

7. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

Из курсов общей биологии и биохимии студентам должно быть известно следующее:

Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называется *первичной структурой* белка.

Участки полипептидной цепи с регулярной укладкой, такой как альфа-спираль или бета-складки, образуют *вторичную структуру*.

Общий ход полипептидной цепи и пространственное расположение боковых групп формируют *третичную структуру*.

На долю *четвертичной структуры* остается образование глобул из нескольких свернутых потипетидных цепей, называемых *субъединицами*.

Все эти структуры входят как единое целое в *пространственную структуру* белка, которая представляет собой не что иное, как расположение в пространстве всех атомов, входящих в состав белковой молекулы. На языке математики это означает, что нам известны координаты всех атомов по всем трем осям трехмерной системы координат, которая выбирается либо как Декартова (мировая) система, либо привязывается к началу элементарной ячейки и ее граням. Таблица с координатами атомов представляет собой бесценный результат рентгеноструктурного анализа белкового кристалла и наряду с характеристикой элементарной ячейки и некоторыми другими данными о белке и его кристалле содержит исчерпывающую информацию об атомной структуре молекулы белка.

7.1 Международная база данных структуры белков (Protein Data Base, PDB)

Данные о пространственной структуре белков публикуются в специальных журналах, а также поступают на хранение в Международную базу данных белковой структуры PDB (protein data base). В настоящее время PDB поддерживается группой организаций, объединенных в Исследовательский Центр по Структурной Биоинформатике (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, RCSB), созданной в США в основном Калифорнийским государственным университетом при финансовой поддержке Национального фонда науки, Министерства энергии и Национального Института Здоровья США.

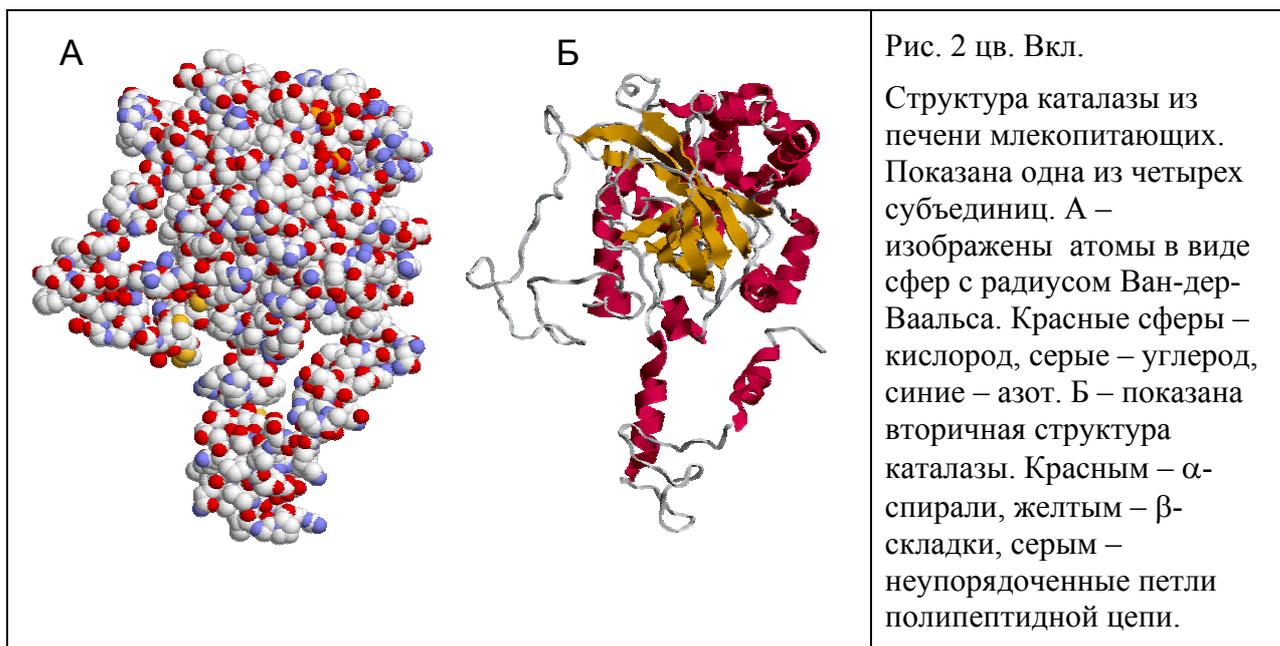
PDB – открытая база данных, в которую можно войти через Internet по адресу <http://www.rcsb.org/pdb/> или просто www.pdb.org. Чтобы иметь возможность ознакомиться со структурой интересующего нас белка, необходимо иметь программу визуализации, которая превращает так называемый *молекулярный файл* (электронную таблицу с координатами атомов и некоторыми другими данными) в изображение трехмерной структуры белка на экране компьютера. Программ визуализации много, и они постоянно разрабатываются. Приведенные в данной книге изображения получены с помощью очень компактной программы RasMol, которая обросла дружественной интерактивной оболочкой, работающей под Windows, и получила название RasTop. Загрузить программу RasTop можно с того же сайта.

