

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ЧЕРЕПАНОВ ДМИТРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА
БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВЫХ
КОМПЛЕКСОВ**

Специальность: 03.01.02 – «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Москва - 2018

Работа выполнена в лаборатории био- и нанофотоники
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической физики имени Н.Н.Семенова
Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Ризниченко Галина Юрьевна,

доктор физико-математических наук, профессор,
заведующая сектором, каф. Биофизики, Биоло-
гический ф-т, Московский Государственный
Университет им. М.В.Ломоносова, Москва

Разживин Андрей Павлович,

доктор физико-математических наук, заведую-
щий отделом, Научно-исследовательский ин-
ститут физико-химической биологии имени
А.Н.Белозерского, Московский Государствен-
ный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва

Медведев Эмиль Самуилович,

доктор физико-математических наук, старший
научный сотрудник, главный научный сотруд-
ник Лаборатории теории элементарных процес-
сов, Институт проблем химической физики
РАН, Черноголовка

Защита диссертации состоится 17 мая 2018 года в 15.30 часов на засе-
дании диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские
горы, д. 1, стр. 2, физический факультет МГУ, ЦФА.

E-mail: info@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной
библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте ИАС «ИСТИНА»:
https://istina.msu.ru/dissertation_councils/councils/28357490/

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.01.04,

кандидат технических наук

Сидорова А.Э.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Работа посвящена изучению роли конформационной динамики белка в процессах преобразования энергии биоэнергетическими комплексами сопрягающих мембран фотосинтезирующих бактерий, цианобактерий, хлоропластов и митохондрий.

Актуальность работы. Преобразование энергии в сопрягающих фосфолипидных мембранах представляет собой фундаментальный процесс, имеющий место во всех клеточных организмах. Среди биоэнергетических реакций особое значение занимает фотосинтез, являющийся глобальным источником свободной энергии биосферы Земли. Фотосинтетическое преобразование солнечной энергии в устойчивые химические формы отвечает за генерацию кислорода в атмосфере и образование органических соединений, как в процессе вегетации, так и в виде запасенных ископаемых углеводов. Важность исследований процессов преобразования энергии в биологических мембранах является очевидной как с научной точки зрения, так и в прикладных целях (медицинские аспекты биоэнергетики, развитие альтернативных источников энергии).

Цель и задачи работы. Общей целью диссертационной работы является определение механизма сопряжения реакций переноса заряда и структурной динамики белка в процессах преобразования энергии биоэнергетическими комплексами сопрягающих мембран фотосинтезирующих бактерий, цианобактерий, хлоропластов и митохондрий. В работе получены количественные характеристики конформационных движений, обуславливающих реакции переноса электрона и протона в фотосинтетических пигмент-белковых комплексах бактериального реакционного центра (БРЦ), фотосистемы 1 (ФС1), в белковом комплексе F_0F_1 АТФ-синтазы, а также диффузии ионов в слоях структурно-упорядоченной воды вблизи поверхности фосфолипидных мембран. Были поставлены следующие **основные задачи**:

1. Выявить особенности молекулярного механизма сопряжения первичных реакций фотоиндуцированного разделения зарядов в бактериальном фото-

синтетическом реакционном центре с поляризационной динамикой белка.

Для решения этой задачи требовалось:

- а) разработать методы теоретического описания сопряжения адиабатических реакций переноса электрона и конформационной динамики белка;
- б) разработать молекулярно-динамическую модель БРЦ фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter sphaeroides* в липидном бислое;
- в) рассчитать спектральную функцию поляризации белка вокруг специальной пары молекул бактериохлорофилла P_{860} ;
- г) количественно охарактеризовать электрон-фононные взаимодействия и диэлектрический отклик белка в первичных реакциях фотоиндуцированного разделения заряда в БРЦ;
- д) объяснить важнейшие особенности первичных реакций переноса электрона в БРЦ: отсутствие зависимости скорости реакции от температуры и движущей силы, выраженные колебательные особенности в кинетике, нарушение симметрии между структурно близкими ветвями кофакторов.

2. Выяснить механизм электрон-фононного сопряжения реакций первичного (восстановление хлорофилла A_0) и вторичного (восстановление и реокисление филлохинона в сайте A_1) переноса электрона в ФС 1. Частные задачи:

- а) разработать методику прямого возбуждения первичного донора электрона димера хлорофилла P_{700} фемтосекундными импульсами в дальней красной области (760 нм);
- б) проанализировать массив экспериментальных данных, полученных методом лазерного фемтосекундного возбуждения-зондирования и представляющих первичные спектральные изменения в ФС1 в широком спектральном диапазоне в зависимости от энергии возбуждающего импульса;
- в) проанализировать экспериментальные данные, характеризующие электрон-фононные взаимодействия в сайте вторичного акцептора электрона A_1 ;
- г) разработать квантовую модель адиабатического взаимодействия возбужденного состояния димера P_{700}^* и двух димеров молекул хлорофилла A_{0A} и A_{0B} , расположенных в симметричных ветвях кофакторов А и В;

д) разработать квантовую мультифононную модель неадиабатических реакций восстановления и реокисления филлохинона в сайтах A_{1A} и A_{1B} .

3. Выяснить функциональную роль низкочастотной конформационной динамики в реакциях сопряженного переноса электрона и протона в сайте связывания убихинона Q_B фотосинтетических реакционных комплексов фотосинтезирующих бактерий. Для решения данной задачи:

а) провести анализ данных, полученных методами прямой электрометрии, импульсной спектроскопии, рН-метрии, сайт-специфичного мутагенеза, молекулярной динамики, кинетического моделирования и электростатических расчетов в хромофорах и реакционных центрах, выделенных из клеток *Rb. sphaeroides* и *Blastochloris viridis*;

б) разработать кинетическую модель, количественно характеризующую реакции первичного $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ и вторичного $Q_A^- Q_B^- \rightarrow Q_A Q_B H_2$ восстановления хинона в БРЦ и хромофорах в зависимости от температуры, рН и сайт-специфичных аминокислотных мутаций;

в) количественно характеризовать структурные, энергетические и химические факторы, определяющие скорость переноса электронов и протонов в окислительно-восстановительных реакциях убихинона в сайте Q_B ;

г) определить роль конформационных движений молекулы убихинона и ближайших аминокислотных групп в реакциях электрон-протонного сопряжения терминального акцептора электрона в БРЦ.

4. Определить структурно-функциональные характеристики процессов диффузии протона в слое структурированной воды вблизи поверхности фосфолипидных мембран. Частные задачи:

а) рассчитать стационарные диффузионные потоки протона на границе раздела мембрана/вода с учетом низкой диэлектрической проницаемости межфазной воды, геометрической формы и размера липидных везикул, плотности протонных помп;

б) получить нестационарное решение уравнения диффузии в условиях импульсного выброса протонов на поверхность сопрягающих мембран, расчи-

тать зависимость скорости протонной релаксации от концентрации подвижного рН-буфера в растворе, от емкости неподвижных рН-буферных групп на поверхности мембраны, от формы и размера мембранных частиц и от высоты потенциального барьера;

в) проанализировать экспериментальные данные по ускорению межфазной протонной релаксации мобильными рН-буферами и оценить величину межфазного потенциального барьера в зависимости от электрического заряда диффундирующих ионных групп;

г) проанализировать экспериментальные данные по латеральной диффузии протона вдоль полярного интерфейса липидных мембран и оценить величину латерального коэффициента диффузии протона в поверхностном слое воды;

д) определить физический механизм возникновения аномальных свойств воды вблизи заряженной поверхности (структурирование и расслоение растворов электролита в наноскопических пленках, появление больших гидратационных сил отталкивания при высокой ионной силе, наличие межфазного потенциального барьера).

5. Выяснить роль низкочастотной вязкоупругой динамики структурных элементов в процессах электро-механо-химического преобразования энергии в белковых комплексах F_0F_1 АТФ-синтазы. Частные задачи:

а) разработать механо-кинетическую модель эластичного сопряжения реакций транслокации протона в комплексе F_0 и синтеза АТФ из АДФ и фосфата в гетерогексамере F_1 ;

б) с помощью механо-кинетической модели проанализировать функциональные данные, относящиеся к синтезу и гидролизу АТФ комплексом F_0F_1 , а также зависимость протонной проводимости комплекса F_0 от рН и величины трансмембранной разницы электрохимического потенциала протона;

в) рассчитать характеристики вязкоупругой динамики вращающихся актиновых филаментов, активно движимых ферментом под воздействием стохастической силы Ланжевена и вязкого сопротивления окружающего раствора;

г) разработать алгоритм числовой обработки видеокадров вращающихся

флуоресцирующих нитей актина, связанных с иммобилизованными комплексами F_1 и F_0F_1 в условиях гидролиза АТФ;

д) провести анализ вязкоупругой динамики вращающихся филаментов и определить профиль углового момента фермента под внешней нагрузкой;

е) выяснить механизм эффективной передачи мощности в ходе вращательного движения двух сопряженных частей F_0F_1 АТФ-синтазы, обладающих различной осевой симметрией.

Положения, выносимые на защиту

1. Предложено теоретическое описание адиабатических реакций переноса электрона в пигмент-белковых комплексах, сопряженных со стохастической конформационной динамикой белкового матрикса. С помощью молекулярно-динамической модели бактериального реакционного центра (БРЦ) фотосинтетических бактерий *Rhodobacter sphaeroides* рассчитана спектральная функция поляризации белка вокруг первичного донора электрона P_{860} . Поляризационная динамика белка вокруг P_{860} характеризуется значительной асимметрией. В поляризационном спектре можно выделить низкочастотную колебательную моду (частота $\sim 120 \text{ см}^{-1}$, время затухания $> 1 \text{ пс}$), связанную с упругими колебаниями α -спиралей в окрестности первичного донора. Вибронное возбуждение этой моды обусловлено поворотом лигандов первичного донора вокруг аксиальной оси. Аккумуляция части энергии возбуждения P_{860} в виде фононных колебаний объясняет ряд наблюдаемых свойств первичных реакций переноса электрона в БРЦ, а именно: независимость скорости реакции от температуры и движущей силы, осциллирующий характер кинетики и асимметрию между ветвями *A* и *B*.

2. Разработана методика непосредственного возбуждения первичного донора электрона P_{700} фотосистемы 1 фемтосекундными импульсами в дальней красной области поглощения. Методом «возбуждение-зондирование» доказано, что формирование спектра первичной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ в переходном спектре ФС1 происходит за время короче 180 фс. Предложена квантовая модель адиабатического взаимодействия возбужденного состояния

димера P_{700}^* и двух симметричных состояний с разделенными зарядами. Показано, что квантовое смешение трех состояний обуславливает высокую поляризуемость возбужденного состояния реакционного центра и может приводить к появлению плоской потенциальной поверхности вдоль эффективной координаты реакции. Наличие плоского адиабатического терма позволяет объяснить сверхбыструю кинетику разделения зарядов и возникновение необычной экспоненциальной асимптотики спектра поглощения ФС1 в дальней красной области, известной в физике твердого тела как зависимость Урбаха.

3. Определен механизм электрон-фононного сопряжения в сайтах связывания вторичного акцептора электрона филлохинона A_1 в комплексах ФС1, лишенных железо-серных кластеров. Проанализирована температурная зависимость кинетики рекомбинации ион-радикальных состояний $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$, возникающих в двух ветвях кофакторов в ходе фотоиндуцированного разделения зарядов, и построена неадиабатическая модель электрон-фононного сопряжения. Поляризационная динамика белка аппроксимирована двумя фононными модами. Высокочастотная мода ($\sim 1000 \text{ см}^{-1}$) характеризуется высокой энергией сопряжения с реакциями переноса электрона ($\sim 0,7 \text{ эВ}$), ее возбуждение акцептирует основную часть изменения энергии в ходе реакции. Низкочастотная мода ($160\text{--}240 \text{ см}^{-1}$) слабо сопряжена с электронной подсистемой ($10\text{--}30 \text{ мэВ}$), фононные переходы этой моды обеспечивают тонкую подгонку уровней энергии начального и конечного электронных состояний кофакторов. Диэлектрические свойства белкового матрикса ФС1 напоминают свойства кристаллических и стеклянных тел, а их теоретическое описание требует квантового рассмотрения во всем диапазоне температур.

4. Выяснен молекулярный механизм окислительно-восстановительных реакций в сайте связывания вторичного убихинона Q_B реакционных центров фотосинтетических бактерий *Rb. sphaeroides*. Построена кинетическая модель, количественно характеризующая функционирование терминального акцептора: реакции первичного $Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$ и вторичного $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_BH_2$ восстановления убихинона сопряжены с переносом двух протонов и конфор-

мационным переходом хинона из проксимального в дистальное положение. Определены кинетические и термодинамические параметры различных стадий реакции, диэлектрические характеристики белкового комплекса, скорости диффузии протонов внутри сайта Q_B и обмена с водной фазой снаружи от белкового комплекса.

5. Определены структурно-функциональные характеристики диффузии протона в слое структурированной воды вблизи поверхности фосфолипидных мембран. Рассчитана стационарная величина концентрации протонов вблизи поверхности сопрягающих мембран с учетом низкой диэлектрической проницаемости межфазной воды, геометрической формы и размера липидных везикул, типичной плотности и скорости работы протонных помп. Получено нестационарное решение уравнения диффузии протонов, выбрасываемых на поверхность фосфолипидных мембран, и рассчитана скорость протонной релаксации в зависимости от концентрации подвижного рН-буфера в растворе, от емкости неподвижных рН-буферных групп на поверхности мембраны, от формы мембранных частиц и от высоты потенциального барьера. Обнаружена корреляция между высотой межфазного потенциального барьера и электрическим зарядом мобильных буферных групп. Определена величина латерального коэффициента диффузии протона в поверхностном слое воды. Проанализирован возможный механизм возникновения ряда аномальных свойств воды вблизи заряженной поверхности: структурирование и расслоение растворов электролита в наноскопических пленках, появление больших гидратационных сил отталкивания при высокой ионной силе, наличие межфазного потенциального барьера.

6. Проанализирована роль вязкоупругой динамики структурных элементов протонной F_0F_1 АТФ-синтазы в процессе электро-механо-химического преобразования энергии роторным генератором. Разработана модель эластичного сопряжения реакций транслокации протона в комплексе F_0 и синтеза АТФ в гетерогексамере F_1 . Проведено моделирование функциональных данных, относящихся к синтезу и гидролизу АТФ комплексом F_0F_1 , а также протон-

ной проводимости комплекса F_0 в зависимости от pH и величины трансмембранной разницы электрохимического потенциала протона. Рассчитаны характеристики вязкоупругой динамики вращающихся актиновых филаментов, прикрепленных к иммобилизованным на подложке комплексам F_0F_1 и движимых за счет гидролиза АТФ. Определен энергетический профиль углового момента фермента под внешней нагрузкой и выяснен механизм эффективной передачи мощности в ходе вращательного движения двух сопряженных частей F_0F_1 АТФ-синтазы, обладающих различной осевой симметрией.

