

длины неполярных кластеров в беспорядочных последовательно-остатках, состоящих из равных чисел полярных и неполярных остатков, с непрерывными гидрофобными поверхностями в α -спиральных и β -структурных состояниях соответственно. Такое же хорошее согласие получается для α -, β - и $\beta\alpha\beta$ -кластеров.

«Редактирование», происходящее в процессе эволюции, затрагивает биологически функциональную часть глобулы, ее активный центр. Активный центр белка-фермента включен в каркас, обладающий некоторой конформационной подвижностью. Точная структура каркаса не играет определяющей роли. Поэтому структура белка как целого мало связана с его функцией. Это создает важные возможности для белковой инженерии, для искусственного построения белков, применимых в биоэлектронике. Первые шаги в этом направлении уже сделаны. Так, синтезирован *Felix* — искусственный белок, содержащий четыре α -спирали (*Four helices*).

Приведенные факты имеют непосредственное отношение к биологической эволюции на молекулярном уровне, о которой пойдет речь в § 17.7. Забегая вперед, укажем, что вырождение соответствия первичной и пространственной структуры, равно как только что указанная статистичность, являются вескими свидетельствами в пользу *нейтралистской теории* молекулярной эволюции, развитой Кимурой.

§ 4.7. Структура и устойчивость глобулы

Пространственное строение и динамические свойства белковых глобул изучаются теоретически и при помощи ряда экспериментальных методов. Наиболее детальную информацию дает рентгеноструктурный анализ. Более простые методы оптики, оптической спектроскопии, спектроскопии ЯМР и ЭПР, а также γ -спектроскопии дают сведения о долях остатков, находящихся в α - и β -структурах, о внутриглобулярной подвижности и т. д. Эти методы охарактеризованы в следующей главе.

Косвенная информация о подвижности в глобуле может быть получена путем изучения *дейтерообмена* (обмена атомов H белка в тяжелой воде на атомы D). Более подвижные и менее прочно соединенные водородными связями атомы H легче обмениваются.

Поведение белка при денатурации, а также в ходе *протеолиза* определяется устойчивостью глобулы. Изучение денатурации проводится с помощью оптических и калориметрических методов. *Микрокалориметрия* — метод исследования суммарных свойств вещества, в частности, температурного хода теплоемкости.

Интересные сведения о структуре и динамических свойствах белков дает изучение скорости распространения *ультразвука* и его поглощения в водных растворах белков, а также белков в твердом состоянии. Применяется широкий диапазон частот — от 0,1 до 100 кГц. Такого рода исследования позволяют определять модули упругости глобулы (модуль Юнга имеет значение

2—9 ГН · м⁻²), изучать межмолекулярные взаимодействия, гидратацию и денатурацию глобулы. Акустические методы с успехом применяются и при изучении нуклеиновых кислот.

В качестве примеров глобулярных белков рассмотрим миоглобин (Mb) и гемоглобин (Hb). Структура этих белков была детально исследована методами рентгенографии (Mb — Кендрью,

