

СТОХАСТИЧЕСКАЯ ДИНАМИКА И ЭЛЕКТРОННО-КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В БЕЛКАХ

ШАЙТАН К. В., РУБИН А. Б.

Дан обзор современных представлений о конформационной подвижности белков. Рассмотрены вопросы теории динамики различных структурных элементов биомакромолекул и белковой глобулы в целом. Изложена физическая теория электронно-конформационных взаимодействий и ее приложения к реакциям электронного транспорта, ферментативному акту и диффузии лигандов в белках.

В биохимии давно установлено, что изменение конформации биологических макромолекул сильно влияет на их функциональную активность. С другой стороны, химические превращения в этих молекулах также вызывают изменения конформационного состояния. В связи с этим высказывались соображения о важной роли конформационных изменений для биологически целенаправленного действия белков, но изучение физических механизмов этого явления долгое время оставалось за пределами возможности эксперимента. Анализ этой проблемы с общей физической точки зрения привел к формулировке известных концепций электронно-конформационного взаимодействия (ЭКВ) [1, 2], «белок — машина» [3, 4] и релаксационных представлений в теории ферментативного акта [3].

Проблема связи структуры и функции биомакромолекул за последнее время приобрела новый, динамический аспект. Основой здесь служит целый набор экспериментальных данных по динамике белка, полученный с использованием различных методов, и сравнение этих результатов с функциональной активностью [5—13]. Новые экспериментальные результаты позволяют продвинуться дальше в понимании физики конформационной подвижности, теории ЭКВ и построить для ряда процессов полуколичественные теории.

До недавнего времени практически единственной теоретической базой для описания элементарных процессов в биологических системах служили теория абсолютных скоростей реакций [14] и теория окислительно-восстановительных реакций в растворах [15, 16]. Особенно успешным оказалось приложение теории электронно-колебательных переходов к анализу температурных и изотопных эффектов в реакции окисления цитохрома с [4, 16—22]. Этот успех способствовал популяризации концепции ЭКВ в белках, и в течение некоторого времени она практически подменялась представлениями теории реакций в растворах [17—21]. Однако формальное применение квантовой теории реакций в растворах к целому ряду других электрон-транспортных процессов в бактериальном фотосинтезе вызывает определенные трудности, так как получаемым при этом значениям параметров акцептирующих мод трудно дать конкретную физическую интерпретацию [20]. Недостаток чисто «растворного» подхода проявляется и при попытках интерпретации аномальных температурных и изотопных эффектов для реакции рекомбинации зарядов в реакционных центрах (подробнее см. [22]).

Наличие корреляции между параметрами относительно крупномасштабных (с амплитудой $\sim 0,1$ нм) конформационных движений и скоростями элементарных процессов (например, электронного транспорта [5]) также свидетельствует о необходимости существенной модификации «растворной» теории в приложении к анализу реальной ситуации в биологических объектах. По сути дела взаимодействие относительно крупномасштабных конформационных движений с электронно-колебательными процессами внутри отдельных белковых групп не может быть описано в рамках чисто динамической гармонической модели. Здесь необходим также учет диссипативных процессов, возникающих при такого рода движениях, и конкретных вязкоупругих свойств участков белковой структуры. На необходимость учета неупругих процессов, возникающих вследствие ЭКВ, указывалось ранее при введении понятия о конформоне [1], который по физическому смыслу является сильно нелинейным аналогом полярона [23]. В известном смысле теория линейного полярона очень близка к теории окислительно-восстановительных реакций в растворе [15, 16]. Расширение этих представлений на учет конформационных движений фактически приводит к теории конформона.

Аналогичным образом обстоит дело и с концепцией «белок — машина» и с релаксационной теорией ферментативного катализа [3, 4]. Машиноподобное функционирование белковой системы предполагает наличие подвижной относительно крупномасштабной выделенной степени свободы. В результате квазициклического движения по этой степени свободы происходят определенные химические изменения. Однако природа этого движения в общем ранее не рассматривалась. В релаксационной теории ферментативного акта последний представляется как процесс релаксации или перехода системы из неравновесного состояния (фермент — субстрат) в равновесное (фермент — продукт). В этом случае возникает вопрос о наличии лимитирующей стадии (или «узкого места») процесса и его механизме. Здесь также очень важной, в свете упомянутых выше общих

представлений теоретической биофизики, является проблема влияния конформационной подвижности белка на скорость релаксации фермент-субстратного комплекса [10—12]. В этом плане представляется необходимым и важным развитие как теории самой конформационной подвижности, так и конкретных физических представлений о связи этой подвижности с теми или иными элементарными процессами с целью дать с единых позиций описание функционирования белковых систем и найти причины направленных конформационных изменений [24]. Именно этой задаче и посвящена данная статья, основанная на наших публикациях последних лет.

Имеющиеся в настоящее время работы по численному моделированию динамики белка ограничены, к сожалению, интервалом времен в десятки пикосекунд [25], который в большинстве случаев много короче, чем характерные времена изучаемых биофизических процессов. Несомненно, однако, что это направление имеет большое будущее. Вместе с тем нам представляется важным развить в данный момент и общетеоретический полуколичественный подход к анализу процессов с участием биологических макромолекул. Здесь из-за сложности объекта основные физические закономерности часто завуалированы и одна из основных задач теории — вносить ясность в принципиальные вопросы.

СТОХАСТИЧЕСКАЯ ДИНАМИКА БЕЛКА

Общие принципы описания конформационной динамики. Интенсивное развитие физических моделей для конформационной динамики было в значительной степени стимулировано экспериментами по мессбауэровской спектроскопии белков и хроматофоров [5, 6, 25—28]. Здесь, как известно, впервые в явном виде было обнаружено отличие внутренней динамики биологических макромолекул как от твердых тел, так и от жидкостей. Интерпретация аномальных температурных зависимостей фактора f' и ширины линии потребовало в данном случае развития весьма конкретных представлений о конформационной динамике [29, 30]. Вместе с тем необходимо четко понимать, что результаты экспериментов с различными метками дают информацию только о локальной динамике некоторых выделенных степеней свободы и только в диапазоне амплитуд и времен релаксации, характерных для данного метода. Однако для развития общих принципов в теории функционирования белков необходимо иметь также модель флуктуационного поведения глобулы в целом.

