

ОБЗОРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

**Белки как специфическая полярная среда
процессов переноса заряда**

Л.И. Кришталик

Множество биологических процессов связано с переносом заряженных частиц — электронов, протонов. Электростатическое взаимодействие переносимого заряда с окружением, в первую очередь с белком, в значительной мере определяет термодинамические и кинетические характеристики реакции. Рассмотрены особенности белков как предорганизованных высокополярных и низкодieleктрических сред, для которых характерны наличие предсуществующего внутрибелкового электрического поля, низкая энергия реорганизации и большой интервал времён dieлектрической релаксации. Эти особенности обуславливают каталитическое ускорение биохимических реакций. Представлены методы количественных расчётов энергетических характеристик ряда процессов и приведены примеры применения этих методов для конкретных систем.

PACS numbers: 87.10.–e, 87.14.E–, 87.15.–v

DOI: 10.3367/UFNr.0182.201212b.1275

Содержание

1. Введение (1275).
 2. Белки как полярная среда реакций переноса заряда (1277).
 3. Равновесная свободная энергия переноса заряда в белках (1278).
 - 3.1. Особенности электростатики белков как предорганизованных сред.
 - 3.2. Континуальный расчёт энергии сольватации ионов в модельных растворителях.
 - 3.3. Методы расчёта равновесных энергий переноса заряда в белках.
 - 3.4. Сравнение результатов расчётов равновесных свойств белков с экспериментальными данными.
 4. Энергия реорганизации и энергия активации (1286).
 - 4.1. Белок как среда с низкой энергией реорганизации.
 - 4.2. Энергия активации переноса заряда и геометрия белковой глобулы.
 - 4.3. Высокая каталитическая активность ферментов как результат сочетания низкой поляризуемости белка и предсуществующего внутрибелкового электрического поля.
 - 4.4. Расчёт энергии реорганизации переноса заряда в белках.
 - 4.5. Низкая энергия реорганизации белка — исследование методом флуоресцентной спектроскопии.
 5. Заключение (1296).
- Список литературы (1298).

1. Введение

Функции белков в живой природе многочисленны и разнообразны. Одной из важнейших особенностей белков является их ферментативная активность, т.е. способность катализировать протекание различных биохимических процессов, причём огромное ускорение реакций происходит при весьма мягких внешних условиях — при характерных для живых организмов значениях температуры, давления, pH раствора и т.д. Различным физико-химическим аспектам ферментативных процессов посвящены многие обзоры, в том числе ряд недавних [1–10].

Характерным свойством ферментов является их специфичность, т.е. способность ускорять реакции только определённого, обычно довольно узкого, класса, причём высокую каталитическую активность ферменты проявляют лишь для достаточно ограниченного круга субстратов. Ясно, что такое поведение ферментов тесно связано со специфичностью структуры каждого конкретного класса белков. Вместе с тем ферменты с самыми различными химически активными центрами и разнообразной пространственной структурой обладают общим свойством — высокой каталитической активностью. Это заставляет предполагать наличие некоторых общих существенных черт ферментов, обусловленных не только конкретными структурными особенностями того или иного из них, но и некими общими физическими принципами их действия, связанными со спецификой их архитектуры.

Огромное большинство ферментативных реакций включает в себя стадии переноса заряда, например такие формально электронейтральные процессы, как гидролиз амидных связей или цис-трансизомеризация ненасыщенных соединений, осуществляются последовательным присоединением и отщеплением протонов.

Л.И. Кришталик, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Ленинский просп. 31, 119991 Москва, Российская Федерация
Тел. (495) 955-47-51, (499) 250-55-69
Факс (495) 952-08-46
E-mail: av164159@akado.ru

Статья поступила 13 декабря 2011 г.,
после доработки 1 февраля 2012 г.

Поэтому ясно, что для объяснения физических принципов функционирования ферментов необходимо рассмотреть особенности ферментативных реакций с точки зрения современной теории процессов переноса заряда в конденсированных средах [11–24]. В рамках этой теории рассматриваются два типа процессов: движение (перенос) так называемых квантовых (быстрых) частиц — электронов (а в ряде случаев и протонов) — и движение медленных, классических, частиц: перенос тяжёлых ионов, переориентация диполей растворителя и т.д. Первые характеризуются в связанном состоянии высокими собственными частотами, $\hbar\omega \gg k_B T$, а вторые — низкими, $\hbar\omega \ll k_B T$. В данном обзоре мы будем рассматривать весьма широко распространённые случаи электронного или протонного переноса. При этом следует иметь в виду, что реакции, сопровождающиеся переносом классических частиц, часто сопряжены также с переносом квантовых частиц.

Теоретический анализ скорости реакции включает в себя вычисление двух величин: свободной энергии активации и предэкспоненциального множителя. Свободная энергия активации определяет вероятность достижения классической подсистемой конфигурации, соответствующей вершине энергетического барьера, а предэкспоненциальный фактор определяется вероятностью переноса квантовой частицы при данной переходной конфигурации. Для реакций переноса заряда одной из основных, всегда наличествующих, классических обобщённых координат системы является электрическая поляризация среды; эта поляризация взаимодействует с переносимым зарядом.

Согласно теории переноса заряда, энергия активации собственно элементарного акта переноса электрона или протона ΔG^\ddagger определяется двумя параметрами, а именно энергией реорганизации классической подсистемы λ и свободной энергией элементарного акта ΔG :

$$\Delta G^\ddagger = \frac{(\lambda + \Delta G)^2}{4\lambda}. \quad (1)$$

Соотношения, описываемые уравнением (1) — уравнением Маркуса, иллюстрируются рис. 1. Энергия реорганизации представляет собой энергию, необходимую

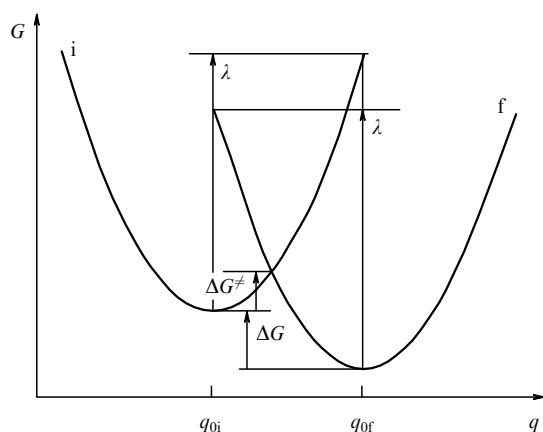


Рис. 1. Энергетический профиль реакции переноса заряда. Кривые начального (i) и конечного (f) состояний, q_{0i} и q_{0f} — равновесные координаты классической подсистемы (поляризации среды) в начальном и конечном состояниях.

для того, чтобы перейти от равновесных координат начального состояния к равновесным координатам конечного, но при этом распределение зарядов остаётся соответствующим начальному состоянию. Например, для реакции $A^+ + B = A + B^+$ энергия реорганизации равна разности неравновесной энергии состояния $A^+ + B$ при координатах, отвечающих равновесному состоянию $A + B^+$, и равновесной энергии состояния $A^+ + B$ при соответствующих равновесных координатах.

Свободная энергия элементарного акта ΔG представляет собой разность равновесных энергий состояний непосредственно после акта переноса заряда и непосредственно перед ним. Для простейшего случая реакции типа $A^+ + B = A + B^+$ энергия ΔG совпадает со стандартной свободной энергией реакции ΔG_0 (здесь мы временно отвлекаемся от энергии сближения реагентов). Ясно, что в общем случае ΔG не должна зависеть от концентрации реагентов. Таким свойством обладает так называемая конфигурационная свободная энергия ΔG_c , т.е. свободная энергия, не включающая в себя компоненту, связанную с перестановочной энтропией. Конфигурационная свободная энергия отличается от стандартной энергии ΔG_0 в тех случаях, когда число молекул в ходе реакции изменяется или когда для реагентов и продуктов выбраны разные стандартные состояния [25].

Уравнение (1) справедливо для неадиабатических процессов переноса заряда (которые преобладают в биологических системах). Для адиабатических процессов, характеризующихся сильным взаимодействием донора и акцептора, имеет место значительное расщепление термов в области пересечения кривых начального и конечного состояний, что приводит к существенному снижению энергии активации.

Уравнение (1) предполагает параболическую зависимость энергии от всех классических координат. При этом условия как λ , так и ΔG_0 могут быть представлены в виде суммы вкладов, обусловленных внутренними свойствами реагентов (λ_i и ΔG_i), и вкладов, связанных со взаимодействием заряда с его окружением (λ_s , ΔG_s). Если первая составляющая одинакова для реакций, например, в водной среде и ферменте (мы сравниваем реакцию одних и тех же активных групп), то вторая составляющая (как λ_s , так и ΔG_s) существенным образом зависит от свойств окружающей среды. Поскольку ферментативные реакции протекают, как правило, внутри белковой макромолекулы, белок является не только участником, но и средой реакции [26]. В связи с этим возникает необходимость проанализировать свойства белка как особой диэлектрической среды.

Раздел 2 данного обзора посвящён общему описанию свойств белков как особой конденсированной полярной среды. В разделах 3 и 4 рассматривается влияние этих свойств на равновесные энергии процессов заряжения, а также на энергии реорганизации и активации процессов переноса заряда. В разделе 3.3 рассматриваются методы расчёта равновесных энергий: в разделе 3.3.1 описывается общий подход к такому расчёту, а раздел 3.3.2, посвящённый оценке параметров электростатических расчётов, адресован читателю, специально интересующемуся техникой таких расчётов. Сравнение результатов теоретических расчётов и экспериментов представлено в разделах 3.4 и 4.4.3, причём оба эти раздела начинаются с обсуждения основных результатов и выводов, а далее в них рассматриваются примеры приложения общих

принципов к конкретным биологическим системам. В разделе 5 приводятся основные выводы.

2. Белки как полярная среда реакций переноса заряда

Основным принципом архитектоники белков является их формирование как линейной последовательности аминокислотных звеньев, связанных прочными пептидными связями и довольно жёстко упакованных в определённые вторичные и третичные структуры. Основные элементы этой структуры — пептидные группы — обладают большим дипольным моментом. Так, дипольные моменты многих свободных амидов близки к 4 Д [27]; имеются указания на то, что образование некоторых вторичных структур, в частности α -спиралей, приводит к взаимной поляризации пептидных связей и увеличению их дипольного момента до ~ 6 Д [28–30].

Плотная упаковка пептидных звеньев и полярных боковых цепей внутри определённых структур сильно ограничивает способность диполей белка изменять свою ориентацию (реориентироваться) под действием внешнего электрического поля. Разумеется, определённой подвижностью диполи обладают, что следует как из различных экспериментов, так и из молекулярно-динамических расчётов, но ориентация диполей может изменяться лишь в весьма узких пределах. Отсюда вытекают два важных следствия [31].

Во-первых, диэлектрический отклик белка на внешнее электрическое поле оказывается весьма слабым, а статическая диэлектрическая проницаемость белков соответственно — низкой; последняя, согласно результатам измерений на ряде сухих белков, составляет $\sim 3,5$ – $4,0$ [32–36]. Близкие величины получаются также в результате разных вариантов молекулярно-динамического моделирования для областей внутри белка [37–43]. В то же время жидкие низкомолекулярные амиды, обладающие практически такой же или даже меньшей концентрацией полярных амидных групп, характеризуются высокими относительными диэлектрическими проницаемостями — вплоть до 180 для *N*-метилформамида [44]. Как показано в разделе 4, низкая статическая диэлектрическая проницаемость белков приводит к резкому снижению энергии реорганизации реакций переноса заряда в этих средах.

Во-вторых, важным отличием белков от низкомолекулярных полярных растворителей, обусловленным особенностью структуры белков, является существование постоянного внутрибелкового электрического поля [31, 45–47]. В низкомолекулярной жидкости электрический потенциал, создаваемый её диполями в любой точке жидкости в произвольный момент времени, в общем случае отличен от нуля. Однако благодаря беспорядочным флуктуациям ориентации диполей средний во времени потенциал равен нулю. Только после внесения в данную точку какого-либо иона средняя ориентация диполей перестаёт быть произвольной и создаваемый ими потенциал принимает определённое значение. В отличие от ориентации диполей в жидкости, ориентация диполей белка задана его структурой. Разумеется, ориентация диполей белка испытывает некоторые флуктуации (иначе их статический диэлектрический отклик вообще бы отсутствовал), но допустимые флуктуационные изменения ориентации весьма ограничены, так что в среднем

по времени в каждой точке белка существует некое перманентное электрическое поле. Это поле присутствовало ещё до внесения в белок нового свободного заряда, поэтому оно может быть названо предсуществующим полем. Если в жидкостях определённая упорядоченность в расположении диполей появляется только после внесения заряда, то в белках она существует исходно. Поэтому белки можно определить как "предорганизованные полярные среды" [31].

Энергия взаимодействия заряда q с отдельным точечным диполем μ выражается как $q\mu \cos\theta/R^2$, где R — расстояние между зарядом и точечным диполем, θ — угол между моментом диполя и радиусом-вектором \mathbf{R} . На расстоянии R от заряда находится $n\pi R^2$ диполей (n — средняя концентрация диполей на площади сечения). Таким образом, суммарный вклад некоторого слоя диполей в энергию взаимодействия с зарядом равен $q\mu n\pi \cos\theta(R)$, где $\cos\theta(R)$ описывает среднюю ориентацию диполей на расстоянии R . В жидком диэлектрике ориентация диполей определяется конкуренцией воздействия внешнего поля и теплового движения. Поскольку поле убывает обратно пропорционально квадрату расстояния, величина $\cos\theta(R)$ быстро уменьшается при удлении от свободного заряда. В результате суммарный вклад диполей в энергию их взаимодействия с зарядом тем меньше, чем больше расстояние от диполей до заряда.

В предорганизованном диэлектрике ситуация совершенно иная. В этой среде предсуществующая ориентация диполей задана структурой и она не зависит от поля заряда. Поэтому удалённые от заряда диполи могут оказаться в более выгодной ориентации, чем близкие к нему. Поскольку число диполей на расстоянии R от заряда увеличивается с возрастанием R , их вклад в энергию взаимодействия предсуществующего поля с зарядом может оказаться бóльшим, чем вклад ближайших диполей, и даже отличаться от последнего знаком. Описанная простая модель точечных диполей качественно правильно передаёт основное отличие предорганизованных сред от бесструктурных. Что касается количественного анализа, то расчёт потенциалов, создаваемых парциальными зарядами атомов белка в разных точках активного центра α -химотрипсина, действительно выявил как преобладание в отдельных случаях вклада удалённых аминокислотных остатков, так и изменение знака потенциала [47–49].

Из сказанного выше видно, что белки представляют собой высокополярные низкодиэлектрические среды — сочетание свойств, невозможное для низкомолекулярных жидкостей, обладающих практически неограниченной подвижностью диполей. Поэтому для белков нет смысла противопоставлять высокую полярность и низкую диэлектрическую проницаемость.

В реальных биологических системах белок практически никогда не выступает как единственная диэлектрическая фаза: обычно белки граничат с другими диэлектриками — водой, липидами. Вследствие дальнедействующего характера кулоновских сил взаимодействие зарядов с небелковой фазой может быть весьма существенным, и оно должно обязательно учитываться при количественном описании процессов переноса заряда. Введение при таком описании некоей эффективной диэлектрической проницаемости (которое иногда применяется), усреднённым образом описывающей отклик двух фаз, является

весьма грубым приближением, не имеющим чёткого физического смысла (см., например, [50]).

Водное окружение оказывает влияние как на энергию взаимодействия заряда с диполями, создаваемыми поляризацией (присутствие воды всегда усиливает это взаимодействие, улучшая сольватацию иона), так и на величину предсуществующего поля. Последнее обусловлено экранированием поля зарядов в белке поляризацией водного окружения, диэлектрическая проницаемость которого выше. Этот эффект впервые количественно был описан в классической работе Танфорда и Кирквуда [51] при рассмотрении поля заряженных ионогенных групп белка; для поля диполей данный эффект впервые был учтён Уоршелом и Левитом [46] в микроскопической модели, а в рамках полуконтинуальной модели — в работах [49, 52]. В настоящее время для расчёта электростатики макромолекул произвольной формы, окружённых раствором электролита, разработан ряд программ, например DelPhi [53], MEAD (Macroscopic Electrostatics with Atomic Detail) [54]. Речь идёт о численном решении уравнения Пуассона–Больцмана (при решении уравнения Пуассона учитывается больцмановское распределение ионов электролита в приближении Дебая–Хюккеля).

Следует отметить одну интересную особенность: экранирование всегда ослабляет поле единичного заряда, но поле диполя в некоторой области пространства может усилиться. Наглядно это можно представить, если экранирование заряда поляризацией внешней водной фазы описать как наложение поля противоположного по знаку заряда изображения, расположенного в водной фазе. Если один из полюсов диполя, например положительный, находится ближе к границе раздела, чем другой, то отрицательный заряд его изображения тоже располагается ближе к границе, чем положительный заряд другого изображения. Тогда потенциал, создаваемый диполем изображения в любой точке белка, будет отрицательным. В той области белковой фазы, где потенциал первичного диполя положителен, наложение поля изображения уменьшит потенциал, а в той области, где первичный потенциал отрицателен, под действием поля изображения он приобретёт ещё большее отрицательное значение, т.е. возрастёт по абсолютной величине. Расчёт поля парциальных зарядов в α -химотрипсине при отсутствии и наличии водного окружения выявил ряд случаев такого поведения [49].

Структурные ограничения подвижности диполей называются не только на допустимой степени их ориентации, но и на скорости их поворота. Известно, что в белке имеется широкий набор разномасштабных движений с различными активационными барьерами и, следовательно, различными характеристическими временами [55–57]. Повороты диполей, связанные с разными типами подвижности белка, соответствуют разным скоростям диэлектрического отклика, что выражается в широком спектре времён диэлектрической релаксации (от нескольких сотен фемтосекунд до нескольких секунд). Эта ситуация может быть феноменологически описана как некий набор эффективных диэлектрических проницаемостей, каждая из которых соответствует определённому временному интервалу [58, 59].

Таким образом, следствием общих принципов архитектуры белков являются их низкая диэлектрическая проницаемость, наличие постоянного внутрибелкового электрического поля и широкий набор времён диэлект-

рической релаксации. В разделах 3, 4 мы рассмотрим, каким образом эти специфические особенности белков как диэлектрических сред проявляются в их каталитической активности.

3. Равновесная свободная энергия переноса заряда в белках

3.1. Особенности электростатики белков как предорганизованных сред

Как обсуждалось в разделе 2, свободная энергия элементарного акта переноса заряда складывается из компоненты, обусловленной внутренними свойствами реагентов (ионизация, разрыв или изменение длин связей и т.д.), и энергии взаимодействия заряда с окружением. Последняя в свою очередь состоит из двух компонент. Во-первых, это энергия поляризации зарядом диэлектрической среды ΔG_{pol} . Энергия поляризации, вызванная диэлектрическим откликом среды, проявляется как в низкомолекулярных жидкостях, так и в белках, различаясь лишь количественно в соответствии с разницей статических диэлектрических проницаемостей.

Наряду с обычной поляризацией среды зарядом, в белковой среде проявляется качественно новый эффект, отсутствующий в жидких диэлектриках, а именно упомянутый в разделе 2 эффект предсуществующего поля (pre-existing field). Заряд, внесённый в белок (или перенесённый из одной точки белка в другую), взаимодействует не только с создаваемой им самим поляризацией, но и с предсуществующим полем:

$$\Delta G_s = \Delta G_{\text{pol}} + \Delta G_{\text{p.f.}} \quad (2)$$

Эффект предсуществующего поля диполей (а не только поверхностных заряженных групп) был отмечен ещё в начале 1970-х годов [31, 45–47] и затем исследовался во многих работах. Однако до недавнего времени анализ электростатических эффектов в белках проводился непосредственно, что связано с неоднозначностью использования в таких расчётах понятия диэлектрической проницаемости. В частности, в ряде работ отмечалось, что эффективная диэлектрическая проницаемость белка оказывается различной при рассмотрении разных задач, что лишает эту величину чёткого физического смысла (см., например, [37, 50, 60, 61], а также обобщающую работу [62]).

