

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*<sub>1</sub> как комплекс цитохромредуктазы и цитохромы *a* и *a*<sub>3</sub> 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 — СН<sub>3</sub>), 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

малом числе случаев к изменению класса остатка. Это указывает на далеко идущее сходство пространственной структуры всех цит *c*.

В ходе эволюции клетки перешли от анаэробных процессов к дыханию как источнику энергии. Именно на этой стадии, реализовавшейся примерно 1,2 миллиарда лет назад, возникли цитохромы. Это весьма древние белки, функциональная структура которых очень точно стабилизирована естественным отбором, о чем свидетельствует то обстоятельство, что цитохромы *c*, выделенные из любого эукариота — растения, животного или микроорганизма, реагируют *in vitro* с цитохромоксидазой любого другого вида [101].

Сходство структуры всех цитохромов *c* выражается не только в постоянстве расположения 6 классов остатков. Некоторые участки цепи вообще не варьируют. 35 из 104 положений заняты одними и теми же остатками в цит *c* всех изученных видов, включая длинную последовательность от 70-го до 80-го остатка:

— Асн — Про — Лиз — Лиз — Тир — Иле — Про — Гли —  
— Тре — Лиз — Мет —

35 инвариантных мест заняты 15 различными остатками. Другие 23 места заняты только одним или двумя различными, но весьма сходными остатками. В 17 местах возможны лишь замены в пределах трех остатков на каждом месте. С другой стороны, имеются немногие места, для которых оказываются допустимыми самые различные замены; сюда относится, например, остаток № 89 [101].

Эти свойства первичной структуры всех цитохромов *c* показывают, что пространственное строение фермента, ответственное в конечном счете за его биологическую функциональность, фиксировано достаточно строго. Мутационные нарушения первичной структуры, приводящие к сколько-нибудь существенным изменениям строения глобулы, элиминируются естественным отбором, будучи летальными. В этом смысле цит *c* фиксирован точнее, чем гемоглобин, не говоря уже о фибриллярных белках, но менее строго, чем гистоны (см. стр. 46).

Таковы важные выводы, которые следуют из изучения первичных структур 40 различных цитохромов *c*. Ответ на вопрос о смысле наблюдаемого консерватизма последовательности остатков дает рентгеноструктурный анализ.

На рис. 6.21 изображена структура окисленного цитохрома *c* лошади, установленная Дикерсоном и его сотрудниками [101]. Ее рассмотрение показывает, что группа гема соединена пятой и шестой валентностями атома железа с имидазольным кольцом Гис 18 и атомом серы Мет 80. Гем связан ковалентно также

с Цис 14 и Цис 17. Гем расположен в глубокой выемке, причем его окружение весьма консервативно в эволюции. Инвариантная последовательность 70—80 также является частью ближайшего окружения гема.

Структура цит *c* характеризуется, как обычно, расположением гидрофобных остатков внутри молекулы (см. [3], § 4.6, 4.7),

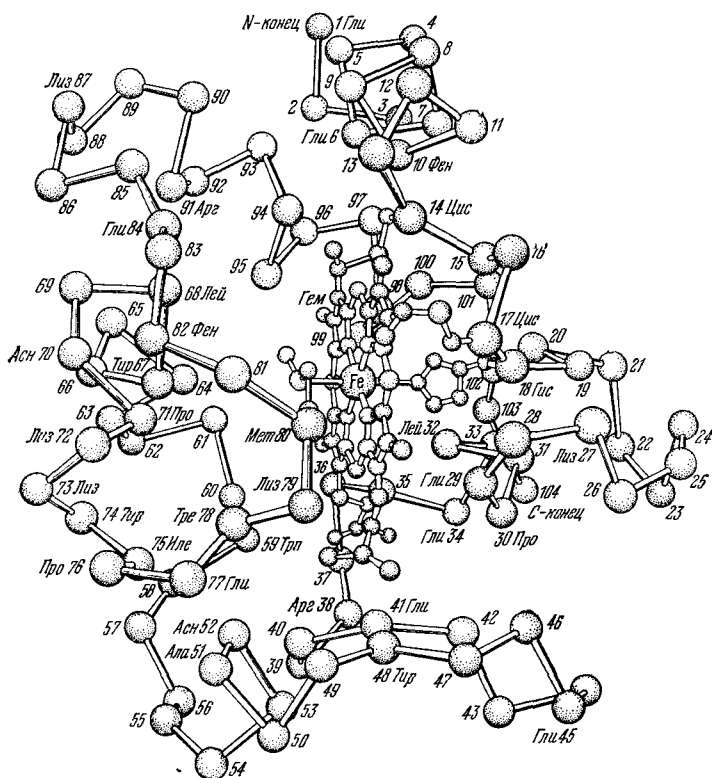


Рис. 6.21. Структура окисленного цитохрома *c* лошади.

