

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

§ 5.1. Рентгеноструктурный анализ

Прежде чем продолжить рассмотрение белков, остановимся на методах исследования структуры биополимеров.

Естественно пользуется двумя главными способами для изучения строения атомов и молекул. Эти способы — химия и оптика в широком смысле слова, т. е. изучение взаимодействия вещества со светом во всем диапазоне длин волн — от рентгеновских лучей до радиоволн. Химия расшифровывает первичную структуру биополимеров, структуру функциональных центров белковых глобул и т. д. Однако химия как таковая не может установить пространственное строение белка или нуклеиновой кислоты.

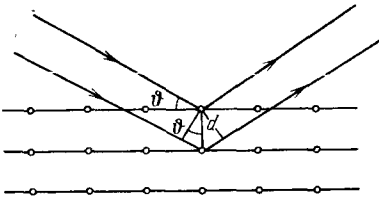


Рис. 5.1. Дифракция рентгеновских лучей

Рентгенография дает прямую информацию о расположении атомов в молекулах и кристаллах.

Рентгеновские лучи, т. е. электромагнитные волны с длиной порядка 0,1 нм, рассеиваются на электронных оболочках атомов. Интерференция волн, рассеянных веществом, приводит к возникновению дифракционной картины. При рассеянии на кристалле можно рассматривать дифракцию как отражение рентгеновских лучей плоскостями кристаллической решетки (рис. 5.1). Дифракция наблюдается, если рассеянные волны находятся в фазе, т. е. разность хода равна целому числу n волн. Если расстояние между кристаллическими плоскостями равно d , то условие дифракции (отражения) дается формулой Брэгга — Вульфа

$$n\lambda = 2d \sin \theta, \tag{5.1}$$

где λ — длина волны, θ — угол между направлением падающего луча и кристаллической плоскостью. Вывод формулы ясен из рис. 5.1.

Дифракция определяется тем, что межатомные расстояния d в решетке (0,1—0,4 нм) имеют тот же порядок, что и длины волн

(часто пользуются $K\alpha$ -излучением Cu с $\lambda = 0,154$ нм). Основная идея рентгеноструктурного анализа состоит в определении расстояний d на основании дифракционной картины, получаемой для лучей с известной длиной волны. Подробные сведения о строении вещества можно получить только при исследовании кристаллов, в которых атомы расположены периодически. При этом, конечно,

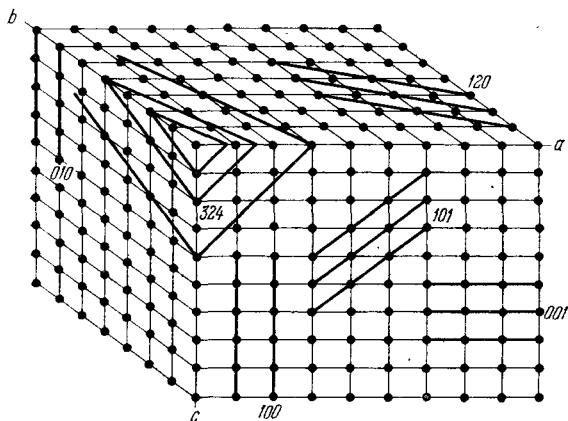


Рис. 5.2. Сечения отражающих плоскостей в ортогональной кристаллической решетке

элементарная формула (5.1) недостаточна. Кристаллическая решетка характеризуется не одним, а тремя периодами и в кристалле имеется набор различных кристаллических плоскостей, от которых «отражаются» рентгеновские лучи. Эти плоскости можно охарактеризовать целыми числами (*миллеровские индексы*) и межплоскостные расстояния d различны для разных индексов. На рис. 5.2 показаны сечения различных отражающих плоскостей в ортогональной кристаллической решетке. Соответственно на рентгенограмме (*лауэграмме*), полученной при монохроматическом излучении, наблюдается множество дифракционных максимумов. Их число особенно велико для кристаллов белка, что связано с относительно большими периодами кристаллической решетки. На рис. 5.3 показана рентгенограмма кристаллического миоглобина кашалота. Рентгенограмма получается на фотопленке, но ионизационные методы регистрации значительно более точны и чувствительны.