Как известно, малые колебания атомов в молекулах и кристаллах с амплитудой $x_a \sim 0,001—0,01$ нм могут быть описаны в рамках гармонического приближения. Соответствующие упругие постоянные для валентных колебаний лежат в диапазоне $K \sim 10^2—10^3$ Н/м, а частоты $\omega_0 \sim 10^{13}$ с⁻¹. Эффекты ангармонизма обуславливают межмодовое взаимодействие, приводящее к колебательной релаксации с характерными временами $\tau \sim 10^{-12}$ с. Гармоническое приближение, к сожалению, совершенно не годится для описания конформационных движений в биомacroмолекулах с амплитудой $x_a \gg 0,001—0,01$ нм. Плотность белковой глобулы сравнима с плотностью жидкостей и органических кристаллов. Поэтому смещение здесь на величину, превышающую 0,01 нм, как и в случае жидкостей, требует образования флуктуационной полости или «дырки» [31]. Можно показать, что эта ситуация эквивалентна случайным блужданиям по набору «дышащих» потенциальных ям, отделенных друг от друга барьерами [32]. Иными словами, конформационные движения в белке ограничены по амплитуде, как и в твердых телах, но требуют энергии активации, как в случае движений в жидкости. Рассмотрим физические модели для описания этих движений.

Простейшая (условно «газовая») модель — активированные перескоки из одного фиксированного локального минимума в другой. Барьер $\Delta G^\ddagger$ в этом случае статический и обусловлен отталкиванием валентно-несвязанных атомов. Согласно [14], средняя частота перескока определяется известной формулой: $\nu = \frac{kT}{h} \exp(-\Delta G^\ddagger/kT)$.

Очевидно, однако, что в случае крупномасштабных конформационных движений в белках такая модель несправедлива, так как ширина барьера намного больше 0,01 нм и при движении в барьерной области начинают работать эффекты взаимодействия со средой, обсужденные выше. Этих недостатков лишена модель конформационного перехода в вязкой среде между двумя локальными минимумами, отделенными широким статическим барьером высотой $\Delta G^\ddagger$ [33]. В силу особенностей конформационной динамики скорость такого перехода определяется из решения уравнения Фоккера — Планка

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} = D_p \left\{ \frac{\partial^2 P(x, t)}{\partial x^2} + \frac{1}{kT} P(x, t) \frac{\partial U(x)}{\partial x} \right\}, \quad (1)$$

где D_p — коэффициент диффузии по конформационной степени свободы x , обратно пропорциональный микровязкости белка η_p [32]; $U(x)$ — конформационный потенциал; $P(x, t)$ — плотность вероятности найти систему в конформации x в момент времени t . Можно показать [33], что средняя скорость перехода в этом случае определяется формулой

$$\nu_c \simeq \frac{D_p}{aL} e^{-\Delta G^\ddagger/kT}. \quad (2)$$

Здесь $a \sim 0,01$ нм — ширина локального минимума, $L \sim 0,1—1$ нм — длина барьера. Формула (2) фактически обобщает известную формулу Крамерса [34] для скорости перехода через барьер в вязкой среде на случай конформационных переходов

очень широкий барьер. Так как коэффициент диффузии D_p экспоненциально зависит от температуры: $D_p = D_0 e^{-\varepsilon_p/kT}$ (ε_p — энергия активации требуемых флуктуаций плотности), то энергия активации перехода равна сумме $\Delta G^\ddagger$ и ε_p . Формула (2) позволяет конкретизировать динамику конформационных (или фазовых) сегментальных переходов, введенных в [35], и определить зависимость среднего квадратичного смещения от времени, которое в этом случае определяется формулой

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \approx L^2 (1 - e^{-v_c t}) + a^2 e^{-t/\tau}, \quad (3)$$

где $\tau \ll v_c^{-1}$ — время релаксации системы в локальном минимуме потенциала $U(x)$. При $L \gg a$ вторым членом можно пренебречь и формула (3) практически оказывается эквивалентной зависимости $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ для случая броуновского осциллятора [31].

При рассмотрении наиболее часто встречающихся конформационных флуктуаций с полной амплитудой $\sim 0,1$ нм и в отсутствие резко выраженных локальных минимумов широко используется предложенная нами модель броуновского осциллятора [29, 36] или модель «вязкого ящика» [32]. В первом случае рассматривается диффузионное движение белковых групп, ограниченное параболическим потенциалом с константой упругости K (обычно $K \leq 1$ Н/м); во втором — ограниченная диффузия в прямоугольном ящике длиной L . Эта же ситуация может быть рассмотрена динамически как движение в поле со сложным рельефом — потенциальной гребенкой. Если бы положения минимумов потенциальной гребенки были строго фиксированы, то можно было бы говорить о миграции по конформационным подсостояниям [26]. Однако проведенный нами анализ решения этой задачи и сравнение с данными мессбауэровской спектроскопии белков показывают, что расстояния между минимумами гребенки должны быть очень малы и модель дискретных подсостояний совершенно нереальна и ситуация здесь близка к непрерывной ограниченной диффузии. Величина среднего квадратичного смещения в случае ограниченной диффузии в параболической яме определяется формулой [29]

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = x_a^2 (1 - e^{-t/\tau_c}), \quad (4)$$

где $x_a^2 = kT/K$ и $\tau_c = \gamma/K$ — время корреляции ограниченной диффузии (γ — коэффициент трения, пропорциональный микровязкости белка). Формула (4) с точностью не менее 6% справедлива и в случае прямоугольной потенциальной ямы, причем $x_a^2 = L^2/6$ и $\tau_c = L^2/\pi^2 D_p$, где L — длина ямы [32].

Развитая нами модель броуновского осциллятора или ограниченной диффузии в пределах ошибок эксперимента хорошо описывает данные мессбауэровской спектроскопии, характеризующиеся временным разрешением $\sim 10^{-7}$ с. Недавно эта модель была обобщена на многомодовый случай [27, 28, 30]. Однако динамика белка не сводится к движениям только боковых групп. В ней имеются упругие участки полипептидного каркаса, флуктуации которого должны описываться несколько иным образом.