В идеале, при полностью микроскопическом описании белка, мы должны были бы найти распределение электронной плотности и, следовательно, электрического поля во всей молекуле белка, не прибегая к понятию диэлектрической проницаемости (т.е. фактически при вакуумном значении $\epsilon = 1$). Однако ввиду чрезвычайной сложности системы мы вынуждены прибегать к некоторым упрощениям. Так, истинное распределение электронной плотности по всем атомам белка мы заменяем некими эффективными, полученными в результате квантово-химических расчётов малых молекул или их фрагментов, парциальными зарядами атомов, приближённо описывающими поле вне этих молекул (о параметризации этих зарядов см. раздел 3.3.2). Далее, нам необходимо учесть, что поле каждого из фрагментов искажает распределение электронной плотности всех других фрагментов, индуцируя в них соответствующие дипольные моменты. Последовательный микроскопиче-

ский расчёт требует самосогласованного нахождения этих моментов путём многократных итераций [46, 63]. Таким способом может быть найдено внутрибелковое поле при фиксированных координатах атомов. В дальнейшем внесение нового свободного заряда потребует не только перерасчёта поля индуцированных электронных диполей, но и учёта сдвига тяжёлых атомов к новым равновесным координатам. Такая процедура чисто микроскопического расчёта чрезвычайно трудоёмка, и даже при использовании мощных компьютеров она неизбежно связана с привлечением ряда упрощений и приближений.

Другой, полумикроскопический, метод расчёта требует значительно меньшего объёма вычислений и характеризуется, как нам представляется, более прозрачным физическим смыслом; кроме того, он более естественным образом соотносится с расчётом энергии реорганизации (см., в частности, раздел 4.4.1).

В данном обзоре мы будем опираться в основном на результаты полумикроскопического подхода (который может быть также определён как полуконтинуальный). Разумеется, оба метода, полностью микроскопический и полуконтинуальный, в принципе позволяют при последовательном учёте всех факторов получить количественно правильные результаты. Практическое применение обоих подходов неизбежно включает в себя ряд приближений, различных для разных методов, и поэтому весьма существенной является возможность сравнения основных результатов, полученных различными способами (такое сравнение проведено в разделе 4.4.3.).

В рамках полуконтинуального приближения взаимная электронная поляризация фрагментов белковой молекулы усредняется и описывается некой средней электронной (оптической) диэлектрической проницаемостью ϵ_0 , т.е. белок описывается как система парциальных зарядов, погружённых в непрерывную среду с проницаемостью ϵ_0 .

Следует подчеркнуть, что для расчёта предсуществующего поля используется именно оптическая проницаемость ϵ_0 , поскольку координаты всех атомов являются заданными и их сдвиг под действием предсуществующего поля не должен учитываться (ещё при формировании структуры белка атомы уже приняли равновесные положения, определяющиеся их взаимодействием).

Этот подход является полуконтинуальным, поскольку среда описывается континуально, но в ней рассматривается определённое дискретное расположение точечных парциальных зарядов. Если в такой среде появляется новый свободный заряд (присоединение к какой-либо группе электрона или протона), то он вызывает как сдвиг тяжёлых атомов (и/или поворот диполей — аналог атомной и ориентационной поляризации обычных диэлектриков), так и поляризацию всех электронных оболочек. Поскольку реагируют все виды поляризуемости, эффект взаимодействия нового заряда с создаваемой им поляризацией определяется полной, т.е. статической, диэлектрической проницаемостью ϵ_s . Таким образом, мы приходим к следующему алгоритму расчёта ΔG_s : $\Delta G_{p,f}$ вычисляется с использованием ϵ_0 белка, а ΔG_{pol} — с использованием его ϵ_s .

Рассмотрим случай, когда какая-то группа, например один из редокс-центров, являлась незаряженной в условиях, в которых определялась структура белка. Зарядение этой группы вызовет изменение ориентации диполей белка. Поэтому потенциал, создаваемый её зарядом в других точках, должен рассчитываться с использованием

статической проницаемости ϵ_s . Этот потенциал суммируется с созданным всеми остальными зарядами (полными и парциальными) потенциалом предсуществующего поля, рассчитанным с использованием оптической проницаемости ϵ_0 .

Предложенный нами [64, 65] подход устраняет отмеченную выше неопределённость, возникающую при попытке описать белок с помощью единственной эффективной диэлектрической проницаемости. Приведённый в [64, 65] метод расчёта позволяет также избежать подчёркнутого ранее Уоршелом и др. [41] противоречия, присущего ранее применявшемуся алгоритму, в котором ϵ_s использовалась для расчёта обеих компонент энергии. Действительно, при использовании ϵ_s в обоих случаях фактически предполагается, что постоянные диполи не только создают внутрибелковое поле, но и сами его экранируют. Если поле диполей экранируется только электронной поляризацией, описываемой ϵ_0 , то отпадает физически необоснованное предположение об экранировании поля постоянных диполей самими же этими диполями.

Сходная идея о необходимости использовать статическую диэлектрическую проницаемость только при расчёте энергии поляризации была высказана Саймонсоном и др. [66]. Однако в работе [66] не учитывалась роль оптической проницаемости, а эффект предсуществующего поля рассчитывался при $\epsilon \approx 1$, т.е. практически пренебрегалось влиянием электронной поляризуемости.

Следует отметить ещё одно обстоятельство. В реальных системах белок окружён другой средой, в первую очередь водой, поэтому все расчёты должны выполняться для гетерогенной системы. Поскольку, в отличие от координат атомов белка, координаты окружающих молекул воды не фиксированы, её диэлектрический отклик включает в себя все виды поляризуемости, т.е. расчёт предсуществующего поля должен производиться с использованием ϵ_0 для белка, но статической проницаемостью ϵ_{sw} для воды.

Как указывалось выше, ΔG_{pol} рассчитывается со статическими проницаемостями белка и окружающей воды. Поскольку ϵ_s белка много меньше, чем воды, энергия ΔG_{pol} в системе белок + вода много меньше по абсолютной величине, чем в чисто водном окружении. Поэтому перенос заряда из воды в низкодиелектрическую среду энергетически невыгоден. Ион в белковом окружении может существовать только тогда, когда потеря энергии сольватации компенсирована действием внутрибелкового предсуществующего поля. Такая более или менее полная компенсация была обнаружена уже в [67, 68] и впоследствии неоднократно наблюдалась в ряде работ (см., например, [69–73]). Однако результаты этих исследований страдают тем недостатком, что в них предсуществующее поле рассчитывалось с использованием статической проницаемости белка; применение оптической проницаемости усиливает поле и делает компенсацию низкой энергии сольватации более надёжно установленным фактом. Как показано в разделе 3.4, в ряде случаев именно только использование оптической проницаемости позволяет достичь согласия результатов расчёта с опытными данными.

3.2. Континуальный расчёт энергии сольватации ионов в модельных растворителях

Отражённая в названии этого раздела проблема весьма обширна. В данном обзоре мы кратко остановимся на

двух её аспектах. Во-первых, некоторые растворители могут использоваться как модели для оценки границ применимости континуальной электростатики для тех или иных ионов. Во-вторых, обычным методом применения электростатических расчётов к белкам является расчёт энергий переноса ионов в белок из какого-либо раствора, в котором термодинамические свойства данного иона известны из эксперимента, поэтому необходимо проверить обоснованность такого подхода.

Диэлектрический отклик белков, вообще говоря, может отличаться от строго континуального из-за влияния дискретности среды [74]. Пределы применимости макроскопического определения диэлектрической проницаемости к белкам теоретически не установлены, хотя в ряде случаев понятие диэлектрической проницаемости позволяет дать хорошее описание ситуации [4]. Во всяком случае, несомненно, что необходимым предварительным условием применения континуальных представлений к какой-либо ионогенной группе белка является их справедливость для той же группы в более простой, но тоже дискретной среде, а именно в жидких растворителях.

Электростатические расчёты позволяют найти так называемую химическую энергию сольватации иона, т.е. разность между его химическими потенциалами в растворителе и газовой фазе. Однако прямое экспериментальное определение этой величины невозможно. Любое термодинамически обоснованное измерение работы какого-либо процесса с участием ионов сводится к измерению разности электрохимических потенциалов

$$\tilde{\mu} = \mu \pm e\varphi. \quad (3)$$

Здесь знаки плюс и минус относятся соответственно к катиону и аниону. Электрохимический потенциал включает в себя химическую составляющую μ , которая полностью определяется свойствами самого иона, в том числе его взаимодействием со средой, и энергию иона в электрическом поле $\pm e\varphi$, где φ — потенциал данной фазы относительно какого-либо стандарта, e — заряд электрона (для простоты мы будем рассматривать однозарядные ионы). При этом φ определяется свойствами фазы в целом, а не отдельного иона. Раздельное измерение μ и φ невозможно, и для их определения приходится прибегать к внутримолекулярным допущениям.

Как известно, наиболее широко используемое уравнение континуальной электростатики — уравнение Борна — неприменимо для количественного описания в случае малых ионов, поскольку электрическое поле вблизи иона слишком велико. С одной стороны, это вызывает диэлектрическое насыщение среды. С другой стороны, поле, быстро изменяющееся с расстоянием, делает сильно выраженным влияние дискретности среды. В идеальном континууме поляризация в каждой точке полностью определяется полем в данной точке, т.е. является локальной. В дискретной среде, которую представляет собой реальный растворитель, поляризация в данной точке зависит и от полей в соседних точках, поскольку ориентация одного диполя (полярной связи) молекулы скоррелирована с ориентацией другого диполя той же молекулы (нелокальный диэлектрический отклик) [75–77]. Характерная длина корреляции имеет порядок радиуса молекулы растворителя (или кластера молекул). Исходя из этих соображений можно ожидать, что поведение системы будет приближаться к континуаль-

ному при размерах иона, существенно превышающих размер молекул растворителя (малое изменение поля на длине корреляции). Большой низкозарядный ион не будет также вызывать и заметного диэлектрического насыщения.

Проверка применимости континуальной электростатики оказалась возможной посредством экспериментального определения суммы химических энергий переноса катиона и аниона. Основным результатом этих исследований [78–85] явился вывод о том, что для больших компактных ионов, в частности металлоценов, уравнение Борна количественно описывает энергию их сольватации в апротонных растворителях, причём справедливость этого вывода подтверждена при различных величинах диэлектрической проницаемости, вплоть до её низких значений (7,2), приближающихся к характерным для активных центров белков. Это даёт основания для применения к большим простетическим группам в белках подходов континуальной электростатики. Редокс-потенциал металлоценов (ферроцена, кобальтицена) может использоваться в качестве внутреннего стандарта при сравнении потенциалов разных редокс-пар в апротонных средах.

В присутствии доноров протона, особенно воды, для анионов наблюдаются сильные отклонения от величин энергий, рассчитанных по уравнению Борна, от соответствующих экспериментальных значений [82, 85–87]. Эти отклонения обусловлены образованием водородной связи молекулы донора с анионом.

В отличие от большинства растворителей, вода обладает развитой трёхмерной сеткой водородных связей. Это обуславливает сильную корреляцию ориентации соседних диполей, так что характерная длина корреляции оказывается существенно большей размера молекулы. В результате простое континуальное описание может оказаться непригодным даже для довольно больших частиц. В частности, непропорциональность континуального описания воды показана нами для большой молекулы красителя профлавина [88].

Экспериментальная оценка влияния структуры воды на редокс-потенциалы кобальтициния получена в результате исследования влияния добавки к воде до 30 объёмных процентов апротонных растворителей, разрушающих сетку водородных связей [89]. Эта добавка вызывает существенный положительный сдвиг потенциала, на порядок и более превосходящий величину, ожидаемую в соответствии с уравнением Борна, из-за снижения диэлектрической проницаемости смешанного растворителя. Подробный анализ соответствующих данных позволил оценить эффект структуры воды величиной около 0,07 В.

Расчёт по кобальтициниевому стандарту (включая поправку, учитывающую структуру воды) не принимает во внимание ещё одного фактора — предсуществующего электрического поля. Многочисленные работы по моделированию водных растворов методами молекулярной динамики выявили несимметричность ориентации молекул воды вокруг нейтральной молекулы растворённого вещества, создающую положительный потенциал [90–96]. В отличие от предсуществующего поля белков, обусловленного самой их структурой, этот потенциал вызван не структурой жидкости, а асимметрией короткодействующих сил: атом водорода обладает менее пространственно протяжённой электронной оболочкой и

поэтому слабее отталкивается от молекулы растворённого вещества, приближаясь к ней на меньшее расстояние, чем атом кислорода [94]. Анализ экспериментальных данных, проведённый в [97], позволил оценить величину этого внутрифазного потенциала воды для иона кобальтициния в 0,1 В, в то же время для ряда апротонных растворителей, в том числе химически близкого к белкам диметилформамида, такой потенциал пренебрежимо мал.

В биофизике белков широко используется приближение континуальной электростатики, в частности для расчёта как редокс-потенциалов соответствующих центров, так и рК ионогенных групп, причём фактически рассчитывается изменение этих величин при переносе модельных соединений из воды в белок. Как видно из проведённого выше анализа, такое приближение никак нельзя считать удовлетворительным. Можно рекомендовать использовать электростатические расчёты для сравнения энергий достаточно больших ионов и молекул в белках и апротонных средах, опираясь при этом на экспериментальные данные, полученные в соответствующих растворителях. Примеры таких расчётов приведены в разделе 3.4.

3.3. Методы расчёта равновесных энергий переноса заряда в белках

3.3.1. Общий подход к расчёту равновесных энергий. Рассчитанные равновесные энергии в белках складываются из двух компонент: известной энергии процесса в данной среде и энергии переноса реагентов в белок. В качестве среды выбирается или вакуум, или какой-либо растворитель.

Энергия процесса в вакууме определяется экспериментально (например, ионизационный потенциал) или рассчитывается с помощью квантово-химических методов. Поскольку ионизационный потенциал относится к процессу с образованием свободного электрона, а нас интересует редокс-потенциал относительно выбранного водного электрода сравнения (обычно — нормального водородного электрода), то вакуумную энергию надо сопоставить с соответствующей энергией для этого электрода сравнения (с так называемым абсолютным электродным потенциалом электрода сравнения). По соображениям, аналогичным изложенным в разделе 3.2, абсолютный электродный потенциал недоступен непосредственному измерению, и для его определения необходимо прибегнуть к каким-либо внутримолекулярным допущениям. Наиболее обоснованно использование так называемого потенциала Трасатти, равного 4,30 В (подробнее см. раздел 3.4.2).

Как показано в разделе 3.2, вода непригодна в качестве модельного растворителя из-за её структурированности, заметного внутрифазного потенциала и её способности образовывать в ряде случаев водородные связи с реагентами. Все эти эффекты не укладываются в простое континуальное электростатическое описание среды. Поэтому предпочтительным выбором являются апротонные растворители, в частности химически близкий к пептидной связи диметилформамид. Однако применение неводных растворителей порождает проблему недоступного экспериментально определению межфазного потенциала на границе растворитель–вода. Для разрешения этой проблемы также приходится прибегать к внутримолекулярным допущениям. С

наименьшими ошибками этого удаётся достичь при использовании в качестве внутреннего стандарта металлоцен/металлоциниевых электродов. Примеры таких расчётов приведены в разделе 3.4.2.

Проблемы, аналогичные описанным выше, возникают и при расчётах рК. Здесь также должны быть известны абсолютные величины энергии гидратации протона или энергии его переноса из воды в апротонный растворитель. Эти величины определяются на основе тех же внутримолекулярных допущений (см. раздел 3.4.2).

Энергии переноса из модельной среды в белок рассчитываются электростатически. Электростатическая энергия в модельной среде включает в себя только энергию диэлектрического отклика (модельные среды выбраны именно таким образом, чтобы континуальный расчёт давал для них правильные величины). Электростатическая энергия в белке состоит из энергии диэлектрического отклика и энергии заряда в предсуществующем поле. Как показано в разделе 3.1, в белке как предорганизованной среде каждая из этих составляющих должна рассчитываться с использованием соответствующей диэлектрической проницаемости — статической или оптической.

3.3.2. Параметры расчётов электростатики белков. Величина оптической диэлектрической проницаемости ряда жидких амидов близка к 2 [44]. Однако надо учесть, что при практически такой же поляризуемости каждого звена полипептидной цепи плотность белка примерно на 30 % выше. Согласно уравнению Клаузиуса–Мосотти, это повысит ϵ_0 до $\sim 2,5$. К такому же значению приводит экстраполяция данных о коэффициенте преломления водных растворов α -химотрипсина [88].

Как отмечалось в разделе 2, экспериментальные значения ϵ_s для сухих белков близки к 3,5–4,0. Теоретические расчёты дают близкие величины для сердцевины глобулы, но заметно большие значения (~ 10) в случае некоторых белков для периферии глобулы [37–43]. Хотя эти расчёты, основывающиеся главным образом на методах молекулярной динамики, не вполне последовательно учитывают электронную поляризуемость белка, они дают общее представление о величине статического диэлектрического отклика. В некоторых расчётах получены значительно большие константы, вплоть до ~ 30 [42], но они фактически не характеризуют диэлектрическую среду внутри белка, так как обусловлены высокоподвижными ионизированными группами на его поверхности; в реальных системах эти группы существенно экранированы водным окружением [43].

Часто активный центр расположен не в центре глобулы, а ближе к её поверхности, т.е. в области несколько повышенной диэлектрической проницаемости. В отсутствие точных данных о пространственном распределении диэлектрической проницаемости можно принять её некоторое усреднённое значение, например 5. В разделе 3.4.2 приведены примеры использования этого приближения и показано, что в некоторых случаях можно оценить локальные диэлектрические проницаемости, используя независимые экспериментальные данные.

Если статическая диэлектрическая проницаемость ϵ_s белка близка к 4, то ϵ_i "тела" той группы, для которой проводится расчёт рК или редокс-потенциала, должна быть близка к соответствующей оптической величине, поскольку трудно представить себе наличие сколько-

нибудь заметной ориентационной поляризации внутри этой группы. Таким образом, мы имеем систему по крайней мере из трёх диэлектриков: группа, окружающий её белок и внешняя вода.

Ещё один существенный вопрос — это выбор парциальных зарядов атомов. Последние недоступны экспериментальному определению — они находятся как некие эффективные значения, описывающие поле вне молекулы, соответствующее данным квантово-химических расчётов. Последовательное микроскопическое описание многоатомных (и многомолекулярных) систем встречает значительные трудности. В связи с этим предложен целый ряд систем парциальных зарядов, параметризованных таким образом, чтобы, пользуясь некоторыми упрощёнными моделями, наилучшим образом описать те или иные экспериментальные данные.

