

## § 6.6. Электронно-конформационные взаимодействия

Для понимания природы ЭКВ полезна наглядная модель взаимодействия электронов и атомных ядер — электроны в потенциальном ящике с бесконечно высокими подвижными стенками. Совокупность атомных ядер молекулы или ее функционального участка моделируется таким ящиком (рис. 6.10). Электроны помещаются в ящике,  $2n$  электронов занимают  $n$  уровней. Возможные значения энергии электронов внутри ящика легко вычисляются, исходя из представления о стоячих волнах де Бройля с узлами на стенках. Если ширина ящика  $L$ , то стоячие волны имеют длины волн

$$\lambda = 2L/n, \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (6.42)$$

Скорость электрона в ящике находится по соотношению де Бройля ( $m_e$  — масса электрона)

$$v = \frac{h}{m_e \lambda} = \frac{nh}{2m_e L}. \quad (6.43)$$

Внутри ящика энергия электрона равна его кинетической энергии

$$E = \frac{m_e v^2}{2} = \frac{n^2 h^2}{8m_e L^2}. \quad (6.44)$$

Электрон оказывает на стенку давление, сила которого равна

$$f = \left| \frac{dE}{dL} \right| = \frac{n^2 h^2}{4m_e L^3}. \quad (6.45)$$

В равновесии эти силы компенсированы внешними по отношению к ящику взаимодействиями. Изменение равновесия возникает либо вследствие возбуждения электронов в системе, либо вследствие добавления электронов. И то, и другое повышает давление. Не находящиеся более в равновесии стенки ящика перемещаются и переходят в новое равновесное положение на увеличенном расстоянии друг от друга  $L + \Delta L$ . Иными словами, работа перемещения ядер  $f \Delta L$  производится за счет уменьшения энергии электронов — согласно (6.44) электронная энергия убывает при увеличении  $L$ .

Если рассматривать не прямоугольную потенциальную яму, а параболическую, т. е. воспользоваться моделью электрона-гармонического осциллятора, то легко показать, как ЭКВ снижают активационный барьер (рис. 6.11). Расширение параболы под действием добавочной силы давления означает уменьшение коэффициента упругости для осциллятора. Точка пересечения со второй параболой, отвечающей конечному состоянию ФСК, перемещается и ее ордината, представляющая собой энергию активации, понижается. Можно показать, что для значительного

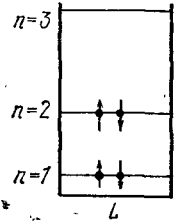


Рис. 6.10. Электроны в потенциальном ящике

уменьшения энергии активации, т. е. для большого ускорения реакции, достаточно малого к. п. д. системы.

Все это рассмотрение имеет лишь иллюстративное значение. Оно показывает, однако, что энергия электронного возбуждения

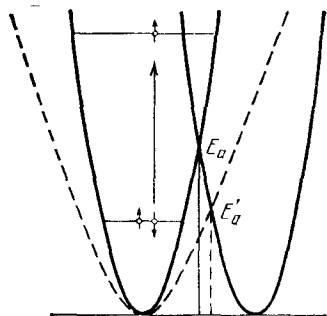


Рис. 6.11. Понижение активационного барьера в результате ЭКВ

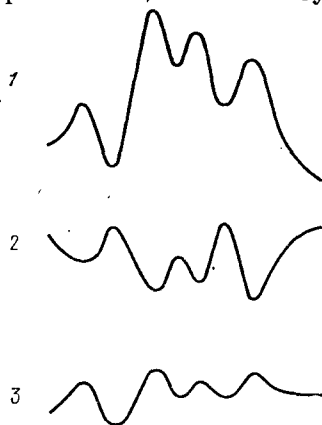


Рис. 6.12. Эффект дополнителности: 1 — профиль химической свободной энергии, 2 — профиль конформационной свободной энергии, 3 — суммарный профиль

трансформируется в работу перемещения атомных ядер, т. е. в конформационную энергию. Это влечет за собой ускорение реакции.

