

УДК 541.136

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В БЕЛКАХ

Куллас Ю. Ю.

Описаны результаты исследований кинетики окислительно-восстановительных реакций индивидуальных белков — переносчиков электрона и ферментов. Основное внимание удалено влиянию природы активных центров белковых молекул и модификации отдельных аминокислотных остатков на скорость переноса электрона в гомогенной среде. Детально рассмотрены вопросы, связанные с электрохимическим превращением белков и влиянием состояния интерфазы на скорость этого процесса. Изложены представления о теоретическом расчете констант скорости электронного переноса в белках.

Библиография — 154 ссылки.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1699
II. Окислительно-восстановительные реакции переносчиков электрона	1700
III. Количественные закономерности окислительно-восстановительных реакций ферментов	1708
IV. Скорость электрохимического превращения белков	1711

I. ВВЕДЕНИЕ

Окислительно-восстановительные процессы синтеза и деструкции веществ в живых организмах осуществляются с участием белковых систем, в которых перенос электрона протекает путем окисления или восстановления активных центров белковых молекул [1]. Успех наметившегося практического использования этих реакций при трансформации органических и неорганических соединений, конверсии энергии, а также в электрокаталитических системах [2—4] в значительной мере определяется глубиной понимания основных закономерностей переноса электрона в индивидуальных белках. Не менее важное значение количественная оценка скорости переноса электрона в белках приобретает при моделировании ферментативного катализа и создания эффективных низкомолекулярных катализаторов [5]. Кинетические закономерности окислительно-восстановительных реакций индивидуальных белков представляют также и значительный теоретический интерес для молекулярной биологии и смежных областей, поскольку они способствуют пониманию механизма функционирования окислительно-восстановительных цепей переноса электрона в биологических мембранах.

Кинетические исследования в настоящее время занимают доминирующее положение в изучении механизма переноса электрона в белках. Разработка препаративных методов, позволивших получать индивидуальные белки в количествах, необходимых для химического эксперимента, способствовала быстрому накоплению экспериментальных данных о влиянии структуры белковой глобулы или даже отдельных аминокислот на скорость электронного переноса. Обобщение и обсуждение таких результатов представляется весьма своевременным.

Настоящий обзор посвящен анализу кинетических результатов исследования окислительно-восстановительных реакций белков — переносчиков электронов и ферментов. В нем представлены данные о химическом и электрохимическом превращении белков и изложены основные представления о теоретическом расчете скорости переноса электрона.

II. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСЧИКОВ ЭЛЕКТРОНА

1. Формально-кинетические особенности переноса электрона в белках

Окислительно-восстановительные белки, являющиеся компонентами окислительно-восстановительных цепей переноса электрона или участвующие в процессах переноса кислорода, как правило, обладают небольшой молекулярной массой и содержат в активном центре металлы, железосерные кластеры, flavинадениндинуклеотид (ФАД), flavинмонуклеотид (ФМН) или другие кофакторы. Выделенные в нативном состоянии, эти белки способны реагировать с различными соединениями и такие реакции являются бимолекулярными.

Белковые молекулы представляют собой заряженные частицы, поэтому скорость процесса зависит от электростатических взаимодействий. Для устранения этого эффекта значение константы скорости относят к бесконечной ионной силе раствора согласно выражению [6]:

$$\ln k^\infty = \ln k + 3,576 \left[\frac{\exp(-\kappa R_1)}{1 + \kappa R_2} + \frac{\exp(-\kappa R_2)}{1 + \kappa R_1} \right] \left[\frac{Z_1 Z_2}{R_1 + R_2} \right]$$

в котором Z_1 , Z_2 и R_1 , R_2 — соответственно заряды и радиусы реагирующих молекул, а $\kappa = 3,29 \mu^{1/2} \text{ нм}^{-1}$ (25°), где μ — выраженная в М ионная сила раствора.

Константы скорости бимолекулярных реакций переносчиков электронов с комплексными соединениями изменяются в пределах 10^6 — $10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и зависят от pH, ионной силы раствора, а также от природы донора и акцептора. Анализ приведенных в табл. 1 данных показывает, что неорганические реагенты, содержащие в качестве лигандов ароматические соединения, реагируют с большей скоростью, чем координационные соединения тех же металлов, не содержащие гидрофобных лигандов. Оксалатные комплексы кобальта обладают, как правило, низкой реакционной способностью. Низкие значения констант скорости наблюдаются также для белков, физиологическая функция которых заключается в переносе кислорода, а именно для гемоглобина и миоглобина.

Энтальпия и энтропия активации реакций переноса электрона изменяются в пределах от 0 до 352 кДж/моль и от -185 до 33 Дж/моль·К соответственно. Это указывает на возможность значительных конформационных изменений в белковых глобулах при переносе электронов, поскольку для образования простых бимолекулярных комплексов соударения типичны небольшие значения энтальпии активации, а энтропия активации составляет -40 Дж/моль·К.

В реакциях переноса электронов проявляется также и видовая специфичность. Высокопотенциальный железосодержащий белок пластоцианин, выделенный из разных источников, реагирует с различными окислителями с неодинаковой скоростью. При низкой ионной силе раствора некоторые переносчики образуют комплексы с неорганическими ионами. Константа устойчивости комплекса азурин с фенантролиновым комплексом кобальта равна 457 M^{-1} , а константа скорости превращения (k) $21,3 \text{ с}^{-1}$ [28]. Реакция между тем же медьсодержащим белком и гексацианоферратом (III) протекает более сложно с образованием комплексов как окисленного, так и восстановленного азуринов [29]. При окислении цитохрома с гексацианоферратом (III) также образуется комплекс, константа устойчивости которого $3,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, а константа скорости превращения $1,9 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ [30].

Влияние pH на скорость процесса обусловлено изменением степени протонизации аминокислотных остатков в области активного центра

К табл. 1.

Обозначения: ЭДТА — этилендиаминтетрацетат; ПДТА — 1,2-диаминопропантетрацетат; пир — пиридин; окс — оксалат; ник — 2,6-дипиколинат; фен — 5-хлор-1,10-фенантролин; 4,7-(Me)₂-фен — 5,6-диметил-1,10-фенантролин; 4,7-(F)₂-фен — 4,7-дифенилсульфо-1,10-фенантролин; сеп — 1,3,6,8,10,13,16,19-октаазобицикло-6,6,6-этиказан; ВПБЖ — высокопотенциальный железосодержащий белок.

* — электронновозбужденный.

Таблица I

Константы скорости и некоторые термодинамические параметры реакций переносчиков электронов с неорганическими комплексными соединениями при 25°C

Окислитель	Восстановитель	pH	μ, M	$k_{12}, l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$	$\Delta H^\neq, kJ/mol$	$\Delta S^\neq, J/mol \cdot K$	Ссылки
Ru(NH ₃) ₅ pir ³⁺	азурин	6,5	0,1	$2,0 \cdot 10^3$	41,4	-58,7	[7]
Ru(pir) ₅ ^{2+*}	—»—	7,0	0,1	$6,9 \cdot 10^8$	—	—	[8]
Co(окс) ₃ ³⁻	—»—	7,0	0,5	$2,9 \cdot 10^{-2}$	—	—	[9]
Co(фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$3,2 \cdot 10^3$	59,9	20,9	[10]
Co(5,6-(Me) ₂ -фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$1,5 \cdot 10^3$	48,6	-20,9	[10]
Co(5-Cl-фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$4,2 \cdot 10^2$	37,3	-71,2	[10]
Co(4,7-(Me) ₂ -фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$8,4 \cdot 10^1$	41,5	-71,2	[10]
Азурин	Fe(ЭДТА) ²⁻	7,0	0,2	$1,3 \cdot 10^3$	8,4	-155	[11]
Co(фен) ₃ ³⁺	пластоцианин	7,0	0,1	$4,9 \cdot 10^3$	58,7	20,9	[10]
Co(фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,5	$1,0 \cdot 10^3$	—	—	[9]
Co(фен) ₃ ³⁺	пластоцианин	7,0	0,1	$3,9 \cdot 10^2$	40,6	-61,2	[12]
Ru(pir) ₅ ^{2+*}	—»—	7,0	0,1	$1,6 \cdot 10^9$	—	—	[9]
Co(5,6-(Me) ₂ -фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$8,0 \cdot 10^3$	57,0	4,2	[10]
Co(5-Cl-фен) ₃ ²⁺	—»—	7,0	0,1	$7,0 \cdot 10^2$	45,7	-33,5	[10]
Co(4,7-(Фc) ₂ -фен) ₃ ³⁻	—»—	7,0	0,1	$2,6 \cdot 10^1$	32,7	-10,9	[10]
Co(окс) ₃ ³⁻	—»—	7,0	0,5	$2,4 \cdot 10^{-1}$	—	—	[9]
Ru(NH ₃) ₅ pir ³⁺	—»—	6,5	0,1	$2,0 \cdot 10^3$	—	—	[7]
Пластоцианин	Fe(ЭДТА) ²⁻	7,5	0,2	$3,1 \cdot 10^4$	—	—	[11]
—»—	—»—	5,5	0,2	$5,5 \cdot 10^4$	—	—	[11]
Ru(NH ₃) ₅ pir ³⁺	Ru(NH ₃) ₆ ²⁺	7,0	0,1	$2,4 \cdot 10^6$	—	—	[12]
Ru(pir) ₅ ²⁺	стеллацианин	6,5	0,1	$1,9 \cdot 10^5$	28,4	-50,3	[7]
Co(фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$4,2 \cdot 10^8$	—	—	[8]
Co(окс) ₃ ³⁻	—»—	7,0	0,5	$1,8 \cdot 10^5$	—	—	[9]
Co(5,6-(Me) ₂ -фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,5	$7,3 \cdot 10^2$	—	—	[10]
Co(4,7-(Фc) ₂ -фен) ₃ ³⁻	—»—	7,0	0,1	$1,8 \cdot 10^4$	38,5	-29,3	[10]
Стеллацианин	Fe(ЭДТА) ²⁻	7,5	0,5	$5,1 \cdot 10^5$	—	—	[11]
—»—	—»—	5,0	0,5	$5,7 \cdot 10^5$	—	—	[11]
Ru(NH ₃) ₅ pir ³⁺	Fe(CN) ₆ ⁴⁻	6,0	0,1	$1,6 \cdot 10^3$	35,2	-46,4	[7]
Co(окс) ₃ ³⁻	цитохром c	5,3	0,5	$1,9 \cdot 10^4$	—	—	[9]
Co(ник) ₂ ³⁺	—»—	7,0	0,5	5,5	—	—	[14]
Co(фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,2	$1,1 \cdot 10^4$	18,4	-10,5	[14]
Co(5-Cl-фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$1,5 \cdot 10^3$	47,3	-25,1	[15]
Co(5,6-(Me) ₂ -фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$1,3 \cdot 10^2$	40,2	-67,0	[15]
Co(4,7-Me) ₂ -фен) ₃	—»—	7,0	0,1	$2,7 \cdot 10^2$	51,9	-25,1	[15]
Co(4,7-(Фc) ₂ -фен) ₃ ³⁻	—»—	7,0	0,1	$2,8 \cdot 10^1$	61,2	-12,6	[15]
Цитохром c	Fe(пик) ₂ ²⁻	7,0	0,1	$2,9 \cdot 10^3$	53,6	—	[15]
—»—	Ru(NH ₃) ₆ ²⁺	6,4	0,1	$3,8 \cdot 10^4$	30,2	-64,5	[14]
—»—	Fe(ЭДТА) ²⁻	7,0	0,09	$9,0 \cdot 10^3$	—	—	[16]
Fe(CN) ₆ ³⁻	цитохром c ₅₅₁	7,0	0,1	$1,0 \cdot 10^2$	—	—	[17]
Co(фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$5,3 \cdot 10^4$	51,5	16,8	[15]
Co(5-Cl-фен) ₃ ³⁺	цитохром c ₅₅₁	7,0	0,1	$4,4 \cdot 10^3$	39,4	-41,9	[15]
Co(5,6-(Me) ₂ -фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$4,3 \cdot 10^3$	57,0	29,3	[15]
Co(4,7-(Me) ₂ -фен) ₃ ³⁺	—»—	7,0	0,1	$3,2 \cdot 10^3$	45,7	-25,1	[15]
Co(4,7-(Фc) ₂ -фен) ₃ ³⁻	—»—	7,0	0,1	$2,8 \cdot 10^4$	57,8	33,5	[14]
Co(ник) ₂ ²⁻	—»—	7,0	0,2	$5,8 \cdot 10^2$	15,1	-142,5	[14]
Цитохром c ₅₅₁	Fe(пик) ₂ ²⁻	7,0	0,2	$3,2 \cdot 10^3$	40,2	-41,9	[19]
Цитохром b ₅	Fe(ЭДТА) ²⁻	7,0	0,5	$2,8 \cdot 10^2$	22,6	-122,3	[19]
Цитохром c _{d1} (гем c)	—»—	7,0	0,5	$2,0 \cdot 10^2$	—	—	[20]
Цитохром c _{d1} (гем d ₁)	—»—	7,0	0,5	$0,6 \cdot 10^2$	—	—	[20]
Метгемоглобин	—»—	7,0	0,2	$2,9 \cdot 10^1$	23,0	-138	[21]
Метмиоглобин	—»—	7,0	0,2	$3,1 \cdot 10^1$	50,3	-54,3	[21]
—»—	Co(сеп) ²⁺	6,3	0,45	$3,1 \cdot 10^1$	—	—	[22]
—»—	SO ₂ ²⁻	6,3	0,15	$3,5 \cdot 10^3$	—	—	[22]
Метмиоглобин	ВПЖБ	6,3	0,5	$4,5 \cdot 10^6$	—	—	[9]
Co(окс) ₃ ³⁻	—»—	6,3	0,1	$8,0 \cdot 10^{-3}$	62,4	30,2	[23]
Co(фен) ₃ ³⁺	—»—	6,3	0,08	$(0,2 \cdot 5) \cdot 10^4$	—	—	[24]
Fe(CN) ₆ ³⁻	ВПЖБ	7,0	0,1	$1,6 \cdot 10^3$	3,3	-171,8	[23]
Рубредоксин	Fe(ЭДТА) ²⁻	7,0	0,1	$9,5 \cdot 10^4$	5,9	-129,9	[25]
—»—	Ru(NH ₃) ₆ ²⁺	4,0	0,1	$1,6 \cdot 10^4$	0,4	-167,6	[25]
Ферредоксин	V(H ₂ O) ₆ ²⁺	4,0	0,1	$1,2 \cdot 10^3$	0,4	-184,4	[25]
—»—	Cr(H ₂ O) ₆ ²⁺	7,3	0,05	$3,0 \cdot 10^4$	23,5	-88,0	[26]
Fe(CN) ₆ ³⁻	V(ЭДТА) ²⁻	7,3	0,05	$3,2 \cdot 10^5$	352,0	-29,3	[26]
—»—	Eu(ПДТА) ²⁻	7,0	0,05	$1,7 \cdot 10^5$	3,6	-159,2	[27]