Мы считаем необходимым выбирать, во-первых, такие значения парциальных зарядов, которые соответствовали бы единственной экспериментально измеряемой характеристике молекулы, непосредственно связанной с распределением в ней плотности заряда, а именно дипольному моменту. Отметим, что в связи с неоднозначностью извлечения величин парциальных зарядов из квантово-химических данных разные системы зарядов, описанные в литературе, и после приведения их к одинаковому дипольному моменту дают несколько различные распределения парциальных зарядов. Во-вторых, квантово-химический расчёт даёт поле молекулы в вакууме, причём внутри молекулы ϵ также равно единице. Поскольку при расчёте предсуществующего поля мы описываем белок как непрерывную среду с ϵ_0 , ту же оптическую проницаемость мы автоматически приписываем и внутренней области каждого молекулярного фрагмента. Такое "заполнение" фрагмента средой с $\epsilon_0 > 1$ ослабляет его поле. Для того чтобы сохранить правильное значение поля вне фрагмента, надо умножить "вакуумные" парциальные заряды на коэффициент, близкий к $(\epsilon_0 + 2)/\epsilon_0$ (поле диполя, помещённого в сферу с ϵ_0 , в $\epsilon_0/(\epsilon_0 + 2)$ раз слабее поля того же диполя в вакууме). Этот коэффициент следует вводить только для парциальных зарядов диполей или других электронейтральных групп. Величины свободных зарядов не должны корректироваться (поле вне заряженной сферы не зависит от диэлектрической проницаемости внутри сферы).

3.4. Сравнение результатов расчётов равновесных свойств белков с экспериментальными данными

3.4.1. Общий обзор результатов. В разделе 3.4.2 будут приведены примеры расчётов для ряда реальных белков, иллюстрирующие разные варианты общего подхода. Для читателя, не заинтересованного в детальном рассмотрении отдельных систем, мы посчитали целесообразным кратко суммировать результаты этих исследований.

Были рассчитаны редокс-потенциалы всех восьми кофакторов ФС I (Фотосистемы I), ферредоксинов, происходящих из двух различных организмов, и железосерного белка Риска. Рассчитаны также рК гистидинов белка α -химотрипсина. Расчёты проводились на основе как экспериментальных данных, полученных в растворах в диметилформамиде, так и ионизационных потенциалов в вакууме, вычисленных квантово-химическими методами. Во всех случаях получено разумное согласие рас-

чётных и экспериментальных результатов. Отметим, что в условиях отсутствия или недостаточной точности экспериментальных данных расчёт позволяет сделать более определённые заключения о механизме реакции.

Следует подчеркнуть, что согласия с экспериментальными результатами удавалось достичь только при последовательном применении разработанного нами подхода, а именно использовании статической диэлектрической проницаемости при расчёте энергии диэлектрического отклика и оптической проницаемости белка для расчёта предсуществующего поля. Традиционный подход, учитывающий только одну, а именно статическую, проницаемость, приводит к значительным ошибкам, достигающим 1 В. Существенную роль в повышении точности расчётов играет также описанное в настоящем обзоре корректное использование внутермодинамических допущений, позволяющих переходить от данных, полученных в вакууме или в неводном растворителе, к соответствующим данным для белков. Связанные с этой проблемой ошибки в расчётах, приведённых в литературе, составляют до $\sim 0,3$ В.

3.4.2. Примеры расчёта конкретных систем. В рассматриваемых ниже примерах мы опускаем детали расчётов и подробное обсуждение экспериментальных данных, ограничиваясь лишь описанием исследуемых систем и основных результатов.

I. Редокс-потенциалы кофакторов ФС I. Расчёт, основанный на сравнении с экспериментальными редокс-потенциалами [98].

ФС I — это одна из двух электрон-транспортных систем, характерных для фотосинтезирующих организмов, выделяющих кислород. ФС I содержит ряд редокс-центров (кофакторов), фиксированных внутри белковой матрицы (рис. 2). Кофакторы расположены в виде цепи, протягивающейся от одной стороны мембраны хлоропластов до противоположной. Первичным донором электронов является так называемая спецпара P_{700} , которая представляет собой димер двух молекул хлорофилла, Chl1A и Chl1B (A и B в обозначениях этих молекул отражают то обстоятельство, что часть кофакторов расположена в виде двух параллельных и в основном симметричных цепей A и B). При поглощении света (максимум поглощения при длине волны 700 нм) спец-

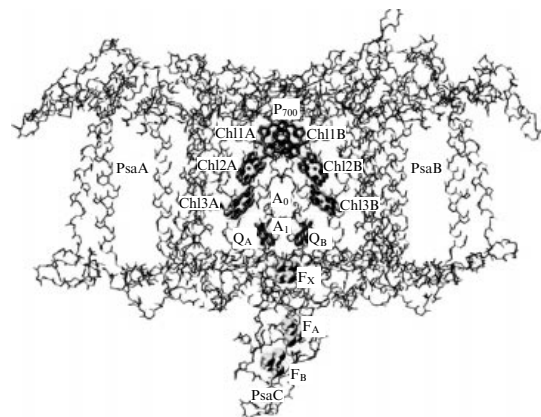


Рис. 2. (В цвете онлайн.) Структура ФС I. Тонкими линиями обозначен полипептидный остов трёх белков, жирными цветными линиями и символами обозначены кофакторы (указанные рядом). Белки PsaA и PsaB погружены в липидную мембрану, белок PsaC находится вне её.

пара переходит в возбуждённое состояние P_{700}^* . Высокий уровень энергии электрона в P_{700}^* (большой отрицательный редокс-потенциал) делает возможным перенос электрона к первичному акцептору A_0 , представляющему собой последовательность двух молекул хлорофилла, Chl2A и Chl3A (или Chl2B и Chl3B). Затем электрон передаётся акцептору A_1 — одной из двух молекул пластохинона Q_A или Q_B , и далее последовательно — трём акцепторам: F_X , F_A и F_B , которые являются четырёхъядерными железо-серными кластерами, связанными с белковой матрицей через четыре остатка аминокислоты цистеина $(RS)_4Fe_4S_4$ (здесь RS — краткое обозначение остатка цистеина RSH , в котором водород замещён железом). Далее электрон передаётся от F_B растворимому белку ферредоксину (Fd), содержащему два аналогичных железо-серных кластера. Ферредоксин вступает в дальнейшую последовательность синтетических реакций. С другой (донорной) стороны мембраны катион — радикал P_{700}^+ , образовавшийся после потери электрона спецпарой, — восстанавливается другим растворимым белком — пластоцианином. По окончании цикла ФСЦ возвращается в исходное состояние.

В литературе описан ряд расчётов редокс-потенциалов некоторых кофакторов, не приведших к хорошим результатам. Наши расчёты, рассматривающие все кофакторы в рамках единого подхода, отличаются от описанных в литературе в трёх аспектах. Во-первых, электростатические энергии переноса рассчитывались, как это обосновано выше, с использованием двух диэлектрических проницаемостей — статической и оптической. Во-вторых, учитывалась неоднородность статической диэлектрической проницаемости белкового комплекса. В-третьих, осуществлялся последовательный переход от редокс-потенциалов, измеренных в неводном растворителе (диметилформамиде (ДМФ)), к потенциалам относительно водного электрода сравнения — стандартного водородного электрода (СВЭ), относительно которого измеряются потенциалы белковых редокс-центров.

Измерение электрогенеза, т.е. возникающей разности потенциалов, обусловленной переносом заряда между двумя кофакторами, позволяет оценить относительные значения диэлектрической проницаемости [99]. Действительно, указанная разность потенциалов пропорциональна расстоянию переноса заряда (по нормали к мембране), которое известно из рентгеноструктурных данных, и обратно пропорциональна диэлектрической проницаемости соответствующей области. Аналогичные данные недавно получены и для ФСЦ [100, 101]. В описанном методе оценка диэлектрических проницаемостей проводится в рамках модели нескольких параллельных слоёв с разными ϵ_s . Можно ожидать, что вклад относительно малоподвижного полипептидного скелета в статическую поляризуемость разных областей белка примерно одинаков. Существенные различия должны вносить более подвижные полярные боковые цепи аминокислот. Выяснилось, что, действительно, имеется чёткая корреляция между средней концентрацией полярных групп и величинами ϵ_s , полученными из измерений электрогенеза. В средней части комплекса, где концентрация полярных групп мала, принято $\epsilon_s = 3$, на периферии комплекса ϵ_s повышается до 6–10. Кофакторы P_{700} , A_0 и A_1 расположены в области с $\epsilon_s = 3$, а железо-серные кластеры — в области с более высоким значением ϵ_s .

Измерение редокс-потенциалов в неводном растворителе обычно проводится относительно водного электрода сравнения. Однако это экспериментальное значение не может непосредственно использоваться в качестве опорной точки для расчёта редокс-потенциала в белке. Как указывалось в разделе 3.2, измеряемая величина содержит недоступную определению составляющую — межфазный потенциал жидкостного соединения ϕ . Пренебрежение этой составляющей или некорректные попытки обойти эту проблему приводят к существенным ошибкам. Например, в работах [102, 103] вызванная этим ошибка в величине редокс-потенциала Q/Q^{*-} составила 0,34 В.

В наших расчётах использовался следующий приём. Находился потенциал интересующего нас электрода X/X^\pm относительно ферроцен/феррицинииевого (Fc/Fc^+) электрода в том же растворителе, в частности ДМФ. Далее необходимо было перейти к потенциалу относительно водного Fc/Fc^+ -электрода, потенциал которого относительно СВЭ известен (0,4 В). Для такого перехода использовались внутермодинамические оценки, описанные в разделе 3.2. В результате потенциал пары Fc/Fc^+ в ДМФ относительно водного СВЭ был оценён величиной 0,43 В. Это позволило привести потенциалы пары X/X^\pm , измеренные в ДМФ, к потенциалам относительно СВЭ.

Основные результаты расчётов для ФСЦ и растворимых ферредоксинов из двух разных организмов приведены в таблице.

Отметим прежде всего проблему, не обсуждавшуюся выше. Дело в том, что молекулы хлорофилла расположены близко друг к другу и их плоскости параллельны, что создаёт условия для сопряжения их π -орбиталей и вызванного этим снижения энергии. Эффект сопряжения для спецпары обсуждался неоднократно, однако эта проблема для A_0 оставалась невыясненной. Мы провели квантово-химические расчёты для взаимного расположения молекул Chl, известного из рентгеноструктурных данных. Соответствующие поправки введены в средние потенциалы каждой пары хлорофиллов; результат указан в таблице как потенциал димера.

Экспериментальные значения редокс-потенциалов получены непосредственным редокс-титрованием только для P_{700} и растворимых ферредоксинов, другие потенциалы найдены косвенными методами, чем и объясняется большой разброс их значений. Учитывая это обстоятельство, а также возможные ошибки расчёта, следует признать согласие с опытом вполне удовлетворительным.

В таблице приведены вклады различных эффектов в суммарный потенциал. Вклад внутривеликовому поля определяется вкладами от полей перманентных парциальных зарядов атомов, а также вкладом заряженных боковых групп аминокислот и зарядами кофакторов (P_{700}^+ , $Fe_4S_4^{2-}$). Преобладающим в большинстве случаев является первый вклад, хотя для A_0 и A_1 другие вклады могут быть сравнимыми по абсолютной величине. Обращает на себя внимание тот факт, что величины эффекта поля и изменения диэлектрического отклика (борновской энергии сольватации) противоположны по знаку. Для хлорофиллов и хинонов эти эффекты в основном компенсируют друг друга, но для железосерных кластеров эффект поля, который является существенно большим, остаётся некомпенсированным.

Таблица. Редокс-потенциалы кофакторов ФСІ и растворимых ферредоксинов. Основные вклады в рассчитанную величину

Реакция	Кофактор	E в ДМФ относительно СВЭ, В	Эффект изменения диэлектрического отклика, эВ	Эффект внутри-белкового поля, эВ	E (расчёт), В	E (эксперимент), В
$P_{700} \rightarrow P_{700}^+$	Chl1A	0,54	0,30	-0,29	0,55	
	Chl1B	0,54	0,27	-0,23	0,58	
	Димер				0,45	0,45
$A_0(A) \rightarrow A_0(A)^-$	Chl2A	-1,16	-0,35	0,09	-1,42	
	Chl3A	-1,16	-0,37	0,26	-1,27	
	Димер				-1,23	-1,07 ÷ -1,29
$A_0(B) \rightarrow A_0(B)^-$	Chl2B	-1,16	-0,36	0,08	-1,44	
	Chl3B	-1,16	-0,38	0,22	-1,32	
	Димер				-1,27	-1,07 ÷ -1,29
$A_1(A, B) \rightarrow A_1(A, B)^-$	Q_A	-0,80	-0,41	0,54	-0,67	-0,75 ÷ -0,81
	Q_B	-0,80	-0,41	0,37	-0,84	< -0,7
$Fe_4S_4^{2-} \rightarrow Fe_4S_4^{3-}$	F_X	-1,35	-0,94	1,70	-0,59	-0,65 ÷ -0,71
	F_A	-1,35	-0,70	1,57	-0,48	-0,44 ÷ -0,54
	F_B	-1,35	-0,73	1,53	-0,55	-0,47 ÷ -0,59
Ферредоксины, Fe_4S_4 -кластеры						
<i>A. vinelandii</i>		-1,35	-0,44	1,14	-0,65	-0,64
<i>C. aciditurici</i>		-1,35	-0,38	1,27	-0,46	-0,43

Рассмотрим, какие выводы о механизме работы ФСІ можно сделать на основании этих расчётов. Уровень энергии электрона в возбуждённом состоянии P_{700}^* на 1,77 эВ выше, чем в основном. Соответственно редокс-потенциал сдвигается в область отрицательных значений: $0,45 - 1,77 = -1,32$ В, превосходя по абсолютной величине рассчитанный потенциал димера A_0 (-1,23 В или -1,27 В). Следовательно, процесс переноса электрона от P_{700}^* к A_0 является энергетически выгодным (перенос "под гору"). Однако этот процесс был бы невыгодным, если бы первичным акцептором являлся не димер, а один из мономеров Chl2A (-1,42 В) или Chl2B (-1,44 В). Таким образом, сопряжение двух хлорофиллов оказывается необходимым.

Высказывалась гипотеза, что первичным донором является не P_{700}^* , а Chl2, а первичным акцептором — Chl3 [104]. Наши расчёты показали, однако, что такой процесс термодинамически невыгоден и, следовательно, маловероятен (соответствующие значения в таблице не приведены). Для близкой по структуре ФСІІ (фото-системы II) первичным донором также является спецпара P_{680} ; однако, хотя при наличии заряда на Q_A спецпара P_{680} при температуре $T = 278$ К остаётся первичным донором, при $T = 77$ К эта роль переходит к мономеру хлорофилла. Дело в том, что появление нового заряда на Q_A создаёт дополнительное поле, которое, как описано в разделе 3.1, определяется статической диэлектрической проницаемостью белка. При температуре 278 К эффективное значение ϵ_s составляет около 4, а при $T = 77$ К, когда все движения атомов практически заморожены, приближается к 2,5. Chl ближе к Q_A , чем

P_{680} , поэтому поле на Chl сильнее. При $T = 278$ К поле является слабым и практически не влияет на разность потенциалов P_{680} и Chl, но при $T = 77$ К эта поправка к потенциалу становится существенной и отрицательный потенциал Chl оказывается большим по абсолютной величине, чем потенциал P_{680} . Соответственно именно Chl становится первичным донором [105].

Дальнейший перенос электрона к хинонам и кластерам F идёт "под гору". Перенос к F_X от Q_B более выгоден, чем от Q_A . Этот вывод, согласующийся с кинетическими данными, нельзя было бы сделать на основе экспериментальных редокс-потенциалов ввиду их большой неопределённости. Однако расчётные данные, хотя они и не могут претендовать на точность абсолютных значений, достаточно надёжно показывают относительные величины рассматриваемых потенциалов, поскольку последние получены в рамках одних и тех же приближений и при одних тех же параметрах.

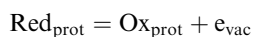
С целью оценки того, насколько важны новые подходы к расчёту электростатических энергий, предложенные в наших работах, мы провели расчёт с использованием традиционного подхода, т.е. с единой для всех компонент диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 4$. Наиболее показательное такое сравнение для тех кофакторов, для которых электростатические составляющие являются наибольшими, т.е. для железосерных кластеров. Полученные результаты таковы: -1,46 В для F_X , -1,55 В для F_A , -1,44 В для F_B , -1,42 и -1,20 В для *A. vinelandii* и *C. aciditurici* соответственно. Таким образом, традиционный подход привёл к ошибкам порядка 0,8 - 1,0 В, т.е. к совершенно неприемлемым результатам.

Предварительные результаты наших расчётов для близкого по структуре бактериального реакционного центра фотосинтеза также находятся в разумном согласии с результатами опытов. И в данной системе использование двух диэлектрических проницаемостей оказалось необходимым.

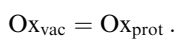
II. *Редокс-потенциал железосерного белка Риске. Абсолютный расчёт потенциала* [106].

Железосерный белок Риске является компонентом электрон-транспортных цепей практически всех организмов. Его физиологическая роль заключается в участии в первой стадии окисления гидрохинона QH₂ (различные гидрохиноны для растений и животных) с последующей передачей электрона цитохрому одного из двух типов: *c*₁ или *f*. Железосерный двухъядерный кластер Fe₂S₂ лигандирован двумя цистеинами и двумя гистидинами (RS)₂FeS₂Fe(RIm)₂. (Здесь Im — имидазол.) Кроме того, один из атомов серы образует водородную связь с аминокислотой серином. В отличие от ситуации с четырёхъядерными кластерами, описанной выше, для изолированного кластера Риске отсутствуют экспериментальные данные по его потенциалу в каком-либо растворителе. Поэтому здесь необходимо произвести абсолютный расчёт электродного потенциала.

Суммарный электродный процесс



можно представить как последовательность трёх стадий:



Здесь Red и Ox обозначают восстановленную и окисленную формы реагента соответственно, *e* — электрон, индексы prot и vac указывают на нахождение частицы в белке или в вакууме.

Стандартный электродный потенциал E^0 относительно стандартного водного водородного электрода (СВЭ) можно рассчитать по формуле

$$FE^0 = \Delta G_{\text{ion}}^0(\text{Red}) - [\Delta G_{\text{sol}}^0(\text{Red}) - \Delta G_{\text{sol}}^0(\text{Ox})] - FE(\text{H}), \quad (4)$$

где *F* — константа Фарадея, ΔG_{ion}^0 и ΔG_{sol}^0 — стандартные свободные энергии Гиббса ионизации в вакууме и сольватации в белке соответственно, константа $E(\text{H})$ определяется следующим соотношением:

$$-FE(\text{H}) = \frac{1}{2} \Delta G_{\text{dis}}^0(\text{H}_2) + \Delta G_{\text{ion}}^0(\text{H}) + \Delta G_{\text{hyd}}^{\text{chem}}(\text{H}^+), \quad (5)$$

где $\Delta G_{\text{dis}}^0(\text{H}_2)$ — свободная энергия Гиббса диссоциации молекулы водорода, $\Delta G_{\text{ion}}^0(\text{H})$ — свободная энергия Гиббса ионизации атома водорода. В качестве свободной энергии гидратации протона $\Delta G_{\text{hyd}}^{\text{chem}}(\text{H}^+)$ здесь принимается "химическая" энергия гидратации.

В качестве $E(\text{H})$ очень часто (а в биофизической литературе почти всегда) используется определённый Рейсом и Хеллером [107] так называемый абсолютный потенциал водородного электрода, который, как показано в [108], в действительности не отличается от потенциала E_K , впервые предложенного Каневским [109]. "Абсолютный" потенциал может быть строго рассчитан термодинамически из экспериментальных данных как сумма работы выхода металла и разности потенциалов контакта металл–раствор при заданном электродном

потенциале, в частности потенциале СВЭ. Как было подчеркнuto в [110], в расчёте по уравнениям (4), (5) используется электродный потенциал, зависящий от "химической" энергии гидратации. В отличие от последнего, потенциал Каневского определяется "реальной" энергией гидратации, включающей в себя величину поверхностного потенциала воды $\chi(\text{H}_2\text{O})$:

$$\Delta G_{\text{hyd}}^{\text{real}}(\text{H}^+) = \Delta G_{\text{hyd}}^{\text{chem}}(\text{H}^+) + F\chi(\text{H}_2\text{O}). \quad (6)$$

"Химическая" энергия гидратации входит в так называемый потенциал Трасатти E_T [111], отличающийся от потенциала Каневского добавкой, равной поверхностному потенциалу воды: $E_K = E_T + \chi(\text{H}_2\text{O})$ (подробно эта проблема рассмотрена в монографии А.Н. Фрумкина [112]). Таким образом, при расчёте по формуле (4) именно потенциал Трасатти следует использовать в качестве $E(\text{H})$.

