

УДК 541.138 : 547

Белки как природные наноструктуры. Роль квантовых и динамических факторов в дистанционном переносе электрона в белках

А. И. Котельников

АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ КОТЕЛЬНИКОВ — доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией химической физики ферментативного катализа Института проблем химической физики РАН (ИПХФ РАН). Область научных интересов: химическая физика металлоферментов, перенос электрона в белках, спектральные методы исследования белков и мембран.

142432 Черноголовка, Московская обл., ИПХФ РАН, тел. 096-522-1492, факс 096-515-5420, E-mail: kotel@icp.ac.ru

Введение

В течение последних десятилетий человечество вплотную подошло к осознанию исключительной важности понимания фундаментальных основ и использования в повседневной практике явлений, которые обусловлены наноразмерными эффектами. Упорядочивание атомных или молекулярных структур на расстояниях порядка нанометров создает принципиально новые эффекты как квантовой, так и механической природы. Во многом такое понимание приходит при детальном исследовании на молекулярном уровне функционирования биологических структур — белков, мембран, нуклеиновых кислот. Собственно говоря, любой живой организм, от простейших до самых высших, можно рассматривать как гигантскую высокоорганизованную наноструктуру или совокупность отдельных наноструктур. Изучение механизмов функционирования ферментов дает неоценимые сведения об основных принципах создания функционально важных высокоорганизованных молекулярных систем с характерными размерами 1–10 нм и более, подсказывает пути их целенаправленного конструирования. Важнейшей проблемой практического использования наноструктур является также организация их сборки. И здесь отлаженные эволюцией принципы самосборки, взаимной комплементарности биологических структур, хотя бы в перспективном плане, могут быть приняты на вооружение исследователями. Достигнутые в последние годы успехи генетических подходов не только в изучении структуры нуклеиновых кислот и белков, но и в направленном изменении их функциональных свойств ставят на повестку дня создание и эффективное производство на базе биологических макромолекул дешевых высокоорганизованных наноструктур с заранее заданными свойствами и функциями.

Биомакромолекулы как основа молекулярной электроники

Очевидно, что применение научных подходов направленного создания наноструктур, в том числе с ис-

пользованием принципов живой природы, может оказаться чрезвычайно полезным для создания высокоэффективных катализаторов, разнообразных высококачественных полимеров, мембранных структур с управляемой селективной проницаемостью, принципиально новых лекарственных средств. Однако в данной статье основное внимание уделено другой важнейшей области развития науки о наноструктурах — перспективным принципам нано- и молекулярной электроники, какими они видятся на примере детальных исследований закономерностей переноса электрона в высокоорганизованных белковых системах.

Р. Ф. Фейнман еще на рубеже 60-х годов прошлого столетия указывал на поразительные примеры микроскопической, сверхкомпактной записи информации в биологических системах и ставил вопрос об использовании принципов живой природы для создания совершенных компьютеров. Зародившаяся в 50-е годы интегральная электроника за истекшие десятилетия прошла огромный путь и достигла поразительных успехов. Однако именно стремительная миниатюризация микросхем позволяет предсказать близкий предел их совершенствования в рамках традиционных технологий. Линейные размеры современных электронных элементов соизмеримы с размером биологической клетки, они составляют в настоящее время порядка 0,15 мкм, что лишь в 20–100 раз больше, чем характерные размеры белков, элементов мембранных структур или ДНК. Дальнейшая миниатюризация с неизбежностью приводит к необходимости создания молекулярных электронных элементов, процесс конструирования и сборки которых, а также фундаментальные принципы их функционирования (передачи сигнала и обработки информации) коренным образом отличаются от принципов современной электроники. Если в традиционной полупроводниковой электронике процесс переноса и управления зарядом основан на коллективных взаимодействиях в кристалле, что обеспечивает его эффективность и однозначность, то в электронике, основанной на переносе заряда между отдельными

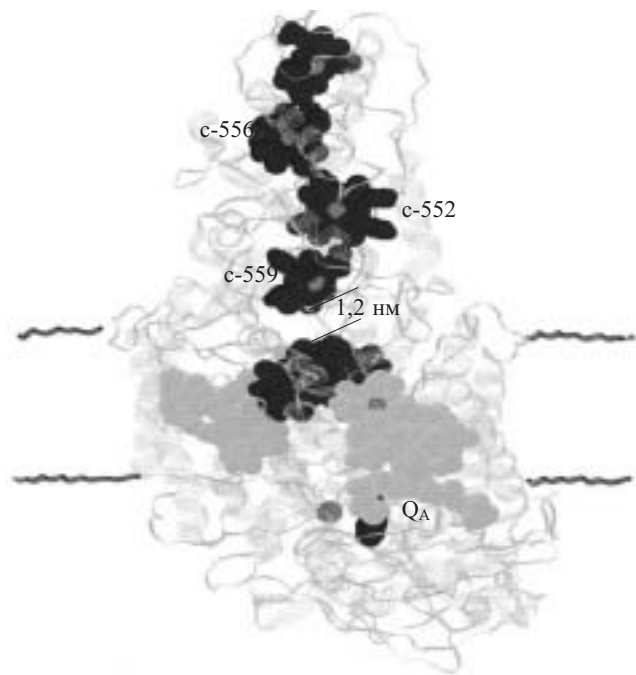


Рис. 1. Структура белкового комплекса реакционного центра с цитохромом из фотосинтетических бактерий *Rhodospseudomonas*.

Пояснения даны в тексте

молекулами или донорно-акцепторными центрами в высокоорганизованных молекулярных ансамблях, перенос электрона подчиняется обычным закономерностям окислительно-восстановительных реакций в конденсированной фазе. При типичных значениях разности потенциалов порядка долей электрон-вольта для каждой такой реакции при комнатной температуре трудно достичь соотношения скоростей прямой и обратной реакции более чем 10^3 – 10^4 , что совершенно недостаточно для устойчивой работы электронной схемы, состоящей из множества таких элементов. Согласно законам детального равновесия, при наличии тепловых флуктуаций обратная реакция всегда достаточно вероятна, что делает вероятность правильного срабатывания такого электронного элемента заметно отличной от единицы. Наблюдать быстрый и высокоэффективный направленный перенос электрона удается лишь в структуре реакционных центров — белковых комплексов, осуществляющих направленный трансмембранный перенос зарядов в процессе фотосинтеза (рис. 1).