Таблица 2

Константы скорости взаимодействия редокс-белков с органическими соединениями (25°C)

Белок	Восстановитель	pH	μ, M	$k_{12}, \text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$	Ссылки
Цитохром c	ФМН $^{\cdot}$	7,0	0,04	$6,0\cdot10^7$	[33]
	ФМН $^{\cdot}$	7,0	0,1	$7,0\cdot10^7$	[34]
	ФМН $_2$	7,0	0,1	$3,0\cdot10^7$	[34]
	2-метил-1,4-нафтогидрохинон	6,0	0,1	$8,5\cdot10^2$	[35]
	тетрахлор-1,4-гидрохинон	7,4	0,02	$4,2\cdot10^5*$	[36]
	тетраметилфенилендиамин	7,4	0,02	$2,6\cdot10^4*$	[36]
	N-метил-гидрофеназин	7,4	0,02	$6,0\cdot10^5*$	[36]
	МВ $^{+}$	7,0	0,004	$7,2\cdot10^7*$	[37]
	C $_2\text{H}_5\text{OH}^{\cdot}$	7,0	0,004	$1,4\cdot10^8*$	[37]
	МВ $^{+}$	7,0	0,2	$2,3\cdot10^8*$	[37]
	МВ $^{+}$	7,2	0,07	$2,4\cdot10^7$	[38]
	БВ $^{+}$	7,2	0,07	$3,3\cdot10^7$	[38]
Цитохром c_3	МВ $^{+}$	7,2	0,005	$4,5\cdot10^8*$	[37]
	C $_2\text{H}_5\text{OH}^{\cdot}$	7,2	0,005	$6,0\cdot10^8*$	[37]
	МВ $^{+}$	7,2	0,3	$9,7\cdot10^8*$	[37]
Метгемогло- бин	ФМН $_2$	7,0	0,1	$5,5\cdot10^6$	[39]
Метмиогло- бин	МВ $^{+}$	7,0	0,004	$2,3\cdot10^7*$	[37]
	C $_2\text{H}_5\text{OH}^{\cdot}$	7,0	0,004	$5,5\cdot10^7*$	[37]
	МВ $^{+}$	7,0	0,2	$5,4\cdot10^7*$	[37]
	анион аскорбиновой кислоты	7,2—8,1	0,3	$1,2\cdot10^{-2}$	[40]
Ферредоксин	ПВ $^{+}$	7,3	0,05	$1,2\cdot10^5$	[26]
	МВ $^{+}$	8,0	0,055	$2,4\cdot10^8$	[37]
Флаводоксин-	МВ $^{+}$	8,0	0,055	$7,0\cdot10^8$	[37]
семихинон					

Обозначения: МВ $^{+}$, БВ $^{+}$, ПВ $^{+}$ — соответственно катион-радикалы метилвиологена, бензилвиологена, пропилвиологена; C $_2\text{H}_5\text{OH}^{\cdot}$ — радикал этанола.

* При 20°C .

белков. Показано, что депротонированный остаток гистидина His-83 в молекуле азурина уменьшает электростатическое отталкивание положительно заряженных ионов так, что при pH выше р K происходит значительное возрастание скорости реакции [28]. В реакциях с гексацианоферратом, ответственным за связывание субстрата является His-35, протонизация которого в кислой области значительно ускоряет процесс. В случае пластицианина при pH < 5 скорость реакции значительно уменьшается, когда используют фенантролиновый комплекс кобальта, но не зависит от pH, когда применяют отрицательно заряженные комплексы [10]. Это обусловлено тем, что фенантролиновый комплекс связывается с депротонированным остатком Туг-83, находящимся примерно на расстоянии 1 нм от активного центра, в то время как гексацианоферрат (III) образует комплекс с депротонированным His-87 (р K 5,7), находящимся в координационной сфере меди [31]. В реакциях цитохрома c с гексацианоферратом и другими отрицательно заряженными реагентами принимают участие протонированные остатки Lys-72 и Lys-13, находящиеся вблизи гема [32], поэтому ассоциация цитохрома c с полиаминами уменьшает скорость реакции. На скорость реакций также влияет протонизация Туг-87, ответственного за конформационные изменения белковой глобулы [16].

Редокс-белки обладают по отношению к органическим соединениям в целом повышенной реакционной способностью (табл. 2). Особенно большие величины констант скорости восстановления белков наблюдаются в реакциях с катион-радикалами виологенов и с другими радикалами. В случае флаводоксина, цитохрома *c* и цитохрома *c₃* скорость реакций с катион-радикалом метилвиологена приближается к скорости диффузионно-контролируемого процесса. Высокой реакционной способностью обладают также восстановленный флавинмононуклеотид (FMNH_2) и его семихинон (FMNH^{\cdot}), что обусловлено их низким редокс-потенциалом.

Было показано, что в реакциях цитохрома *c* с флавинами перенос электрона осуществляется, когда N-5-область молекул флавинов ориентирована к гемовой щели, а N-пиримидиновая часть — в обратную сторону [34]. Строгое взаимное расположение реагентов в комплексе соударения обуславливает слабую зависимость скорости реакции от ионной силы раствора, несмотря на то, что FMNH^{\cdot} и FMNH_2 обладают зарядами —2 и —2,8 соответственно. Полученные результаты имеют важное значение для теоретического анализа зависимости скорости переноса электрона от ионной силы раствора.

Скорость взаимодействия сольватированного электрона с цитохромом *c*, миоглобином и метгемоглобином определяется диффузией [41, 42]. Редокс-состояние активного центра мало влияет на скорость восстановления белка, и лишь удаление гема из миоглобина замедляет скорость реакции в два раза.

Изучение восстановления ацетилированного, сукцинилированного и карбоксиметилированного цитохрома *c* сольватированными электронами и другими восстановителями позволило выяснить роль электростатического взаимодействия и конформационного изменения в этих редокс-реакциях [41]. Как оказалось, в случае цитохрома *c* скорость процесса главным образом определяется конформационным изменением, а перенос электрона протекает в области гема.

2. Количественные закономерности переноса электрона

Результаты исследований редокс-превращений переносчиков электрона были использованы при изучении возможностей применения теории внешнесферного переноса к белковым системам. Согласно представлениям Маркуса [43], константа скорости внешнесферного переноса электронов (k_{12}) связана с константой равновесия реакции (K) и константами скорости внутреннего обмена для каждого из реагентов (k_{11} и k_{22} следующим уравнением):

$$k_{12}^{\infty} = (k_{11}^{\infty} k_{22}^{\infty} K f)^{1/2}$$

где $\lg f = (\lg K)^2 / 4 \lg (k_{11}^{\infty} k_{12}^{\infty} / P^2)$ и $P \approx 10^{11} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Обычно величина близка к 1, когда K невелика. Из этого уравнения следует, что скорость переноса электрона зависит от доступности центрального атома комплекса для отдельных реагентов, а также от разности потенциалов реагирующих соединений, т. е. от константы равновесия процесса. Если перенос электрона в активном центре белка протекает так же, как и в низкомолекулярных редокс-соединениях, то константы скорости внутреннего обмена белков, рассчитанные в реакциях с разными реагентами, должны совпадать в пределах порядка. В случае кинетической селективности константы будут различаться на несколько порядков.