Определение скачка потенциала вода–газ $\chi(\text{H}_2\text{O})$ требует использования внутримолекулярных допущений. Одно из них применено в [97], где найдено значение $\chi(\text{H}_2\text{O}) = 0,14$ В. Тогда в сочетании с известным экспериментальным значением $E_K = 4,44$ В для потенциала Трасатти получаем $E_T = 4,30$ В.

Энергия сольватации в белке включает в себя две компоненты — энергию диэлектрического отклика и энергию внесения заряда в предсуществующее электрическое поле. Расчёт первой проведён в двух вариантах: при $\epsilon_{\text{sp}} = 4$ и $\epsilon_{\text{sp}} = 5$, вторая составляющая рассчитана с использованием оптической проницаемости $\epsilon_{\text{op}} = 2,5$. Проницаемость внутри реагента $\epsilon_i = 2,5$.

Энергия ионизации комплекса Риске (а также парциальные заряды атомов) рассчитывались квантово-химическим методом теории функционала плотности (Density Functional Theory — DFT); сопряжение спинов атомов железа учитывалось методом нарушенной симметрии (Broken Symmetry — BS). Расчёты проводились для разных атомных базисных наборов, в частности TZVP (Triple Zeta Valence plus Polarization) и 6-31++G(d,p), которые хорошо зарекомендовали себя при анализе анионов и систем с низкой энергией ионизации.

Поскольку лиганды атомов железа представляют собой аминокислотные остатки, объединённые ковалентными связями с остальным белком, их координаты определяются не только взаимодействиями внутри активного центра. Соответственно оптимизация координат Fe и S проводилась при фиксированных координатах внешних лигандов. Этот вариант расчёта рассматривался как основной. В то же время квантово-химический расчёт структуры молекулы Im₂Fe₂S₂(SCH₃)₂, проведённый с полной оптимизацией координат всех атомов, привёл к структуре, заметно отличающейся от экспериментальной структуры этого комплекса в белке.

Расчитанные значения редокс-потенциала белка Риске составляют 0,19 и 0,26 В при $\epsilon_{\text{sp}} = 4$ и 0,26 и 0,34 В при $\epsilon_{\text{sp}} = 5$ (первые значения потенциала получены при базисе TZVP, а вторые — при 6-31++G(d,p)). Экспериментальное значение редокс-потенциала белка Риске 0,308 В. Согласие результатов расчёта с опытными данными следует признать хорошим. В единственной имеющейся в литературе работе, где был выполнен квантово-химический/электростатический расчёт потенциала белка Риске [113], получено отрицательное значение $-0,01$ В, намного меньшее экспериментального. Основные причины такого расхождения заключаются в

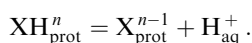
использовании в [113] потенциала Каневского, а также статической диэлектрической проницаемости при расчёте внутрибелкового поля.

Как отмечалось выше, полная оптимизация координат всех атомов активного центра приводит к структуре, заметно отличающейся от его структуры в белке, в которой координаты лигандов фиксированы белковой матрицей. Расчёты для полностью оптимизированного комплекса, отличающегося от обсуждавшегося выше как геометрией, так и распределением парциальных зарядов, приводят к потенциалам, на 0,27–0,32 В сдвинутым в сторону отрицательных значений. Это показывает важную роль напряжений внутри комплекса, создаваемых белком, в настройке необходимой величины редокс-потенциала.

Кроме приведённых выше результатов для белка дикого типа, был рассчитан его редокс-потенциал в щелочном растворе, когда лиганды имидазолы теряют два протона, сдвигая потенциал к значению $-0,13$ В, а также для трёх мутантов. Во всех случаях получено разумное согласие с экспериментом.

III. *pK* ионогенных групп белка — пример расчёта для α -химотрипсина [114].

Расчёт *pK* основан на тех же принципах, что и расчёт редокс-потенциала, т.е. на комбинации величины *pK* в модельном растворителе (например, ДМФ), определённой экспериментально, с энергиями переноса кислоты (XH^n) и основной (X^{n-1}) форм из ДМФ в белок, рассчитанных на основе континуальной электростатики. Особенностью процесса кислотной диссоциации белковых групп является то, что обе формы — кислота и основание — находятся в белке, тогда как ион водорода уходит в воду (соответствующие индексы prot и aq):



Поэтому кроме энергий переноса в белок надо учесть энергию переноса H^+ из ДМФ в воду:

$$2,3RT pK = 2,3RT pK_0 - \Delta G_{XH^n}^{\text{tr}} + \Delta G_{X^{n-1}}^{\text{tr}} + \Delta G_{H^+}^{\text{tr}}. \quad (7)$$

Здесь pK_0 — это величина *pK* в ДМФ, ΔG^{tr} с разными нижними индексами — соответствующие энергии переноса.

Водородные связи, образуемые в белке кислотой (и сопряжённым ей основанием), учитываются в электростатических расчётах в явном виде (расчёт предсуществующего поля), тогда как континуальный расчёт энергии заряжения в ДМФ этих связей не учитывает. Поэтому энергия водородной связи молекулы кислоты с молекулой ДМФ должна вычитаться из энергии её переноса из ДМФ в белок.

Континуальный расчёт энергий переноса кислоты и основной форм из ДМФ в белок производился так же, как это описано выше для редокс-потенциала. Энергия водородной связи принята равной 20 кДж моль $^{-1}$, энергия переноса H^+ из ДМФ в воду — 28 кДж моль $^{-1}$ [97], экспериментальное значение $pK_0 = 6,4$.

Расчёт *pK* одного из аминокислотных остатков гистидина (Гис-57), который определяет *pK* активного центра фермента, дал величины $^1 6,2$ при $\epsilon_{\text{sp}} = 4$ и $7,9$ при

$\epsilon_{\text{sp}} = 5$. Экспериментальное значение $pK = 7$. Таким образом, для достижения количественного согласия с экспериментом надо принять $\epsilon_{\text{sp}} \approx 4,5$, т.е. взять величину несколько большую, чем измеренная для сухих белков (3,5–4,0). Для других ионогенных групп, расположенных ближе к поверхности глобулы, было найдено более высокое эффективное значение ϵ_{sp} , что полностью согласуется с обсуждавшимися в разделе 3.3 результатами молекулярно-динамического моделирования диэлектрических свойств белков [37–43].

Надо отметить, что точность рассчитанных выше абсолютных значений *pK* вряд ли превышает 1,0, в первую очередь, из-за неточности определения энергии переноса иона H^+ . Это, однако, не затрагивает сравнения относительных значений *pK* разных групп и, следовательно, приведённых выше результатов наблюдений относительно увеличения эффективной диэлектрической проницаемости при приближении к поверхности глобулы. Расчёты, о которых говорилось выше, относились к комплексу Михаэлиса α -химотрипсина с малым субстратом (дипептидом). В комплексе с большим белком существенно меняется экранирование активного центра и, следовательно, энергия диэлектрического отклика. Кроме того, добавляется поле диполей этого белка. Расчёт, проведённый нами для комплекса с белковым ингибитором, привёл к величине *pK*, меньшей на 1,4, что согласуется с экспериментальными данными ($\Delta pK = 1,5$).

В традиционном методе полуконтинуального расчёта *pK* белковых групп не только пренебрегается эффектами структуры воды и водородными связями воды с растворённым веществом, но и используется одна и та же диэлектрическая проницаемость (статическая) для расчёта и предсуществующего поля, и диэлектрического отклика. Применение статической диэлектрической проницаемости приводит к существенному занижению первой из этих компонент. Поэтому, чтобы добиться при таком расчёте согласия с опытом, приходится принимать неоправданно большое значение эффективной диэлектрической проницаемости белка. Расчёт *pK* Гис-57, выполненный в рамках традиционного подхода, привёл к величинам, согласующимся с экспериментальными данными только при $\epsilon_{\text{sp}} \geq 20$. Практически такой же результат получен в [115]; вряд ли можно физически обосновать столь высокое значение ϵ_s .

4. Энергия реорганизации и энергия активации

4.1. Белок как среда с низкой энергией реорганизации

Рассмотрим сначала простейший случай переноса заряда e в однородной среде с оптической и статической диэлектрическими проницаемостями ϵ_0 и ϵ_s . Согласно уравнению Маркуса, энергия реорганизации среды

$$\lambda_s = e^2 \left(\frac{1}{\epsilon_0} - \frac{1}{\epsilon_s} \right) \left(\frac{1}{2a_1} + \frac{1}{2a_2} - \frac{1}{R_{1,2}} \right), \quad (8)$$

где a_1, a_2 — радиусы реагентов, $R_{1,2}$ — расстояние между их центрами.

Низкое значение статической диэлектрической проницаемости белков драматическим образом сказывается на их энергии реорганизации. Действительно, для обычных полярных растворителей $\epsilon_s \gg \epsilon_0$, поэтому так называемая полярная константа связи (константа Пекара)

¹ В связи с уточнением энергии переноса иона H^+ эти величины больше приведённых в [113] на 0,7.

$C = 1/\epsilon_0 - 1/\epsilon_s$ слабо зависит от статической проницаемости. Так, для воды $\epsilon_0 = 1,8$, $\epsilon_s = 78$ и $C = 0,54$ (в ряде случаев правильно применять не оптическую диэлектрическую проницаемость, а так называемое квантовое граничное значение, для воды приблизительно равное 2,1 [116], т.е. $C=0,46$); для диметилформамида $\epsilon_0 = 2,04$, $\epsilon_s = 36,7$, $C = 0,46$. Для белков характерны близкие значения оптической и статической проницаемостей (примерно 2,5 и 4), приводящие к низкому значению $C \approx 0,15$. Соответственно, можно ожидать величины энергии реорганизации белка примерно втрое меньшей, чем в воде и других полярных растворителях. Низкая энергия реорганизации переноса заряда в белке является одной из основных физических причин малой энергии активации и, следовательно, высокой каталитической активности ферментов [117, 118].

Вывод о низкой энергии реорганизации был сделан нами вначале на основе качественных соображений: малая подвижность диполей белка обуславливает незначительное изменение их ориентации в процессе переноса заряда, т.е. слабую реорганизацию [31]. Ограниченная подвижность диполей фактически определяет как слабый диэлектрический отклик, так и низкую энергию реорганизации. Их количественная связь выражается через константу связи.

Низкая энергия реорганизации самого белка ещё не характеризует полностью процесса переноса заряда, поскольку белок, как правило, окружён другой средой (часто — водой), обладающей иными диэлектрическими свойствами (наличие водного окружения уже учитывалось в разделе 3 при расчёте равновесных энергий). Поэтому для количественного анализа проблемы следует использовать не упрощённую формулу (8), а более общее выражение, учитывающее реорганизацию водного окружения. В разделах 4.4.1, 4.4.2 мы рассмотрим общий вывод уравнения, определяющего энергию реорганизации для реальной белковой системы произвольной геометрии, и методы её численного расчёта. Но начнём мы с рассмотрения упрощённой модели, позволяющей проследить некоторые общие тенденции.

В качестве такой модели, допускающей аналитическое решение, рассмотрим два сферических реагента с радиусами a_1 и a_2 , находящихся в точках r_1 и r_2 внутри сферической глобулы радиусом R [117, 118] (см. также [119–122]). Результаты расчёта для разумного по порядку величины набора параметров представлены на рис. 3. Верхняя горизонтальная прямая представляет энергию реорганизации данной реакции в водном окружении, нижняя прямая — энергию реорганизации для реакции в бесконечном гомогенном белке, кривые соответствуют белковой глобуле при различных значениях геометрических параметров. Как видно из рисунка, энергия реорганизации в белковой глобуле значительно (на 95–120 кДж моль⁻¹) меньше, чем в воде. Физическая причина этого ясна: часть растворителя вблизи реагентов заменяется слабореорганизуемой средой — белком, что и снижает энергию реорганизации. С другой стороны, энергия реорганизации в глобуле заметно выше, чем в бесконечном белке, т.е. определённый вклад вносит водное окружение глобулы.

Взаимодействие переносимого заряда с белком и водным окружением зависит, естественно, от геометрии системы. Это хорошо видно из кривых, приведённых на рис. 3. Чем ближе оба реагента к границе раздела белок —

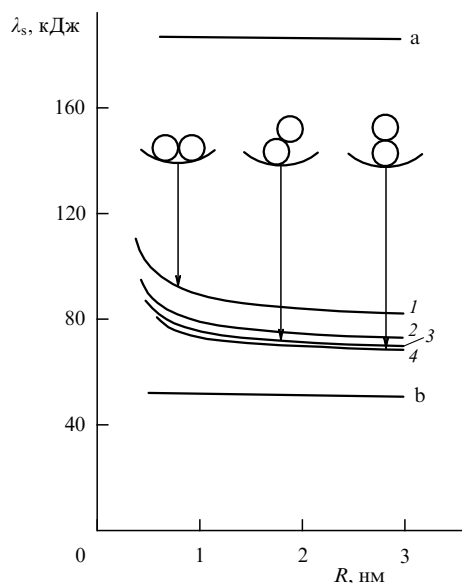


Рис. 3. Зависимость энергии реорганизации от радиуса глобулы для следующей модели. Два сферических реагента с радиусами 0,2 нм, касающиеся друг друга, расположены в сферической глобуле так, что реагент 1 касается её поверхности, а центр реагента 2 находится на следующих расстояниях от её поверхности: 0,2 нм (реагент касается поверхности) — кривая 1; 0,3, 0,4 и 0,6 нм — кривые 2–4 соответственно. Показаны схемы расположения реагентов для кривых 1, 3 и 4. Прямая а соответствует реагентам в воде, прямая б — реагентам в бесконечном белке. (По данным [122].)

вода, тем больше энергия реорганизации. Возрастание радиуса глобулы при заданном расстоянии реагентов от её поверхности увеличивает экранирование заряда белком и, следовательно, уменьшает энергию реорганизации. Эта зависимость сильнее при малых радиусах; при дальнейшем возрастании радиуса глобулы из взаимодействия с зарядом исключаются всё более далёкие слои воды и эффект её замены белком становится слабее.

Вследствии низкие значения энергий реорганизации белка также были получены для ряда конкретных реакций в результате микроскопического моделирования, а в более поздних работах — с помощью методов молекулярной динамики (см., например, [123–135]). Важно отметить, что в некоторых случаях была показана квадратичная зависимость энергии от соответствующего микроскопического параметра — зависимость, которая лежит в основе уравнения Маркуса (см., например, [129, 133]). Таким образом, выводы полуконтинуальной теории полностью согласуются с результатами микроскопического моделирования².

² Роль низкой энергии реорганизации была подчеркнута в 1989 г. Уоршелом и др. [129]. К сожалению, авторы [129] представляют это заключение, полностью совпадающее с нашими сделанными ранее выводами, как нечто принципиально отличное от них. В работе [129, р. 4805] утверждается следующее: "Это заключение может не удивить тех, кто знаком с более ранними макроскопическими аргументами Кришталлика и сотрудников, которые пытались оценить энергию реорганизации для различных ферментативных реакций на основе макроскопической модели, рассматривающей активный центр белка как бесструктурную низкодиэлектрическую среду... К сожалению, неполярные области белка будут скорее замедлять, чем ускорять реакцию переноса заряда из-за потери собственной энергии (энергии сольватации)... Это обстоятельство было фактически признано Кришталликом в его последующих исследованиях (см. ссылку 12 ([137]

Как видно из предшествующих рассуждений (а также из результатов расчётов и экспериментальных данных для ряда конкретных систем (см. раздел 4.4.3)), энергия реорганизации весьма существенно зависит от геометрии системы (размера реагентов и их расположения относительно друг друга и границы белок – вода). Поэтому не имеет физического смысла часто встречающееся в литературе использование "энергии реорганизации белка" как некоего постоянного параметра.

4.2. Энергия активации переноса заряда и геометрия белковой глобулы

В этом разделе мы ставим целью выяснить характер зависимости энергии активации от геометрических параметров нашего гетерогенного диэлектрика (белок + вода). Примем λ_i постоянной — на форме зависимости это допущение практически не сказывается. Что касается ΔG , то эта величина включает в себя как весьма существенный постоянный для данной реакции внутримолекулярный вклад ΔG_i , так и вклад, обусловленный взаимодействием заряда с окружением, т.е. ΔG_{pol} и $\Delta G_{p.f.}$. Поскольку, как было показано в [64] (см. также раздел 4.4.1), поляризационные компоненты λ_s и ΔG_{pol} не зависят от предсуществующего поля, можно объединить ΔG_i и $\Delta G_{p.f.}$ в некую величину ΔG_{str} , определяемую структурой реагентов и белка, и рассматривать её как параметр. Разумеется, для реальных глобул разного размера величина предсуществующего поля является различной и определяется не только ближайшими к реакционному центру диполями, но и более удалёнными слоями белка; однако, начиная с некоторого расстояния от центра, вклад других областей заметно уменьшается. Поэтому в первом приближении предсуществующее поле можно считать постоянным, что позволяет качественно оценить тенденцию изменения энергии активации при изменении размера глобулы. В приведённых ниже примерах мы варьировали ΔG_{str} в интервале ± 10 ккал моль⁻¹, что позволяет охватить обычный разброс величин энергий активации. Результаты некоторых модельных расчётов представлены на рис. 4, 5.

Как видно из этих данных, при прочих равных условиях энергия активации ниже, если при реакции перенос заряда направлен из внутренней части глобулы к её внешней границе. Это понятно, поскольку при таком направлении переноса возникает выигрыш в энергии взаимодействия заряда с водным окружением [136]. Поскольку при полном каталитическом цикле заряд должен в конце концов вернуться в исходное положение, неизбежно присутствуют оба направления переноса заряда. Следовательно, для оптимизации катализа необходимо, чтобы в наименее энергетически выгодной

в настоящем обзоре. — Л.И.К.)". Это возражение, которое неоднократно повторяется в статьях Уоршела вплоть до настоящего времени (см., например, [3]), основано на смешении понятий "неполярный" и "низкодиелектрический" (см. раздел 2). Наша позиция, неоднократно излагавшаяся (в том числе задолго до появления статьи [129]), состоит в том, что белок обладает предорганизованной структурой и только совместное действие низкой диэлектрической проницаемости (низкой энергии реорганизации) и внутримолекулярного электрического поля позволяет объяснить основные особенности энергетических характеристик процесса ферментативного катализа (см., в частности, [137], а также раздел 4.3). С учётом этого обстоятельства противоречие, о котором пишут Уоршел и др., в действительности отсутствует.