Реакционный центр (РЦ) представляет собой белок, состоящий из трех полипептидных цепей и имеющий в своем составе ряд пигментов типа хлорофилла. Общая молекулярная масса белка более $135 \cdot 10^3$ дальтон и состоит он соответственно из более чем 10^4 атомов. При возбуждении квантом света димера бактериохлорофилла электрон переносится с его возбужденного уровня последовательно на мономер бактериохлорофилла, феофетин и первичный акцептор — хинон, оказываясь таким образом за время около 200 пс на противоположной стороне мембраны. Образовавшийся катион-радикал бактериохлорофилла P^+ восстанавливается электронами, локализованными на гемах цитохрома *c*, который в бактериях *Rhodospseudomonas* образует прочный комплекс

с глобулой реакционного центра. В результате с высоким квантовым выходом осуществляется трансмембранный перенос электронов с повышением их потенциала, который преобразуется в дальнейшем в химическую энергию.

В следующем разделе статьи приведен анализ закономерностей одной из реакций переноса электронов в структуре реакционных центров, на примере которого выявляются специфические особенности белковых макромолекул, созданных природой для направленного дистанционного переноса электронов.

Роль квантовых и динамических факторов в реакциях дистанционного переноса электронов в структуре реакционных центров

В последние годы достигнут значительный прогресс в количественном описании реакций дистанционного переноса электронов между металлсодержащими центрами в белках. Практически во всех публикациях эти реакции анализируются в рамках неадиабатического приближения теории внешнесферного переноса электрона [1, 2], согласно которому в условиях быстрой реорганизации матрицы ($V_{ab}^2 \ll \{\lambda h\nu / (4\pi)\}$) константу скорости переноса электрона k_{et}^{NA} можно представить в виде

$$k_{et}^{NA} = k_0^{NA} \exp\left(-\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda RT}\right) \quad (1)$$

$$k_0^{NA} = \frac{2\pi V_{ab}^2(r)}{h\sqrt{4\pi\lambda kT}} \quad (2)$$

где k_0^{NA} — предэкспоненциальный фактор, V_{ab} — интеграл перекрытия, характеризующего квантовый эффект перекрытия волновых функций донорного и акцепторного центров; ΔG — свободная энергия реакции; λ — энергия ядерной реорганизации; ν — частота ядерной реорганизации, обеспечивающая процесс диэлектрической релаксации; h — постоянная Планка; R — газовая постоянная; k — постоянная Больцмана. k_{et}^{NA} имеет экспоненциальную зависимость от расстояния переноса r и не зависит от частоты ν .

Применение неадиабатического приближения зависит от соотношения V_{ab} и ν , которое может широко варьироваться в белках. Существуют оценки, что для реакций переноса электронов в РЦ и других металлсодержащих белках на расстоянии 1,2–1,5 нм величина $V_{ab} = 10^{-1}$ – 10^{-2} см $^{-1}$ [3–5]. Если принять, что для таких реакций $\lambda = 1$ эВ, то условие неадиабатичности будет выполняться при $\nu \gg 10^7$ с $^{-1}$. С помощью различных физических методов показано, что для некоторых гем-белков при комнатной температуре $\nu = 10^6$ – 10^4 с $^{-1}$ [6–9]. Для таких реакций условие неадиабатичности не выполняется, и в первом приближении [10, 11] следует применять формулу

$$k_{et} = \frac{k_0^{NA}}{1 + (k_0^{NA}/A)\tau} \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (3)$$

где $\tau = 1/\nu$ — время диэлектрической релаксации; $E_a = \frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda}$; $A = \frac{\epsilon_s}{\epsilon_\infty} \left(\frac{\lambda}{16\pi kT}\right)^{\frac{1}{2}}$; ϵ_s и ϵ_∞ — значения диэлектрической проницаемости при статических

измерениях и в пределе высоких частот. Если $(k_0^{NA}/A)\tau \gg 1$, то выполняется адиабатический предел, при котором константа скорости переноса электрона выражается в виде

$$k_{et}^{AD} = \nu A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (4)$$

Как видно из уравнения (4), в адиабатическом приближении k_{et}^{AD} определяется молекулярной динамикой среды, задаваемой параметром ν , не зависит от интеграла перекрытия V_{ab} и, соответственно, от расстояния переноса r .

Различия в функциональной зависимости k_{et} от r и ν между неадиабатическим и адиабатическим приближениями очень важны для анализа реакций переноса электронов в белках, потому что как r , так и ν определяются пространственной и динамической организацией макромолекул и могут значительно варьироваться от белка к белку. Учет этого обстоятельства может быть определяющим для корректного количественного анализа экспериментальных результатов.

На ранних стадиях анализа реакций переноса электронов в белках были обнаружены экспериментально наблюдаемые зависимости $\lg k_{et}$ от расстояния переноса (туннелирования r), что говорило в пользу неадиабатического приближения. Различные модели дают достаточно хорошие линейные корреляции между экспериментально оцениваемыми значениями $\lg k_0^{NA}$ и параметрами, соответствующими эффективному расстоянию переноса электронов при анализе реакций переноса электронов в отдельных белках (РЦ, миоглобин, цитохром *c*, азурин) или с белка на электрод вдоль линейных полимерных молекул [3, 4, 12–18]. В то же время при сопоставлении

зависимости скорости переноса электронов от расстояния переноса в различных белках все эти модели не дают удовлетворительного согласия. Более детальный анализ таких зависимостей дан в обзорах [19, 20]. Ряд экспериментальных данных указывает на существенную зависимость эффективности переноса электронов от динамики матрицы, что косвенно указывает на адиабатический характер наблюдаемых реакций [21–29].

В работах [30, 31] для описания температурных зависимостей реакций переноса электронов на расстояние 1,2 нм от восстановленного проксимального гема с-559 цитохрома к катион-радикалу димера бактериохлорофилла P^+ в структуре РЦ из *Rps. sulfoviridis* была использована комбинированная адиабатическо-неадиабатическая модель. При анализе принимали во внимание особенности молекулярной динамики белка, которые обусловлены наличием в структуре макромолекулы различных типов релаксационных процессов, обеспечивающих широкое распределение по временам релаксации.