Дифракционные максимумы обладают различными интенсивностями. Их анализ позволяет найти распределение электронной плотности в кристалле. Эта плотность выражается через так называемые структурные амплитуды, зависящие от числа электронов в атоме и от направления рассеяния. Структурные амплитуды — величины комплексные, они характеризуются модулями и фазами. Не зная фаз, нельзя установить структуру объекта. Метод определения фаз, развитый Перутцом применительно к

Белкам, состоит в том, что к молекулам, образующим кристалл, присоединяют тяжелые атомы, например, атомы ртути. Тяжелый атом, имеющий много электронов и сильно рассеивающий рентгеновские лучи, вызывает заметные изменения интенсивности дифракционных пятен. По разности амплитуд в присутствии и в отсутствие тяжелого атома можно определить фазу. Применение производных белка, содержащих несколько тяжелых атомов, позволяет решить проблему фаз однозначно. Необходимым условием при этом является полное сохранение структуры белкового кристалла при введении тяжелых атомов. Метод Перутца есть *метод изоморфного замещения* — ртутные производные белка кристаллизуются изоморфно с незамещенным белком.

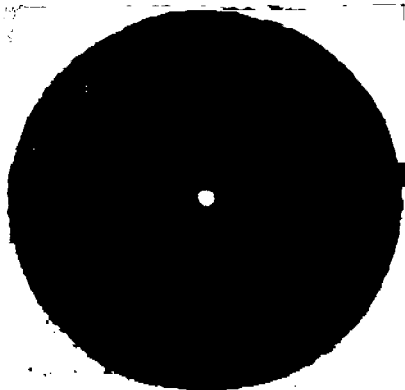


Рис. 5.3. Рентгенограмма миоглобина кашалота

Найденное по измеренным интенсивностям распределение электронной плотности $\rho(x, y, z)$ изображается своего рода «геодезическими картами», на которых линии соединяют точки с одинаковыми значениями ρ . Ввиду малости структурного фактора атомы водорода непосредственно не видны на карте электронной плотности. Их положение можно установить по искривлениям изолиний.

Пространственное распределение плотности можно сделать видимым, наложением друг на друга контурных карт, вычерченных на листах прозрачного пластика. Соответствующая картина для миоглобина показана на рис. 5.4. Окончательным результатом исследования является пространственная модель молекулы белка, в которой определены положения всех его атомов (см. с. 113, 185).

До сороковых годов рентгенография сравнительно простых низкомолекулярных соединений подтверждала их структуру, установленную химическими методами, и давала количественные сведения о межатомных расстояниях. В 1944 г. Ходжкин расшифровала структуру пенициллина, которую химикам не удавалось определить. Молекулы пенициллина содержит 23 атома кроме атомов водорода. Далее Ходжкин установила структуру витамина B_{12} , определив координаты уже 93 атомов. Вслед за этим рентгенографию стали применять в исследованиях наиболее сложных молекулярных белков. Основоположником этого направления молекулярной биофизики был Бернал, крупнейшие достижения в изучении биополимеров принадлежат кембриджской научной школе (Брэгг, Кендрию, Перутц). В 1957 г. Кендрию ус-

тановил пространственное строение первого белка — миоглобина (с. 113), определив положения 2500 его атомов.

Необходимые для рентгеноструктурного анализа кристаллы белка далеко не всегда возможно вырастить. Они представляют собой молекулярные решетки, в узлах которых расположены глобулярные макромолекулы. Установлено, что денатурация этих молекул (переходы глобула — клубок) может предшествовать



Рис. 5.4. Пространственное распределение электронной плотности в миоглобине

плавлению кристалла (Есипова и Макаров). Кристаллы белка содержат большое количество воды, и их исследуют в маточном растворе. Бернал и Ходжкин впервые воспользовались этим методом и получили десятки тысяч четких рефлексов на рентгенограммах. Их число может доходить и до сотен тысяч. Расшифровка столь сложных рентгенограмм — очень трудная и длительная работа, которую можно провести, лишь пользуясь ЭВМ. Для точного определения фазы, соответствующей каждому рефлексу, необходимо измерить несколько раз его интенсивность при дифракции как от чистого белка, так и от его производных, содержащих тяжелые атомы. В расчетах фигурируют десятки миллионов чисел.

