

натяжение, что накладывает жесткие ограничения на первичную структуру цепи.

Работы [1, 178] имеют принципиальное значение для физики белка. Статистико-термодинамический анализ, основанный на учете линейной памяти в цепи, объясняет общие свойства белковых глобул. Необходимо дальнейшее развитие этих идей применительно к гетерополимерным цепям. В то же время решение проблемы самоорганизации глобулы требует исследования и кинетических факторов. По-видимому, для надежной самоорганизации в длинной цепи необходимо, чтобы кинетические и термодинамические требования совпадали, т. е. чтобы энергетически оптимальная конформация цепи обладала простейшей топологией и была кинетически достижимой.

§ 4.8. ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ

Как уже указывалось выше (см. стр. 223), сравнительно мягкие воздействия на белок, не разрывающие пептидных связей, могут привести к утрате биологической функциональности — происходит *денатурация* белка. Она может быть вызвана нагреванием, механическим воздействием (ультразвук), изменением рН, действием различных химических агентов (например, мочевины). Денатурация состоит в разрушении пространственной структуры белковых молекул при сохранении первичной структуры цепей. Денатурированная молекула белка оказывается в состоянии статистического клубка с ограничениями, налагаемыми дисульфидными связями, или без них. Для глобулярных белков процесс денатурации сводится к переходу глобула — клубок.

Изучение денатурации дает информацию о природе и устойчивости нативной структуры. Интерпретация экспериментальных данных трудна, так как взаимодействия внутри глобулы и на ее поверхности многообразны, а параметры перехода имеют суммарный характер.

Глобула имеет фиксированную компактную структуру, она является аperiодическим кристаллом. Переход глобула — клубок отличен от переходов α -спираль — клубок и β -форма — клубок, так как он происходит в трехмерной системе. Кооперативность перехода определяется не только взаимодействиями между соседними звеньями данной цепи, но и взаимодействиями других пространственно сближенных участков цепи или цепей. Кооперативность глобулы определяется не только взаимодействиями (водородные связи и т. д.), но и геометрическими факторами упаковки [2].

На рис. 4.24 показаны результаты исследования термической денатурации глобулярного белка химотрипсिनогена, полученные

Брандтсом и др. [125, 126]. Переход выражается в изменении коэффициента экстинкции ϵ при 2930 Å. Процесс обратим, и кривые являются равновесными. Такой переход типичен для глобулярных белков. Интервал температур, при которых он происходит, составляет около 10 °С. Сходство с переходом спираль — клубок, однако, обманчиво. Внимательный анализ зависимости степени денатурации от температуры показывает, что конечную ширину интервала, в котором происходит переход, нельзя объяснить наличием частично денатурированных молекул, находящихся в равновесии с нативными и с полностью

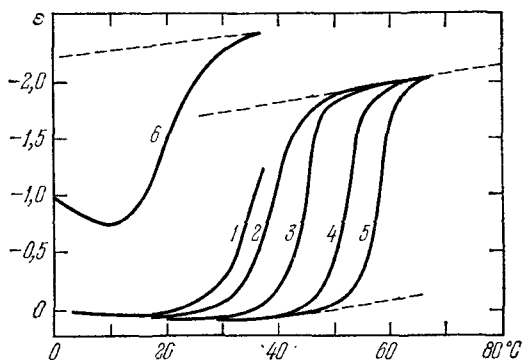


Рис. 4.24. Зависимость коэффициента экстинкции при 2930 Å раствора химо-трипсिनогена от температуры.

Цифры у кривых указывают значения pH. Нижняя пунктирная кривая соответствует нативной форме, верхние — денатурированной.

денатурированными. Переход происходит одноступенчато и в этом смысле подобен фазовому переходу первого рода [127].

Калориметрические исследования дают прямую информацию о термодинамических характеристиках денатурационных переходов. Привалов показал, что поглощение тепла при нагревании некоторых глобулярных белков (альбумины, миоглобин, химо-трипсिनоген, рибонуклеаза) идет в две стадии. Первая стадия — предденатурационная, характеризуемая некоторым увеличением теплоемкости без скачкообразного изменения энтальпии, и вторая — собственно денатурация, фазовый переход [128]. Энтальпия денатурации сильно зависит от pH среды, о чем свидетельствует, например, табл. 4.14.

