

Независимо от этих исследований значение хемиосмотической теории велико. Она послужила мощным стимулом для глубокого изучения биоэнергетики сопрягающих мембран и предложила объяснение ряда фактов, относящихся к биоэнергетике и фотобиологии (см. § 14.3, 14.4, 14.8).

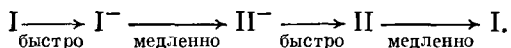
§ 13.4. Электронно-конформационные взаимодействия

Перемещение электронов в молекулярных системах всегда сопровождается перемещением атомных ядер. Как мы видели (гл. 6), в биополимерных системах реализуются электронно-конформационные взаимодействия (ЭКВ). Движение электрона и плотности зарядов в биополимерной системе, в частности, в мембране, сопряженное с конформационными движениями, может трактоваться как перемещение квазичастицы — *конформона* (с. 198). Есть весьма веские основания рассматривать окислительное фосфорилирование в ЦПЭ, исходя из этих представлений.

Грин и Джи (1972) предложили электромеханохимическую модель структуры и функции митохондрий. Элементарные частицы митохондрий (ЭЧМ) предполагаются существующими в основном неэнергизованном и в возбужденном энергизованном состояниях. Свободная энергия данного состояния складывается из химической, электрической и механической энергий. Взаимное превращение этих вкладов определяется ЭКВ. Конкретная модель Грина и Джи имеет, однако, гипотетический характер.

В работах Блюменфельда и сотрудников были установлены конформационные превращения в мембранах митохондрий (с помощью спектров ЭПР спин-меченых мембран, с помощью спектров люминесценции и т. д.). Доказана высокая кооперативность этих превращений и наличие термических структурных переходов в СМЧ.

Блюменфельд (1972) выдвинул гипотезу *релаксационных конформационных переходов* в митохондриальных мембранах. Допустим, что элементарный акт состоит в присоединении электрона к активному центру (скажем, к группе гема цитохрома). Нейтральной форме макромолекулы соответствует равновесная конформация I, заряженной (восстановленной) — другая конформация — II. Перенос электрона происходит много быстрее конформационного изменения. Следовательно, при протекании элементарного акта образуется неравновесное конформационное состояние — электрон перешел, но конформация не успела измениться. Затем происходит медленная релаксация к состоянию II. Весь переход можно представить схемой (минус обозначает электрон):



Энергия, выделяемая в элементарном акте, запасается в форме конформационной энергии в течение времени релаксации. За

время релаксации конформационная энергия трансформируется в химическую, т. е. электронную.

Эта картина полностью согласуется с концепциями электронно-конформационных взаимодействий (ЭКВ) и конформона. Применительно к ЦПЭ можно предположить, что в пункте сопряжения создается лабильный комплекс между переносчиком и некоторой группой в активном центре фермента сопряжения, роль которой, вероятно, играет аденин связанного АДФ. При релаксации $I^- \rightarrow II^-$ в какой-то момент энергетический уровень, на котором находится электрон, понижается до акцепторного уровня аденина. Эти два уровня разделены барьером, по возможен подбарьерный *туннельный переход* электрона на аденин. Увеличение электронной плотности на аденине сопровождается резким повышением основности аминогруппы. Если в активном центре АДФ-синтетазы имеется электрофильная группа (например, карбоксил), то аденин реагирует с ней, образуя амидную связь. В следующий момент релаксации уровень переносчика опускается ниже уровня аденина и электронная плотность переходит с аденина обратно на редокс-группу того же или следующего переносчика электрона в ЦПЭ.

Блюменфельд и Чернавский (1973) обобщили эту модель применительно к любым ферментативным реакциям. Формулируется постулат, согласно которому конформационное изменение субстратферментного 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. Элементарный акт ферментативной реакции заключается в конформационном изменении макромолекулы (фермент-субстратного комплекса, ФСК), и скорость превращения субстрат — продукт определяется скоростью этого конформационного изменения. Можно представить каталитический разрыв связи А — В субстрата последовательностью четырех стадий:



Здесь 1 — быстрая стадия образования ФСК, 2 — медленная релаксация фермента E в новую конформацию \tilde{E} , 3 — быстрый отрыв продукта, 4 — медленный переход $\tilde{E} \rightarrow E$. На всех стадиях происходит изменение свободной энергии.