Ламри и Билтонен предположили, что профиль конформационной свободной энергии вдоль реакционной координаты допол-

Т а б л и ц а 6.2. Характерные амплитуды и времена тепловых флуктуаций элементов структуры белка при  $T = 300$  К

Процесс	Амплитуда, нм	Время, с
Валентные колебания	0,001—0,01	$10^{-12}$
Микроконформационные движения боковых групп	0,03—0,1	$10^{-8}$ — $10^{-9}$
Изгибные движения $\alpha$ -спиралей и $\beta$ -лент	0,2—0,7	$10^{-7}$ — $10^{-5}$

нителен к профилю химической (электронной) свободной энергии (рис. 6.12). В результате в суммарном профиле активационные барьеры снижены.

Теоретические подходы к ЭКВ развиты Догонадзе с сотрудниками и Шайтаном. Движения атомных ядер в белках характеризуются амплитудами и временами, представленными в табл. 6.2.

Концепция ЭКВ исходит из того, что изменение зарядового или электронного состояния системы приводит к изменению конформации, что в свою очередь индуцирует изменение электронного состояния. Амплитуды конформационных движений относительно велики. Для их описания не пригодна модель гармонических колебаний, применяемая в теории электронно-колебательных взаимодействий. Соответственно надо иметь дело с уравнением Ланжевена для осциллятора в системе с трением:

$$m\ddot{x} + b\dot{x} + m\omega_0^2x = F(t), \quad (6.46)$$

где  $m$  — эффективная масса сегмента,  $b$  — коэффициент трения,  $\omega_0$  — круговая частота осциллятора,  $F(t)$  — случайная сила, действующая на осциллятор со стороны окружающих частиц;  $F(t)$  обусловлена тепловыми флуктуациями среды. Частоты этих конформационных движений значительно меньше упомянутых на с. 164.

По-видимому, есть основания считать, что конформационное движение представляет собой ограниченную непрерывную диффузию в протяженной потенциальной яме малой глубины. Такое движение описывается уравнением Фоккера — Планка

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} D(x) \left[ \frac{\partial P(x, t)}{\partial x} + \frac{1}{\kappa T} P(x, t) \frac{\partial U(x)}{\partial x} \right]. \quad (6.47)$$

Здесь  $P(x, t)$  — плотность вероятности найти систему в момент времени  $t$  в конформации со значением координаты  $x$ ,  $D(x)$  — коэффициент конформационной диффузии,  $D(x) = \kappa T / b(x)$ ,  $b(x)$  — коэффициент трения,  $U(x)$  — конформационный потенциал. Температурная зависимость движения определяется зависимостью  $D(x)$  от энергии активации  $\epsilon(x)$

$$D(x) = D_0 e^{-\epsilon(x)/\kappa T}. \quad (6.48)$$

Сравнительно крупные конформационные движения в белковой глобуле возможны вследствие наличия или возникновения в ней свободных, «пустых» участков — «дырок». «Дырки» возникают в свободном объеме глобулы или проникают в глобулу из растворителя.

Таким образом, с точки зрения динамики белковая глобула есть сложная структурированная система, обладающая целым набором конформационных движений с различными временами. Задача физики состоит в построении теории диффузии в сильно структурированной среде. Такая теория необходима для понимания как проникновения субстрата к активному центру фермента, так и прохождения ионов через каналы биологических мембран (см. гл. 10, 11).

Перемещение любого лиганда, начиная с электрона, в макромолекуле вызывает изменение электронной плотности и, вслед за ним, конформационного состояния системы. Конформационную перестройку можно трактовать как возбуждение сильно затухающих длинноволновых фононов. Система «электронная плот-

ность лиганда плюс конформационная деформация» подобна полярону в физике твердого тела. Такая система названа *конформоном* (Волькенштейн). Конформон отличается от полярона сильной нелинейностью. Конформон не может перемещаться без диссипации энергии на большие расстояния. Быстрая диссипация определяется неоднородностью, аperiodичностью глобулы. Для реализации ферментативного процесса достаточно конформационной перестройки в пределах нескольких связей.

Движение к активному центру есть движение конформона. Оно происходит путем конформационного раскрытия некоторой щели в глобуле, характеризуемой определенной микровязкостью. Структурное соответствие фермент — субстрат имеет динамический характер; количественной мерой соответствия может служить критическая энергия деформации щели, соответствующей размеру и форме молекулы субстрата. При значении модуля Юнга  $\epsilon \sim 10^{10}$  эрг/см<sup>3</sup> и длине краев щели 1 нм средняя амплитуда тепловых флуктуаций ширины щели составит  $\sim 0,07$  нм. Согласно этим оценкам скорость проникновения субстрата и образование ФСК составит  $10^5$ — $10^8$  с<sup>-1</sup>. Это не обязательно лимитирующая стадия ферментативного катализа.