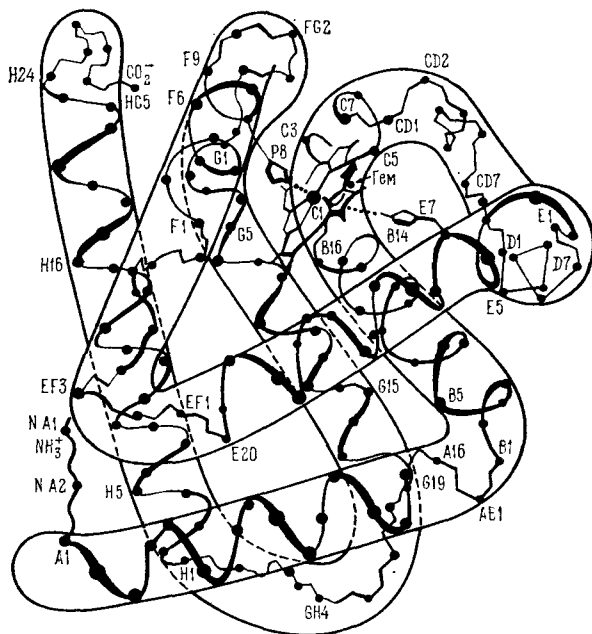


Рис. 4.17. Структура миоглобина

Hb — Перутц). На рис. 4.17 изображено строение Mb. Молекула, содержащая простетическую группу гема (указана стрелкой, ср. с. 50, 111), построена из восьми α -спиральных участков, прерываемых неупорядоченными. Примерно 75% общего числа 153 остатков принадлежит этим участкам, обозначаемым буквами от А до Н (считая от N-конца цепи); внутри каждого α -спирального участка остатки нумеруются от 1 до n . Межспиральные, неупорядоченные участки обозначаются АВ, CD и т. д., концевые участки — NA и HC—. В отличие от Mb, молекула Hb имеет четвертичную структуру: она состоит из четырех свернутых в глобулы цепей — двух цепей, обозначаемых α , и двух цепей β . Структура α - и β -глобул сходна, но не совпадает со структурой Mb.

Детальный анализ структуры Mb и Hb показывает, что «сердцевины» их глобул действительно заполнены плотно упакованными неполярными боковыми привесками R аминокислотных остатков. Число внутренних остатков в каждой из четырех субъединиц Hb равно 36. Многие остатки Гли и Ала, будучи слабо гидро-

фобными, располагаются на поверхности молекулы. Некоторые объемистые неполярные боковые цепи, не находящиеся внутри глобулы, спрятаны в выемке вблизи поверхности, что сводит к минимуму их контакты с водой. Все привески, ионизуемые при нейтральном рН, находятся на поверхности глобулы. То же справедливо для других полярных боковых цепей, за исключением связанных с гемом Гис и Тре С4, которые соединены водородной связью. В целом в Mb из 77 полярных групп только 5—6 расположены внутри глобулы, остальные находятся на ее поверхности. Изучение гемоглобинов различных видов позвоночных и миоглобинов кашалота и человека показало, что при замещениях 33 внутренних остатков сохраняется их неполярный характер. На поверхности глобулы имеется лишь 10 инвариантно неполярных остатков. Анализ α -спиральных участков А, В, Е, G, H свидетельствует о периодическом расположении в них неполярных остатков. На одной стороне α -спирали расположены гидрофобные

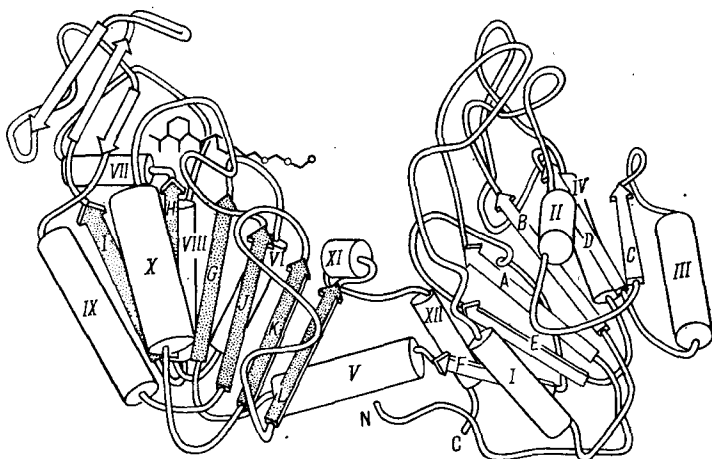


Рис. 4.18. Структура фосфоглицераткиназы

остатки, на другой — преимущественно гидрофильные. Гидрофобная сторона ориентирована к ядру глобулы.

Наиболее важная роль в эволюции принадлежит всего лишь пяти остаткам в нативном центре Нв. Именно замены этих остатков имеют эволюционное значение (Перутц).

Таким образом, гидрофобные взаимодействия особенно существенны при самосборке глобулы. Вторичная структура также определяется этими взаимодействиями.