стадии процесса (наибольшее положительное ΔG_{str}) заряд переносился изнутри глобулы наружу. Мы проанализировали структуры ряда глобулярных ферментов с известным механизмом реакции, и во всех случаях медленная стадия реакции была действительно связана со сдвигом заряда изнутри вовне. Это справедливо для

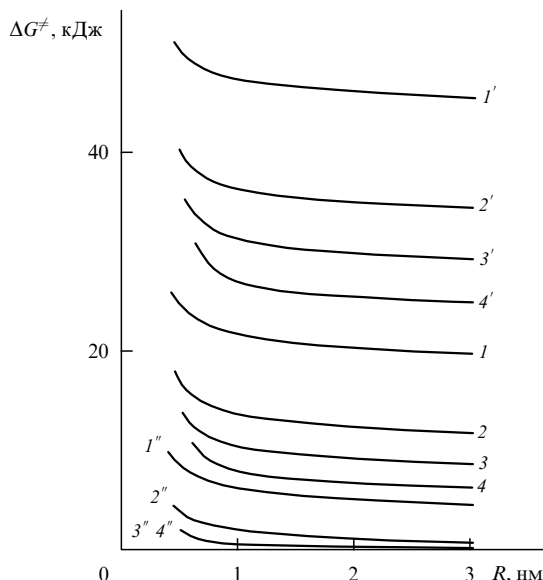


Рис. 4. Зависимость энергии активации от радиуса глобулы для той же модели, что и на рис. 3. Перенос заряда от реагента 2 к реагенту 1, т.е. изнутри глобулы к её поверхности. Для кривых 1–4 $\Delta G_{str} = 0$, для кривых 1'–4' $\Delta G_{str} = 41,8$ кДж моль⁻¹, для кривых 1''–4'' (на рисунке кривые 3'' и 4'' практически сливаются) $\Delta G_{str} = -41,8$ кДж моль⁻¹. (По данным [122].)

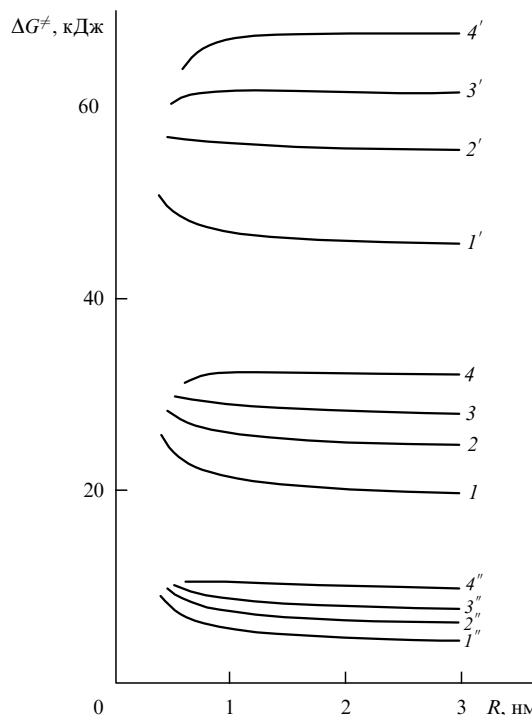


Рис. 5. Зависимость энергии активации от радиуса глобулы для той же модели, что и на рис. 3. Перенос заряда от реагента 1 к реагенту 2, т.е. от поверхности глобулы внутрь её. Для кривых 1–4 $\Delta G_{str} = 0$, для кривых 1'–4' $\Delta G_{str} = 41,8$ кДж моль⁻¹, для кривых 1''–4'' $\Delta G_{str} = -41,8$ кДж моль⁻¹. (По данным [122].)

сериновых и цистеиновых протеиназ, рибонуклеазы, ли-зоцима, НАД-зависимых³ дегидрогеназ [120, 122].

Далее, выгодным является перенос заряда под острым углом к поверхности глобулы: при этом энергия активации является почти минимальной (см. рис. 4), но зато удаётся избежать погружения исходного заряда на большую глубину в белок, что энергетически невыгодно. Этот вывод также подтверждается структурой активного центра названных выше ферментов.

Как видно из результатов наших расчётов, и энергия реорганизации, и энергия активации переноса заряда убывают с увеличением радиуса глобулы, сначала быстро, а затем весьма медленно (см. рис. 3, 4). Отсюда следует, что должен существовать некоторый интервал оптимальных радиусов, при котором энергия активации почти минимальна и одновременно минимальной является затрата "строительного материала", т.е. белка. Быстрым начальным уменьшением энергии активации с возрастанием радиуса объясняется тот экспериментальный факт, что размеры ферментных глобул, как правило, существенно больше размеров собственно активного центра.

В рамках описанной приближённой модели (сферические глобула и реагенты) дана оценка оптимального радиуса (радиуса, при котором замедляется ход зависимости ΔG^\ddagger от R); заданными являются размеры реагентов, расстояние между ними и их расположение относительно поверхности глобулы. Эта оценка дала правильный порядок величины и правильные относительные размеры ферментов (по сравнению с реальными размерами рассчитанные радиусы несколько занижены, что является естественным ввиду приближённости модели).

Интересно сравнение трёх сериновых протеиназ: хитотрипсина, субтилизина и карбоксипептидазы, обладающих одинаковой структурой и размерами активного центра. Для первых двух радиусы глобул практически одинаковы, тогда как для карбоксипептидазы, отличающейся от них только ориентацией активных групп относительно поверхности глобулы, радиус существенно больше из-за изменившихся геометрических условий взаимодействия с водным окружением [120, 122].

4.3. Высокая каталитическая активность ферментов как результат сочетания низкой поляризуемости белка и предсуществующего внутрибелкового электрического поля

Выше мы показали (см. разделы 4.1, 4.2), что низкая статическая диэлектрическая проницаемость белка приводит к низкой энергии реорганизации. С другой стороны, низкая диэлектрическая проницаемость делает невыгодным существование в белке заряженных групп, что в принципе может повысить энергию активации реакции по сравнению с таковой в водной среде, особенно если процесс сопровождается увеличением общего заряда реагентов. Кроме того, последовательное сравнение двух сред требует учесть и энергию переноса заряда ΔG_{tr} из одной среды в другую (или различие в энергиях образования заряда в данных средах). Эффективная энергия активации выражается как

$$\Delta G_{\text{eff}}^\ddagger = \Delta G_{tr} + \Delta G^\ddagger. \quad (9)$$

Были выполнены расчёты энергии активации для ряда типичных реакций (разделение зарядов, их нейтрализация, перенос заряда от исходно заряженного реагента к незаряженному, перенос зарядов от двух доноров к одному акцептору и др.). При этом модельные представления привлекались для количественной оценки энергии активации (см. раздел 4.2, а также [122, 137, 138]), однако общие выводы не зависят от той или иной конкретной модели [122]. Эти выводы состоят в том, что в некоторых случаях энергия активации собственно элементарного акта в среде с низкой диэлектрической проницаемостью меньше, чем в воде, а в некоторых случаях — больше. Однако во всех случаях эффективная энергия активации в низкодиэлектрической среде выше, чем в высокодиэлектрической. Иными словами, дополнительная затрата энергии на перенос заряда в среду с низкой диэлектрической проницаемостью (или на образование в ней заряда) всегда превышает соответствующее понижение энергии активации собственно элементарного акта переноса заряда ΔG^\ddagger .

Этот вывод справедлив в случае бесструктурного диэлектрика, для которого поляризационное взаимодействие заряда с окружающей средой (борновская энергия сольватации) является единственным вкладом в электростатическую энергию системы. Белки, однако, представляют собой высокоструктурированную систему, в каждой точке которой имеется перманентное электрическое поле, предсуществовавшее до внесения в систему свободного заряда реагента. Энергия вносимого заряда в данном поле является существенной составляющей электростатической энергии системы и при соответствующем значении потенциала в области расположения реагента может компенсировать потерю борновской энергии сольватации. Примеры такой компенсации приведены в разделах 3.1, 3.4.

Величина компенсационного эффекта внутрибелкового поля может быть как несколько меньше, так и несколько больше потери борновской энергии сольватации — важно, чтобы суммарная величина ΔG была снижена до приемлемого уровня. Отметим, что чересчур сильная стабилизация заряда иногда может быть невыгодной — снижая ΔG данной стадии, такая стабилизация затрудняет осуществление следующей стадии, связанной с нейтрализацией промежуточного продукта (или выделением свободного иона).

Часто можно встретить утверждение, что внутрибелковое поле стабилизирует переходное состояние. Такое представление имеет определённые основания, в частности, для реакций переноса тяжёлых частиц, однако оно охватывает далеко не все существенные аспекты этой проблемы [138]. Для неадиабатического переноса электрона (а также протона [24]), что является весьма распространённым случаем в биохимических процессах, теряет смысл само понятие заряда переходного состояния, так как заряд практически целиком сосредоточен на одном из реагентов в начальном или конечном состоянии реакции. В этой ситуации можно говорить об электростатической стабилизации продукта реакции, в результате которой снижается высота активационного барьера. Иными словами, снижение энергии переходного состояния представляет собой следствие не прямого действия поля на заряд переходного состояния (который, как подчеркнуто выше, не является определённой величиной), а косвенным результатом снижения ΔG реакции.

³ НАД — никотинамидадениндинуклеотид.

Напомним, что переходное состояние включает в себя не только сами реагирующие группы, но и окружающую среду, находящуюся в неравновесной конфигурации. Поведение этой среды определяется энергией её реорганизации. Последняя не зависит от внутрибелкового электрического поля, а её низкое значение, типичное для белков, обусловлено характером их диэлектрического отклика.

Итак, низкая диэлектрическая проницаемость белка приводит к снижению энергии реорганизации, что способствует увеличению каталитической активности ферментов. В то же время этот фактор неблагоприятно влияет на равновесную энергию процесса, снижая энергию сольватации заряженных реагентов. Однако это неблагоприятное воздействие может компенсироваться внутрибелковым электрическим полем. Оба эффекта — низкая диэлектрическая проницаемость и внутрибелковое поле — обусловлены общим принципом архитектуры белков — фиксацией высокополярных групп в рамках определённой структуры, что создаёт своеобразную высокополярную среду с низкой диэлектрической проницаемостью. Только совместное действие указанных факторов способно обеспечить высокую каталитическую эффективность ферментов. Мы полагаем, что именно благодаря этим структурным особенностям белков ферменты получили эволюционное преимущество в качестве биологических катализаторов.

Недавно был открыт новый класс биокатализаторов — рибозимы, которые имеют химическую природу, совершенно отличную от таковой белков (см. обзор, например, в [139]). Имеется, однако, существенная структурная аналогия между рибонуклеиновой кислотой (РНК) и белками: скелет РНК содержит регулярную последовательность высокополярных фосфодиэфирных групп, а боковые цепи являются также полярными пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Как показывают рентгеноструктурные данные, эти элементы образуют достаточно плотную структуру [140]. Поэтому можно ожидать, что рибозимы также являются высокополярными низкодиэлектрическими средами.

4.4. Расчёт энергии реорганизации переноса заряда в белках

В этом разделе описываются методы расчёта энергии реорганизации переноса заряда в белках и приводятся результаты применения этих методов к конкретным системам в сравнении с экспериментальными данными [141].

4.4.1. Вывод общего уравнения для энергии реорганизации.

Начнём с краткого описания метода вывода уравнения для энергии реорганизации неструктурированного диэлектрика. Согласно Маркусу [142, 143], эта энергия может быть найдена путём проведения процесса заряжения в две стадии:

1) равновесное заряжение в среде со статической диэлектрической проницаемостью ϵ_s , при котором в полной мере проявляются все виды поляризации — медленная (инерционная) атомная и быстрая (безынерционная) электронная поляризации. Энергия этого процесса W_I ;

2) быстрое разряжение, во время которого координаты всех тяжёлых частиц (ядер) остаются неизменными и только распределение электронной плотности следует

за изменением заряда реагентов. Иными словами, на перераспределение зарядов реагентов откликается только электронная поляризуемость среды, т.е. её оптическая проницаемость ϵ_o . Соответствующую энергию обозначим как W_{II} .

По окончании этого двухстадийного процесса распределение зарядов реагентов соответствует начальному состоянию, а инерционная поляризация среды — зарядам в конечном состоянии. Следовательно, полная энергия процесса представляет собой не что иное, как энергию реорганизации среды:

$$\lambda_s = W_I + W_{II}. \quad (10)$$

Рассмотрим диэлектрик с произвольным распределением диэлектрических проницаемостей $\epsilon_s(\mathbf{r})$ и $\epsilon_o(\mathbf{r})$. Начальное распределение плотности заряда реагентов $\rho_i(\mathbf{r})$, потенциал, создаваемый этими зарядами в среде со статической проницаемостью, $\varphi_{si}(\rho_i, \mathbf{r})$. Зарядим теперь реагенты; их конечная плотность заряда имеет вид $\rho_f(\mathbf{r}) = \rho_i(\mathbf{r}) + \Delta\rho(\mathbf{r})$. Опуская детали расчёта, приведём окончательное выражение для энергии заряжения:

$$W_I = \int_V \varphi_{si}(\rho_i, \mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \frac{1}{2} \int_V \varphi_s(\Delta\rho, \mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r}. \quad (11)$$

Введём специальные обозначения для каждого члена в правой части (11):

$$W_I = W_c + W_s. \quad (11a)$$

Здесь W_c (первый интеграл) представляет собой энергию внесения заряда $\Delta\rho(\mathbf{r})$ в поле $\varphi_{si}(\rho_i, \mathbf{r})$, W_s — собственно энергия заряжения, обусловленная внесением заряда $\Delta\rho(\mathbf{r})$.

Для расчёта W_{II} предположим, что реагенты имеют заряды той же величины, но противоположного знака, $\rho_i - \rho_f = -\Delta\rho$ в среде с ϵ_o (такое изменение зарядов реагентов приводит к начальному распределению заряда в системе). Соответствующая энергия заряжения состоит из двух компонент: энергии внесения заряда $\rho_i - \rho_f$ в поле $\varphi_s(\rho_f, \mathbf{r})$, созданное после заряжения на стадии I, и энергии отклика электронной поляризации на приобретение системой заряда $\rho_i - \rho_f$,

$$W_{II} = - \int_V \varphi_s(\rho_f, \mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + \frac{1}{2} \int_V \varphi_o(\Delta\rho, \mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (12)$$

где $\varphi_o(\Delta\rho, \mathbf{r})$ — поле оптического отклика на перераспределение плотности заряда $\Delta\rho(\mathbf{r})$ в среде с ϵ_o .

После первой стадии заряжения поле $\varphi_s(\rho_f, \mathbf{r}) = \varphi_{si}(\rho_i, \mathbf{r}) + \varphi_s(\Delta\rho, \mathbf{r})$. Тогда

$$W_{II} = -W_c - 2W_s + W_o. \quad (12a)$$

Сумма (11) и (12) даёт

$$\lambda_s = \frac{1}{2} \int_V \varphi_o(\Delta\rho, \mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} - \frac{1}{2} \int_V \varphi_s(\Delta\rho, \mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = W_o - W_s. \quad (13)$$

Уравнение (13) выглядит как *разность* энергий заряжения (диэлектрического отклика) в средах с ϵ_o и ϵ_s (W_o и

W_s), когда в обоих случаях реагенты изначально не заряжены. Однако отрицательный знак второго члена возникает просто в результате суммирования W_s из уравнения (11) и $-2W_s$ из уравнения (12) (W_c и $-W_c$ из этих уравнений взаимно уничтожаются); таким образом, полная энергия λ_s , по сути, является суммой энергий W_I и W_{II} .

Как видно из уравнения (13), энергия реорганизации, в отличие от энергий заряжения W_I и W_{II} , зависит только от изменения зарядов реагентов, но не от их абсолютных величин.

Как неоднократно подчёркивалось выше, белки являются предорганизованной полярной средой в том смысле, что их диполи расположены в виде некоторой определённой структуры, существующей до заряжения реагентов [31]. Эта предорганизация приводит к формированию предсуществующего поля $\varphi_{p.f.}$. Учитывая предсуществующее поле, при выводе выражения для W_I мы должны добавить к исходному потенциалу $\varphi_{si}(\rho_i, \mathbf{r})$ потенциал $\varphi_{p.f.}(\mathbf{r})$, не зависящий от $\rho_i(\mathbf{r})$ и $\Delta\rho(\mathbf{r})$. Соответственно, в выражении для W_I появляется дополнительный интеграл

$$W_{p.f.} = \int_V \varphi_{p.f.}(\mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}) \, d\mathbf{r},$$

отражающий зависимость равновесной энергии реакции, в которую входит W_I , от предсуществующего поля.

При расчёте W_{II} появляется тот же интеграл, но со знаком минус, поскольку $\Delta\rho(\mathbf{r})$ имеет противоположный знак:

$$-W_{p.f.} = - \int_V \varphi_{p.f.}(\mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}) \, d\mathbf{r}.$$

При суммировании выражений для W_I и W_{II} оба эти интеграла взаимно уничтожаются и для λ_s получается то же уравнение (13). Таким образом, энергия реорганизации не зависит от предсуществующего поля [64].

В рамках полуконтинуального формализма поле предориентированных диполей влияет на ΔG^0 . Однако для энергии реорганизации важна не абсолютная величина этого поля, а только её изменение в процессе заряжения. Это изменение рассчитывается в рамках диэлектрического формализма. Как показано выше, энергия реорганизации переноса заряда в белках не зависит от предсуществующего поля. Поэтому методы её расчёта оказываются одинаковыми как для предорганизованных, так и для обычных сред. Независимость от внутрибелкового поля делает континуальный расчёт энергии реорганизации более точным, чем полуконтинуальный расчёт энергии реакции — в последнем случае должны быть точно известны координаты и парциальные заряды всех атомов белка.

При микроскопическом моделировании энергия взаимодействия диполей с зарядом рассчитывается в явном виде. Разность энергий взаимодействия диполей с начальным распределением заряда при начальных и конечных координатах (или наоборот) даёт величину энергии реорганизации (см., например, [129–135]). Таким образом, и в рамках этого подхода энергия реорганизации зависит только от разницы взаимодействий заряд-диполи. Поэтому неудивительно, что оба подхода приводят к схожим величинам (см. раздел 4.4.3).

Отметим одну важную особенность молекулярно-динамических расчётов: в большинстве из них до сих пор использовалась параметризация, не учитывающая в явном виде электронную поляризуемость атомов. В последнее время этот фактор принимается во внимание (так называемое приближение поляризуемых силовых полей (polarizable force field) (см., например, [134])). Следует отметить, что количественные результаты микроскопических расчётов чувствительны к используемой параметризации.

4.4.2. Методы расчёта энергии реорганизации. Мы представили уравнение (13) в виде, удобном для расчёта энергии реорганизации с помощью программ численного решения уравнения Пуассона–Больцмана (предпочтительны программы, позволяющие описывать гетерогенные системы более чем с двумя областями с разными диэлектрическими проницаемостями). При этом целесообразно выбрать следующее приближение: непрерывное распределение плотности заряда заменить набором точечных парциальных зарядов каждого атома. Иными словами, интегралы по объёму $\int_V \varphi(\Delta\rho, \mathbf{r}) \Delta\rho(\mathbf{r}) \, d\mathbf{r}$ заменяются суммами по всем атомам реагентов $\sum_i \varphi_i \Delta q_i$, где Δq_i — изменение заряда i -го атома в ходе реакции, φ_i — потенциал на i -м атоме, создаваемый изменениями зарядов всех других атомов.

Парциальные заряды атомов находятся с помощью квантово-химических расчётов, причём из разных вариантов таких распределений наиболее подходящими являются так называемые электростатические потенциалы (electrostatic potential — ESP), подбираемые так, чтобы наилучшим образом аппроксимировать электростатическое поле вне атома, создаваемое распределением электронной плотности в нём. Возможны различные аппроксимации ESP-потенциалов, и целесообразно проводить сравнение разных вариантов. Результаты конкретных расчётов энергии реорганизации показали её малую чувствительность к выбору системы парциальных зарядов.

Реагенты описываются как тела с оптической диэлектрической проницаемостью, что учитывает модуляцию их внутренних орбиталей под действием неравновесной поляризации среды (электронная поляризация диэлектрической полости (Мертц и др. [144])). Диэлектрическая проницаемость реагента ϵ_{or} обычно оценивается величинами от 2,0 до 2,5.