Пространственное строение исследованных белков известно, и можно подсчитать энтальпию денатурации, приходящуюся на моль водородных связей. Для всех трех белков эта величина составляет 1,4—1,5 ккал/моль связей. Отсюда Привалов делает вывод об определяющем значении водородных связей в процессе

денатурации. Такой вывод нельзя считать окончательным — он опирается на ограниченный материал и не согласуется с общими представлениями о структуре глобулы.

Таблица 4.14

Температуры и энтальпии денатурации в ккал/моль белка при разных значениях pH

| Химотрипсиноген | | | Рибонуклеаза | | | Миоглобин | | |
|-----------------|--------------------------|------------|--------------|--------------------------|------------|-----------|--------------------------|------------|
| pH | $T_{пл}, ^\circ\text{C}$ | ΔH | pH | $T_{пл}, ^\circ\text{C}$ | ΔH | pH | $T_{пл}, ^\circ\text{C}$ | ΔH |
| 2,3 | 43 | 78 | 2,4 | 34 | 52 | 12,2 | 50 | 73 |
| 2,6 | 49 | 102 | 3,3 | 47 | 66 | 12,0 | 54 | 80 |
| 2,8 | 51 | 110 | 3,7 | 50 | 73 | 11,5 | 63 | 100 |
| 3,4 | 58 | 130 | 4,4 | 54 | 77 | 11,3 | 67 | 117 |
| 4,0 | 61 | 140 | 6,0 | 59 | 89 | 11,0 | 72 | 134 |
| 5,0 | 62 | 148 | | | | 10,7 | 78 | 170 |

Многостадийная денатурация наблюдается в ряде случаев (например, денатурация парамиозина гуанидинхлоридом [129]). Идентификация промежуточных состояний и истолкование многостадийного процесса встречаются с большими трудностями.

Характерные значения термодинамических параметров денатурации приведены в табл. 4.15 [130].

Таблица 4.15

Типичные значения термодинамических параметров денатурации¹⁾

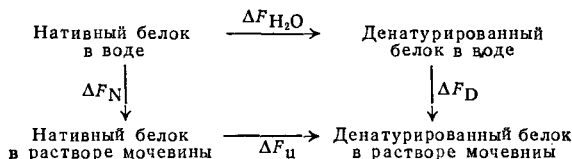
| Белок | Денатурирующий агент | $\Delta F,$ ккал \times \times моль ⁻¹ | $\Delta H,$ ккал \times \times моль ⁻¹ | $\frac{\Delta S}{T^*},$ ккал \times \times моль ⁻¹ \times \times град ⁻¹ | $\frac{\Delta c_p}{T^*},$ ккал \times \times моль ⁻¹ \times \times град ⁻¹ | $T^*, ^\circ\text{C}$ |
|--|----------------------|---|---|---|---|-----------------------|
| Рибонуклеаза pH 2,5 | Нагревание | 0,9 | 57 | 185 | 2000 | -9 |
| Химотрипсиноген pH 3,0, 0,01 M Cl | Нагревание | 7,3 | 39 | 105 | 2600 | 10 |
| Миоглобин pH 9,0 | Нагревание | 13,6 | 42 | 95 | 1400 | <0 |
| β -лактоглобулин pH 3,0, 25 $^\circ\text{C}$ | 5M мочевины | 0,6 | -21 | -72 | 2150 | 35 |

¹⁾ T^* — температура максимальной стабильности, при которой константа равновесия K_D процесса нативный белок \rightleftharpoons денатурированный белок минимальна. Если $T < T^*$, эта константа возрастает с уменьшением T , если $T > T^*$, она возрастает с увеличением T . Методы определения K_D описаны Тенфордом [130].