Миоглобин и другие глобины не содержат отдельных областей — доменов — в глобуле. Многие белки имеют *доменную структуру*. На рис. 4.18 показано строение фермента фосфоглицераткиназы. Глобула состоит из двух доменов. Цилиндры I—XII — α -спирали, стрелы А — L — β -участки.

Взаимное расположение α -спиралей и β -лент в белковых глобулах имеет ограниченные топологические возможности. Левитт и Чотга выделяют четыре основных типа. Во-первых, α -белки,

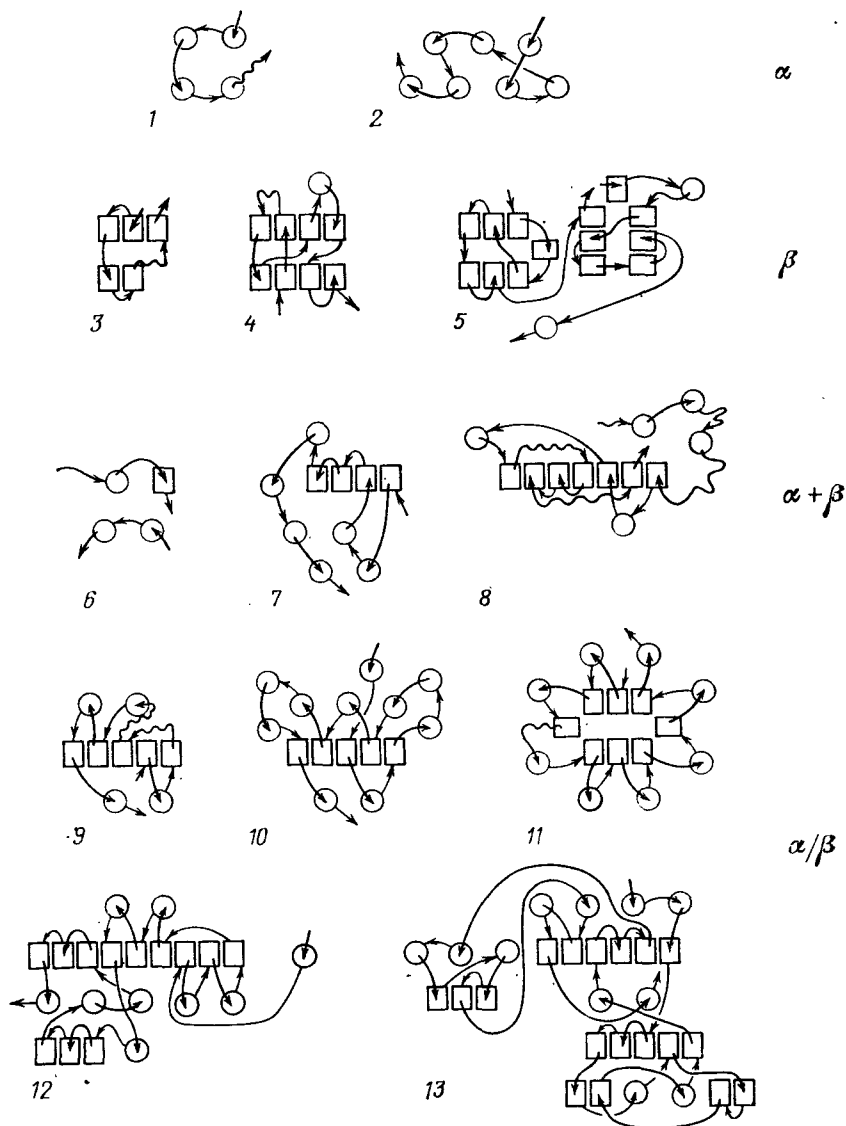


Рис. 4.19. Схемы строения белков

состоящие из α -спиралей, содержащие обычно два слоя таких элементов (глобина, гемаритрин). Во-вторых, β -белки, лишённые α -спиралей, содержащие обычно два β -слоя (рубредоксин, химо-