Кинетические кривые изменения поглощения P^+ , описывающие реакцию переноса электронов от гема цитохрома с-559 на димер бактериохлорофилла в РЦ из *Rps. sulfoviridis*, имеют существенно неэкспоненциальный характер в широком диапазоне температур от 40 до 295 К; при этом они зависят от состояния восстановления двух других гемов цитохрома — с-556 и с-552. Примеры таких кинетических кривых при различных температурах и различных состояниях восстановления цитохрома приведены на рис. 2 и 3.

Уже упоминалось, что после возбуждения первичного донора Р (димера бактериохлорофилла) электрон переносится на первичный акцептор Q_A [32]. Затем может происходить восстановление P^+ за счет прямого переноса электрона с восстановленного проксимального гема с-559⁻ или путем обратного переноса электрона с Q_A^- согласно схеме, приведенной на рис. 4.

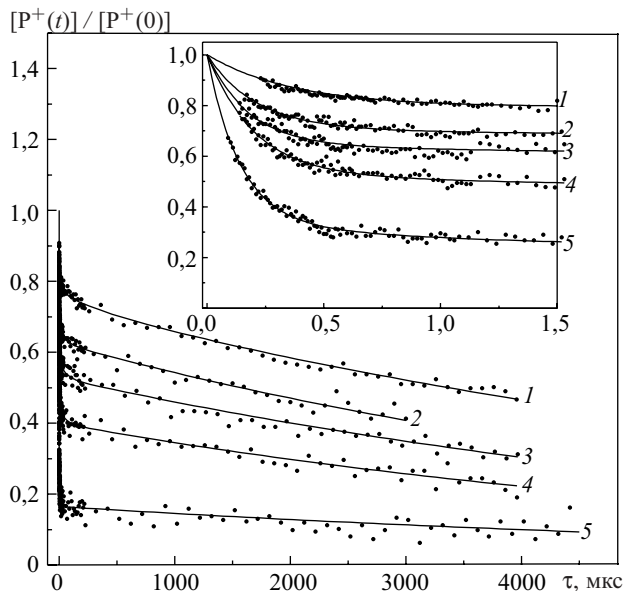


Рис. 2. Кинетика восстановления катион-радикала P^+ в РЦ из *Rps. sulfoviridis* при температурах 233 (1), 248 (2), 258 (3), 268 (4) и 294 К (5)

Цитохром в первом состоянии восстановления ($E_{1/2} = +360$ мВ относительно каломельного электрода; восстановлен гем с-559); точки — экспериментальные измерения; сплошные линии — компьютерный расчет в соответствии с предлагаемой моделью

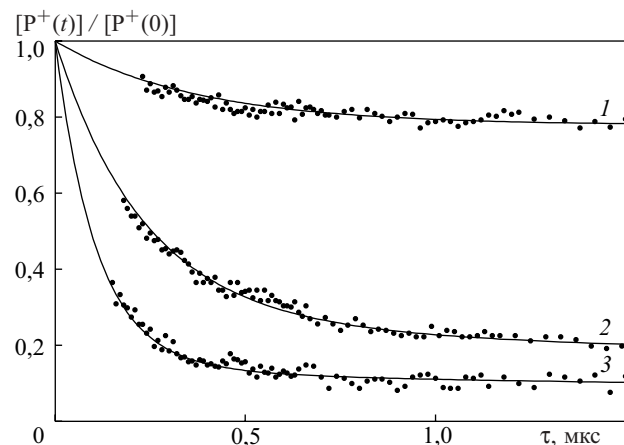


Рис. 3. Кинетика восстановления катион-радикала P^+ в РЦ из *Rps. sulfoviridis* при разных состояниях восстановления цитохрома во временном диапазоне 1,5 мкс:

1 — восстановлен гем с-559 ($E_{1/2} = +360$ мВ); 2 — восстановлены гемы с-559 и с-556 ($E_{1/2} = +250$ мВ); 3 — восстановлены гемы с-559, с-556 и с-552 ($E_{1/2} = +20$ мВ). Температура 219 К; точки — экспериментальные измерения; сплошные линии — компьютерный расчет в соответствии с предлагаемой моделью

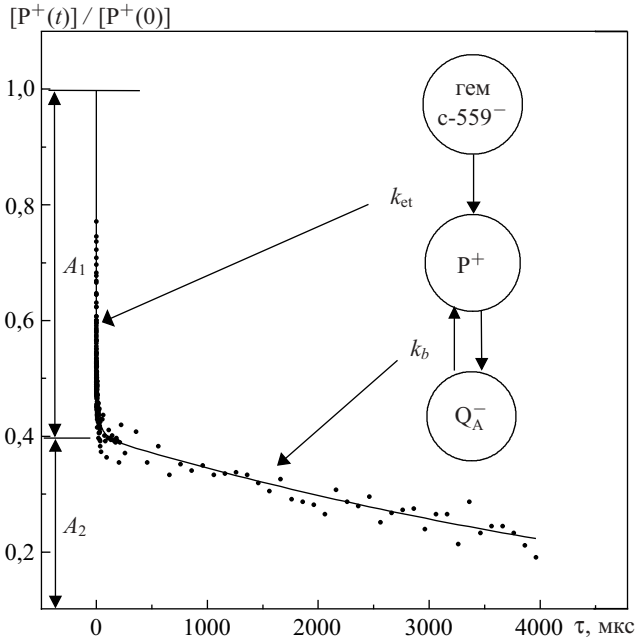


Рис. 4. Схема анализа кинетических кривых восстановления P⁺:

A₁ — амплитуда, соответствующая быстрой фазе восстановления P⁺ за счет переноса электрона с гема c-559⁻; A₂ — амплитуда, соответствующая медленной фазе восстановления за счет обратного переноса электрона с первичного акцептора — хинона Q_A⁻.

Если прямая реакция лежит в микросекундном диапазоне времен, то обратная реакция от Q_A⁻ к P⁺ значительно медленнее: k_b = (1–4)10² · с⁻¹ в диапазоне 100–295 К [33].