Движение конформона описывается уравнением (6.47) (Шайтан и Рубин).

Дальнейшее рассмотрение ЭКВ и неразрывно связанной с ЭКВ концепции релаксационных конформационных переходов (Блюменфельд) проведено в § 13.4 в связи с переносом электрона в процессах окислительного фосфорилирования.

Конечно, подлинная теория ЭКВ и ферментативного катализа в целом требует последовательного применения методов квантовой механики и квантовой химии. Ввиду большой сложности систем последовательные расчеты здесь пока невозможны. Реализуются, однако, приближенные оценки, основанные на качественных идеях квантовой химии (см. § 6.9).

Наряду с изучением ферментативного катализа экспериментальную информацию об ЭКВ могут дать исследование изменений химических (электронных) свойств биополимера, вызванных изменением лиганда или кофактора, и наблюдение возникающих при этом изменений конформационных свойств макромолекулы как целого. Такое исследование было проведено на системах аспаратаминотрансфераза (ААТ) — лиганд (кофактор). Изучалась денатурация в растворе мочевины апофермента, нормального холофермента и ряда комплексов апофермента с различными химическими модификациями кофермента. Изомеры денатурации оказались сильно зависящими от природы кофермента. Это означает, что электронные изменения в активном центре сильно влияют на конформационные свойства белка как целого. Количественный анализ полученных результатов и сопоставление ферментативного процесса, катализируемого ААТ, с реакцией в конгруэнтной модельной системе показали, что в ферментативной системе происходит выравнивание энергии

ческих уровней различных промежуточных форм и понижение активационных барьеров. В этом и проявляется комплементарность профилей химической (электронной) и конформационной свободных энергий (с. 196). Комплементарность определяется ЭКВ.

К проблеме ЭКВ эффективно применяются качественные методы квантовой химии, позволяющие наглядно представить электронную оболочку субстрата, находящегося под возмущающим действием групп активного центра. В физике ферментов сейчас особенно существенны обоснованные качественные модели, позволяющие понять смысл наблюдаемых явлений и оценить порядки величин характерных параметров.

### § 6.7. Кооперативные свойства ферментов

Стационарная кинетика ферментативных реакций зачастую отличается от кинетики Михаэлиса — Ментен (с. 178). На кривой зависимости скорости реакции  $v$  от концентрации субстрата  $S$  или (и) концентрации модификатора наблюдаются перегибы, максимумы, плато. На рис. 6.13 для примера показана кривая

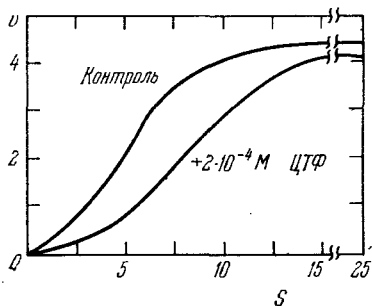


Рис. 6.13. Кривые  $v(S)$  для аспарат-транскарамиллазы. По оси абсцисс — концентрация аспартата в  $10^{-3}$  моль/л

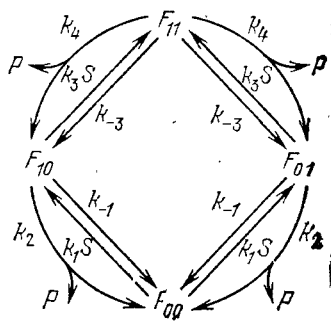


Рис. 6.14. Схема реакции с ферментом, состоящим из двух тождественных субъединиц

$v(S)$  для аспарат-транскарамиллазы ( $S$  — аспарат) в отсутствие и в присутствии модификатора — ЦТФ. В первом случае кривая имеет S-образную, а не гиперболическую форму.

Как правило, эти особенности объясняются наличием у фермента четвертичной структуры и взаимодействием субъединиц. Тем самым, поведение фермента кооперативно — средство к субстрату и каталитическая активность данной субъединицы (промера) зависят от того, в каких состояниях находятся остальные субъединицы — связали они субстрат или нет.

Рассмотрим простую модель молекулы фермента, состоящей из двух взаимодействующих тождественных субъединиц. Каждая субъединица имеет активный центр. Схема стационарного