

ОБЗОРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

Динамические свойства и энергетический ландшафт простых глобулярных белков

Ю.Ф. Крупянский, В.И. Гольданский

Анализ динамических свойств простого глобулярного белка — миоглобина — позволяет прийти к заключению, что миоглобин обладает иерархически организованным энергетическим ландшафтом. В белке, кроме колебаний, существуют два типа специфических белковых движений: 1) индивидуальные движения небольших атомных групп — переходы между конформационными подсостояниями (КП) нижнего 2-го яруса; 2) кооперативные движения элементов вторичной структуры (α -спиралей) — переходы между КП верхнего 1-го яруса. Срез динамических свойств макромолекулы показывает сильную гетерогенность. В окрестности активного центра наблюдаются только колебания. По направлению к периферии растет количество КП, и специфические движения 1-го и 2-го типов становятся доминирующими. Данная картина соответствует концепции белка как "слегка отредактированного в окрестности активного центра случайного сополимера".

PACS numbers: 87.10.+e, 87.15.By, 87.15.He, 87.80.-y

Содержание

1. Введение (1247).
2. Структурная организация функционирующих белков (1249).
2.1. Модели белка как физического тела. 2.2. О фазовых переходах в макромолекулах. 2.3. Основные требования к структурной организации функционирующих белков.
3. Основные свойства стекол и переохлажденных жидкостей (1250).
4. Самоорганизация белков (1252).
5. Динамические и кинетические свойства простых белков. Результаты экспериментальных исследований (1255).
5.1. Общая постановка и условия экспериментальных исследований. 5.2. Миоглобин — атом водорода в биологии. 5.3. Холодовая денатурация в белках. 5.4. Концепция конформационных подсостояний (КП) и энергетический ландшафт белковой макромолекулы. 5.5. Энергетический ландшафт миоглобина при низких температурах ($T \leq 20$ К). 5.6. Свойства белков при $T > 220$ К. Равновесные флуктуации.
6. Белки как сложные системы (1265).
6.1. Энергетический ландшафт и его иерархическое устройство. 6.2. Функционально важные движения в белках. 6.3. Сложность белков.
7. Заключение. Перспективы исследований (1267).

Список литературы (1268).

"... периодические кристаллы ... составляют одну из наиболее очаровательных и сложных структур, которыми неодушевленная природа приводит в замешательство интеллект физика. Однако, по сравнению с аperiodическими кристаллами они ... элементарны и скучны. Различие ... здесь такое же, как между обычными обоями ... и рафаэлевским гобеленом, который повторяет сложный, последовательный и полный замысла рисунок, начертанный великим мастером".

Э. Шрёдингер [1]

1. Введение

Практически все функции живой клетки определяются белками. Молекулы белков, наряду с молекулами ДНК и РНК, — самые сложные из известных науке. Белки-ферменты являются катализаторами биохимических реакций. Выяснение механизма этих реакций — одна из важнейших задач биологической физики [1–9]. Человечество, буквально на глазах, вступило в новую "постгеномную" эпоху. Это произошло после того, как в начале 2001 г. были опубликованы подробные данные о структуре генома человека. После прочтения генома начинает быстро развиваться новая наука о поведении совокупности протеинов (белков) в клетке в данный момент времени и их биохимическом взаимодействии, так называемая "протеомика".

Быстро развивается структурная геномика, задачей которой является определение или достаточно точное предсказание трехмерной структуры огромного числа белков, ставших известными после расшифровки геномов человека и многочисленных видов бактерий и т.д. С этой целью строятся новые мощные биомедицинские центры (в основном в США), целью которых является

Ю.Ф. Крупянский, В.И. Гольданский. Институт химической физики РАН им. Н.Н. Семенова
117977 Москва, ул. Косыгина 4, Российская Федерация
Тел. (095) 939-73-00
Факс (095) 137-83-18
E-mail: yufk@chph.ras.ru

Статья поступила 20 ноября 2001 г.,
после доработки 11 марта 2002 г.

комбинированное определение трехмерной структуры белков методами рентгеноструктурного анализа, ЯМР-спектроскопии и теоретического предсказания структуры по известной первичной последовательности. Отметим, что в области предсказания структуры белков существенный вклад внесли и вносят отечественные ученые [10–12].

Вернемся, однако, в "геномную" эпоху. Белки-ферменты обладают исключительно высокой каталитической активностью [2–4]. Объяснению высокой каталитической активности ферментов посвящено множество работ. В химии обычно хорошо известна логическая связь между структурой объекта (жесткой молекулой) и его функциональными свойствами. В биологической физике связь между структурой макромолекулы и ее функциональными свойствами также существует. Однако, в отличие от химии жестких молекул, эта взаимосвязь существенно сложнее. Изучение фундаментальных принципов функционирования белковых макромолекул приводит к выводу, что для понимания и количественного описания процесса функционирования белков надо знать не только их структуру, надо также знать их динамические свойства, которые определяются энергетическим ландшафтом макромолекулы. Поэтому надо знать энергетический ландшафт белковых макромолекул, который формируется в процессе самоорганизации первичной структуры белка в пространственную. Естественно высказать предположение, что в новой "постгеномной" эпохе вслед за определением трехмерной структуры многочисленных новых белков последует скрупулезное выяснение их динамических свойств и энергетических ландшафтов.

Если взять нанокристаллическую частицу и белок приблизительно одинакового размера, то у этих двух систем флуктуации энергии, энтропии и объема одного порядка величины. Однако их реакционная способность и динамические свойства отличаются разительным образом. Различия проистекают из-за разницы в структурно-динамической организации. Специфическая структурно-динамическая организация белков-ферментов обеспечивает их высокую реакционную (каталитическую) способность. Структурная организация белков определяет также наличие очень специфических (существенно отличающихся от обычных твердых тел) динамических свойств белков.

Полученные в последние 20–25 лет многочисленные экспериментальные данные показывают, что физические свойства белков намного сложнее, чем это предполагалось ранее. Данные рентгеноструктурного анализа (вплоть до разрешения в 1 Å) [13], высокая плотность упаковки [14], кооперативность процесса денатурации [15] и другие факты [13, 16, 17] подтверждают впечатляющие о белке как об упорядоченной "кристаллоподобной" системе — "аперриодическом кристалле" [1, 3]. В то же время в многочисленных экспериментах по изучению динамических свойств белков (в экспериментах по рассеянию нейтронов (РН) [18], мёссбауэровской спектроскопии (МС) [19–22] и рэлеевскому рассеянию мёссбауэровского излучения (РРМИ) [22–26]) специфические (внутриглобулярные) белковые движения рассматриваются в рамках моделей ограниченной прыжковой или непрерывной диффузии, т.е. жидкообразны на малых временах. В этих экспериментах белки совсем не похожи на "кристаллоподобные" системы. Таким образом, раз-

ные эксперименты выявляют совершенно различные и, казалось бы, противоречащие друг другу свойства белков.

Известно, что белки обладают способностью к самоорганизации. В физике самоорганизации белков идут оживленные дебаты, какая гипотеза самоорганизации белковых глобул справедлива — пост-трансляционная или ко-трансляционная, а пост-трансляционная гипотеза в свою очередь имеет сторонников термодинамической гипотезы и кинетической гипотезы [27–30]. Доказательство справедливости той или иной гипотезы самоорганизации белковых глобул немедленно ответило бы на многие вопросы о динамических свойствах белков. *В случае справедливости термодинамической гипотезы нативное состояние белка отвечает глобальному минимуму энергии*, и, следовательно, белок представляет собой обычный идеальный нанокристалл, в котором возможны лишь гармонические или близкие к гармоническим колебания¹. Однако о специфических белковых движениях или о каких-либо жидкообразных (на малых временах) движениях в этом случае не может быть и речи. *Если справедлива кинетическая гипотеза или ко-трансляционная гипотеза сворачивания*, то динамические свойства белка могут быть значительно богаче, так как в этом случае *нативное состояние белка отвечает одному из локальных минимумов энергии*. Кроме обычных твердотельных гармонических колебаний появляются специфические (не твердотельные) белковые движения типа ограниченной диффузии.

Динамические свойства белков определяются энергетическим ландшафтом глобулы, который формируется в процессе сворачивания белка. Следовательно, динамика белков тесно связана с механизмом самоорганизации белковых глобул. Изучение динамических свойств белков может пролить некий свет на механизм самоорганизации. В свете этого ведущиеся оживленные дискуссии о динамических свойствах белков должны быть взаимосвязаны с физикой самоорганизации белков. К сожалению, взаимосвязь этих фундаментальных разделов физики белков стала проследиваться лишь в недавних обзорах [7, 8] и в трудах последних отечественных и международных конференций [32–34].

Общепринято, что для ферментативного катализа важнейшее значение имеют электронно-конформационные взаимодействия и конформационные изменения в процессе функционирования [2–8]. Конформационная релаксация является лимитирующей стадией реакции [2]. Поэтому правильное представление об энергетическом ландшафте макромолекулы и ее динамических свойствах чрезвычайно важны для количественного описания процесса функционирования белков. Без знания пространственно-временных характеристик специфических белковых движений невозможно продвинуться в понимании фундаментальных принципов функционирования белков.

Настоящий обзор посвящен описанию экспериментальных данных и теоретических представлений, связанных с изучением динамических свойств и энергетического ландшафта одного из простейших, но наиболее изученных глобулярных белков — миоглобина. Иногда при-

¹ Естественно, возможны короткоживущие флуктуации структуры, насколько они вообще возможны в малых частицах [31].

водятся данные для другого, достаточно хорошо исследованного белка — лизоцима.

2. Структурная организация функционирующих белков

Живые клетки состоят из макромолекул: нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), белков, полисахаридов и липидов [35]. Строительными блоками для нуклеиновых кислот являются нуклеотиды, а для белков — аминокислоты. Нуклеиновые кислоты построены из четырех типов различных нуклеотидов, в то время как белки построены из 20 типов аминокислотных остатков.

На следующем, более высоком уровне организации, макромолекулы клетки образуют надмолекулярные комплексы, например, *рибосомы*, являющиеся комплексами нуклеиновых кислот и белков.

Надмолекулярные комплексы, в свою очередь, образуют органеллы, примером которых является ядро клетки. В организмах, которые имеют хромосомы (части ядра), молекулы ДНК закручены вокруг белковых молекул (гистонов) для компактного хранения и доступа. Без подобной компактизации 3-метровая молекула ДНК (с 1 миллионом нуклеотидов) была бы неспособна находиться в ядре клетки, диаметр которого около 5 микрон.

Язык жизни — генетический код — основан на четырехбуквенном алфавите: четырех типах различных нуклеотидов, из которых состоит ДНК. Эти буквы входят в состав трехбуквенных кодовых слов, называемых кодонами. Общий набор таких кодонов составляет генетический код. Последовательность серии кодонов, расположенных в цепи ДНК, образует определенный ген, по которому, как по матрице, синтезируется молекула РНК.

В молекуле РНК перезаписана (с ДНК) информация для конструирования специфического белка. Далее, молекула РНК перемещается в рибосому, где и происходит биосинтез белка. РНК инструктирует рибосому, в каком порядке должны быть синтезированы аминокислоты, чтобы сформировать первичную аминокислотную последовательность. Когда первичная аминокислотная последовательность появляется из рибосомы, происходит самосборка или самоорганизация функционально активной пространственной белковой структуры.

Обращаясь к структурной организации белков, следует сказать о ее иерархичности. Имеются первичная, вторичная и третичная (иногда и четвертичная) структуры.

Первичная структура, или последовательность звеньев в цепи, формируется при биосинтезе каждой макромолекулы на рибосоме и запоминается, т.е. при дальнейшем тепловом движении не меняется вплоть до разрушения данной структуры.

Вторичные структуры — это α -спирали или β -складки, у которых элементарная единица включает несколько, до десяти, элементов цепи.

Третичная структура — это способ расположения в пространстве первичной цепи как целого или способ размещения в пространстве элементов вторичной структуры. При формировании третичной структуры в пространстве могут сблизиться любые, в том числе и сколь угодно далекие по цепи участки. Большая часть функционирующих в клетке белков имеет вид плотно сжатого комка, при этом практически все молекулы растворителя

выдавлены наружу звеньями цепи. Белки с такой третичной структурой называются глобулярными. После расшифровки генома человека оказалось, что старая формула "один ген — один белок" справедлива лишь для группы генов, а многие гены (возможно, большинство) кодируют семейство родственных, но существенно разных белков, т.е. действует принцип "один ген — много белков".

2.1. Модели белка как физического тела

Макромолекулы белков-ферментов имеют нанометровые размеры. К телам нанометровых масштабов, содержащим тысячи простых молекул или атомов, а поэтому и к макромолекулам белков применимы такие понятия макрофизики, как температура, диэлектрическая проницаемость и т.п. [5]. Иными словами, белковая макромолекула может рассматриваться как макроскопическое тело в физическом понимании этого слова. Скажем несколько слов о популярных в настоящее время моделях белков. По сути, сами названия моделей говорят о том, какие аналогии с простейшими агрегатными состояниями в них использованы. Модель белок — армированная капля подробно обсуждается в многочисленных работах К.В. Шайтана и А.Б. Рубина (см., например, [4, 6]).

Еще Э. Шрёдингер отмечал, что биологические системы удивительно упорядочены, поэтому живой организм ближе к чисто механическому, чем термодинамическому поведению [1]. Д.С. Чернавским с соавторами было высказано мнение, что механика примешивается к статистике уже на уровне отдельных макромолекул биополимеров (белков) [36]. Известно, что молекулы белка содержат информацию, заключенную в первичной последовательности, которая определяет как его пространственную структуру, так и функцию белка. Другими словами, белок собирается по "плану" [5]. Аналогом белка-фермента по Д.С. Чернавскому может быть лишь другой объект, построенный по плану, т.е. конструкция. В этом смысл концепции "белок — машина" [5].

Выше шла речь об удивительной упорядоченности биологических систем. Однако трудно представить себе, чтобы живая клетка в целом была много упорядоченной капли воды таких же размеров. Л.А. Блюменфельд [2] провел количественные оценки биологической упорядоченности и пришел к выводу, что упорядоченность биологической организации человеческого тела не превышает 300 энтропийных единиц (э.е.)². Подавляющий вклад в эту величину вносит упорядоченное распределение аминокислотных остатков в молекулах белков. Поэтому, согласно физическим критериям, любая биологическая система упорядочена не больше, чем кусок горной породы того же веса [2]. В основе ощущения особой упорядоченности биологических структур лежит то обстоятельство, что в ее упорядоченности, точнее, в информации, содержащейся в живой материи, есть смысл [37] или ценность [38].

Стеклообразная динамическая модель макромолекулы белка была предложена авторами данного обзора около двадцати лет назад [39, 24]. К этому времени на основании ряда кинетических и динамических данных была сформулирована концепция конформационных подсостояний (КП) в белковой макромолекуле [40–42].

² 1 энтропийная единица = 1 э.е. = 1 кал град⁻¹ [2].

Незадолго до этого было обнаружено, что стекла обладают рядом специфических низкотемпературных свойств — аномалий, в частности наличием линейного члена в низкотемпературной теплоемкости при $T < 1$ К.

Оказалось, что данная аномалия является прямым следствием сложного энергетического ландшафта в стеклах — наличия локальных минимумов энергии или КП, туннелирование атомов или небольших атомных групп, между которыми и обеспечивает появление линейного члена [43, 44]. Эта аналогия настолько бросалась в глаза, что мы немедленно предположили, что такими же "стеклянными" аномалиями должны обладать и белковые макромолекулы, что и подтвердилось впоследствии в многочисленных экспериментах. Если в концепции "белок-машина" за основу берется то, что роднит белок с "живой" природой, то в стеклообразной динамической модели макромолекулы белка учитывается лишь то, что есть в белковой макромолекуле от "неживой" природы.

Как мы увидим в разделе 5, от "неживой" природы в белковой макромолекуле осталось довольно много. Утверждение о наличии стекловых аномалий у макромолекулы белка иногда воспринимается, как совершенно другое утверждение о том, что белок есть стекло (см., например, [5]). Это, конечно, не так. Современное состояние исследований, использующих идеи данной модели, приведено нами в разделах 5 и 6.

2.2. О фазовых переходах в макромолекулах

В статистической физике фазовый переход и различные фазы строго определены только для систем с бесконечным числом частиц (реально, для числа частиц порядка числа Авогадро $N = 6 \times 10^{23}$). В самых больших (длинных) белковых макромолекулах число звеньев порядка 100–1000, что мало по сравнению с числом Авогадро. Поэтому состояния данной конечной биомолекулы не всегда можно отнести к определенной фазе. Вблизи фазового перехода должна существовать переходная область температур ΔT конечной ширины, разделяющая области, уверенно относимые к различным фазам.

