

3.6. КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕСТРОЙКИ БЕЛКОВ

Известно, что нативная, трехмерная структура белка устанавливается в результате действия целого ряда энергетических и энтропийных факторов. Характерные времена многих внутримолекулярных изменений, в том числе и ферментативных процессов, не превышают 10^{-2} — 10^{-3} с и зависят от pH, температуры и ионного состава среды. Таким образом, изменения ионного гомеостаза могут непосредственно влиять на структурные изменения в клеточных белках и соответственно на их функции и активность. Рассмотрим в качестве примера конформационные перестройки белков, переносящих кислород, — гемоглобина и миоглобина. Строение этих белков, находящихся в кристаллической форме, детально изучено методом рентгеноструктурного анализа. Пространство между α -спиральными участками, в том числе полость активного центра гемовой группы внутри молекул белка, заполнено гидрофобными боковыми цепями аминокислот, а в окружающую водную среду выступает множество полярных боковых цепей. Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц (две α и две β), образующих правильный тетрамер. Молекулы воды, локализованные в области контактов субъединиц, образуют солевые мостики и дополнительно стабилизируют тетрамер. Железо может находиться в высоко- и низкоспиновом состоянии в зависимости от способа заполнения d -орбитали электронами, который определяется правилами Хунда. В связи с этим заполнение электронами внешних d -орбиталей ионов двух- и трехвалентного железа характерно для свободных ионов или ионов в составе соединений с ионной связью. Ситуация меняется, когда атомы железа находятся в комплексе, где связаны лигандными атомами ковалентной связью и входят в состав гема. Следует подчеркнуть, что спиновое состояние центрального атома в комплексе определяется характером лигандного окружения: симметрией, силой связывания лигандов в комплексе и т. д. В силу этого изменения в лигандном окружении могут приводить к изменениям в спиновом состоянии иона металла, что в свою очередь может вызвать изменения конформации белка, с которым связан ион металла. Изменения спинового состояния ионов железа, индуцированные присоединением субстратов, сменой температуры, были продемонстрированы для ряда гемопротейнов. Переход иона железа из низкоспинового состояния в высокоспиновое увеличивает диаметр иона и приводит к выходу его из плоскости гема, что обуславливает и конформационные изменения в ближайшем «белковом» окружении гема.

В высокоспиновом состоянии Fe^{2+} обладает координационным числом 5 и расположен вне плоскости гема на расстоянии 0,05 — 0,07 нм. Он координационно связан с четырьмя атомами азота пиррольных групп плоского порфиринового кольца, а в 5-м положении взаимодействует с атомом N имидазольного кольца гистидина. Оксигенация и

образование связи кислород — железо не меняют валентности атома железа, но переводят его из высокоспинового состояния в низкоспиловое, увеличивая число лигандов в координационной сфере до 6. В 6-м положении железо координируется с кислородом или другими лигандами.

Присоединение кислорода индуцирует ряд конформационных изменений в молекуле гемоглобина. Связывание кислорода с переводом атома железа в низкоспиновое состояние сопровождается одновременным смещением железа на 0,07 нм в плоскость гемовой группы. Это смещение передается через гистидин, и спираль вместе с ним «подтягивается» в сторону гема к центру молекулы, выталкивая из полости остаток тирозина. Затем происходят поэтапный разрыв солевых мостиков между α -субъединицами и смещение их вдоль области контакта. Расстояние между гемом и α -субъединицами увеличивается, а между гемом и β -субъединицами, наоборот, сокращается. Центральная полость гема при этом сжимается. Разрыв шести солевых мостиков и освобождение протонов (эффект Бора) характерны для этих конформационных изменений гемоглобина. В целом оксигенация переводит каждую из субъединиц из дезокси- в оксиконформацию. Разрыв четырех солевых мостиков из шести при оксигенации первых двух α -субъединиц способствует разрыву двух остальных мостиков и, следовательно, облегчает соединение следующих молекул кислорода с остальными субъединицами, увеличивая сродство их к кислороду в несколько сотен раз. В этом и состоит кооперативный характер присоединения кислорода к гемоглобину, при котором начало оксигенации последнего облегчает связывание остальных молекул кислорода.