В связи с этим целесообразно отнести быструю неэкспоненциальную часть кривой к реакции c-559⁻ → P⁺, а медленную экспоненциальную — к процессу рекомбинации P⁺ ← Q_A⁻.

Анализ быстрой начальной фазы кинетики переноса электрона

Для описания неэкспоненциальных кинетик переноса электронов в РЦ во временном диапазоне 1–40 мкс использовалась комбинация моделей Рипса–Джертнера и Овчинниковой–Суми–Маркуса. Согласно модели Рипса–Джертнера [34], при описании кинетики переноса электрона принимается, что процесс диэлектрической релаксации матрицы осуществляется за счет диффузионной моды, спектр характеристических времен которой описывается с помощью распределения Кола–Девидсона

$$g(\tau) = \frac{\sin(\pi\beta)}{\pi\tau} \left(\frac{\tau}{\tau_0 - \tau} \right)^\beta \quad 0 < \tau < \tau_0 \quad (5)$$

$$g(\tau) = 0 \quad \tau > \tau_0$$

где 0 ≤ β ≤ 1 является параметром распределения Кола–Девидсона; τ₀ — характеристическое время релаксации, соответствующее максимальному значению наблюдаемых времен диэлектрической релаксации τ.

По аналогии с формализмом, приведенным в [34], функция F(t) = P⁺(t)/P⁺(0) может быть записана в виде

$$F(t) = A_1 \int_0^\infty g(\tau) \exp(-k_{et}(\tau)t) d\tau + A_2 \exp(-k_b t) \quad (6)$$

где k_{et}(τ) определяется выражением (3). В уравнении (6) первый интегральный член описывает быструю прямую реакцию c-559⁻ → P⁺, а второй экспоненциальный член — обратную реакцию P⁺ ← Q_A⁻; для коэффициентов A₁ и A₂ выполняется соотношение A₁ + A₂ = 1.

Для описания температурных зависимостей переноса электронов для различных состояний восстановления цитохрома в широком температурном интервале экспоненциальный член уравнения (6) модифицировали, как описано в работе [20]. Эти модификации основаны на модели Овчинниковой–Суми–Маркуса, которая принимает возможность диссипации энергии одновременно по двум степеням свободы: колебательной и диффузионной [35, 36]. На рис. 5 приведена поверхность свободной энергии для реакций такого типа. Если движение вдоль колебательной (q) и диффузионной (X₁) координат является быстрым, реакция идет по оптимальной, наиболее быстрой неадиабатической траектории 1 от точки В₁ к точке С с минимальной энергией активации E_a^{min} в точке S₁, представляющей переходное состояние реакции. Однако, если движение вдоль диффузионной координаты замедляется при понижении температуры и реакция переноса электрона вдоль диффузионной координаты становится формально адиабатической, то эффективный перенос электрона продолжает осуществляться благодаря возможности протекания реакции преимущественно вдоль колебательной координаты через другое переходное состояние S₂ с большей энергией активации. Такой сдвиг переходного состояния может быть описан феноменологически с помощью комбинации уравнений (1) и (3), описывающих реакцию переноса электрона вдоль колебательной и диффузионной координат, путем

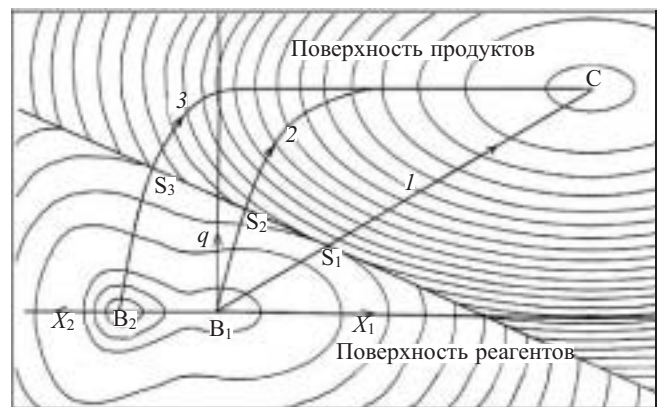


Рис. 5. Поверхность свободной энергии для реакции переноса электрона от гема c-559 цитохрома к катион-радикалу P⁺

Оси q и X₁ соответствуют колебательной и диффузионной координатам реакции, связанным с быстрой компонентой реакции переноса электрона; ось X₂ соответствует второй диффузионной координате, обеспечивающей переход белкового комплекса из состояния В₁ в состояние В₂. Пояснения даны в тексте

введения τ -зависимых предэкспоненциального множителя $k_0(\tau)$, изменения свободной энергии $\Delta G(\tau)$ и энергии реорганизации $\lambda(\tau)$ согласно формулам

$$k_0(\tau) = k_0^{\text{NA}} [P_k + (1 - P_k)\varphi(\tau)] \quad (7)$$

$$\Delta G(\tau) = \Delta G [P_{\Delta G} + (1 - P_{\Delta G})\varphi(\tau)] \quad (8)$$

$$\lambda(\tau) = \lambda [P_\lambda + (1 - P_\lambda)\varphi(\tau)] \quad (9)$$

где параметры P_k , $P_{\Delta G}$ и P_λ представляют вклад температурно-независимой колебательной координаты; второй член с функцией $\varphi(\tau)$ описывает вклад диффузионной координаты. Функция $\varphi(\tau)$ представляется в виде

$$\varphi(\tau) = \frac{1}{1 + (k_0^{\text{NA}} / A) \tau} \quad (10)$$

и, согласно уравнению (3), служит для переключения между высокотемпературным (неадиабатическим) и низкотемпературным (адиабатическим) пределами; соответственно $\varphi(\tau) \sim 1$ при комнатной температуре и $\varphi(\tau) \ll 1$ при низких температурах.