В связи с этим может возникнуть следующий общий вопрос: как быть с общепринятой классификацией фазовых переходов? Согласно ей фазовый переход называется переходом первого рода, если в точке перехода скачкообразно изменяются первые производные термодинамических потенциалов (энтропия, плотность, намагниченность и т.д.); при переходе второго рода скачки претерпевают вторые производные (теплоемкость, восприимчивость и т.д.). Поскольку в конечной системе скачков вообще нет, вся эта классификация к ней не применима (подробнее см. [45]). В отличие от систем с бесконечным числом частиц в белках должна существовать переходная область температур ΔT конечной ширины относительно некой критической температуры T_c , разделяющая области, уверенно относимые к различным фазам. Это должно относиться и к переходу типа стеклования.

2.3. Основные требования к структурной организации функционирующих белков

Хорошо известно, что ферментативный катализ и многие другие функции белков требуют определенного (упорядоченного, однозначного) взаимного расположе-

ния и взаимной ориентации аминокислотных остатков в активном центре. Поэтому должен существовать механизм, обеспечивающий упорядоченность активного центра и защищающий указанное определенное взаимное расположение и взаимную ориентацию от разрушения вследствие тепловых флуктуаций.

По-видимому, наиболее надежным механизмом является встраивание активного центра в большую кооперативную систему (структуру), которая имеет возможность разрушаться только как целое, т.е. посредством механизма внутриглобулярного фазового перехода, близкого к переходу первого рода. В этом случае свободная энергия, стабилизирующая нативную структуру активного центра, близка по своему значению к величине свободной энергии, стабилизирующей всю трехмерную структуру белка, т.е. достаточно велика. Такой механизм действительно осуществляется в глобулярных белках: плавление нативной трехмерной глобулы есть (с точностью современного эксперимента) фазовый переход первого рода.

О.Б. Птицын и М.В. Волькенштейн выделяют следующие наиболее общие требования к функционирующим глобулярным белкам [46]:

1) наличие активного центра (упорядоченно организованного устройства атомных групп, напрямую участвующих в функционировании белков); 2) встраивание активного центра в разветвленную структуру, каркас которой сформирован α -спиралями и/или β -складками, а боковые группы в ней плотно упакованы; 3) устойчивость трехмерной структуры белка в условиях его функционирования.

Эффективность работы ферментов оценивают числом оборотов: числом каталитических актов, осуществляемых одной молекулой фермента в единицу времени. Для ряда ферментов число оборотов составляет несколько сотен тысяч в секунду. Энергия связывания лиганда порядка энергии денатурации, поэтому устойчивость структуры или ее способность после ферментативного акта возвращаться в исходное структурное состояние — одно из главных требований к пространственной структуре глобулы белка. Поскольку в простых веществах устойчивой (стабильной) структурой обладают лишь кристаллы, то естественно было предположить, что белки "кристаллоподобны", что и было сделано в ряде основополагающих работ [1, 3].

3. Основные свойства стекол и переохлажденных жидкостей

В общем случае любое твердое тело, не имеющее периодической структуры или характеризующееся отсутствием дальнего (кристаллического) порядка, называется некристаллическим или аморфным. Обычное определение "стекла" как аморфного твердого тела, приготовленного быстрым охлаждением расплава, в настоящее время считается недостаточным. Под стеклообразным состоянием или просто стеклом (не путать со стеклом как практическим материалом) подразумевают аморфное твердое тело, которое имеет калориметрический переход в стеклообразное состояние вблизи некой характеристической температуры T_g [47, 48]. Тогда твердое состояние вещества при $T < T_g$ называется стеклом (при этом оно имеет вязкость, превышающую $10^{13} - 10^{14}$ пуаз), а стеклообразующая система при $T_m > T > T_g$ называется

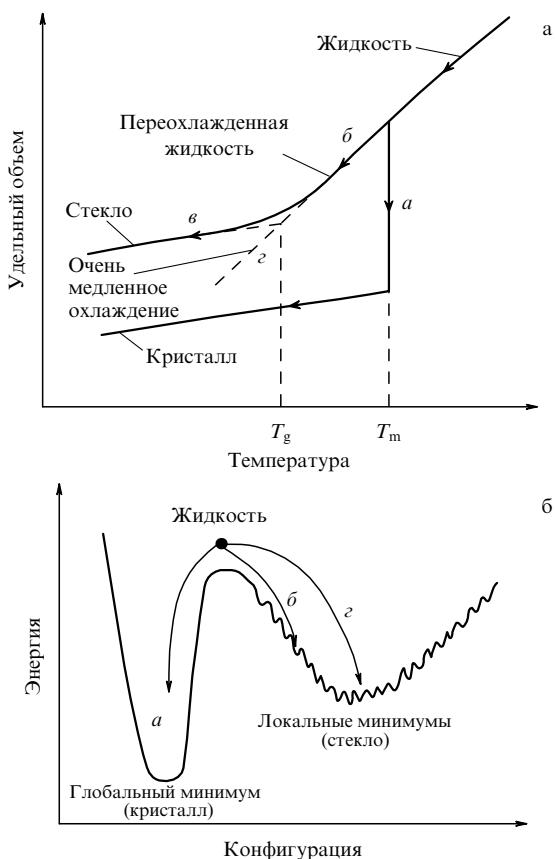


Рис. 1. (а) Кривая зависимости удельного объема от температуры, иллюстрирующая особенности возникновения стеклообразного вещества из жидкого. (б) Диаграмма образования стекла или кристалла из жидкости, представленная в координатах энергия–конфигурация. Глобальному минимуму соответствует основное состояние системы — кристаллическое. Стеклообразному состоянию соответствуют локальные минимумы. Подробности в тексте.

метастабильной долгоживущей переохлажденной жидкостью. Здесь T_m — точка плавления. Основным и равновесным состоянием для данной системы является кристаллическое.

При медленном охлаждении жидкости (расплава) до температуры плавления T_m (рис. 1а) происходит кристаллизация (путь *a*). При быстром охлаждении достаточно вязкий расплав может переохладиться без кристаллизации (путь *б*). Введем $R = -dT/dt$ — скорость охлаждения. Для каждого вещества существует такая R_{min} , что при $R > R_{min}$ данное вещество переходит в переохлажденную жидкость. При $R < R_{min}$ вещество кристаллизуется. Чем больше вязкость вещества в точке плавления, тем вероятнее стеклование вещества. Так как вязкость (η) металлов много меньше вязкости силикатов (например, для Fe $\eta(T_m) = 0,07$ пуаз, а для SiO₂ $\eta(T_m) = 10^7$ пуаз), то для первых характерен путь *a*, а для вторых — путь *б*.

В диэлектрических стеклах R_{min} обычно порядка $10^{-5} - 1 \text{ К с}^{-1}$. Для металлических стекол типичное значение R_{min} очень высокое: $R_{min} \sim 10^6 - 10^{10} \text{ К с}^{-1}$ [48, 49]. Компьютерное моделирование дает еще большие значения $R_{min} \sim 10^{11} - 10^{13} \text{ К с}^{-1}$ для небольших систем, состоящих из 10^3 атомов, так что стеклование в настоящее время найдено даже для простых монокристаллических жидкостей типа жидкого аргона [49]. Если компьютер-

ное моделирование действительно отражает процессы в реальных веществах, то для любого вещества существует такая R_{min} , что охлаждение с большей скоростью ведет к стеклованию данного вещества. Таким образом, стеклование является универсальным явлением природы.

Известно, что кристаллическое состояние вещества является термодинамически стабильным. Переохлажденные жидкости находятся в метастабильном состоянии конечное, однако довольно долгое время жизни τ_1 . В большинстве случаев это время близко к времени замораживания τ_f , которое в свою очередь определяется средней скоростью охлаждения R :

$$\tau_1 \sim \tau_f \approx \frac{T_m - T_g}{R}.$$

Например, если $R \sim 10^{-5} \text{ К с}^{-1}$, $T_m - T_g = 100 \text{ К}$, то $\tau_1 \approx 3,5$ года. Стекла также метастабильны, однако для них $\tau_1 \gg \tau_f$. Для обычных оконных стекол известно, что они стабильны многие столетия.

Структура стекла неравновесна в двух отношениях: 1) по отношению к равновесной кристаллической структуре и 2) по отношению к метаравновесной для данной температуры структуре стеклообразного вещества. При стекловании замораживается структура жидкости (расплава), соответствующая $T \geq T_g$. Ниже T_g скорость установления структурного равновесия столь мала, что за время наблюдения структура не успевает релаксировать к своему метаравновесному состоянию. Поэтому структура и свойства вещества в стеклообразном состоянии зависят от их тепловой истории.

При отжиге (прогреве стекла, выдержки при данной температуре и последующем охлаждении) может произойти как кристаллизация вещества, так и приближение к метаравновесному состоянию (если большая вязкость препятствует кристаллизации). Данный процесс называется стабилизацией стекла. Отжиг обычно приводит к обновлению структуры вещества. Этот факт говорит об отсутствии у стекол памяти.

Если вещество пошло по пути *a*, т.е. кристаллизовалось, то кристаллическое состояние при дальнейшем охлаждении системы не может перейти в стеклообразное.

Метастабильность стеклообразующих систем также проявляется в зависимости точки стеклования T_g и других свойств от скорости охлаждения R . Так, например, если $R' > R$, то $T_g(R') > T_g(R)$. Поэтому мы можем считать, что $T_m > T_g \geq T_g(R_{min})$. Обычно $T_g \approx 2/3 T_m$.

В простых стеклообразующих жидкостях обычно существует низкотемпературная упорядоченная (кристаллическая) фаза с трансляционной симметрией. Эта фаза, которую, как мы видели, можно избежать путем быстрого охлаждения и есть действительно основное состояние системы, характеризующееся глобальным минимумом энергии. Переохлажденная жидкость или стекло имеют сложный энергетический ландшафт с множеством локальных минимумов энергии (конформационных подсостояний (КП)) (рис. 1б). При высоких температурах система блуждает по энергетическому ландшафту, включая все области, в том числе и области с повышенной конформационной энергией. При медленном охлаждении система с большей вероятностью попадает в состояние с низкой энергией (путь *z*). При быстром охлаждении система может оказаться в области с повышенной конформационной энергией (путь *б* на рис. 1б). Рисунок 1б, таким образом, хорошо иллюстрирует

неравновесность стекла по отношению к метаравновесному состоянию и по отношению к основному состоянию (глобальному минимуму энергии).

При нагревании выше точки стеклования T_g стекло переходит в переохлажденную жидкость. Этот переход похож на фазовый переход второго рода. По современным представлениям, однако, переход стеклования нельзя свести к обычным термодинамическим фазовым переходам второго рода, хотя бы потому, что T_g зависит от скорости охлаждения [47].

Стекла обладают рядом специфических низкотемпературных свойств — аномалий. Эти свойства называются аномалиями потому, что они не характерны ни для идеальных кристаллов, ни для "нестеклообразных" аморфных веществ. Для нас одной из наиболее важных аномалий является наличие линейного члена в низкотемпературной теплоемкости стекол при $T < 1$ К. Данная аномалия является прямым следствием сложного энергетического ландшафта в стеклах — наличия локальных минимумов энергии или КП, туннелирование атомов или небольших атомных групп между которыми и обеспечивает наличие линейного члена [43, 44]

Для обычной жидкости (высокотемпературный предел) отклик на механические или электрические возмущения описывается обычной дебаевской моделью релаксации и экспоненциален во времени [50]:

$$F(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right),$$

здесь τ — время релаксации.

Соответствующий частотный отклик определяется динамической восприимчивостью:

$$\chi(\omega) = \frac{\chi_0}{1 + i\omega\tau}.$$

Фундаментальной особенностью переохлажденной жидкости вблизи T_m является наличие медленного релаксационного процесса с макроскопически большим временем релаксации. Обычно этот процесс называется первичной или α -релаксацией. В этой области температура отклик переохлажденной жидкости на механические или электрические возмущения определяется в основном α -релаксацией и имеет неэкспоненциальную временную зависимость. Релаксационная функция часто описывается выражением Кольрауша – Вильямса – Ватса [51]

$$F(t) = \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta\right]. \quad (3.1)$$

Динамическая восприимчивость переохлажденных жидкостей не описывается простой дебаевской моделью, поэтому для описания экспериментальных данных вводят спектр времен релаксаций $G(\tau)$

$$\chi(\omega) = \chi_0 \int d\tau \frac{G(\tau)}{1 + i\omega\tau}.$$

Дэвидсон и Коул [52] ввели следующее эмпирическое выражение для восприимчивости, хорошо описывающее многочисленные экспериментальные данные:

$$\chi(\omega) = \frac{\chi_0}{(1 + i\omega\tau)^\beta}. \quad (3.2)$$

Несмотря на различный функциональный вид выражений (3.1) и (3.2) в численном виде они дают схожие результаты [53].

4. Самоорганизация белков

Преобразование полипептидной цепочки в нативный белок является ключевым аспектом перевода генетической информации в биологическую активность [54]. Попытки понять данный процесс резко интенсифицировались в последние 5–10 лет. В клетке образование функционально активных белков складывается из двух процессов — синтеза на рибосоме (образование химической структуры — первичной аминокислотной последовательности) и сворачивания (самоорганизации) функционально активной пространственной белковой структуры. Эти два процесса часто рассматривают как независимые и последовательные (пост-трансляционное сворачивание).

Более тридцати лет назад К. Анфинсен показал [27], что и в пробирке (вне клетки) при определенных условиях (медленность процесса, малость концентрации и т.д.) предварительно денатурированный белок ренатурирует, т.е. происходит самопроизвольное восстановление правильной третичной (нативной) структуры белка. Если первичная структура белка изготавливается в клетке особым устройством — рибосомой, то для формирования третичной структуры по крайней мере простых, небольших белков никаких особых устройств не нужно. Опыты К. Анфинсена показали, что третичная структура белка обладает способностью к самоорганизации — трансформации одномерной информации в трехмерную структуру. Именно самоорганизация обеспечивает белкам возможность функционировать.

Известно, что естественный (эволюционный) отбор белков идет по пространственным структурам. Поэтому между генетически predetermined первичной структурой белка и его пространственным строением должно быть однозначное или вырожденное соответствие [3]. В данном разделе будет сделана попытка кратко осветить состояние проблемы самоорганизации белков. Тем, кто хочет глубже познакомиться с данной проблемой, можно порекомендовать многочисленные великолепные оригинальные обзоры и статьи [54–62].

В течение длительного времени в литературе обсуждается вопрос, отвечает ли нативная структура белка абсолютному (глобальному) минимуму свободной энергии (так называемая термодинамическая гипотеза свертывания белка [27]) или только локальному минимуму (кинетическая гипотеза свертывания белка [28, 29]). В кинетической гипотезе свертывания белка полагается, что за считанные минуты — реальное время самосборки белка в клетке — белковая цепь не способна достигнуть самого стабильного по энергии состояния (глобального минимума). В результате самосборки нативная конформация белковой цепи отвечает достаточно глубокому, но локальному минимуму энергии, чтобы структура белка была устойчивой к возможным возмущениям. Иными словами, нативная структура белка квазиравновесна или, строго говоря, находится в метастабильном состоянии с очень большим временем жизни. Это означает, что белковая цепь в ходе самосборки попадает в состояние, отделенное от абсолютно равновесного (глобального) минимума высоким барьером свободной энергии активации ΔG и потому не в состоянии его преодолеть. Конформация, отвечающая глобальному минимуму энергии, кинетически недоступна для нативного белка.

Для целей данного обзора справедливость термодинамической или кинетической гипотезы свертывания

белка имеет решающее значение. Динамические свойства белков определяются энергетическим ландшафтом глобулы, который формируется в процессе самоорганизации белка. Доказательство справедливости термодинамической гипотезы самоорганизации немедленно сняло бы все вопросы о динамических свойствах белков. В этом случае нативное состояние белка отвечает глобальному минимуму энергии с очень простой — гармонической или квазигармонической — поверхностью потенциальной энергии, а сам белок по своим свойствам представляет идеальный нанокристалл, в котором возможны лишь гармонические или близкие к гармоническим колебания. О каких-либо специфических белковых движениях в этом случае не может быть и речи. Если справедлива кинетическая гипотеза сворачивания, то нативное состояние белка отвечает достаточно глубокому, но локальному минимуму энергии. В этом случае основное состояние по энергии вырождено, белок может обладать большим набором конформационных подсостояний и следует говорить об энергетическом ландшафте белковой молекулы. Если осуществляется этот вариант, то динамические свойства белка могут быть значительно богаче. Кроме обычных твердотельных колебаний могут появиться специфические белковые движения типа ограниченной диффузии. Можно говорить о жидкообразных (на малых временах) движениях.

Обычно полагают, что термодинамическая гипотеза свертывания подтверждается и доказывается классическими экспериментами К. Анфинсена. Опыты по ренатурации действительно свидетельствуют о воспроизводимости взаимного расположения элементов вторичной структуры, но они не способны доказать абсолютную воспроизводимость расположения всех атомов в макромолекуле белка и, соответственно, не позволяют напрямую решить вопрос, в каком минимуме энергии находится нативная структура — локальном или глобальном [29]?

До сих пор остается непонятным, как белки различного размера находят "свою" структуру среди громадного числа возможных. Если нативная структура выбирается как самая стабильная, то как белковая цепь успевает в этом убедиться за считанные минуты самоорганизации? Ведь для того чтобы перебрать все возможные структуры, а их порядка 10^{100} (где 100 — число аминокислотных остатков и каждый имеет около 10 конформаций) требуется астрономическое время (так называемый парадокс Левинтала [28]). Или, как предположил Левинталь [28], нативная структура не самая стабильная, но зато к ней ведет самый быстрый путь сворачивания.