Остановимся, в частности, на методе определения разности свободных энергий денатурированного и нативного белка ΔF по денатурации в растворе мочевины, предложенном Тенфордом [131]. Имеем для этого процесса

$$-\Delta F_u = RT \ln K_u = RT \ln \frac{[D]}{[N]}, \quad (4,120)$$

где $[D]$ и $[N]$ — концентрации денатурированного и нативного белка. Нас интересуют значения ΔF_{H_2O} для водного раствора. Воспользуемся схемой



Тогда

$$\delta \Delta F = \Delta F_u - \Delta F_{H_2O} = \Delta F_D - \Delta F_N. \quad (4,121)$$

Величину $\delta \Delta F$ можно представить в виде

$$\delta \Delta F = \sum_i \alpha_i n_i \Delta F_i, \quad (4,122)$$

где n_i — число групп типа i в белке, ΔF_i — их вклад в свободную энергию перехода, α_i — численный параметр, зависящий от степени доступности растворителю групп данного типа в нативной конформации. Согласно Тенфорду, согласно с опытом получается, если принять для полярных групп $\alpha_i = 0,25$, для гидрофобных $\alpha_i = 0,75$ и для пептидных $\alpha_i = 0,50$. Величины ΔF_i находят из данных о растворимости аминокислот в воде и в растворе мочевины данной концентрации.

Пусть c_u^* — концентрация мочевины, при которой $[D] = [N]$, т. е. точка полуденатурации. Тогда, согласно (4,120), $\Delta F_u = 0$ и искомая величина равна

$$\Delta F_{H_2O} = -(\delta \Delta F)_{c_u^*} = -\sum_i \alpha_i n_i (\Delta F_i)_{c_u^*}. \quad (4,123)$$

Это — удобный и простой способ определения конформационной стабильности белка.

Изучение кинетики денатурации (в частности, с помощью релаксационных методов, см. § 7.7) позволяет определить активационные параметры переходов. Значения H^\ddagger обычно порядка 40—80 ккал/моль, S^\ddagger 40—200 э. е., F^\ddagger 20—25 ккал/моль [132].

Свободная энергия денатурации ΔF должна быть суммой многих вкладов. Согласно [133]

$$\Delta F = \Delta F_a + \Delta F_H + \Delta F_{np} + \Delta F_e + \Delta F_u + \Delta F_x + \dots, \quad (4,124)$$

где ΔF_a определяется раскручиванием α -спиралей, ΔF_H — разрывами водородных связей между белковыми цепями соседних макромолекул, ΔF_{np} — изменением гидрофобных взаимодействий, ΔF_e — изменением электростатических взаимодействий, ΔF_u — набуханием образовавшегося клубка, ΔF_x — разрывом поперечных связей между спиральями, существующими в кристаллической фазе. ΔF_a и ΔF_x не зависят от pH, остальные члены, связанные с присутствием ионизируемых групп, от pH зависят. Имеем

$$\Delta F_a = (N - 4) \Delta H_0 - (N - 1) T \Delta S_0, \quad (4,125)$$

где N — число звеньев в α -спирали, ΔH_0 и ΔS_0 — изменения энтальпии и энтропии на звено бесконечно длинной цепи при переходе спираль — клубок. Цепь, состоящая из N звеньев, имеет в α -спиральной форме $N - 4$ водородных связей, ограничивающих подвижность $N - 1$ звеньев. Из (4,125) следует, что α -спираль устойчива, т. е. $\Delta F_a > 0$, лишь если N достаточно велико.

$$\Delta F_H = -kT \sum_{i,j} \ln(1 - x_{ij}), \quad (4,126)$$

где x_{ij} — доля молекул с водородной связью между группами i и j , равная

$$x_{ij} = \frac{K_{ij}}{1 + K_{ij} + K_i/[H^+] + [H^+]/K_j}; \quad (4,127)$$

здесь K_{ij} — константа равновесия для образования связи между i и j , K_i и K_j — константы ионизации для донорных и акцепторных групп, не имеющих водородных связей.

$$\Delta F_u = -2pkT \ln(1 + Kc) \quad (4,128)$$

(K — константа равновесия для взаимодействия NH- или CO-групп белка с малыми молекулами в растворе). Так, мочевины $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ образует водородные связи с белком и способствует денатурации. В этом случае c — молярная концентрация мочевины, а p — число остатков «кристаллической» цепи, которые после разрушения спирали могут взаимодействовать с мочевиной. Конечно, молекулы воды также взаимодействуют с белком, но это взаимодействие уже учтено в ΔF_a , ΔF_H и ΔF_{np} . При малых c

$$\Delta F_u = -2pkTKc. \quad (4,129)$$

Член ΔF_x имеет чисто энтропийную природу. Он равен

$$\Delta F_x = -T \Delta S_x = \frac{3}{2} kT \nu (\ln n + 3), \quad (4,130)$$

где ν — число спиралей, соединенных поперечными связями, а n — число звеньев между поперечными связями.