В настоящее время рентгенография высокого разрешения (вплоть до 0,25 и даже 0,20 нм, для Mb — до 0,14 нм) проведена примерно для 200 глобулярных белков. Укажем, в частности, на расшифровку структур пепсина, леггемоглобина и аспарат-аминотрансферазы (Андреева, Вайнштейн и Борисов). Исследован ряд ферментов, причем в некоторых случаях определено и

строение комплексов, образуемых ферментами с ингибиторами и с аналогами субстратов (см. гл. 6).

Принципиальная проблема, с которой встречается рентгенография белков, состоит в следующем: в какой мере структура белковой молекулы в кристалле совпадает с ее биологически функциональной структурой в водном растворе?

Если бы белковая глобула представляла собой не анериодиче-ский кристалл, а сильно флуктуирующее образование, то можно

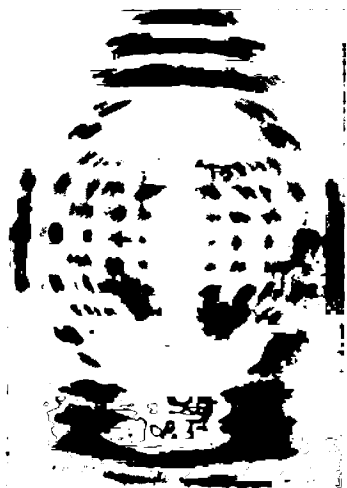


Рис. 5.5. Рентгенограмма Na-соли ДНК в форме А

было бы думать, что кристаллизация означает отбор одной или нескольких конформаций из большого их числа в растворе. Но глобула имеет фиксированное строение. Кристаллические белки, как уже сказано, содержат большое количество воды, и их изучают в маточном растворе. Результаты рентгенографического исследования кристалла белка и данные оптических измерений того же белка в растворе, как правило, согласуются друг с другом. В частности, совпадают степени спиральности, определенные обоими методами. Более того, установлено, что ферментативная активность ряда белков сохраняется в сильно оводненном кристалле. В целом ответ на поставленный вопрос положителен

(см., впрочем, следующий параграф). Напротив, белки, подвергнутые лиофильной сушке, изменяют свое строение — рентгенограммы высушенных кристаллов белка очень бедны рефlekсами.

Недавно с помощью особенно точной и тонкой методики удалось изучить температурную зависимость дифракции рентгеновских лучей на кристаллах белков (метмиоглобин, миоглобин, лизоцим) и определить подвижность аминокислотных остатков. Это важно для физики ферментов (см. § 6.4). Метод сводится к прецизионным измерениям интенсивности и ширины рефлексов, которая непосредственно связана с конформационной подвижностью аминокислотных остатков в белках и ее зависимостью от температуры. Это — метод *рентгенодинамического анализа*, обещающий очень многое.

Рентгенограммы фибриллярных биополимеров (коллаген, ДНК), образующих системы, периодические в одном измерении, характеризуются специфическими особенностями. На рис. 5.5 приведена рентгенограмма натриевой соли ДНК в так называемой А-форме (см. § 7.2). Для фибриллярной системы характерно растяжение дифракционных пятен в так называемые *слоевые линии*

и преимущественное их расположение вблизи меридиана или экватора рентгенограммы. Наблюдаемая картина представляет так называемую *осевую текстуру* одномерно упорядоченной системы, в которой одни оси молекулы приблизительно параллельны выделенному направлению, а другие оси ориентированы произвольно. Текстура имеет одну ось симметрии бесконечного порядка.

Для ряда биополимеров, в частности для ДНК, характерно спиральное строение. В этом случае на рентгенограмме текстуры наблюдается преимущественное расположение дифракционных пятен вдоль двух прямых, образующих косой (андреевский) крест (см. рис. 5.5). Не следует, однако, думать, что для расшифровки спиральной структуры достаточно простого обозрения рентгенограммы и констатации косого креста. Исследуемый объект представляет собой агрегат цепных молекул, обладающий гораздо меньшей упорядоченностью, чем трехмерный кристалл. Соответственно дифракционная картина бедна рефлексами. Разработан ряд приемов для ее расшифровки. Применяется метод «проб и ошибок»: на основании структурно-физических представлений и анализа атомных моделей строится пробная модель системы, для которой и вычисляется распределение интенсивностей рефлексов. Совпадение с наблюдаемым распределением доказывает истинность модели. Далее можно вычислить фазы и найти распределение электронной плотности биополимера. Именно таким способом была установлена знаменитая двойная спираль ДНК (см. § 7.2).