трипсин и др.). В-третьих, $\alpha + \beta$ -белки, в которых α - и β -участки перемешаны (рибонуклеаза, термолизин). Эти белки также обычно двухслойные. И в-четвертых, α/β -белки, в которых α - и β -участки отделены друг от друга. Чаще всего они имеют сэндвичевую $\alpha\beta$ -структуру. На рис. 4.19 показаны схемы строения различных

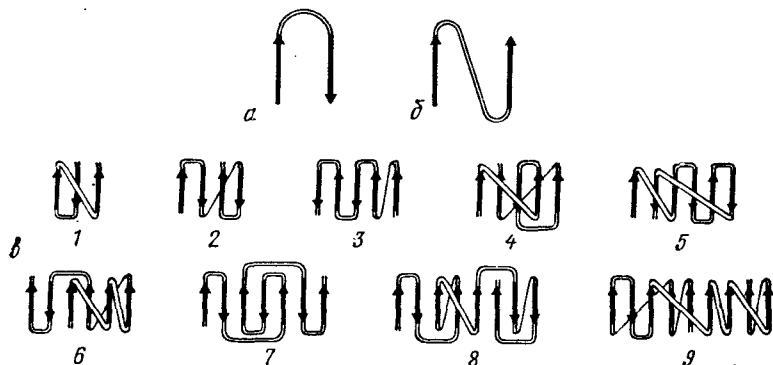


Рис. 4.20. Топология β -форм в белках

белков, отвечающие перечисленным вариантам (α -спирали показаны кружками, β -цепи — квадратами). Оси α -спиралей не обязательно параллельны друг другу. На рис. 4.20 показаны элементы β -структур: *a* — «шпилька», *b* — «параллельная шпилька», а также топологически различные их комбинации в глобулах (*a*). Ричардсон показала, что соответствующие геометрические мотивы подобны орнаментам на античных вазах.

Не только гидрофобные, но и электростатические солевые связи в белках стабилизируются водным окружением, так как при их образовании освобождаются ориентированные молекулы воды, окружающие заряженные группы. Тем самым возникновение солевой связи сопровождается увеличением энтропии воды. Этот выигрыш в свободной энергии более значителен, чем определяемый электростатическим притяжением зарядов. Однако воздействие воды на солевую связь отлично от гидрофобного — солевые связи усиливаются, а гидрофобные ослабевают при добавлении неводных растворителей.

Кажущаяся плотность белков в воде выше, чем их сухая плотность в органических растворителях. Это возрастание плотности вызывается *электрострикцией* связанной воды. Молекулы воды связываются на поверхности глобулы, а также внутри нее — между доменами химотрипсина, например, или между субъединицами белка, обладающего четвертичной структурой. Количество связанной воды, в которую не могут проникать электролиты, составляет около 0,3 г на 1 г белка, т. е. примерно 100 молекул H_2O на белок с м. м. 6000. Непроникновение электролитов в связанную воду определяется электростатическими эффектами. Рассмотрим заряд *e*, погруженный в растворитель с высокой диэлект-

рической проницаемостью ϵ_0 , под которым расположен слой вещества с малой диэлектрической проницаемостью ϵ_p . В этом слое возникает индуцированный заряд, равный

$$e' = e \frac{\epsilon_0 - \epsilon_p}{\epsilon_0 + \epsilon_p}. \quad (4.42)$$

Соответственно энергия заряда e на расстоянии r от неполярного слоя равна

$$E = \frac{ee'}{2\epsilon_0 r} = \frac{\epsilon_0 - \epsilon_p}{\epsilon_0 + \epsilon_p} \frac{e^2}{2\epsilon_0 r}. \quad (4.43)$$

Если $\epsilon_0 = 81$, $\epsilon_p \approx 5$, то $E = \kappa T$ при $r = 0,3$ нм, т. е. ионы не могут проникнуть в слой воды толщиной примерно в одну молекулу, находящийся на белке.