На основе теории релаксационных конформационных переходов Блюменфельд в последние годы провел экспериментальные исследования синтеза АДФ в биологических мембранах — как в митохондриях, так и в тилакоидах (см. гл. 14). Показано, что АДФ синтезируется из АДФ и фосфата при скачкообразном повышении рН среды от 5 до 9. Это можно трактовать не как результат создания трансмембранного градиента рН, а как следствие возникновения неравновесных состояний АДФ-азы и других белков в цепях электронного транспорта и/или целой тилакоидной мембраны благодаря диссоциации определенных кислот-

ных групп. Хемисмотическая теория приводит к синтезу АТФ при понижении рН. В ходе релаксации неравновесного состояния фермента реализуется энергоакцепторная стадия синтеза АТФ (например освобождение связанного АТФ, образовавшегося без затраты энергии из АДФ и Ф_n). Не успевшая релаксировать молекула фермента служит первичным макроэргом. Число молекул АТФ, образующихся за счет скачка рН, составляет 2—5 за один скачок на одну цепь электронного транспорта. Для митохондрий время релаксации $\tau_{1/2}$, т. е. время, в течение которого выход АТФ снижается вдвое, составляет при комнатной температуре 10 с, т. е. релаксация достаточно медленна. Синтез АТФ в результате скачка рН дополнителен к таковому при нормальном окислительном фосфорилировании.

Таким образом, релаксационная теория, неотделимая, очевидно, от теории ЭКВ, получила весьма существенные экспериментальные подтверждения.

Для построения кинетической теории нужно определить относительную роль двух механизмов — надбарьерного перехода по Эйрингу (см. § 6.1) и туннельного эффекта. Второй эффект при переносе электрона в биологической системе был впервые рассмотрен Чансом (1968).

Константа скорости активационного перехода равна (с. 175)

$$k_1 = \frac{\kappa T}{h} \exp\left(-\frac{G^\ddagger}{\kappa T}\right). \quad (13.16)$$

Число актов туннельного перехода в единицу времени равно

$$k_2 = \nu_0 \exp\left[-\frac{4\pi L}{h} \sqrt{2m_e(U-E)}\right], \quad (13.17)$$

где ν_0 — частота «колебаний» электрона, величина порядка 10^{17} с^{-1} , L — ширина барьера, U — его высота, E — уровень энергии электрона, m_e — его

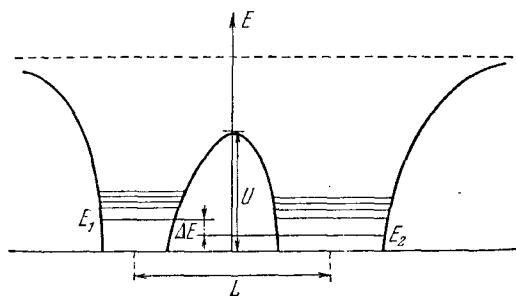


Рис. 13.11. Две несимметричные потенциальные ямы, разделенные барьером

масса. На рис. 13.11 показана схема потенциальных ям двух соседних звеньев ЦПЭ.

Полная скорость переноса определяется суммой k_1 и k_2 . При высоких температурах преобладает первый член, при низких — второй. Согласно имеющимся оценкам $L \approx 1-2$ нм, $U \approx G^\ddagger \approx 1-2$ эВ. При этих значениях

$k_2 \gg k_1$. Отсюда следует, что переходы должны быть практически не зависимы от температуры, что противоречит опыту. Это противоречие можно объяснить.