Флуктуации полипептидного каркаса, иерархия времен релаксации и модель армированной капли. Структура белка, как известно, состоит из чередующихся α и β спиральных участков, определенным образом сочлененных друг с другом [37, 38]. В известном смысле молекулу белка можно представить как конструкцию [3, 4, 35], состоящую из элементов различной протяженности и формы, погруженных в плотную среду из боковых групп и молекул растворителя. Элементы этой конструкции испытывают ограниченное броуновское движение с параметрами, определяемыми константами жесткости, микровязкостью и т. д. [39]. Движение простейших структурных элементов — боковых групп — может быть рассмотрено в рамках обсуждавшейся выше модели броуновского осциллятора. Напомним, что времена корреляции этих движений лежат в наносекундном диапазоне, а полные амплитуды $x_a \sim 0,03$ – $0,1$ нм [26, 39].

Принципы описания тепловых флуктуаций элементов относительно жесткого α -спирального каркаса в общем похожи на описание изгибных флуктуаций ДНК [40–42]. Различие здесь заключается в выборе граничных условий и ряде специальных приближений. Анализ соответствующих стохастических уравнений показывает, что основной вклад в флуктуации жестких элементов каркаса дает первая гармоника, которая практически определяет профиль и времена корреляции флуктуационного изгиба [39]. Так, для α -спирали, моделируемой упругим стержнем с подпертыми концами, флуктуационный профиль определяется средним квадратичным смещением в каждой точке z стержня:

$$\langle [\Delta x(z, t)]^2 \rangle \approx A^2 (1 - e^{-t/\tau_\alpha}) \sin^2 \left(\frac{\pi z}{L} \right), \quad (5)$$

где

$$A = \left(\frac{8}{\pi^5} kT \frac{L^2}{ER^4} \right)^{1/2} \quad (6)$$

средняя амплитуда флуктуаций в центре стержня;

$$\tau_\alpha = \frac{4}{\pi^5} \left(\frac{L}{R} \right)^4 \frac{c\eta_p}{E} \sim 0,1 \frac{\eta_p}{E} \left(\frac{L}{R} \right)^4 \quad (7)$$

время релаксации изгибных флуктуаций. Здесь L — длина, R — радиус (в качестве R , согласно [38], нужно взять величину $\sim 0,23$ нм), E — модуль Юнга ($E \sim 10^{10}$ Дж/м² [43]), η_p — микровязкость белка, $c \sim 10$ — гидродинамический коэффициент. При ре-

альных значениях параметров амплитуды изгибных флуктуаций α -спиралей могут достигать нескольких десятых нм, а времена релаксации лежат в микросекундном диапазоне.

Задача о флуктуациях β -структур, моделируемых пластинами, по-видимому, не имеет аналогов. Соответствующее уравнение Ланжевена может быть получено путем добавления к уравнению изгибных колебаний пластины [44] дополнительных членов, описывающих затухание и тепловой шум:

$$\frac{2}{3} E h^3 (\nabla^2)^2 x(z, y, t) + \frac{c'}{b} \eta_p \frac{\partial x(z, y, t)}{\partial t} + 2h\rho \frac{\partial^2 x(z, y, t)}{\partial t^2} = f(z, y, t). \quad (8)$$

Здесь ∇^2 — оператор Лапласа, h — полутолщина пластины ($h \sim 0,1$ нм [38]), $\rho \sim 10^3$ кг/м³, b — характерный линейный размер ($b \sim 2$ нм [38]), $c' \sim 10$ — множитель, определяемый из гидродинамических соображений [45]. $f(z, y, t)$ — плотность случайной силы, определяемая аналогично [39]. Можно показать, что в силу жесткости пластины форма и время релаксации ее изгибных флуктуаций будут определяться в основном первой гармоникой. В случае прямоугольной пластины с ребрами длиной L_1 и L_2 и подпертыми краями

$$\langle [\Delta x(z, y, t)]^2 \rangle \approx B^2 (1 - e^{-t/\tau_\beta}) \sin^2 \left(\frac{\pi y}{L_1} \right) \sin^2 \left(\frac{\pi z}{L_2} \right). \quad (9)$$

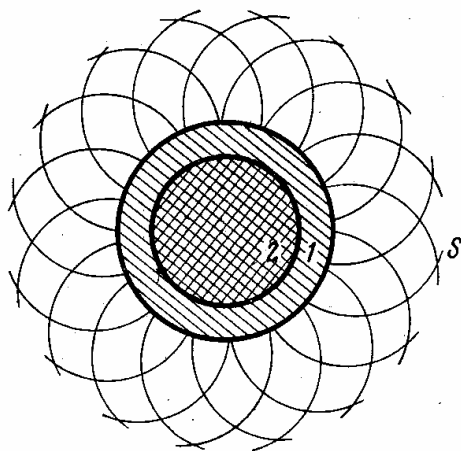
Амплитуда флуктуаций в центре пластины и время τ_β несколько иначе зависят от линейных размеров пластины, чем в случае α -спиралей

$$B \approx \left(\frac{kTb^2}{30Eh^3} \right)^{1/2}, \quad (10)$$

$$\tau_\beta \approx \frac{0,05 \eta_p}{E} \left(\frac{b}{h} \right)^3 \quad (11)$$

(величина $b \sim L_1 \sim L_2$). Оценки показывают, что β -структуры при прочих равных условиях должны быть менее жесткими по отношению к изгибам, чем α -спирали. Так, при указанных выше значениях параметров b , h и $E \sim 10^9$ – 10^{10} Дж/м³ величина B может достигать 0,25–0,7 нм. Значения τ_β при $\eta_p \sim 10$ Па·с составляют несколько микросекунд.

Таким образом, в белке имеется набор связанных элементов, существенно различающихся по временам релаксации. Наиболее быстрые и относительно мелкомасштабные флуктуации свойственны боковым группам. Эти группы образуют жидкоподобную опуху вокруг спиральных участков полипептидного каркаса и играют роль демпфирующей среды. Резкое различие во временах релаксации боковых групп и $\tau_{\alpha, \beta}$ упрощает описание флуктуационного поведения системы, позволяет воспользоваться гидродинамическим приближением [46] и не учитывать корреляции между флуктуациями боковых групп и каркаса. Иными словами, существование описанной выше иерархии времен релаксации дает возможность при изучении флуктуационной динамики белковой глобулы моделировать ее жидкоподобной каплей, армированной упругим полипептидным каркасом. Дальнейшее изложение электронно-конформационных взаимодействий, диффузионных процессов в сильноструктурированных средах (белках), влияния вязкости растворителя на конформационную динамику и др. будет фактически основано на динамической модели армированной капли для белковой глобулы.