Набрав электронный адрес <http://www.rcsb.org/pdb/>, вы попадаете на первую страницу PDB, где открыто поисковое окно (Search the Archive), в которое нужно ввести либо название белка, либо фамилию автора, либо какое-нибудь ключевое слово или

идентификационный код белка, если он вам известен (Enter a PDB ID or keyword). Например, введем слово *catalase*, и начнем поиск, нажав кнопку «Search».

Открывается следующая страница (Query Result Browser), на которой выставлен список найденных белковых структур. Выбор белка – дело, требующее знаний, но при прочих равных условиях лучше иметь дело со структурой, полученной с высоким разрешением. Для примера можем выбрать модель 1GWH. Это каталаза *Micrococcus lysodeikticus*, структура которой получена с разрешением 1,74 Å. Чтобы открыть молекулярный файл этой структуры, надо нажать кнопку с изображением страницы текста, расположенную над строчкой с названием белка. Открывшийся молекулярный файл выглядит как большая таблица, состоящая из многих страниц. Над таблицей надпись **Save full entry to disk**, на которую следует нажать. Открывается окно сохранения файла. Выберите нужное место на Вашем компьютере и сохраните файл, который в нашем случае имеет название 1GWH.pdb.

Открыть этот файл и рассмотреть структуру белка можно, используя имеющуюся программу визуализации, например, RasTop. Структура белка или отдельных его частей может быть представлена множеством способов. Профессиональные исследователи начинают просмотр белковой структуры с режима «паутины», когда атомы не даны вообще, а связи даны в виде тонких проволочек. Именно в таком виде белковая молекула предстает нашему взору при загрузке файла данных в программу RasTop. Общее представление о форме белковой молекулы можно получить, если представить все атомы в виде сфер с радиусами Ван-дер-Ваальса. Чтобы получить такую картину надо дать команду Atoms/Spacefill/Van der Waals, нажимая на соответствующие надписи в верхней части окна. Пример такого изображения каталазы дан на рис. 2 цв. Вкл.



Хорошо видно, что внутренняя структура белка представляет собой не рыхлую сетку, а плотную гроздь из малосжимаемых электронных сгустков вокруг ядер атомов. Ничего, кроме поверхности, на таком изображении увидеть невозможно. Чтобы увидеть вторичную структуру белка, нужно дать команду Ribbons / Display only. На рисунке 2 цв. вкл. α -спирали показаны в виде скрученных красных лент, а β -листы в виде желтых полосок; неструктурированные петли полипептидной цепи даны белым цветом. Особенно полезную информацию можно получить, выделяя определенные группы или атомы

белковой молекулы и показывая их в желательном виде. На рисунке 3 цв. Вкл. ход полипептидной цепи показан в виде толстой ленты, гемовая группа в виде зеленых стержней, отображающих химические связи, а атом железа дан в виде желтой сферы с радиусом Ван дер Ваальса.