При исследовании скорости восстановления цитохрома *c* комплексными соединениями железа, содержащими в качестве лигандов производные ЭДТА, выявлено хорошее совпадение экспериментально измеренных и рассчитанных согласно теории внешнесферного переноса [44] констант. Различие наблюдается лишь для тех координационных соединений, которые содержат неполностью координированную сферу, что может быть обусловлено увеличением размера комплекса за счет образования водородной связи между растворителем и гидроксилом, входящим в эту сферу. При окислении цитохрома *c* производными иона

Таблица 3

Константы скорости внутреннего обмена металлопротеинов при рН 7,0 и 25° С

Белок	Реагент	k_{11}^{∞} , л·моль ⁻¹ ·с ⁻¹	Ссылки
Цитохром c_{551}	Со(фен) ₃ ³⁺	$2,2 \cdot 10^5$	[15]
	стеллацианин	$6,0 \cdot 10^3*$	[46]
	Со(оксо) ₃ ³⁻	$1,4^{**}$	[9]
	Fe(ник) ₂ ²⁻	$4,5 \cdot 10^{-1}$	[14]
	Fe(ЭДТА) ₂ ²⁻	2,0	[14]
	Со(ник) ₂ ²⁻	$2,9 \cdot 10^3$	[14]
	Fe(ЭДТА) ₂ ²⁻	$1,2 \cdot 10^1$	[15]
Цитохром c	Ru(NH ₃) ₆ ²⁺	$1,6 \cdot 10^1$	[7]
	Со(фен) ₃ ³⁺	$7,1 \cdot 10^2$	[7]
	Ru(NH ₃) ₅ пир ³⁺	$2,0 \cdot 10^4$	[7]
	ионы феррициания	$(0,5—7,0) \cdot 10^3$	[45]
	Со(оксо) ₃ ³⁻	$4,6 \cdot 10^{1**}$	[9]
	Fe(ЭДТА) ₂ ²⁻	4,3	[19]
	Со(окс) ₃ ³⁻	$2,5 \cdot 10^{4**}$	[9]
Стеллацианин	Fe(ЭДТА) ₂ ²⁻	$2,3 \cdot 10^5$	[7]
	цитохром c_{551}	$2,9 \cdot 10^{4*}$	[46]
	Ru(NH ₃) ₅ пир ³⁺	$1,7 \cdot 10^5$	[7]
	Со(фен) ₃ ³⁺	$3,0 \cdot 10^5$	[7]
	Со(фен) ₃ ³⁺	$1,1 \cdot 10^4$	[10]
	Fe(ЭДТА) ₂ ²⁻	$7,3 \cdot 10^1$	[10]
	Ru(NH ₃) ₅ пир ³⁺	$4,9 \cdot 10^4$	[10]
Пластоцианин	цитохром f	$4,0 \cdot 10^{1*}$	[11]
	Со(окс) ₃ ³⁻	$2,7 \cdot 10^{-3**}$	[9]
	Fe(ЭДТА) ₂ ²⁻	$2,8 \cdot 10^{-2}$	[15]
	Со(фен) ₃ ³⁺	$1,6 \cdot 10^4$	[14]
	цитохром c_{551}	$8,0 \cdot 10^7*$	[11]
	Со(фен) ₃ ³⁺	$1,8 \cdot 10^4$	[15]
	Fe(CN) ₆ ³⁻	$1,0 \cdot 10^1*$	[23]
ВПЖБ	Fe(ЭДТА) ₂ ²⁻	$1,5 \cdot 10^{-2}$	[15]
	Со(окс) ₃ ³⁻	$1,1 \cdot 10^{-3**}$	[23]
	Ru(NH ₃) ₅ пир ³⁺	$2,1 \cdot 10^3$	[7]
	Ru(NH ₃) ₅ пир ₆ ²⁺	2,0	[15]
	Ru(NH ₃) ₆ ²⁺	$1,0 \cdot 10^9*$	[25]
	V(H ₂ O) ₆ ²⁺	$1,7 \cdot 10^{8*}$	[25]
	Fe(ЭДТА) ₂ ²⁻	$2,8 \cdot 10^{-3}$	[21]
Метгемоглобин	Fe(ЭДТА) ₂ ²⁻	$1,3 \cdot 10^{-1}$	[21]

* $\mu=0,1$ М; ** $\mu=0,5$ М.

феррициана, редокс-потенциал которых меняется на величину 0,56 В, также отмечены близкие значения рассчитанных и экспериментальных констант [45]. Энталпия активации процесса достигает примерно 20 кДж/моль, а энтропия колеблется между —24 и —48 Дж/моль·К. Эти данные указывают на то, что процесс действительно протекает через образование простого бимолекулярного комплекса соударения без значительных структурных изменений в белковой глобуле.

Когда вместо однотипных железных комплексов используют координационные соединения других металлов, наблюдается значительный разброс рассчитанных значений констант скорости внутреннего обмена (табл. 3). Лишь для двух белков — стеллацианина и рубредоксина эти константы практически не зависят от природы реагента. Для остальных изученных белков они могут различаться при использовании разных реагентов более чем на 5 порядков.

Аномально высокие значения констант наблюдаются в тех случаях, когда при взаимодействии между реагентами образуются комплексы, как например, комплексы цитохрома f с пластоцианином или цитохрома c_{551} с азурином. Реагентам, в состав которых входят ароматические лиганды соответствуют повышенные, а реагентам с гидрофильными лигандами — более низкие значения констант, что связано со способностью первых проникать в гидрофобную область активного центра. На основе имеющихся данных можно заключить, что производные железа, содержащие в качестве лигандов этилендиаминтетрауксусную кислоту

или ее аналоги, не проникают в белковую глобулу. Поэтому константы, полученные для этих соединений, могут быть использованы в качестве «реперных» при сравнении реакционной способности разных белков. Видно (см. табл. 3), что константы скорости внутреннего обмена, полученные с использованием $\text{Fe}(\text{ЭДТА})^{2-}$, близки для разных цитохромов. Стевлацианин обладает наибольшей, а метгемоглобин — наименьшей константой скорости внутреннего обмена.

Для устранения эффектов, связанных с гидрофильными или гидрофобными свойствами лигандов, был применен электронновозбужденный комплекс рутения (см. табл. 1). Поскольку при возбуждении сильно возрастает окислительно-восстановительная способность реагента, это равносильно увеличению движущей силы реакции. Константы скорости бимолекулярных реакций окисления восстановленных медьсодержащих белков хорошо совпадают с теоретическими, рассчитанными на основании редокс-потенциала возбужденного комплекса. Это является веским подтверждением применимости теории внешнесферного переноса электрона к этим металлопротеинам. Возможность применения данной теории предполагается и для других белков, в частности, флаводоксина [47].

Зависимости, вытекающие из теории внешнесферного переноса, наблюдаются и при использовании органических реагентов. Так, для цитохрома c или цитохрома f экспериментально обнаружена линейная зависимость логарифма констант скорости от стандартного потенциала хинонов с тангенсом угла наклона прямой, близким к теоретическому значению [48]. Из этих экспериментальных данных можно заключить, что лимитирующей стадией процесса является одноэлектронный перенос и что константы скорости внутреннего обмена для применяемых хинонов сильно не различаются.

В реакциях переносчиков белков с органическими реагентами наблюдается приближение скорости переноса электрона при большом значении свободной энергии процесса к некоторому предельному значению [49]. По-видимому, это обусловлено тем, что энергия реорганизации растворителя в этих процессах ниже, чем в реакциях с неорганическими заряженными комплексными соединениями, и система приближается к «инвертной» области [43], в которой скорость уменьшается при увеличении свободной энергии реакции. Необходимо отметить, что за пределывание скорости при большом изменении свободной энергии наблюдается и в реакциях с участием низкомолекулярных соединений. С целью объяснения экспериментальных данных предложено [50] эмпирическое выражение для свободной энергии активации, которая при большой экзотермичности реакции равна свободной энергии процесса. Теоретическое обоснование этого выражения приведено в работе [51].

Наряду с теорией внешнесферного переноса электрона, для расчета скорости процесса в белках используют теорию термически активированного тунNELьного переноса [52—54]. Согласно [55], константа скорости тунNELьного переноса электрона

$$k_1^{\infty^2} = 0,6023 \cdot k_{\mu} (2\pi\lambda_0^3 r / R_1)$$

$$k_{\mu} = (4\pi^2/h) |T(r)|^2 (4\pi k_B T \Delta)^{-1/2} \exp[-(E_a - E_b - \Delta)^2/4k_B T \Delta],$$

$$|T(r)| = 2,7 (N_a N_b)^{-1/2} \exp(-7,2 r)$$

где λ_0 — константа затухания, r — расстояние переноса электрона, R_1 — радиус белковой молекулы, h — константа Планка, k_B — константа Больцмана, T — абсолютная температура, Δ — параметр вибрационной синхронизации, E_a и E_b — стандартные потенциалы белка и медиатора, N_a , N_b — количество мест распределения начальной и конечной волновых функций, $T(r)$ — матричный элемент электронного обмена. Константа затухания для белковых молекул обычно принимается равной 0,07 нм, а параметр вибрационной синхронизации не превышает 1 эВ.

Согласно теории туннельного переноса, энталпия и энтропия активации выражаются уравнениями:

$$\Delta H^\neq = (E_a - E_b - \Delta)^2 / 4\Delta - 3RT/2$$

$$\Delta S^\neq = R \ln \left[\frac{23,8}{k_B T} \left(\frac{2\pi\lambda_0^3 r}{R_1} \right) \left(\frac{1}{4\pi k_B T \Delta} \right)^{\frac{1}{2}} |T(r)|^2 \right] - \frac{3R}{2}$$

Эти уравнения применяют для расчета параметров вибрационной синхронизации и констант затухания.

Для цитохрома *c* константы скорости, рассчитанные в рамках теорий внешнесферного и туннельного переноса, близки [44]. Однако при восстановлении ферредоксина комплексными соединениями ванадия, европия или катион-радикалом метилвиологена константы скорости взаимного обмена, рассчитанные по теории внешнесферного переноса, на 4 порядка меньше констант, определенных экспериментально в модельных соединениях. В то же время расчеты, выполненные в рамках теории туннельного переноса, дают величины, близкие к экспериментальным [26]. Необходимо отметить, что рассчитанные константы весьма чувствительны к величинам параметра вибрационной синхронизации и константы затухания. Последние могут быть рассчитаны на основе термодинамических данных, однако в большинстве случаев их применение в дальнейших расчетах не приводит к хорошему совпадению с экспериментальными величинами.

Принимая константу затухания постоянной для разных металлопротеинов, Маук и соавт. [15] предложили полуэмпирическую формулу, связывающую расстояние переноса электрона с константой скорости взаимного обмена:

$$r = 0,62 - 0,035 \ln k_{11}^\infty$$

Уменьшенное на ван-дер-ваальсовский радиус, это расстояние соответствует глубине залегания активного центра, которая для цитохромов составляет 0,34—0,69, пластицианина — 0,28, азуринга — 0,56 и высоко-потенциальных железосодержащих белков — 0,58 нм. Активный центр стеллацианина находится на поверхности глобулы, поэтому константа скорости взаимного обмена этого белка использована при выводе последнего уравнения. Применение его к переносчикам электронов, несодержащим металлы, приводит к результатам, которые хорошо коррелируют с рентгеноструктурными данными [56].

3. Экспериментальные данные о переносе электрона в белковых комплексах и структурные представления

Константы скорости реакции в белковых комплексах принимают значения порядка 10^3 — 10^7 л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$ (табл. 4). Пары белков, образующие комплексы в электрон-транспортных цепях (цитохром *c* с оксидазой — цитохром *c*, цитохром *c* — цитохром *b*₅, пластицианин — цитохром *f*, азурин — цитохром *c₅₅₁* и др.), реагируют значительно быстрее, чем белки, которые таких комплексов не дают. Подобные пары образуются в результате электростатического взаимодействия положительных и отрицательных зарядов аминокислотных остатков, что было установлено на примере комплексов цитохрома *c* с цитохромом *c₁* и цитохромом *c* оксидазой [68], цитохрома *b*₅ с метгемоглобином [69] и цитохрома *b*₂ с цитохромом *c* [70]. Образование комплексов между белками, которые не являются физиологическими партнерами, возможно при взаимодействии как противоположно, так и одинаково заряженных участков [57, 70]. По-видимому, в этих случаях важную роль играют силы гидрофобного взаимодействия.