Сформулируем, следуя работе А.В. Финкельштейна [63], смысл знаменитого парадокса Левинтала. Сворачивание белковой цепи ведет к падению ее энтропии S (из-за роста упорядоченности цепи) и энергии E (вследствие образования в цепи контактов между сближающимися звеньями). Напомним, что выражение для свободной энергии G имеет следующий вид:

$$G = E - TS. \quad (4.1)$$

Падение энтропии повышает, а падение энергии понижает свободную энергию цепи. Если по ходу сворачивания цепь должна близко подойти к своей конечной структуре перед тем, как начнут возникать стабилизирующие эту структуру контакты (т.е. цепь должна

потерять почти всю свою энтропию перед тем, как начнет выигрывать энергия), то повышение свободной энергии на первом этапе будет большим, а сворачивание — страшно медленным³. Именно такая картина (проигрыш всей энтропии до начала выигрыша энергии) лежит в основе знаменитого "парадокса Левинтала" [28], утверждающего, что белковая цепь не может за время жизни Вселенной найти свою самую стабильную структуру. Напротив, если есть путь сворачивания, по ходу которого падение энтропии практически тут же компенсируется падением энергии [55, 64], то по этому пути сворачивание будет идти быстро.

Исходя из изложенных выше соображений, были предложены механизмы последовательной самосборки белков, которые должны были преодолеть сформулированную Левинталем трудность [55, 64].

За последние годы активное взаимодействие теории и эксперимента привело к значительному прогрессу в понимании деталей механизма самоорганизации (см. [54–61]).

За это же время произошла существенная эволюция взглядов на белки. Около 20–25 лет назад каждый белок считался уникальным и незаменимым творением природы. Естественно, что данное мнение сразу же вызывало следующее возражение: каким образом данная уникальная последовательность могла образоваться за время существования Вселенной?

Далее, в первых компьютерных экспериментах по моделированию самоорганизации белков пришли к другой крайности и стали для простоты полагать, что последовательность звеньев в белке (или первичная структура) — случайна. Иными словами, в качестве модели белка брались случайные гетерополимеры. При более тщательном рассмотрении оказалось, что случайные последовательности не могут служить сколь угодно разумной моделью белков. Оказалось, что такие последовательности не сворачиваются в "нативную" структуру, точнее, сворачивание в "нативную" структуру оказывается не быстрым и не надежным. Это, конечно, не удивительно, так как эволюция все-таки что-то делала с белками. Этот факт нашел отражение в высказанной М.В. Волькенштейном и О.Б. Птицыным концепции белка как "слегка отредактированного случайного сополимера", при этом "редактирование" касается, в основном, окрестности активного центра [46]. Эта концепция, на наш взгляд, крайне важна для понимания как процессов сворачивания белков, так и для понимания современных представлений о динамических свойствах простых глобулярных белков.

Теоретическое изучение самосборки белков практически с самого начала ориентировалось на компьютерное моделирование, хотя был выполнен и ряд аналитических работ. В ранних работах пытались численно работать с реальными белками и максимально детально учитывать реальные взаимодействия между компонентами белка. Скоро, однако, стало ясно, что такие детальные расчеты не могут быть выполнены в обозримом будущем. Для того чтобы преодолеть вычислительный барьер, был использован другой подход. Этот подход использовал простейшие модели [58], которые

³ Согласно химической кинетике [2, 3], время протекания процесса экспоненциально зависит от достигаемого по его ходу максимального повышения свободной энергии.

1) сохраняли некую схожесть с белками, 2) были достаточно сложны для постановки нетривиальных физических вопросов и 3) воспроизводили определенные фундаментальные аспекты самосборки белка. Как полагают сами авторы данных работ, необходимо чрезвычайно осторожно подходить к результатам, получаемым с помощью этих упрощенных моделей. Следует понимать, что в данных моделях дается грубое описание, адекватное лишь на пространственно-временных масштабах, значительно превышающих микроскопические (размеры более 10 Å и времена более 1 мс соответственно) [58]. Другими словами, решеточные модели слишком грубы, чтобы правдиво описывать мелкомасштабные структурные и химические детали белковой структуры, даже локализацию или распределение по размерам вторичной структуры. "Мономеры", используемые в данных моделях — это перенормированные "квазимономеры", т.е. мелкомасштабные детали полностью вымыты из модели [62]. Так, конформацию решеточного полимера нужно понимать как огрубленное представление о расположении элементов вторичной структуры. С этой точки зрения 27-мер или даже 18-мер могут считаться адекватными однодоменному белку, имеющему обычно от 50 до 200 остатков [62].

Были развиты новые, отличные от моделей последовательной самосборки [55, 64], теоретические представления, компьютерные методы и достигнуты большие успехи в методике эксперимента [57, 61]. Упомянем две, в некотором смысле параллельные, группы работ. Первое направление работ основано на известной работе Брингельсона и Волинеса [65] и развито в серии статей (см. ссылки в обзорах [59, 60]). В них авторы исходят из положения, что полное понимание механизма самосборки требует знания энергетической поверхности самосборки. Энергетическая поверхность самосборки в грубом приближении напоминает воронку с ловушками, в которых белок может временно застревать (рис. 2). Уникального пути к нативному состоянию не существует, есть множество сходящихся путей. Брингельсон и Волинес предположили [65], что белки, в отличие от случайных гетерополимеров, удовлетворяют "принципу наименьшей фрустрации"⁴. Другими словами, белок, в

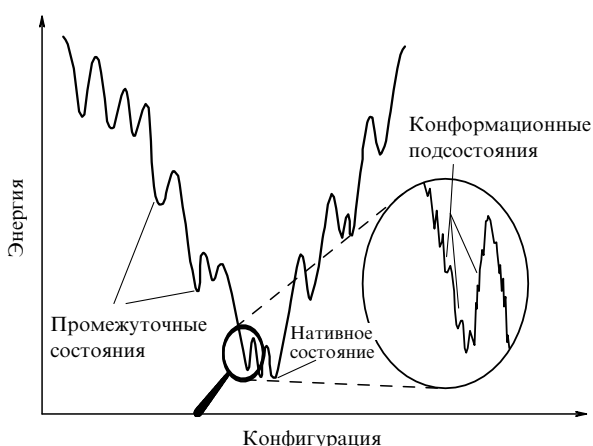


Рис. 2. Энергетическая поверхность самосборки белка (воронка с ловушками), соответствующая работе [59].

⁴ Концепция фрустрации взята из физики спиновых стекол и популярно изложена, например, в обзоре [7].

отличие от обычного случайного гетерополимера, имеет такую аминокислотную последовательность, для которой конфигурация с наименьшей энергией обладает тем свойством, что для нее почти все многочисленные взаимодействия взаимосвязаны друг с другом (не взаимосвязанных, не осуществленных (или фрустрированных) взаимодействий почти не остается). Было предположено, что результаты эволюции являются отражением принципа "наименьшей фрустрации" или принципа "гармонии" [65, 66].

Поскольку в природе встречается лишь двадцать типов аминокислот, а не бесконечное их количество, то авторы данной концепции полагают, что определенная доля фрустраций, а следовательно, и сложный энергетический ландшафт (как в спиновых стеклах) неизбежны [7, 59, 65].

В моделях последовательной самосборки белков [55, 64] всегда предполагалось, что сворачивание ведет к уникальной пространственной нативной структуре на атомном уровне, которая соответствует глобальному минимуму свободной энергии.

В группе работ, базирующихся на "принципе наименьшей фрустрации", а также в наших оригинальных работах [36, 24, 42] существенно изменилось понятие об уникальности нативной структуры. В этих работах полагается, что каждый нативный белок в ансамбле свернутых белков имеет одинаковую конформацию (или грубую структуру, фолд), но в пределах данной конформации может различаться в локальных конфигурациях. Другими словами, белок в данной конформации находится в одном из конформационных подсостояний (см. рис. 2). Энергетический ландшафт белка, отвечающего "принципу наименьшей фрустрации", имеет ряд низко лежащих уровней энергии, для каждого из которых многие структурные характеристики будут очень схожи. Для реальных белков усреднение по этим конфигурациям дает структуру, определяемую из рентгеноструктурного анализа. Отклонение данной структуры от уникальной в рентгеноструктурном анализе определяется фактором Дебая – Валлера или В-фактором.

Второе направление работ, начавшееся с известных работ Е. Шахновича и соавт. [67, 68] и получившее дальнейшее развитие в группе М. Карплуса и Е. Шахновича, а также в группе А. Фершта, прекрасно изложено в обзорах [58, 69]. В этой группе работ развиты следующие представления о механизме самосборки простейших белков. Результаты экспериментов для небольших и не содержащих дисульфидные мостики белков показывают, что самосборка, видимо, следует двухстадийному механизму [58]. Поэтому для таких (небольших) белков был выбран следующий ландшафт свободной энергии (рис. 3).

Двухуровневый профиль свободной энергии предполагает, что процесс самосборки определяется двумя характеристическими временами: 1) временем релаксации движений полипептидной цепочки в потенциале, отвечающем минимуму свободной энергии в денатурированном (развернутом) состоянии; 2) временем преодоления барьера между денатурированным и нативным состояниями.

Время преодоления полагается равным экспериментально наблюдаемому времени самосборки. Для быстрого процесса самоорганизации важно наличие большой энергетической щели между нативной и ближайшей к ней по энергии, но структурно с ней не

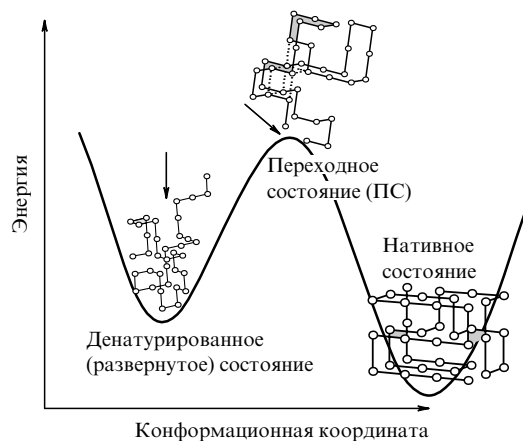


Рис. 3. Энергетическая поверхность самосборки белка, соответствующая работе [58].

связанной конформацией [58, 63]. Порядок фазового перехода определяет его кинетические особенности. Кооперативность процесса самосборки предполагает, что кинетически должен осуществляться механизм зародышеобразования, как это обычно происходит в фазовых переходах первого рода.

В соответствии с механизмом зародышеобразования в физической кинетике, система флуктуирует в "старой" фазе (денатурированное состояние) до тех пор, пока не образуется островок "новой" фазы (нативное состояние), достаточно большой, чтобы расти дальше с уменьшением свободной энергии.

Простейшим примером такого механизма является конденсация пара с образованием зародышей жидкости [70]. Если данный зародыш превышает критический размер, то он растет дальше, образуя жидкую фазу. В случае белков следует ожидать, что в переходном состоянии (ПС) имеется частично собранный фрагмент нативной структуры, который может быть идентифицирован как зародыш самосборки.

Такое кинетическое поведение было действительно найдено в эксперименте при тщательном анализе механизма самосборки небольшого белка (CI 2) методами белковой инженерии [57]. В современном механизме "зародышеобразования – конденсации" [57], зародыши новой фазы белка должны содержать по крайней мере несколько нелокальных контактов, ответственных за формирование длинных петель.

Очевидно, что принцип "наименьшей фрустрации" альтернативен механизму "зародышеобразования – конденсации".

Упомянем, что в модели "зародышеобразования – конденсации" авторы легко объясняют, как природа решает "парадокс Левинталя". Это неудивительно, поскольку любой фазовый переход первого рода сопровождается большим уменьшением энтропии, поэтому при таком механизме сворачивания белка "парадокса Левинталя" не больше, чем при конденсации пара или при каком-нибудь другом фазовом переходе первого рода.

До сих пор речь шла о самоорганизации изолированных белков. В живой клетке белки никогда не находятся в изолированном состоянии. В живой клетке самоорганизация белка происходит в тесном окружении других макромолекул [71]. Поэтому картина самосборки может

сильно поменяться при переходе к реальным условиям живой клетки. За годы эволюции природа изобрела ряд механизмов, чтобы избежать влияния межмолекулярных взаимодействий. Для этого в клетке существует целое семейство "молекулярных шаперонов" (подробнее см. [72]). А.С. Спириным и рядом других авторов полагается, что в эукариотических клетках превалирует процесс ко-трансляционного, а не пост-трансляционного сворачивания [73, 74], который рассматривался нами до сих пор. Сворачивание полипептидной цепи белка по мере ее роста на рибосоме в направлении от N-конца к C-концу (ко-трансляционное сворачивание) является альтернативой, которая представляется ряду авторов более реалистической и в биохимическом, и в физическом отношении. В пользу ко-трансляционного сворачивания говорит также ряд экспериментальных фактов [73, 74].

Вопрос, какой механизм сворачивания осуществляется на самом деле: пост-трансляционный или ко-трансляционный, а в рамках пост-трансляционного механизма сворачивания, какая гипотеза верна: термодинамическая или кинетическая? — на наш взгляд, остается остро дискуссионным.

Мы полагаем, что кинетическая гипотеза сворачивания и ко-трансляционный механизм сворачивания могут иметь общие черты. В начале сворачивания может возникнуть энергетически менее выгодная, но кинетически более доступная конформация. В дальнейшем упаковка новых ее участков будет определяться уже имеющимся "ядром". Глобальному минимуму свободной энергии всей полипептидной цепочки соответствовала бы совершенно другая конформация "ядра". Однако переход макромолекулы в конформацию, отвечающую глобальному минимуму, может быть невозможен уже кинетически. Поэтому механизм ко-трансляционного сворачивания, аналогично кинетической гипотезе сворачивания, приводит к тому, что белок в нативном состоянии находится в локальном, а не глобальном минимуме энергии.

Поскольку точность современного эксперимента при сворачивании белка не позволяет претендовать на описание мелкомасштабных деталей структуры белка [62], то особую важность приобретают экспериментальные исследования динамических и кинетических свойств нативных глобулярных белков, которые могут дать ценные сведения не только об энергетическом ландшафте макромолекулы белка, но и свидетельствовать в пользу того или иного механизма самоорганизации белков.

5. Динамические и кинетические свойства простых белков. Результаты экспериментальных исследований

5.1. Общая постановка и условия экспериментальных исследований

Экспериментальные данные, о которых пойдет речь ниже, были получены в довольно необычных для классических биологов и биохимиков условиях. Динамические и функциональные свойства белков (в основном, это данные для миоглобина) изучались в широком диапазоне температур (от 2 К до 330 К) [40, 75], времен (от

фемтосекунд до 5×10^4 с) [76], давлений (0,1–2 кбар) [77], вязкостей (10^{-2} – 10^{-7} пуаз) [78] и степеней гидратации [79, 80].

Б. Чанс был первым исследователем, который использовал низкие температуры (в начале 60-х годов) для изучения простейшей биохимической реакции с участием переноса электрона от цитохрома С к окисленной форме хлорофилла [81]. Для изучения других простейших (но уже молекулярных) реакций с участием белка миоглобина низкие температуры были впервые использованы Х. Фраунфельдером в начале 70-х годов [40].

Для чего это делалось? Ведь белки эволюционно оттачивались природой для работы при физиологических (т.е. вблизи комнатных) температурах. При физиологических температурах реакции протекают быстро, элементарные стадии взаимно перемешаны. Для того чтобы разделить элементарные стадии, надо замедлить суммарный процесс и разложить его на компоненты. Это возможно сделать при низких температурах. Фактически в данных работах используется физический (как в обычной физике конденсированного состояния) подход — свойства вещества (в данном случае белков) исследуются при предельных (но не приводящих к денатурации) значениях параметров внешней среды.

5.2. Миоглобин — атом водорода в биологии

Белки, о которых пойдет речь ниже, выбирались из следующих соображений: они должны были быть достаточно просты как в обращении (для использования экспериментального физического подхода), так и по своей функции, чтобы можно было добиться определенного прогресса в понимании принципов их функционирования. В то же время их функция должна быть достаточно сложна, т.е. иметь определенный биологический смысл. Для этих целей очень хорошо подходят так называемые гемовые белки и, в первую очередь, миоглобин.

Миоглобин (Mb) был выбран для большинства исследований, описанных в этом разделе. Это хорошо изученный простой белок, осуществляющий простые функции связывания и накопления кислорода в мышцах, особенно у водных млекопитающих (кашалотов), способствующий диффузии кислорода в клетке



Одной из конкурентных реакций является связывание миоглобином угарного газа (CO)



Молекулы O_2 и CO являются лигандами миоглобина. Эти обратимые реакции (5.1) и (5.2) были использованы (и используются) для изучения теории химических реакций в белках, процесса функционирования белка, а также для изучения динамических свойств белков.