тогда как заряженные группы, кислотные или основные, находятся на ее поверхности. Среди последних групп существенны остатки Лиз, число которых велико — оно равно 19. Очевидно, что определенное расположение зарядов на поверхности молекулы важно как для фиксированной структуры глобулы, так и для электростатических взаимодействий с оксидазой и редуктазой. Химические исследования показали, что взаимодействие цит *c* с оксидазой действительно имеет электростатический характер, причем положительные заряды расположены на цит *c*, а

отрицательные — на комплексе. Блокировка заряда Лиз 13, находящегося на правой части молекулы, сильно уменьшает это взаимодействие. Положительные заряды на другой стороне молекулы, по-видимому, взаимодействуют с редуктазой. В этой области находятся и три ароматических остатка: Фен 62, Тир 74 и Тир 67.

Таким образом, молекула цит *c* представляет собой упорядоченную систему, молекулярную машину, предназначенную для переноса электрона в результате определенного взаимодействия с оксидазой и редуктазой.

Пока нет прямой информации о том, как эта машина работает, что происходит при транспорте электронов с составляющими ее элементами. Из общих представлений об электронно-конформационных взаимодействиях (см. § 6.6) следует, что функциональность цит *c* определяется конформационными перестройками молекулы при переходе из окисленного в восстановленное состояние и обратно. Это подтверждается химическими исследованиями [102, 103], дающими, однако, ограниченную информацию.

В работе [100] проведено рентгенографическое исследование восстановленного цит *c* из сердца тунца с разрешением до 2,45 Å. Результаты этого исследования сопоставлены с данными для окисленного цит *c*. Таким образом, установлены структуры для двух конечных состояний окисления и восстановления цитохрома *c*.

Структура глобулы окисленного цит *c* тождественна для лошади и рыб — бонито и тунца. Кристаллы для всех цит *c* изоморфны, они относятся к пространственной группе  $P4_3$ .

Напротив, восстановленные цит *c* рыб бонито и тунца не изоморфны, их пространственные группы соответственно  $P2_12_12_1$  [101] и  $P2_12_12$  [100].

Сравнение полученных структур восстановленного и окисленного цитохромов *c* показывает, что в целом они похожи. В обоих случаях гем погружен в полость молекулы, его ковалентные связи с белком одни и те же. Сходно и расположение водородных связей.

Полость, в которой расположен гем, образована слева остатками 80—84, задняя стенка полости состоит из боковых цепей Иле 9 и Иле 85 и Лей 68 и 94. Иле 81 находится на краю полости. Вблизи гема расположено 7 «критических» ароматических остатков, сохраняющихся в эволюции. На дне полости находится пара Тир 48 — Фен/Тир 46, справа пара Фен 10 — Тир/Фен 94 и между гемом и поверхностью молекулы триплет Тир/Фен 74 — Трп 59 — Тир/Фен 67. Инвариантен также остаток Фен 82.

Майер и Пал изучали влияние последовательной модификации метионинов, тирозилов и триптофанилов N-бромсукцинимидом

дом (БСИ) при рН 4,1 [105, 106]. При отношении БСИ : белок до 3,3 : 1 Мет 65 и Трп 59 окисляются. При отношении 5 : 1 разрушается и Тир 74. При этих химических изменениях резко падает редуказная активность НАД-Н-цитохрома *c*, и ее падение пропорционально доле окисленного Трп 59. Одновременно происходит более медленное падение оксидазной активности цитохрома *c*. Если отношение БСИ : белок более 5 : 1, происходит модификация второго (не идентифицированного) Тир и окисление Мет 80, что приводит к потере оксидазной активности.

Эти результаты показывают, что Трп 59, по-видимому, участвует в восстановлении цит *c*. Исходя из этого и из предварительных данных рентгеноструктурного анализа, Дикерсон и Уинфилд предложили модельный механизм восстановления цит *c*, состоящий в следующем [101].

1. Один электрон каким-то способом переносится от редуказы на Тир 74 и вследствие перекрывания  $\pi$ -электронных облаков с Тир 74 на Трп 59. Если избыточный электрон попал на Тир 74, он спонтанно мигрирует на Трп, так как более протяженная кольцевая система делокализации Трп обладает более низкой антисвязывающей орбиталью, которую может занять электрон.