Путем селективной модификации выявлены группы, участвующие в образовании комплексов. В цитохроме *c* остатки Lys-13, -25, -27, -72, -79 находятся поблизости от гема и комплементарно взаимодействуют с отрицательно заряженными Asp-48, -60, Glu-43, -44 и пропионатом гема в цитохроме *b*₅ [63]. Во взаимодействии цитохрома *c* с цитохромом *c*

Таблица 4

Константы скорости переноса электрона между белками (pH 6,1—7,6)

Окислитель	Восстановитель	T, °C	μ, M	$k, л\cdot моль^{-1}\cdot с^{-1}$	Ссылки
Азурин	цитохром <i>c</i>	25	0,1	$6,6 \cdot 10^3$	[57]
»	цитохром <i>c₅₅₁</i>	25	0,1	$3,0 \cdot 10^6$	[58]
»	цитохром <i>c₅₅₃</i>	25	0,05	$(2-0,5) \cdot 10^6$	[59]
ВПЖБ	цитохром <i>c₂</i>	20	0,02	$(2,4-1,5) \cdot 10^5$	[46]
»	цитохром <i>c</i>	20	0,02	$(8,7-2,6) \cdot 10^4$	[46]
»	»	—	0,21	$(12-3,8) \cdot 10^4$	[60]
Пластоцианин	цитохром <i>f</i>	25	0,1	$3,6 \cdot 10^7$	[61]
»	цитохром <i>c₅₅₃</i>	25	0,1	$5,0 \cdot 10^5$	[61]
»	цитохром <i>c₅₅₁</i>	25	0,1	$7,5 \cdot 10^5$	[61]
»	цитохром <i>c</i>	25	0,1	$1,0 \cdot 10^6$	[61]
»	цитохром <i>c₅₅₃</i>	25	0,05	$4,0 \cdot 10^5$	[59]
»	цитохром <i>c</i>	25	0,10	$1,5 \cdot 10^6$	[57]
Цитохром <i>c</i>	цитохром <i>c₅₅₃</i>	25	0,05	$4,0 \cdot 10^4$	[59]
»	цитохром <i>c₅₅₁</i>	20	0,02	$4,9 \cdot 10^4$	[62]
»	азурин	25	0,05	$1,6 \cdot 10^3$	[59]
»	стеллацианин	25	0,1	$1,9 \cdot 10^3$	[46]
»	цитохром <i>b₅</i>	25	0,1	$3,0 \cdot 10^7$	[63]
»	флаводоксин семихинон	23,5	0,18	$1,3 \cdot 10^5$	[64]
Цитохром <i>c₁</i>	цитохром <i>c₁</i>	10	1,02	$2,4 \cdot 10^5$	[65]
Цитохром <i>c₅₅₁</i>	цитохром <i>c</i>	10	1,02	$3,3 \cdot 10^5$	[65]
Цитохром <i>c</i> оксидаза	стеллацианин	25	0,1	$1,7 \cdot 10^6$	[46]
»	цитохром <i>c</i>	25	0,1	$1,0 \cdot 10^8$	[66]
	»	8	0,05	$3,5 \cdot 10^7$	[67]

оксидазой принимают участие карбоксильные группы Asp-112, Glu-114, -198 [71]. В паре физиологических партнеров цитохром *b₅* — НАДН — цитохром *b₅* редуктаза электростатическое взаимодействие реализуется между комплементарными остатками Glu-47, -48, -52, пропионатом гема и неустановленной шестой карбоксильной группой цитохрома *b₅* [72]. В реакциях цитохрома *c₃* с гидрогеназой или ферредоксином участвуют и остатки лизина, которые находятся на расстоянии 3 нм от редокс-центров [73].

Рентгеноструктурные данные для индивидуальных белков позволили построить модели комплексов и представить гипотетический путь переноса электрона. В комплексе цитохрома *c* с цитохромом *b₅* простетические группы почти копланарны, а расстояние между ближайшими атомами порфиринового кольца составляет 0,85 нм [74]. Строение комплекса цитохром *c* пероксидазы — цитохром *c* проанализировано более подробно [75]. В этом комплексе остатки His-13, -27, -72, -86, -87, Gln-12, -16 цитохрома *c* взаимодействуют с остатками Asp-79, -216, -37, -34, Asn-87 и Gln-86 пероксидазы. В комплексе оба гема параллельны, но их плоскости раздвинуты по вертикали на 0,68 нм. Расстояние между атомами железа равно 2,46 нм, а наименьшее расстояние между гемами 1,65 нм. Авторы [75] считают, что перенос электрона в комплексе осуществляется при миграции свободной валентности, тогда как в работе [76] предполагается, что этот процесс протекает путем туннелирования. Веским подтверждением туннельного переноса в рассматриваемых системах является экспериментальное обнаружение комплекса переноса заряда между гемом и гексацианоферратом, а также в комплексе цитохром *c* — P₈₇₀ [77].

Построены также гипотетические модели комплексов цитохром *b₅* — метгемоглобин [78] и флаводоксин — цитохром *c* [64]. В комплексе цитохрома *b₅* с субчастицами метгемоглобина взаимодействуют отрицательные группы цитохрома *b₅* и положительно заряженные — метгемоглобина. Гемовые группы в комплексе расположены параллельно на расстоянии 0,7—0,8 нм друг от друга, а расстояние между атомами железа равно 1,6 нм. Поскольку последняя величина близка к соответствующему расстоянию в комплексе цитохром *c* пероксидаза — цитохром *c*, то можно предположить, что перенос электрона между гемами

протекает путем туннелирования при активном участии пропионатной группы гема в цитохроме b_5 [79].

В образовании комплекса флаводоксина с цитохромом c принимают участие Lys-13, -25, -27 и -29 цитохрома c и кислотные группы Glu-120, -65, -62, Asp-58 в флаводоксине [64]. Наименьшее расстояние между тиоэфирной связью Cys-17 в цитохроме c и метильной группой при C(7) флавина в флаводоксине составляет 0,34 нм. Расстояние между атомами углерода в конъюгированных системах равно 0,57 нм. Плоскости гема и флавина расположены под углом 30°, что обеспечивает хорошее перекрывание π-орбиталей и высокую скорость внутрикомплексного переноса электрона. Анализ рентгеноструктурных данных для цитохрома c_3 [80] и кинетических результатов для цитохрома cd_1 [81] подтверждает вывод о том, что для обеспечения высокой скорости внутримолекулярного переноса электрона необходима параллельная ориентация гемов.

Экспериментальные данные о скорости переноса электрона в белковых молекулах получены с использованием меченых пентааммиакатом рутения белков [82—84]. Найдено, что скорость переноса электрона в цитохроме c составляет 20 и 82 с^{-1} на расстояниях 1,4 и 1,6 нм соответственно. В молекуле азуринга перенос электрона на активный центр, находящийся на расстоянии 1,2 нм от метки, протекает медленнее ($1,9 \text{ с}^{-1}$) [84]. Еще большее различие в скоростях наблюдается при переносе электрона между субчастицами гемоглобина [85]. В этом белке расстояние между ионами металла составляет 2,5 нм, а скорость переноса электрона равна 60 с^{-1} . Все эти результаты указывают на специфику белковой глобулы и влияние природы активного центра. Весьма важной представляется пространственная ориентация как атомов металлов, так и лигандов. Перенос электрона между активными центрами, по-видимому, осуществляется путем туннелирования, однако не исключена возможность передачи валентности, а также участия в этом процессе промежуточных ковалентных связей и ароматических аминокислотных остатков.

III. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ФЕРМЕНТОВ

Количественные данные о переносе электрона с участием ферментов весьма немногочисленны, что объясняется их высокой специфичностью и сложностью механизма действия. Лишь для некоторых ферментов были подобраны реакционные серии, что позволило получить кинетические данные о редокс-превращениях каталитически активных белков.

1. Окисление активного центра глюкозооксидазы

Окисление активного центра глюкозооксидазы хиноидными акцепторами электрона протекает со скоростью от $3,5 \cdot 10^3$ до $1,5 \cdot 10^6 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [56]. Скорость реакции для соединений, обладающих *n*-хинонным строением, увеличивается при увеличении редокс-потенциала акцептора электрона. Между логарифмами констант скорости и потенциалом акцепторов наблюдается линейная зависимость, которая описывается корреляционной прямой с наклоном $8,4 \text{ В}^{-1}$.

Неорганические комплексные соединения реагируют с восстановленной глюкозооксидазой медленно, несмотря на их высокий потенциал, но скорость окисления гексацианоферратом (III) значительно увеличивается в кислой среде. При высокой ионной силе раствора фенантролиновый или дипиридиловый комплексы кобальта реагируют с указанным субстратом со скоростью, близкой к скорости окисления его феррицианидом, однако при уменьшении pH (до 4) скорость меняется значительно меньше.

На основе полученных данных сделаны следующие выводы: 1) лимитирующей стадией процесса является одноэлектронный перенос, поскольку скорости реакций с участием одноэлектронных акцепторов — тетрациано-*n*-хинодиметана и его анион-радикала — починаются брен-

стедовской зависимости; 2) перенос электрона протекает по внешнесферному механизму; 3) производные о-хинонов образуют самостоятельную группу акцепторов, которые обладают по сравнению с *пара*-производными повышенной реакционной способностью, определяемой *ортого*-эффектом; 4) низкая скорость окисления глюкозооксидазы неорганическими соединениями обусловлена спецификой действия одноэлектронных акцепторов, которая определяется наличием заряда.

Константы скорости взаимного обмена глюкозооксидазы, рассчитанные по теории внешнесферного переноса, при большой ионной силе составляют 10^{-2} — 10^{-9} л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$, а расстояние переноса электрона для неорганических реагентов равно 1,1—1,3 нм в нейтральной среде и 0,8—0,9 нм в кислой области. В случае гидрохинона оно составляет 0,88 нм. Эти различия в рассчитанных расстояниях определяются степенью проникновения реагентов в зону активного центра, что связано со структурными изменениями белковой глобулы.

2. Реакции цитохрома b_2 с акцепторами электронов

Константы скорости окисления цитохрома b_2 органическими акцепторами электронов зависят от редокс-потенциала соединений и меняются в пределах $1,2 \cdot 10^4$ — $4,7 \cdot 10^7$ л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$ [86]. Между логарифмом константы скорости и величиной редокс-потенциала наблюдается линейная зависимость, наклон которой равен 8,6 В $^{-1}$. Восстановленный цитохром b_2 реагирует также и с неорганическими комплексными соединениями, причем окислению подвергается гем, тогда как органические акцепторы электронов взаимодействуют с другой простетической группой фермента (ФМН). Константы скорости взаимного обмена с комплексными соединениями, рассчитанные на основе кинетических данных, меняются в пределах $1 \cdot 10^1$ — $6,6 \cdot 10^6$ л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$, а для *n*-бензохинона константа составляет $1,6 \cdot 10^3$ л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$. Особенно велика эта константа в случае дипиридилового комплекса кобальта, который реагирует в зоне связывания цитохрома *c*. Расстояние переноса электрона для непроникающих комплексов равно 0,31—0,54 нм, а для *n*-бензохинона 0,36 нм. Эти величины совпадают со значениями, полученными для других цитохромов.