Научная и практическая значимость работы. Работа имеет выраженную фундаментальную направленность. В диссертационной работе предложено решение нескольких проблем молекулярной биофизики, относящихся к функциональной роли выделенных конформационных движений белка (колебательных мод) в реакциях преобразования энергии мембранными биоэнергетическими комплексами. Концепция функционирования белковых комплексов как молекулярных машин была разработана в отечественной биофизике и в настоящее время представляет собой актуальную область мировой науки, активно развивающуюся в связи с появлением новых методов, позволяющих детально характеризовать структуру и динамику белка с атомным уровнем разрешения. В работе проанализированы процессы преобразования энергии белковыми комплексами наноскопического размера, находящимися в сопрягающих мембранах митохондрий, хлоропластов, клетках фотосинтезирующих бактерий и синезеленых водорослей, во временном диапазоне от фемтосекунд до секунд. Рассматриваются различные аспекты сопряжения реакций переноса заряда (электрона, протона и мобильных ионов) с конформационной динамикой структурно-упорядоченной полярной среды (белковый матрикс, фосфолипидная мембрана, водное окружение). Детальное знание физико-химических механизмов процессов преобразования энергии в белковых мембранных комплексах имеет важнейшее прикладное значение для молекулярной фармакологии и развития альтернативных источников энергии. Полученные результаты могут найти применение при теорети-

ческом моделировании внутриклеточных биохимических процессов, в решении задач молекулярной фармакологии, а также в создании альтернативных преобразователей солнечной энергии.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на 7 международных конференциях.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 46 работ, представленных в базах «Scopus» и «Web of Science» и «RSCI», список которых приведен в конце автореферата.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав, описания материалов и методов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы работы изложены на 248 страницах машинописного текста, включая 59 рисунков и 8 таблиц. Список литературы содержит 337 библиографических ссылок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава «**Электрон-фононные взаимодействия в реакциях переноса электрона в бактериальном фотосинтетическом реакционном центре**» посвящена анализу реакций электронного транспорта (ЭТ) в пигмент-белковых комплексах бактериального реакционного центра (БРЦ) фотосинтезирующих бактерий. Теоретический анализ этих процессов в диссертации основывается на двух взаимодополняющих подходах. Во-первых, это теория неадиабатических реакций, восходящая к классической теории окислительно-восстановительных реакций в растворах Маркуса [1], и квантовая теория многофононных переходов в плотных средах Догондзе-Левича [2]. Последовательное квантово-механическое описание данных реакций аппроксимирует движение ядер белка как мультифононную систему гармонических осцилляторов, сопряженных с безызлучательными электронными переходами, а скорость реакции рассчитывается на основе «золотого правила» Ферми:

$$W_{a \rightarrow b} = 2\pi\hbar^{-1} |V|^2 \cdot \sum_m \sum_n^{|E_{bn} - E_{am}| < \Delta E} P_m |f_{am, bn}|^2 / \Delta E \quad (1)$$

Здесь V – матричный элемент электронного сопряжения между слабо взаимодействующими кофакторами, сумма по всем начальным и конечным квантовым состояниям m и n (известная как фактор Франка-Кондона), $f_{am,bn}$ – интеграл перекрытия между ядерными волновыми функциями начального и конечного состояния, p_m – больцмановский фактор, E_{am} и E_{bn} представляют энергии вибронных состояний, а ΔE – энергетический зазор малой величины. Неадиабатическое приближение предполагает, что электронное сопряжение кофакторов мало (электронный переход медленнее поляризационной динамики среды), поэтому туннелирование электронов возможно только в ядерных конформациях, где энергии начального и конечного состояний совпадают с точностью до величины ΔE . Классическое описание реакций в растворе следует из многофононной теории как высокотемпературный предел, когда частота поляризации растворителя ω_s значительно ниже эффективной тепловой частоты $k_B T/\hbar$. Частный случай безызлучательных переходов в двухфононном приближении был проанализирован Джортнером, его решение было выражено в виде ряда модифицированных функций Бесселя [3].

Во-вторых, это теория адиабатических реакций, которая описывает ЭТ в случаях, когда электронный обмен между кофакторами быстрее, чем диэлектрический отклик окружающей среды, так что скорость реакции определяется динамикой реорганизации среды. Такой механизм характеризуется высоким значением электронного сопряжения и не может быть описан в рамках золотого правила Ферми. Теория адиабатического ЭТ использует систему связанных уравнений Смолуховского [4], а предельный случай сильно экзотермических реакций был проанализирован Маркусом и соавторами [5].

Релаксационные процессы в белках протекают в широком временном интервале от пикосекунд до секунд, поэтому сравнительно медленные процессы диэлектрической поляризации могут вызывать дополнительное перераспределение электронной плотности в реакциях, протекающих в целом по неадиабатическому механизму. Использование систем связанных эллиптических уравнений в частных производных для описания адиабатических реак-

ций ЭТ вызывает определенные технические трудности. Кроме того, для сверхбыстрых реакций первичного разделения заряда в фотосинтетических комплексах необходимо учитывать осцилляционный характер поляризационной динамики, что требует использования значительно более сложного аппарата уравнений типа Фоккера-Планка. Для количественного анализа адиабатических реакций переноса электрона, сопряженных с поляризационной динамикой белкового матрикса, в диссертации разработан альтернативный подход, основанный на комбинации методов молекулярной динамики (МД) и обобщенного стохастического уравнения Ланжевена.

Феноменологическое стохастическое уравнение Ланжевена описывает два типа кинетического поведения – затухающие колебания и монотонную (дебаевскую) релаксацию. В диссертации изложен метод разделения поляризационной динамики на быструю и медленную составляющие: более быстрая компонента реорганизации связана с первоначальным перераспределением электрона между реагентами по неадиабатическому механизму (константы скоростей прямой и обратной реакций $k_{ab}\{Q\}$ и $k_{ba}\{Q\}$ зависят от медленных координат Q); при этом медленная составляющая характеризует релаксационную адиабатическую динамику. Медленная динамика может быть описана как диффузия в многомерном эффективном потенциале $U\{Q\}$, вычисляемом методом термодинамического усреднения по конфигурационному пространству системы с учетом изменяющегося электронного состояния реагентов:

$$U\{Q\} = -k_B T \ln \left[\exp \left(- \sum_j \frac{2\Lambda_j Q_j^2}{2k_B T} \right) + \exp \left(- \sum_j \frac{2\Lambda_j (1-Q_j)^2 + \Delta G}{2k_B T} \right) \right] \quad (2)$$

Здесь Q_j – множество медленных эффективных координат системы, Λ_j – соответствующие им коэффициенты электрон-фононного сопряжения (энергии реорганизации), ΔG – изменение свободной энергии (движущая сила) реакции. Динамика координат Q_j выражается обобщенным стохастическим уравнением Ланжевена:

$$\ddot{Q}_j + \Gamma_j \dot{Q}_j + \Omega_j^2 [Q_j \cdot P_A(t) + (Q_j - 1) \cdot P_B(t)] = \sqrt{\Gamma_j k_B T \Omega_j^2 / \Lambda_j} F_j(t) \quad (3)$$

где Γ_j – коэффициент демпфирования, Ω_j – эффективная частота моды j , F_j – случайная сила, $P_A(t)$ и $P_B(t)$ – вероятности начального и конечного электронных состояний реагентов, изменения которых задаются уравнениями:

$$\begin{aligned} \dot{P}_A(t) &= -k_{AB}\{Q\} \cdot P_A + k_{BA}\{Q\} \cdot P_B \\ \dot{P}_B(t) &= k_{AB}\{Q\} \cdot P_A - k_{BA}\{Q\} \cdot P_B \end{aligned} \quad (4)$$

Данный подход был применен к описанию реакций ЭТ в БРЦ. Реакции первичного разделения зарядов в БРЦ представляют собой классический объект для изучения механизма ЭТ в пигмент-белковых комплексах. Однако, несмотря на многолетние исследования, механизм реакции образования ион-радикальной пары (катиона первичного донора электрона P_{860}^+ и аниона бактериофеофитина H_A^-) остается во многих отношениях непонятным: (i) скорость данной реакции практически не изменяется при варьировании температуры от 4 до 300 К и движущей силы $-\Delta G$ от -200 до $+40$ мэВ, (ii) реакция переноса электрона имеет выраженные колебательные особенности, впервые наблюдавшиеся В.А. Шуваловым и соавторами (1997), (iii) реакция характеризуется сильным нарушением симметрии между структурно близкими ветвями кофакторов A и B . С целью найти объяснение указанным выше особенностям реакций первичного разделения зарядов и характеризовать поляризационную динамику белкового матрикса была разработана молекулярно-динамическая модель БРЦ *Rhodobacter sphaeroides* в липидном бислое, а результаты моделирования были проанализированы в рамках феноменологического подхода Ланжевена. Были рассчитаны спектральная функция тепловых флуктуаций поляризации белка вокруг специальной пары бактериохлорофилла P_{860} , а также Фурье-спектр диэлектрического отклика белка, индуцированного образованием первичного диполя $P_L^+P_M^-$ между мономерами специальной пары P_{860} (рис. 1). Полученные спектральные функции были аппроксимированы системой стохастических осцилляторов Ланжевена, для которых были определены характерные частоты, коэффициенты демпфирования и величины электрон-фононного сопряжения.

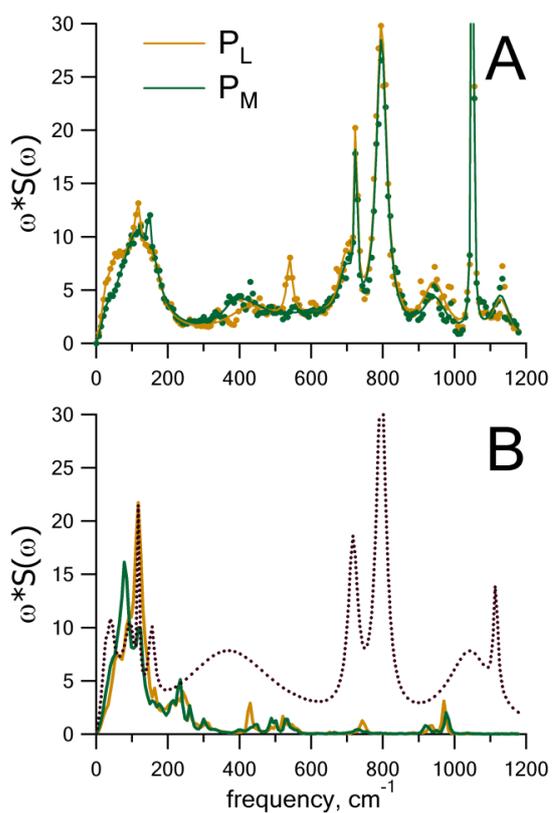


Рисунок 1. (А) Спектральные функции флуктуаций электрического поля на мономерах P_L (желтый) и P_M (зеленый) специальной пары БРЦ, рассчитанные по результатам равновесного молекулярно-динамического моделирования при 100 К (точки), и модели Ланжевена (сплошные линии). (В) Корреляция вращательной динамики аксиальных лигандов специальной пары P_{860} гистидинов His-L172/His-M202 и динамики поляризации в ответ на образование диполя внутри первичного донора $P_L^+P_M^-$ при 100 К. Показаны спектральная функция диэлектрического отклика (черная пунктирная линия) и спектральные функции вращения His-L173 (желтый) и His-M202 (зеленый).

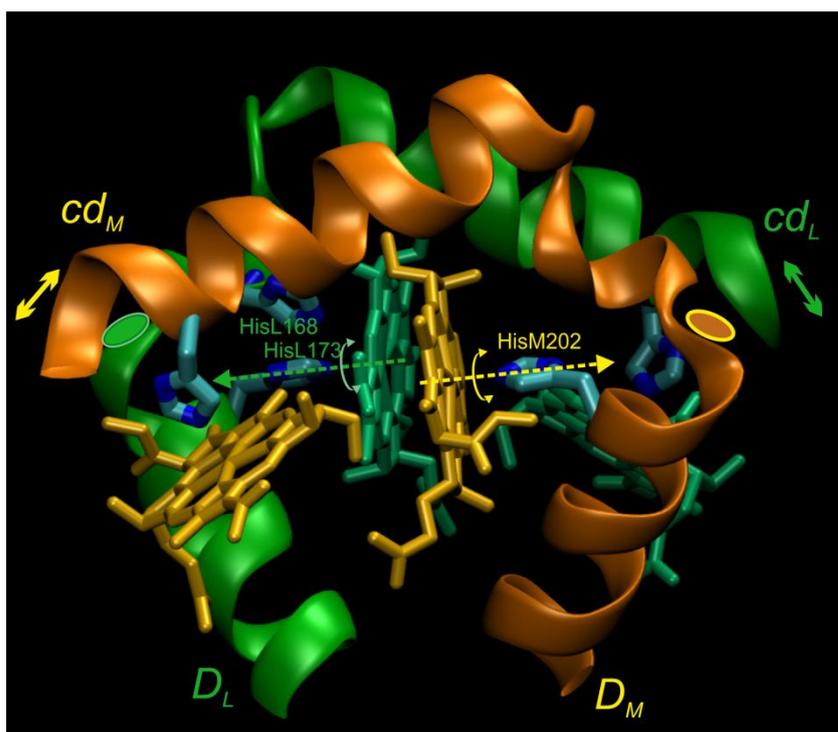


Рисунок 2. Колебательное движение спиралей cd_L/cd_M (обозначено сплошными стрелками) вокруг подвижных «шарниров» (отмечены эллипсами) между спиральями cd и D . Упругие колебания сопряжены с вращением имидазольных колец His-L173/His-M202 (оси вращения обозначены пунктирными стрелками), индуцированным возбуждением первичного донора P_{860} . Симметричные области ветвей L и M показаны оранжевым и зеленым.

Обнаружена значительная асимметрия в свойствах белка вокруг мономеров P_L и P_M . Поляризация вокруг P_L характеризовалась низкочастотными колеба-

тельными модами с частотой 30–80 см⁻¹ и суммарной амплитудой 130 мВ (табл. 1). Две основных низкочастотных моды поляризации белка вокруг P_M имели частоты 95 и 155 см⁻¹ с общей амплитудой 30 мВ. Кроме того, было обнаружено сопряжение реакции образования диполя P_L⁺P_M⁻ с колебательным движением, характеризующимся частотой 118 см⁻¹ и временем затухания >1.1 пс. Данное конформационное движение обусловлено упругими колебаниями α-спиралей в окрестности первичного донора P_LP_M. Светоиндуцированное возбуждение низкочастотной выделенной колебательной моды, сопряженной с образованием диполя внутри возбужденного состояния специальной пары и поворотом ее аксиальных лигандов His-L172/His-M202 (рис. 2), объясняет необычные свойства реакций первичного переноса электронов, а именно: независимость скорости реакции от температуры и движущей силы, осциллирующий характер кинетики и асимметрию между ветвями A и B в первичных процессах разделения заряда в БРЦ.

Таблица 1. Ланжевенская модель поляризационной динамики, индуцированной образованием диполя P_L⁺P_M⁻.

Колебательная мода		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Частота, см ⁻¹		1110	1030	794	715	426	155	118	95	81	43	28
Время затухания, фс		380	36	160	170	16	260	1130	180	60	240	250
Амплитуда, мВ	P _L	1	11	11	6	42	1	9	6	47	35	47
	P _M	1	3	7	4	36	11	3	19	3	5	3

В рамках обобщенного уравнения Ланжевена было получено количественное описание осцилляционных особенностей в кинетике восстановления бактериохлорофилла в сайте V_A, наблюдавшихся в БРЦ, содержащих феофитин *a*, встроенный на место молекулы бактериофеофитина N_A. Осцилляционные особенности кинетики восстановления V_A были интерпретированы как результат сопряжения первичной реакции разделения зарядов и выделенной колебательной моды с характерной частотой 150 см⁻¹ и энергией сопряжения 58 мэВ (рис. 3). С помощью данной теории были также проанализированы

медленные низкоэзотермические реакции ЭТ между первичным и вторичным хинонными акцепторами Q_A и Q_B в акцепторной части БРЦ из *Rhodobacter sphaeroides*, между гемами цитохрома c в донорной части БРЦ из *Blastochloris viridis*, а также реакции окисления редокс-активного тирозина Y_Z , являющегося вторичным донором электрона в фотосистеме 2 (ФС2).