Энергия активации для константы $k_{\text{et}}(\tau)$ при написании интегрального уравнения (6) определяется по аналогии с уравнением (3) через τ -зависимые энергию реорганизации и свободную энергию реакции согласно уравнениям (8) и (9). Необходимо отметить, что согласно приближению Овчинниковой—Суми—Маркуса, числитель в экспоненциальной части уравнения (3) содержит полную энергию реорганизации λ , соответствующую высокотемпературному пределу уравнения (9) с $\varphi(\tau) = 1$. В низкотемпературном пределе

$$E_a(\tau) = \frac{[\Delta G P_{\Delta G} + \lambda]^2}{4\lambda P_\lambda} \quad (11)$$

где $P_{\Delta G}$ и P_λ меньше единицы. В результате $E_a(\tau)$ возрастает с понижением температуры.

Расчет кинетических кривых переноса электрона проведен с параметрами $P_k \ll 0,01$, $P_\lambda = 0,7$ и $P_{\Delta G} = 0,1$, как определено в [20]. Значения ΔG для переноса электрона в первом, втором и третьем состояниях восстановления цитохрома составляют: $\Delta G_1 = -0,14$ эВ, $\Delta G_2 = -0,18$ эВ и $\Delta G_3 = -0,29$ эВ [37]; для всех реакций $\lambda = 0,29$ эВ.

С помощью такого подхода удалось описать весь ансамбль экспериментальных кривых (около 50) в температурном диапазоне 40–298 К для трех состояний восстановления цитохрома. В дополнение к параметрам, входящим в уравнения (1)–(3) для неадиабатического переноса электрона, и параметрам, использованным ранее в [20] для описания переноса электрона в рамках двухмерной модели, предлагаемая в данной работе модель содержит ряд новых параметров, в том числе β и τ_0 .

Параметр β характеризует распределение времен диэлектрической релаксации белков, участвующих в реакции переноса электрона (рис. 6). Этот параметр указывает на относительный вклад быстрых и медленных степеней свободы в процессе диэлектрической релаксации белка. Значение β близко к 0,04–0,06 для всех трех состояний восстановления цитохрома в диапазоне температур 298–220 К; при температурах в диапазоне 200–130 К β увеличивается с 0,08 до 0,2, и достигает значения 0,57 при 40 К.

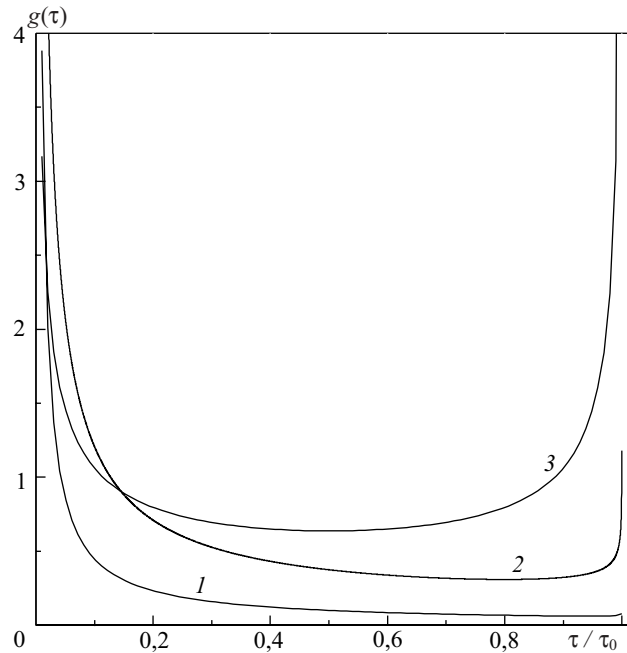


Рис. 6. Графики функции распределения Кола–Девидсона для значений параметра $\beta = 0,05$ (1), 0,2 (2) и 0,5 (3), которые описывают процесс диэлектрической релаксации белковой глобулы при переносе электрона в структуре РЦ фотосинтетических бактерий при температурах 293, 130 и 50 К, соответственно

Как видно из рис. 6, при комнатных температурах ($\beta = 0,05$) основная доля релаксационных процессов сконцентрирована в высокочастотной области спектра, вероятно, за счет значительного вклада быстрых колебательных и либрационных движений. При понижении до температуры 130 К ($\beta = 0,2$) становится заметным вклад низкочастотных релаксаций. При самых низких температурах вблизи 40 К ($\beta = 0,5$) кривая распределения становится симметричной, что указывает на равный вклад высокочастотных и медленных движений в процесс диэлектрической релаксации белковой матрицы.

Было найдено, что для РЦ с цитохромом в первом состоянии восстановления параметр $(k_0^{\text{NA}} / A)\tau_0$, который отражает степень адиабатичности реакции, равен 10 при комнатной температуре и возрастает до 178 при понижении температуры до 219 К. Это означает, что даже при комнатной температуре реакции переноса электрона являются адиабатическими для фракции белков с наибольшими временами релаксации. В то же время для основной части белков при комнатной температуре $\beta = 0,05$ и среднее время релаксации $\tau_{\text{cp}} = \beta\tau_0$ обеспечивает неадиабатичность реакции. При понижении температуры увеличивается как τ_0 , так и параметр β , в результате чего степень адиабатичности возрастает. Следует отметить, что при дальнейшем понижении температуры вклад диффузионной координаты в процесс переноса электрона понижается, и реакция идет преимущественно вдоль колебательной координаты в неадиабатическом режиме.

В работах [30, 31] k_0^{NA} определяется как независимый параметр, равный $1,410^7 \text{ c}^{-1}$ при комнатной температуре для всех трех состояний восстановления цитохрома.

Если известно k_0^{NA} и можно оценить значение параметра A (принимая $\epsilon_s / \epsilon_\infty = 2$ и $\lambda = 0,29$ эВ), то удастся определить τ_0 , которое при комнатной температуре равно 0,35 мкс. В результате среднее время диффузионной релаксации в белке, согласно приведенному выше определению, составило 17,5 нс.

Это достаточно хорошо совпадает со значением времени релаксации гемового кармана миоглобина (9 нс), которое было измерено по регистрации релаксационного сдвига спектра флуоресценции красителя, встроенного в гемовый карман миоглобина [8]. Определенные значения параметров τ_0 и β также близки к значениям аналогичных параметров для динамики гема в структуре миоглобина, определенных методом мессбауэровской спектроскопии [38].