Миоглобин относится к α -спиральным белкам. Первичная аминокислотная последовательность состоит из 153 аминокислотных остатков. Вторичная структура представляет собой восемь α -спиралей (рис. 4а). α -спирали вместе с боковыми группами сворачиваются в трехмерную структуру с приблизительными размерами $2 \times 3 \times 4$ нм³, показанную на рис. 4б. Внутри структуры находится гемовая группа (протопорфирин IX) или гем

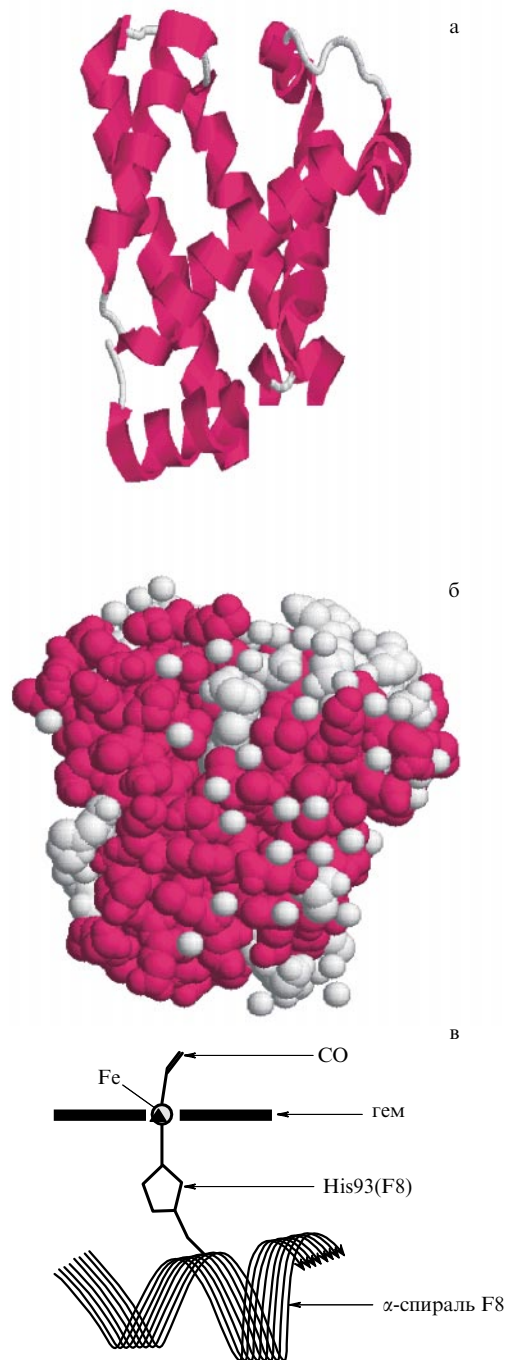


Рис. 4. (а) Вторичная структура миоглобина (восемь α -спиралей); (б) пространственная структура миоглобина; (в) схематическое изображение гема со связанным CO и ближайшей к гему α -спирали (F8).

атомом железа в центре группы (рис. 4в). Лиганды связываются с железом гема (рис. 4в). α -спиральные белки обычно имеют грубую симметрию: α -спирали образуют каркас из ребер полиэдра [82]. О миоглобине известно практически все, что вообще известно о белках. Первой белковой структурой, которая была расшифрована Кендрью, была структура Mb [83] и т.д. Известно, насколько хорошо изучен в химии атом водорода. Многочисленные экспериментальные результаты, полученные в последнее время для Mb с помощью различных методик, позволяют считать данный белок аналогом атома водорода в биологии [8, 76]. Остальные белки, которые будут упомянуты ниже, такие как лизоцим и

другие, исследованы также достаточно хорошо, но хуже, чем Mb.

5.3. Холодовая денатурация в белках

Многие биохимики довольно скептически отнеслись к первым результатам, полученным при низких температурах, полагая, что в процессе охлаждения водно-белковых смесей возможна частичная или полная денатурация белка. Предпринимались специальные исследования, посвященные холодовой денатурации (см., например, [84, 85]). В работе [84] было обнаружено, что в определенном диапазоне рН от 3,5 до 3,9 метмиоглобин претерпевает структурный переход, похожий на денатурационный, не только при нагревании, но и при охлаждении системы до $-5 - 10^\circ\text{C}$. В работе [85] сделан вывод о частичной денатурации белков при замораживании их в водных растворах. Однако добавление глицерина или сахарозы — так называемых криопротекторов — препятствует частичной, а тем более, полной денатурации [85]. Поскольку исследования, о которых ниже будет вестись речь, проводились с криопротекторами (использовались водно-глицериновые системы), то явлениями частичной или полной денатурации белков в указанных исследованиях можно пренебречь. Аналогичный вывод можно сделать и в отношении образцов белков, находящихся в кристаллическом состоянии. В них отсутствие эффектов денатурации доказывается прямым рентгеноструктурным анализом.

5.4. Концепция конформационных подсостояний (КП) и энергетический ландшафт белковой макромолекулы

При комнатной температуре Mb ведет себя как очень простой и даже "скучный" белок. Однако первые же кинетические исследования, проведенные группой Х. Фрауэнфельдера, при низких температурах показали наличие чрезвычайно большого количества неизвестных и очень интересных явлений. В этих экспериментах исследовалась кинетика повторного связывания СО миоглобином после флеш-фотолиза MbCO [40, 75]. По сути дела, именно в этих исследованиях и начало формироваться современное представление об энергетическом ландшафте белковых макромолекул.

В таблице 1 приведены основные экспериментальные данные, приведшие к новой для физики белков концепции о наличии конформационных подсостояний (КП) в макромолекулах белка. В рамках этой концепции все макромолекулы из ансамбля одинаковых белков обладают одинаковой грубой структурой — конформацией, но каждая макромолекула в пределах конформации несколько отличается от других макромолекул по своей локальной структуре (повороты относительно σ -связей, сдвиги водородных мостиков, флуктуационный разрыв и восстановление водородных связей и, как следствие этого, небольшие сдвиги молекулярных крупных групп, фрагментов относительно других частей глобулы) [39–42]. Эти небольшие различия в структуре приводят к тому, что каждая макромолекула белка имеет свой барьер H для связывания СО (см. табл. 1 (пункт А1)).

Если концепция КП у макромолекулы белка справедлива, то это означает, что основное состояние (по энергии) у нативного белка вырождено. Иными словами, это означает, что конкретная белковая макромолекула находится не в глобальном минимуме энергии, а в локальном. В этом случае следует говорить не об

энергетических уровнях, как в атомах или простых молекулах, а об энергетическом ландшафте белковой макромолекулы. Наличие энергетического ландшафта у белков позволяет сделать выводы: 1) о предпочтительности кинетической или ко-трансляционной гипотез свертывания перед термодинамической; 2) наличие очевидной аналогии в энергетических ландшафтах глобул белка и стекол позволило нам выдвинуть предположение о том, что для белков, аналогично случаю стекол, в низкотемпературной теплоемкости должен содержаться линейный член C_1T [39]. Все дальнейшие эксперименты подтвердили это предположение (см. табл. 1, пункт А2).

5.5. Энергетический ландшафт миоглобина при низких температурах ($T \leq 20\text{ K}$)

Резонансная частота определенного оптического перехода хромофора зависит от конформации белка, поэтому она служит индикатором структуры белка в данный момент времени. Структурные изменения белка, в котором находится хромофор, приводят к флуктуациям частот перехода. Эти флуктуации называются спектральной диффузией [100]. Методами, с помощью которых можно измерить спектральную диффузию, являются лазерное выжигание дыр и фотонное эхо, эти методы комплементарны друг другу (детальное описание этих методов и эксперимента можно найти в работе [100]). В указанной работе была исследована спектральная диффузия гемовой группы миоглобина в интервале температур от 100 мК до 20 К и времен от наносекунд до нескольких дней. Использование комбинации методов выжигания дыры и фотонного эха позволило установить детальную структуру энергетического ландшафта миоглобина в данном диапазоне температур. На рисунке 12 приведено схематическое изображение энергетического ландшафта миоглобина в диапазоне до 10 кДж моль^{-1} . Данное исследование подтвердило наличие конформационных подсостояний в миоглобине и указало на иерархию в энергетическом ландшафте миоглобина. Оказалось, что число КП на самом низком по иерархии уровне невелико — около трех-четырех. Данный результат достаточно хорошо согласуется с данными низкотемпературной калориметрии белков.

5.6. Свойства белков при $T > 220\text{ K}$.

Равновесные флуктуации

В становлении представлений о наличии конформационных подсостояний (КП), кроме приведенных в табл. 1 результатов и методик, важнейшую роль сыграли рентгенодинамический анализ (РДА), рассеяние нейтронов (РН), мёссбауэровская спектроскопия (МС) и рэлеевское рассеяние мёссбауэровского излучения (РРМИ). В этих методиках есть общее: для описания структурно-динамических свойств исследуемого вещества используются взятые из арсенала физики твердого тела корреляционные функции Ван-Хова [101], в которых содержится вся пространственно-временная информация об исследуемом веществе (в нашем случае белке).

Данные методы сильно различаются по своему энергетическому разрешению и, как следствие, по исследуемому диапазону времен корреляции специфических белковых движений. У РДА энергетическое разрешение порядка 1 эВ, поэтому данный метод вообще не содержит информации о временах корреляции движений и не дает

Таблица 1. Наблюдаемые в различных экспериментах "кристаллоподобные" и "стеклоподобные" свойства белков при различных температурах

"Кристаллоподобные" свойства белков	"Стеклоподобные" свойства белков		
1. Устойчивость (стабильность) структуры.	Наличие энергетического ландшафта. Энергетический ландшафт изменяется в зависимости от температуры и других внешних воздействий		
2. Наличие определенной структуры (конформации или фолда) по данным рентгеноструктурного анализа [13]. 3. Высокая плотность упаковки [14], особенно в области, близкой к активному центру. 4. Кооперативность процесса денатурации [15]. 5. Механические свойства белков (модуль Юнга) близки к твердым телам — молекулярным кристаллам и стеклообразным полимерам [16].	А. Область температур $T < 160$ К 1. Неэкспоненциальный (степенной) характер кинетики повторного связывания СО миоглобином при температурах ниже 160 К (рис. 5а). Неэкспоненциальная временная зависимость объясняется тем, что барьер, который должен преодолеть СО для связывания с Mb, различен по величине для каждой белковой макромолекулы. Величина $g(H) dH$ определяет вероятность нахождения барьера в интервале $H + dH$. В данном эксперименте впервые появились распределения $g(H)$ (рис. 5б) [40, 41]. 2. Эксперименты по низкотемпературной теплоемкости белков показывают наличие линейного члена $C_1 T$ во всех исследованных к настоящему времени биополимерах [39, 86–89]. Удельная теплоемкость кристаллического образца метмиоглобина показана на рис. 6. Величина C_1 уменьшается с увеличением степени гидратации [89] (см. рис. 7). 3. Лазерное выжигание дыр. Рисунок 8 демонстрирует лазерное выжигание узкой линии (или дыры) в уширенной спектральной линии миоглобина [90].	Б. Переходная область температур ($160 < T < 220$ К) 1. Структурная релаксация в белках неэкспоненциальна по времени и неаррениуссова по температуре [77, 91]. 2. Метастабильность состояния белка. Метастабильность системы означает, что состояние системы ниже точки стеклования определяется ее предисторией. В работе [77] (см. рис. 9) образец из начального состояния (I) сперва замораживали (F), а потом прикладывали давление (P), во втором случае сначала прикладывали давление (P) и затем замораживали образец (PF). В равновесии свойства системы не зависят от пути (или истории системы), поэтому свойства водно-белковой системы в точках (FP) и (PF) должны совпадать. Измерялась полоса поглощения СО в образце swMbCO в 75%-ном растворе глицерина с водой, начальные и конечные температуры и давления были равны $T_i = 225$ К, $T_f = 100$ К, $P_i = 0,1$ МПа, $P_f = 200$ МПа. Оказалось, что инфракрасные спектры, измеренные в точках (FP) и (PF) значительно отличаются друг от друга [77]. Это означает, что белок ниже некой критической температуры $T_c \approx 200$ К находится в метастабильном состоянии. 3. Стеклование в водно-белковых системах. Наличие в водно-белковых системах фазового перехода вблизи некой критической температуры $T_c \approx 200$ К продемонстрировано в калориметрических экспериментах [92–97]. Внешне этот переход напоминает фазовый переход из стекла в переохлажденную жидкость для обычных стеклообразующих жидкостей или стеклообразных полимеров, поэтому T_c часто называется в литературе точкой стеклования T_g (рис. 10а). Тщательное изучение гидратированного лизоцима [92], а именно, использование существенно меньших скоростей нагрева около $0,05$ К мин^{-1} , показывает (рис. 10б), что в области от 160 К до 180 К наблюдается размягчение стекла, затем в области от 180 К до 210 К — его частичная кристаллизация. Несмотря на очевидные аналогии, наблюдаемые в переходе типа "стеклования" в водно-белковых системах и переходе стеклования в обычных стеклах, наличие, как минимум, одно существенное различие — часть водной компоненты водно-белковой системы ведет себя абсолютно необычно для перехода стеклования, а именно, сначала превращается в жидкость, а затем с повышением температуры кристаллизуется в процессе перехода. При дальнейшем повышении температуры происходит кластерное плавление этой кристаллизовавшейся воды [25, 92].	В. $T > 220$ К 1. Зависимость T_g от степени гидратации $T_g = T_g(h)$. Проведенные немногочисленные эксперименты четко показывают, что температура стеклования является функцией степени гидратации макромолекулы $T_g = T_g(h)$. С уменьшением степени гидратации кристаллического лизоцима температура стеклования повышается (рис. 11) [96]. Аналогичные зависимости установлены для белков легумина [98], коллагена и цитохрома С (подробнее см. обзор [99]). При степенях гидратации $h < 0,05 - 0,1$ температура стеклования повышается выше комнатной температуры (300 К) и при полной дегидратации приближается к 400 К [99].

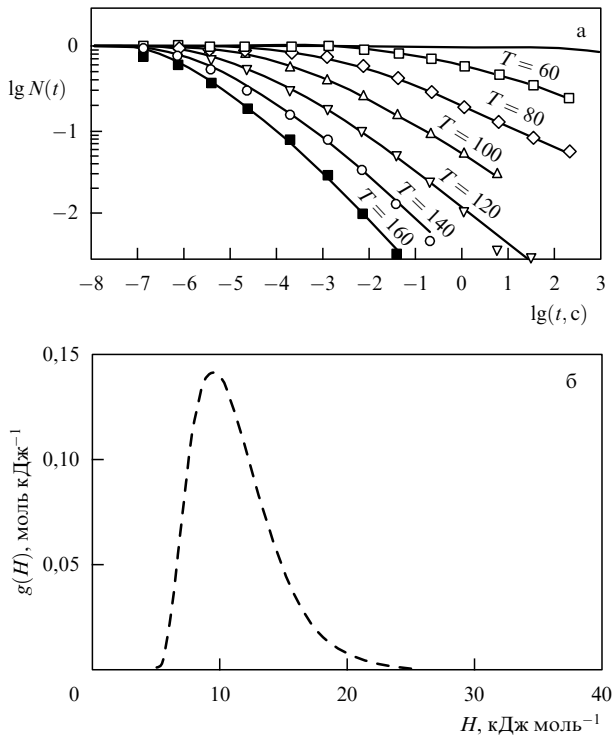


Рис. 5. (а) Кинетика повторного связывания СО миоглобином после флэш-фотолиза в интервале температур от 60 К до 160 К; (б) функция распределения энthalпии активации.

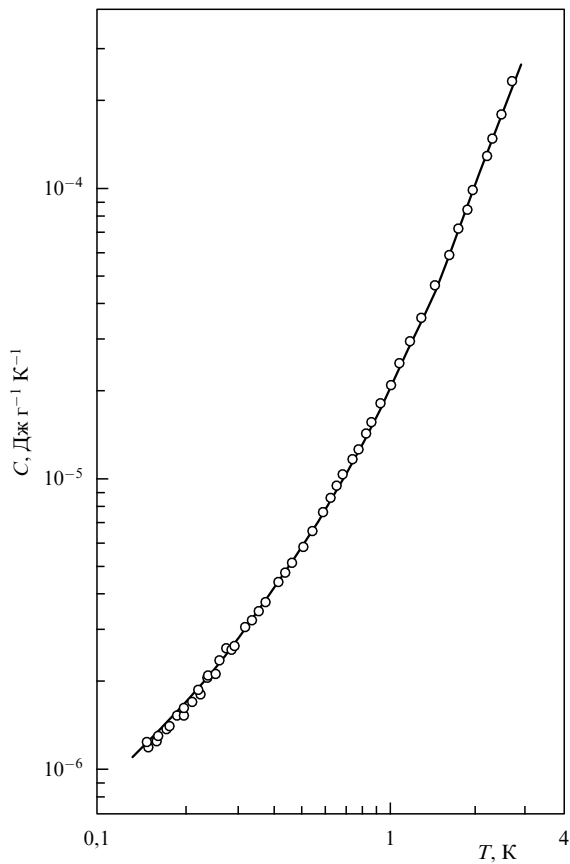


Рис. 6. Удельная теплоемкость миоглобина в кристаллическом состоянии в зависимости от температуры.