Программы численного решения уравнения Пуассона–Больцмана (например, DelPhi [53]) рассчитывают так называемую энергию поля реакции (энергия диэлектрического отклика, борновская энергия сольватации). Энергия заряжения в среде равна алгебраической сумме энергии заряжения в вакууме и энергии поля реакции. Следовательно, энергия реорганизации, т.е. разность энергий заряжения в оптической и статической средах, равна разности энергий поля реакции в этих средах.

Энергии диэлектрического отклика в статической среде рассчитываются со статическими проницаемостями $\epsilon_{sp} = 4-5$ для белка и $\epsilon_{sw} = 78$ для воды, при этом учитывается больцмановское распределение ионов электролита в рамках приближения Дебая–Хюккеля. В оптической среде $\epsilon_{op} = 2,5$, $\epsilon_{ow} = 1,8$, при этом заряжение в оптической среде, т.е. быстрый процесс, не включает в себя медленного перераспределения ионов. Формально это можно описать введением очень малой концентрации

ионов (например, 0,00001 моль), при которой дебаевская длина оказывается на несколько порядков больше размеров рассматриваемого при расчёте ящика, содержащего белок и его водное окружение.

4.4.3. Сравнение рассчитанных энергий реорганизации с экспериментальными.

I. *Общий обзор результатов.*

Расчёт энергии реорганизации был проведён для ряда систем различного типа: глобулярные белки (цитохром *c* нативный и модифицированный, азурин, ферредоксин), внутримембранные белки (бактериальный реакционный центр фотосинтеза, цитохром *c*-оксидаза), межбелковый комплекс. Во всех случаях, кроме оговорённых ниже, имело место разумное согласие результатов расчёта с экспериментальными данными. Следует учитывать, что экспериментальная оценка энергий реорганизации часто является довольно грубой, предоставляя только интервал вероятных значений. Расчётные величины укладываются в этот интервал.

Важным результатом расчётов, согласующимся с экспериментальными данными, является сильная зависимость энергии реорганизации от степени приближённости реакционных центров к водной фазе. Так, энергия реорганизации для реакции с участием рутениево-аминных комплексов, ковалентно привязанных к цитохрому *c* и окружённых со всех сторон водой, почти в шесть раз больше, чем для электронного переноса между двумя гемами, глубоко погружёнными во внутримембранный комплекс цитохрома *c*-оксидазы. Этот результат показывает необоснованность часто встречающегося в литературе использования величины "энергии реорганизации белка" как некоего постоянного параметра.

Для нескольких из изученных нами систем имеются литературные данные по молекулярно-динамическому моделированию. Их согласие с экспериментальными данными, как правило, не лучше, чем результатов наших полуконтинуальных расчётов (исключение составляет один из типов амин-рутинированных цитохромов *c*, для которого результаты молекулярной динамики сильно отличаются как от экспериментальных, так и от наших расчётных). Отметим, что молекулярно-динамическое моделирование требует на несколько порядков больших затрат компьютерного времени, чем расчёты в рамках континуальной электростатики.

Довольно точные экспериментальные значения получены для цитохрома *c* и его амин-рутиниевых производных. В этих системах рассчитанная энергия реорганизации оказалась ниже экспериментальной примерно на 0,2 эВ. Эта разница объясняется тем, что реакция окисления – восстановления активного центра (гема, т.е. железо-порфирина) сопровождается заметным сдвигом прилегающих к гему боковых цепей аминокислот, который не может быть описан как линейный отклик, т.е. не укладывается в рамки диэлектрического описания. Квантово-химический расчёт энергии изменения конфигурации этих аминокислотных остатков привёл к величине около 0,2 эВ, т.е. практически совпадающей с разностью экспериментальной величины и результата континуального расчёта.

Особый случай представляет собой реакция электронного переноса в межбелковом комплексе метиламинодегидрогеназы с амицианином. Экспериментальная оценка энергии реорганизации составляет 2,3 эВ, что более чем в

два раза превышает теоретическое значение 1 эВ. Такое расхождение явно превышает возможную ошибку расчёта, и поэтому оно требует соответствующего объяснения. Дело в том, что в прочном межбелковом комплексе взаимная ориентация двух белков не обеспечивает оптимальных условий для переноса электрона на большое расстояние (краткое обсуждение проблемы дальнего переноса электрона см. в заключении). Поэтому экспериментально определённая энергия активации процесса включает в себя не только энергию активации элементарного акта переноса электрона, описываемую формулой Маркуса (1), но и энергию, затрачиваемую на изменение взаимной ориентации двух белков (явление "поверхностной диффузии"). Таким образом, теоретический расчёт энергии реорганизации позволил выявить наличие для данной реакции ещё одного фактора, влияющего на её скорость.

II. *Расчёт энергии реорганизации для конкретных систем с разными классами белков.*

Оставляя в стороне детали расчётов, приведём их основные результаты.

1. *Глобулярные белки. Внешний перенос заряда.*

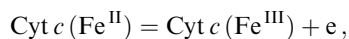
Цитохром c. Небольшой водорастворимый белок цитохром *c* служит переносчиком электронов между разнообразными электрон-транспортными цепями. Редокс-центром является гем с осевыми лигандами гистидином (моделируется имидазолом) и метионином (моделируется диметилсульфидом).

Отметим сразу, что результаты расчёта оказались малочувствительными (в пределах нескольких миллиэлектронвольт) к варьированию в разумных пределах оптической проницаемости реагента и распределения парциальных зарядов. То же было отмечено и для других систем, описанных ниже.

Расчитанное значение энергии реорганизации среды составляет 0,45 эВ при $\epsilon_{sp} = 4,0$ и 0,48 эВ при $\epsilon_{sp} = 5,0$ (последняя величина представляется более реалистичной ввиду большей подвижности фрагментов белковой структуры вблизи поверхности глобулы (см. раздел 3.3)). Таким образом, варьирование статической проницаемости белка в разумных пределах не очень сильно сказывается на конечном результате. Надо отметить, что аналогичная ситуация наблюдалась нами и для других белков.

Энергия реорганизации для лигандированного гема в бесконечном белке составляет 0,19 эВ (при $\epsilon_{sp} = 4,0$) и 0,26 эВ (при $\epsilon_{sp} = 5,0$). Разница между этой величиной и энергией реорганизации для гетерогенной системы белок – вода (0,26 эВ – 0,22 эВ) может служить приближённой мерой вклада водного окружения. Как видим, вклады белка и воды в энергию реорганизации сравнимы по масштабу.

Мы рассчитали энергию реорганизации для реакции



где электрон предполагается удаляющимся на бесконечность. Экспериментальные данные [145, 146] получены в результате исследования зависимости скорости электронного обмена от потенциала на электроде, модифицированном длинноцепочечным алифатическим спиртом. Зависимость скорости от потенциала даёт не что иное, как зависимость энергии активации от ΔG_0 реакции, откуда по уравнению (1) находится энергия реорганиза-

ции λ . Эта энергия оказалась равной 0,58 эВ. В условиях эксперимента электрон не удаляется на бесконечность, а переходит в металл. Поэтому в указанную величину следует ввести поправку, учитывающую энергию взаимодействия электрона с силами изображения. Эта поправка, рассчитанная по формуле, выведенной в работе [147], составляет 0,06 эВ; таким образом, референтное значение $\lambda = 0,64$ эВ.

Разницу между экспериментальной полной энергией реорганизации и рассчитанной энергией реорганизации среды (0,19 эВ–0,16 эВ) естественно объяснить вкладом других процессов реорганизации. Внутрисферная энергия реорганизации лигандированного гема не превышает 0,04 эВ [148]. Имеется ещё одна компонента энергии реорганизации среды, связанная со значительным сдвигом молекулы воды 156 и остатков Asn52, Tyr57 и Trp78, примыкающих непосредственно к гему [149–153]. Этот сдвиг не может быть описан в обычном диэлектрическом приближении, так как последнее предполагает линейный отклик, практически возможный только при малых сдвигах. Наши квантово-химические расчёты оценили эту "нелинейную диэлектрическую реорганизацию" окружения величиной порядка 0,2 эВ, т.е. близкой к указанной выше разности.

Микроскопическое моделирование реорганизации цитохрома *c* дало величины $\lambda = 0,40$ –0,65 эВ [132] и 0,77 эВ [133] (последнее исследование является более подробным), которые находятся в разумном согласии с результатами эксперимента и полуконтинуального расчёта.

2. Глобулярные белки. Внутриглобулярный перенос электрона.

Модифицированный цитохром c. Грей с сотрудниками разработали оригинальный способ исследования электронного переноса в белках (обзор см. в [154, 155]). Суть этого способа состоит в том, что к одной из поверхностных аминокислот белка (обычно гистидину) ковалентно привязывается редокс-активный неорганический комплекс. После того как реакция в растворе изменит валентное состояние комплекса, измеряется скорость его обмена электроном с редокс-активным центром белка. Используя серию подобных комплексов с различными редокс-потенциалами, можно определить зависимость свободной энергии активации от стандартной свободной энергии реакции и отсюда по уравнению Маркуса найти энергию реорганизации.

Мы рассчитали энергию реорганизации для представителей двух серий молекул цитохрома *c*, модифицированных по His32 рутений-аминами. Для одной серии это $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5$ и $\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{Ru}$, для другой — $\text{Ru}(\text{BPy})_2\text{Im}$. Здесь Ru — пиридин, BPy — бипиридин, Im — имидазол. Для $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5$ $\lambda = 1,12$ эВ (при $\epsilon_{\text{sp}} = 4$) и 1,18 эВ (при $\epsilon_{\text{sp}} = 5$), для $\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{Ru}$ — 0,95 эВ и 1,01 эВ соответственно. Оценивая, как и ранее, эффект водного окружения, получаем величины 0,57–0,67 эВ для первого производного и 0,47–0,55 эВ для второго. Это значительно больше, чем для немодифицированного цитохрома *c* (0,22–0,25 эВ). Такого поведения λ и следовало ожидать, так как заряд на комплексе Ru значительно менее экранирован от взаимодействия с водой по сравнению с экранированием заряда на геме, находящемся внутри белка. Экспериментальная оценка энергии реорганизации $1,20 \pm 0,05$ эВ [154, 155] найдена в основном из данных, полученных с одним более объёмным лигандом типа Ru, поэтому её следует сравнить с величинами

0,95–1,01 эВ. Разница порядка 0,2 эВ, такая же как и наблюдавшаяся для немодифицированного цитохрома *c*, вызвана, по всей вероятности, той же причиной — нелинейной реорганизацией ближнего окружения.

Для $\text{Ru}(\text{BPy})_2\text{Im}$ рассчитана энергия реорганизации 0,70–0,74 эВ. Экспериментальная оценка 0,75 эВ [156] сделана на основе серии с замещёнными BPy, т.е. с более объёмными лигандами, так что в действительности и здесь есть некоторая разница между диэлектрической и полной энергиями реорганизации.

Полностью микроскопическое моделирование замещённых цитохромов выполнено в [134]. Для $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5$ в [134] было найдено полное значение $\lambda = 1,34$ эВ, что согласуется с результатами как эксперимента, так и нашего континуального расчёта. Важно, что авторы [134] рассматривали модель поляризуемых атомов — использование модели неполяризуемых атомов повышало энергию реорганизации примерно на 40%. Для $\text{Ru}(\text{BPy})_2\text{Im}$ в [134] найдена величина $\lambda = 1,26$ эВ, которая согласуется с экспериментальными результатами значительно хуже, чем полученная при континуальном расчёте. Причина столь большого расхождения неясна.

Азурин. Фарвер и Пехт [157] исследовали реакцию между анион-радикалом дисульфида и моноядерным медным реакционным центром. Анион-радикал образовывался в результате реакции с анион-радикалом CO_2^- , получавшимся при импульсном радиолитическом расщеплении раствора. Использовались азурины из разных организмов и некоторые мутанты, что позволило изучить кинетику в определённом интервале редокс-потенциалов. Энергия реорганизации оценена как 1,39 эВ.

Рассчитанная энергия реорганизации среды составила 1,24–1,34 эВ. Эффект водного окружения оценивается величиной 0,54–0,64 эВ — это больше, чем для цитохрома *c*, поскольку в азурине реагенты находятся ближе к поверхности глобулы.

Внутрисферная энергия реорганизации для аналога реакционного центра — комплекса $\text{Cu}(\text{Im})_2(\text{SCH}_3)(\text{S}(\text{CH}_3)_2)$ — близка к 0,32 эВ [158, 159], так что ожидаемая полная энергия реорганизации составляет 1,5–1,6 эВ. Это удовлетворительно согласуется с экспериментальными данными, особенно если учесть, что данные [158] получены в довольно узком интервале энергий и они имеют большой разброс.

Ферредоксин. Ферредоксины содержат два железосерных кластера, различающихся в связи с различием их окружения своими редокс-потенциалами. Варьируя потенциал редокс-центров ферредоксина из *Chromatium vinosum* путём использования различных мутантов, удалось приближённо оценить энергию реорганизации как 0,2–0,5 эВ [160]. Наши расчёты дали величину 0,50–0,58 эВ, т.е. практически совпадающую с верхним пределом экспериментальной оценки. Влияние водного окружения для ферредоксина оказалось меньшим, чем для всех других исследованных глобулярных белков (0,16–0,19 эВ).

3. Перенос электрона во внутримембранных белковых комплексах.

Бактериальный реакционный центр фотосинтеза (БРЦ). Аналогично описанной в разделе 3.4.2 ФСЦ, БРЦ содержит несколько кофакторов, образующих две параллельные цепи, расположенные поперёк мембраны. Трансмембранный перенос электрона осуществляется в результате его перемещения от одного кофактора к

следующему. Первичным донором электронов является так называемая спецпара Р (димер бактериохлорофилла (БХ₂)) после её возбуждения светом (возбуждённое состояние Р*), первичным акцептором — мономер бактериохлорофилла (БХл). Затем электрон переносится к бактериофеофитину (БФе) и далее к хинону. Энергии реорганизации для этих реакций переноса рассчитаны в [59] в рамках модели трёхслойной мембраны; кофакторы моделировались эллипсоидами соответствующего размера [161].

Первичное разделение зарядов (Р⁺ – БХл⁻) и последующий перенос электрона к БФе происходит за время порядка 1–2 пс, причём в субпикосекундном интервале могут наблюдаться осцилляции [162, 163]. За столь короткие времена диэлектрический отклик белка развивается лишь частично. Об этом можно судить по разности уровней энергии электрона в Р* и БФе⁻, определённой методом замедленной флуоресценции по истечении некоторого времени после образования БФе⁻. Сразу после его образования (~ 2–3 пс) эта разность оценивается величиной $-0,08 \div -0,18$ эВ [164–167], через 10 пс — как $-0,20 \div -0,23$ эВ [165–167], через 100 мкс — как $-0,26$ эВ [168] и по истечении нескольких миллисекунд эта разность составляет $-0,30$ эВ [169]. Такое изменение энергии реакции может быть описано в рамках континуальной диэлектрической модели как вызванное изменением статической (квазистатической) диэлектрической проницаемости [58, 59] ϵ_s . При этом изменение ϵ_s сказывается на величинах как энергии реакции ΔG^0 , так и энергии реорганизации λ . Для реакции разделения зарядов эти два эффекта полностью взаимно компенсируются, а для реакций переноса заряда такая компенсация близка к полной. Поэтому вывод о безактивационном характере рассматриваемых реакций, сделанный на основании полуконтинуальных расчётов, практически не зависит от эффективного значения ϵ_s [58, 59].

Практически равенство рассчитанных энергий реорганизации экспериментально наблюдавшимся (на соответствующем временном интервале) энергиям реакции получено также при использовании метода молекулярной динамики [124–127, 130, 170]. Таким образом, микроскопическое моделирование даёт результаты, согласующиеся с результатами, полученными методами континуальной электростатики.

Поскольку мы имеем дело с разными ϵ_s , т.е. разными λ на разных временных интервалах, оказывается возможной полиэкспоненциальная кинетика [171]. На очень малых временах происходит быстрый безактивационный перенос электрона. Но, поскольку на малых временах энергетический зазор мал (за короткое время ионы плохо сольватируются), вскоре включается обратная реакция и наступает равновесие. По мере дальнейшего усиления диэлектрического отклика сольватация возрастает и равновесие сдвигается в сторону всё более полного разделения зарядов. На этой стадии скорость процесса в целом определяется уже не закономерностями электронного переноса, а скоростью релаксации белка к новому равновесному состоянию. Альтернативное объяснение полиэкспоненциальной кинетики — микрогетерогенность системы, наличие набора конформационных субсостояний, различающихся кинетическими параметрами (хотя вряд ли им можно приписывать одинаковые энергии реорганизации) [172, 173]. Если переход между этими состояниями осуществляется со скоростями, срав-

нимыми со скоростью реакции, то, по сути, этот вариант близок к рассмотренному выше. Такая ситуация возможна при физиологических температурах, но при низких температурах переходы между субсостояниями заморожены [174].

Перенос электрона от БФе⁻ к хинону, происходящий за время порядка 100 пс, сопровождается сильным уменьшением энергии (по оценкам [58, 59] — на 0,52–0,54 эВ). Такой перепад энергии в основном необходим для того, чтобы предотвратить возврат электрона в исходное состояние. Для того чтобы обеспечить высокую скорость (безактивационный характер) процесса, необходима энергия реорганизации, практически равная по абсолютной величине энергии реакции. Именно такая величина получена в результате полуконтинуального расчёта — повышение энергии реорганизации достигнуто благодаря использованию акцептора хинона, т.е. кофактора значительно меньшего размера, чем БФе, и увеличению расстояния между реагентами.

Приведённое выше значение энергии реакции соответствует ситуации, в которой стабилизация анион-радикала семихинона происходит только благодаря диэлектрической релаксации. При физиологических рН зарядение хинона приводит к протонированию близлежащих аминокислотных остатков, что способствует дополнительной стабилизации анион-радикала. (См. более подробное обсуждение этого эффекта "протонной релаксации" в [171].)

Цитохром с-оксидаза (СсО). В комплексе СсО осуществляется целый ряд разнообразных процессов, из которых мы рассмотрим только две реакции электронного переноса: между гемами a и a_3 и между биядерным медным центром Сс_А и гемом a .

Для первой из этих реакций авторы работы [175] исследовали температурную зависимость скорости и равновесия электронного обмена между гемами a и a_3 . На основе этих данных дана оценка энергии реорганизации 0,05–0,20 эВ (верхний предел представляется более вероятным). Поскольку оба гема расположены в самой середине мембраны, наиболее вероятными являются низкие значения статической диэлектрической проницаемости. В результате расчёта при $\epsilon_{sp} = 3,5$ и $3,0$ получены значения λ_s соответственно 0,24 эВ и 0,17 эВ, которые близки к наиболее вероятной экспериментальной оценке (внутрисферной реорганизацией гемов можно пренебречь). Вклад водного окружения в энергетический баланс составляет только 0,06–0,07 эВ, поскольку гемы хорошо экранированы от взаимодействия с водой. Викстрём с сотрудниками [135] в результате микроскопического моделирования этой реакции получили $\lambda_s = 0,2$ эВ. Последняя величина практически совпадает с приведённым выше результатом полуконтинуального расчёта.

Для переноса электрона между Сс_А и гемом a экспериментальные оценки энергии реорганизации оказываются довольно неопределёнными — от 0,15 эВ до 0,5 эВ [176, 177]. Рассчитанная энергия реорганизации среды составляет 0,48 эВ при $\epsilon_{sp} = 4$ и 0,30 эВ при $\epsilon_{sp} = 3$; эффект водного окружения оценивается как 0,11 эВ и 0,15 эВ соответственно — в данном случае Сс_А менее экранирован, чем гем. Нам неизвестно пространственное распределение диэлектрической проницаемости в этом комплексе, но, поскольку медный центр расположен дальше от его середины, большее значение ϵ_{sp} представляется более вероятным. К энергии реорганизации среды

надо добавить внутрисферную компоненту, которая может быть оценена величиной 0,22 эВ [159, 178]. Ожидаемое значение полной энергии реорганизации 0,5–0,7 эВ близко к верхнему пределу экспериментальной оценки.