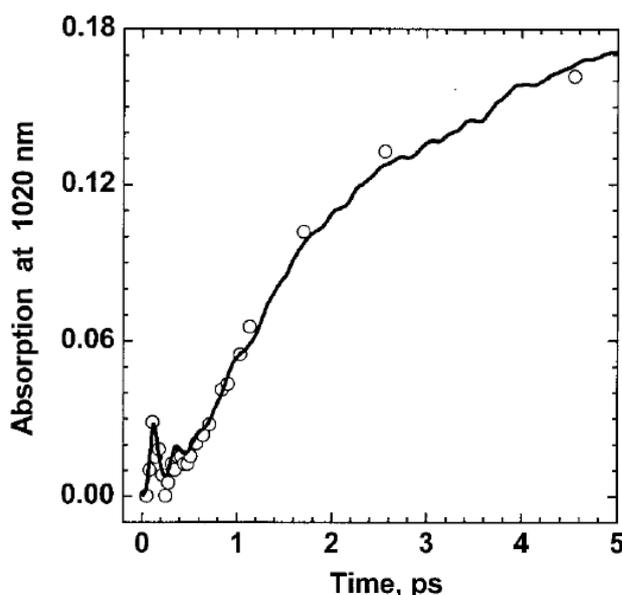


Рисунок 3. Кинетика восстановления бактериохлорофилла B_A в феофитин-замещенных БРЦ *Rb. sphaeroides* (экспериментальные данные из работы Яковлева и др. (2000)). Теоретическая кривая была получена численным интегрированием двух стохастических уравнений (3) в сочетании с кинетическими уравнениями (4), было проведено усреднение по 100 траекториям. Использовались следующие значения параметров: $\Delta G = -20$ мэВ, $\lambda = 40$ мэВ, $\Lambda_1 = 58$ мэВ, $\Lambda_2 = 41$ мэВ, $\omega_{\text{eff}} = 400$ cm^{-1} , $\Omega_1 = 150$ cm^{-1} , $\Omega_2 = 20$ cm^{-1} , $\Gamma_1 = 25$ cm^{-1} , $\Gamma_2 = 10$ cm^{-1} , $Q_1(0) = -0,3$, $Q_2(0) = 0$.

Вторая глава «Механизм реакций переноса электрона в фотосистеме 1» посвящена квантовым аспектам сверхбыстрых (адиабатических) и более медленных (неадиабатических) процессов электронного транспорта. Фотосистема 1 (ФС1) высших растений и цианобактерий представляет собой мембранный белок, в котором 90 молекул хлорофилла интегрированы вместе с кофакторами двух ветвей ЭТ в большой пигмент-белковый комплекс. Первичные реакции разделения зарядов в ФС1 изучены значительно хуже по сравнению с аналогичными реакциями в БРЦ. В диссертации проведен анализ прямых и обратных реакций ЭТ в ФС1 из цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803, первичные данные были получены методами фемтосекундной спектроскопии «возбуждение-зондирование» в лаборатории В.А. Надточенко Института Химической Физики РАН и импульсной спектроскопии в лаборатории Джона Гольбека (Университет штата Пенсильвания, США).

Изучение механизма первичных реакций в ФС1 затруднено тем обстоятельством, что прямое возбуждение первичного донора— специальной пары молекул хлорофилла P_{700} — в выделенных комплексах неосуществимо в обычных условиях из-за наличия в реакционном центре 90 молекул хлорофилла антенны, поглощающих в том же диапазоне, что и P_{700} . В связи с этим в работе осуществлялось возбуждение ФС1 фемтосекундными импульсами, центрированными в дальней красной области на длинах волн >720 нм. Спектр поглощения ФС1 в красной области имеет необычную экспоненциальную асимптотику, известную в физике твердого тела как феноменологическое правило Урбаха. Был проведен анализ массива данных, представляющих фотоиндуцированные спектральные изменения в ФС1 во временном интервале от 150 фс до 500 пс на длинах волн от 450 до 730 нм при различных энергиях возбуждающего импульса. Показано, что при облучении комплексов 760 нм импульсом длительностью 30 фс происходит прямое возбуждение димера P_{700} практически без участия длинноволновых форм хлорофилла антенны. В этих условиях полное формирование спектра первичной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ в переходном спектре ФС1 происходит за время короче 180 фс, а формирование спектра вторичной пары $P_{700}^+A_1^-$ со временем 26 пс (рис. 4).

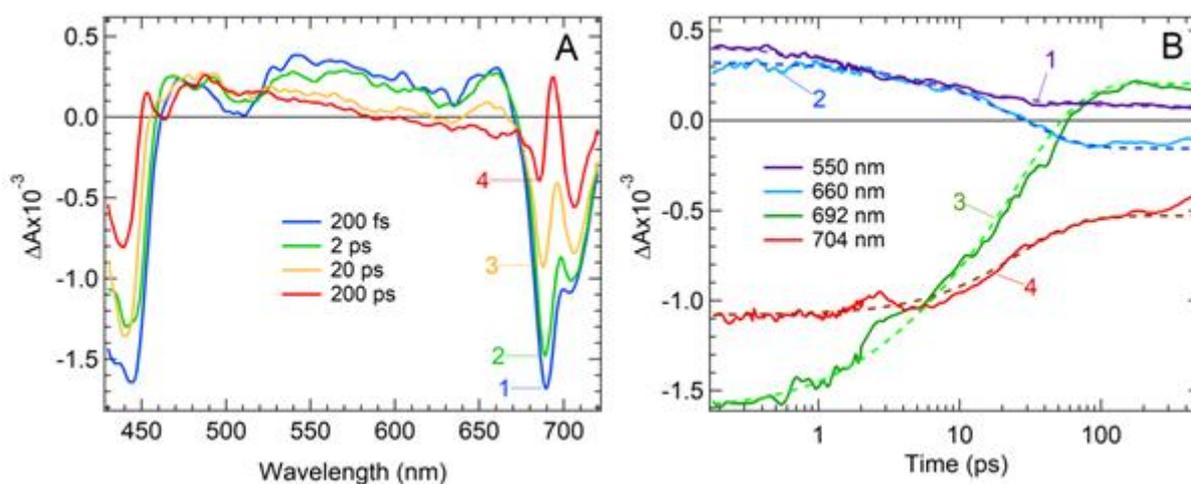


Рисунок 4. А. Спектры поглощения ФС1 при различных временах задержки (1 – 200 фс, 2 – 2 пс, 3 – 20 пс, 4 – 200 пс). В. Спектральные изменения на определенных длинах волн (1 – 550 нм, 2 – 660 нм, 3 – 692 нм, 4 – 704 нм). 30-фс возбуждающие импульсы были центрированы на 760 нм с отсечкой компонент <740 нм (энергия 200 нДж).

Полученные данные существенно меняют принятые в фотобиологии представления о скорости первичной реакции разделения заряда в ФС1, которая в большинстве работ принимается равной 2–5 пс. Первичное разделение зарядов в ФС1 является, по всей видимости, самой быстрой реакцией ЭТ в биологических системах, механизм этой реакции был проанализирован в рамках квантовой адиабатической модели трех состояний. Модель рассматривает взаимодействие возбужденного димера P_{700}^* и двух ближайших к P_{700} симметрично расположенных молекул хлорофилла A_{0A} и A_{0B} . Непосредственный стерический контакт молекул хлорофилла P_{700} и A_0 (расстояние 3.3 Å) обуславливает их сильное электронное сопряжение, что приводит к квантовому смешению состояний P_{700}^* , $P_{700}^+A_{0A}^-$ и $P_{700}^+A_{0B}^-$. Из-за симметрии в расположении кофакторов гамильтониан модели трех состояний в диабатическом представлении имеет вид:

$$H^{diab} = \begin{pmatrix} U_1 & V & V \\ V & U_A & 0 \\ V & 0 & U_B \end{pmatrix} \quad (4)$$

Здесь V - матричный элемент взаимодействия P_{700}^* и ион-радикальных состояний $P_{700}^+A_{0A}^-$ и $P_{700}^+A_{0B}^-$, взаимодействие между двумя последними состояниями не учитывается. Энергетические термы возбужденного состояния находятся решением секулярного уравнения для матрицы (4)

$$(U_1 - \varepsilon)(U_A - \varepsilon)(U_B - \varepsilon) - V^2(U_A - \varepsilon) - V^2(U_B - \varepsilon) = 0 \quad (5)$$

Нижний адиабатический терм смешанного состояния как функция обобщенной координаты реакции представлен на рис. 5 (сплошная синяя линия). Возбуждение фс-импульсом в максимум поглощения P_{700} (705 нм) индуцирует образование электронного состояния с наибольшим вкладом от P_{700}^* , тогда как возбуждение в дальний красный край спектра (760 нм) переводит комплекс преимущественно в состояние с разделенными зарядами. Квантовое смешение трех состояний приводит к появлению плоской потенциальной поверхности вдоль эффективной координаты реакции и обуславливает высокую поляризуемость возбужденного состояния. Предложенная модель дает объ-

яснение как сверхбыстрой кинетике образования ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$, так и экспоненциальной асимптотике спектра поглощения ФС1 в дальней красной области.

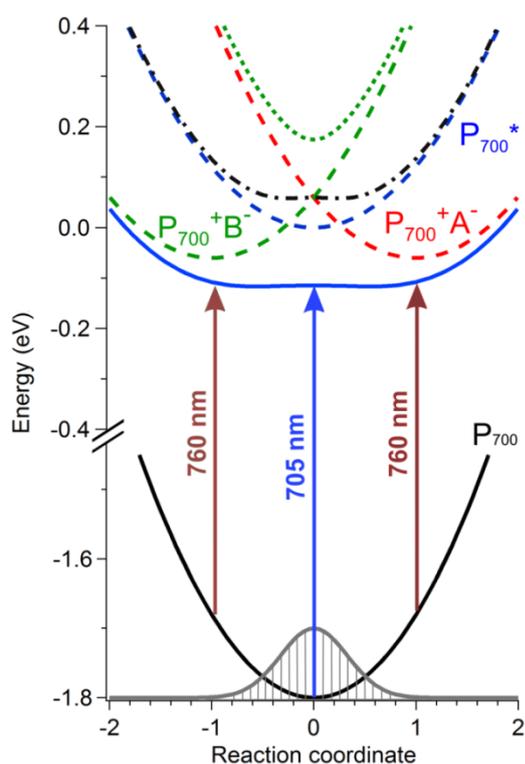


Рисунок 5. Энергетические термы адиабатической модели возбужденного состояния реакционного центра ФС1. Диабатические энергетические термы рассчитаны для основного, возбужденного и ион-радикального состояний пигментов с параметрами $\Delta G_0 = -0,06$ эВ, $\lambda = 0,12$ эВ, $U_0 = 1,8$ эВ; адиабатические термы были рассчитаны по уравнению (5) для $|V_{ab}| = 0,1$ эВ. Штриховкой показано тепловое распределение Больцмана в основном состоянии.

Окислительно-восстановительные реакции хинонных акцепторов в реакционном центре ФС1 происходят в белковой матрице вдали от границы белково-вода и представляют собой пример процессов, удобных для изучения механизма квантового электрон-фононного сопряжения. Классическое исследование электрон-фононного сопряжения в БРЦ *Rhodobacter sphaeroides* было предпринято Даттоном и сотрудниками, которые измеряли прямые и обратные реакции ЭТ с химически модифицированными хинонами в сайте Q_A [6]. Было обнаружено, что скорости как прямой $H_A^-Q_A \rightarrow H_A Q_A^-$, так и обратной $P_{860}^+Q_A^- \rightarrow P_{860}Q_A$ реакций не зависят от ΔG в широком интервале и постоянны при температурах между 5 К и 113 К. Анализ данных с использованием теории мультифононных безызлучательных переходов Догондзе-Левича-Джортнера привел авторов к выводу, что в условиях низких температур механизм переноса электрона в БРЦ обусловлен фононными переходами ядерной подсистемы, поведение которой должно описываться квантовым обра-

зом. Однако, кинетические свойства реакций в БРЦ не могут быть экстраполированы в область высоких температур, что оставляет открытым вопрос о механизме ЭТ в обычных условиях.

Сходный подход был применен в диссертационной работе для анализа аналогичных реакций хинонов в реакционных центрах ФС1 с использованием экспериментальных данных, полученных в лаборатории Дж.Гольбека (США). В отличие от аналогичных реакций в БРЦ, кинетика рекомбинации $P_{700}^+A_1^- \rightarrow P_{700}A_1$ в реакционных центрах ФС1, лишенных железо-серных кластеров, не претерпевает изменений в точке стеклования водно-глицериновой смеси около 160 К (рис. 6), что дает возможность проанализировать механизм ЭТ в диапазоне температур от 20 до 300 К. Реакция характеризуется наличием двух кинетических компонент с характерными временами 10–25 и 80–400 микросекунд, которые обусловлены рекомбинаций электрона с хинонных акцепторов A_{1B} и A_{1A} в симметричных ветвях кофакторов. Скорости обеих реакций были постоянны при температуре ниже 150 К и слабо ускорялись при повышении температуры выше 150 К. Амплитуды кинетических компонент отражают соотношение скоростей прямых реакций от первичных акцепторов $A_{0A/0B}$ к хинонам $A_{1A/1B}$ в ветвях *A* и *B*. Ниже 100 К соотношение этих скоростей существенно изменяется в пользу ветви *A*. Температурные зависимости скоростей прямого и обратного ЭТ были проанализированы с помощью неадиабатической теории мультифононных переходов в соответствии с уравнением (1). Модель аппроксимирует поляризационную динамику белка с помощью двух упругих фононных мод (табл. 2). Высокочастотная мода ($\sim 900 \text{ см}^{-1}$) характеризуется высокой энергией сопряжения с реакциями ЭТ ($\sim 0,7 \text{ эВ}$), возбуждение этой моды акцептирует основную часть изменения энергии в ходе реакции. Низкочастотная мода ($160\text{--}240 \text{ см}^{-1}$) слабо сопряжена с реакцией ЭТ (энергия реорганизации 10–30 мэВ) и обеспечивает тонкую подгонку уровней энергии начального и конечного состояний системы. Слабые температурные зависимости прямых и обратных реакций ЭТ с участием хинонов обусловлены изменением больцмановского распределения колеба-

ТЕЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ НИЗКОЧАСТОТНОЙ МОДЫ.

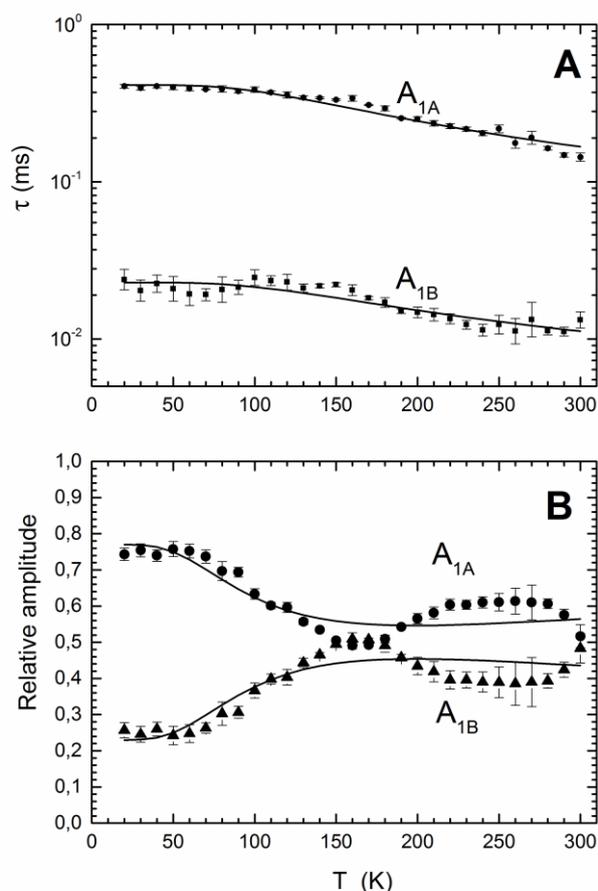


Рисунок 6. Температурные зависимости кинетики (А) и амплитуды (В) двух кинетических компонент рекомбинации заряда $P_{700}^+A_1^- \rightarrow P_{700}A_1$ в ФС1, лишенной железо-серных кластеров. Сплошные линии представляют теоретические кривые, вычисленные по уравнению (1) с параметрами, приведенными в таблице 2.