3. Закономерности переноса электрона в пероксидазном процессе

Для процесса катализа пероксидазой характерно образование активных промежуточных состояний фермента — комплексов E_1 и E_2 [87]. Предполагается, что в соединении E_2 железо находится в феррильном состоянии. В E_1 один из окислительных эквивалентов существует в виде порфиринового π -катион-радикала, а другой аналогичен эквиваленту E_2 . В цитохром *c* пероксидазе свободный радикал локализуется не на порфириновом кольце, а на остатке Trp-51 [88]. Окислительно-восстановительные потенциалы обеих форм ферментов мало зависят от pH и составляют для перехода E_2/E_1 0,963 В, а для E_1/E_2 0,94 В [87].

Восстановление комплекса E_1 неорганическими соединениями протекает в большинстве случаев по одноэлектронному механизму с образованием комплекса E_2 . Константы скорости восстановления комплекса E_1 принимают значения 10^4 — 10^7 л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$ (табл. 5). С исключительно высокой скоростью реагирует производное рутения, содержащее в качестве лиганда ароматическое соединение [89]. Феррипероксидаза также восстанавливается сильными восстановителями до ферро-формы. Стандартный потенциал этого перехода равен —0,25 В [93]. Сепулхрат кобальта, стандартный потенциал которого равен —0,3 В, реагирует со скоростью $7 \cdot 10^4$ л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$, а дитионит почти на порядок быстрее [92]. В реакциях феррипероксидазы с МВ $^{+}$ наблюдается сильная зависимость скорости восстановления от ионной силы раствора. Рассчитанный на основе этих результатов заряд пероксидазы равен —5. В работе [90] показано, что при восстановлении цитохром *c* пероксидазы в состоянии E_2 комплексами железа наблюдается линейная зависимость между изменениями свободных энергий реакции и активации, которая со-

Таблица 5

Константы скорости восстановления пероксидаз при 25° С [89—92]

Пероксидаза	Реагент*	pH	μ, M	$k_{12},$ л·моль $^{-1} \cdot с^{-1}$
Цитохром с пероксидаза (E ₂ -комплекс)	Co(тип) ²⁺	7,0	0,1	1,1·10 ⁵
	Ru(NH ₃) ₅ тип ²⁺	7,0	0,1	9,5·10 ⁶
	Fe(CN) ₆ ⁴⁻	7,0	0,1	7,6·10 ³
	Fe(CN) ₆ ⁴⁻	5,26	0,1	8,1·10 ⁴
	Fe(дипир) ₃ ²⁺	5,26	0,1	3,6·10 ²
	Fe(дмдипир) ₃ ²⁺	5,26	0,5*	4,2·10 ³
	Fe(тмдипир) ₃ ²⁺	5,26	1,0	1,2·10 ⁴
	Fe(фен) ₂ (CN) ₂ ²⁻	5,26	2,0	3,4·10 ⁴
Пероксидаза из хрена (E ₁ -комплекс)	Fe(фен)(CN) ₄ ²⁻	5,26	1,0	8,0·10 ⁵
	Fe(CN) ₆ ⁴⁻	6,93	0,11	8,5·10 ⁵
Пероксидаза из хрена (E ₂ -комплекс)	Fe(CN) ₆ ⁴⁻	6,83	0,11	1,8·10 ⁴
Пероксидаза из хрена	Co(сеп) ²⁺	6,3	0,15	7,0·10 ⁴
	SO ₂ ²⁻	6,3	0,15	5,0·10 ⁵
	MB ⁺	7,0	∞	4,9·10 ⁵

Обозначения: тип — терпиридин; дипир — диметилдипиридин; тмдипир — триметилдипиридин.

* При 20°.

гласуется с теорией внешнесферного переноса. Константа скорости взаимного обмена, рассчитанная для ферроцианида, составляет $7,5 \cdot 10^{-5}$ л·моль $^{-1} \cdot с^{-1}$, а для комплекса бис(трипиридинил) Co(II) — $1,3 \cdot 10^{-4}$ л·моль $^{-1} \cdot с^{-1}$. Константа скорости взаимного обмена комплекса E₂ пероксидазы из хрена при использовании ферроцианида примерно на порядок меньше ($9 \cdot 10^{-7}$ л·моль $^{-1} \cdot с^{-1}$). Рассчитанные на основе этих данных расстояния переноса электрона составляют для указанных трех случаев 0,93, 0,95 и 1,1 нм соответственно.

В реакциях феррипероксидазы с восстановителями свободная энергия процесса, меньше, чем реакция с участием комплексов E₁ или E₂, и вероятность попадания системы в инвертную область уменьшается. В наших работах [4] определена константа взаимного обмена при взаимодействии MB⁺ с феррипероксидазой. Она равна 3,6 л·моль $^{-1} \cdot с^{-1}$, а расстояние переноса электрона составляет 0,58 нм. Расчет в рамках теории туннельного переноса при принятых по аналогии с феррицитохромом с $\Delta=0,8$ эВ и константой затухания 0,07 нм дал расстояние переноса электрона также 0,58 нм.

4. Окисление доноров электрона в лакказной реакции

Лакказа является одной из немногих оксидаз, которые восстанавливают молекулярный кислород до воды в четырехэлектронном процессе. Активный центр лакказы включает ионы меди трех типов, они находятся в двухвалентном состоянии и все участвуют в каталитическом восстановлении кислорода. Лакказа является двухсубстратным ферментом, катализирующим окисление гидроксильных производных бензола или неорганических ионов молекулярным кислородом. Константа скорости бимолекулярного взаимодействия активного центра лакказы с кислородом равна $1,6 \cdot 10^6$ л·моль $^{-1} \cdot с^{-1}$, а скорость окисления субстратов меняется в пределах $1,0 \cdot 10^5$ — $2,5 \cdot 10^6$ л·моль $^{-1} \cdot с^{-1}$ и зависит от природы фермента [94, 95]. Константа скорости восстановления активного центра не коррелирует с редокс-потенциалом доноров. Однако для одной из изученных лакказ [95] наблюдается повышенное значение бимолекулярной константы в ряду гидрохинонов, содержащих заместители с неподеленной электронной парой, несмотря на то, что введение заместителя увеличивает редокс-потенциал донора электронов. Подобный эффект заместителей обнаружен также при изучении предстационарной кинетики восстановления в лакказе меди первого типа [96]. Предполагается, что

это обусловлено дополнительной координацией нуклеофильных заместителей с атомами меди третьего типа. Именно этим объясняется значительное увеличение константы ингибиования фторид-ионом окисления 2,3-дициангидрохинона, поскольку сродство фторида к меди второго типа также уменьшается при координации меди третьего типа с азидом [97].

Кинетические данные о восстановлении активного центра лакказы гидрохиноном и гексацианоферратом (II), полученные методом остановленной струи [98], позволяют заключить, что реакция протекает по механизму внешнесферного переноса. Отсутствие бренстедовской зависимости в процессах восстановления кислорода обусловлено сложностью механизма и четырехэлектронным восстановлением кислорода [98].

Важным вопросом в катализе лакказой является природа высокого потенциала активного центра фермента. Спектроэлектрохимические измерения редокс-потенциала лакказы в интервале 7—41°C дают следующие значения изменений термодинамических параметров и потенциала восстановления активного центра: $\Delta S = -58,2 \text{ Дж/моль}\cdot\text{К}$ и $\Delta H = -92,6 \text{ кДж/моль}$ и $E(25^\circ\text{C}) = 780 \text{ мВ}$ [99]. Сравнение энтропийного и энタルпийного параметров с известными для одноцентровых металло-протеинов позволяет заключить, что высокий потенциал синей меди обусловлен в основном стабилизацией лигандами, а эффекты сольватации белка играют значительно меньшую роль.

IV. СКОРОСТЬ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ БЕЛКОВ

Существует глубокая аналогия между процессами переноса электронов в растворе и электродными реакциями. В рамках простой модели изотропной среды теория внешнесферного переноса дает следующее выражение, которое связывает скорость процессов в объеме раствора и на поверхности электрода [43]:

$$(k_h/P_h)^{\frac{1}{2}} \geq k_s/P_s$$

где k_h и k_s — константы скорости соответственно бимолекулярного и гетерогенного процессов, P_h и P_s — число максимально возможных соударений в объеме ($\sim 10^{11} \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$) и на поверхности ($\sim 10^4 \text{ см}^2/\text{с}$). При помощи этого уравнения можно оценить скорость электрохимического превращения белков на основе кинетических результатов, тогда как представления о тунNELном переносе [100] позволяют рассчитать скорость на основе структурных данных о белковых молекулах.

1. Редокс-превращения белков на ртутном электроде

В ранних работах электрохимические свойства белков наиболее часто изучали на ртутных капающем или стационарном электродах. Первым и наиболее подробно исследованным белком был цитохром *c* [101]. В многочисленных работах, посвященных этому белку, обнаружена разная степень обратимости электрохимического превращения цитохрома *c* на ртутных электродах. Авторы [102], а также [103], например, считают, что восстановление цитохрома *c* при низких концентрациях протекает обратимо. Другие исследователи [104, 105] показали, однако, что нативный цитохром *c* в отличие от гемина, восстанавливается с высоким перенапряжением, достигающим 0,3 В, а гетерогенная константа скорости этого процесса весьма низка (10^{-10} — $10^{-11} \text{ см}/\text{с}$). Наблюдаемое различие в электрохимическом поведении цитохрома *c* обусловлено, по-видимому, разным составом среды и наличием примесей. Действительно, недавно показано [101], что даже в высокоочищенных препаратах белка содержится примесь, которая существенным образом влияет на скорость электрохимического превращения.

Исследование электрохимических свойств цитохрома *c* на ртутном электроде позволило поставить вопрос о состоянии белковой глобулы на его поверхности. Предполагается, что первые адсорбированные порции белка «расплющиваются» и необратимо денатурируются на поверхности электрода [106, 107]. Согласно [108], разряд молекул цитохрома *c*

осуществляется в порах монослоя. Адсорбция в них нативных глобул белка протекает обратимо. Площадь поры для цитохрома *c* составляет 4 нм², что в 2,25 раза меньше площади сечения нативной молекулы белка. Необходимо отметить, что адсорбция цитохрома *c* на втором и последующих слоях протекает медленнее по сравнению со свободной поверхностью ртути. Поэтому при большом перенапряжении перенос электрона может лимитироваться обменом адсорбированных и свободно диффундирующих молекул. В результате предельные токи не достигают тех величин, которые получаются на основе уравнения Ильковича.

Цитохром *c*₇, строение которого похоже на строение цитохрома *c*, является трехгемовым белком. Этот низкопотенциальный гемопротеин восстанавливается обратимо при —0,17 и —0,22 В [109]. Скорость процесса определяется диффузией и перенос электрона не замедляется адсорбцией белка. Другой цитохром, *c*₅₅₃, обладает низкой молекулярной массой, но его гемовое окружение отличается от окружения цитохрома *c*. Электрохимическое превращение цитохрома *c*₅₅₃ протекает квазиобратимо [110]. Катодное перенапряжение восстановления этого цитохрома не превышает 40 мВ, а редокс-потенциал системы составляет 0,02 В. Электрохимическое восстановление четырехгемового цитохрома *c*₃ протекает обратимо с высокой константой скорости (>0,1 см/с), но ступенчато из-за неэквивалентности гемов в белковой молекуле [111, 112].