Разрушение нативной глобулы — денатурация белка — отличается от перехода глобула — клубок, описанного в § 3.5. Гетерополимерный статистический клубок является лишь конечным, отдаленным результатом денатурации. Белковая цепь сравнительно коротка, глобула не имеет флуктуирующей «опушки». Превращение такой глобулы в клубок должно быть фазовым переходом второго рода. Однако при термической денатурации белка наблюдаются разрывы, энтальпии и энтропии — ΔH и ΔS . Характерные значения для разностей ΔH и $T\Delta S$ порядка 400 кДж/моль.

Наблюдаемый с помощью сканирующей микрокалориметрии фазовый переход первого рода при денатурации является не переходом глобула — клубок (подобным переходу жидкость — газ), а переходом от нативной к «расплавленной» глобуле (подобным

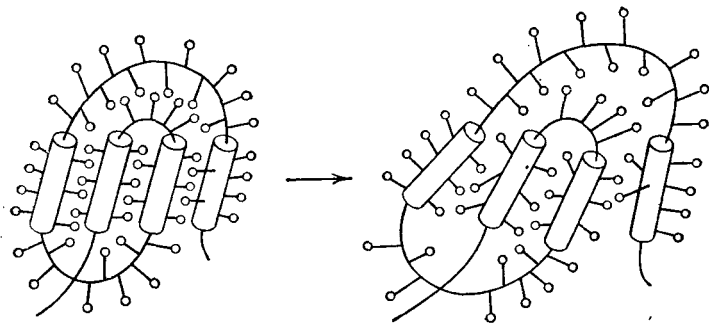


Рис. 4.21. Схема «плавления» белковой глобулы: слева — плотно упакованная глобула, справа — расплавленная глобула

переходу кристалл — жидкость). Схема такого перехода показана на рис. 4.21. Слабые связи разрушены, но глобула в целом сохраняется (Привалов, Птицын).

На рис. 4.22 показаны результаты спектроскопического изучения термической денатурации химотрипсिनогена. При переходе

происходит изменение коэффициента поглощения света при 293 нм. Процесс обратим, кривые являются равновесными. Интервал перехода порядка 10°С.

Энтальпия и температура денатурации белка сильно зависят от рН среды, что свидетельствует о существенной роли электростатических эффектов. Так, например, миоглобин при рН 12,2

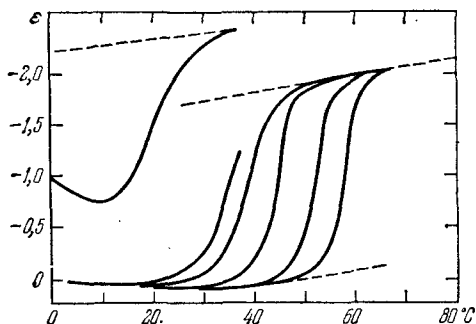


Рис. 4.22. Зависимость коэффициента экстинкции при 293 нм раствора химотрипсिनогена от температуры. Кривые сняты при различных рН. Нижняя штриховая кривая отвечает нативной форме, верхняя — денатурированной

имеет $T_{пл} = 50^\circ\text{C}$ и $\Delta H = 300$ кДж/моль; при рН 10,7 $T_{пл} = 78^\circ\text{C}$ и $\Delta H = 710$ кДж/моль.

Денатурация белка кислотой или щелочью определяется двумя факторами. Во-первых, свободная энергия сферического полиэлектролита пропорциональна квадрату суммарного заряда поверхности, так что стабильность глобулы убывает в обе стороны от изоэлектрической точки. Во-вторых, изменение рН может приводить к ионизации групп, погребенных в неполярном ядре глобулы. Будучи ионизованными, эти группы притягивают гидратные оболочки, что вызывает сдвиг равновесия к расплавленной форме.

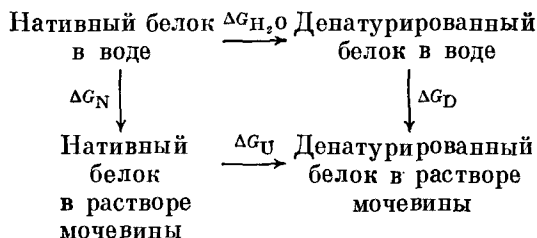
Сканирующая микрокалориметрия выявляет в ряде случаев последовательность пиков теплоемкости при плавлении глобулы. На рис. 4.23 приведена кривая плавления Лиз-плазминогена (Привалов и сотрудники). Ясно видны три пика теплоемкости. Это может свидетельствовать о раздельном плавлении доменов в глобуле или об отщеплении ионов H^+ , происходящем при разных температурах в разных участках. В сочетании с рентгенографией и другими методами микрокалориметрия дает полезную информацию.