Таким образом, анализ температурных зависимостей кинетики реакций переноса электрона в реакционном центре ФС1 показал, что диэлектрические свойства белкового матрикса напоминают свойства кристаллических и стеклянных тел, а их теоретическое описание требует квантового рассмотрения во всем диапазоне температур.

Таблица 2. Параметры электрон-фононного сопряжения в двухфононной модели реакций ЭТ в ФС1.

Reaction	V , eV	$-\Delta G$, eV	ω_f , cm^{-1}	λ_f , meV	ω_s , cm^{-1}	λ_s , meV
$A_{0A} \rightarrow A_{1A}$	–	0.58	871	700	242	13
$A_{0B} \rightarrow A_{1B}$	–	0.50	1286	700	164	27
$A_{1A} \rightarrow P_B$	$1.6 \cdot 10^{-6}$	1.05	892	700	184	10
$A_{1B} \rightarrow P_B$	$8.8 \cdot 10^{-6}$	1.16	892	700	184	10

В третьей главе «Сопряжение реакций переноса электрона и протона в фотосинтетических комплексах» рассматриваются процессы переноса протона в области полярного интерфейса мембранных белков, сопряженные с окислительно-восстановительными реакциями кофакторов цепи электронного транспорта. Детально проанализирован механизм переноса протона в акцепторной части БРЦ.

Фотоиндуцированное восстановление молекулы убихинона в сайте Q_B БРЦ происходит последовательно в две стадии с образованием промежуточного анион-радикала семихинона $Q_B^{\bullet-}$. Перенос второго электрона сопровождается связыванием хиноном двух протонов, которые диффундируют внутрь белка из водной фазы. Молекулярный механизм переноса протона ко вторичному хиноновому акцептору в сайте Q_B реакционных центров в хроматофорах *Rhodobacter sphaeroides* и *Blastochloris viridis* изучался методами прямой электрометрии, импульсной спектроскопии, измерением электрохромного каротиноидного отклика, рН-метрии, сайт-специфичного мутагенеза, молекулярной динамики, кинетического моделирования и электростатических расчетов. Первичные данные были получены в лаборатории А.Ю. Семенова (Институт физико-химической биологии МГУ) и в лаборатории Вольфганга Юнге (Университет г. Оснабрюк, Германия), сайт-специфичный мутагенез был произведен в лаборатории Дитера Остерхельта (Институт биохимии им. Макса Планка, Мюнхен, Германия).

Были проанализированы температурные зависимости реакций первичного $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ и вторичного $Q_A^- Q_B^- \rightarrow Q_A Q_B H_2$ восстановления хинона в хроматофорах *Rb. sphaeroides*. При температуре $<15^\circ C$ кинетика первой реакции четко разделяется на две компоненты с характерными временами 25 мкс и 300 мкс ($+10^\circ C$, рН 7,0). Вклад медленной компоненты возрастает при рН $> 9,0$. Энергии активации E_{act} быстрой и медленной фаз при рН 7,0 оценивались как <10 кДж/моль и 60–70 кДж/моль, соответственно. Кинетика переноса второго электрона и сопряженного электрогенного переноса двух протонов измерялась как функция рН и температуры. В кинетике этой реакции также

выделяется две компоненты со временами 65 мкс и 360 мкс и сопоставимыми вкладами (+10 °С, рН 7,2). Амплитуда быстрой компоненты уменьшалась в щелочной области ($pK_a \sim 8,5$), тогда как амплитуда более медленной компоненты была постоянной вплоть до рН 9,5 и уменьшалась при рН > 10. Наблюдаемые энергии активации быстрой и медленной компонент ($E_{act} < 10$ кДж/моль и 55–66 кДж/моль) соответствовали аналогичным величинам, полученным для первичного восстановления хинона в сайте Q_B . Сходные данные были получены для БРЦ в хроматофорах *Bl. viridis*: время быстрой температурно-независимой компоненты реакции первичного восстановления хинона составляло 30 мкс, медленной составляющей 200 мкс с энергией активации 50 кДж/моль (+20 °С, рН 7,5). Кинетика после второй вспышки характеризовалась быстрой температурно-независимой компонентой со временем 5 мкс и медленной компонентой 600 мкс с $E_{act} = 60$ кДж/моль.

Был детально проанализирован механизм переноса протона в сайте Q_B . Скорость реакции исследовалась зависимости от концентрации рН-индикатора, добавленного рН-буфера и температуры. Было показано, что (i) перенос протонов в сайт Q_B происходит с поверхностных буферных групп белкового комплекса одновременно с восстановлением Q_B с характерным временем <100 мкс и не лимитирует реакцию; (ii) обмен протонами между поверхностными буферными группами белка и мобильным буфером в водной фазе затруднен и осуществляется со временем ~400 мкс.

Реакции образования $Q_B H_2$ изучались также в реакционных центрах *Rb. sphaeroides*, в которых были произведены сайт-специфичные замены аминокислот в различных позициях субъединиц L, M и H. В частности, была изучена роль в переносе протона аминокислотных групп Ser-L223, Arg-L207 и Arg-L217 субъединицы L. Ser-L223 является непосредственным лигандом дистального атома кислорода убихинона в сайте Q_B . В то время как Arg-L207 находится на расстоянии 17 Å от Q_B , Arg-L217 расположен значительно ближе (9 Å) и непосредственно контактирует с Q_B -связывающим карманом. Анализ рН-зависимости скорости рекомбинации заряда после первой вспыш-

ки позволил определить разность редокс-потенциалов сайтов Q_A и Q_B , а также эффективное значение pK_{212} кислотной группы Glu-L212, находящейся на расстоянии 4 Å от Q_B . Замещение положительно заряженных аргининов нейтральными изолейцинами дестабилизировало состояние Q_B^- у мутанта L217RI в большей степени, чем у L207RI. Значение pK_{212} у мутанта L207RI увеличивалось на ~0,4 единицы pH, тогда как у мутанта L217RI уменьшилось на 0,3 единицы pH, что противоречит ожиданиям. В рамках этой модели были проанализированы также литературные данные для БРЦ нативного типа и ряда мутантов, несущих сайт-специфичные замены аминокислотных групп вблизи убихинона Q_B (см. рис. 7 и Таблицу 3).

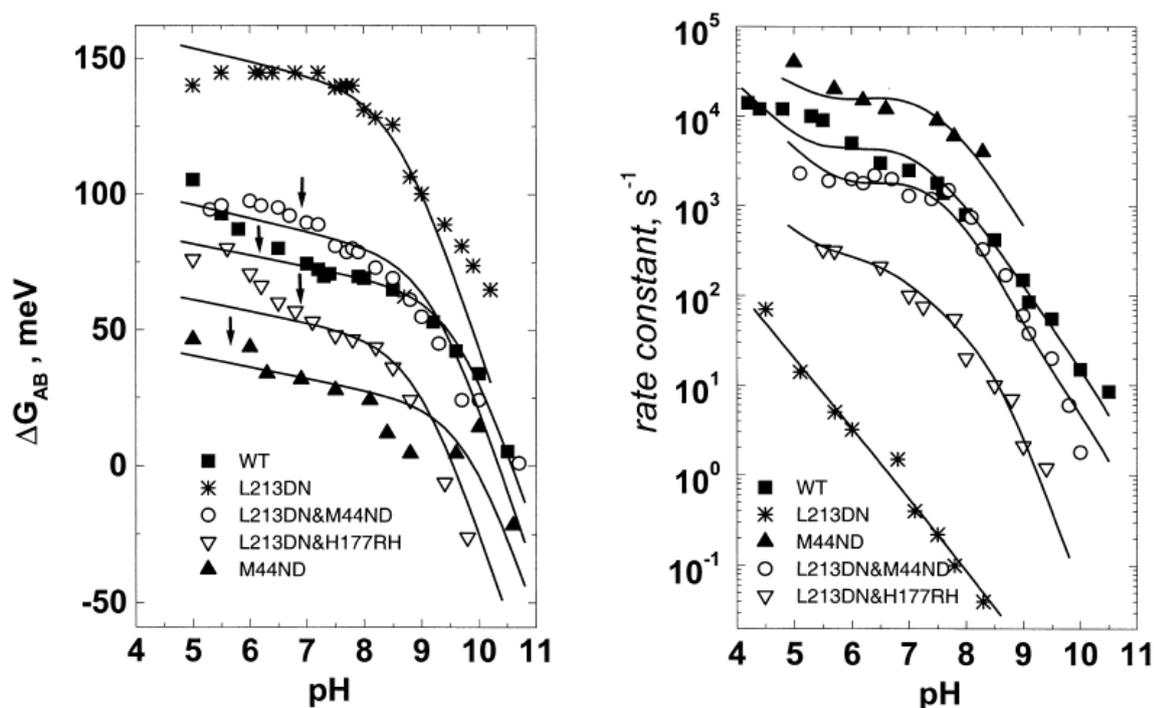


Рисунок 7. pH зависимости активности выделенных препаратов БРЦ *Rb. sphaeroides*: Левая панель: свободная энергия ΔG_{AB} для реакции переноса первого электрона между Q_A и Q_B как функция pH в БРЦ нативного типа (■), L213DN (*), M44ND (▲), L213DN&M44ND (○), L213DN&H177RH (▽). Правая панель: скорость переноса второго электрона в БРЦ нативного типа и тех же модификаций. Теоретические кривые рассчитаны для параметров, перечисленных в таблице 3. Оригинальные экспериментальные данные любезно предоставлены М. Окамурой и М. Паддоком.

Скорость перехода $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_BH_2$ после второй вспышке у мутанта L207RI была в два раза быстрее, чем у дикого типа, но оставалась практически неизменной в мутанте L217RI. Чтобы объяснить эти результаты, была

разработана и проанализирована кинетическая модель сопряжения реакций восстановления-протонирования хинона в сайте Q_B (рис. 8). Модель описывает совокупность имеющихся экспериментальных данных и количественно определяет кинетические и термодинамические параметры обеих реакций восстановления хинона в сайте Q_B. «Химическое» сродство сайта Q_B к протонам, определяемое локальной системой водородных связей, оказалось столь же важным фактором энергетики реакции, как и дальнедействующие электростатические взаимодействия. На основе функциональных исследований, структурных данных, электростатических расчетов, учитывающих неоднородность диэлектрической проницаемости сайта Q_B, кинетического и молекулярно-динамического моделирования, был определен механизм электрон-протонного сопряжения терминального акцептора БРЦ. Ключевым процессом, определяющим скорость восстановления убихинона Q_B и его протонирование, является конформационный переход хинона из проксимального в дистальное положение. Этот переход сопровождается поворотом хинольного кольца и протонированием расположенного рядом Glu-L212. Для этой реакции определены протон-проводящие пути, основные энергетические и кинетические параметры отдельных стадий реакции, а также диэлектрические свойства сайта Q_B.

Таблица 3. Величины ΔG_{AB} и pK_{212} в БРЦ *Rb. sphaeroides* с заменами в позициях L213, M44 и H177.

Штамм	ΔG_{AB}	pK_{212}
WT	-75.9	9.8
L213DN	-148.9	8.6
L213DN & M44ND	-91.3	9.2
M44ND	-30.3	10.4
L213DN & H177RH	-43.7	8.9

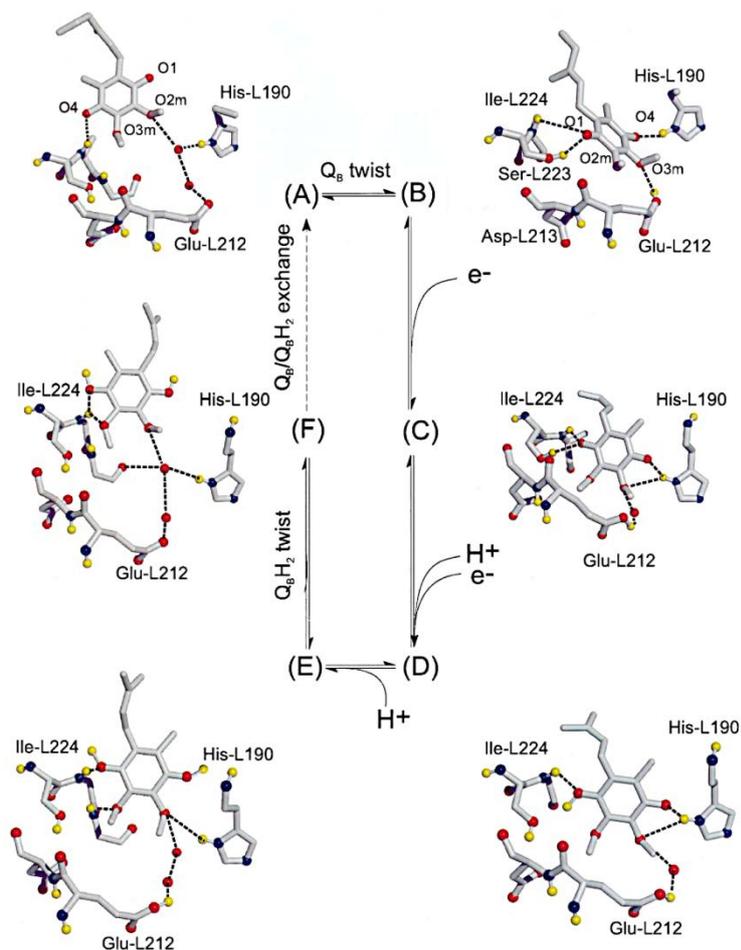


Рисунок 8. Схема двух последовательных реакций переноса электрона, протона и сопряженных конформационных изменений в сайте Q_B в БРЦ *Rb. sphaeroides*. Дистальное и проксимальное положения Q_B взяты из структур 1AJJ и 2RCR, конформация семихинона – из структуры 1AIG. Переход молекулы Q_BH_2 в дистальное положение сопровождается вращением (взято из структуры 1PCR, полученной в присутствии аскорбата).

В четвертой главе «Диффузия протона в поверхностном слое структурированной воды» рассматриваются особенности процессов миграции протона в примембранном пространстве. Синтез АТФ в сопрягающих мембранах бактерий, митохондрий и хлоропластов осуществляется за счет трансмембранного переноса протона под действием протон-движущей силы – трансмембранной разницы электрохимического потенциала протона $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. До настоящего времени остается дискуссионным вопрос, насколько активность протона вблизи поверхностных буферных групп сопрягающих мембран (энтропийная составляющая $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$) находится в термодинамическом равновесии с активностью протона в объемных водных фазах. Чтобы проверить, может ли поверхностное значение pH_S отклоняться от его значения pH_V в объеме, было проанализировано поведение протонов на границе раздела мембрана/вода. В расчетах была принята во внимание низкая диэлектрическая проницаемость

межфазной воды [7]. Профиль потенциального барьера, полученный решением уравнения Пуассона-Больцмана с учетом неоднородности диэлектрической проницаемости вблизи полярного интерфейса и типичной поверхностной плотности заряда сопрягающих мембран, достигает максимальной высоты на расстоянии 0,5–0,4 нм от поверхности мембраны, его высота больше для одновалентных анионов (0,2–0,3 эВ), чем для одновалентных катионов (0,1–0,15 эВ). Решение уравнения Смолуховского для протонов, распространяющихся от протонных насосов на поверхности сопрягающих мембран, показало, что потенциальный барьер вызывает существенное повышение локальной концентрации протонов на границе раздела фаз по сравнению с их активностью в водной фазе. Используя в расчетах типичные значения плотности протонных насосов и скорости их работы, было показано, что в стационарных условиях потенциальный барьер высотой 0,12 эВ приводит к появлению поверхностного $pH_s \sim 6$, отличающегося от pH_v водной фазы в нейтральных и щелочных условиях. Полученные результаты дают объяснение давно существующей проблемы о видимой недостаточности величины протон-движущей силы в мезофильных и алкалофильных бактериях.