Частично расщепленный трипсином цитохром *b*₅ в условиях классической полярографии образует хорошо выраженные волны и потенциал полуволны находится вблизи его редокс-потенциала [113]. Нативный цитохром *b*₅, выделяемый с использованием детергентов, восстанавливается на ртутном электроде значительно труднее и с большим перенапряжением, а цитохром Р-450 вообще не восстанавливается [113]. Другие гемсодержащие белки, природные функции которых заключаются в переносе кислорода — метмиоглобин и метгемоглобин, восстанавливаются на электроде с большим перенапряжением и необратимо [114, 115].

При сравнении электрохимических свойств гемсодержащих протеинов — переносчиков электронов выявляется, что быстрое электрохимическое превращение претерпевают лишь низкомолекулярные белки, обладающие небольшой молекулярной массой и низкими значениями редокс-потенциала, величина которого коррелирует со степенью доступности гема для воды [116]. Следовательно, структурные особенности строения молекулы белка играют значительную роль в процессах электрохимического превращения. Безусловно, адсорбционные и ориентационные факторы также влияют на скорость процесса. Слабая адсорбция и (или) агрегация цитохрома *b*₅, по-видимому, является причиной медленной реакции, хотя активный центр имеет значительную площадь контактирования с водной средой.

На ртутном электроде изучены электрохимические свойства и других белков. Восстановление ферредоксина высших растений протекает при —0,33 В, а бактериального — при —0,325 В, и в электродной реакции участвуют протоны [117]. Известные литературные данные указывают на то, что ферредоксины растительного и микробного происхождения по-разному ведут себя на электроде [118].

На основе сравнительного электрохимического исследования пяти белков — ферредоксина, рубредоксина, флаводоксина, цитохрома *c*₃ и цитохрома *c* выяснено, что [119]:

1) положительно заряженный цитохром *c*₃ с высокой скоростью восстанавливается на ртутном электроде, поскольку процесс осуществляется при потенциале ниже потенциала нулевого заряда ртути, а поли-*L*-лизин ингибитирует процесс;

2) бактериальный и растительный ферредоксины, так же как и флаводоксины, заряжены отрицательно. Их редокс-потенциалы совпадают с зарядом ртутного электрода. Поэтому высокая скорость электрохимического превращения наблюдается лишь при наличии положительно заряженных поверхностно-активных веществ;

3) положительно заряженный цитохром *c* медленно восстанавливается на положительно заряженном электроде в области редокс-превращения белка.

Все эти факты позволяют сделать вывод о том, что электростатическое взаимодействие играет существенную роль при электрохимическом превращении белков и восстановление положительно заряженных белков должно протекать медленно при положительном потенциале, большем потенциала нулевого заряда. Подобные трудности возникают и при восстановлении отрицательно заряженных белков, если потенциал электрода имеет более отрицательное значение, чем заряд белка. Неравномерное распределение зарядов на поверхности глобул белка может привести, однако, к тому, что эффективное взаимодействие будет наблюдаться при одинаковом заряде электрода и белка или наоборот — процесс не будет осуществляться несмотря на их противоположные заряды. Примером могут служить данные о восстановлении отрицательно заряженных рубредоксина и флаводоксина, редокс-превращения которых не протекают при положительном заряде ртутного электрода [119]. Понятно, в этих белках, как и в цитохроме *c*, ориентация дипольного момента такова, что он образует угол с гемом. Следовательно, при приближении белковой молекулы к положительно заряженной поверхности предпочтительно будут взаимодействовать побочные группы, а активный центр не будет непосредственно контактировать с электродом.

Электрохимическое восстановление ферментов, обладающих большой молекулярной массой по сравнению с переносчиками электронов, протекает, как правило, с диссоциацией кофактора [114]. Даже в случае холестериноксидазы, в которой ФАД привязан к белку ковалентной связью, адсорбция приводит к частичному освобождению кофактора и электрохимические свойства системы определяются редокс-превращением ФАД в присутствии денатурированного белка [120]. Катализически активные фрагменты глюкозооксидазы, образующиеся при частичном расщеплении нативной структуры фермента, восстанавливаются при значении потенциала на 0,1 В больше потенциала восстановления ФАД [121]. Более того, энзиматически восстановленный фермент окисляется электрохимически с небольшим перенапряжением. Совпадение потенциала полуволны ($E_{1/2}$) с редокс-потенциалом фермента и постоянство $E_{1/2}$ при изменяющейся концентрации фермента показывают, что фрагменты глюкозооксидазы превращаются обратимо. Нативная гликозооксидаза реагирует квазиобратимо на платиновых электродах [122].

Другие изученные белки, в том числе флавопротеин из желтка яиц, денатурируют при адсорбции на ртутном электроде с освобождением кофактора, который восстанавливается в области редокс-потенциала [121]. При адсорбции пероксидазы на амальгамированном золотом электроде наблюдается окислительно-восстановительный процесс, который, однако, связан с редокс-превращением дисульфидных связей [123].

2. Электрохимические реакции белков на твердых электродах

В ранних работах показано, что электрохимическое превращение цитохрома *c* на золотом, платиновом, никелевом, серебряном, др. металлических электродах, и на кремниевом полупроводниковом электроде *p*-типа протекает необратимо [101]. Квазиобратимое превращение цитохрома *c* наблюдалось на оптически прозрачных электродах [124]. В работе [101] показано, что тщательно очищенный цитохром *c* превращается квазиобратимо на легированном оловом электроде из окси индия с гетерогенной константой скорости $4,9 \cdot 10^{-3}$ см/с. Детальное исследование электрохимического превращения цитохрома *c* на твердых электродах позволило выявить, что скорость процесса зависит не только от тщательности очистки белка, но и от способа подготовки электрода и состава буферного раствора [125]. Имеющиеся данные убедительно демонстрируют, что цитохром *c* может обмениваться электронами с раз-

ными электродами. При этом скорость процесса близка к величине, рассчитанной на основе констант скорости взаимного обмена, которая равна 0,1 см/с с учетом стерического фактора (0,025) [126].

Восстановление и окисление ферредоксина на электродах из пиролитического графита протекает обратимо лишь в присутствии ионов магния [127, 128]. Электрохимическое превращение рубредоксина, флаводоксина и ферредоксина на этих же электродах в присутствии положительно заряженных ионов гексаммоний хрома или ионов магния протекает или квазиобратимо, или обратимо [129]. Для быстрого превращения азуринга ионы не требуются. Наблюдаемые явления могут быть объяснены тем, что все изученные белки заряжены отрицательно и обладают редокс-потенциалами, в области которых графитовая поверхность имеет отрицательный емкостный заряд. Положительно заряженные ионы концентрируются во внешней плоскости слоя Гельмгольца и тем самым уменьшают отталкивающее действие электрода на рубредоксин, флаводоксин и ферредоксин. Слабое влияние положительно заряженных ионов в случае азуринга обусловлено высокой степенью спаривания заряда между боковыми группами.

Электрохимическое окисление цитохрома b_5 на платиновых сетчатых электродах происходит при 0,9 В, а восстановление фермента маскируется восстановлением воды [130]. Полученные данные указывают на необратимость электрохимического превращения фермента. Спектроэлектрохимические исследования, однако, позволили выявить, что оба кофактора — ФМН и гем обмениваются электронами независимым путем.

Электрохимическое превращение переносчиков кислорода протекает весьма медленно. Показано [4], что электрохимическое превращение метгемоглобина на электроде SnO_2 протекает необратимо с гетерогенной константой $5,2 \cdot 10^{-8}$ см/с и коэффициентом переноса 0,29. Адсорбция тетраэтиламмониевого иона увеличивает константу в 3 раза. Возможно, это обусловлено изменением потенциала диффузного слоя электрода при адсорбции поверхностно-активного катиона.

3. Окислительно-восстановительные превращения белков на модифицированных электродах

Обсуждены выше результаты электрохимического превращения белков на твердых электродах показывают, что на скорость процесса значительное влияние оказывает состояние интерфазы электрод-буферный раствор. Для ее направленного изменения применяют модификаторы (табл. 6). Электрохимическое превращение цитохромов на золотых, углеродистых или платиновых электродах, модифицированных 4,4'-дипиридилом или его серосодержащими аналогами, протекает при равновесном потенциале с высокой константой скорости, которая близка к константе для хорошо изученной пары ферри/ферроцианид. Наряду с этими четырьмя аналогами 4,4'-дипиридила известно несколько соединений — 4,4'-азопиридила и 2,5-бис(4-пиридила)-1,3,4-тиадиазол, а также пурин и его производные, которые обладают способностью ускорять редокс-превращение цитохрома с [133, 145]. Модификаторы, как правило, содержат в концах молекулы по одному атому азота, имеют определенную длину и сопряженную электронную систему. Другие, не соответствующие этим требованиям, хотя и близкие по строению к 4,4'-дипиридилу соединения, такие как пиридин, пиразин, 4-фенилпиридин, 2,2'-дипиридила и 1,2-бис-(4-пиридила)этан, не увеличивают электрохимическую активность цитохромов.

Механизм действия модификаторов заключается в адсорбции этих соединений на поверхности электрода и образовании слоя, на котором адсорбируются белки [146]. Во взаимодействии белка с адсорбированным слоем принимают участие положительно заряженные лизиновые остатки, что способствует ориентации гема к поверхности электрода.

Таблица 6

Электрохимические параметры белков, определенные на химически модифицированных электродах

Белок	Электрод	Модификатор	Электрохимические параметры		Ссылка
			k_s , см/с	α	
Цитохром <i>c</i>	Au	4,4'-дипиридилил; 1,2-бис(4-пиридилил) этилен	$1,9 \cdot 10^{-2}$	—	[131]
»	Au	бис(4-пиридилил)дисульфид; бис(4-пиридилил) сульфид	$(2,1-8,9) \cdot 10^{-3}$	—	[132]
»	Au	пурин	$1,0 \cdot 10^{-3}$	—	[133]
»	SnO_2	полиэтиленимид	—	0,3	[134]
»	C	4,4'-дипиридилил	$4,4 \cdot 10^{-4}$	—	[135]
Цитохром <i>c</i> ₃	Au	»	$>10^{-2}$	—	[131]
Цитохром <i>cd</i> ₁	C	»	$4,0 \cdot 10^{-4}$	—	[135]
Цитохром <i>c</i>	Au	метилвиологен	$3,4 \cdot 10^{-5}$	0,25	[136]
Миоглобин	Au	»	$7,7 \cdot 10^{-5}$	0,18	[136]
»	Au	»	$3,9 \cdot 10^{-11}$	0,18	[137]
Ферредоксин	Au	»	$(59-6,5) \cdot 10^{-5}$	0,4—0,6	[138,139]
Пероксидаза	Au	N,N'-ди(2-аминоэтил)дипиридилил; метилвиологен; бензилвиологен	$(84-1,3) \cdot 10^{-5}$	0,31—0,71	[140]
Цитохром <i>c</i>	Au, Pt	N,N'-бис-[3-(тристетоксилил)-пропил]дипиридилил	$<0,06$	—	[141]
»	C	N-винил-4,4'-дипиридилил	—	—	[142]
»	Pt	полиалкилированный ферроцен	$(2,4-8,7) \cdot 10^{-4}$	—	[143]
»	<i>n</i> -Si	—	$(1,8-3,5) \cdot 10^{-4}$	—	[144]
Ферредоксин	C	N,N'-ди(3-аминопропил)дипиридилил	$(1,6-4,0) \cdot 10^{-3}*$ $>10^{-2}**$	—	[145]

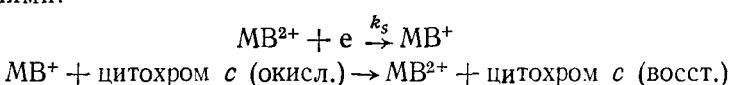
* Для бактериального ферредоксина; ** для растительного ферредоксина.

