

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

различных относительных положениях аминокислотных остатков. Они предположили, что периодические скопления гидрофобных и гидрофильных участков, наблюдаемые в гемоглобине, миоглобине ([111], см. стр. 233) и в лизоциме [145], обеспечивают стабилизацию спиральных областей глобулы. Перити, Квальяротти и Ликуори [146] развили статистический метод предсказания вторичной структуры. Они определили частоты, с которыми появляются пары остатков, отстоящих друг от друга на 0, 1, ..., 5 остатков, в спиральных и неспиральных участках гемоглобина и миоглобина, и смогли предсказать спиральные участки в лизоциме.

В работах Птицына [147, 148] на основании статистического анализа аминокислотного состава и последовательности участков полипептидной цепи с различной вторичной структурой были предложены классификация аминокислот и метод предсказания вторичной структуры глобулярных белков по их первичной структуре. Оказалось возможным приписать каждой аминокислоте некоторую индивидуальную способность встраиваться в спиральные участки («спиральный потенциал»), в первом приближении не зависящую от ее соседей в цепи.

Это положение было обосновано в работе Котельчука и Шераги [149] на основе данных о конформационных энергиях. Они показали, что существенно взаимодействие с амидной группой бокового привеска аминокислоты на ее С-стороне. Это взаимодействие чаще не зависит от природы боковых привесков соседних аминокислот. В работе [149] сопоставлялись конформационные энергии каждого остатка в трех конформациях с наименьшей энергией (правая и левая спирали, антипараллельная β -форма), и было установлено, что остатки, у которых минимуму энергии отвечают правые спирали, являются «спиральными», а в остальных случаях спирализация не происходит. Пейн и Робсон [150] вычислили «спиральные потенциалы» аминокислот в предположении о существенной роли локальных взаимодействий боковых привесков с основной цепью.

Птицын и Финкельштейн [148] наряду со «спиральным потенциалом» оценивают « β -структурный потенциал» аминокислоты. Положительный «спиральный потенциал» можно приписать Ала, Лей, Мет, отрицательный — Асп, Цис, Сер, Тир, Тре и Гли, нулевой — остальным остаткам. Такое поведение аминокислот нетрудно объяснить [146, 147]. Аминокислотам с массивными углеводородными боковыми привесками (Иле, Лей, Фен) можно приписать большой положительный « β -структурный потенциал», аминокислотам с заряженными боковыми группами (Асп, Глу, Арг, Гис, Лиз), а также Про — большой отрицательный « β -потенциал». Остальным гидрофобным остаткам приписывается малый положительный « β -потенциал», полярным и Гли — малый

отрицательный « β -потенциал». На основании данных, относящихся к миоглобину, лизоциму, папаину и α -химотрипсину, была предсказана структура α - и β -цепей гемоглобина, рибонуклеазы А, субтилизина *BPN'* и фрагмента карбоксипептидазы. Согласно с опытом было получено для 74% аминокислот.

В работе Лима [151] реализован более содержательный подход к проблеме. Как уже сказано, раздельное рассмотрение вторичной и третичной структуры белка не имеет самостоятельного смысла — вторичная структура является элементом пространственной структуры глобулы, ею определяемым (см. стр. 220). Лим исходит из того, что глобула состоит из гидрофобного ядра и полярной оболочки. Целиком гидрофильные участки не могут образовать более одного витка спирали, так как спирализация препятствует взаимодействию с водой. Спирализуются лишь те гидрофильные участки, которые примыкают к спирали, «скрепленной» с ядром. Образование длинных спиралей возможно лишь из участков, содержащих гидрофобные боковые группы, которые входят в ядро. Целиком гидрофобные участки спиральны, если они находятся внутри глобулы. Смешанные участки спиральны, если гидрофильные остатки расположены на поверхности глобулы, а гидрофобные — внутри нее. Об этом свидетельствуют, в частности, результаты изучения гемоглобина (см. стр. 232). Для спиралей характерны «скобы», состоящие из гидрофобных остатков и находящиеся в положениях $i, i + 4$.