Агрегаты цепных молекул существуют в различных степенях упорядоченности, начиная с истинного кристалла и кончая аморфным полимером, в котором цепи разупорядочены. Строгая теория позволяет судить по дифракционной картине о нарушениях порядка, вызываемых сдвигами, изгибами, отклонениями от параллельной упаковки макромолекулярных цепей. Полимерные структуры в ряде случаев образуют *паракристаллы* — системы, лишенные истинного трехмерного порядка, но состоящие из цепных молекул, сдвинутых и повернутых параллельно друг другу. Для ряда фибриллярных белков (кератин, коллаген), для целлюлозы и некоторых других волокнистых веществ характерны нарушения упорядоченности с сохранением примерной параллельности осей молекул. Такие системы обладают свойствами *жидких кристаллов*.



Рис. 5.6. Дебаграмма коллагена

Для ряда фибриллярных белков (кератин, коллаген), для целлюлозы и некоторых других волокнистых веществ характерны нарушения упорядоченности с сохранением примерной параллельности осей молекул. Такие системы обладают свойствами *жидких кристаллов*.

Синтетические аморфные полимеры (например, каучук) дают, подобно жидкостям, дифракционные картины в виде совокупности концентрических колец (*диаграммы Дебая — Шерера*, рис. 5.6). Для такой картины, несравненно более бедной, чем лауэграмма кристалла, характерно наличие размытого кольца — *аморфного гало*, диаметр которого определяется преимущественными расстояниями между рассеивающими центрами. При растяжении аморфного полимера возникает текстура и вместо равномерных по интенсивности колец, как мы видим, наблюдаются более или менее протяженные дуги вблизи меридиана или экватора кольца. Сходные картины дают фибриллярные белки, а также надмолекулярные структуры типа мышечных волокон.

§ 5.2. Диффузное рассеяние рентгеновских лучей растворами биополимеров

Диффузное рассеяние рентгеновских лучей растворами макромолекул дает прямую информацию о распределении рассеивающих объектов. Диффузное рассеяние есть суммарное рассеяние на беспорядочно расположенных отдельных макромолекулах, тем самым в нем усредняются интенсивности рассеянного света по всевозможным ориентациям макромолекулы. Чем больше углы рассеяния, тем меньше размеры деталей структуры, на которых происходит дифракция рентгеновских лучей. Под малыми углами рассеяния изучается общее строение макромолекул в растворе, а под средними и большими — особенности их внутреннего строения.

Теория малоугловой дифракции исходит из представлений, близких к применяемым в теории рассеяния света растворами макромолекул (с. 82). Теория позволяет связать наблюдаемую под теми или иными углами интенсивность рассеяния, т. е. его индикатрису с расстояниями между рассеивающими частицами. Для определения формы макромолекулы приходится задаться некоторыми о ней предположениями — представить макромолекулу в виде шара, эллипсоида или вытянутого цилиндра. Для таких, а также для других простых тел вычисляется индикатриса рассеяния как функция геометрических параметров макромолекулы. Так, для шара определяется электронный радиус инерции (электронный, так как рентгеновские лучи рассеиваются электронами). Для миоглобина этот радиус оказался равным 1,6 нм, что хорошо согласуется с размерами, определенными методом рентгеноструктурного анализа кристаллического миоглобина. Если рассеивающая система вытянута, то определяется электронный радиус инерции ее поперечного сечения. По индикатрисам рассеяния определены размеры, форма и молекулярные массы ряда биополимеров. Так, лизоцим представляется эквивалентным эллипсоидом вращения с размерами $2,8 \times 2,8 \times 5,0$ нм³. Более детальная информация о форме однородных частиц получается из анализа кривых рассеяния под большими углами (от