4. Межбелковый перенос электрона.

Экспериментально изучен перенос электрона в ряде комплексов, образующихся при контакте двух белков. Например, в результате исследования зависимости ΔG^\ddagger от ΔG^0 была получена энергия реорганизации реакции цитохрома *b₅* с цитохромом *c*, равная 0,8 эВ [179]. Аналогично для реакций цитохрома *c*-551 с пластоцианином и рустицианином найдены практически одинаковые (около 0,38 эВ) значения λ [180], которые лежат в обычных пределах, характерных для реакций в белках.

Особый интерес представляет реакция метиламинодегидрогеназы с амицианином и его мутантами. Для этой реакции экспериментально определена необычно высокая энергия реорганизации, $\lambda = 2,3 \pm 0,1$ эВ [181]. Полукоординатный расчёт приводит к величинам 0,68–0,72 эВ; даже если к этому добавить внутрисферную энергию реорганизации медного центра — около 0,3 эВ, то суммарная величина всё равно оказывается намного меньше экспериментального значения. Дэвидсон [181] объясняет большую величину λ реориентацией двух молекул воды, близких к активному центру дегидрогеназы. Однако это объяснение вряд ли можно признать адекватным. Мы рассчитали энергию реорганизации для воображаемой системы, в которой белок полностью заменён водой, получив таким образом предельно завышенный эффект от воды. Соответствующая величина оказалась равной 1,72 эВ, что также существенно меньше экспериментального значения.

Объяснение этой аномалии видится в следующем. Значение $\lambda = 2,3$ эВ получено исходя из величины энергии активации, найденной при исследовании температурной зависимости скорости реакции. Однако эта "кажущаяся" энергия активации включает в себя не только энергию активации собственно элементарного акта реакции, но и энергию, затрачиваемую на образование самого реакционного комплекса, в котором затем и происходит перенос электрона. В оригинальной теории Маркуса — это энергия сближения, при котором преодолевается взаимное отталкивание реагентов (например, одноимённо заряженных ионов). При реакции двух белков важным является достижение такой взаимной ориентации макромолекул, которая обеспечивает оптимальный путь переноса электрона. Эта конфигурация может заметно отличаться от той, которая является оптимальной для образования межбелкового комплекса. Переход от одной конфигурации к другой (так называемая "поверхностная диффузия" [179]) может потребовать существенной затраты энергии, т.е. значительно увеличится измеряемая энергия активации. Весьма вероятно, что именно этот фактор играет существенную роль в рассматриваемом случае, поскольку комплекс дегидрогеназы с амицианином является весьма прочным.

4.5. Низкая энергия реорганизации белка — исследование методом флуоресцентной спектроскопии

Метод исследования стоксовых сдвигов спектра флуоресценции [88] позволяет охарактеризовать энергию реорганизации белка без привлечения каких-либо данных о кинетике ферментативных реакций переноса заряда. При оптическом возбуждении некоторой хромо-

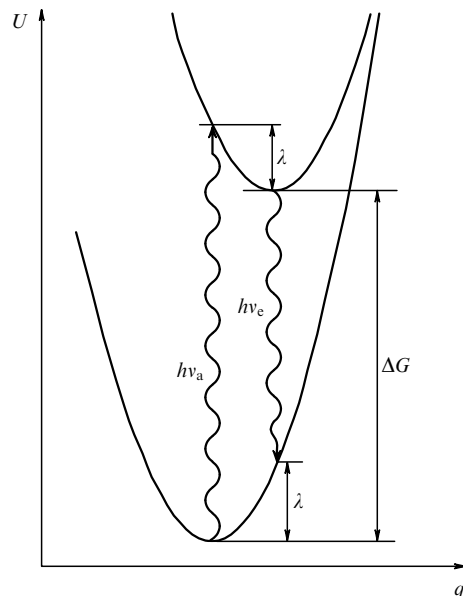


Рис. 6. Вид потенциальных кривых для основного (нижняя кривая) и возбуждённого (верхняя кривая) электронных состояний. $h\nu_a$ — энергия максимума поглощения, $h\nu_e$ — энергия в максимуме излучения.

форной группы происходит перераспределение электронной плотности и окружающая среда перестраивается в соответствии с новым распределением заряда. В классической системе стоксов сдвиг равен удвоенной энергии реорганизации [182, 183] (рис. 6). Учёт изменения колебательных уровней основного и возбуждённого состояний приводит к соответствующей поправке [184].

В качестве флуорофора был выбран краситель профлавины (ПФ), спектр флуоресценции которого не подвержен воздействию ряда возможных осложняющих эффектов [185]. ПФ является конкурентным ингибитором α -химотрипсина (ХТ), заполняющим так называемый карман связывания в активном центре фермента (условия его полного связывания определены в [186]). Таким образом, оказывается возможным оценить энергию реорганизации непосредственно в активном центре фермента.

Не останавливаясь на деталях эксперимента и его обработки, приведём конечный результат. На рисунке 7 кружками обозначены значения половины стоксова сдвига ПФ в ряде апротонных растворителей. Эти величины хорошо коррелируют с энергиями реорганизации среды, рассчитанными на основе квантово-химических данных о перераспределении зарядовой плотности при оптическом возбуждении молекулы; они могут служить эталоном для сравнения спектров ПФ, связанного с белком. Верхняя горизонтальная стрелка показывает величину стоксова сдвига ПФ в комплексе ПФ + ХТ, растворённом в воде. Эта величина близка к таковой для ПФ в растворителе умеренной полярности, но она значительно меньше стоксова сдвига для ПФ в чисто водном окружении (последний отмечен на рисунке ромбом; заметим, что стоксов сдвиг для ПФ в воде существенно выше, чем можно было бы ожидать в растворителе с макроскопическими диэлектрическими характеристиками воды — вода проявляет аномально высокую реорганизационную способность). Стоксов сдвиг комплекса в водном растворе отражает как вклад самого белка, так и вклад его водного окружения. Чтобы оценить чисто

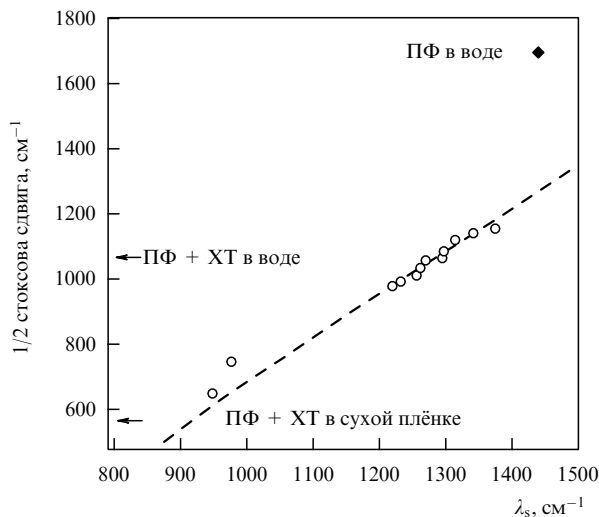


Рис. 7. Зависимость 1/2 стоксова сдвига спектра флуоресценции профламина (ПФ) от рассчитанной в рамках континуальной электростатики энергии внешнесферной реорганизации (перераспределение парциальных зарядов при оптическом возбуждении рассчитано квантово-химически с учётом диэлектрической проницаемости окружения). Кружки — данные для ряда апротонных растворителей и их смесей, тёмным ромбом показана соответствующая величина для воды. Верхняя горизонтальная стрелка указывает на значение стоксова сдвига для комплекса α -химотрипсина (ХТ) с ПФ в водном растворе, нижняя — для того же комплекса в виде сухой плёнки. (По данным [88].)

белковый вклад, были измерены спектры флуоресценции комплекса в высушенной белковой плёнке (стоксов сдвиг показан нижней горизонтальной стрелкой). Видно, что в данной системе энергия реорганизации меньше, чем даже в таком малополярном растворителе, как дихлорметан ($\epsilon_{sp} = 9$, нижняя точка).

Изучение флуоресценции связанного с белком красителя позволило обнаружить релаксационные эффекты также в глобулярных белках [88, 187]. Выявлены характерные времена релаксации от нескольких пикосекунд до нескольких наносекунд [187]. Интересно, что времена, большие наносекундных, дают очень малый (всего несколько процентов) вклад в общую энергию реорганизации белка [88]. В этом глобулярный белок (в данном случае α -химотрипсин) оказался заметно отличным от реакционного центра фотосинтеза (см. выше). Возможно, сказались как более компактная структура глобулы, так и отсутствие заметной протонной релаксации.

5. Заключение

Особенности белков как диэлектриков вытекают из общих принципов их структурной организации — фиксации большого числа высокополярных групп в рамках довольно жёсткой структуры. Фиксация, т.е. довольно низкая подвижность диполей, обуславливает весьма слабый диэлектрический отклик белка, т.е. низкую статическую диэлектрическую проницаемость. Заданность, в определённых пределах, ориентации диполей приводит к наличию значительного внутрибелкового электрического поля. Оба эти следствия, отражающие отличие белков от обычных полярных растворителей, позволяют определить белки как высокополярные низкодиелектрические среды.

Низкая статическая диэлектрическая проницаемость белков имеет два важных следствия. С одной стороны, это низкая энергия реорганизации среды, существенно снижающая энергию активации большинства реакций. С другой стороны, это плохая сольватация заряженных частиц, делающая перенос заряда в белковую среду энергетически невыгодным и, следовательно, тормозящим процесс. Для бесструктурного диэлектрика этот второй, энергетически невыгодный, эффект является преобладающим. Однако он может быть компенсирован внутрибелковым электрическим полем. *Только совместное действие двух факторов — низкой энергии реорганизации и внутрибелкового электрического поля — способно обеспечить существенное уменьшение энергии активации, т.е. высокую каталитическую активность ферментов. Следует подчеркнуть, что оба указанных эффекта являются прямым следствием общего принципа структурной организации всех белков.*

Хорошо известно, что ферментативный катализ является весьма структурно-специфичным. Это выражается в такой структуре активного центра, которая обеспечивает связывание определённых субстратов, сближение и взаимную ориентацию субстрата и соответствующих каталитических групп. К этому перечню структурно-обусловленных свойств следует теперь добавить такой структурный фактор, как пространственная конфигурация внутрибелкового поля, необходимая для обеспечения благоприятного энергетического эффекта процесса переноса заряда. Это поле определяется не только аминокислотными остатками самого активного центра, но и значительным количеством диполей пептидных групп и боковых цепей, входящих в его окружение.

Расчёт внутрибелкового поля предполагает, что координаты и парциальные заряды всех атомов белка известны. Предсуществующее поле парциальных зарядов экранируется только электронной поляризацией белка (его оптической диэлектрической проницаемостью), поскольку положение всех атомов в данной структуре фиксировано. Напротив, внесение нового заряда, отсутствовавшего в исходной структуре белка, вызывает изменение структуры, т.е. сдвиг атомов. Поэтому такой борновский процесс заряжения включает в себя все виды поляризации, и, следовательно, его энергия должна рассчитываться с использованием статической диэлектрической проницаемости. Необходимость применения двух разных диэлектрических проницаемостей при полуконтинуальном расчёте равновесных энергетических эффектов является специфической особенностью белков как структурированных полярных сред.

Сложная структура белков определяет наличие разных характерных времён диэлектрической релаксации для различных элементов этой структуры, что особенно сказывается на кинетике быстрых реакций электронного переноса, скорость которых сравнима со скоростью релаксации тех или иных диполей белка.

Наконец, важную роль играет гетерофазность биологических объектов, в частности водное окружение многих белков. Этот фактор необходимо учитывать при любом количественном анализе процессов переноса заряда в белках.

Мы рассмотрели влияние диэлектрических свойств белка на реакции переноса заряда. Однако это лишь один из аспектов проблемы специфики белков как среды

реакции. Имеются и другие особенности белков, не сводимые к их диэлектрическим свойствам. Рассмотрение этих проблем выходит за рамки данного обзора, поэтому мы ограничимся лишь кратким перечислением некоторых из них.

Наряду с диэлектрическим откликом, т.е. небольшими сдвигами атомов, практически пропорциональными электрическому полю (сюда же в известном смысле можно отнести и нелинейный отклик, связанный с заметным изменением ориентации отдельных аминокислотных остатков), в ряде систем наблюдаются крупномасштабные конформационные изменения структуры белка, связанные с движением доменов в выделенных направлениях. Возможность таких движений привела к формулировке представления о белках как о молекулярных машинах [188, 189].

Характер движений доменов может быть различным. Так, шарнирно связанный с bc_1 -комплексом белок Риске совершает периодические движения от сайта связывания убинола, от которого он принимает электрон, к цитохрому c_1 , которому он отдаёт этот электрон [190]. Это устройство, которое не использует для своей работы энергию какой-либо определённой химической реакции, вряд ли может быть названо молекулярной машиной в строгом смысле этого слова. Машинами, использующими энергию аденозинтрифосфата (АТФ), являются линейные моторы, в которых обусловленные гидролизом АТФ изменения конформации вызывают передвижение одних белков относительно других, например миозиновых нитей относительно актина или молекул кинезина относительно тубулиновой микротрубочки [191]. Ещё более сложные соотношения характерны для вращающихся молекулярных моторов, в частности для наиболее эффективного и наиболее важного среди них — АТФ-синтазы [192]. В этом устройстве накопленная химическая энергия, равная разности электрохимических потенциалов протона, превращается в механическую энергию вращения комплекса F_0 , которая передаётся комплексу F_1 , вызывая его конформационные изменения, приводящие к синтезу АТФ, т.е. к превращению механической энергии в химическую. Рассматриваемая система может функционировать и в обратном направлении, действуя как протонный насос. Отметим, что и в этих процессах электростатические взаимодействия играют существенную роль.

В ряде ферментативных реакций переноса протона проявляются эффекты, редкие для гомогенных реакций в жидкостях. В растворах донор и акцептор протона (кислота и основание) обычно имеют водородную связь и могут довольно легко сблизиться друг с другом до расстояний, значительно меньших равновесного. Такое сближение приводит к существенному снижению барьера по координате протона, так что протон может перейти в конечное состояние классическим путём, т.е. надбарьерно. Во многих белках возможность сближения донора и акцептора протона ограничена вследствие их связи с белковой матрицей. В этом случае соответствующий барьер оказывается высоким и преобладающим становится подбарьерный (туннельный) переход. Вероятность туннелирования зависит от массы частицы, поэтому для таких реакций наблюдается существенный кинетический изотопный эффект [24].

Для обширных классов биологических редокс-реакций характерен перенос электрона на большие расстоя-

ния, что весьма существенно сказывается на величине предэкспоненциального множителя (см. обзоры [193, 194]). Перенос электрона осуществляется по механизму сверхобмена, при котором имеет место перекрывание волновых функций верхних занятых или нижних свободных орбиталей молекул, расположенных между донором и акцептором [194]. Межатомные расстояния для атомов, имеющих ковалентные связи, значительно короче, и, следовательно, перекрывание волновых функций значительно больше, чем для атомов, находящихся в вандер-ваальсовом контакте. Поэтому в белках, обладающих разветвлённой системой ковалентных связей, дальний перенос электронов встречается значительно чаще, чем в низкомолекулярных растворителях. Это является существенной особенностью белков как среды реакций переноса электронов.

Вероятность переноса электрона экспоненциально убывает с увеличением числа промежуточных связей. Расстояние переноса электрона изменяется симбатно с возрастанием числа связей, поэтому наблюдается экспоненциальный спад вероятности с увеличением расстояния [193]. Иногда эту зависимость объясняют как зависимость вероятности туннелирования от толщины барьера. В действительности, однако, не существует однозначной зависимости предэкспоненты от расстояния, хотя во многих случаях такая эмпирическая зависимость является оправданной.

В белке существует большое число возможных параллельных путей переноса. Как показали Ники и др. [195], перенос электрона к цитохрому c от металла, покрытого монослоем длинноцепочечной карбоновой кислоты, осуществляется практически только через один из окружающих гем многочисленных лизинов (Лиз 13). Этот аминокислотный остаток связан с гемом самой короткой цепью ковалентных связей, поэтому он предоставляет самый короткий путь переноса электрона. Геометрические расстояния других лизинов от гема являются практически такими же, но цепь их ковалентных связей значительно длиннее.

Другой пример — электрохимическое восстановление молекулы гемина, адсорбированной на монослое карбоновой кислоты. Изменение ориентации углеводородных цепей кислоты при изменении рН раствора приводит к двукратному уменьшению толщины слоя, но скорость реакции остаётся практически той же, поскольку не меняется число ковалентных связей между электродом и гемом [196].

Структура белков определяет их способность выполнять самые разнообразные функции. В настоящем обзоре мы остановились на связи общих принципов архитектуры белков с их свойствами как диэлектрической среды реакций переноса заряда. Этим, конечно, не исчерпывается роль структурного фактора — от него зависят специфичность взаимодействия белков между собой и с низкомолекулярными веществами, механохимические превращения, пути дальнего переноса электронов и др. Проблема связи структуры и функции белков является одной из центральных в молекулярной биофизике, и исследование её различных аспектов представляет чрезвычайный интерес.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-03-00085-а). Автор выражает благодарность всем коллегам, участвовавшим в исследованиях, описанных в настоящем обзоре.