Механизм действия другого модификатора — полиэтиленимина, по-видимому, также заключается в ориентации глобул белка [134]. Однако концентрационная зависимость потенциала редокс-превращения белка и зависимость тока превращения от времени модификации электрода указывают, что полиэтиленимин не образует сплошного покрытия на электродах.

В качестве модификаторов также используют полимеризованные на золотых электродах виологены [136—140]. Константы электрохимического превращения белков на таких электродах небольшие, однако, коэффициент переноса (α) в некоторых системах близок 1 (см. табл. 6). Действие поливиологенов в качестве промоторов электрохимического превращения белков аналогично по своему механизму действию 4,4'-дипиридила, что подтверждается электрохимической инертностью модификаторов в области редокс-превращения белков. Кроме того, поливиологены являются сопряженными молекулами, в терминальных группах которых содержатся атомы азота, что делает их похожими на дипиридилил.

Электроды, модифицированные N,N'-бис[3-(тристетоксилил)пропил]дипиридилилом и родственными соединениями (см. табл. 6), содер-

жат иммобилизованные виологены или ферроцен. Электрохимическое превращение белков на этих электродах протекает по медиаторной схеме [147]. Для цитохрома *c* процесс может быть изображен следующими уравнениями:



В этом процессе константа скорости бимолекулярной реакции превышает $10^8 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$. Процесс лимитируется реакцией белка на поверхности электрода, поэтому ток прямо пропорционален квадратному корню из скорости развертки потенциала [141, 144].

4. Электрохимическое превращение ковалентно иммобилизованных ферментов

При иммобилизации глюкозооксидазы на графитовых электродах посредством хлористого цианура на дифференциальной импульсной вольт-амперограмме наблюдается пик при $-0,31 \text{ В}$ [148]. Значение потенциала этого пика сдвинуто на 20 мВ в катодную область по сравнению с адсорбированным на графитовом электроде ферментом и на 100 мВ в анодную область по сравнению с редокс-превращением фермента в растворе. Иммобилизованная оксидаза *L*-аминокислот, а также ксантинооксидаза превращаются при тех же значениях потенциала [149]. Эти результаты демонстрируют возможность прямого переноса электрона к флавиновым оксидазам. Однако нативность иммобилизованных ферментов, т. е. их способность катализировать превращение субстратов, остается под вопросом. Дело в том, что изученные ферменты легко диссоциируют на апофермент и кофактор. То, что восстановление этих белков протекает при потенциале, отличающемся от потенциала восстановления адсорбированного ФАД, окончательно не доказывает нативности фермента, поскольку это может быть связано с восстановлением ФАД, который ассоциирован не в зоне активного центра. Такие эффекты, например, наблюдаются при ассоциации ФАД с инертным белком [106].

* * *

Таким образом, переносчики электрона и окислительно-восстановительные ферменты реагируют подобно небелковым редокс-системам. Специфика действия полипептидной цепи заключается в регулировании потенциала активного центра и его ориентации в комплексах, в которых осуществляется перенос электрона. Не исключена возможность того, что боковые группы аминокислот принимают непосредственное участие в переносе электрона на большие расстояния, как это было показано на примере комплекса цитохром *c* пероксидазы — цитохром *c* [150]. Дальнейший прогресс в области изучения механизма переноса электрона в белках в большой степени связан с выяснением вклада полипептидной цепи в энергию активации и адиабатичность переноса. Весьма интересные результаты в данном направлении получены в работах [151—154].

ЛИТЕРАТУРА

1. Лихтенштейн Г. И. Многоядерные окислительно-восстановительные металлоферменты. М.: Наука, 1979, с. 102.
2. Швядас В. Ю.-К., Марголин А. Л., Семенов А. Н., Яковлева В. И., Губницкий Л. С. В кн.: Введение в прикладную энзимологию/Под ред. Березина И. В., Мартиника К. М.: Изд-во МГУ, 1982, с. 215.
3. Варфоломеев С. Д. Конверсия энергии биокатализитическими системами. М.: Изд-во МГУ, 1981, с. 105.
4. Кулес Ю. Ю., Разумас В. И. Биокатализ в электрохимии органических соединений. Вильнюс: Мокслас, 1983, с. 54, 74.
5. Шилов А. Е. В сб.: Окислительно-восстановительные металлоферменты и их модели. Теоретические и методические аспекты, ч. 2/Под ред. Лихтенштейна Г. И. Черноголовка: Ред.-изд. отдел ОИХФ АН ССР, 1982, с. 3.

6. Wherland S., Gray H. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 9, p. 2950.
7. Cummins D., Gray H. B. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 15, p. 5158.
8. English A. M., Lum V. R., DeLaise P. J., Gray H. B. Ibid., 1982, v. 104, № 3, p. 870.
9. Holwerda R. A., Knaff D. B., Gray H. B., Clemmer J. D., Crowley R., Smith J. M., Mauk A. G. Ibid., 1980, v. 102, № 3, p. 1142.
10. McArdle J. V., Coyle C. L., Gray H. B., Yoneda G. S., Holwerda R. A. Ibid., 1977, v. 99, № 8, p. 2483.
11. Rosenberg R. C., Wherland S., Holwerda R. A., Gray H. B. Ibid., 1976, v. 98, № 20, p. 6364.
12. Segal M. G., Sykes A. G. Ibid., 1978, v. 100, № 14, p. 4585.
13. Kurland R. J., Winkler M. E. J. Biochem. Biophys. Methods, 1981, v. 4, p. 215.
14. Mauk A. G., Coyle C. L., Bordignon E., Gray H. B. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 17, p. 5054.
15. Mauk A. G., Scott R. A., Gray H. B. Ibid., 1980, v. 102, № 12, p. 4360.
16. Adegitte A., Okpanachi M. I. Ibid., 1980, v. 102, № 8, p. 2832.
17. Ryan M. D., Wei J.-F., Feinberg B. A., Lau Y.-K. Anal. Biochem., 1979, v. 96, № 1, p. 326.
18. Goldkorn T., Schejter A. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 24, p. 12562.
19. Reid L. S., Mauk A. G. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 3, p. 841.
20. Schichman S. A., Gray H. B. Ibid., 1981, v. 103, № 26, p. 7794.
21. Mauk A. G., Gray H. B. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, v. 86, № 1, p. 206.
22. Balahura R. J., Wilkins R. G. Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 724, № 2, p. 465.
23. Rawlings J., Wherland S., Gray H. B. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 8, p. 2177.
24. Nettlesheim D. G., Johnson W. V., Feinberg B. A. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 593, № 2, p. 371.
25. Jacks C. A., Bennet L. E., Raymond W. K., Lovenberg W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 4, p. 1118.
26. Dasgupta S. P., Ryan M. D. Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 680, № 2, p. 242.
27. Takabe T., Niwa S., Ishikawa H., Takenaka K. J. Biochem., 1980, v. 88, № 4, p. 1167.
28. Lappin A. G., Segal M. G., Weatherburn D. C., Henderson R. A., Sykes A. G. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 9, p. 2302.
29. Goldberg M., Pecht I. Biochemistry, 1976, v. 15, № 19, p. 4197.
30. McGraw J. A., Kihara T. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 548, № 2, p. 417.
31. Cookson D. J., Hayes M. T., Wright P. E. Nature, 1980, v. 283, № 5748, p. 682.
32. Butler J., Davies D. M., Sykes A. G. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 2, p. 469.
33. Salet C., Land E. J., Santus R. Photochem. Photobiol., 1981, v. 33, p. 753.
34. Ahmad I., Cusanovich M. A., Tollin G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 11, p. 6724.
35. Rich P. R., Bendall D. S. FEBS Letters, 1979, v. 105, № 2, p. 189.
36. Petersen L. C., Cox R. P. Biochem. J., 1980, v. 192, № 4, p. 687.
37. Van Leeuwen J. W., Van Dijk C., Grande H. J., Veeger C. Europ. J. Biochem., 1982, v. 127, № 3, p. 631.
38. Wei J.-F., Ryan M. D. Anal. Biochem., 1980, v. 106, № 1, p. 269.
39. Yubisti T., Matsukawa S., Yoneyama Y. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 24, p. 11694.
40. Tsukahara K., Yamamoto Y. J. Biochem., 1983, v. 93, № 1, p. 15.
41. Ilan Y., Shafferman A., Feinberg B. A., Lau Y.-K. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 548, № 3, p. 565.
42. Hasinoff B. B., Pecht I. Ibid., 1983, v. 743, № 2, p. 310.
43. Marcus R. A. J. Chem. Phys., 1965, v. 43, № 2, p. 679.
44. Wei J.-F., Ryan M. D. J. Inorg. Biochem., 1982, v. 17, № 2, p. 237.
45. Carney M. J., Lesniak J. S., Likar M. D., Pladziewicz J. R. J. Amer. Chem. Soc., 1984, v. 106, № 9, p. 2565.
46. Wilson M. T., Silvestrini M. C., Morpurgo L., Brunori M. J. Inorg. Biochem., 1979, v. 11, № 1, p. 95.
47. Jung J., Tollin G. Biochemistry, 1981, v. 20, № 18, p. 5124.
48. Rich P. R. J. Chem. Soc. Farad. Discuss., 1982, v. 74, p. 349.
49. Meyer T. E., Przysiecki C. T., Watkins J. A., Bhattacharyya A., Simondsen R. P., Cusanovich M. A., Tollin G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 22, p. 6740.
50. Rehm D., Weller A. Isr. J. Chem., 1970, v. 8, № 2, p. 259.
51. Scandola F., Balzani V. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 20, p. 6140.
52. Григорьев Л. Н., Черновский Д. С. Биофизика, 1972, т. 17, № 2, с. 195.
53. Blumenfeld L. A., Chernavskii D. S. J. Theor. Biol., 1973, v. 39, № 1, p. 1.
54. Hopfield J. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 9, p. 3640.
55. Chien J. C. W. J. Phys. Chem., 1978, v. 82, № 20, p. 2158.
56. Kulyas J. J., Cernas N. K. Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 744, № 1, p. 57.
57. Augustin M. A., Chapman S. K., Davies D. M., Sykes A. G., Speck S. H., Margoliash E. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 10, p. 6405.
58. Antonini E., Finanzi-Agro A., Aviglianico L., Guerricci P., Rotilio G., Mondovi B. Ibid., 1970, v. 245, № 18, p. 4847.
59. Mizrahi I. A., Cusanovich M. A. Biochemistry, 1980, v. 19, № 21, p. 4733.
60. Aprahamian G., Feinberg B. A. Ibid., 1981, v. 20, № 4, p. 915.
61. Wood P. M. Biochim. Biophys. Acta, 1974, v. 357, № 2, p. 370.
62. Morton R. A., Overnell J., Harbury H. A. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 18, p. 4653.
63. Ng S., Smith M. B., Smith H. T., Millet F. Biochemistry, 1977, v. 16, № 23, p. 4975.
64. Simondsen R. P., Weber P. C., Salemme F. R., Tollin G. Ibid., 1982, v. 21, № 25, p. 6366.