Туннелирование электрона зависит от соотношения между разностью электронных уровней ΔE (см. рис. 13.11) и величиной резонансного расщепления:

$$\Delta E_r = E \exp \left[-\frac{2\pi L}{\hbar} \sqrt{2m_e(U-E)} \right]. \quad (13.18)$$

Если $\Delta E \gg \Delta E_r$, то туннельного перехода не будет. При $\Delta E \leq \Delta E_r$ переход происходит за время $\tau_r = \hbar (\Delta E_r)^{-1}$. При $L = 2$ нм, $U - E = 2$ эВ $\Delta E_r \approx 10^{-6}$ эВ. Значения ΔE в ЦПЭ должны быть много больше, и такой идеальный переход невозможен. Туннелирование, однако, происходит вследствие диссипации энергии, обеспечивающей сближение электронных уровней и определяемой ЭКВ. Чернавская и Чернавский рассматривают потенциальные ямы, защищенные от ионной среды неполярной оболочкой. Допустим, что существенна лишь одна колебательная степень свободы. Возможно возбуждение колебательного кванта E_k , причем

$$\Delta E = \hbar \omega_k \equiv E_k, \quad (13.19)$$

или увеличение энергии уже имеющегося кванта

$$\Delta E = \Delta E_k \equiv \hbar \Delta \omega_k. \quad (13.20)$$

Значения E_k и ΔE_k порядка 0,1 эВ. Вероятность туннельного перехода при условии (13.19) выражается формулой

$$w = \frac{2E^2}{\hbar} \rho(\Delta E) g^2 \exp \left[-\frac{4\pi L}{\hbar} \sqrt{2m_e(U-E)} \right]. \quad (13.21)$$

Здесь $\rho(\Delta E)$ — плотность уровней конечного состояния, $g^2 = 10^{-2} - 10^{-4}$ — константа, характеризующая «силу связи». В случае (13.20)

$$w = \frac{E^2}{\pi \hbar} \rho(\Delta E - \Delta E_k) \exp \left(-\frac{\hbar \omega_k}{kT} \right) \exp \left[-\frac{2L}{\hbar} \sqrt{2m_e(U-E)} \right]. \quad (13.22)$$

Величина w зависит от температуры.

В следующем параграфе кратко обсуждается кинетика окисления — восстановления цитохрома *c*.

В биополимерных системах возникает конформон (с. 198). Далее приводится грубая оценка его энергии и размеров.

В среде, содержащей равномерно распределенные ионы массы M , взаимодействующие по закону Кулона, имеем (согласно теореме вириала)

$$\frac{1}{2} M v^2 \approx e^2 / r. \quad (13.23)$$

Скорости v и расстоянию r соответствует круговая частота колебаний

$$\omega_k = \frac{v}{r} = \sqrt{\frac{8\pi e^2}{3M} n}, \quad (13.24)$$

где $n = \left(\frac{4\pi}{3} r^3 \right)^{-1}$ — число ионов в единице объема. Взаимодействуя с колебаниями (конформационными переходами) ионов, электрон приобретает энергию $\hbar \omega_k$ и импульс

$$p = \sqrt{2m_e \hbar \omega_k} \equiv \sqrt[4]{4m_e^2 \hbar^2 \omega_k^2},$$

где m_e — масса электрона. Согласно соотношению неопределенностей соот-

ветствующий размер электронного облака равен

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

Вводя боровский радиус $a_0 = \hbar/m_e e^2 \approx 0,05$ нм, получаем

$$q = \sqrt[4]{\frac{3}{32\pi}} \sqrt[4]{\frac{M a_0}{m_e n}} = a_0 \sqrt[4]{\frac{3}{32\pi}} \sqrt[4]{\frac{M}{m_e n a_0^3}}. \quad (13.25)$$

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

$$E_p = e^2/(eq), \quad (13.26)$$

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

$$N = E_p/(\hbar \omega_k). \quad (13.27)$$

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

В кинетике электроно-конформационных переходов можно выделить четыре процесса: 1) колебания электрона внутри ямы с частотами порядка 10^{17} с⁻¹; 2) колебания атомов с частотами порядка $kT/\hbar \sim 10^{13}$ с⁻¹ и с амплитудами $10^{-2} - 10^{-3}$ нм; частоты упругих колебаний белковой глобулы порядка $10^{12} - 10^{11}$ с⁻¹; 3) туннелирование электрона, $\tau \sim 10^{-7} - 10^{-6}$ с, расстояния 1—2 нм; 4) медленные конформационные переходы в макромолекуле, $\tau > 10^{-3}$ с.

