в нахождении поверхности свободной энергии фермент-субстратного комплекса как целостной системы, обладающей электронными и конформационными степенями свободы, и в нахождении пути процесса. Сама эта поверхность действительно должна меняться с температурой.

При рассмотрении пути процесса следует учитывать «конформационную» природу явления. Иными словами, положения электронных уровней энергии зависят от динамического состояния среды — белка, обладающего конформационными степенями свободы. Вследствие медленности конформационных движений система является адиабатической. Основные положения упрощенной модельной теории, развитой в работах [94—96], изложены в § 6.7 книги [3]. В последующих работах Кришталика [97] проведено более детальное рассмотрение фермента, учитывающее наличие в его молекуле большого числа полярных групп, обладающих ограниченной подвижностью. В этих условиях в ходе процесса должен осуществляться перенос заряда в положения, оптимальные для заданной конфигурации диполей. Тем самым реализуется определенная предорганизация среды, способствующая повышению скорости ферментативных реакций и благоприятствующая эстафетному переносу зарядов на дальние расстояния. Рассмотрено также одновременное прохождение двух реакций переноса заряда. При благоприятных геометрических условиях возможно сильное сопряжение двух процессов, в частности, протекание эндергонической реакции за счет экзергонической.

Теория Блюменфельда и Чернавского, основанная на рассмотрении ЭКВ, существенно отлична от модельных представлений, используемых в феноменологической теории Митчелла. Представления об ЭКВ (или ЭКП) имеют более реальные и глубокие физические основания. Переход от этих представлений к феноменологическому, общему описанию и его согласование с положениями теории Митчелла, подтвержденными опытом, по видимому, окажутся возможными в дальнейшем. Для этого необходимы не грубые оценки и качественные гипотезы типа предложенных в работах [26, 73, 74, 90], но подлинная количественная теория конформона (или нелинейного полярона). Такая теория пока не создана. Ее построение связано с исследованиями конкретных процессов, учитывающими детали поведения электронно-конформационной системы. Эти детали не могут быть получены из умозрительной картины (см. [26]), но лишь из экс-

периментальных данных, которых пока недостаточно. Тем самым сейчас нет еще возможности строить атомно-молекулярную теорию ЦПЭ в целом. Следует начать с рассмотрения отдельных звеньев процесса, с изучения поведения отдельных ферментов — переносчиков электронов.

§ 6.7. ЦИТОХРОМ *c*

Были проведены рентгеноструктурные исследования окисленной и восстановленной формы цитохрома *c* [98—100].

Среди участников ЦПЭ в митохондриях именно цит *c* наиболее доступен для изучения переносчиков электронов. Этот белок можно выделить в чистой форме и закристаллизовать. Остальные компоненты удается пока выделить лишь в виде мультиферментных комплексов: цитохромы *b* и *c*₁ как комплекс цитохромредуктазы и цитохромы *a* и *a*₃ как цитохромоксидазу. Редуктаза снабжает цит *c* электронами, оксидаза отбирает их у цит *c*.

Задолго до рентгенографических исследований было проведено изучение первичной структуры цит *c* из более чем 40 различных организмов, начиная с низших растений и кончая обезьянами и человеком (см. [3], § 2.5, [10]). Результаты этих работ очень существенны и в биологическом, и в биофизическом аспектах.

Молекулы цит *c* позвоночных содержат 104 аминокислотных остатка, насекомых — 107, низших растений — 107—109, высших растений — 111 (в одном случае 110). Последовательности остатков хорошо отражают биологическую эволюцию. Так, первичные структуры цит *c* человека и шимпанзе тождественны, отличаясь от структуры цит *c* обезьяны резуса только одной заменой из 104 остатков — у резуса на 102-м месте фигурирует Ала, вместо Тре. Цит *c* гремучей змеи отличается от цит *c* пекарских дрожжей добавлением 5 остатков с N-конца, удалением последнего остатка с C-конца и 40 заменами, а от цит *c* человека — 12 остатками. Примечательно, что большинство замещений во всех исследованных цит *c* консервативно в том смысле, что мутационная замена сохраняет характер остатка. Можно разбить аминокислотные остатки на 6 классов: гидрофобные ароматические (Фен, Трп, Тир), гидрофобные алифатические (Иле, Лей, Мет, Вал), гидрофильные основные (Гис, Лиз, Арг, Лиз — СН₃), гидрофильные кислотные (Асп, Глу), амбивалентные, т. е. малые гидрофобные или незаряженные полярные (Ала, Асн, Цис, Про, Гли, Сер, Тре) и, наконец, остаток глицина Гли, не имеющий боковой цепи. Оказывается, что эволюционные изменения цит *c* во всей живой природе от низших растений до человека сводятся, как правило, к замещениям внутри одного класса, и лишь в