Слоистая модель для описания влияния растворителя на внутреннюю динамику белка

Корреляция флуктуаций и влияние вязкости растворителя на конформационную динамику. Выше мы широко пользовались понятием микровязкости белка как мерой диссипативных процессов при конформационных движениях. Хотя интуитивно использование микровязкости не вызывает затруднений, физический смысл этого понятия не так прост и нуждается в определенных пояснениях. Особенно актуальным этот вопрос становится при интерпретации данных о зависимости скоростей внутрибелковых процессов от вязкости растворителя [10–12]. Наличие здесь эффекта является сильным аргументом в пользу развиваемых представлений о роли конформационной динамики в механизме функционирования биомолекул. Интересно, что ранее аналогичные эффекты были обнаружены для совершенно других процессов — аннигиляции позитрония в жидкой фазе [47]. Существенно, однако, что эти эффекты не могут быть описаны известной формулой Крамерса [34] и требуют привлечения новых физических представлений. В частности, недавно высказана идея [48] о том, что в системах со сложной структурой координата реакции является суперпозицией динамических и диффузионных степеней свободы. Ниже мы рассмотрим эту проблему с точки зрения корреляции флуктуаций, с которыми тесно

связано понятие микровязкости белка и влияние на нее вязкости растворителя. Как уже отмечалось, конформационные движения в конденсированной фазе (белке) могут происходить лишь при наличии в соответствующем месте флуктуационной полости или «дырки» [31].

Образование «дырок» внутри глобулы может происходить двумя способами. Во-первых, за счет собственного свободного объема глобулы и, во-вторых, за счет проникновения в глобулу через ее поверхность «дырок», образующихся в растворителе. Согласно данным [49], сжимаемость белка существенно ниже, чем жидкостей, и при не слишком больших значениях вязкости растворителя (т. е. не очень больших энергиях активации ΔG_s^* образования «дырки») второй способ оказывается более предпочтительным. Первый способ образования флуктуационных полостей в глобуле обеспечивает вклад в скорость внутривискозных процессов [10], не зависящий от вязкости растворителя η_s , второй — определяет зависимость от η_s . Чтобы понять природу этого вклада выделим условно в системе белок — растворитель три слоя (см. рисунок). Обозначим v_s^* и v_s — средние частоты образования и схлопывания «дырки» в растворителе. Согласно принципу детального равновесия

$$\frac{v_s^*}{v_s + v_s^*} = e^{-\Delta G_s^*/kT} \quad (12)$$

Величина $v_s \sim 10^{13} \text{ с}^{-1}$ [31]. Конформационные движения поверхностных групп в наружном слое белка могут происходить лишь при наличии «дырки» в растворителе. Обозначим v_1^* и v_1 — средние частоты конформационных переходов, приводящие к образованию и исчезновению «дырки» в наружном слое при наличии «дырки» в растворителе. Если последняя отсутствует, то будем считать конформационные переходы невозможными. Аналогично конформационные движения во втором слое, приводящие там к образованию и схлопыванию «дырки», возможны лишь при наличии «дырки» в первом слое и т. д. Таким образом, образование флуктуационных полостей внутри глобулы происходит за счет каскада последовательных случайных процессов. Этот процесс можно трактовать и как диффузию «дырки» из растворителя в глобулу, однако он не является марковским. Микровязкость в такой системе определяется концентрацией «дырок» и скоростью их миграции. Решая систему уравнений типа рассмотренной в [39], находим, что в физически разумном пределе, когда v_s много больше скоростей всех остальных процессов, наблюдаемые скорости переходов составляют в поверхностном слое

$$k_1^* \approx \frac{v_s^*}{v_s} v_1^* \quad (13)$$

в следующем слое

$$k_2^* \approx \frac{k_1^*}{v_2^* + k_1^* + k_1} v_2^* \quad (14)$$

и т. д. Здесь v_2^* — скорость конформационного перехода во втором слое при наличии соответствующей «дырки» в первом слое. Величина k_1 — есть реальная скорость схлопывания «дырки» в первом слое, определяемая аналогично (13), если этот процесс также требует флуктуации плотности растворителя. Сравнение (13) и (14) с формулой Крамерса [34] показывает, что для поверхностных групп не должно наблюдаться заметных отклонений от результатов [34], так как $v_s^*/v_s \sim 1/\eta_s$. Что касается более глубоких слоев, то здесь микровязкость не постоянна и, например, для второго слоя $1/\eta_p \sim k_1^*/(v_2^* + k_1^* + k_1)$. Видно также, что для более глубоких слоев влияние растворителя на скорости конформационных движений ослабевает и в общем случае зависимость от η_s должна аппроксимироваться формулой $k \sim (A_1 + A_2/\eta_s^\alpha)$, где $0 < \alpha \leq 1$.

Итак, структурная организация белковой глобулы вносит определенное своеобразие в ее флуктуационное поведение. Имеется набор конформационных степеней свободы с полными амплитудами движения до нескольких ангстрем с резко различающимися временами релаксации. Флуктуации относительно жестких элементов каркаса имеют определенную форму. Все конформационные движения происходят по механизму ограниченной диффузии. Влияние вязкости растворителя на времена релаксации внутривискозных движений обусловлено процессом диффузии внутрь глобулы «дырок», генерируемых в растворителе.