Было также получено нестационарное решение уравнения диффузии в условиях импульсного выброса протонов на поверхность сопрягающих мембран и рассчитано, как релаксация протонов зависит от концентрации подвижного рН-буфера в растворе, от емкости поверхностных рН-буферных групп, от формы и размера мембранных частиц и от высоты потенциального барьера. Были проанализированы литературные данные об ускорении межфазного уравнивания протонов анионными рН-буферами в везикулах хроматофоров из фототрофных бактерий и в мембранах, содержащих бактериородопсин. Моделирование имеющихся экспериментальных зависимостей скорости протонной релаксации от концентрации рН-буферов дало оценку величины межфазного потенциального барьера для различных ионов (рис. 9). Было показано, что высота межфазного барьера коррелирует с электрическим зарядом буфера в диапазоне от 0,09–0,12 эВ для однозарядных видов до $>0,36$ эВ

для четырехзарядного аниона пиранина. Для ионов H^+/OH^- высота барьера составляет 0.12 эВ.

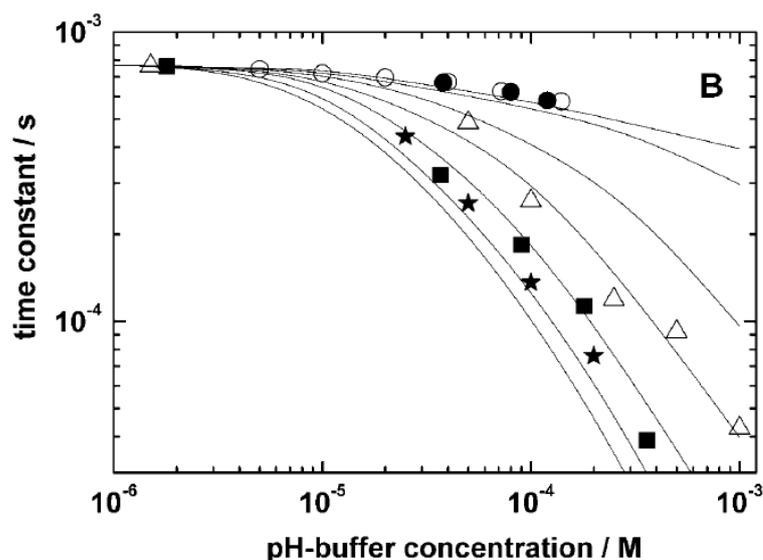


Рисунок 9. Зависимость времени релаксации протонов от концентрации добавленного мобильного буфера. Набор из семи теоретических кривых был рассчитан для различных высот потенциального барьера для мобильного буфера (0, 60, 120, 150, 180, 240 и 360 мэВ соответствуют кривым, построенным последовательно слева направо) при значении потенциального барьера для протона 120 мэВ. Кривые рассчитаны для везикул радиуса 100 нм и объемной буферной емкости $7,4 \cdot 10^{-8}$ моль/ м^2 , pH 7,2. Экспериментальные данные: пиранин (сплошные кружки – (Porschke, 2002), окружности – (Heberle, 1991)), р-нитрофенол (звездочки – (Drachev *et al.*, 1984)), MES (Porschke, 2002), фосфат (треугольники – (Grzesiek and Dencher, 1986)). Коэффициент диффузии ионов H^+/OH^- и мобильного буфера принимался равным 10^{-4} и $2 \cdot 10^{-6}$ $\text{см}^2\text{с}^{-1}$, соответственно.

Латеральная диффузия протона вдоль поверхности сопрягающих мембран обычно формулируется в терминах «протон-собирающей антенны» [8], движение по которой представляет последовательность скачков между протон-связывающими группами, находящимися на поверхности мембраны. Эксперименты, проведенные совместно с лабораторией Питера Поля (Университет Линц, Австрия), свидетельствуют об альтернативной модели. В опытах выброс мембранно-связанных протонов был инициирован с помощью УФ-вспышки, прибытие протонов на удаленные участки липидной мембраны детектировалось с помощью флуоресцентных меток. Была измерена диффузионная кинетика прихода выброшенных протонов на различные расстояниях для различных мембран в нормальной и тяжелой воде. Было обнаружено, что протонная диффузия вдоль мембраны происходит быстро даже в отсутствие

ионизируемых групп в мембране и сильно уменьшается в D_2O по сравнению с H_2O . Экспериментальные данные были проанализированы с помощью диффузионной модели, которая учитывала наличие ионов H^+/OH^- и подвижного рН-буфера в водной фазе, а также неподвижных буферных групп на поверхности мембраны (рис. 10). Было показано, что быстрый перенос протонов вдоль мембраны обусловлен диффузией по поверхностной воде, но не через ионизируемые рН-буферные группы липидных мембран.

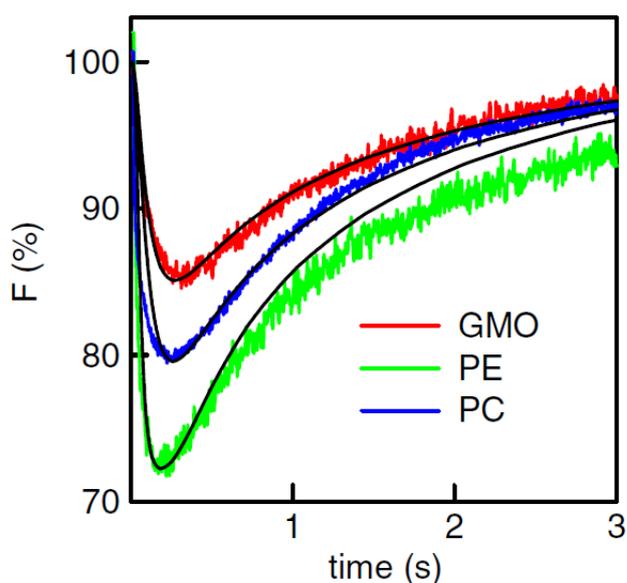


Рисунок 10. Тушение флуоресценции на поверхности трех разных липидных мембран, вызванное латеральной диффузией протонов (GMO – моноолеат глицерина, PE – фосфатидилэтаноламин, PC – фосфатидилхолин). Область наблюдения расположена на расстоянии 70 мкм от места генерации свободных протонов. Несмотря на существенные различия в составе буферных групп разных липидных бислоев была аналогичной. Буфер содержал 0,1 мМ Capso (рН 9,0) и 100 мМ NaCl.

Физико-химические свойства межфазной воды существенно отличаются от объемной жидкости. Один из ярких межфазных феноменов наиболее изящно продемонстрирован в работах Израелашвили и Пашли, наблюдавших появление осцилляционных сил в растворах электролита, сжатых в наноскопических пленках [9]. Для объяснения аномальных свойств воды вблизи заряженной поверхности, таких как структурирование и расслоение растворов электролита в наноскопических пленках, появление больших гидратационных сил отталкивания при высокой ионной силе и наличие межфазного потенциального барьера, диссертантом была разработана теория нелокальной электростатики с использованием диэлектрической функции изотропной воды. Нелокальный аналог классического уравнения Пуассона-Больцмана представляет собой нелинейное интегро-дифференциальное уравнение следующего вида:

$$\sum_{\alpha\beta} \frac{\partial}{\partial r_\alpha} \int_V d^3\mathbf{r}' \varepsilon_{\alpha\beta}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \frac{\partial}{\partial r'_\beta} \varphi(\mathbf{r}') = -4\pi \sum_i c_0 q_i \exp(-q_i \varphi(\mathbf{r})/k_B T) \quad (6)$$

Продольная компонента диэлектрической проницаемости изотропной воды, рассчитанная методами молекулярной динамики [10], содержит отрицательные компоненты в области волновых векторов между 2 и 12 Å⁻¹ (рис. 11). Решение уравнения (6) было получено для одномерного случая выделением в диэлектрической функции локальной $\varepsilon_{loc} \cdot \delta(x-x')$ и нелокальной $\varepsilon_{non}(x, x')$ составляющих. В опытах Израелашвили и Пашли область интегрирования включала пространство между двумя сближенными слоями, поэтому решение находилось последовательными итерациями алгебраических уравнений для ряда дискретных Фурье-компонент φ_k методом самосогласованного поля:

$$\varphi_k = \frac{(8\pi\sigma/L - \kappa_0^2 \psi_k) [\varepsilon_{loc} + \varepsilon(k)]^{-1}}{(8\pi k/L)^2 + [\varepsilon_{loc} + \varepsilon(k)]^{-1} \kappa_0^2} \quad (7)$$

Здесь L – расстояние между слоями, σ – поверхностная плотность заряда, κ_0 – обратный дебаевский радиус экранирования, $\varepsilon(k)$ – Фурье-компонента нелокальной проницаемости изотропной воды (рис. 11). Фурье-компоненты вспомогательной функции $\psi(x) = \sinh[-q\varphi(x)/k_B T] \cdot k_B T / 2q - \varphi(x)$ вычислялись для потенциала $\varphi(k)$, полученного на предыдущем шаге итераций.

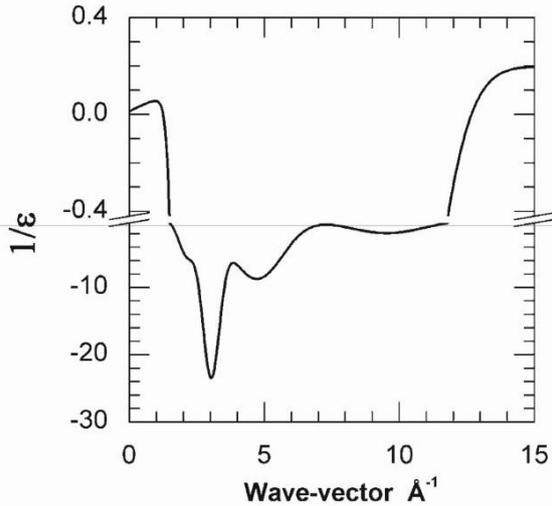


Рисунок 11. Зависимость обратной величины Фурье-преобразования диэлектрической проницаемости $1/\varepsilon(k)$ изотропной воды от волнового вектора k . Пространственная дисперсия была аппроксимирована суммой четырех гауссовских и одного экспоненциальных членов. Низкочастотный предел равен статической диэлектрической проницаемости $\varepsilon_{stat} = 78$, а высокочастотный предел равен инфракрасной диэлектрической постоянной $\varepsilon_{loc} = 5$ объемной воды. Масштаб оси ординат меняется в точке разрыва.

На рис. 12 показаны осцилляции силы в зависимости от расстояния L между цилиндрическими листами слюды, рассчитанные по формулам (7) для ионной силы 10^{-3} и 10^{-2} М (сплошные линии), вставки показывают эксперимен-

тальные данные Израелашвили и Пашли (1983, 1984). Появление выраженных слоев возникает из-за отрицательного знака диэлектрической функции на некоторых волновых векторах («перезащитывание»), аналогичных появлению волн плотности заряда в высокотемпературных сверхпроводниках.

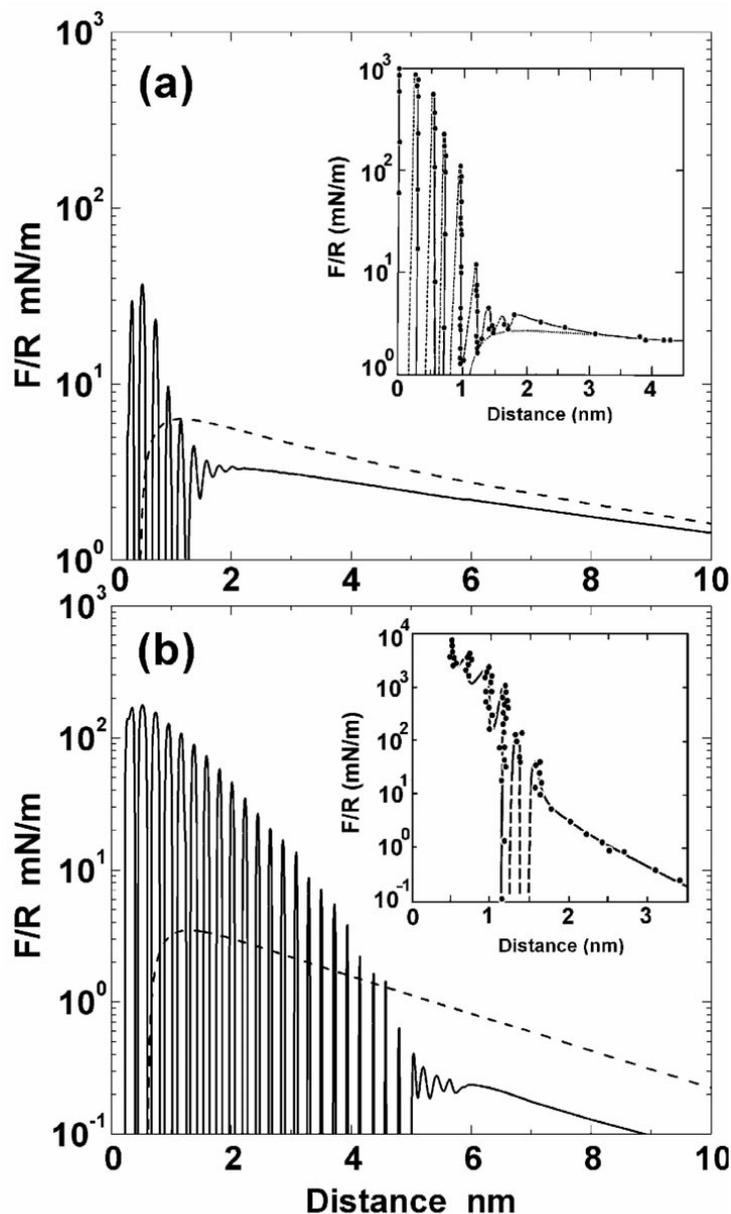


Рисунок 12. Нормализованная сила взаимодействия между двумя заряженными цилиндрами в растворе электролита в зависимости от расстояния L между ними. Сила взаимодействия F пары скрещенных цилиндров радиуса R рассчитана по свободной энергии взаимодействия двух параллельных заряженных стенок с использованием приближения Дерягина $F(L) = 2\pi R\Omega(L)$, где $\Omega(L)$ – функционал свободной энергии для раствора неидеального электролита. Сплошные линии показывают силу взаимодействия для нелокальной диэлектрической функции (рис. 11); пунктирные линии были получены со статической диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 78$ в приближении Дерягина-Ландау-Фервея-Овербека (DLVO). Плотность поверхностного заряда была равна $0,016 \text{ см}^{-2}$. Кривые (a) и (b) соответствуют ионным силам 10^{-3} и 10^{-2} М, соответственно. Вставки показывают экспериментальные кривые, полученные Израелашвили и Пашли в растворах 1 мМ и 1 М KCl (1983, 1984).

На рис. 13 приведены осцилляции электростатического потенциала $\varphi(k)$ в слое толщиной $L = 6$ нм, рассчитанные для ионной силы 10^{-3} и 10^{-2} М. Осцилляции имеют период 0.2 нм, сравнимый с периодом 0.22 нм в силовых измерениях Израелашвили и Пашли. Осцилляции указывают на наличие протяженных корреляций в ориентации водных диполей. При низкой ионной силе корреляции быстро затухают (длина 0.3 нм) и на расстоянии 1 нм от по-

верхности потенциал следует классическому уравнению Пуассона-Больцмана. При ионной силе 10^{-2} М колебания резонансно усиливаются, а их амплитуда определяется нелинейными эффектами.