Оказывается целесообразным провести детальную классификацию остатков применительно к указанным их свойствам. Лим подразделяет остатки на малые (Гли, Ала), средние гидрофобные (Цис, Вал, Мет, Лей, Иле, Про), большие гидрофобные (Фен, Тир, Три), малые гидрофильные (Асп, Асн, Глу, Глн, Сер, Тре), большие гидрофильные (Лиз, Арг, Гис).

Сформулирован ряд правил (имеющих в конечном счете эмпирическое происхождение), определяющих участие или неучастие этих классов остатков в спиралах, и установлено разумное согласие со структурными данными для 12 белков. Существенное отличие работы [151] от других исследований состоит в рассмотрении дальних, а не локальных взаимодействий. Они оказываются определяющими.

Робсон и Пейн [152] попытались применить к рассмотрению этой проблемы теорию информации. Последовательность остатков в цепи и последовательность их конформаций в глобуле считаются двумя сообщениями, связанными трансляционным кодом. С помощью ЭВМ определялась «спиралеобразующая информация» для 11 белков. Пользуясь только информационными величинами для отдельных остатков, авторы предсказали спиральные участки. Некоторые несоответствия были устранены

внесением поправок, учитывающих количество информации в парах остатков.

Согласно [152] «спиралеобразующая информация», заключенная в отдельном остатке, выражается различием его энергий в спиральной и неспиральной структуре, зависящим от взаимодействия боковой группы с основной цепью.

Этот подход нельзя считать перспективным, так как он имеет формальный характер и, в сущности, не учитывает физику глобулы.

В работе Есиповой и Туманяна [153] исследована уже не спирализация, но непосредственная связь между первичной и пространственной структурами белка.

В качестве характеристики третичной структуры в работе [153] рассматриваются места поворотов (узловые точки) основной цепи. Иными словами, цепь аппроксимируют линией, находят участки максимальной кривизны этой линии и выясняют причины локальных изгибов цепи. Изгиб цепи определяется аминокислотами, входящими в поворот. Поворот цепи означает резкую смену значений двугранных углов ϕ и ψ (см. стр. 179). Для большинства аминокислот энергетически выгодны углы ϕ и ψ , отвечающие правой α -спирали. Но Сер, Асп, Три, Тир и Лиз характеризуются минимумами энергии в конформациях левой α -спирали и β -формы.

Наибольшей гибкостью обладает Гли. Этот остаток можно считать своего рода универсальным шарниром в молекуле белка. Можно думать также, что перегибы должны преимущественно происходить на негидрофобных остатках, в частности на Сер.

В работе [153] проведен анализ структуры лизоцима, химотрипсина, миоглобина, эластазы, рибонуклеазы, папаина и карбоксипептидазы. Указанные положения в целом подтвердились. Так, в лизоциме определено 17 поворотов цепи, причем в них входят практически все остатки Гли. Установлено, что наличие Гли является достаточным, но не необходимым условием резкого поворота. В семи поворотах из 16 в участках максимальной кривизны находятся Сер, Асп, Арг, Три. Эти же остатки соседствуют с «поворотными» остатками Гли. Аналогичные закономерности установлены для химотрипсина, эластазы, рибонуклеазы, папаина. Из 19 остатков Гли α -химотрипсина 17 располагаются в поворотных участках, в эластазе из 25 Гли 23 находятся в поворотах. Наряду с названными остатками в поворотах участвуют еще Тре, Асп, Лиз, Гли. Включение наряду с Гли одного из этих остатков, по-видимому, существенно для анализа поворотов. Для поворотов весьма важно также наличие водородных связей между боковым радикалом и основной цепью (Сер).

В целом надежные статистические оценки показывают, что в поворотах участвуют Гли, Сер, Асн, Арг. Менее точно установлено участие Тир, Тре и Асп. «Избегают» поворотов Лей, Вал, Ала и Иле. С меньшей достоверностью это относится к Фен, Про и Гис.

В белках с малой долей α -спиралей Гли, не находящийся в узловой точке, обычно соседствует с Вал и Иле. Напротив, в миоглобине Гли обычно соседствует с Глу и Ала, стабилизирующими α -спираль. Тем самым, наличие такого Гли не может препятствовать появлению спирали и образованию поворотов. С другой стороны, Гли в миоглобине и сходных белках обеспечивает контакты между α -спиральными сегментами, так как в местах нахождения Гли в спирали появляются выемки, удобные для упаковки. Поэтому третичная структура стабилизирует α -спирали, содержащие Гли.