КОНФОРМАЦИОННО-ДИНАМИЧЕСКИЕ СТАДИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Общие принципы описания ЭКВ. Изложенная выше стохастическая теория конформационной динамики белка позволяет с новых позиций подойти к проблеме ЭКВ. Как известно, изменение химического или зарядового состояния отдельных групп приводит к изменению конформации белковой среды [1—4, 24]. С другой стороны, конформационные флуктуации способствуют химическим превращениям. Иными словами, имеется взаимодействие между электронным и конформационными состояниями макромолекул, что и обозначается уже ставшим привычным термином ЭКВ [10, 11]. До недавнего времени представления об ЭКВ развивались в основном в рамках хорошо разработанной теории внутримолекулярных электронно-колебательных взаимодействий и теории окислительно-восстановительных реакций в растворах [13, 15, 16, 19—23, 50,

51]. Эта теория основана на использовании золотого правила Ферми и приближений Борна — Оппенгеймера и Кондона [52] для вычисления вероятностей переходов в единицу времени между различными электронно-колебательными состояниями. Следует отметить, что применение теории электронно-колебательных взаимодействий (или «растворной» теории) к реакциям в белках предполагает, что молекулярные свойства реагирующих групп остаются неизменными, а движения по всем колебательным степеням свободы описываются уравнениями динамического типа. Однако, как уже отмечалось, имеется много данных, говорящих о прямом вовлечении в процесс и относительно крупномасштабных конформационных движений, для которых эти условия заведомо не выполнены. В этом случае требуется определенная модификация теории электронно-колебательного взаимодействия, которое целесообразно отличать от ЭКВ [53].

Принципиальными моментами для формулировки принципов описания ЭКВ является стохастический (или диффузионный) характер движения молекулярных групп по конформационным степеням свободы и наличие иерархии времен релаксации для внутримолекулярных ($\tau \sim 10^{-12}$ с) и конформационных движений ($\tau_c \sim 10^{-9} - 10^{-5}$ с). Последнее приводит к параметрической зависимости свойств молекулярных групп от конформационных координат x и, как следствие, к параметрической зависимости скоростей химических реакций от x [53]. При заданном значении x скорость реакции $W(x)$ может быть вычислена по правилам теории реакций в растворах.

Уравнение движения для конформона и молекулярные «машины». Рассмотрим ЭКВ на простом примере. Весьма часто перенос электрона от донора D^- к акцептору A^+ осуществляется с участием промежуточной группы 1:



Отвлекаясь от описания конформационных состояний D^- и A^+ сосредоточим внимание на медиаторе J и введем плотности вероятности $P_1(x, t)$ и $P_2(x, t)$ для групп J^- и J соответственно. Конформационная динамика групп J^- и J будет описываться уравнениями Фоккера — Планка (1) с соответствующими коэффициентами диффузии D_1 и D_2 и конформационными потенциалами $U_1(x)$ и $U_2(x)$, которые, вообще говоря, могут сильно отличаться друг от друга, что является одной из сторон ЭКВ. Изменение же зарядового состояния группы J описывается членами, пропорциональными константам скорости окисления и восстановления этих групп — $W_1(x)$ и $W_2(x)$ соответственно. В результате кинетика переноса заряда и ее взаимодействие с конформационными флуктуациями описывается системой зацепляющихся уравнений [53]:

$$\begin{cases} \frac{\partial P_1(x, t)}{\partial t} = D_1 \left\{ \frac{\partial^2 P_1}{\partial x^2} + \frac{1}{kT} P_1 \frac{\partial U_1}{\partial x} \right\} - W_1(x) P_1 + W_2(x) P_2, \\ \frac{\partial P_2(x, t)}{\partial t} = D_2 \left\{ \frac{\partial^2 P_2}{\partial x^2} + \frac{1}{kT} P_2 \frac{\partial U_2}{\partial x} \right\} + W_1(x) P_1 - W_2(x) P_2. \end{cases} \quad (16)$$

Поясним механизм сопряжения функционирования с конформационной подвижностью группы J , описываемый системой уравнений (16). Изменение зарядового состояния группы J сопровождается переходом системы с одной поверхности конформационной потенциальной энергии на другую. Эти переходы можно изобразить вертикальными стрелками в областях, где $W_1(x)$ и $W_2(x)$ заметно отличны от нуля. В результате изменения конформационной энергии эффективный тепловой эффект каждой из стадий зависит от координаты x :

$$Q_1(x) = \Delta E_1 - \Delta U_{12}(x), \quad Q_2(x) = \Delta E_2 + \Delta U_{12}(x), \quad (17)$$

где ΔE_1 и ΔE_2 — тепловые эффекты стадий без учета взаимодействий, зависящих от конформации системы:

$$\Delta U_{12}(x) = U_2(x) - U_1(x).$$

Очевидно, что скорость реакции будет заметно отлична от нуля только при $Q(x) \geq 0$. Если величина $\Delta U(x) < 0$, то соответствующая часть теплового эффекта не переходит сразу в тепло за счет колебательной релаксации, а запасается в виде напряжения конформации. Это напряжение далее релаксирует по механизму ограниченной диффузии. Но, как отмечалось выше, скорость такой конформационной релаксации много меньше скорости обычной внутримолекулярной колебательной релаксации. Зависимость эффективного теплового эффекта $Q(x)$ реакции от конформационной координаты может быть одной из причин зависимости $W(x)$, в частности при небольших ширинах колебательных уровней акцептирующих мод и в случае слабой электронно-колебательной связи [4, 21, 22].

При исследовании переноса электрона в процессе фотосинтеза экспериментально наблюдается сильная корреляция между конформационной подвижностью и скоростью электронного транспорта [5]. Это возможно, когда скорость реакции достаточно резко зависит от конформации биологических макромолекул. Иными словами, в этих реакциях велика роль стерических факторов, и при конформационных движениях происходит, по-видимому, подготовка реакционноспособного состояния. При этом функции $W_1(x)$ и $W_2(x)$ можно аппроксимировать δ -функциями:

$$W_1(x) = W_1 \delta(x - x_1), \quad W_2(x) = W_2 \delta(x - x_2). \quad (18)$$

В этом случае система уравнений (16) описывает процессы изменения электронного состояния группы J в точках x_1 и x_2 , индуцированные конформационными движениями, и последующую конформационную релаксацию. Физический смысл нестационарного решения этой системы уравнений по своей сути очень близок к идее о конформоне, выдвинутой в [1]. В определенном смысле систему уравнений [16] можно назвать уравнением движения для конформона. Особенностью описания этой квазичастицы в данном случае является разделение потенциала взаимодействия на две части: регулярную (или конформационный потенциал $U(x)$) и нерегулярную потенциальную «гребенку». Возможность применения диффузионного приближения позволяет избежать осложнений, возникающих при динамическом решении сильно нелинейной задачи.