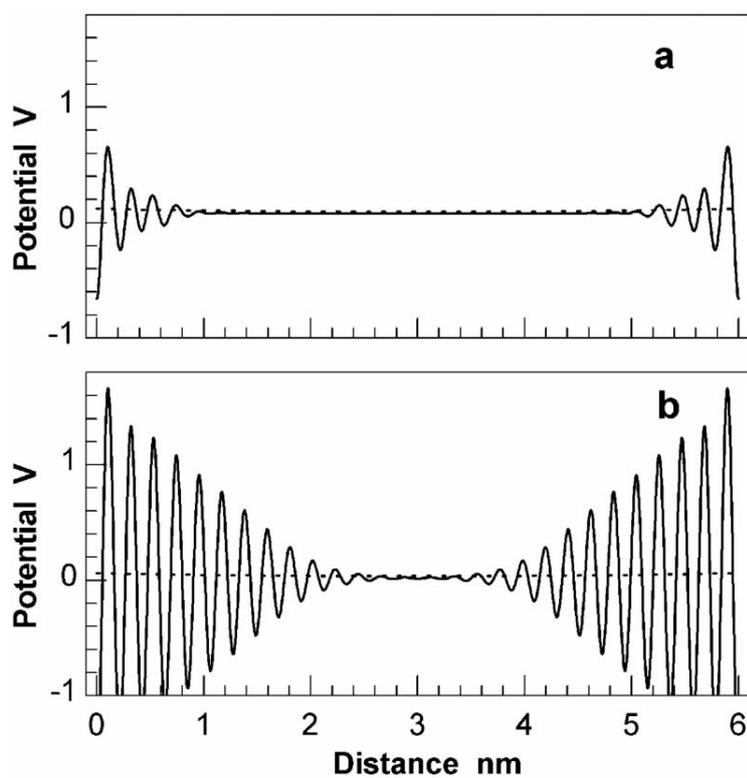


Рисунок 13. Осцилляции электростатического потенциала в растворе электролита между двумя заряженными поверхностями раздела фаз. Потенциал в слое $L = 6$ нм рассчитывался решением нелинейного интегро-дифференциального уравнения Пуассона-Больцмана (6) с использованием нелокальной диэлектрической функции рис. 11 (сплошные линии) и статической диэлектрической проницаемости $\epsilon = 78$ (пунктирные линии), другие параметры как на рис. 12. Кривые (а) и (б) получены для ионной силы 10^{-3} и 10^{-2} М соответственно.

Пятая глава «Роль выделенных конформационных движений белка в электрохимическом преобразовании энергии» посвящена анализу низкочастотных колебательных движений, возникающих в трансмембранных биоэнергетических комплексах.

Синтез АТФ в сопрягающих мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий осуществляется АТФ-синтазой F-типа, преобразующей энергию из электрохимической формы в механическую и химическую путем необычного вращательного движения субъединиц $\epsilon\gamma_{10-14}$ (ротор) против $\delta(\alpha\beta)_3ab_2$ (статор). Функционально белковый комплекс представляет собой роторный двигатель с двумя приводами, обратимо вращающимся относительно друг друга: протон-переносящая трансмембранная часть F_0 и каталитическая периферийная часть F_1 отдалены друг от друга на расстояние ~ 5 нм. Обе части расположены на центральном валу (субъединица γ) и удерживаются вместе экс-

центричной опорой (субъединицы a и b). Установлено, что гидролиз трех молекул АТФ в F_1 (гетерогексамер $\alpha_3\beta_3$) вращает центральный вал по кругу в три этапа по 120° каждый. С вращающимся валом сопряжено вращение олигомера c_{12} , состоящего из 10-17 протон-переносящих субъединиц c (количество субъединиц c может варьировать у разных видов, в белке *Escherichia coli* их 12). Протонный поток через F_0 генерирует 12-ступенчатое вращение ротора, так что четыре акта транслокации протона по 30° каждый приводят к синтезу одной молекулы АТФ. Сопряжение 3-тактного синтеза АТФ и 12-тактной транслокации протона возможно только при наличии эластичной трансмиссии между ротором и статором (рис. 14).

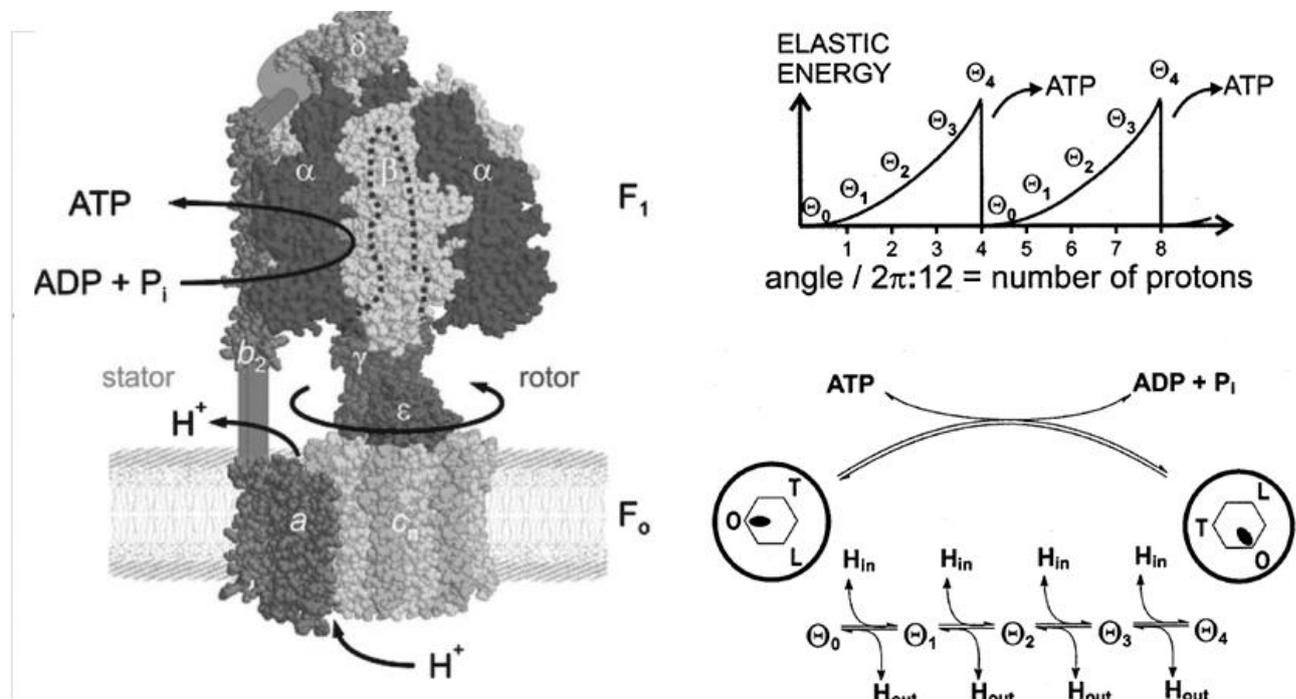


Рисунок 14. Схематическая иллюстрация работы F_0F_1 с субъединицей F_1 , упруго связанной с F_0 . Топологическое деление на F_0 и F_1 накладывается на функциональное деление на ротор (субъединицы $c_{12}\gamma\epsilon$) и статор ($ab_2\delta\alpha_3\beta_3$). Двенадцать протон-связывающих копий субъединицы c расположены в виде кольца, последовательное связывание четырех протонов передвигает кольцо четыре раза на 30° , а затем толкает γ к следующему нуклеотид-связывающему сайту $\alpha_3\beta_3$. Две переплетенных α -спирали субъединицы γ функционируют как пружина кручения, а две параллельных α -спирали b_2 служат упругой опорой, аккумулирующих энергию четырех протонов. Каталитические сайты F_1 последовательно проходят через три конформационных состояния: «открытое» состояние с низким сродством к АДФ и неорганическому фосфату (O), в котором нуклеотиды и фосфат легко обмениваются с раствором; «рыхлое» состояние (L), в котором АДФ и фосфат обмениваются медленнее; и плотно связанное состояние (T) с высоким сродством к АДФ. В последнем состоянии равновесие между АДФ и АТФ предположительно смещено в сторону АТФ.

В диссертации проанализировано эластичное сопряжение между транслокацией протона в комплексе F_0 и синтезом АТФ в гетерогексамере F_1 . Модель работы комплекса предполагает, что четыре поворота олигомера c_{12} в F_0 закручивают торсионную пружину, образованную двойной спиралью субъединицы γ , энергия которой освобождается при диссоциации молекулы АТР из активного сайта комплекса F_1 .

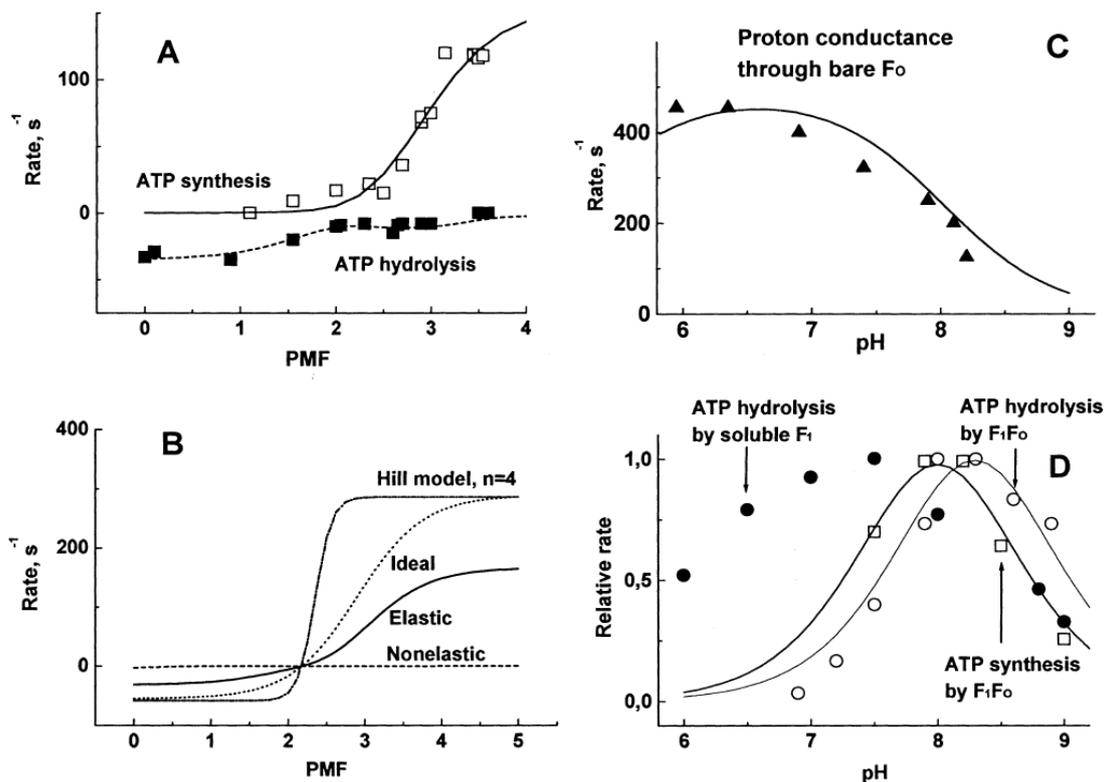


Рисунок 15. Эффективность работы упруго-сопряженного комплекса F_0F_1 в зависимости от протон-движущей силы (PMF) и pH (точки – экспериментальные данные, линии – теоретические кривые). А: Скорость синтеза (открытые квадраты) и гидролиза (сплошные квадраты) АТФ-синтазы шпината при pH 8,2. В: Эффективность работы F_0F_1 в зависимости от формы распределения нагрузки при переносе четырех протонов: упругое сопряжение (сплошная кривая), равномерное распределенные энергии (точечная кривая), полное отсутствие эластичного сопряжения (пунктирная кривая), одновременный перенос всех четырех протонов (штрих-пунктирная кривая). С: Зависимость протонной проводимости F_0 без каталитической части F_1 от pH (треугольники – экспериментальные данные, сплошная кривая – модель с нулевой нагрузкой). D: Наличие резкого pH-оптимума для скорости синтеза АТФ комплексом F_0F_1 (открытые квадраты) и гидролиза в сопряженных хроматофорах *Rb. sphaeroides* при PMF = 170 мВ (окружности). Сплошными кружками показана Mg^{2+} -зависимая АТФазная активность комплекса F_1 в растворе.

Кинетическая модель эластичной АТФ-синтазы позволила объяснить функциональные зависимости, относящиеся к синтезу и гидролизу АТФ комплек-

Был проведен расчет вязкоупругой динамики вращающихся актиновых филаментов, активно движимых ферментом и испытывающих воздействие стохастической силы Ланжевена и вязкого сопротивления окружающего раствора. Моделирование показало, что в упругой динамике филаментов преобладают колебательные движения самой низкочастотной моды. Характерное время релаксации филамента составляет ~ 100 мс, поэтому его движение сильно демпфировано и не отражает возможные 3-тактные биения вращательного импульса фермента, связанные с механизмом гидролиза АТФ в гетерогексамере F_1 . Однако, расчеты показали, что актиновый филамент можно использовать как пружинный динамометр. Профиль углового момента фермента под внешней нагрузкой, которой в данном случае является вязкое сопротивление раствора, может быть измерен путем измерения средней кривизны и стохастических флуктуаций актиновых филаментов (рис. 17).

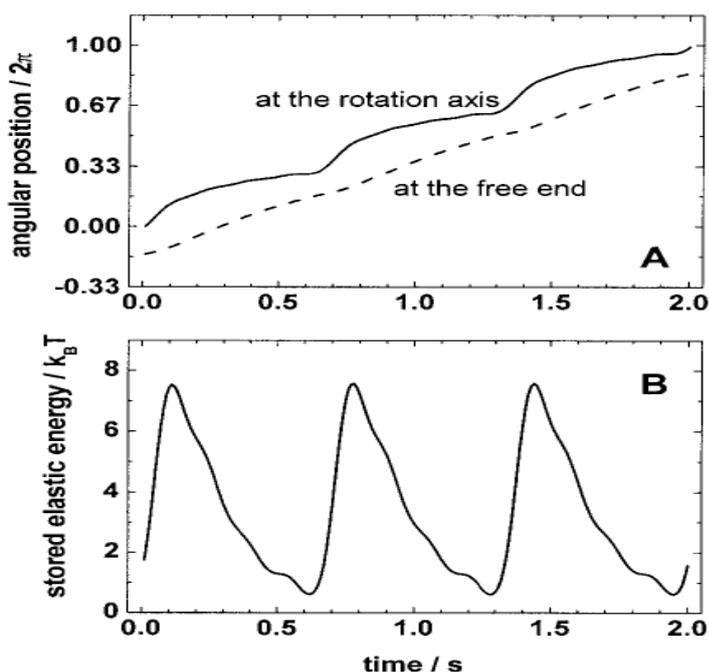


Рисунок 17. Вязкоупругая динамика вращающейся нити актина и аккумуляция ею энергии, выделяемой в процессе трехтактного гидролиза АТФ иммобилизованным F_1 комплексом. (А) Сравнение углового положения кантилевера во времени возле оси вращения (верхняя кривая) и на свободном конце (нижняя кривая). Разница характеризует общее искривление кантилевера. (В) Упругая энергия, аккумулируемая актиновым кантилевером при неравномерном вращении в единицах $k_B T$ (стандартная энергия гидролиза АТФ составляет $12,5 k_B T$).