65. Konig B. W., Wilms J., Van Gelder B. F. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 636, № 1, p. 9.
66. Nicholls P., Hildebrandt V., Hill B. C., Nicholls F., Wrigglesworth J. W. Canad. J. Biochem., 1980, v. 58, № 10, p. 969.
67. Antalis T. M., Palmer G. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 11, p. 6194.
68. Smith H. T., Ahmed A. J., Millett F. Ibid., 1981, v. 256, № 10, p. 4984.
69. Mauk M. R., Mauk A. G. Biochemistry, 1982, v. 21, № 19, p. 4730.
70. Capeillere-Blandin C. Europ. J. Biochem., 1982, v. 128, № 2—3, p. 533.
71. Millett F., de Jong C., Paulson L., Capaldi R. A. Biochemistry, 1983, v. 22, № 3, p. 546.
72. Dailey H. A., Strittmatter P. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 12, p. 5388.
73. Pierrot M., Haser R., Frey M., Payan F., Astier J.-P. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 23, p. 14341.
74. Salemme F. R. J. Mol. Biol., 1976, v. 102, № 3, p. 563.
75. Poulos T. L., Kraut J. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 21, p. 10322.
76. Potasek M. J. Science, 1978, v. 201, p. 151.
77. Goldstein R. F., Bearden A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 1, p. 135.
78. Poulos T. L., Mauk A. G. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 12, p. 7369.
79. Reid L. S., Mauk M. R., Mauk A. G. J. Amer. Chem. Soc., 1984, v. 106, № 7, p. 2182.
80. Pierrot M., Haser R., Frey M., Payan F., Astier J.-P. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 23, p. 1431.
81. Makinen M. W., Schicman S. A., Hill S. C., Gray H. B. Science, 1983, v. 222, p. 929.
82. Winkler J. R., Nocera D. G., Yocom K. M., Bordignon E., Gray H. B. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 21, p. 5798.
83. Isied S. S., Worosila G., Atherton S. J. Ibid., 1982, v. 104, № 26, p. 7659.
84. Kostic N. M., Margalit R., Che Chi-Ming, Gray H. B. Ibid., 1983, v. 105, № 26, p. 7765.
85. McGourty J. L., Blough N. V., Hoffman B. M. Ibid., 1983, v. 105, № 13, p. 4470.
86. Кулис Ю. Ю., Ченас Н. К., Круповицкое А. Л., Швирмицкис Г.-Ю. С. Тр. АН ЛитССР. Сер. Б, 1982, т. 4, № 80, с. 114.
87. Hayashi Y., Yamazaki I. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 18, p. 9101.
88. Poulos T. L., Kraut J. Ibid., 1980, v. 255, № 17, p. 8199.
89. Yandell J. K., Yonetani T. Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 748, № 2, p. 263.
90. Purcell W. L., Erman J. E. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 22, p. 7033.
91. Hasinoff F., Dunford H. B. Biochemistry, 1970, v. 9, № 25, p. 4930.
92. Balahura R. J., Wilkins R. G. Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 724, № 2, p. 465.
93. Yamazaki I., Tamura M., Nakajima R. Mol. Cell. Biochem., 1981, v. 40, p. 143.
94. Наки А., Варфоломеев С. Д., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1981, т. 260, № 3, с. 646.
95. Вайткеевичюс Р. К., Вельжите В. А., Ченас Н. К., Банис Р. Г., Кулис Ю. Ю. Биохимия, 1984, т. 49, № 6, с. 1000.
96. Holwerda R. A., Clemmer J. D., Yoneda G. S., McKerley B. J. Bioinorg. Chem., 1978, v. 8, p. 255.
97. Winkler M. E., Spira D. E., Lubien C. D., Thamann T. J., Solomon E. I. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, v. 107, № 3, p. 727.
98. Holwerda R. A., Gray H. B. J. Amer. Chem. Soc., 1974, v. 96, № 19, p. 6008.
99. Toniguchi T., Malstrom B. G., Anson F. C., Gray H. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 10, p. 3387.
100. Varfolomeev S. D., Berezin I. V. In: Advances in Physical Chemistry/Ed. by Kolotyrkin Ya. M. M.: Mir, 1982, p. 60.
101. Bowden E. F., Hawkrige F. M., Chlebowski J. F., Bancroft E. E., Thorpe C., Blount H. N. J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 26, p. 7641.
102. Betso S. R., Klapper M. H., Anderson L. B. Ibid., 1972, v. 94, № 23, p. 8197.
103. Scheller F., Janchen M., Lampe J., Prumke H.-J., Blanek J., Palecek E. Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 412, № 1, p. 157.
104. Parasevich M. R., Bogdanovskaya V. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 1976, v. 3, № 5, p. 589.
105. Haladjian J., Bianco P., Serre P. A. Ibid., 1979, v. 6, № 4, p. 551.
106. Kuznetsov B. A., Shumakovitch G. P., Mestechkina N. M. Ibid., 1977, v. 4, № 4, p. 512.
107. Serre P. A., Haladjian J., Bianco P. Biopolymers, 1982, v. 21, p. 1781.
108. Kuznetsov B. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 1981, v. 8, № 4, p. 681.
109. Bianco P., Haladjian J. Ibid., 1981, v. 8, № 2, p. 239.
110. Bianco P., Haladjian J., Pilard R., Bruschi M. J. Electroanal. Chem., 1982, v. 136, № 2, p. 291.
111. Bianco P., Fauque G., Haladjian J. Bioelectrochem. Bioenerg., 1979, v. 6, № 3, p. 389.
112. Niki K., Yagi T., Inokuchi H., Kimura K. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 12, p. 3335.
113. Кузнецов Б. А., Местечкина Н. М., Изотов М. В., Карузина И. И., Каражин А. В., Арчаков А. И. Биохимия, 1979, т. 44, № 9, с. 1569.
114. Kuznetsov B. A., Mestechkina N. M., Shumakovitch G. P. Bioelectrochem. Bioenerg., 1977, v. 4, № 1, p. 1.
115. Scheller F., Prumke H.-J. Studia Biophysica, 1976, v. 60, № 2, p. 137.
116. Stellwagen E. Nature, 1978, v. 275, № 5675, p. 73.
117. Киселев Б. А., Казакова А. А., Евстигнеев В. Б., Гинс В. К., Мухин Е. Н. Биофизика, 1976, т. 21, № 1, с. 35.

118. *Senda M., Ikeda T., Kakutani T., Kano K.* Bioelectrochem. Bioenerg., 1981, v. 8, № 2, p. 151.
119. *Van Dijk C., Van Leeuwen J. W., Weeger C., Schreurs J. P. G. M., Barendrecht E.* Ibid., 1982, v. 9, № 5, p. 743.
120. *Ikeda T., Ando S., Senda M.* Bull. Chem. Soc. Japan, 1981, v. 54, № 8, p. 2189.
121. *Scheller F., Strnad G., Neumann B., Kuhn M., Ostrowski W.* Bioelectrochem. Bioenerg., 1979, v. 6, № 1, p. 117.
122. *Durliat H., Comtat M.* Analyt. Chem., 1984, v. 56, № 2, p. 148.
123. *Yaropolov A. I., Tarasevich M. R., Varfolomeev S. D.* Bioelectrochem. Bioenerg., 1978, v. 5, № 1, p. 18.
124. *Yeh P., Kuwana T.* Chem. Letters, 1977, p. 1145.
125. *Bowden E. F., Hawkridge F. M., Blount H. N.* J. Electr. Chem., 1984, v. 161, p. 355
126. Фогель В. Р., Лихтенштейн Г. И., Котельников А. И. Биофизика, 1984, т. 29, № 2, с. 181.
127. *Armstrong F. A., Hill H. A. O., Walton N. J.* FEBS Letters, 1982, v. 145, № 2, p. 241.
128. *Armstrong F. A., Hill H. A. O., Walton N. J.* Ibid., 1982, v. 150, № 1, p. 214.
129. *Armstrong F. A., Hill H. A. O., Oliver B. N., Walton N. J.* J. Amer. Chem. Soc., 1984, v. 106, № 4, p. 921.
130. *Durliat H., Comtat M.* Analyt. Chem., 1982, v. 54, № 6, p. 856.
131. *Eddowes M. J., Hill H. A. O., Uosaki K.* J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 23, p. 7113.
132. *Taniguchi I., Toyosawa K., Yamaguchi H., Yasukouchi K.* J. Electroanal. Chem., 1982, v. 140, № 1, p. 187.
133. *Taniguchi I., Iseki M., Toyosawa K., Yamaguchi H., Yasukouchi K.* Ibid., 1984, v. 164, № 2, p. 385.
134. *Razumas V. J., Samalius A. S., Kulys J. J.* Ibid., 1984, v. 164, № 1, p. 195.
135. *Dhesi R., Cotton T. M., Timkovich R.* Ibid., 1983, v. 154, № 1, p. 129.
136. *Castner J. F., Hawkridge F. M.* Ibid., 1983, v. 143, № 1, 2, p. 217.
137. *Bowden E., Hawkridge F. M., Blount H. N.* Bioelectrochem. Bioenerg., 1980, v. 7, № 3, p. 447.
138. *Crawley C. D., Hawkridge F. M.* Biochem. Biophys. Res. Communs. 1981, v. 99, № 2, p. 516.
139. *Crawley C. D., Hawkridge F. M.* J. Electroanal. Chem., 1983, v. 159, № 2, p. 313.
140. *Razumas V. J., Gudavicius A. V., Kulys J. J.* Ibid., 1983, v. 151, № 1, 2, p. 311.
141. *Lewis N. S., Wrighton M. S.* Science, 1981, v. 211, p. 944.
142. *Elliott C. M., Martin W. S.* J. Electroanal. Chem., 1982, v. 137, № 2, p. 377.
143. *Chao S., Robbins J. L., Wrighton M. S.* J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 2, p. 181.
144. *Van Dijk C., Van Eijs T., Van Leeuwen J. W., Veeger C.* FEBS Letters, 1984, v. 166, № 1, p. 76.
145. *Haladjian J., Bianco P., Pilard R.* Electrochim. Acta, 1983, v. 28, № 12, p. 1823.
146. *Albery W. J., Eddowes M. J., Hill H. A. O., Hillman A. R.* J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 13, p. 3904.
147. *Cenas N. K., Pocius A. K., Kulys J. J.* Bioelectrochem. Bioenerg. 1983, v. 11, № 1, p. 61.
148. *Ianniello R. M., Lindsay T. J., Yacynych A. M.* Analyt. Chem., 1982, v. 54, № 7, p. 1098.
149. *Ianniello R. M., Lindsay T. J., Yacynych A. M.* Anal. Chim. Acta, 1982, v. 141, p. 23.
150. *Bosshard H. R., Banziger J., Hasler T., Poulos T. L.* J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 9, p. 5683.
151. *Churg A. K., Weiss R. M., Warshel A., Takano T.* J. Phys. Chem., 1983, v. 87, № 10, p. 1683.
152. *Кришталик Л. И., Харкац Ю. И.* Биофизика, 1984, т. 29, № 1, с. 19.
153. *Лихтенштейн Г. И.* Успехи биологической химии, 1982, т. 23, с. 3.
154. *Larsson S.* J. Chem. Soc., Faraday Trans. II, 1983, v. 79, p. 1375.

Институт биохимии
АН ЛитССР, Вильнюс