Как было показано нами [53, 54], задача о конформоне тесно связана и с машиноподобным функционированием белковых систем [3, 4, 55]. Стационарное решение системы (16) описывает ситуацию, когда имеются постоянный источник и сток для электронов и медиатор J за счет квазициклического движения по поверхностям конформационной энергии осуществляет перенос электрона. Скорость этого процесса (или обратное время оборота молекулярной «машины») может быть вычислена следующим образом [53, 54]:

$$\bar{W} = W_{\infty} \frac{1 + \tau W_0}{1 + \tau W_{\infty}}, \quad (19)$$

где W_{∞} — скорость собственно химических стадий при оптимальной конформации, W_0 — скорость химических процессов в состояниях, далеких от оптимального (за счет перекрывания $W_1(x)$ и $W_2(x)$), τ — время конформационного перехода от x_1 до x_2 и обратно для групп J^- и J соответственно:

$$\tau = \int_{x_1}^{x_2} dx \left[\frac{1}{D_1(x) P_1^{(0)}(x)} + \frac{1}{D_2(x) P_2^{(0)}(x)} \right], \quad (20)$$

$P_{1,2}^{(0)}(x)$ — соответствующие равновесные функции распределения. Время τ экспоненциально зависит от температуры. Поэтому даже при постоянных значениях W_{∞} и W_0 в области температур, когда $1/W_{\infty} \ll \tau \ll 1/W_0$, для скорости процесса будет наблюдаться типичная аррениусовская зависимость. В целом (19) описывает характерную двухфазовую температурную зависимость скорости реакции, наблюдаемую для многих процессов [5, 17, 18]. Отметим, что в данном случае природа этой зависимости иная, чем в случае окисления цитохрома c [19–22]. Отличительной чертой описываемых здесь процессов является корреляция температурных (и других) зависимостей скоростей реакций и времен корреляции для конформационных движений [5].

Диффузия лигандов в белках и проблема лимитирующей стадии ферментативного акта. Диффузия в белках, как и в любой конденсированной среде, невозможна без образования флуктуационных полостей. Однако в отличие от простых жидкостей форма флуктуационных полостей и щелей не может быть произвольной и определяется специфической структурой белка. Здесь мы имеем дело с новым классом задач — диффузией в сильно структурированных средах, которая обладает рядом особенностей, в частности стереоспецифичностью [56, 57]. Мы не будем останавливаться на математических деталях, подробно изложенных в упомянутых выше работах. Отметим только, что задача о диффузии частицы через флуктуирующую щель (или канал) приводит к системе уравнений типа (16). Проникновение частицы в щель может осуществляться лишь тогда, когда ее раскрытие превышает ван-дер-ваальсовский диаметр лиганда x_0 . В наиболее интересном для приложений случае, когда скорость диффузии лимитируют флуктуации каркаса, получаем для коэффициента диффузии

$$D \approx \frac{2a^2}{\sqrt{\pi}} \frac{1}{\tau_p} \left(\frac{x_0}{2x_a} \right) e^{-(x_0/2x_a)^2}, \quad (21)$$

где a — среднее расстояние между щелями, $x_a = \sqrt{kT/k}$ — средняя амплитуда флуктуации щели (K — коэффициент упругости стенок щели), $\tau_p = \gamma/K$ — время релаксации стенок щели (γ — коэффициент трения, пропорциональный микровязкости η_p). Из (21) видно, что энергия активации диффузии складывается из двух величин — энергии активации $1/\eta_p$ и энергии напряжения стенок щели $Kx_0^2/4$. Изменение формы лиганда резко сказывается на необходимой величине раскрытия щели x_0 , что обеспечивает стереоспецифичность процесса. Влияние вязкости растворителя на скорость диффузии [10] осуществляется через изменение микровязкости η_p по механизму, обсужденному выше. Формула (21) позволяет получать информацию о динамике тех или иных белковых групп по данным о диффузии лигандов и здесь имеется хорошее согласие результатов, полученных независимыми методами [56, 57].

К задаче о диффузии в сильно структурированной среде приводит и проблема образования фермент-субстратного комплекса (ФСК). Известно [58, 59], что на поверхности ферментов имеется, как правило, щель, образованная сравнительно жесткими краями, и проникновение субстрата к активному центру связано с соответствующей флуктуационной подгонкой форм и размеров щели и субстрата. Проведенные нами оценки скорости этого процесса в условиях субстратного насыщения при реальных значениях упругости и микровязкости белка показывают, что в благоприятном случае характерные времена лежат здесь в диапазоне 10^{-7} – 10^{-5} с [39]. Наблюдается также

резкое торможение процесса при изменении диаметра субстрата больше, чем на $\sim 0,1$ нм. Эти оценки согласуются с известными ранее результатами [58]. Аналогичные оценки могут быть получены и для распада комплекса на продукт и фермент. При энергии связи продукт — фермент ≤ 21 кДж/моль эти времена близки к времени образования ФСК [39]. С другой стороны, известно, что время лимитирующей стадии ферментативного акта составляет 10^{-2} – 10^{-4} с [3, 58, 59] и, следовательно, обсужденные выше процессы не являются лимитирующими. Однако в последнее время появились данные о влиянии вязкости растворителя через конформационную динамику на скорость ферментативного акта [11, 12]. Анализ этой ситуации [39] привел нас к выводу, что лимитирующим фактором здесь, по-видимому, является образование многоцентровой химически активной конфигурации ФСК.

Образование активной конфигурации ФСК как лимитирующий фактор ферментативного акта. Проблемы, связанные с физическим механизмом ферментативного акта, являются одними из самых трудных для современной молекулярной биофизики. Имеются многочисленные попытки сформулировать некий общий принцип биологического катализа, исходящие из самых различных физических идей — от теории абсолютных скоростей реакций до теории когерентных процессов [1–4, 51, 55, 58–61]. Одна из основных трудностей состоит здесь в том, что ферментативный акт является многостадийным процессом, состоящим из разнородных по своей физике событий. В целом же, согласно [3], происходит релаксационный процесс из неравновесного состояния фермент — субстрат в равновесное фермент — продукт. Принципиальным в такой постановке является вопрос о наличии лимитирующей стадии и ее механизме.