Таким образом, можно не рассматривать быстрые процессы 1)—3) и усреднять по времени положения электронов и атомов. Именно такая процедура применена в описанной выше релаксационной модели. Молекула, получив электрон, оказывается в неравновесной конформации, медленно релаксирующей к равновесию. Для туннельного эффекта требуется поэтому не совпадение электронных уровней восстановленного донора и акцептора, но наличие надлежащим образом расположенного виртуального электронного уровня акцептора в окислительной конформации. Энергия, выделявшаяся при туннелировании, диссипирует, но энергия, медленно выделяемая при конформационной релаксации, может быть конвертирована в энергию макроэрга. Будучи связан с условиями резонанса электронных уровней энергии, туннельный эффект подвержен влиянию мембранного потенциала. Следовательно, возможен регуляторный процесс — мембранный потенциал, создаваемый активным транспортом ионов, зависит от скорости переноса электронов, в свою очередь регулируемой мембранным потенциалом. Реализуется обратная связь,

обеспечивающая автоматическое поддержание системы в условиях, близких к резонансным.

Конформационные события несомненно играют важную роль в сопрягающих мембранах. Следует думать, что наряду с электронно-конформационными реализуются и протонно-конформационные взаимодействия. Протоны также могут туннелировать — в отличие от более тяжелых атомов и групп.

§ 13.5. Цитохром с

Среди электронных переносчиков лучше всего изучен цитохром с — универсальный гемсодержащий белок, обязательный участник процессов дыхания любых организмов, начиная с дрожжевых клеток и кончая человеком.

Установлены первичные структуры цитохрома с многих десятков организмов. Цитохромы с позвоночных содержат 104 аминокислотных остатка, насекомых — 107, низших растений — 107—109, высших — 111. Последовательность остатков хорошо отражает биологическую эволюцию (с. 35, см. также § 17.9). Эволюционные изменения цитохрома с во всей живой природе сводятся, как правило, к замещениям остатков внутри одного класса (гидрофобные ароматические, гидрофобные алифатические, гидрофильные основные, гидрофильные кислотные, амбивалентные). Это указывает на далеко идущее сходство пространственной структуры всех цитохромов с.

Цитохромы с — древние белки. В ходе эволюции клетки перешли от анаэробных процессов к дыханию. Именно на этой стадии, примерно $1,2 \cdot 10^9$ лет назад, возникли цитохромы с.

Стабильность пространственной структуры цитохрома с, выработанная в ходе эволюции, доказывается, в частности, тем, что цитохромы с, выделенные из любого эукариота, реагируют *in vitro* с цитохромоксидазой любого другого вида. Структура цитохрома с показана на рис. 13.12. 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. Ближайшее окружение гема — последовательность остатков 70—80 — инвариантно. Эти остатки одинаковы почти у всех видов: -Асп-Про-Лиз-Лиз-Тир-Иле-Про-Гли-Тре-Лиз-Мет-.

Естественно думать, что конформация цитохрома с изменяется при переходах $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+}$. Первоначальные результаты рентгеноструктурного анализа (Дикерсон, Уинфилд) показывали, что при восстановлении цитохрома с изменяется положение нескольких ароматических остатков. Эта прямая демонстрация ЭКВ выглядела очень привлекательно. К сожалению, эти результаты не подтвердились. Лишь недавно обнаружены малые различия в пространственном строении окисленного и восстановленного цитохрома с, сводящиеся к изменению положения молекулы воды, примыкающей к гему.