Остановимся на методе определения ΔG по денатурации в растворе мочевины (Танфорд). Имеем для этого процесса

$$-\Delta G_U = RT \ln K_U = RT \ln \frac{[D]}{[N]}, \quad (4.44)$$

где $[D]$ и $[N]$ — концентрации денатурированного и нативного белков. Нас интересуют значения $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ для водного раствора.

Воспользуемся циклом



Тогда

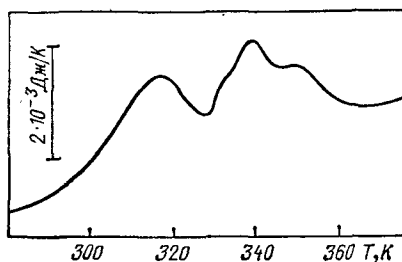
$$\delta\Delta G = \Delta G_U - \Delta G_{\text{H}_2\text{O}} = \Delta G_D - \Delta G_N. \quad (4.45)$$

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

$$\delta\Delta G = \sum y_i n_i \Delta G_i, \quad (4.46)$$

где n_i — число групп типа i в белке, ΔG_i — их вклад в свободную энергию перехода, y_i — численный параметр, зависящий от степени доступности для растворителя групп данного типа в нативной конформации. Согласно с опытом получается, если принять

Рис. 4.23. Кривая плавления Лиз-плазминогена. По вертикальной оси — дифференциальная теплоемкость



для полярных групп $y_i = 0,25$, для гидрофобных $y_i = 0,75$, для пептидных связей $y_i = 0,50$. Величины ΔG_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 (4.44), $\Delta G_U = 0$ и

$$\Delta G_{\text{H}_2\text{O}} = -(\delta\Delta G)_{c_U^*} = -\sum_i y_i n_i (\Delta G_i)_{c_U^*}. \quad (4.47)$$

Это удобный способ определения конформационной стабильности белка.

Свободная энергия денатурации должна быть суммой многих вкладов. Можно написать

$$\Delta G = \Delta G_\alpha + \Delta G_H + \Delta G_{\text{нп}} + \Delta G_e + \Delta G_{\text{наб}} + \Delta G_p + \dots, \quad (4.48)$$

где ΔG_α определяется переходами α -спираль — клубок, ΔG_H — разрывами водородных связей между белковыми цепями соседних макромолекул, $\Delta G_{\text{нп}}$ (нп — неполярные) — изменением гидрофоб-

ных взаимодействий, ΔG_e — изменением электростатических взаимодействий, $\Delta G_{\text{наб}}$ — набуханием образовавшегося клубка, ΔG_p — разрывом слабых связей между участками вторичной структуры. Имеем

$$\Delta G_\alpha = (N - 4)\Delta H_\alpha - (N - 1)T\Delta S_\alpha, \quad (4.49)$$

где N — число звеньев в α -спирали, ΔH_α и ΔS_α — изменения энтальпии и энтропии на звено цепи с $N \gg 1$ при переходе спираль — клубок. Цепь из N звеньев имеет в α -спиральной форме $N - 4$ водородных связей, ограничивающих подвижность $N - 1$ звеньев. По имеющейся оценке $\Delta H_\alpha = 6,3$ кДж/моль, $\Delta S_\alpha = 17,6$ Дж/(моль · К). Если учесть лишь ΔG_α и $\Delta G_{\text{наб}}$, то температура перехода находится из условия $\Delta G = \Delta G_\alpha + \Delta G_{\text{наб}} = 0$, т. е.

$$T_{\text{пл}} = \frac{(N - 4)\Delta H_\alpha + \Delta H_{\text{наб}}}{(N - 1)\Delta S_\alpha + \Delta S_{\text{наб}}}, \quad (4.50)$$

причем величиной $\Delta H_{\text{наб}}$ можно пренебречь; $\Delta S_{\text{наб}}$ пропорционально N — чем длиннее цепь, тем больше число поперечных связей. Оценка $\Delta G_{\text{пл}}$ дает 2,1 кДж/моль, значения ΔG_H и ΔG_e того же порядка. Строгое теоретическое определение всех вкладов в ΔG затруднительно.