Было исследовано движение актиновой нити, прикрепленной к кольцу c_{12} иммобилизованного комплекса F_1 , вращающегося за счет гидролиза АТФ. Трение актинового филамента в вязкой среде моделировало нагрузку нативного фермента с вращающимся комплексом F_0 . Было показано, что основное сопротивление вращательному движению актиновых филаментов было обу-

словлено поверхностной вязкостью среды и невязкими взаимодействиями с твердой подложкой, но не с вязким сопротивлением объемной жидкости, как предполагалось ранее (Yasuda *et al.*, 1998). Репрезентативные видеокадры вращающейся актиновой нити длиной 3 мкм показаны на рис. 18. Движение нити часто затруднялось. Во всех случаях нить была упруго деформирована крутящим моментом, создаваемым ферментом. Были проанализированы видеозаписи нескольких вращающихся нитей (рабочая длина 2–4 мкм), для каждого кадра были рассчитаны угловое положение и мгновенная кривизна филамента. Экстраполированные оси и рассчитанные кривые деформации показаны в последних двух рядах рис. 18 белыми и черными линиями.

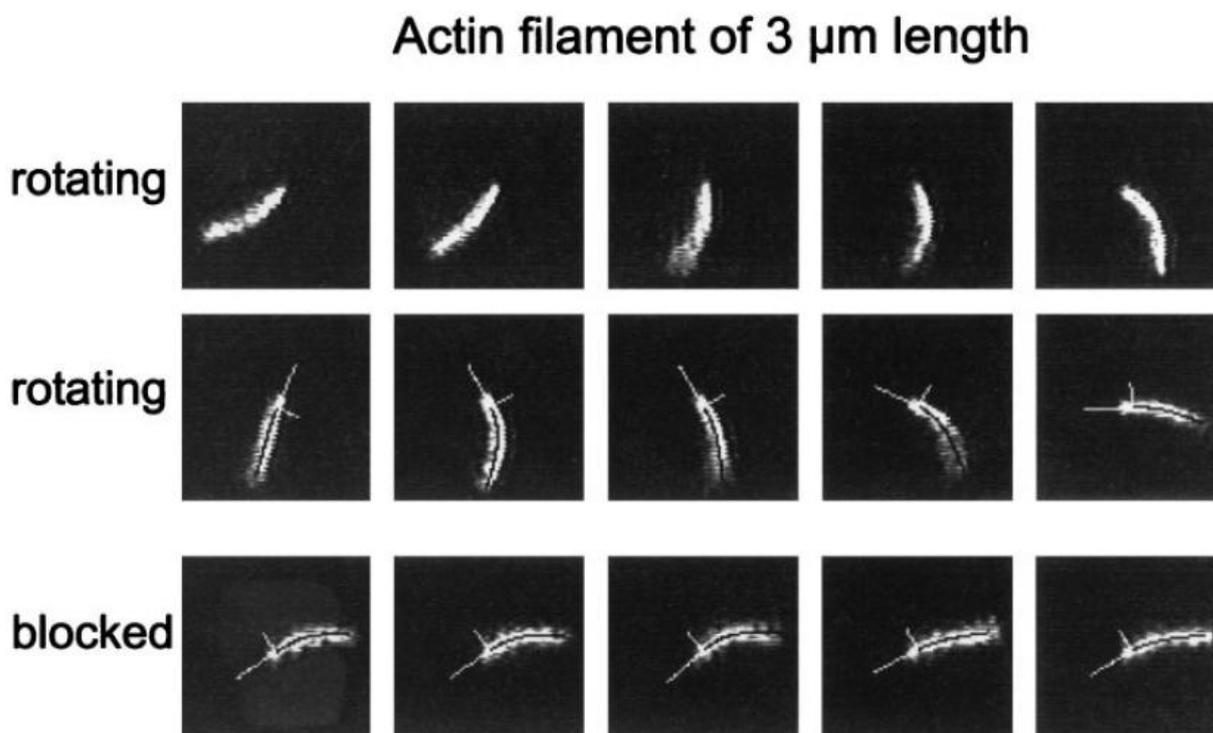


Рисунок 18. Видеокадры вращающейся нити актина, снятые последовательно с интервалами 200 мс. Первый и второй ряды представляют вращательное движение, обусловленное гидролизом АТФ, третьей – стационарное положение, вызванное блокировкой филамента препятствием на поверхности. Независимо от вращения, филамент был упруго деформирован под действием вращательного момента фермента. Для каждого видеокадра методом наименьших квадратов было рассчитано угловое положение нити на оси (в двух последних рядах угловые положения нити на оси вращения были показаны тонкими белыми линиями). Рассчитанный изгиб искривленного филамента показан черным цветом.

После этого рассчитывалось концевое смещение свободного конца филамента A_0 . Распределение смещений $\rho(A_0)$, рассчитанное для всей траектории, по-

казано на рис. 19 заполненными кружками. Для сравнения на рисунке показаны распределения амплитуд двух наименьших собственных мод $\rho(A_0)$ и $\rho(A_1)$, рассчитанные для заблокированной нити. Средний крутящий момент фермента, рассчитанный для шести вращающихся филаментов, составил 50 ± 6 пН·нм, что хорошо согласуется со свободной энергией гидролиза АТФ (51 пН·нм) в данных экспериментальных условиях и доказывает отсутствие проскальзывания в иммобилизованном на подложке комплексе.

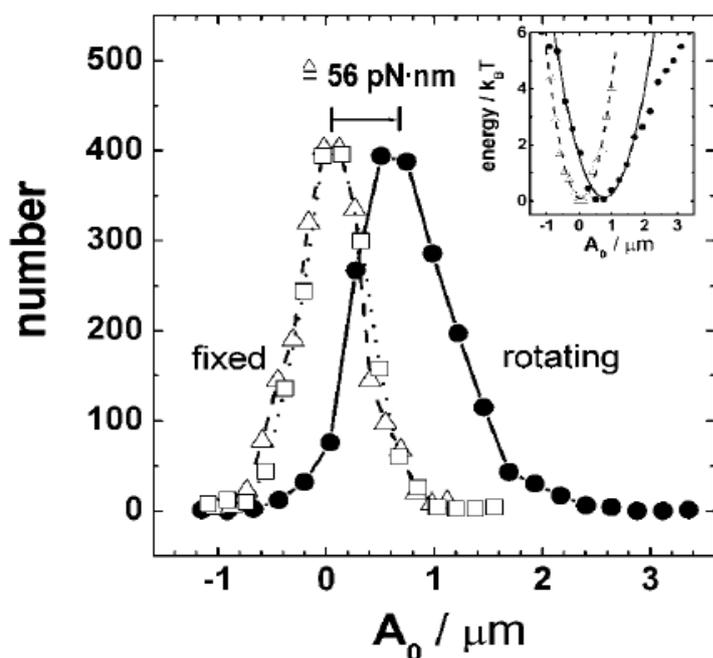


Рисунок 19. Гистограммы упругих деформаций филаментов A_0 . Проанализированы вращающаяся (кружки) и невращающаяся (треугольники) нити длиной 2,0 и 2,6 мкм. Для характеристики точности приведено тепловое распределение амплитуды второй собственной моды невращающейся нити (открытые квадраты). Средняя деформация вращающейся нити соответствовала крутящему моменту 56 пН·нм. На вставке: профиль свободной энергии упруго деформируемого актина и его гармоническая аппроксимации.

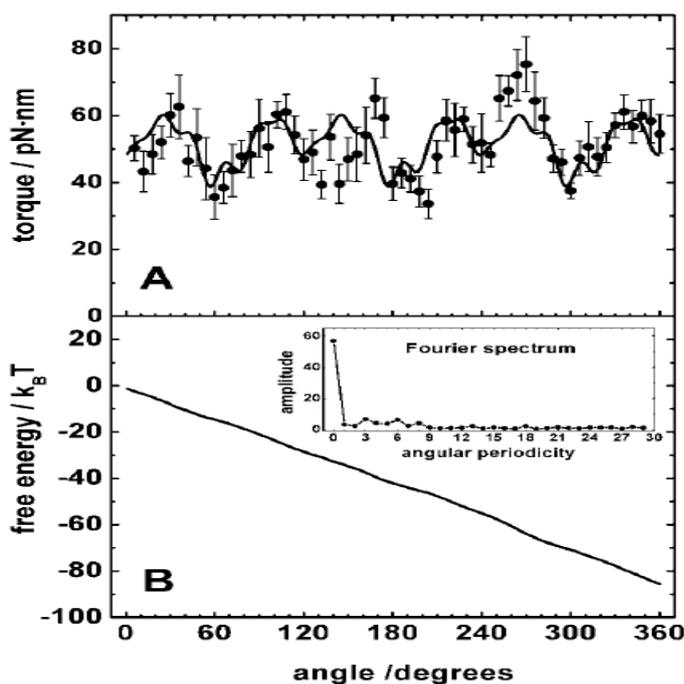


Рисунок 20. Угловая зависимость среднего крутящего момента (A) и соответствующего профиля свободной энергии (B) комплекса F_0F_1 . Профиль был рассчитан для $\sim 10^4$ оборотов шести вращающихся нитей. Вставка на нижней панели показывает спектр Фурье экспериментальных точек с верхней панели (кружки). Гладкая кривая на верхней панели была получена как отфильтрованное обратное преобразование спектра Фурье в предположении тройной симметрии генератора крутящего момента

Детальный статистический анализ упругих деформаций вращающихся актиновых нитей позволил определить усредненную угловую зависимость крутящего момента комплекса F_0F_1 (рис. 20, верхняя панель). Угловой профиль крутящего момента, определяемый анализом кривизны филаментов, оказался весьма гладким. Это соответствует почти линейному профилю свободной энергии по координате угловой реакции (рис. 20, нижняя панель). Учитывая тройной шаг и высокий активационный барьер в работе F_1 , постоянный выходной крутящий момент означает мягкую упругую передачу мощности между внутренним вращательным приводом F_1 и c -кольцом F_0 . Эластичная передача мощности существенна не только для надежной работы двух частей этого фермента, обладающих различной осевой симметрией, но и обеспечивает высокую скорость катализа двух противодействующих друг другу шаговых двигателей / генераторов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Разработана стохастическая теория сопряжения адиабатических реакций переноса электрона в пигмент-белковых комплексах с конформационной динамикой белкового матрикса. С помощью молекулярно-динамической модели бактериального реакционного центра (БРЦ) фотосинтетических бактерий *Rhodobacter sphaeroides* рассчитана поляризационная динамика белка вблизи первичного донора электрона. Проанализирован молекулярный механизм возникновения асимметрии между двумя ветвями переносчиков электрона в БРЦ. В поляризационной динамике обнаружена низкочастотная колебательная мода (частота $\sim 120 \text{ см}^{-1}$, время затухания $> 1 \text{ пс}$), связанная с упругими колебаниями α -спиралей вблизи первичного донора и поворотом лигандов первичного донора вокруг аксиальной оси. Вибронное возбуждение этой моды сопряжено с первичным актом разделения зарядов между кофакторами, что приводит к аккумуляции части энергии возбуждения в виде фононных колебаний и объясняет ряд наблюдаемых свойств первичных реакций переноса электрона в БРЦ, а

именно: независимость скорости реакции от температуры и движущей силы, осциллирующий характер кинетики и асимметрию между ветвями *A* и *B*.

2. Разработана методика непосредственного возбуждения первичного донора электрона P_{700} фотосистемы 1 (ФС1) фемтосекундными импульсами в дальней красной области поглощения. Методом «возбуждение-зондирование» доказано, что формирование спектра первичной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_0^-$ в переходном спектре ФС1 происходит за время короче 180 фс. Предложена квантовая модель адиабатического взаимодействия возбужденного состояния димера P_{700}^* и двух симметричных состояний с разделенными зарядами. Показано, что квантовое смешение трех состояний обуславливает высокую поляризуемость возбужденного состояния и может приводить к появлению плоской потенциальной поверхности вдоль эффективной координаты реакции. Наличие плоского адиабатического терма объясняет механизм сверхбыстрой кинетики разделения зарядов в реакционном центре ФС1 и природу необычной экспоненциальной асимптотики в спектре поглощения ФС1 в дальней красной области, известной в физике твердого тела как зависимость Урбаха.

3. Определен механизм электрон-фононного сопряжения в сайтах связывания вторичного акцептора электрона филлохинона A_1 в комплексах ФС1, лишенных железо-серных кластеров. Проанализирована температурная зависимость кинетики рекомбинации ион-радикальных состояний $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$, возникающих в двух ветвях кофакторов в ходе фотоиндуцированного разделения зарядов, и получено количественное описание рассматриваемых реакций с помощью квантовой двухфононной модели электрон-фононного сопряжения Джортнера. Теория объясняет наблюдаемые температурные зависимости прямых и обратных реакций переноса электрона в ФС1, в том числе, в инвертированной области Маркуса. Показано, что диэлектрические свойства белкового матрикса ФС1 напоминают свойства кристаллических и стеклянных тел, а их теоретическое

описание требует квантового рассмотрения во всем диапазоне температур.

4. Проведен детальный анализ окислительно-восстановительных реакций в сайте связывания вторичного убихинона Q_B реакционных центров фотосинтетических бактерий *Rb. sphaeroides*. Построена кинетическая модель, количественно характеризующая функционирование терминального акцептора: реакции первичного $Q_A^- Q_B \rightarrow Q_A Q_B^-$ и вторичного $Q_A^- Q_B^- \rightarrow Q_A Q_B H_2$ восстановления убихинона сопряжены с переносом двух протонов и конформационным переходом хинона из проксимального в дистальное положение. Определены кинетические и термодинамические параметры различных стадий реакции, диэлектрические характеристики белкового комплекса, скорости диффузии протонов внутри сайта Q_B и обмена с водной фазой снаружи от белкового комплекса.

5. Определены структурно-функциональные характеристики процессов диффузии протона и других ионов в слое структурированной воды вблизи поверхности фосфолипидных мембран. Рассчитана стационарная величина концентрации протонов вблизи сопрягающих мембран с учетом низкой диэлектрической проницаемости межфазной воды, геометрической формы и размера липидных везикул, типичной плотности и скорости работы протонных помп. Получено нестационарное решение уравнения диффузии протонов, выбрасываемых на поверхность фосфолипидных мембран, и рассчитана скорость протонной релаксации в зависимости от концентрации подвижного рН-буфера в растворе, от емкости неподвижных рН-буферных групп на поверхности мембраны, от формы мембранных частиц и от высоты потенциального барьера. Обнаружена корреляция между высотой межфазного потенциального барьера и электрическим зарядом мобильных буферных групп. Определена величина латерального коэффициента диффузии протона в поверхностном слое воды. Проанализирован возможный механизм возникновения ряда аномальных свойств воды вблизи заряженной поверхности: структурирование и расслоение растворов электролита в

наноскопических пленках, появление больших гидратационных сил отталкивания при высокой ионной силе, наличие межфазного потенциального барьера.