Анализ медленной фазы кинетики переноса электрона

Детальный анализ показывает, что первый интегральный член в уравнении (7) описывает только начальные участки кинетических кривых в диапазоне времен 0,1–40 мкс. Для моментов времени более 40 мкс вклад интегральной части уравнения пренебрежимо мал и все кинетические кривые хорошо описываются экспоненциальным членом $A_2 \exp(-k_b t)$ с $k_b = (1-4) \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$.

Такое поведение кинетических кривых можно объяснить, если предположить, что в образце присутствуют две популяции белков. В первой популяции осуществляется быстрый перенос электрона от восстановленного гема с-559⁻ к P^+ с $k_{\text{et}} = 10^7\text{--}10^4 \text{ с}^{-1}$; кинетика переноса в этой популяции описывается вышеприведенными параметрами и вклад обратной реакции $\text{P}^+ \leftarrow \text{Q}_\text{A}^-$ в процесс восстановления P^+ в этой популяции пренебрежимо мал. Во второй популяции для прямой реакции $k_{\text{et}} \ll 10^2 \text{ с}^{-1}$, и восстановление P^+ осуществляется за счет обратной реакции. Параметры A_1 и A_2 являются коэффициентами, соответствующими долям «быстрой» и «медленной» популяции белков. Аналогичный вывод о существовании равновесия между двумя состояниями комплекса цитохром–РЦ, активного и неактивного по отношению к прямому переносу электрона на P^+ , был сформулирован ранее [39, 40] и обсуждался в работах [41, 42]. Тем не менее два вопроса оставались неразрешенными.

1. В чем причина таких больших различий в кинетике прямого переноса электрона между «быстрой» и «медленной» популяцией белков?

2. Что является причиной изменения параметров A_1 и A_2 (описывающих равновесие между двумя популяциями комплекса цитохром–РЦ) в зависимости от температуры и состояния восстановления цитохрома?

Было показано [30], что для первого состояния восстановления цитохрома переход «быстрой» популяции в «медленную» происходит с энергией активации 0,22 эВ. Для третьего состояния восстановления цитохрома энергия активации составляет только 0,031 эВ. Что является причиной изменения равновесия между двумя типами белкового комплекса при восстановлении цитохрома?

Ключом к разрешению этой загадки является предположение о возможности существования двух различных состояний белков, V_1 и V_2 , с малым различием в значениях свободной энергии для исходного состояния переноса

электрона (см. рис. 5). Так как A_1 и A_2 изменяются с изменением температуры и степени восстановления цитохрома, разность свободных энергий этих двух состояний должна быть сравнима с энергией теплового движения и энергией электростатического взаимодействия между зарядами на проксимальном геме цитохрома и добавляемыми электронами на соседних гемах. Согласно используемым в настоящей работе значениям ΔG , эта разница энергий должна составлять 0,04–0,15 эВ.

Зависимость в разности значений свободной энергии между состояниями белка V_1 и V_2 от состояния восстановления гемов цитохрома с-552 и с-556, удаленных от гема с-559 на расстояние 1,4 и 2,7 нм, означает, что белки в этих состояниях имеют различное распределение зарядов вблизи проксимального гема. Реальной физической причиной различия между двумя такими состояниями может быть протонирование пептидной группы вблизи проксимального гема с энергией активации 0,1–0,2 эВ.

Например, карбоксильная группа вблизи проксимального гема может находиться в депротонированном состоянии при комнатной температуре и протонироваться при ее понижении. В первом состоянии восстановления цитохрома отрицательно заряженный карбоксилат-ион создает благоприятные энергетические условия для быстрой реакции переноса электрона от состояния V_1 к конечному состоянию С вдоль пути 1 (комнатные температуры, $k_{\text{et}} \sim 10^7 \text{ с}^{-1}$) или вдоль пути 2 (220 К, $k_{\text{et}} = 10^4 \text{ с}^{-1}$). При низких температурах происходит протонирование карбоксилат-иона за счет диффузионного движения протона с характеристическими временами $\tau \gg 10^{-2} \text{ с}$ в интерьере белковой глобулы, что переводит белок в состояние V_2 с пониженной энергией электрона. Из состояния V_2 система может перейти в конечное состояние С вдоль пути $\text{V}_2 \rightarrow \text{V}_1 \rightarrow \text{C}$ (путь 2) или прямо из V_2 в С (путь 3) со значительно большей энергией активации (см. рис. 5). Скорость реакции переноса электрона от V_2 к С вдоль путей 2 и 3 меньше, чем 10^2 с^{-1} .

При восстановлении гема с-556 благодаря электростатическому взаимодействию этого гема с протоном карбоксильной группы равновесие сдвигается в сторону ее депротонированного состояния. В результате скорость переноса электрона возрастает при данной температуре и реакцию удается наблюдать при более низких температурах. Добавление третьего электрона к гему с-552 еще более усиливает смещение протона от карбоксильной группы. Таким образом, состояние депротонирования нарастает далее и перенос электрона остается быстрым при самых низких температурах. Из определяемой в эксперименте температурной зависимости соотношения A_1/A_2 видно, что для равновесия между состояниями V_1 (непротонированное) и V_2 (протонированное) разница в свободных энергиях составляет 0,22 эВ для первого состояния восстановления цитохрома и 0,031 эВ для третьего состояния восстановления. Приращение свободной энергии, 0,19 эВ, находится в хорошем соответствии со значением $\Delta G_1 - \Delta G_3 = 0,15 \text{ эВ}$, которое соответствует электростатическому вкладу в приращение скорости переноса электрона в «быстрых» белковых комплексах, как это было определено ранее [37] и использовано в нашей модели.

Согласно обычному неадиабатическому или адиабатическому приближению, уменьшение ΔG вследствие

электростатического взаимодействия на 0,1–0,2 эВ при $\lambda = 0,29$ эВ не может быть причиной изменения k_{et} на шесть или более порядков. Тем не менее такие большие изменения скорости переноса электрона могут быть объяснены в рамках приближения Овчинниковой–Суми–Маркуса изменением относительного вклада колебательной и диффузионной степеней свободы в параметры λ и ΔG согласно уравнениям (8)–(10). Изменение зарядового состояния при протонировании карбоксилат-иона может приводить к изменению дистанционного электростатического взаимодействия, которое определяет вклад в ориентационную дипольную релаксацию. Комбинация различных вкладов температурно-независимой колебательной и зависящей от температуры диффузионной мод в реорганизацию белка открывает возможность объяснить большое различие в скоростях реакции переноса электрона для двух состояний белка при низких температурах.