Определение ΔF_{np} и ΔF_e представляет большие трудности. Есть основания считать эти члены относительно малыми (речь ведь идет не о ΔH и ΔS , а о ΔF).

По оценке Шеллмана [134], $\Delta H_0 = 1,5$ ккал/моль, $\Delta S_0 = 4,2$ э. е. Величина ΔH_0 значительно меньше обычных энергий водородных связей; она равна разности энергий групп, соединенных внутримолекулярными и межмолекулярными водородными связями. Оценка Привалова близка к приведенной [123].

При больших N

$$\Delta F_a \approx N (\Delta H_0 - T \Delta S_0), \quad (4,131)$$

и при $T = 300^\circ \text{K}$ $\Delta F_a \approx N (1500 - 1260) = 240 N$ ккал/моль, что меньше RT . В присутствии мочевины ΔF_u отрицательно, т. е. стабильность нативного белка уменьшается. Напротив, изменение гидрофобных взаимодействий (ΔF_{np}) ее увеличивает. Если белок не имеет побочных водородных или гидрофобных связей, то температура перехода находится из условия

$$\Delta F = (N - 4) \Delta H_0 - (N - 1) T_{\text{пер}} \Delta S_0 - T_{\text{пер}} \Delta S_x = 0 \quad (4,132)$$

и

$$T_{\text{пер}} = \frac{(N - 4) \Delta H_0}{(N - 1) \Delta S_0 + \Delta S_x}. \quad (4,133)$$

Величина ΔS_x также пропорциональна N — чем длиннее цепь, тем больше поперечных связей она может образовать. Значит, $\nu \propto N$. Если $N \gg 1$, то $T_{\text{пер}}$ не зависит от N . Если известны ΔH_0 и ΔS_0 , то можно по $T_{\text{пер}}$ определить ΔS_x . ΔF_{np} оценивается в 0,5 ккал/моль. Значения ΔF_H и ΔF_e того же порядка.

Доля денатурированного материала равна

$$x = \frac{\exp(-\Delta F/kT)}{1 + \exp(-\Delta F/kT)}. \quad (4,134)$$

В точке перехода $\Delta F = 0$ и $x = 0,5$. В работе [102] проведено детальное рассмотрение водородных и гидрофобных связей в системе белок — вода. Количественные оценки ΔH , ΔS и ΔF согласуются с приведенными.

Острота термического денатурационного перехода характеризуется производной

$$\left(\frac{dx}{dT} \right)_{T_{\text{пер}}} = \frac{\Delta H}{4RT_{\text{пер}}^2}, \quad (4,135)$$

где

$$\Delta H = (N - 4) \Delta H_0 + \Delta H_H, \quad (4,136)$$

$$\Delta H_H = \sum x_{ij} \left[-\Delta H_{ij} + \frac{(K_1/[H^+]) \Delta H_1 - ([H^+]/K_2) \Delta H_2}{1 + K_1/[H^+] + [H^+]/K_2} \right]. \quad (4,137)$$

Входящие сюда величины x_{ij} определены уравнением (4,127), ΔH_{ij} — теплота образования водородной связи между группами i и j , ΔH_1 , ΔH_2 — теплоты ионизации, соответствующие константам равновесия K_1 и K_2 . $T_{\text{пер}}$ не зависит от степени кооперации спиральных участков. Напротив, острота перехода зависит от нее. Если переход выполняется одновременно r участками, то

$$\left(\frac{dx}{dT}\right)_{T_{\text{пер}}} = \frac{r \Delta H}{4RT_{\text{пер}}^2}. \quad (4,138)$$

Изложенные теоретические соображения в общем согласуются с опытом (см., например, [133]). Многочисленные экспериментальные данные, относящиеся к денатурации, приведены в монографии Жоли [132], а также в обзорах Тенфорда [130] и Брандтса [107], в которых содержится и теоретический анализ.