Доля денатурированного материала может быть представлена формулой

$$x = \frac{\exp(-\Delta G/RT)}{1 + \exp(-\Delta G/RT)}. \quad (4.51)$$

В точке перехода $\Delta G = 0$ и $x = 0,5$. Острота перехода характеризуется производной

$$\left(\frac{dx}{dT}\right)_{T_{\text{пл}}} = \frac{\Delta H}{4RT_{\text{пл}}^2}. \quad (4.52)$$

Насонов и Александров (1940) предположили, что функционирование белков связано с их «частичной денатурацией». Позднее Александров установил корреляции между температурой тела организма и температурой денатурации его белков. Это иллюстрируется, в частности, табл. 4.6, в которой сопоставлены соответствующие характеристики двух родственных видов лягушек — более северной травяной лягушки (*Rana temporaria* L.) и более южной озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall.).

Температура денатурации белков значительно превосходит температуру тела. Александров объяснил эту корреляцию тем, что функционирование белка требует определенного уровня подвижности, внутренней гибкости глобулярной или фибриллярной белковой молекулы (о значении этой подвижности для ферментативного катализа см. в гл. 6). Чем ниже температура тела, тем

слабее должны быть внутримолекулярные взаимодействия, ответственные за жесткость молекулы, и тем ниже должна быть температура денатурации. Возможно, что здесь особенно важную роль играют междоменные взаимодействия в глобуле. По-видимому, существенны и электростатические взаимодействия — соляные мостики. Показательны свойства малого белка — ферредоксина, содержащего около 60 аминокислотных остатков и два кластера Fe_4S_4 . Ферредоксин из бактерий *Clostridium pasteurianum* полностью инактивируется при нагревании до $70^{\circ}C$ в течение двух

Т а б л и ц а 4.6. Теплолюбивость лягушек (по Александрову)

Характеристика	Травяная лягушка	Озерная лягушка
Граница ареала:		
северная	70° с. ш.	60° с. ш.
южная	43° с. ш.	40° с. ш.
верхняя	3048 м	2438 м
Температура тела в природе (°C)	6,0—26	11,0—29,5
Выбираемая температура	13—26	18—28
Температура потери рефлекторной возбудимости организма	30—32	35—36
Температура потери подвижности сперматозоидов	39,2	41,4
Температура потери способности к развитию яйцеклетки	36,6	38,5
Температура полной инактивации АТФ-азной активности мышечных гомогенатов	40—42	46—50
Температура 50%-ной денатурации гемоглобина	60	64
Температура 50%-ного сокращения коллагена сухожильий	51,5	57,6
Температура 50%-ной денатурации тропоколлагена кожи	25,5	32,0
Температура начала коагуляции сывороточного альбумина	68,0	75,0

часов, ферредоксин из *C. acidivorans* сохраняет при этом 20% активности, из *C. tartarivorans* — 50%, из *C. thermosaccharolyticum* — 90%. Выяснилось, что повышенная теплостойкость белка из термофильных организмов определяется добавочными соляными мостиками. Один такой мостик может увеличить свободную энергию стабилизации до 12—16 кДж/моль.

С денатурацией хорошо коррелирует протеолиз, т. е. гидролитическое расщепление белка с помощью протеолитических ферментов (Линдшерстрем-Ланг). Чем выше термостабильность белка, тем труднее он расщепляется. Это важно, в частности, для лягушек — протеолиз коллагена коллагеназой происходит при утрате головастиком его хвоста.