2. Другой электрон переносится с Тир 67 на гем, оставляя Тир 67 с нехваткой электрона. Здесь также электрон переходит с меньшей системы делокализации на большую, обладающую более низкими уровнями энергии. Этому переходу способствует электростатическое отталкивание, создаваемое избыточным отрицательным зарядом на Трп 59, хотя прямой переход электрона с Трп 59 на Тир 67 невозможен вследствие отсутствия перекрывания  $\pi$ -электронных облаков.

3. Происходит конформационное изменение, в результате которого кольца Трп 59 и Тир 67 устанавливаются параллельно и их  $\pi$ -облака перекрываются. Этому превращению способствует электростатическое притяжение обогащенного электроном Трп 59 и имеющего нехватку электрона Тир 67.

4. Электрон затем переносится с Трп 59 на Тир 67, обе группы становятся электрически нейтральными, и молекула остается в наблюдаемой конформации восстановленного цитохрома *c*. Последний электронный перенос облегчается малой диэлектрической проницаемостью внутренней гидрофобной молекулы.

Редфилд и Гупта [107] установили методом ЯМР, что в окисленном цитохроме *c* неспаренный спин гема проводит большую часть времени на пиррольном кольце, связанном с Цис 17, и на противоположном кольце по диагонали, погребенном в глубине кармана. Это последнее пиррольное кольцо находится в тесном контакте с Тир 67. Спаривание электронов в этой части порфиринового кольца должно способствовать переносу электрона с Тир 67 на гем.

Данные об участии ароматических соединений в восстановлении гема (окисленного гема) были получены путем изучения дисперсии магнитного вращения (ДМВ) (см. [3], § 7.3, 7.4) в модельных системах [108]. ДМВ гема в безводном пиридине практически совпадает с ДМВ феррокомплекса гема с пиридином. При добавлении воды ДМВ резко изменяется и становится сходной с ДМВ гема. По-видимому, в отсутствие воды возникают  $\pi$ -комплексы гема с пиридином. Такие комплексы гема с сопряженными молекулами в неполярных растворах хорошо изучены, причем показано, что это комплексы с переносом заряда [109]. Сходство ДМВ комплекса гемин — пиридин и комплекса гем — пиридин показывает, что пиридин служит донором электрона, переходящего на гемин. Из этих результатов следует, что в  $\pi$ -комплексе порфиринового кольца и ароматической молекулы (пиридина) происходит перенос электрона и для данного процесса существенна неполярность растворителя, стабилизирующего  $\pi$ -комплекс. Переход электрона должен, очевидно, происходить с понижением энергии, т. е. от менее протяженной  $\pi$ -электронной системы пиридина к более протяженной системе гема.

Укажем попутно, что исследование дисперсии магнитного вращения и магнитного кругового дихроизма (МКД) цитохромов очень перспективно для изучения процессов, происходящих в ЦПЭ. Соответствующие работы начаты лишь недавно. Кривые ДМВ и МКД, полученные для взвеси субмитохондриальных частиц, содержат ярко выраженные пики, отвечающие отдельным цитохромам [110]. Обычные спектры поглощения не дают такой ясной картины.

Модель Дикерсона — Уинфилда очень привлекательна — она непосредственно изображает электронно-конформационные взаимодействия. К сожалению, пришлось от этой модели отказаться (см. [117]). Последующие результаты рентгеноструктурного анализа не выявляют заметных различий между структурами окисленного и восстановленного цит *c*. Найден цит *c*, в котором Тир 74 заменен на Лей при полном сохранении активности фермента. Поэтому Дикерсон приходит к выводу о туннельном механизме переноса электрона в цитохроме.

В работах [94—97] предложена модельная квантовомеханическая теория ферментативного катализа и изложено ее применение к процессу восстановления — окисление цит *c*. Показано, в частности, значительное ускорение процесса при наличии промежуточных электронных состояний системы, взаимодействующих как с начальными, так и с конечными состояниями. Реакции переноса заряда, такие как  $\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$ , сильно ускоряются в присутствии третьей частицы, играющей роль «мостика» для

переноса электрона. Функция виртуального мостика рассмотрена в случае цит *c*, причем получены грубые оценки скорости процесса и зависимости ее от температуры, согласные с опытом.

Таким образом, имеются различные предположения о механизме переноса электрона в цитохроме *c*. Решение этой проблемы требует, с одной стороны, экспериментального исследования динамики окисления — восстановления, с другой — построения полной квантовомеханической теории процесса, учитывающей и электронные и конформационные степени свободы. Мы встречаемся здесь с очень большими трудностями.