Например, для реакции в первом состоянии восстановления цитохрома $\Delta G_1 = -0,14$ эВ, $\lambda = 0,29$ эВ, $P_{\Delta G} = 0,1$, и $P_{\lambda} = 0,7$. Тогда, при комнатной температуре $E_a = 0,02$ эВ ($\varphi(\tau) = 1$) и при низкой температуре $E_a = 0,1$ эВ ($\varphi(\tau) = 0$). Согласно уравнению (1), это дает изменение константы скорости при понижении температуры от комнатной до 150 К примерно на три порядка. Если в другой популяции белка P_{λ} уменьшить до 0,2, при комнатной температуре E_a остается той же, однако при низкой температуре становится равной 0,33 эВ, что дает десять порядков в изменении константы скорости при изменении температуры от 295 до 150 К. В результате для двух популяций белка с $P_{\lambda} = 0,7$ и $P_{\lambda} = 0,2$ при комнатной температуре скорости переноса электрона оказываются равными, а при 150 К различаются на семь порядков.

Таким образом, анализ закономерностей изменения с температурой и степенью восстановления цитохрома кинетики быстрой компоненты и относительных вкладов быстрой и медленной компоненты реакции восстановления P^+ в структуре реакционных центров указывает на наличие в структуре белка широкого распределения по временам диэлектрической релаксации. Разделение процесса релаксации в белках на два типа, имеющих разные активационные параметры, позволяет эффективно управлять скоростью переноса электрона в организованных молекулярных системах в пределах семи и более порядков.

Заключение

Как отмечалось в начальных разделах данной статьи, стратегия анализа явлений окружающего нас мира в диапазоне расстояний порядка единиц или десятков нанометров может оказаться очень полезной как в плане фундаментальных исследований, так и в прикладных разработках. Взаимодействие сил и степеней свободы различной природы на расстояниях от ангстрем до нескольких нанометров в высокоорганизованных молекулярных системах приводит к возникновению качественно новых эффектов. Большую помощь в комплексном анализе и изучении таких эффектов дает исследование биологических макромолекулярных систем, структура и функции которых отшлифованы в процессе эволюции жизни на Земле до высокого совершенства. Эта идея достаточно

очевидна и широко обсуждается в течение двух последних десятилетий [43–47]. Однако примеры детального количественного анализа функционирования реальных молекулярных машин или устройств на физико-химическом уровне встречаются достаточно редко.

В рассмотренных выше работах впервые на количественном уровне показана важная роль взаимодействия в процессе переноса электрона в белковой макромолекуле, имеющей размеры порядка нескольких нанометров и состоящей из нескольких тысяч атомов, как квантовых эффектов на расстояниях до 1–3 нм, так и различных механических степеней свободы, которые реализуются локально или во всем масштабе белковой глобулы. Вариация вкладов различных степеней свободы сильно изменяет скорость переноса и позволяет эффективно управлять этим процессом.

Суммируя опыт исследования реакций дистанционного переноса электрона в структуре реакционных центров и различных металлсодержащих белков, следует отметить важные закономерности этих процессов.

1. Перенос заряда в белках является дискретным, электрон локализуется на отдельных металлсодержащих комплексах или кластерах в структуре белка и переносится между ними туннельным образом на расстояния порядка 1–3 нм с характерными временами от нескольких пикосекунд до десятков миллисекунд.

2. Кинетика переноса электрона между центрами в белках описывается в рамках теории Маркуса, если принять во внимание структурные и динамические особенности белковых макромолекул.

Важнейшей особенностью белков с точки зрения направленного дистанционного переноса электрона является оптимизация в их структуре двух необходимых факторов — квантового и механического. Согласно квантовому, центры, между которыми осуществляется перенос электрона, имеют химическую структуру, обеспечивающую для них необходимый окислительно-восстановительный потенциал и возможность быстрого и обратимого изменения состояния окисления. Далее, эти центры расположены друг от друга на расстояниях порядка 1–3 нм, что обеспечивает слабое перекрытие их электронных оболочек за счет суперобменного взаимодействия через белковую глобулу, достаточного для обеспечения туннелирования электрона между центрами с требуемой скоростью.

В качестве механической функции белковая глобула осуществляет оптимальную по скорости и энергии диэлектрическую релаксацию в окружении центров, обеспечивая эффективную стабилизацию разделенных зарядов по мере переноса заряда между центрами. Таким образом, белок — это не только статическая структура, обеспечивающая фиксацию активных центров в пространстве. В процессе функционирования белка его структура изменяется строго определенным образом, обеспечивая оптимальную траекторию протекания реакции в фазовом пространстве с учетом квантовых характеристик матрицы. Другими словами, это молекулярная машина молекулярных размеров, в функционировании которой значительную роль играют квантовые эффекты. Для создания молекулярного электронного устройства с точки зрения науки о наноструктурах необходимо организовать кластеры с оптимальными окислитель-

но-восстановительными свойствами, как правило состоящие из нескольких атомов металла или атома металла в порфириновой структуре (железо-серные кластеры или геммы и хлорофиллы белков), имеющие размеры порядка 1 нм, затем их надо расположить вдоль цепи переноса на расстоянии 1–2 нм друг от друга и обеспечить оптимальную динамику окружения этих центров.

Таким образом, молекулярное устройство для управляемого переноса заряда не может быть очень простым и малым. Оно должно иметь размеры порядка 5–10 нм (что близко к 10–100 атомам в диаметре, как указывал Р. Ф. Фейнман), достаточно сложную структуру для обеспечения релаксации вдоль различных степеней свободы и создания возможности эффективного управления этими степенями свободы. На современном уровне состояния науки возможна постановка задачи о перспективном конструировании таких молекулярных электронных устройств.