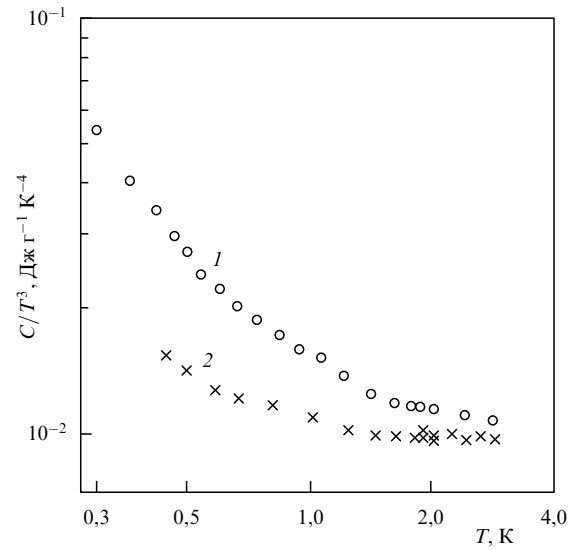


Рис. 7. Удельная теплоемкость для образцов меланина с различным содержанием воды: 1 — 47 % H₂O, 2 — 89 % H₂O.

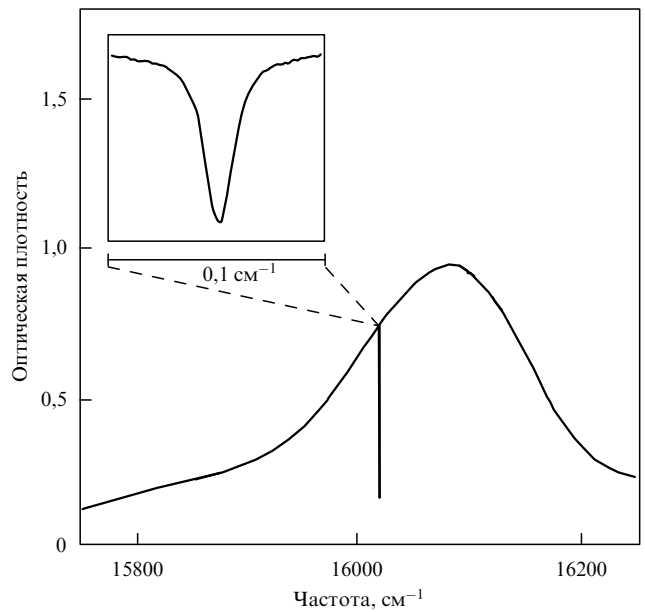


Рис. 8. Лазерное выжигание узкой линии (дыры) в уширенной спектральной линии миоглобина.

возможности различать реальные движения от статического беспорядка [102]. В то же время РДА как метод уникален, поскольку дает общий срез динамических свойств макромолекулы через индивидуальные среднеквадратичные смещения ($\langle x^2 \rangle$) атомов С, О, N.

В лучших нейтронных спектрометрах разрешение не превосходит 10^{-6} эВ, поэтому рассеяние нейтронов дает информацию о динамике белков в интервале времен, меньших 100 пс [102]. В нейтронных экспериментах извлекается динамическая информация, усредненная по всем атомам водорода макромолекулы.

Мёссбауэровская спектроскопия (МС) [102, 22] обладает энергетическим разрешением порядка 10^{-9} эВ и, соответственно, чувствительна к движениям мёссбауэровского ядра (обычно это ядра ^{57}Fe , находящиеся в

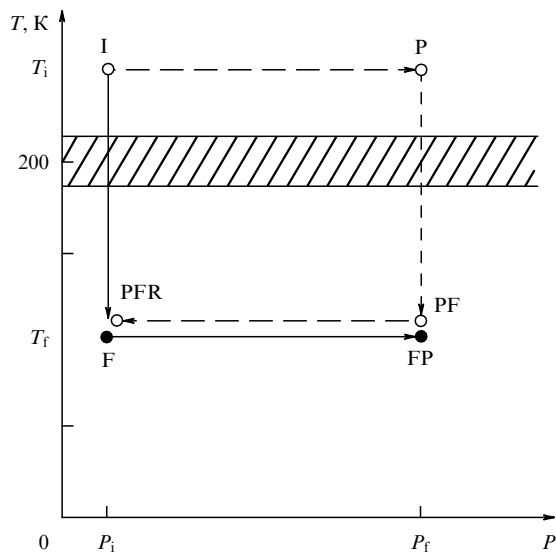


Рис. 9. Схематическое изображение эксперимента по определению зависимости свойств системы от предыстории образца. По работе [77]. Подробности в табл. 1.

активном центре глобулы) в интервале времен, меньших 100 нс.

Среди современных физических методов исследования значительную роль играет метод рэлеевского рассеяния мёсбауэровского излучения (РРМИ), в становлении которого заметная роль принадлежит авторам обзора [102, 22, 25, 26, 103–105]. РРМИ представляет собой комбинацию рентгеноструктурного анализа и мёсбауэровской спектроскопии с высоким (рекордным) энергетическим разрешением, равным разрешению мёсбауэровской спектроскопии. Изучение динамики белков проводится обычно с помощью двух различных экспериментальных вариантов метода. В первом варианте используются мягкие условия коллимации (ширина функции углового разрешения составляет 8 градусов). В этом варианте нами изучалась доля упругого рассеяния для различных белков и спектры РРМИ [23, 25, 103]. Из доли упругого рассеяния определяют "обобщенную"

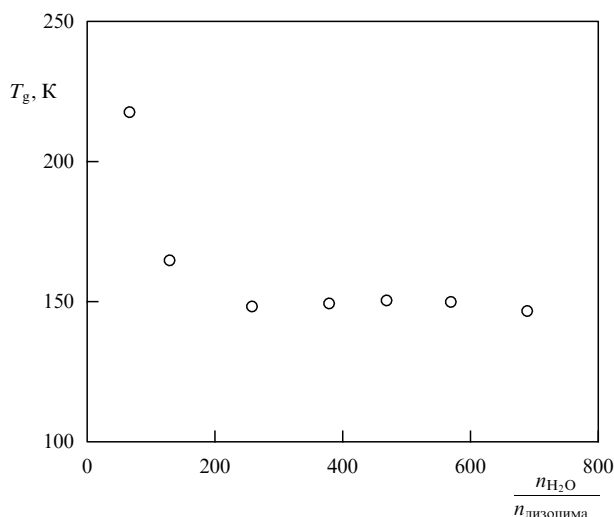


Рис. 11. Зависимость перехода стеклования от содержания воды в кристаллах лизоцима [96].

среднеквадратичную амплитуду смещений белковых движений $\langle x^2 \rangle_R$, измерение спектров РРМИ позволяет фиксировать времена корреляции белковых движений в диапазоне $10^{-7} - 10^{-9}$ с. Во втором варианте метода используются жесткие условия коллимации (ширина функции углового разрешения не превышает 2 градусов). В данном варианте возможно определять размеры и форму движущихся внутри глобулы сегментов посредством изучения угловых зависимостей интенсивности неупругого рассеяния [26, 104, 105].

5.6.1. Данные методов мёсбауэровской спектроскопии и рэлеевского рассеяния мёсбауэровского излучения. Мёсбауэровская спектроскопия и рэлеевское рассеяние мёсбауэровского излучения сыграли большую роль в изучении равновесных флуктуаций в макромолекулах белков. Напомним основные экспериментальные факты для белков, полученные с помощью МС и РРМИ (мягкие условия коллимации) и требующие своего объяснения [19–26].

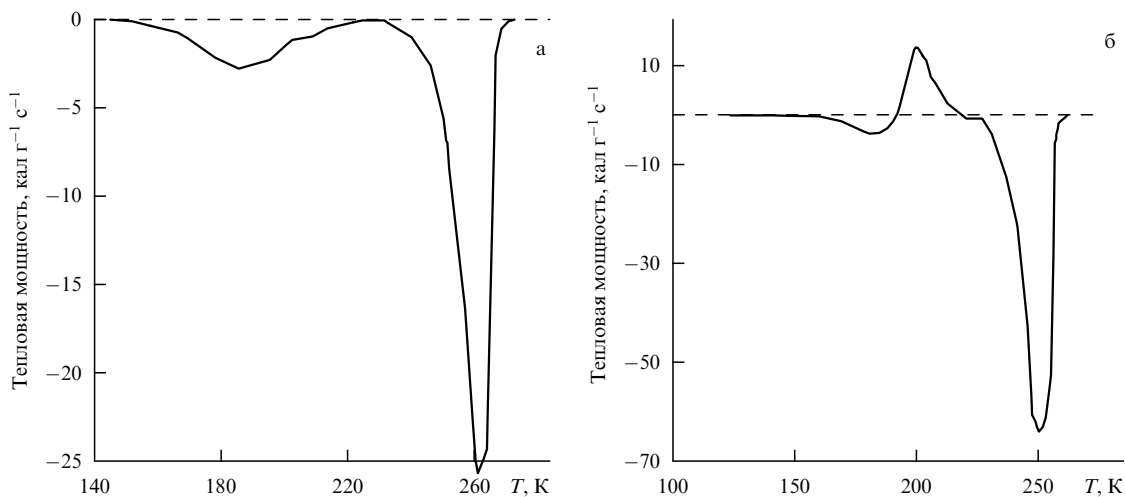


Рис. 10. Калориметрическая кривая размораживания гидратированного лизоцима. Скорость охлаждения до 77 К равна 200 К мин⁻¹. Скорость размораживания: (а) 0,2 К мин⁻¹, (б) 0,05 К мин⁻¹. По работе [92].

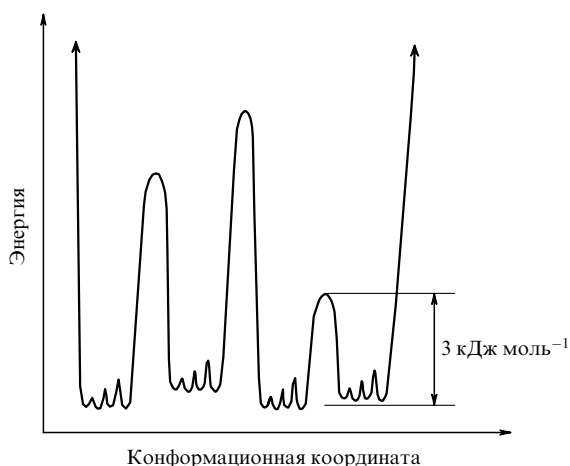


Рис. 12. Схематическое изображение энергетического ландшафта миоглобина в диапазоне до 10 кДж моль⁻¹. Данные взяты из работы [100].

В области низких температур средневекторная амплитуда смещений $\langle x^2 \rangle_{Fe}$ слабо изменяет свое значение в интервале от 4,2 К до 25 К [106, 107] и далее линейно возрастает (в фиксированном окне измерения) вплоть до 200 К [106, 108]. Эту область температур называют "нормальной", поскольку в данной области как эволюция формы линии спектров МС и РРМИ, так и поведение $\langle x^2 \rangle_{Fe}$ и $\langle x^2 \rangle_R$ аналогичны изменениям этих же величин для обычных твердых тел.

При некой критической температуре $T_c > 200$ К практически для всех изученных белков значения эффекта Мёссбауэра f' и доли упругого рассеяния f_R (в фиксированном окне измерения) резко падают⁵ (рис. 13а).

Температуру $T_c \approx 200$ К, при которой начинается резкий рост $\langle x^2 \rangle_{Fe}$ и $\langle x^2 \rangle_R$, обычно связывают с температурой стеклования водно-белковой системы T_g . Уменьшение f' и f_R сопровождается очень своеобразным изменением формы линии — наряду с "узкой" компонентой появляется так называемая "широкая" [19–25, 103, 108, 109], в результате чего наблюдаемая форма линии становится нелоренцевой (рис. 13б).

Считается, что в этой области температур появляются специфические (т.е. отличные от обычных гармонических колебаний) белковые движения, ответственные за необычное поведение f' и f_R и своеобразную эволюцию формы линии. Первоначально такое своеобразное поведение f' и f_R , а также мёссбауэровских спектров и спектров РРМИ, описывалось в простейших моделях фазового перехода и броуновского осциллятора с сильным затуханием [20–22]. Достаточно полный обзор экспериментальных результатов и моделей, описывающих специфические белковые движения, дан в работах [19–21, 110, 22, 25, 26].

Анализ, проведенный в работах [20–26] с помощью различных теоретических моделей показал, что в белках существует, как минимум, два вида специфических белковых движений: 1) индивидуальные движения не-

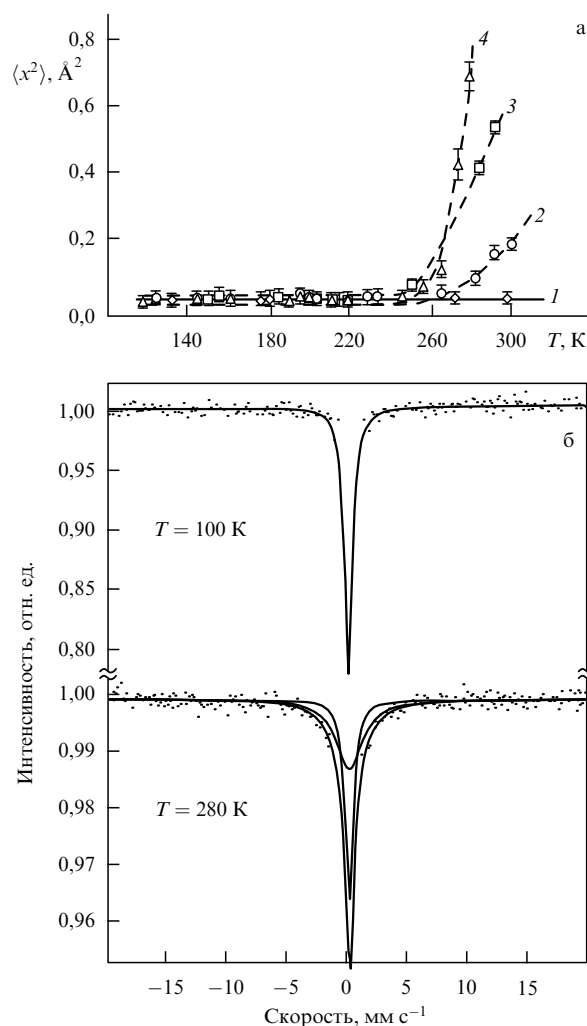


Рис. 13. (а) Зависимость обобщенного средневекторного смещения от температуры для различных образцов метмиоглобина: 1 — образец со степенью гидратации $h = 0,05$, 2 — поликристалл, 3 — $h = 0,5$, 4 — $h = 2,3$ [25]; (б) спектры РРМИ для метмиоглобина с $h = 0,7$ при $T = 100$ К и $T = 280$ К [25].

больших атомных групп (переходы между КП) с временами корреляции τ_c порядка $10^{-9} - 10^{-11}$ с и 2) сложные кооперативные движения больших атомных групп или отдельных частей макромолекулы с временами корреляции τ_c порядка $10^{-7} - 10^{-8}$ с. Оба этих вида движения имеют характер ограниченной диффузии и на малых временах $t \ll \tau_c$ "жидкообразны" [22–26].

Иерархия в структурной организации белка отражается в иерархии амплитуд и времен корреляции внутримолекулярной подвижности. Очевидно, что вовлечение во внутримолекулярную подвижность различных атомных групп должно проявляться в наличии широкого спектра времен корреляции внутримолекулярной подвижности $G(\tau)$ [20–22]. Действительно, для описания эволюции формы линии в более поздних и более прецизионных исследованиях в качестве одной из моделей использовался иерархический броуновский осциллятор с учетом спектра времен корреляции $G(\tau)$ [21].

Сравнительно недавно специфические белковые движения в миоглобине (данные МС) и сывороточном альбумине человека (данные РРМИ) были проанализи-

⁵ Соответственно $\langle x^2 \rangle_{Fe}$ и $\langle x^2 \rangle_R$ резко возрастают и при комнатной температуре значительно превосходят амплитуду колебаний атомов или атомных групп для дегидратированных белков или обычных твердых тел.

рованы с помощью модели прыжковой диффузии с распределенным временем ожидания τ прыжка $G(\tau)$ [109]. В качестве функций распределения времени ожидания прыжка τ были выбраны хорошо известные функции распределения (или спектры времен корреляции $G(\tau)$) Коула–Девидсона, Коула–Коула и Негами–Хаврилиака [50]. Изучение угловых зависимостей интенсивности неупругого рассеяния для миоглобина и лизоцима [104, 105] методом РРМИ с жесткими условиями коллимации показало, что сложные кооперативные движения представляют собой движения элементов вторичной структуры: альфа-спиралей в случае миоглобина, альфа-спиралей и бета-складок в случае лизоцима [104, 105].