В настоящее время практически общепринято, что превращение субстрата в активном центре (АЦ) происходит за счет многоцентрового кооперативного химического взаимодействия и образования цепи переноса заряда [58, 59, 62], что обеспечивает высокую эффективность и селективность химического превращения. В растворе реакция по такому механизму требовала бы крайне маловероятных тройных, четверных и т. д. столкновений [58, 63]. Однако организация белков-ферментов такова, что образующийся ФСК по своей структуре близок к активному состоянию с многоцентровым химическим взаимодействием. Далее за счет конформационных движений группы АЦ и субстрата выходят в активную область конфигурационного пространства, размер которой определяется факторами Франка — Кондона для данного электронно-колебательного перехода (или химической реакции). Простые оценки показывают, что радиус активной области составляет порядка амплитуд валентных колебаний $a \sim 0,01$ нм. Общий принцип описания процесса образования активной конфигурации сохраняется тот же, что и при рассмотрении ЭКВ в реакциях электронного транспорта, но принципиально новым фактором здесь является многомерность задачи. Можно показать [39], что в приближении гиперсферического потенциального ящика с отражающими стенками радиуса ρ , размерности N и центральной активной областью радиуса a средняя скорость выхода системы в активную конфигурацию по механизму ограниченной диффузии определяется формулой

$$k_E \approx \frac{\rho^2}{D_p} \left(\frac{a}{\rho} \right)^{N-2} N(N-2); N \geq 3, \quad (22)$$

где D_p — коэффициент диффузии, определяемый микровязкостью белка в области АЦ. (Случаи $N=1$ и 2 также разобраны в [39]). Число степеней свободы N определяется химическим механизмом реакции и в случае гидролиза пептидных связей $N \sim 6 \div 7$. Величины ρ и D_p могут быть получены независимо, например из данных мессбауэровской спектроскопии [6, 64], и при $T \approx 300$ К обычно составляют $\rho \sim 0,1$ нм, $D_p \sim 10^{-9}$ см²/с [32, 65]. Таким образом, следует ожидать, что в случае гидролиза пептидной связи $k_E \sim 10^2 \div 10^4$ с⁻¹, т. е. порядка обратного времени оборота ферментов при субстратном насыщении [58, 59, 63]. Разумеется, это довольно грубая прикидка и процесс выхода системы в активную конфигурацию может иметь множество особенностей, однако порядок величин здесь должен сохраниться. Сам химический акт перераспределения электронной плотности в заданной активной конфигурации, по-видимому, происходит намного быстрее, чем 10^{-4} с, так как его скорость должна быть сравнима с внутримолекулярными безызлучательными процессами [15, 16, 20–22]. Иными словами, есть основания думать, что лимитирующей стадией ферментативного акта, рассматриваемого как релаксационный процесс [3], является выход ФСК в активную конфигурацию. Этот вывод подтверждают и эксперименты [10–12] по зависимости скорости превращения ФСК от вязкости растворителя.

Отметим, что формула (22) кардинально отличается от обычно используемых в теории активированного комплекса [14]. В теории активированного комплекса вводится константа равновесия между активной и неактивной конфигурациями и в силу этого полностью теряется информация о динамике достижения этой активной конфигурации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы функционирования белков тесно связаны с их внутренней динамикой. Наличие специфической структуры приводит к определенной организации флуктуационного поведения биомакромолекул. Это сказывается прежде всего в образовании флуктуационных полостей и щелей определенной формы, а также в иерархии амплитуд и времен релаксаций для различных элементов структуры белка.

Конформационные движения в отличие от валентных колебаний носят характер ограниченной диффузии. Основные флуктуационные свойства такой системы могут

быть описаны в рамках модели армированной капли, помещенной в плотную (жидкую) среду.

Влияние вязкости растворителя на динамические свойства белка обусловлено диффузией внутрь глобулы из растворителя флуктуационных «дырок», необходимых для конформационных смещений.

Наиболее непосредственно с динамикой белка связаны процессы диффузии лигандов и образования ФСК, которые относятся к новому типу физических задач — диффузии в сильно структурированных средах. Скорость этих процессов зависит от времен релаксаций движений, открывающих соответствующий канал или щель, и очень чувствительна к размерам и форме лиганда.