Из изложенного следует, что денатурацию можно рассматривать как процесс кооперативного перехода между двумя состояниями — нативным и денатурированным. Брандтс обосновал эту концепцию [107]. Оба наблюдаемых макроскопических состояния являются результатом усреднения по совокупностям микроскопических состояний. Теория перехода между двумя состояниями исходит из того, что любое микроскопическое состояние относится к нативному или к денатурированному макроскопическому состоянию или фигурирует в распределениях и для того, и для другого состояния. С помощью статистической суммы (4,85), где q дается (4,87), Брандтс вычислил изменение числа звеньев n , соединенных водородными связями, с температурой для «белка» с $N = 200$ (40% гидрофобных, 20% гидрофильных и 40% нейтральных остатков). Функция распределения микросостояний, характеризуемых числом водородных связей, оказывается отчетливо бимодальной. При изменении температуры от 20 до 50 °C резко уменьшаются вероятности состояний с $n \approx 200$ и одновременно резко увеличиваются вероятности состояний с $n \approx 0$.

Изучение денатурационных переходов дает информацию, с одной стороны, о степени стабильности нативного белка (изменение свободной энергии), с другой — о кооперативности взаимодействий в белке (острота перехода). Эти характеристики не обязательно коррелируют друг с другом.

Исследование денатурации, естественно, не раскрывает устройства «машины» — белковой глобулы. Денатурация означает разрушение этой машины. Тем не менее при таком разрушении мы получаем некоторые сведения об устойчивости внутренних связей, об электронно-конформационных взаимодействиях (ЭКВ) в белке (см. § 6.7).

Равновесная трактовка денатурационных явлений, строго говоря, применима лишь к обратимой денатурации. Наблюдаемая денатурация в большинстве случаев частично или полностью

необратима. Однако описан и ряд явлений обратимой денатурации. Если денатурация проводится в мягких условиях (например, в результате медленного и не очень значительного повышения температуры), то для ряда белков удается наблюдать *ренатурацию*, т. е. восстановление их нативных свойств и структуры при столь же мягком изменении денатурирующих факторов в обратную сторону.

Естественно, что полной обратимости денатурации следует ожидать для белков, не содержащих групп, вступающих в денатурированном состоянии в необратимые реакции (например, окисление S—H-групп) [101]). Так, доказана обратимость денатурации рибонуклеазы [135], такаамилазы А [136] и α -амилазы [136]. В работах Анфинсена и др. [137—140] показано, что можно добиться ренатурации белков и с разорванными дисульфидными связями. Из этих данных следует, что денатурацию действительно можно трактовать как термодинамический конформационный переход и что нативная структура белка отвечает если не глобальному, то относительному минимуму свободной энергии.

§ 4.9. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ЦЕПИ И ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ГЛОБУЛЫ

Проблема связи между первичной структурой полипептидной цепи и пространственным строением глобулы — одна из важнейших в физике белка. Биологически функциональна нативная пространственная структура макромолекулы, а генетически кодируется первичная структура. Если бы эта связь была неоднозначной, то пришлось бы пересмотреть основные положения молекулярной биологии. Приведенные выше факты, относящиеся к ренатурации белков, дают экспериментальное обоснование наличию такой связи, следующему из общетеоретических соображений (ср. § 9.7).

В ряде работ был проведен сравнительный анализ пространственной структуры белков, установленной рентгенографически, и их первичной структуры с целью определения аминокислотных остатков, преимущественно входящих в α -спиральные участки глобулы и не входящих в спирали, нарушающих спирализацию. Гуццо [141] провел разделение аминокислот на «спиральные» и «неспиральные», исходя из данных для гемоглобина и миоглобина (см. также [142]). Протеро [143] расширил эту классификацию, пользуясь данными для большего числа белков, и сформулировал критерий для длины сегментов, в которых должны фигурировать определенные классы аминокислот, обеспечивающих спиральность самих сегментов. Шиффер и Эдмунсон [144] предложили модель, описывающую спиралеобразование при