Использование лазерного излучения с длиной волны поглощения в диапазоне β -полосы порфирина и вблизи нее позволяет регистрировать спектры РКР протопорфиринов в целых клетках (эритроцитах). В этих спектрах доминируют линии, лежащие в области 1 000 — 1 650 см^{-1} , которые обусловлены плоскостными колебаниями связей C—C и C—N и деформационными колебаниями C—N. Некоторые из них подвержены влиянию химических превращений, происходящих с атомом железа, и могут быть использованы для изучения структуры макроцикла. При изменении состояния окисления атома железа от Fe(III) к Fe(II) наблюдается снижение частоты некоторых скелетных колебаний порфирина. Положение этой и других характерных полос спектра РКР отражает заселенность электронами π -орбиталей порфирина. С ее увеличением связи в порфирине становятся менее прочными, что выражается в снижении частоты колебаний. Заселенность π -орбиталей порфирина возрастает за счет обратного перехода электронов с π -орбиталей атома железа. Поскольку процесс сильнее выражен для Fe(II), чем для Fe(III), полосы, характеризующие состояние окисления, сдвинуты в область более низких частот для гемов с Fe(II). При таком подходе любой эффект (в том числе изменения состояния окисленности атомов железа), который вызывает изменения в распре-

делении электронов на π -орбиталях порфирина, может повлиять на частоту соответствующих характеристических линий. Эта частота сильно меняется, например, если аксиальный лиганд, имеющий π -орбиталь, может взаимодействовать с орбиталями порфиринов через $d\pi$ -электроны атома железа. Аксиальный π -электронный донор приводит к дополнительному переходу $d\pi$ -электронов атома железа на π -орбитали порфирина и вызывает снижение частоты полос, характеризующих состояние окисления, до «нетипичных» величин.

3.7. СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ КЛЕТОК

Живые организмы, их ткани и клетки при активном делении способны излучать УФ-фотоны, обладающие митогенетическим эффектом. Это было установлено в 1920 – 1930-е гг. русским ученым А. Г. Гурвичем и его сподвижниками, которые для обнаружения данного излучения применяли биотесты. Значительно позже в нескольких независимых лабораториях с использованием ФЭУ были обнаружены источники слабого УФ-излучения в диапазоне длин волн от 250 до 380 нм (культуры дрожжей, кишечной палочки, микроспорозиты). Трудности изучения этого эффекта связаны с тем, что УФ-излучение биологических объектов зависит от поглощения ими видимого света, а регистрация излучения с помощью ФЭУ требует помещения объекта в полную темноту. В связи с этим для большей надежности выявления слабого УФ-свечения у биологических объектов необходимы строгие требования «слепоты» ультрафиолетового ФЭУ к видимой области спектра, а такие детекторы не использовались в этих работах. В настоящее время существуют ФЭУ, не чувствительные к свету с длинами волн по крайней мере более 365 нм.

Сейчас уже нет сомнений в том, что некоторые ткани и клетки живых организмов способны излучать более длинноволновый свет, чем УФ, невидимый невооруженным глазом, но тем не менее информирующий о некоторых важных окислительно-восстановительных реакциях в клетках, обязательными участниками которых являются активные формы кислорода и другие свободные радикалы, приводящие к образованию электронно-возбужденных продуктов. Впервые достоверное сверхслабое излучение живой ткани в видимом диапазоне спектра обнаружено в 1954 г. Л. Колли с соавторами. Они зарегистрировали слабую люминесценцию (несколько сот импульсов в секунду) от экстрактов различных частей растений. Однако лишь в конце 1950-х гг. Б. Н. Гарусовым были проведены первые систематические исследования ССИ живых объектов с помощью высокочувствительных установок с применением ФЭУ. Было обнаружено ССИ широкого круга интактных органов, изолированных клеток, тканевых гомогенатов позвоночных и беспозвоночных животных, растений и ряда реакций в