Взаимосвязь динамики белка с ферментативным актом и электронным транспортом более сложна, и ее описание с точки зрения развиваемых представлений дает естественное развитие концепциям ЭКВ и «белок — машины». Одним из основных факторов здесь является образование вследствие конформационных движений строго определенной химически активной конфигурации (или «контактного» состояния [66]). Изменение химического состояния белковых групп приводит к изменению поверхности потенциальной энергии и последующей конформационной релаксации. Отличие ферментативного акта от более простых реакций электронного транспорта с точки зрения динамики белка состоит в необходимости образования многоцентровой реакционноспособной конфигурации групп АЦ и субстрата. Именно этот процесс, по-видимому, является лимитирующим для систем с временами оборота порядка 10^{-2} — 10^{-4} с.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волькенштейн М. В. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1971, № 6, с. 805.
2. Волькенштейн М. В. Молекуляр. биология, 1982, т. 16, с. 901.
3. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики. М.: Наука, 1977.
4. Чернавская Н. М., Чернавский Д. С. Туннельный транспорт электронов в фотосинтезе. М.: МГУ, 1977.
5. Берг А. И., Нокс П. П., Кононенко А. А. и др. Молекуляр. биология, 1979, т. 13, с. 81.
6. Гольдманский В. И., Крупянский Ю. Ф., Фролов Е. Н. Молекуляр. биология, 1983, т. 17, с. 532.
7. Аксенов С. И. Молекуляр. биология, 1983, т. 17, с. 475.
8. Буриштейн Э. А. Молекуляр. биология, 1983, т. 17, с. 455.
9. Лихтенштейн Т. И., Котельников А. И. Молекуляр. биология, 1983, т. 17, с. 505.
10. Beece D., Eisenstein L., Frauenfelder H. et al. Biochemistry, 1980, v. 19, p. 5148.
11. Gavish B., Werber M. M. Biochemistry, 1979, v. 18, p. 1269.
12. Welch G. R., Somogyi B., Damjanovich S. Progr. Biophys. Mol. Biol., 1982, v. 39, p. 109.
13. Демченко А. П. Укр. биохим. журн., 1981, т. 53, с. 114.
14. Глассстон С., Лейдлер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. М. Изд-во иностр. лит., 1948.
15. Догонадзе Р. Р., Кузнецов А. М. Кинетика химических реакций в полярных растворителях. М.: ВИНТИ, 1973.
16. Kestner N. R., Logan I., Jortner J. J. Phys. Chem., 1974, v. 78, p. 2148.
17. Vault D. De., Chance B. Biophysical J., 1966, v. 6, p. 825.
18. Kihara T., McCray J. A. Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 292, p. 207.
19. Kuznetsov A. M., Sondergard N. C., Ulstrup J. Chem. Phys., 1978, v. 29, p. 383.
20. Jortner J. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 594, p. 193.
21. Shaitan K. V., Rubin A. B. J. Theor. Biol., 1980, v. 86, p. 203.
22. Шайтан К. В., Рубин А. Б. Молекуляр. биология, 1981, т. 15, с. 368.
23. Пекар С. И. Исследования по электронной теории кристаллов. М.: Физматгиз, 1951.
24. Perutz M. Nature, 1970, v. 228, p. 734.
25. Karplus M., McCammon J. A. CRC Crit. Rev. Biochem., 1981, v. 9, p. 923.
26. Frauenfelder H., Petsko G. A., Tsernoglou D. Nature, 1979, v. 280, p. 558.
27. Parak F., Knapp E. W., Kucheida D. J. Mol. Biol., 1982, v. 161, p. 177.
28. Bauminger E. R., Cohen S. G., Nowik I., Ofer S., Yariv J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, p. 736.
29. Шайтан К. В., Рубин А. Б. Молекуляр. биология, 1980, т. 14, с. 1323.
30. Шайтан К. В., Рубин А. Б. Биофизика, 1984, т. 29, с. 735.
31. Френкель Я. И. Кинетическая теория жидкостей. Л.: Наука, 1975.
32. Шайтан К. В. Вестн. МГУ. Сер. Физика, астрономия, 1982, т. 23, с. 15.
33. Шайтан К. В., Рубин А. Б., Чернавский Д. С. Биофизика, 1985, т. 30, с. 31.
34. Kramers H. A. Physica, 1940, v. 4, p. 185.
35. Chernavskii D. S., Frolov E. N., Goldanskii V. I., Kononenko A. A., Rubin A. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 7222.
36. Чандрасекар С. Стохастические проблемы в физике и астрономии. М.: Изд-во иностр. лит., 1948.
37. Буриштейн Т. М., Птицын О. Б. Конформации макромолекул. М.: Наука, 1964.
38. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982.
39. Шайтан К. В., Рубин А. Б. Молекуляр. биология, 1983, т. 17, с. 1280.
40. Barkley M. D., Zimm B. H. J. Chem. Phys., 1979, v. 70, p. 2991.
41. Frank-Kamenetskii M. D. Comments Mol. and Cell Biophysics, 1981, v. 1, p. 105.
42. Berg O. G. Biochemistry, 1979, v. 18, p. 2861.

43. Морозов В. Н., Морозова Т. Я. Молекуляр. биология, 1983, т. 17, с. 577.
44. Рэлей Дж. В. Теория звука. М.: ГИТТЛ, 1955, т. 1.
45. Хэппель Дж., Бреннер Г. Гидродинамика при малых числах Рейнольдса. М.: Мир, 1976.
46. Боголюбов Н. Н. Проблемы динамической теории в статистической физике. М.—Л. Гостехиздат, 1946.
47. Goldanskii V. I., Shantarovich V. P. Appl. Phys., 1974, v. 3, p. 335.
48. Александров И. В., Гольданский В. И. Хим. физика, 1984, т. 3, с. 185.
49. Gavish B., Gratton E., Hardy C. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, p. 750.
50. Dogonadze R. R., Kuznetsov A. M., Ulstrup J. J. theor. Biol., 1977, v. 69, p. 239.
51. Волькенштейн М. В., Догонадзе Р. Р., Мадумаров А. К., Урушадзе З. Д., Харкац Ю. И. Молекуляр. биология, 1972, т. 6, с. 431.
52. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Квантовая механика. М.: Наука, 1963.
53. Шайтан К. В., Рубин А. Б. Молекуляр. биология, 1982, т. 16, с. 1004.
54. Шайтан К. В., Рубин А. Б. Биофизика, 1982, т. 27, с. 386.
55. Чернавский Д. С., Хургин Ю. И., Шноль С. Э. Молекуляр. биология, 1967, т. 1, с. 419.
56. Шайтан К. В., Упоров И. В. Хим. физика, 1984, т. 3, с. 1416.
57. Шайтан К. В., Упоров И. В., Рубин А. Б. Молекуляр. биология, 1984, т. 18, № 6.
58. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высш. школа, 1977.
59. Полторацк О. М., Чухрай Е. С. Физико-химические основы ферментативного катализа. М.: Высш. школа, 1971.
60. Fain V. J. Chem. Phys., 1976, v. 65, p. 1854.
61. Волькенштейн М. В. Молекуляр. биофизика. М.: Наука, 1975.
62. Blow D. M. The Enzymes, 1971, v. 3, p. 185.
63. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика. М.: Наука, 1979.
64. Шаркевич И. В., Крупнянский Ю. Ф., Хургин Ю. И. и др. IV Всес. конф. по спектроскопии биополимеров. Харьков, 1981, с. 201.
65. Крупнянский Ю. Ф., Шайтан К. В., Гаубман Е. Э. и др. Биофизика, 1981, т. 26, с. 1037.
66. Петров Э. Г., Харкянен В. Н., Нокс П. П., Кононенко А. А., Рубин А. Б. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1983, № 1, с. 28.

Биологический факультет
Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
15.VI.1984

STOCHASTIC DYNAMICS AND ELECTRON-CONFORMATION INTERACTIONS IN PROTEINS

SHAITAN K. V., RUBIN A. B.

Department of Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University

A review of modern concepts of conformational motions in proteins is presented. Problems relevant to the theory of the dynamic behavior of different structural elements of biomacromolecules and a protein globule as a whole are discussed. A theory of electron conformation interactions is presented and its applications to electron-transport reactions, the enzymic act, and the diffusion of the ligands in the proteins are discussed.