6. Проанализирована роль низкочастотной вязкоупругой динамики структурных элементов протонной F_0F_1 АТФ-синтазы в процессе электро-механо-химического преобразования энергии роторным генератором. Разработана модель эластичного сопряжения реакций транслокации протона в комплексе F_0 и синтеза АТФ в гетерогексамере F_1 . Проведено моделирование функциональных данных, относящихся к синтезу и гидролизу АТФ комплексом F_0F_1 , а также протонной проводимости комплекса F_0 в зависимости от рН и величины трансмембранной разницы электрохимического потенциала протона. Рассчитаны характеристики вязкоупругой динамики вращающихся актиновых филаментов, прикрепленных к иммобилизованным на подложке комплексам F_0F_1 и движимых за счет гидролиза АТФ. Определен энергетический профиль углового момента фермента под внешней нагрузкой и выяснен механизм эффективной передачи мощности в ходе вращательного движения двух сопряженных частей F_0F_1 АТФ-синтазы, обладающих различной осевой симметрией.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marcus R.A., *On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer*. J. Chem. Phys., 1956. **24**: p. 966–978.
2. Левич, В.Г. и Р.Р. Догонадзе, *Теория безызлучательных электронных переходов между ионами в растворах*. ДАН СССР, 1959. **124**(1): p. 123–126.
3. Jortner, J., *Temperature Dependent Activation Energy for Electron Transfer between Biological Molecules*. J. Chem. Phys. 1976, **64**: p. 4860–4867.
4. Zusman, L.D., *Outer-Sphere Electron Transfer in Polar Solvents*. Chem. Phys., 1980. **49**: p. 295–304.
5. Sumi, H. and R.A. Marcus, *Dynamical Effects in Electron Transfer Reactions*. J. Chem. Phys., 1986. **84**: p. 4894–4914.
6. Gunner, M.R., D.E. Robertson and P.L. Dutton, *Kinetic Studies on the Reaction Center Protein from Rhodospseudomonas Sphaeroides: The Temperature and Free Ener-*

- gy Dependence of Electron Transfer between Various Quinones in the QA Site and the Oxidized Bacteriochlorophyll Dimer. J. Phys. Chem., 1986. **90**: p. 3783–3795.
7. Teschke, O., G. Ceotto and E.F. de Souza, *Interfacial Water Dielectric-Permittivity-Profile Measurements Using Atomic Force Microscopy*. Phys. Rev. E, 2001. **64**: 11605.
 8. Yamashita, T. and G.A. Voth, *Properties of Hydrated Excess Protons near Phospholipid Bilayers*. J. Phys. Chem. B, 2010. **114**: p. 592–603.
 9. Israelachvili, J.N. and R.M. Pashley, *Molecular Layering of Water at Surfaces and Origin of Repulsive Hydration Forces*. Nature, 1983. **306**(5940): p. 249–250.
 10. Bopp, P.A., A.A. Kornyshev and G. Sutmann, *Static Nonlocal Dielectric Function of Liquid Water*. Phys. Rev. Lett., 1996, **76**: p. 1280–1283.

**ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ,
ИНДЕКСИРУЕМЫХ В БАЗАХ ДАННЫХ WEB OF SCIENCE, SCOPUS, RSCI,
ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Bibikov S.I., Bloch D.A., **Cherepanov D.A.**, Oesterhelt D., Semenov A.Y. Flash-induced electrogenic reactions in the SA(L223) reaction center mutant in *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores // FEBS Lett. 1994. T. 341, № 1, C. 10–14. *Scopus*
2. **Cherepanov D.A.**, Haumann M., Junge W., Mulkidjanian A. 1995. Topology of chromophores and cofactors in PSII as derived from the local electrochromic bandshifts. in: Photosynthesis: from Light to Biosphere, Vol. I, P.Mathis editor. Kluwer Academic Publishers, C. 531-534. *Web of Science*
3. Mulkidjanian A.Y., **Cherepanov D.A.**, Haumann M., Junge W. Photosystem II of green plants: Topology of core pigments and redox cofactors as inferred from electrochromic difference spectra // Biochemistry. 1996. T. 35, № 9, C. 3093–3107. *Scopus*
4. Gupta O.A., Bloch D.A., **Cherepanov D.A.**, Mulkidjanian A.Y. Temperature dependence of the electrogenic reaction in the Q(B) site of the *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center: the $Q_A^-Q_B \rightarrow QAQB^-$ transition // FEBS Lett. 1997. T. 412, № 3, C. 490–494. *Scopus*
5. Haumann M., Bögershausen O., **Cherepanov D.A.**, Ahlbrink R., Junge W. Photosynthetic oxygen evolution: H/D isotope effects and the coupling between electron and proton transfer during the redox reactions at the oxidizing side of photosystem II // Photosynth. Res. 1997. T. 51, № 3, C. 193–208. *Scopus*
6. **Cherepanov D.A.**, Drevenstedt W., Krishtalik L.I., Mulkidjanian A.Y., Junge W. Protein relaxation and kinetics of P_{680}^+ reduction in photosystem II. In Photosynthesis: Mechanisms and Effects. G. Garab, editor. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1998. C. 1073-1076. *Web of Science*
7. Gupta O.A., **Cherepanov D.A.**, Mulkidjanian A.Y., Semenov A.Y., Bloch D.A. Effect of temperature and surface potential on the electrogenic proton uptake in

- the Q_B site of the *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center: $Q_A^- Q_B^- \rightarrow Q_A Q_B H_2$ transition // Photosynth.Res. 1998. T. 55, № 2/3, C. 309–316. *Scopus*
8. Ahlbrink R., Haumann M., **Cherepanov D.A.**, Bögershausen O., Mulkidjanian A., Junge W. Function of tyrosine Z in water oxidation by photosystem II: Electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor // Biochemistry. 1998. T. 37, № 4, C. 1131–1142. *Scopus*
 9. **Cherepanov D.A.**, Mulkidjanian A.Y. Effect of dielectric relaxation on the kinetics of electron transfer in photosynthetic reaction centers. In Photosynthesis: Mechanisms and Effects. G. Garab, editor. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1998. C. 795-798. *Web of Science*
 10. Syroeshkin A. V., Bakeeva L.E., **Cherepanov D.A.** Contraction transitions of F_1F_0 ATPase during catalytic turnover // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 1998. T. 1409, № 2, C. 59–71. *Scopus*
 11. Gupta O.A., **Cherepanov D.A.**, Junge W., Mulkidjanian A.Y. Proton transfer from the bulk to the bound ubiquinone Q_B of the reaction center in chromatophores of *Rhodobacter sphaeroides*: retarded conveyance by neutral water. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999. T. 96, № 23, C. 13159–13164. *Scopus*
 12. **Cherepanov D.A.**, Mulkidjanian A.Y., Junge W. Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase // FEBS Lett. 1999. T. 449, № 1, C. 1–6. *Scopus*
 13. Feniouk B.A., **Cherepanov D.A.**, Junge W., Mulkidjanian A.Y. ATP-synthase of *Rhodobacter capsulatus*: Coupling of proton flow through F_0 to reactions in F_1 under the ATP synthesis and slip conditions // FEBS Lett. 1999. T. 445, № 2–3, C. 409–414. *Scopus*
 14. **Cherepanov D.A.**, Bibikov S.I., Bibikova M.V., Bloch D.A., Drachev L.A., Gupta O.A., Oesterhelt D., Semenov A.Y., Mulkidjanian A.Y. Reduction and protonation of the secondary quinone acceptor of *Rhodobacter sphaeroides* photosynthetic reaction center: Kinetic model based on a comparison of wild-type chromatophores with mutants carrying Arg→Ile substitution at sites 207 and 217 in the L-subunit // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 2000. T. 1459, № 1, C. 10–34. *Scopus*
 15. **Cherepanov D.A.**, Junge W. Viscoelastic dynamics of actin filaments coupled to rotary F-ATPase: curvature as an indicator of the torque // Biophys. J. 2001. T. 81, № 3, C. 1234–44. *Scopus*
 16. **Cherepanov D.A.**, Mulkidjanian A.Y. Proton transfer in *Azotobacter vinelandii* ferredoxin I: entatic Lys84 operates as elastic counterbalance for the proton-carrying Asp15 // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 2001. T. 1505, № 2, C. 179-184. *Scopus*
 17. Junge W., Pänke O., **Cherepanov D.A.**, Gumbiowski K., Müller M., Engelbrecht S. Inter-subunit rotation and elastic power transmission in F_0F_1 -ATPase // FEBS Lett. 2001. T. 504, № 3, C. 152–160. *Scopus*
 18. **Cherepanov D.A.**, Krishtalik L.I., Mulkidjanian A.Y. Photosynthetic electron transfer controlled by protein relaxation: Analysis by Langevin stochastic approach

- // Biophys. J. 2001. T. 80, № 3, C. 1033–1049. *Scopus*
19. Feniouk B.A., **Cherepanov D.A.**, Junge W., Mulkidjanian A.Y. Coupling of proton flow to ATP synthesis in *Rhodobacter capsulatus*: F₀F₁-ATP synthase is absent from about half of chromatophores // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 2001. T. 1506, № 3, C. 189–203. *Scopus*
 20. Pänke O., **Cherepanov D.A.**, Gumbiowski K., Engelbrecht S., Junge W. Viscoelastic dynamics of actin filaments coupled to rotary F-ATPase: Angular torque profile of the enzyme // Biophys. J. 2001. T. 81, № 3, C. 1220–1233. *Scopus*
 21. Gumbiowski K., **Cherepanov D.A.**, Müller M., Pänke O., Promto P., Winkler S., Junge W., Engelbrecht S. F-ATPase: Forced Full Rotation of the Rotor Despite Covalent Cross-link with the Stator // J. Biol. Chem. 2001. T. 276, № 45, C. 42287–42292. *Scopus*
 22. Feniouk B.A., **Cherepanov D.A.**, Voskoboynikova N.E., Mulkidjanian A.Y., Junge W. Chromatophore Vesicles of *Rhodobacter capsulatus* Contain on Average One F₀F₁-ATP Synthase Each // Biophys. J. 2002. T. 82, № 3, C. 1115–1122. *Scopus*
 23. **Cherepanov D.A.**, Feniouk B.A., Junge W., Mulkidjanian A.Y. Low dielectric permittivity of water at the membrane interface: Effect on the energy coupling mechanism in biological membranes // Biophys. J. 2003. T. 85, № 2, C. 1307–1316. *Scopus*
 24. **Cherepanov D.A.** Force oscillations and dielectric overscreening of interfacial water // Phys. Rev. Lett. 2004. T. 93, № 26 I, C. 266104. *Scopus*
 25. Müller M., Gumbiowski K., **Cherepanov D.A.**, Winkler S., Junge W., Engelbrecht S., Pänke O. Rotary F₁-ATPase: Is the C-terminus of subunit γ fixed or mobile? // Eur. J. Biochem. 2004. T. 271, № 19. C. 3914–3922. *Scopus*
 26. **Cherepanov D.A.**, Junge W., Mulkidjanian A.Y. Proton Transfer Dynamics at the Membrane/Water Interface: Dependence on the Fixed and Mobile pH Buffers, on the Size and Form of Membrane Particles, and on the Interfacial Potential Barrier // Biophys. J. 2004. T. 86, № 2, C. 665–680. *Scopus*
 27. Feniouk B.A., Kozlova M.A., Knorre D.A., **Cherepanov D.A.**, Mulkidjanian A.Y., Junge W. The proton-driven rotor of ATP synthase: Ohmic conductance (10 fS), and absence of voltage gating // Biophys. J. 2004. T. 86, № 6, C. 4094–4109. *Scopus*
 28. Mulkidjanian A.Y., **Cherepanov D.A.**, Heberle J., Junge W. Proton transfer dynamics at membrane/water interface and mechanism of biological energy conversion // Biochemistry (Moscow). 2005. T. 70, № 2, C. 251–256. *Scopus*
 29. Mulkidjanian A.Y., Kozlova M.A., **Cherepanov D.A.** Ubiquinone reduction in the photosynthetic reaction centre of *Rhodobacter sphaeroides*: interplay between electron transfer, proton binding and flips of the quinone ring. // Biochem. Soc. Trans. 2005. T. 33, № Pt 4, C. 845–50. *Scopus*
 30. Mulkidjanian A.Y., Heberle J., **Cherepanov D.A.** Protons @ interfaces: Implications for biological energy conversion // Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics). 2006. T. 1757, № 8, C. 913–930. *Scopus*

31. Mulkidjanian A.Y., **Cherepanov D.A.** Probing biological interfaces by tracing proton passage across them. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2006. T. 5, № 6, C. 577–87. *Scopus*
32. Chamorovsky S.K., **Cherepanov D.A.**, Chamorovsky C.S., Semenov A.Y. Correlation of electron transfer rate in photosynthetic reaction centers with intraprotein dielectric properties. // *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*. 2007. T. 1767, № 6, C. 441–8. *Scopus*
33. Kozlova M.A., Juhnke H.D., **Cherepanov D.A.**, Lancaster C.R.D., Mulkidjanian A.Y. Proton transfer in the photosynthetic reaction center of *Blastochloris viridis* // *FEBS Lett.* 2008. T. 582, № 2, C. 238–242. *Scopus*
34. Ptushenko V.V., **Cherepanov D.A.**, Krishtalik L.I., Semenov A.Y. Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I. // *Photosynth. Res.* 2008. T. 97, № 1, C. 55–74. *Scopus*
35. Semenov A., **Cherepanov D.A.**, Mamedov M. Electrostatic reactions and dielectric properties of photosystem II // *Photosynth. Res.* 2008. T. 98, № 1–3, C. 121–130. *Scopus*
36. Mamedov M.D., Kurashov V.N., **Cherepanov D.A.**, Semenov A.Y. Photosystem II: where does the light-induced voltage come from? // *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 2010. T. 15, № 3, C. 1007–1017. *Scopus*
37. Springer A., Hagen V., **Cherepanov D.A.**, Antonenko Y.N., Pohl P. Protons migrate along interfacial water without significant contributions from jumps between ionizable groups on the membrane surface. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. T. 108, № 35, C. 14461–6. *Scopus*
38. Milanovsky G.E., Ptushenko V. V., Golbeck J.H., Semenov A.Y., **Cherepanov D.A.** Molecular dynamics study of the primary charge separation reactions in Photosystem I: Effect of the replacement of the axial ligands to the electron acceptor A₀ // *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*. 2014. T. 1837, № 9, C. 1472–1483. *Scopus*
39. Milanovsky G.E., Ptushenko V.V., **Cherepanov D.A.**, Semenov A.Y. Mechanism of primary and secondary ion-radical pair formation in photosystem I complexes // *Biochemistry (Moscow)*. 2014. T. 79, № 3, C. 221–226. *Scopus*
40. Milanovsky G.E., Shuvalov V.A., Semenov A.Y., **Cherepanov D.A.** Elastic Vibrations in the Photosynthetic Bacterial Reaction Center Coupled to the Primary Charge Separation: Implications from Molecular Dynamics Simulations and Stochastic Langevin Approach // *J. Phys. Chem. B.* 2015. T. 119, № 43, C. 13656–13667. *Scopus*
41. Ptushenko V.V., **Cherepanov D.A.**, Krishtalik L.I. Electrostatics of the photosynthetic bacterial reaction center. Protonation of Glu L 212 and Asp L 213 - A new method of calculation // *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*. 2015. T. 1847, № 12, C. 1495–1508. *Scopus*
42. **Cherepanov D.A.**, Milanovsky G.E., Petrova A.A., Tikhonov A.N., Semenov A.Y. Electron transfer through the acceptor side of photosystem I: Interaction with

- exogenous acceptors and molecular oxygen // *Biochemistry (Moscow)*. 2017. T. 82, № 11, C. 1249–1268. *Scopus*
43. **Cherepanov D.A.**, Shelaev I. V., Gostev F.E., Mamedov M.D., Petrova A.A., Aybush A. V., Shuvalov V.A., Semenov A.Y., Nadtochenko V.A. Excitation of photosystem I by 760 nm femtosecond laser pulses: Transient absorption spectra and intermediates // *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.* 2017. T. 50, № 17. *Scopus*
44. **Cherepanov D.A.**, Shelaev I. V., Gostev F.E., Mamedov M.D., Petrova A.A., Aybush A. V., Shuvalov V.A., Semenov A.Y., Nadtochenko V.A. Mechanism of adiabatic primary electron transfer in photosystem I: Femtosecond spectroscopy upon excitation of reaction center in the far-red edge of the QY band // *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*. 2017. T. 1858, № 11, C. 895–905. *Scopus*
45. Milanovsky G.E., Petrova A.A., **Cherepanov D.A.**, Semenov A.Y. Kinetic modeling of electron transfer reactions in photosystem I complexes of various structures with substituted quinone acceptors // *Photosynth. Res.* 2017. T. 133, № 1–3, C. 185–199. *Scopus*
46. Petrova A.A., Boskhomdzhieva B.K., Milanovsky G.E., Koksharova O.A., Mamedov M.D., **Cherepanov D.A.**, Semenov A.Y. Interaction of various types of photosystem I complexes with exogenous electron acceptors // *Photosynth. Res.* 2017. T. 133, № 1–3, C. 175–184. *Scopus*