Список литературы

- Schaefer M, van Vlijmen H W T, Karplus M *Adv. Protein Chem.* **51** 1 (1998)
- Simonson T *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11** 243 (2001)
- Shurki A, Warshel A *Adv. Protein Chem.* **66** 249 (2003)
- Simonson T *Rep. Prog. Phys.* **66** 737 (2003)
- Olsson M H M, Parson W W, Warshel A *Chem. Rev.* **106** 1737 (2006)
- Gunner M R et al. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **1757** 942 (2006)
- Koehl P *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16** 142 (2006)
- Simonson T *Photosynthesis Res.* **97** 21 (2008)
- Ullmann G M et al. *Photosynthesis Res.* **97** 33 (2008)
- Kamerlin S C L, Haranczyk M, Warshel A *J. Phys. Chem. B* **113** 1253 (2009)
- Marcus R A *Annu. Rev. Phys. Chem.* **15** 155 (1964)
- Догондзе Р Р, Кузнецов А М *Кинетика химических реакций в полярных растворителях* (Итоги науки и техники. Сер. Физическая химия. Кинетика, Т. 2) (М.: ВИНТИ, 1973) с. 5
- Dogonadze R R, Kuznetsov A M *Prog. Surf. Sci.* **6** 1 (1975)
- Кришталлик Л И *Электродные реакции. Механизм элементарного акта* (М.: Наука, 1979)
- Ulstrup J *Charge Transfer Processes in Condensed Media* (Lecture Notes in Chemistry, Vol. 10) (Berlin: Springer-Verlag, 1979)
- Dogonadze R R, Kuznetsov A M, in *Kinetics and Mechanisms of Electrode Processes* (Comprehensive Treatise of Electrochemistry, Vol. 7, Eds В E Conway et al.) (New York: Plenum Press, 1983) p. 1
- Newton M D, Sutin N *Annu. Rev. Phys. Chem.* **35** 437 (1984)
- Marcus R A, Sutin N *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Rev. Bioenerg.* **811** 265 (1985)
- Krishtalik L I *Charge Transfer Reactions in Electrochemical and Chemical Processes* (New York: Consultants Bureau, 1986)
- Kuznetsov A M *Charge Transfer in Physics, Chemistry, and Biology. Physical Mechanisms of Elementary Processes and an Introduction to the Theory* (Luxembourg: Gordon and Breach Publ., 1995)
- Marcus R A, in *Protein Electron Transfer* (Ed. D S Bendall) (Oxford: BIOS Sci. Publ., 1996) p. 249
- Kuznetsov A M, Ulstrup J *Electron Transfer in Chemistry and Biology. An Introduction to the Theory* (New York: Wiley, 1999)
- Kuznetsov A M *Stochastic and Dynamic Views of Chemical Reaction Kinetics in Solutions* (Lausanne: Presses Polytechniques et Univ. Romandes, 1999)
- Krishtalik L I *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **1458** 6 (2000)
- Krishtalik L I *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **849** 162 (1986)
- Perutz M F *Proc. R. Soc. Lond. B* **167** 448 (1967)
- Минкин В И, Осипов О А, Жданов Ю А *Дипольные моменты в органической химии* (Л.: Химия, 1968) [Minkin V I, Osipov O A, Zhdanov Yu A *Dipole Moments in Organic Chemistry* (New York: Plenum Press, 1970)]
- Wada A, in *Polyamino Acids, Polypeptides, and Proteins. Proc. of an Intern. Symp., 1961* (Ed. M A Stahmann) (Madison: Univ. of Wisconsin Press, 1962) p. 131
- Applequist J, Mahr T G *J. Am. Chem. Soc.* **88** 5419 (1966)
- van Duijnen P T, Thole В T *Biopolymers* **21** 1749 (1982)
- Кришталлик Л И *Молекулярная биология* **8** 91 (1974)
- Bayley S T *Trans. Faraday Soc.* **47** 509 (1951)
- Marićić S, Pifag G, Pravič V *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Special Sect. Biophys. Subjects* **79** 293 (1964)
- Takashima S, Schwan H P *J. Phys. Chem.* **69** 4176 (1965)
- Tanaka A, Ishida Y *J. Polymer Sci. Phys. Ed.* **11** 1117 (1973)
- Pethig R *Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials* (Chichester: Wiley, 1979)
- Gilson M K, Honig В H *Biopolymers* **25** 2097 (1986)
- Nakamura H, Sakamoto T, Wada A *Protein Eng.* **2** 177 (1988)
- Simonson T, Perahia D, Bricogne G *J. Mol. Biol.* **218** 859 (1991)
- Simonson T, Perahia D, Brünger A T *Biophys. J.* **59** 670 (1991)
- King G, Lee F S, Warshel A *J. Chem. Phys.* **95** 4366 (1991)
- Smith P E et al. *J. Phys. Chem.* **97** 2009 (1993)
- Simonson T, Perahia D *J. Am. Chem. Soc.* **117** 7987 (1995)
- Ахадов Я Ю *Диэлектрические параметры чистых жидкостей* (М.: Изд-во МАИ, 1999)
- Johannin G, Kellersohn N *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49** 321 (1972)
- Warshel A, Levitt M *J. Mol. Biol.* **103** 227 (1976)
- Krishtalik L I, in *IFIAS Workshop (1975) on Physico-Chemical Aspects of Electron Transfer Processes in Enzyme Systems* (Ed. С G Hedén) (Stockholm: IFIAS, 1977) p. 76
- Кришталлик Л И, Тополев В В *Молек. биология* **17** 1034 (1983) [Krishtalik L I, Topolev V V *Mol. Biol.* **17** 843 (1983)]
- Тополев В В, Кришталлик Л И *Молек. биология* **17** 1177 (1983) [Krishtalik L I, Topolev V V *Mol. Biol.* **17** 963 (1983)]
- Krishtalik L I *J. Theor. Biol.* **139** 143 (1989)
- Tanford C, Kirkwood J G *J. Am. Chem. Soc.* **79** 5333 (1957)
- Warwicker J, Watson H C *J. Mol. Biol.* **157** 671 (1982)
- Nicholls A, Honig В J. *Comput. Chem.* **12** 435 (1991)
- Bashford D, Karplus M *Biochemistry* **29** 10219 (1990)
- Karplus M, McCammon J A *CRC Crit. Rev. Biochem.* **9** 293 (1991)
- Frauenfelder H, Sligar S G, Wolynes P G *Science* **254** 1598 (1991)
- Brooks C L (III), Karplus M, Pettitt В M *Proteins. A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure, and Thermodynamics* (New York: J. Wiley, 1988)
- Krishtalik L I *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **1228** 58 (1995)
- Krishtalik L I *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **1273** 139 (1996)
- Gilson M K et al. *J. Mol. Biol.* **184** 503 (1985)
- Sham Y Y, Chu Z T, Warshel A *J. Phys. Chem. B* **101** 4458 (1997)
- Schutz C N, Warshel A *Proteins Struct. Funct. Genet.* **44** 400 (2001)
- Warshel A, Åqvist J *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20** 267 (1991)
- Krishtalik L I, Kuznetsov A M, Mertz E L *Proteins Struct. Funct. Genet.* **28** 174 (1997)
- Mertz E L, Krishtalik L I *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48** 397 (1999)
- Simonson T, Archontis G, Karplus M *J. Phys. Chem. B* **103** 6142 (1999)
- Кришталлик Л И, Тополев В В *Молек. биология* **18** 712 (1984) [Krishtalik L I, Topolev V V *Mol. Biol.* **18** 581 (1984)]
- Кришталлик Л И, Тополев В В *Молек. биология* **18** 892 (1984) [Krishtalik L I, Topolev V V *Mol. Biol.* **18** 721 (1984)]
- Sharp K A, Honig В *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19** 301 (1990)
- Bashford D *Current Opin. Struct. Biol.* **1** 175 (1991)
- Honig В, Nicholls A *Science* **268** 1144 (1995)
- Gunner M R et al. *Biophys. J.* **78** 1126 (2000)
- Voigt P, Knapp E-W *J. Biol. Chem.* **278** 51993 (2003)
- Rapazyan A, Warshel A *J. Phys. Chem. B* **101** 11254 (1997)
- Воротынцев М А, Корнышев А А *Электростатика сред с пространственной дисперсией* (М.: Наука, 1993)
- Ворп Р А, Корнышев А А, Sutmann G *J. Chem. Phys.* **109** 1939 (1998)
- Medvedev I G *Electrochim. Acta* **49** 207 (2004)
- Алпатова Н М и др. *Электрохимия* **25** 1341 (1989) [Alpatova N M et al. *Sov. Electrochem.* **25** 1195 (1989)]
- Кришталлик Л И, Алпатова Н М, Овсянникова Е В *Электрохимия* **26** 429 (1990) [Krishtalik L I, Alpatova N M, Ovsyannikova E V *Sov. Electrochem.* **26** 383 (1990)]
- Кришталлик Л И, Алпатова Н М, Овсянникова Е В *Электрохимия* **26** 436 (1990) [Krishtalik L I, Alpatova N M, Ovsyannikova E V *Sov. Electrochem.* **26** 390 (1990)]
- Кришталлик Л И *Электрохимия* **27** 154 (1991) [Krishtalik L I et al. *Sov. Electrochem.* **27** 137 (1991)]
- Krishtalik L I, Alpatova N M, Ovsyannikova E V *Electrochim. Acta* **36** 435 (1991)
- Кришталлик Л И, Алпатова Н М, Овсянникова Е В *Электрохимия* **31** 871 (1995) [Krishtalik L I, Alpatova N M, Ovsyannikova E V *Sov. Electrochem.* **31** 802 (1995)]
- Бунакова Л В и др. *Электрохимия* **40** 913 (2004) [Bunakova L V et al. *Russ. J. Electrochem.* **40** 794 (2004)]

85. Бунакова Л В, Ханова Л А, Кришталик Л И *Электрохимия* **41** 325 (2005) [Bunakova LV, Khanova L A, Krishtalik L I *Russ. J. Electrochem.* **41** 287 (2005)]
86. Овсянникова Е В и др. *Электрохимия* **25** 1348 (1989) [Ovsyannikova E V et al. *Sov. Electrochem.* **25** 1201 (1989)]
87. Алпатова Н М, Овсянникова Е В, Кришталик Л И *Электрохимия* **27** 931 (1991) [Alpatova N M, Ovsyannikova E V, Krishtalik L I *Sov. Electrochem.* **27** 823 (1991)]
88. Mertz E L, Krishtalik L I *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** 2081 (2000)
89. Khanova L A, Topolev V V, Krishtalik L I *Chem. Phys.* **326** 33 (2006)
90. Pratt L R, Hummer G, Garsia A E *Biophys. Chem.* **51** 147 (1994)
91. Hummer G, Pratt L R, Garsia A E *J. Phys. Chem.* **100** 1206 (1996)
92. Ashbaugh H S, Wood R H *J. Chem. Phys.* **106** 8135 (1997)
93. Hummer G et al. *J. Phys. Chem. B* **101** 3017 (1997)
94. Garde S, Hummer G, Paulaitis M E *J. Chem. Phys.* **108** 1552 (1998)
95. Ashbaugh H S *J. Phys. Chem. B* **104** 7235 (2000)
96. Grossfield A *J. Chem. Phys.* **122** 024506 (2005)
97. Krishtalik L I *Electrochim. Acta* **53** 3722 (2008); "Corrigendum" *Electrochim. Acta* **54** 4741 (2009)
98. Ptushenko V V et al. *Photosynthesis Res.* **97** 55 (2008)
99. Dracheva S M et al. *Eur. J. Biochem.* **174** 253 (1988)
100. Semenov A Yu, Mamedov M D, Chamorovsky S K *FEBS Lett.* **553** 223 (2003)
101. Semenov A Yu, Mamedov M D, Chamorovsky S K, in *Photosystem I: The Light-Driven, Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase* (Ed. J H Golbeck) (Dordrecht: Springer, 2006) p. 319
102. Ishikita H, Knapp E-W *J. Biol. Chem.* **278** 52002 (2003)
103. Ishikita H et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 9855 (2006)
104. Holzwarth A R et al. *Biophys. J.* **90** 552 (2006)
105. Shelaev I V et al. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **104** 44 (2011)
106. Kuznetsov A M et al. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **1797** 347 (2010)
107. Reiss H, Heller A *J. Phys. Chem.* **89** 4207 (1985)
108. Pleskov Yu V *J. Phys. Chem.* **91** 1691 (1987)
109. Каневский Е А *Журн. физ. хими* **26** 633 (1952)
110. Кузнецов Ан М, Маслий А Н, Кришталик Л И *Электрохимия* **44** 39 (2008) [Kuznetsov An M, Maslii A N, Krishtalik L I *Russ. J. Electrochem.* **44** 34 (2008)]
111. Trasatti S *J. Electroanal. Chem. Interfac. Electrochem.* **52** 313 (1974)
112. Фрумкин А Н *Потенциал нулевого заряда* (М.: Наука, 1982)
113. Ullmann G M, Noodleman L, Case D A *J. Biol. Inorg. Chem.* **7** 632 (2002)
114. Krishtalik L I *Chem. Phys.* **319** 316 (2005)
115. Antosiewicz J, McCammon J A, Gilson M K *J. Mol. Biol.* **238** 415 (1994)
116. Kuznetsov A M, Ulstrup J, Vorotyntsev M A, in *The Chemical Physics of Solvation* Pt. C (Eds R R Dogonadze et al.) (Amsterdam: Elsevier, 1988) p. 163
117. Кришталик Л И *Молек. биология* **13** 577 (1979)
118. Krishtalik L I *J. Theor. Biol.* **86** 757 (1980)
119. Кришталик Л И, Харкац Ю И *Биофизика* **29** 19 (1984)
120. Kharkats Yu I, Krishtalik L I *J. Theor. Biol.* **112** 221 (1985)
121. Zhou H-X *J. Am. Chem. Soc.* **116** 10362 (1994)
122. Krishtalik L I, Topolev V V *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **1459** 88 (2000)
123. Churg A K et al. *J. Phys. Chem.* **87** 1683 (1983)
124. Warshel A, Chu Z T, Parson W W *Science* **246** 112 (1989)
125. Schulten K, Tesch M *Chem. Phys.* **158** 421 (1991)
126. Treutlein M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** 75 (1992)
127. Parson W W, Chu Z-T, Warshel A *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **1017** 251 (1990)
128. Zheng C, McCammon J A, Wolynes P G *Chem. Phys.* **158** 261 (1991)
129. Yadav A et al. *J. Am. Chem. Soc.* **113** 4800 (1991)
130. Marchi M et al. *J. Am. Chem. Soc.* **115** 4178 (1993)
131. Åqvist J, Fothergill M, Warshel A *J. Am. Chem. Soc.* **115** 631 (1993)
132. Muegge I et al. *J. Phys. Chem. B* **101** 825 (1997)
133. Misonson T *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** 6544 (2002)
134. Tipmanee V et al. *J. Am. Chem. Soc.* **132** 17032 (2010)
135. Kaila V R I et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** 21470 (2010)
136. Кришталик Л И *Молек. биология* **15** 290 (1981) [Krishtalik L I *Mol. Biol.* **15** 229 (1981)]
137. Krishtalik L I *J. Theor. Biol.* **112** 251 (1985)
138. Krishtalik L I *J. Mol. Catalysis* **47** 211 (1988)
139. Cech T R et al. *J. Biol. Chem.* **267** 17479 (1992)
140. Cate J H et al. *Science* **273** 1678 (1996)
141. Krishtalik L I *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **1807** 1444 (2011)
142. Marcus R A *J. Chem. Phys.* **24** 966 (1956)
143. Marcus R A *J. Phys. Chem.* **98** 7170 (1994)
144. Mertz E L, German E D, Kuznetsov A M *Chem. Phys.* **215** 355 (1997)
145. Terrettaz S et al. *J. Am. Chem. Soc.* **118** 7857 (1996)
146. Blankman J I et al. *Biochemistry* **39** 14799 (2000)
147. Liu Y-P, Newton M D *J. Phys. Chem.* **98** 7162 (1994)
148. Sigfridsson E, Olsson M H M, Ryde U *J. Phys. Chem. B* **105** 5546 (2001)
149. Berghuis A M, Brayer G D *J. Mol. Biol.* **223** 959 (1992)
150. Berghuis A M et al. *J. Mol. Biol.* **236** 786 (1994)
151. Qi P X, Beckman R A, Wand A J *Biochemistry* **35** 12275 (1996)
152. Bertini I et al. *FEBS Lett.* **415** 45 (1997)
153. Bertini I et al. *J. Magn. Reson.* **147** 1 (2000)
154. Gray H B, Winkler J R *Annu. Rev. Biochem.* **65** 537 (1996)
155. Gray H B, Winkler J R *Quart. Rev. Biophys.* **36** 341 (2003)
156. Mines G A et al. *J. Am. Chem. Soc.* **118** 1961 (1996)
157. Farver O, Pecht I *Biophys. Chem.* **50** 203 (1994)
158. Olsson M H M, Ryde U, Roos B O *Protein Sci.* **7** 2659 (1998)
159. Gamelin D R et al. *J. Am. Chem. Soc.* **120** 5246 (1998)
160. Kümmerle R et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6** 446 (2001)
161. Krishtalik L I *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **977** 200 (1989)
162. Vos M H et al. *Biochemistry* **39** 8353 (2000)
163. Shuvalov V A, Yakovlev A G *FEBS Lett.* **540** 26 (2003)
164. Woodbury N W T, Parson W W *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **767** 345 (1984)
165. Woodbury N W et al. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **851** 6 (1986)
166. Woodbury N W et al. *Biochemistry* **33** 8101 (1994)
167. Peloquin J M et al. *Biochemistry* **33** 8089 (1994)
168. Goldstein R A, Takif L, Boxer S G *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **934** 253 (1988)
169. Shopes R J, Wraight C A *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **893** 409 (1987)
170. Creighton S et al. *Biochemistry* **27** 774 (1988)
171. Cherepanov D A, Krishtalik L I, Mulkijanian A Y *Biophys. J.* **80** 1033 (2001)
172. Jia Y et al. *J. Phys. Chem.* **97** 13180 (1993)
173. Wang Z et al. *Chem. Phys.* **176** 421 (1993)
174. McMahon B H et al. *Biophys. J.* **74** 2567 (1998)
175. Jasaitis A et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 10882 (2005)
176. Ramirez B E et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** 11949 (1995)
177. Brzezinski P *Biochemistry* **35** 5611 (1996)
178. Olsson M H M, Ryde U *J. Am. Chem. Soc.* **123** 7866 (2001)
179. McLendon G, Hake R *Chem. Rev.* **92** 481 (1992)
180. Takayama S J et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* **14** 821 (2009)
181. Davidson V L *Arch. Biochem. Biophys.* **428** 32 (2004)
182. Marcus R A *J. Chem. Phys.* **38** 1858 (1963)
183. Hush N S, in *Progress in Inorganic Chemistry* Vol. 8 (Ed. F A Cotton) (Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2007) p. 391
184. Mertz E L *Chem. Phys. Lett.* **262** 27 (1996)
185. Mertz E L, Tikhomirov V A, Krishtalik L I *J. Phys. Chem. A* **101** 3433 (1997)
186. Мерц Э Л, Кришталик Л И *Биофизика* **41** 320 (1996) [Mertz E L, Krishtalik L I *Biophysics* **41** 303 (1996)]
187. Pierce D W, Boxer S G *J. Phys. Chem.* **96** 5560 (1992)
188. Чернавский Д С, Хургин Ю И, Шноль С Э *Молек. биология* **14** 19 (1967)
189. Блюменфельд Л А *Проблемы биологической физики* (М.: Наука, 1977) [Blumenfeld L A *Problems of Biological Physics* (Berlin: Springer-Verlag, 1981)]
190. Crofts A R, Berry E A *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8** 501 (1998)

191. Тихонов А Н *Соросовский образовательный журн.* (6) 17 (1999)
192. Романовский Ю М, Тихонов А Н *УФН* **180** 931 (2010) [Romanovsky Yu M, Tikhonov A N *Phys. Usp.* **53** 893 (2010)]
193. Moser C C, Dutton P L, in *Protein Electron Transfer* (Ed. D S Bendall) (Oxford: Bios Sci. Publ., 1996) p. 1
194. Beratan D N, Onuchic J N, in *Protein Electron Transfer* (Ed. D S Bendall) (Oxford: Bios Sci. Publ., 1996) p. 23
195. Niki K et al. *J. Phys. Chem. B* **107** 9947 (2003)
196. Khanova L A, Krishtalik L I *Electrochim. Acta* **50** 1085 (2005)

Proteins as specific polar media for charge transfer processes

L.I. Krishtalik

*A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninskii prosp. 31, 119991 Moscow, Russian Federation
Tel. +7 (495) 955 47 51, +7 (499) 250 55 69
Fax +7 (495) 952 08 46
E-mail: av164159@akado.ru*

A great many of biological processes involve the transfer of charged particles, electrons and protons. The electrostatic interaction of a moving charge with its surroundings, primarily with protein, is the major factor determining the thermodynamics and kinetics involved. The paper treats the protein as a pre-organized highly-polar low-dielectric medium that poses a pre-existent intraprotein electric field, a low reorganization energy and a wide range of dielectric relaxation times. These specific protein features are the factors controlling the catalytic acceleration of biochemical reactions. Methods for quantitatively calculating the energetics of a number of typical processes are considered, and examples of their application are given.

PACS numbers: **87.10.-e**, **87.14.E-**, **87.15.-v**

DOI: 10.3367/UFNr.0182.201212b.1275

Bibliography — 196 references

Received 13 December 2011, revised 1 February 2012

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **182** (12) 1275–1300 (2012)

Physics–Uspekhi **55** (12) (2012)