5.6.2. Рассеяние нейтронов (РН). Перейдем к данным по рассеянию нейтронов (РН). В последнее время появилось много работ [18, 111, 112], в которых была исследована "обобщенная" динамика белков. РН имеет определенные преимущества перед описанными выше методами, например, РРМИ. В методе РН часто используют тот факт, что сечение рассеяния на водороде существенно превышает сечение рассеяния на дейтерии. Поэтому, если белок гидратирован в D_2O , то в эксперименте извлекается "обобщенная" (усредненная по глобуле) информация об амплитуде среднеквадратичных смещений атомов водорода собственно белка, $\langle x^2 \rangle_H$, а не всей водно-белковой системы (как, например, в РРМИ). В работах [18, 111] с помощью некогерентного рассеяния нейтронов (энергетическое разрешение порядка 10^{-2} эВ) был исследован гидратированный в D_2O миоглобин ($h = 0,38$) в диапазоне температур от 4 до 350 К. При $T > 200$ К интенсивности упругого и неупругого рассеяния хорошо разрешаются. Из этих измерений извлекалась температурная зависимость $\langle x^2 \rangle_H$. Поведение $\langle x^2 \rangle_H$ оказалось аналогичным поведению $\langle x^2 \rangle_{Fc}$ в мёсбауэровской спектроскопии и $\langle x^2 \rangle_R$ в РРМИ. В диапазоне от 4 К до 180 К поведение интенсивности упругого рассеяния аналогично поведению интенсивности в твердом теле. Критическая температура T_c , или переход стеклования в макромолекуле белка T_g , находится в той же области температур, что и по данным РРМИ и МС, т.е. в области 180–200 К. Квазиупругое рассеяние становится важным при $T > 200$ К. Наличие квазиупругой компоненты в спектрах РН, так же как в мёсбауэровских спектрах и спектрах РРМИ, означает появление специфических белковых движений, которые обычно моделируются движениями диффузионного типа. В указанных работах [18, 111] некогерентное РН было использовано для изучения специфических белковых движений, теоретического описания их с помощью "жидкообразных" моделей и выяснения природы перехода около 200 К в белках.

При интерпретации данных авторы исходили из наличия полной аналогии в динамических свойствах белков и стекол (переохлажденных жидкостей) [18, 111]. Критическая температура T_c рассматривалась как температура стеклования T_g , а природа перехода около 200 К анализировалась в рамках теории связанных мод (ТСМ), развитой для описания фазового перехода стекло–жидкость в простых стеклообразующих жидкостях [113]. Форма линии интенсивности неупругого рассеяния при $T > 180$ К анализировалась либо с помощью упомянутой выше теории связанных мод (ТСМ), либо с

помощью модели прыжковой диффузии с распределенным временем ожидания прыжка по Коулу–Девидсону. Оказалось, что теория связанных мод достаточно хорошо описывает данные по РН, при использовании лишь двух подгоночных параметров. Эксперименты по рассеянию нейтронов также хорошо описываются с помощью модели прыжковой диффузии с распределенным временем ожидания прыжка τ , где в качестве функции распределения была выбрана функция Коула–Девидсона.

В недавней работе [112] получена информация о динамических свойствах отдельных выделенных частей белка бактериородопсина (BR). Для этого в ряде пространственных положений BR водород был заменен дейтерием. В данной работе было обнаружено (см. [112] и комментарий к ней [114]), что усредненная по макромолекуле T_g для бактериородопсина равна $T_g \approx 150$ К, тогда как T_g , близкая к району активного центра, существенно повышается и составляет $T_g \approx 220$ К. Это подтверждает высказанное нами ранее предположение о сильной гетерогенности динамических свойств белковой глобулы, в данном случае проявляющееся в том, что различные области белковой макромолекулы имеют разные T_g [39].

5.6.3. Рентгенодинамический анализ (РДА). К настоящему времени существует уже достаточно много примеров рентгенодинамического анализа белков. Большинство из них посвящено метмиоглобину [41, 115]. В основополагающей работе Фрауэнфельдера и соавторов [41] температурный интервал измерений составлял от 220 до 300 К. В остальных работах этот интервал был существенно расширен в сторону низких температур, вплоть до 40 К [115, 116]. Целью работы Фрауэнфельдера и соавторов [41] было прямое экспериментальное доказательство существования конформационных подсостояний. На рисунке 14, взятом из работы [114], приведена зависимость среднеквадратичных смещений $\langle x^2 \rangle$ от номера аминокислотного остатка миоглобина (Mb),

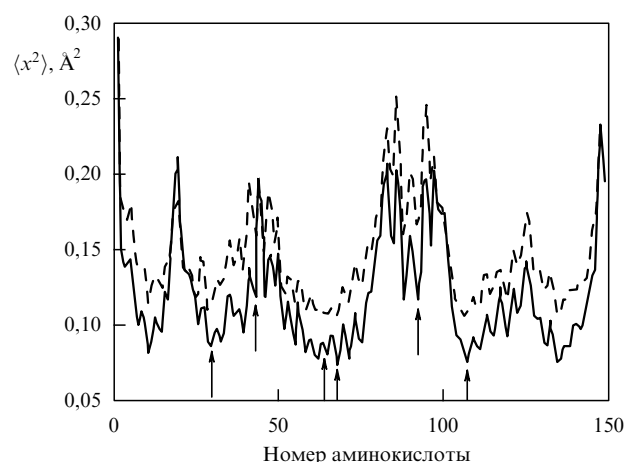


Рис. 14. Зависимость среднеквадратичных смещений $\langle x^2 \rangle$ от номера аминокислотного остатка миоглобина со связанным кислородом (сплошная линия) и без кислорода (штриховая линия) при температуре 80 К. Смещения усреднены по атомам остова $-N-C-C-$ каждой аминокислоты. Стрелки показывают пять дистальных консервативных аминокислотных остатков, окружающих гемовый карман [114].

пересчитанных из величин фактора Дебая–Валлера для температуры 80 К. Смещения усреднены по атомам остова –N–C–C– каждой аминокислоты. Данную картину весьма трудно объяснить в гармоническом приближении, поэтому ее объясняют, используя концепцию КП или структурные распределения [41, 116].

Макромолекулы Mb в различных КП имеют слегка различающиеся структуры и поэтому среднеквадратичные смещения $\langle x^2 \rangle$, определяемые в эксперименте для ансамбля макромолекул Mb, имеют значения $\langle x^2 \rangle$, значительно превышающие таковые, в случае, если бы атомы совершали только колебания. Результаты РДА показывают, что число КП велико в петлях и мало вдоль α -спиральных участков глобулы Mb. Оно существенно зависит от температуры. Из данных РДА на metMb вырисовывается следующая картина динамических свойств макромолекулы белка при комнатной температуре: существует "твердотельное" ядро (область с малыми значениями $\langle x^2 \rangle \leq 0,04 \text{ \AA}^2$, здесь КП нет вообще или их очень мало) и "жидкоподобная" внешняя оболочка ($\langle x^2 \rangle \geq 0,04 \text{ \AA}^2$, с нарастающим числом КП при приближении к периферии глобулы). При комнатной температуре размеры "жидкоподобной" области много больше, чем твердотельного ядра. С уменьшением температуры размеры твердотельной области увеличиваются.

Если принять концепцию КП и наличие температуры стеклования $T_g = T_c$ в белковой глобуле, то ниже T_g каждый белок "заморожен" в своем КП. Выше T_g атомные группы могут перемещаться из одного КП в другое. РДА при $T < T_g$ показывает наличие "замороженных" распределений атомных групп по КП, поэтому для ряда групп даже при низких температурах $\langle x^2 \rangle \geq 0,04 \text{ \AA}^2$ (см. рис. 14). Напомним, что для совершения акта ферментативного катализа и других функций работающие глобулярные белки должны обладать активным центром с определенным (упорядоченным) взаимным расположением и взаимной ориентацией аминокислотных остатков [46]. РДА полностью подтверждает наличие такого активного центра. Стрелки на рис. 14 показывают пять консервативных аминокислотных остатков макромолекулы Mb (Leu-29, Phe-43, His-64, Val-68 и Ile-107), которые окружают связанную молекулу кислорода и His-93, который связан с атомом железа с проксимальной стороны гемовой группы. Эти консервативные аминокислотные остатки имеют малые $\langle x^2 \rangle$ (т.е. не имеют КП) и образуют или, точнее говоря, принадлежат аperiodическому твердотельному ядру или активному центру макромолекулы. Большинство других остатков с проксимальной стороны гемовой группы или далеко от гемовой группы не консервативны, имеют большие $\langle x^2 \rangle$ и "жидкоподобны" (см. рис. 14).

5.6.4. Насколько полезны простые гармонические модели?

Приведенные в табл. 1 и разделах 5.6.1–5.6.3 экспериментальные данные дают очень весомые аргументы о наличии конформационных подсостояний (КП) в макромолекуле, иными словами о вырожденности (по энергии) основного состояния у нативной макромолекулы белка. Предпринималось, однако, довольно много попыток альтернативного объяснения приведенных экспериментальных данных. Полагалось, что макромолекула находится в глобальном минимуме по энергии и характеризуется гармонической или близкой к ней поверхностью

потенциальной энергии. В этих работах использовалось квазигармоническое приближение [117–122], приближение нормальных мод [120–124] и приближение основных компонент [123]. Указанные подходы [117–124] способны объяснить отдельные экспериментальные данные, но встречаются большие трудности при объяснении совокупности данных даже при температуре, выше критической ($T > T_c = 200 \text{ K}$) [125, 126].

В этих работах существенно критикуются данные РДА, поскольку в приведенных данных по РДА не учитывался вклад движения глобулы как целого. Полагается, что если учесть вклад движения глобулы как целого, то все среднеквадратичные смещения $\langle x^2 \rangle$, ответственные за внутримолекулярную подвижность, станут много меньше по абсолютной величине и приблизятся к значениям, характерным для обычных колебаний.

Нами [104, 105] с помощью РРМИ с жесткими условиями коллимации изучена угловая зависимость интенсивности неупругого рассеяния для миоглобина со степенью гидратации $h = 0,7$ (рис. 15). В расчетную кривую, наилучшим образом описывающую результаты эксперимента, вносят вклад движения α -спиралей, индивидуальные движения атомов и малых групп, движения молекул свободной воды, связанной воды и лишь на последнем месте стоит вклад движения макромолекулы как целого. Нами специально была предпринята еще одна попытка описать экспериментальную кривую в предположении, что основным типом движения является движение глобулы как целого. Результат данной попытки также изображен на рис. 15. Из сравнения этих двух попыток очевидно, что интенсивный вклад внутримолекулярной подвижности от α -спиралей и индивидуальных движений атомов и малых групп в совокупности с небольшим вкладом движения макромолекулы белка как целого значительно лучше описывает экспериментальные данные, чем картина, когда наиболее интенсивный вклад вносят движения макромолекулы как целого. О малости вклада движений макромолекулы как целого.

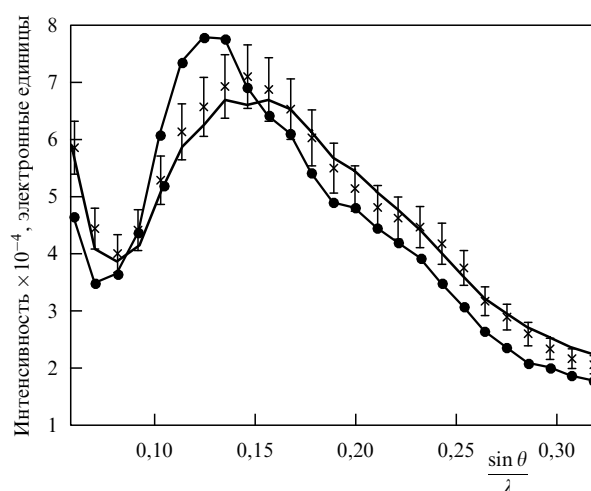


Рис. 15. Угловая зависимость интенсивности неупругого рэлеевского рассеяния мёсбауэровского излучения для миоглобина (степень гидратации $h = 0,7$) (указана ошибками измерения) и две кривых: сплошная линия (наилучшее согласие) — α -спиралей и индивидуальные движения рассматриваются как движущиеся сегменты; —●— — движения макромолекулы как целого, 2θ — угол рассеяния [104, 105].

лекулы как целого в данные РРМИ см. также [127]. Следует заметить, что данный вывод не справедлив для случая рентгеноструктурного анализа, поскольку методика РРМИ чувствительна лишь к движениям с временами корреляции, меньшими 10^{-7} с, тогда как в данные рентгеноструктурного анализа вносит вклад даже статистический беспорядок.

При низких температурах ($T < T_c$) "стеклоподобные" свойства макромолекул белка проявляются в значительно большей степени (см. табл. 1), обнаружены в большом количестве экспериментов и представляется практически нереальным объяснить совокупность изложенных в разделе 5 экспериментальных фактов с помощью моделей, использующих различные квазигармонические приближения [117–126].

5.6.5. Пространственно-временные характеристики специфических белковых движений. Методы МС, РРМИ, РН и РДА внесли существенный вклад в становление представлений о наличии конформационных подсостояний (КП) или сложного энергетического ландшафта. РДА дает общий срез динамических свойств макромолекулы через индивидуальные среднеквадратичные смещения $\langle x^2 \rangle$ атомов С, О, N и, соответственно, показывает наличие (и размер) области "твердотельного" ядра макромолекулы (область с малыми значениями $\langle x^2 \rangle \leq 0,04 \text{ \AA}^2$, в которой КП нет вообще или их очень мало, в этой области находится активный центр макромолекулы) и наличие "жидкоподобных" областей ($\langle x^2 \rangle \geq 0,04 \text{ \AA}^2$) с большим и нарастающим по направлению к периферии макромолекулы числом КП.

Переход типа "стеклования" в окрестности T_g размораживает небольшую часть конформационной подвижности макромолекулы, однако, как явствует из данных РРМИ, основной движущей силой для размораживания конформационной подвижности при температурах $T > 230\text{--}240 \text{ K}$ является кластерное плавление межбелковой воды [22, 25]. Этот факт является причиной того, что практически все аналогии между белками и стеклами (кроме наличия энергетического ландшафта) исчезают при $T \geq 230 \text{ K}$.

Интерпретация данных МС и РРМИ (мягкие условия коллимации) показала, что для описания совокупности результатов нужно ввести, как минимум, два типа (кроме обычных твердотельных), а точнее, целый спектр $G(\tau)$ специфических белковых движений. В этом спектре можно выделить индивидуальные движения небольших атомных групп и кооперативные движения больших атомных групп. Индивидуальные движения представляют собой переходы между, в принципе, доступными КП [24, 25] и служат своего рода "смазкой" для появления

крупномасштабных кооперативных движений атомных групп. Специфические белковые движения имеют характер ограниченной диффузии и "жидкообразны" [20–22] на малых временах $t \ll \tau_c$.

Изучение угловых зависимостей интенсивности неупругого рассеяния для миоглобина и лизоцима [104, 105] методом РРМИ с жесткими условиями коллимации показало, что сложные кооперативные движения представляют собой движения элементов вторичной структуры: альфа-спиралей в случае миоглобина, альфа-спиралей и бета-слоев в случае лизоцима [104, 105]. Значения пространственных характеристик для указанных видов движения, а также для движения глобулы как целого приведены в табл. 2. В таблице 2 использованы следующие параметры: $A = N_s/N$, $B = N_i/N$, где N_s — число атомов, участвующих в сегментальных движениях, N_i — число атомов, участвующих в индивидуальных движениях, N — общее количество атомов в макромолекуле, N_b — число молекул связанной воды и N_f — количество молекул свободной воды. В процессе обработки полагалось, что среднеквадратичные амплитуды смещений сегментальных и индивидуальных движений равны $\langle x^2 \rangle_s = \langle x^2 \rangle_i$; $\langle x^2 \rangle_g$ — среднеквадратичная амплитуда смещений глобулы как целого; $\langle x^2 \rangle_{bw}$ — среднеквадратичная амплитуда смещений связанной воды, h — степень гидратации.

В миоглобине в сложных кооперативных (сегментальных) движениях участвует до 40 % атомов макромолекулы ($A = 0,4$), тогда как в индивидуальных движениях участвует 60 % атомов ($B = 0,6$) (см. табл. 2). В лизоциме в сложных кооперативных (сегментальных) движениях участвует лишь 20 % ($A = 0,2$) атомов, тогда как в индивидуальных движениях участвует до 80 % ($B = 0,8$) атомов. Среднеквадратичные амплитуды смещений обоих типов в лизоциме достигают величины $0,3 \text{ \AA}^2$, тогда как в миоглобине среднеквадратичные амплитуды смещений обоих типов движений достигают величины $0,65 \text{ \AA}^2$. Анализ спектров РРМИ показывает, что в миоглобине присутствуют низкочастотные сегментальные движения альфа-спиралей с временами корреляции порядка сотен наносекунд [22, 103]. В лизоциме внутриглобулярные движения имеют времена корреляции порядка долей наносекунд и меньше [22, 103]. Миоглобин (α -белок) в нативном состоянии сильно отличается от ($\alpha + \beta$)-белка лизоцима в нативном состоянии тем, что у миоглобина существенно более развита внутримолекулярная подвижность. Различие в пространственно-временных характеристиках специфических белковых движений определяется различием в структурной организации данных белков [104, 105].