Таким образом, третичную структуру белка можно моделировать совокупностью приблизительно прямолинейных сегментов, соединенных поворотными шарнирными участками. Так называемые «неупорядоченные» сегменты задают важнейшие элементы пространственной структуры.

Укажем другие работы [179, 180], посвященные той же проблеме. Птицын впервые подошел к проблеме связи между первичной и пространственной структурами белковой глобулы, исходя из физической гипотезы о формировании глобулы во времени [181]. Предполагается, что самоорганизация глобулы есть результат некоего направленного процесса. Опыты по ренатурации показывают, что программа безошибочной самоорганизации закодирована в самой первичной структуре. Самоорганизация происходит стадийно так, что на каждой следующей стадии формируется все более сложная и все менее флуктуирующая структура. На данной стадии образуется флуктуирующий зародыш следующей стадии. Таким образом, нативная структура белковой молекулы строится из отдельных структурированных участков цепи, как из блоков, образование которых предшествует во времени формированию самой структуры. Организация, достигнутая на предшествующей стадии, не изменяется, но лишь стабилизируется на следующей стадии.

Согласно Птицыну, на первой стадии в развернутой белковой цепи образуются флуктуирующие зародыши спиральных участков, участков с вытянутой структурой, а также изгибов и петель цепи, стабилизированные только локальными взаимодействиями. На второй стадии одна или несколько пар зародышей объединяются, образуя комплексы из двух соседних α -спиралей или β -структурные «шпильки», которые могут служить центрами кристаллизации третичной структуры белка. На третьей стадии происходит рост центров кристаллизации за счет присоединения

к ним соседних участков цепи и дальнейшая стабилизация структуры. На четвертой стадии образуется единая компактная структура глобулы путем роста одного центра кристаллизации или объединения нескольких центров. Наконец, путем локальной подстройки образуется нативная структура глобулы.

Количественная разработка этой привлекательной гипотезы позволила подойти к анализу путей самоорганизации белков, в частности миоглобина [182]. Теория предсказывает положение зародышей пяти длинных и двух коротких спиральных участков в цепи. Проведены грубые расчеты конформационных энергий системы на стадиях образования центров кристаллизации. Последовательный анализ позволил найти простанственную структуру миоглобина, хорошо согласующуюся с опытом.

Дальнейшее развитие теории требует уточнения количественных оценок и рассмотрения кинетики самоорганизации. Экспериментальный подход к проблеме состоит в изучении кинетики ренатурации белков при постоянных внешних условиях. Сведения о термодинамически устойчивых стадиях ренатурации при изменяющихся внешних условиях можно получить с помощью ядерного магнитного резонанса (см. § 5.10).

§ 4.10. ФИБРИЛЛЯРНЫЕ БЕЛКИ

Все рассказанное в этой главе относилось к глобулярным белкам со свойственным им многообразием структур и функций. Гораздо менее разнообразные фибриллярные белки характеризуются специфическими особенностями строения и выполняют специальные функции. Это — структурные и сократительные белки. Первые играют роль опорных и защитных компонент, входя в состав сухожилий, хрящей, костей, связок и т. д. (коллагены), а также эпидермиса, волос, шерсти, рогов и т. д. (кератины). Вторые входят в состав рабочих веществ механохимических систем, в частности мышц (миозин).

В отличие от большинства глобулярных белков, фибриллярные, волокнообразующие, белки функционируют не в растворе, т. е. не в цитоплазме клеток, но образуют надмолекулярные тканевые системы. Выполнение структурной функции требует особой точности построения, регулярности структуры на всех уровнях, начиная с первичной.

Кожа животного содержит коллаген (в дерме) и кератин (в эпидермисе). При экстрагировании соединительной ткани холодными растворами солей, разбавленными уксусной кислотой (рН 3,9), а также растворами щелочей часть коллагена переходит в раствор. Эти растворяющиеся молекулы при любом способе экстракции практически идентичны. Часть коллагена, растворимую в кислоте, принято называть проколлагеном.