* * *

Эта работа была частично поддержана грантами РФФИ, грантом ИНТАС №99-00281 и грантом НАТО LST.CLG.977814.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левич В. Г., Догонадзе Р. Р. Докл. АН СССР, 1959, т. 142, с. 123–126.
2. Marcus R. A., Sutin N. Biochim. Biophys. Acta, 1985, v. 811, p. 265–322.
3. Casimiro D. R., Richards J. H., Winkler J. R., Gray H. B. J. Chem. Phys., 1993, v. 97, p. 13073–13077.
4. Casimiro D. R., Beratan D. N., Onuchic J. N. e. a. Mechanistic Bioinorganic Chemistry. Eds. H. H. Thorp, V. Pecoraro. Advances in Chemistry, Series. American Chemical Society, Washington. DC, 1995, p. 471–485.
5. Bjerrum M. J., Casimiro D. R., Chang I. e. a. J. Bioenerg. Biomembranes, 1995, v. 27, p. 295–302.
6. Blumenfeld L. A., Davidov R. M. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 549, p. 255–280.
7. Beece D., Eisenstein L., Frauenfelder H. e. a. Biochemistry, 1980, v. 19, p. 5147–5157.
8. Bashkin J. S., Mc Lendon G., Mukamel S., Marohn J. J. Phys. Chem., 1990, v. 94, p. 4757–4761.
9. Ansari A., Jones C. M., Henry E. R. e. a. Biochemistry, 1994, v. 33, p. 5128–5145.
10. Zusman L. D. Chem. Phys., 1980, v. 49, p. 295–304.
11. Alexandrov I. V. Ibid., 1980, v. 51, p. 449–457.
12. Beratan D. N., Onuchic J. N., Betts J. N. e. a. J. Am. Chem. Soc., 1990, v. 112, p. 7915–7921.
13. Beratan D. N., Onuchic J. N., Winkler J. R., Gray H. B. Science, 1992, v. 258, p. 1740–1741.
14. Котельников А. И. Биофизика, 1993, т. 38, с. 228–232.
15. Moser Ch. C., Keske J. M., Warncke K. e. a. Nature, 1992, v. 355, p. 796–802.
16. Siddarh P., Marcus R. A. J. Phys. Chem., 1993, v. 97, p. 13078–13082.
17. Stuchebrukhov A. A. Adv. Chem. Phys., 2001, v. 118, p. 1–44.
18. Avila A., Gregory B. W., Niki K., Cotton T. M. J. Phys. Chem. B, 2000, v. 104, p. 2759–2786.
19. Котельников А. И., Фогель В. Р. Биофизика, 1996, т. 41, с. 596–605.
20. Kotelnikov A. I., Vogel V. R., Pastuchov A. V. e. a. In: Biological Electron Transfer Chains: Genetic, Composition and Mode of Operation. NATO ASI Ser. Ser. C: Math. and Phys. Sci. Eds. G. W. Canters, E. Vijgenboom. Dordrecht–Boston–London: Kluwer Acad. Publ., 1998, v. 512, p. 29–49.
21. Zang L. H., Maki A. H. J. Am. Chem. Soc., 1990, v. 112, p. 4346–4351.
22. Cowan J. A., Upmacis R. K., Beratan D. N. e. a. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1988, v. 550, p. 68–84.
23. Kuila D., Baxter W. W., Natan M. J., Hoffman B. M. J. Phys. Chem., 1991, v. 95, p. 1–3.
24. Nocek J. M., Liang N., Wallin S. A. e. a. J. Am. Chem. Soc., 1990, v. 112, p. 1623–1625.
25. Фогель В. Р., Пастухов А. В., Психа Б. Л., Котельников А. И. Биофизика, 1997, т. 42, с. 1008–1014.
26. Нокс П. П., Быстряк И. М., Котельников А. И. и др. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1989, т. 5, с. 651–659.
27. Paschenko V. Z., Gorokhov V. V., Grishanova N. P. e. a. Biochim. Biophys. Acta, 1998, v. 1364, p. 361–372.
28. Берг А. И., Нокс П. П., Кононенко А. А. и др. Молекулярная биология, 1979, т. 13, с. 81–89.
29. Лихтенштейн Г. И., Котельников А. И. Там же, 1983, т. 17, с. 505–517.
30. Котельников А., Ортега Х. М., Медведев Э. С. и др. Электрохимия, 2002, т. 38, с. 90–101.
31. Kotelnikov A. I., Ortega J. M., Medvedev E. S. e. a. Bioelectrochemistry, 2002, v. 56, p. 3–8.
32. Holten D., Windsor M. W., Parson W. W., Thornber J. P. Biochim. Biophys. Acta., 1978, v. 501, p. 112–126.
33. Shopes R. J., Wraight C. A. Ibid., 1987, v. 893, p. 409–425.
34. Rips I., Jortner J. Chem. Phys. Lett., 1987, v. 133, p. 411–414.
35. Овчинникова М. Я. Теоретическая и экспериментальная химия, 1981, т. 17, с. 651–654.
36. Sumi H., Marcus R. A. J. Chem. Phys., 1986, v. 84, p. 4894–4914.
37. Frolov E. N., Goldanskii V. I., Birk A., Parak F. Eur. Biophys. J., 1996, v. 24, p. 433–438.
38. Chang I., Hartmann H., Krupyanskiy Yu. e. a. Chemical Physics, 1996, v. 212, p. 221–229.
39. Gao J., Shopes R. J., Wraight C. A. Biochim. Biophys. Acta, 1990, v. 1015, p. 96–108.
40. Kaminskaya O., Konstantinov A. A., Shuvalov V. A. Ibid., 1990, v. 1016, p. 153–164.
41. Ortega J. M., Mathis P. Biochemistry, 1993, v. 32, p. 1141–1151.
42. Ortega J. M., Dohse B., Oesterhelt D., Mathis P. Biophys. J., 1998, v. 74, p. 1135–1148.
43. Drexler K. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 5275–5278.
44. Seeman N. C. Nanotechnology, 1991, v. 2, p. 149–159.
45. Drexler K. E. Trends in Biotechnology, 1999, v. 17, p. 5–7.
46. Merkle R. C. Ibid., 1999, v. 17, p. 271–274.
47. Ball P. Nature, 2001, v. 409, p. 413–416.