Таблица 2. Значения параметров, наилучшим образом описывающие угловые зависимости кривых неупругого рассеяния для лизоцима и миоглобина

Параметры Белок	h	A	B	$\langle x^2 \rangle_g, (\text{\AA}^2)$	$\langle x^2 \rangle_s = \langle x^2 \rangle_i, (\text{\AA}^2)$	$\langle x^2 \rangle_{bw}, (\text{\AA}^2)$	N_b	N_f
Лизоцим	0,05	—	—	0,05	—	—	—	—
	0,2	0,2	0,8	0,03	0,16	0,5	180	—
	0,45	0,2	0,8	0,03	0,3	0,78	346	54
Миоглобин	0,1	—	—	0,1	—	—	—	—
	0,44	0,4	0,6	0,04	0,39	0,56	250	200
	0,7	0,4	0,6	0,04	0,64	0,64	350	350

6. Белки как сложные системы

6.1. Энергетический ландшафт и его иерархическое устройство

Аминокислотные остатки связаны с основной цепью белка одинарными связями. Появление степеней свободы, связанных с вращением вокруг одинарных связей, потенциальная энергия которых имеет несколько минимумов и максимумов [3], резко усложняет форму поверхности потенциальной энергии даже в простейших белках. Предположим, что число аминокислотных остатков в белке около 200 и у каждого 2 альтернативные конформации. Тогда число возможных изоэнергетических состояний будет 2^{200} или порядка 10^{60} — астрономическое число. Если в макромолекуле белка нет стерических ограничений, то все эти состояния могут быть заселены.

В простейших системах, таких, как атом или жесткая молекула, мы говорим об энергетических уровнях. В белках, по указанной выше причине, следует говорить об энергетическом ландшафте или гиперповерхности потенциальной (конформационной) энергии [6, 7, 75, 128]. Характерное сечение гиперповерхности макромолекулы белка уровнями энергии $E \cong NkT/2$ резко отличается по топологической структуре от аналогичных гиперповерхностей для жестких молекул. Имеется множество несвязанных областей, формирующих конформационные подсостояния (КП) или локальные минимумы энергии.

Обсудим организацию КП в макромолекуле MbCO (рис. 16) [75, 128]. Структурная организация макромолекул белков иерархична (имеются третичная, вторичная и первичная структуры). Изучение энергетических ланд-

шафтов в белках находится на самой ранней стадии. Экспериментальные данные в удовлетворительном количестве имеются в настоящее время лишь для одного белка — миоглобина. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что энергетический ландшафт макромолекулы MbCO имеет иерархическое устройство [75, 128, 129].

На рисунке 16 приведено схематическое изображение иерархического устройства энергетического ландшафта макромолекулы MbCO. Конформационные подсостояния на рисунке (КП)_i означают принадлежность к *i*-му уровню организации. При иерархической организации КП предполагается, что энергетические барьеры 0-го яруса значительно выше, чем энергетические барьеры 1-го яруса и т.д. В верхнем ряду на рис. 16 макромолекула MbCO показана в классическом представлении с уникальной нативной структурой и уникальным энергетическим уровнем. Данные инфракрасной спектроскопии показывают, однако, что это представление сильно упрощено. Связанная с Mb молекула CO имеет, как минимум, три полосы поглощения. С каждой такой полосой поглощения можно ассоциировать четко выделенное подсостояние яруса 0. Из эксперимента можно выделить по крайней мере три таких подсостояния. Эти подсостояния различаются по ориентации присоединения CO к гемовой плоскости (это показано на рис. 16б). Данные подсостояния имеют четко различающуюся структуру, динамические и кинетические свойства.

Поскольку конформационные подсостояния яруса 0 (КП0) действительно различны и их немного (по разным данным [75] их три-четыре), то эти подсостояния еще называют таксономными. КП0 — функционально важны для MbCO, так как кинетика связывания CO миоглобином в различных подсостояниях КП0 различна. В подсостоянии A₀ связывание идет наиболее быстро, в A₃ это связывание самое медленное. Существование следующего 1-го яруса конформационных подсостояний — КП1 следует из неэкспоненциального характера кинетики повторного связывания CO миоглобином (см. табл. 1, A1).

В экспериментах показано, что кинетика связывания CO различна в подсостояниях A₀, A₁ и A₃. Соответственно, различаются и функции распределения $g(H)$ (см. табл. 1, A1) для каждого из этих подсостояний. Наличие распределений $g(H)$ говорит о том, что число конформационных подсостояний 1-го яруса — КП1 велико, таксономический подход к этим подсостояниям неприменим и следует пользоваться статистическим подходом. Поэтому подсостояния КП1 этого яруса называются статистическими. Считается, что данные по низкотемпературной теплоемкости и лазерному выжиганию дыр (таблица 1, A2, A3) доказывают наличие следующего яруса — 2-го яруса конформационных подсостояний (КП2). Появление линейного члена в низкотемпературной теплоемкости связано со стимулированным фононами туннелированием между КП2 атомных групп. Туннелирование между КП2 возможно лишь для небольших атомных групп, предпочтительно находящихся на периферии макромолекулы, где достаточно велико число КП2.

Очевидно, что подвижность небольших атомных групп, находящихся на периферии макромолекулы, практически не должна сказываться на процессе связывания лиганда CO активным центром макромолекулы. Про-

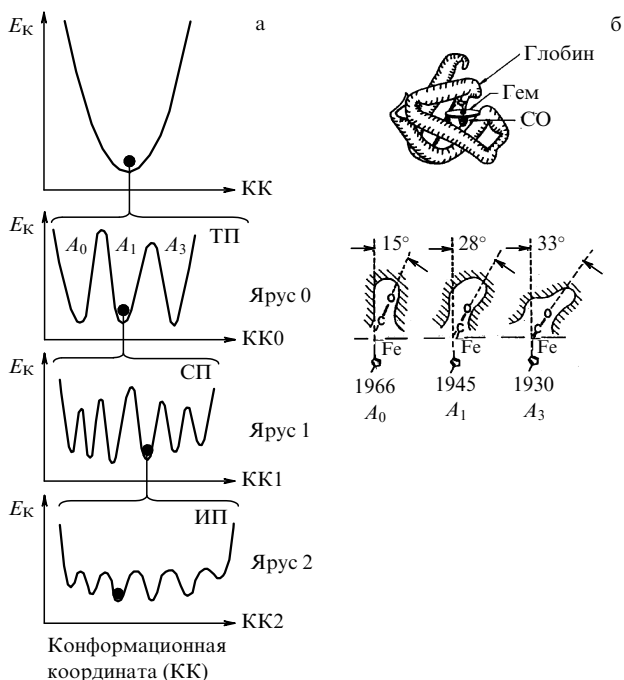


Рис. 16. (а) Схематическое и сильно упрощенное изображение иерархического устройства энергетического ландшафта макромолекулы MbCO. Таксономное подсостояние (ТП), статистические подсостояния (СП), индивидуальные подсостояния (ИП). (б) Иллюстрация возникновения трех подсостояний яруса 0. Подробности в тексте.

цесс связывания лиганда СО в активном центре макромолекулы контролируется кооперативными движениями больших атомных групп (в том числе и гемовой группы) вблизи активного центра. Как явствует из данных низкотемпературной теплоемкости и спектральной диффузии, конформационных подсостояний 2-го яруса не много. При низких температурах макромолекула белка находится в каком-либо специфическом конформационном подсостоянии 2-го яруса. При этих температурах лишь небольшие атомные группы имеют возможность туннелировать между КП2. Такие движения мы называем индивидуальными движениями небольших атомных групп, поэтому и КП2 назовем индивидуальными подсостояниями. Никаких переходов между КП более высоких ярусов не происходит. С повышением температуры появляются активационные переходы между, в принципе, доступными КП2. Здесь специально используется термин "в принципе, доступные КП" [24, 25], поскольку из-за стерических ограничений, возникающих вследствие плотной упаковки атомных групп в макромолекуле белка, не все КП в данный момент времени доступны — часть подсостояний может быть в этот момент занята другими атомными группами. Ситуация здесь очень похожа на процесс диффузии в переохлажденных жидкостях [130].

При повышении температуры выше 200 К резко интенсифицируются индивидуальные движения небольших атомных групп и начинают появляться кооперативные движения больших атомных групп между, в принципе, доступными конформационными подсостояниями 1-го яруса — КП1. При этом индивидуальные движения служат своего рода "смазкой" для появления крупномасштабных кооперативных движений. То есть равновесные флуктуации более низкого яруса служат "смазкой" для появления равновесных флуктуаций на следующем, более высоком по иерархии, ярусе. Таким образом, выше 200 К появляются описанные выше специфические белковые движения. Идеи для изучения иерархически организованных энергетических ландшафтов позаимствованы и, видимо и дальше будут заимствоваться из

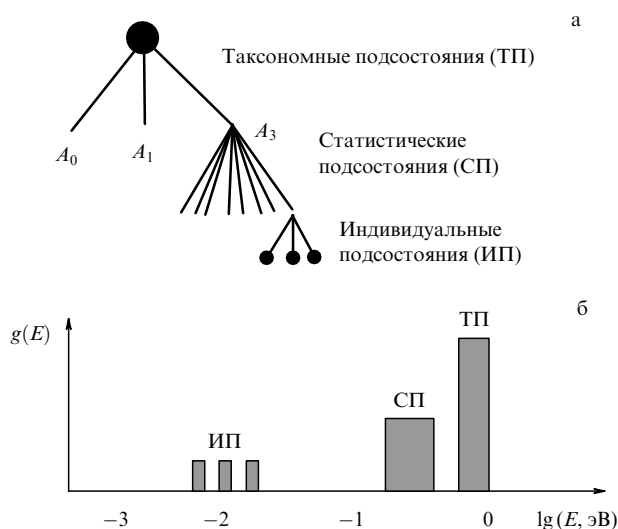
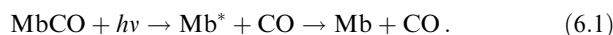


Рис. 17. (а) Энергетический ландшафт макромолекулы MbCO (см. рис. 16), изображенный в виде дерева; (б) приближенная величина барьеров между различными подсостояниями.

физики стеколи спиновых стекол [131, 132]. На рисунке 17а изображен тот же самый энергетический ландшафт, что и на рис. 16, однако он представлен в виде диаграммы — дерева [128].

6.2. Функционально важные движения в белках

До сих пор нами рассматривались равновесные флуктуации. Рассмотрим функционально важные движения. Для этого возьмем в качестве примера реакцию фотодиссоциации MbCO:



Существует два равновесных состояния макромолекулы миоглобина Mb с различной конформацией Mb и MbCO. Это приводит к тому, что существует два типа движения — равновесные флуктуации (РФ) и функционально важные движения (ФВД). Движения в пределах данного равновесного состояния называются равновесными флуктуациями (РФ), о них в основном и шла речь выше. Функционально важные движения (ФВД) — это те движения, посредством которых белок выполняет свою функцию (в случае миоглобина (Mb) это переход от MbCO к Mb или наоборот) или движения, обеспечивающие переход от одного равновесного состояния к другому⁶. Для понимания динамических свойств белков следует исследовать как РФ, так и ФВД. Функционально важные движения и равновесные флуктуации (РФ) в простейшем случае систем, близких к равновесию, связаны флуктуационно-диссипативной теоремой [70].

Детали реакции (6.1), по-видимому, очень сложны, однако некоторые особенности ее ясны уже сейчас. Поглощение фотона гемом вызывает напряжение, которое снимается после разрыва связи Fe—СО. Энергия связывания лиганда миоглобина порядка энергии денатурации белка, поэтому белок после разрыва связи находится в состоянии, далеко от равновесия [2, 129]. Элементарный акт данной простейшей реакции заключается в конформационном изменении макромолекулы MbCO \Rightarrow Mb. Скорость указанной реакции определяется скоростью данного конформационного изменения [2] или скоростью релаксации Mb* \Rightarrow Mb. Функционально важные движения обеспечивают релаксацию миоглобина из возбужденного состояния Mb* в основное Mb.

Поскольку макромолекула белка в возбужденном состоянии находится вдали от равновесия, то в этом случае связь между функционально важными движениями и равновесными флуктуациями существенно сложнее, чем для систем, близких к равновесию. В процессе релаксации из возбужденного состояния (Mb*) в основное (Mb) последовательно участвуют все виды движений, начиная с колебательных (или твердотельных), которые могут значительно повлиять на скорость присоединения лигандов к гему, затем индивидуальные движения небольших атомных групп — движения нижнего 2-го яруса, служащие смазкой для последующего включения движений 1-го яруса — кооперативных движений атомных групп. В результате процесс релаксации начинается в активном центре и впоследствии распространяется на периферию макромолекулы.

⁶ Очевидно, что не все движения, участвующие в переходе от одного равновесного состояния к другому, являются функционально важными.

Йортнер с соавторами [133] показал, что релаксация в иерархически организованных динамических системах должна обнаруживать осцилляции, заметные в координатах $d \lg(f(t))/d \lg(t)$ от времени t , где $f(t)$ — релаксационная функция. Анфинруд с соавторами [134] изучил релаксацию миоглобина после фотодиссоциации в диапазоне шести порядков по времени. Если данную релаксационную кривую построить в указанных выше координатах [128], то, вообще говоря, можно заметить предсказанные осцилляции, что также дает повод говорить о том, что динамическая организация миоглобина иерархична.

6.3. Сложность белков

В последнее время в физике стал проявляться большой интерес к исследованию так называемых "сложных" систем, в первую очередь, стекол и спиновых стекол. Эти системы характеризуются высокой степенью вырождения основного состояния и неэргодичностью. Все, что было сказано о белках, а именно, наличие в белках сложного, иерархически организованного ландшафта дало основание авторам ряда обзорных работ причислить белки к "сложным" системам именно из-за указанной схожести со стеклами, спиновыми стеклами и другими неупорядоченными веществами [7, 8, 135]. Интуитивно, однако, ясно, что такие биологические системы, как клетка, мозг, организм, явно превосходят по своей "сложности" стекла и спиновые стекла. Заметим, что еще в 50-х годах прошлого века фон Нейман предсказывал, что выяснение смысла понятия сложности будет одной из основных задач науки XX века, в той же мере, в какой одной из основных задач науки XIX века было выяснение смысла понятий энергии и энтропии.

Однако до настоящего времени различные авторы используют не только различные определения "сложности", но и вкладывают различные понятия в термин "сложность" [136, 137]. Наиболее ясно понятие "сложности" употребляется в физике конденсированного состояния, где четко разделяют "простые" (кристаллы с фиксированной композицией атомов) и "сложные" системы — жидкости, аморфные тела, стекла. Основой "сложности" этих систем является определяющая их свойства неупорядоченность. Мера "сложности" существует и в теории информации. Это энтропия Шеннона [38]. В канонической теории информации полностью игнорируется содержание информации. Имеется, однако, много научных проблем, к ним относятся и проблемы биологии, где *ценность* информации существенна. По Бонгарду ценность информации определяется формулой [38]

$$V = \log_2 \left(\frac{p^1}{p} \right), \quad (6.2)$$

где p и p^1 — это вероятности достижения цели до и после получения информации соответственно. Избыточная, повторная информация имеет нулевую ценность, так как она не увеличивает и не уменьшает вероятность достижения цели. Поэтому под ценностью информации понимают неизбыточность, незаменимость информации [38].

Под сложностью в теории информации понимают минимальное число двоичных знаков, содержащих всю информацию об объекте, достаточную для его воспроизведения (декодирования) [138–140]. Приведенное

определение сложности сходно с определением ценности сообщения, как его незаменимости [38].

Генетическая информация закодирована с помощью четырехбуквенного алфавита в цепи ДНК. В одном гене содержится вся информация об одной белковой цепи. В "постгеномную" эпоху стали известны тексты множества (около 5 000 000) белков, в том числе одних и тех же белков различных видов. Это позволяет проследить за эволюцией белков.

Многие точечные мутации, выражающиеся в замене аминокислоты, с точки зрения эволюции являются нейтральными, т.е. эти мутации не изменяют свойств белков. Сопоставляя мутационные замещения аминокислоты в данном белке, можно установить, какие аминокислоты более, а какие менее заменимы. Оказалось, что для цитохромов С существует четыре консервативных аминокислотных остатка [141], их роль необычайно важна для самоорганизации белков данного семейства. Для миоглобина существует пять консервативных аминокислотных остатков, которые показаны на рис. 14 [114]. Очевидно, что среди аминокислот в первичной последовательности данного белка наибольшей ценностью обладают консервативные аминокислоты. Ценная информация в белках сосредоточена в области активного центра и консервативных аминокислот.

Генетическая информация, содержащаяся в цепи ДНК, имеет определенную ценность. После рецепции генетической информации в системе клетки, определяющей синтез белка, макромолекулы белка также приобретают ценную информацию, которая теперь содержится в первичной белковой последовательности (в области активного центра). Данное информационное ядро обуславливает как пространственную структуру, так и функцию макромолекулы белка. Поскольку ценная информация сконцентрирована в области активного центра, то пространственная структура активного центра упорядочена. Пространственная структура других областей макромолекулы по мере удаления от активного центра становится все менее упорядоченной (появляются конформационные подсостояния, количество которых становится максимальным на самой периферии макромолекулы). Поэтому "сложность" белков специфична, т.е. связана не только с наличием в белках сложного, иерархически организованного энергетического ландшафта, как это имеет место в стеклах и спиновых стеклах, но и с наличием информационной "сложности" или ценной информации.

Белки в лабораторных условиях идеально воспроизводятся, в отличие от стекол и спиновых стекол. Это превращает саму белковую макромолекулу в уникальную лабораторию для изучения "сложных" систем.

7. Заключение.

Перспективы исследований

В данном обзоре представлены контуры зарождающейся картины динамической организации белков, целиком построенной на очень ограниченном массиве экспериментальных данных, имеющихся в настоящее время в достаточно большом количестве лишь для очень простого белка — миоглобина и, частично, для лизоцима. Можно полагать, что представленная картина динамической организации макромолекул глобулярных белков имеет общие черты для белков с различной массой и с

различной по сложности структурной организацией. Ответ на этот вопрос, однако, могут дать лишь дальнейшие экспериментальные и теоретические исследования. Поэтому основной экспериментальной задачей должно стать исследование пространственно-временных характеристик специфических белковых движений для возможно большего количества белков с различной массой и различной структурной организацией. Теоретическое предсказание и экспериментальное изучение энергетических ландшафтов, а следовательно, динамических и функциональных свойств белковых макромолекул находится в зародышевом состоянии, поэтому любой прогресс в данном направлении будет необычайно ценен.

В заключение авторы выражают свою искреннюю благодарность В.Н. Флерову, К.В. Шайтану, А.Ю. Гросбергу, Д.С. Чернавскому, М.И. Клинеру, Л.А. Блюменфельду, Х. Фрауэнфельдеру и А.Б. Рубину за многочисленные ценные замечания и плодотворные дискуссии.

Авторы благодарны Программе поддержки научных школ (проект 00-15-97392) и Российскому фонду фундаментальных исследований (проект 00-04-48161) за финансовую поддержку.

Список литературы

- Schrödinger E *What is Life? The Physical Aspect of the Living Cell* (Cambridge: The Univ. Press, 1948) [Шредингер Э *Что такое жизнь? С точки зрения физика* 2-е изд. (М.: Атомиздат, 1972)]
- Блюменфельд Л А *Проблемы биологической физики* 2-е изд. (М.: Наука, 1977)
- Волькенштейн М В *Биофизика* (М.: Наука, 1988)
- Рубин А Б *Биофизика* (М.: Университет, 1999)
- Чернавский Д С, Чернавская Н М *Белок-машина: Биологические макромолекулярные конструкции* (М.: Изд-во Моск. ун-та, 1999)
- Шайтан К В *Биофизика* **39** 949 (1994)
- Frauenfelder H, Wolynes P G *Phys. Today* **47** (2) 58 (1994)
- Frauenfelder H, Wolynes P G, Austin R H *Rev. Mod. Phys.* **71** S419 (1999)
- Уайт А и др. *Основы биохимии* (М.: Мир, 1981)
- Ptitsyn O B, Finkelstein A V *Quart. Rev. Biophys.* **13** 339 (1980)
- Финкельштейн А В и др. *Биофизика* **44** 980 (1999)
- Finkelstein A V, in *Protein Folding, Evolution, and Design* (Proc. of the Intern. School of Physics "Enrico Fermi", Course 165, Eds R A Broglia, E I Shakhnovich, G Tiana) (Amsterdam: IOS Press, 2001) p. 249
- Huber R *Nature* **280** 565 (1979)
- Richards F M *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6** 151 (1977)
- Привалов П Л *Биофизика* **32** 742 (1987)
- Морозов В Н, Морозова Т Я *Молекулярная биология* **17** 577 (1983)
- Абатуров Л А, Лебедев Ю А, Носова Н Т *Молекулярная биология* **17** 543 (1983)
- Doster W, Cusack S, Petry W *Nature* **337** 754 (1989)
- Parak F, Frolov E N, Moessbauer R L, Goldanskii V I *J. Mol. Biol.* **145** 825 (1981)
- Шайтан К В, Рубин А Б *Биофизика* **30** 517 (1985)
- Parak F, Heidemeier J, Knapp W, in *Biological and Artificial Intelligence Systems* (Eds E Clementi, S Chin) (Leiden: ESCOM, 1988) p. 23
- Крупянский Ю Ф и др. *Биофизика* **32** 761 (1987)
- Krupyanskiy Yu F et al. *Z. Naturforsch. C* **37** 57 (1982)
- Goldanskii V I, Krupyanskiy Yu F, Fleurov V N *Phys. Scripta* **33** 527 (1986)
- Goldanskii V I, Krupyanskiy Yu F *Quart. Rev. Biophys.* **22** 39 (1989)
- Krupyanskiy Yu F et al. *Hyperfine Interact.* **53** 59 (1990)
- Anfinsen C *Science* **181** 223 (1973)
- Levinthal C *J. Chim. Phys.* **65** 44 (1968)
- Шульц Г Е, Ширмер Р Х *Принципы структурной организации белков* (М.: Мир, 1982) с. 181
- Govindarajan S, Goldstein R A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 5545 (1998)
- Cooper A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** 2740 (1976)
- II Съезд биофизиков России, 23–27 августа 1999 г., Москва. Тезисы докладов* (Под ред. А Б Рубина) (Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1999)
- Proc. of the 3rd European Biophysics Congress, Munich, Germany, Sept. 9–13, 2000; Eur. Biophys. J.* **29** 239 (2000)
- 4th Intern. Conf. on Biological Physics, ICBP-2001, Kyoto, Japan, July 30–Aug. 3, 2001, Abstracts* (2001)
- Албертс Б и др. *Молекулярная биология клетки* Т. 1 (М.: Мир, 1987)
- Хургин Ю И, Чернавский Д С, Шноль С Э *Биофизика* **32** 775 (1987)
- Кестлер Г *Возникновение биологической организации* (М.: Мир, 1967)
- Волькенштейн М В *Энтропия и информация* (М.: Наука, 1986)
- Гольдманский В И, Крупянский Ю Ф, Флеров В Н *ДАН СССР* **272** 978 (1983)
- Austin R H et al. *Biochemistry* **14** 5355 (1975)
- Frauenfelder H, Petsko G A, Tsernoglou D *Nature* **280** 558 (1979)
- Гольдманский В И, Крупянский Ю Ф, Фролов Е Н *Молекулярная биология* **17** 532 (1983)
- Anderson P W, Halperin B I, Varma C M *Philos. Mag.* **25** 1 (1972)
- Phillips W A *J. Low Temp. Phys.* **7** 351 (1972)
- Гросберг А Ю, Хохлов А Р *Статистическая физика макромолекул* (М.: Наука, 1989)
- Ptitsyn O B, Volkenstein M V *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4** 137 (1986)
- Klinger M I *Comments Cond. Matter Phys.* **16** 137 (1992)
- Физический энциклопедический словарь* (Гл. ред. Б А Введенский) (М.: Советская энциклопедия, 1960)
- Vollmayr K, Kob W, Binder K *J. Chem. Phys.* **105** 4714 (1996)
- Böttcher C J F, Bordewijk P *Theory of Electric Polarization* Vol. 2, 2nd ed. (Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. Co., 1978)
- Bässler H *Phys. Rev. Lett.* **58** 767 (1987)
- Davidson D W, Cole R H *J. Chem. Phys.* **18** 1417 (1950)
- Nienhaus G U, Parak F *Hyperfine Interact.* **90** 243 (1994)
- Dobson C M, Ptitsyn O B *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7** 1 (1997)
- Ptitsyn O B *J. Protein Chem.* **6** 273 (1987)
- Dobson C M, Karplus M *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9** 92 (1999)
- Fersht A R *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7** 3 (1997)
- Shakhnovich E I *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7** 29 (1997)
- Brooks C L III et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 11037 (1998)
- Onuchic J N, Luthey-Schulten Z, Wolynes P G *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48** 545 (1997)
- Brockwell D J, Smith D A, Radford S E *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** 16 (2000)
- Гросберг А Ю *УФН* **167** 129 (1997)
- Финкельштейн А В, Бадретдинов А Я *Молекулярная биология* **31** 469 (1997)
- Kim P S, Baldwin R L *Annu. Rev. Biochem.* **51** 459 (1982)
- Bryngelson J D, Wolynes P G *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** 7524 (1987)
- Go N, Abe H *Biopolymers* **20** 991 (1981)
- Shakhnovich E I, Gutin A M *Biophys. Chem.* **34** 187 (1989)
- Abkevich V I, Gutin A M, Shakhnovich E I *Biochemistry* **33** 10026 (1994)
- Karplus M, Shakhnovich E, in *Protein Folding* (Ed. T E Greighton) (New York: W.H. Freeman and Co., 1992) p. 127
- Ландау Л Д, Лифшиц Е М *Статистическая физика* (М.: Наука, 1964)
- Ellis R J, Hartl F U *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9** 102 (1999)
- Feldman D E, Frydman J *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** 26 (2000)
- Спринг А С, в сб. *II Съезд биофизиков России, 23–27 августа 1999 г., Москва. Тезисы докладов* Т. 1 (Под ред. А Б Рубина) (Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1999) с. 5
- Hardesty B, Tsalkova T, Kramer G *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9** 111 (1999)
- Frauenfelder H, Sligar S G, Wolynes P G *Science* **254** 1598 (1991)
- Frauenfelder H et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** 2370 (2001)
- Frauenfelder H et al. *J. Phys. Chem.* **94** 1024 (1990)
- Beece D et al. *Biochemistry* **19** 5147 (1980)
- Rupley J A, Careri G *Adv. Protein Chem.* **41** 37 (1991)

80. Крупнянский Ю Ф и др. *Молекулярная биология* **20** 1356 (1986)
81. DeVault D, Chance B *Biophys. J.* **6** 825 (1966)
82. Murzin A G, Finkelstein A V *J. Mol. Biol.* **204** 749 (1988)
83. Kendrew J C et al. *Nature* **181** 662 (1958)
84. Privalov P L et al. *J. Mol. Biol.* **190** 487 (1986)
85. Strambini G B, Gabellieri E *Biophys. J.* **70** 971 (1996)
86. Singh G et al. *Z. Phys. B* **55** 23 (1984)
87. Веркин Б И и др. *ФНТ* **10** 1225 (1984)
88. Yang I-S, Anderson A C, Preprint Univ. of Illinois, IL -(CM)-87-02 (1987)
89. Yang I-S, Anderson A C *Phys. Rev. B* **34** 2942 (1986)
90. Friedrich J *Methods Enzymol.* **246** 226 (1995)
91. Iben I E T et al. *Phys. Rev. Lett.* **62** 1916 (1989)
92. Barkalov I M, Bolshakov A I, Goldanskii V I, Krupyanski Yu F *Chem. Phys. Lett.* **208** 1 (1993)
93. Sartor G et al. *J. Phys. Chem.* **96** 5133 (1992)
94. Sartor G, Hallbrucker A, Mayer E *Biophys. J.* **69** 2679 (1995)
95. Miyazaki Y, Matsuo T, Suga H *Chem. Phys. Lett.* **213** 303 (1993)
96. Miyazaki Y, Matsuo T, Suga H *J. Phys. Chem. B* **104** 8044 (2000)
97. Doster W et al. *Biophys. J.* **50** 213 (1986)
98. Sochava I V, Smirnova O I *Food Hydrocolloids* **6** 513 (1993); Сочава И В, Смирнова О И *Биофизика* **36** 725 (1991)
99. Angell C A *Science* **267** 1924 (1995)
100. Leeson D T et al. *J. Phys. Chem. B* **101** 6331 (1997)
101. Van Hove L *Phys. Rev.* **95** 249 (1954)
102. Moessbauer R L *Hyperfine Interact.* **33** 199 (1987)
103. Krupyanski Yu F, Goldanskii V I, in *Protein Folding, Evolution, and Design* (Proc. of the Intern. School of Physics "Enrico Fermi", Course 165, Eds R A Broglia, E I Shakhnovich, G Tiana) (Amsterdam: IOS Press, 2001) p. 25
104. Krupyanski Yu F et al. *J. Biol. Phys.* **28** 139 (2002)
105. Крупнянский Ю Ф и др. *Химическая физика* **36** 28 (2002)
106. Dwiwedi A, Petersen T, Debrunner P G *J. Phys. Colloq. (Paris)* **40** C2-531 (1979)
107. Wise H, Debrunner P, Wagner G, Preprint Univ. of Illinois, IL -(Ex)-84 (1984)
108. Chang I et al. *Chem. Phys.* **212** 221 (1996)
109. Krupyanski Yu F et al. *Eur. Biophys. J.* **26** 25 (1997)
110. Chernavskii D S et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** 7218 (1980)
111. Doster W, Cusack S, Petry W *Phys. Rev. Lett.* **65** 1080 (1990)
112. Réat V et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 4970 (1998)
113. Götze W, Sjogren L *Rep. Prog. Phys.* **55** 241 (1992)
114. Frauenfelder H, McMahon B *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 4795 (1998)
115. Parak F et al. *Eur. Biophys. J.* **15** 237 (1987)
116. Parak F, Frauenfelder H *Physica A* **201** 332 (1993)
117. Bialek W, Goldstein R F *Biophys. J.* **48** 1027 (1985)
118. Goldstein R F, Bialek W *Comm. Mol. Cell. Biophys.* **3** 407 (1986)
119. Bialek W, Onuchic J N *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** 5908 (1988)
120. Case D A *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4** 285 (1994)
121. Seno Y, Go N J *J. Mol. Biol.* **216** 111 (1990)
122. Kidera A, Go N J *J. Mol. Biol.* **225** 457 (1992)
123. Hayward S, Go N *Annu. Rev. Phys. Chem.* **46** 223 (1995)
124. Zach C et al. *Hyperfine Interact.* **126** 83 (2000)
125. Melchers B et al. *Biophys. J.* **70** 2092 (1996)
126. Kitao A, Hayward S, Go N *Proteins* **33** 496 (1998)
127. Крупнянский Ю Ф и др. *Биофизика* **33** 401 (1988)
128. Frauenfelder H, McMahon B H *Ann. Phys. (Leipzig)* **9** 655 (2000)
129. Ansari A et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** 5000 (1985)
130. Barlow A J, Lamb J, Matheson A J *Proc. R. Soc. London Ser. A* **292** 322 (1966)
131. Zallen R *The Physics of Amorphous Solids* (New York: Wiley, 1983)
132. Fischer K H, Hertz J A *Spin Glasses* (Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1991)
133. Metzler R, Klafter J, Jortner J *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** 11085 (1999)
134. Jackson T A, Lim M, Anfinsen P A *Chem. Phys.* **180** 131 (1994)
135. Frauenfelder H *Nature Struct. Biol.* **2** 821 (1995)
136. Guerra F, Peliti L, Vulpiani A, in *Measures of Complexity: Proc. of the Conf., Rome, Sept. 30–Oct. 2, 1987* (Lecture Notes in Physics, 314, Eds L Peliti, A Vulpiani) (Berlin: Springer-Verlag, 1988)
137. Parisi G, in *Measures of Complexity: Proc. of the Conf., Rome, Sept. 30–Oct. 2, 1987* (Lecture Notes in Physics, 314, Eds L Peliti, A Vulpiani) (Berlin: Springer-Verlag, 1988)
138. Колмогоров А Н *Проблемы передачи информации* **1** (1) 3 (1965); *Новое в жизни, науке, технике Сер. Математика, кибернетика* (1) 24 (1991)
139. Chaitin G *J. Assoc. Comput. Mach.* **13** 547 (1966)
140. Adami C, Ofria Ch, Collier T C *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** 4463 (2000)
141. Ptitsyn O B *J. Mol. Biol.* **278** 655 (1998)

Dynamical properties and energy landscape of simple globular proteins

Yu.F. Krupyanski, V.I. Gol'danskii

N.N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences

ul. Kosygina 4, 117977 Moscow, Russian Federation

Tel. (7-095) 939-73 00. Fax (7-095) 137-83 18

E-mail: yufk@chph.ras.ru

Analysis of the dynamic properties of a myoglobin suggest the existence of a hierarchical energy landscape in this simple globular protein. Apart from vibrations, proteins can also perform two specifically protein types of motion: 1) the individual motions of small atomic groups — transitions between conformation substates of the lower 2-nd tier, and 2) cooperative motions of secondary structure elements (α -helices) — transitions between conformation substates of the upper 1-st tier. The dynamic properties of a macromolecule show strong heterogeneity. Close to an active center, only vibrations are observed. As one moves towards the periphery, conformation substates grow in number, and type 1 and 2 motions become dominant. This picture is consistent with the concept of a protein as a random copolymer slightly 'edited' in the region of the active center.

PACS numbers: **87.10.+e**, **87.15.By**, **87.15.He**, **87.80.-y**

Bibliography — 141 references

Received 20 November 2001, revised 11 March 2002