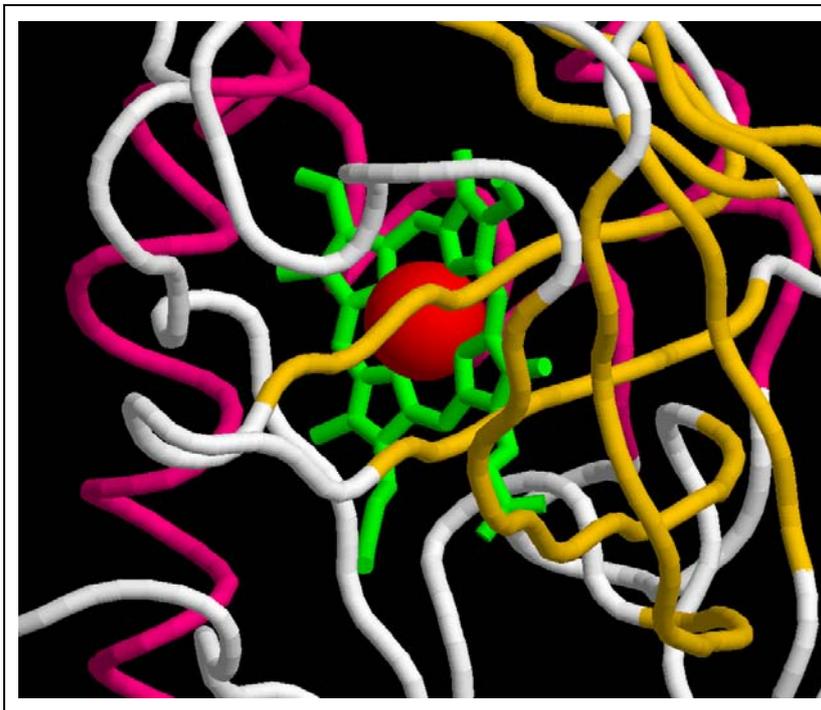


Рис. 3. цв. вкл. Структура молекулы каталазы в области активного центра фермента. Зеленые цилиндры – химические связи в геме; атом железа показан в виде сферы с радиусом Ван-дер-Ваальса. Ход полипептидной цепи показан в виде шнура. Участки α -спирали показаны красным светом, β -листы – желтым, неупорядочные петли – серым цветом.

Создание подобного рода изображений – отнюдь не развлечение, а рабочий инструмент, позволяющий лучше понять внутреннее устройство и способ функционирования молекулярной белковой машины, будь то фермент, рецептор или какой-то другой белок. Большую пользу, как мы увидим позже, может принести, в частности, детальный анализ увеличенного изображения активного центра фермента. Вместе с тем, визуализация – только первый шаг в использовании бездны информации, заключенной в скромном с виду молекулярном файле. Массу полезных сведений можно получить, определяя расстояния между атомами и группами, углы поворота вокруг связей и т.д. Существуют мощные компьютерные программы, которые на основании данных координат атомов могут рассчитывать распределение электронной плотности, сравнивать ее с найденной из рентгеноструктурных исследований и уточнять изучаемую структуру. Можно производить множество других измерений и расчетов, например, оценивать форму полостей внутри белковых молекул, которые могут быть заняты субстратом, ингибитором или лекарством и рассчитывать электростатические силы и энергию взаимодействий, находить пути переноса электронов по туннельному механизму и многое другое. Была бы структура и компьютеры, и многое в работе белков можно понять на основе строгих количественных расчетов.

7.2 Классификация белков по их структуре и проблемы эволюции

Общий характер укладки полипептидных цепей зависит, разумеется, от того, какой клеточной структуре принадлежит данный белок и какую функцию он выполняет. Прежде всего, можно разделить все белки на три класса: фибриллярные, мембранные и водорастворимые глобулярные белки (А.В. Финкельштейн, О.Б. Птицин). Внутри каждого класса существуют опделенные типы упаковки элементов вторичной структуры.

7.2.1 Фибриллярные белки

Не вдаваясь в детали, можно сказать, что фибриллярные белки состоят либо целиком из длинных α -спиралей (α -кератин, тропомиозин) либо из длинных β -тяжей (шелк). Альфа-спирали, в свою очередь, собраны в слегка скрученные пучки (суперспирали), образуя таким образом очень прочные волокнистые структуры. Такие структуры образуют, помимо кератина и тропомиозина, значительную часть молекулы миозина и нити того шелка, который делают пчелы и муравьи.

Бета-листы фиброина шелка тутового шелкопряда состоят из регулярно повторяющихся блоков полипептидной цепи, причем антипараллельные β -листы сложены плоскостями (по принципу «лицом к лицу, спиной к спине») в длинные пучки.

Структуру фибриллярных белков сложной не назовешь, потому что они выполняют довольно простую функцию – механическую, и их задача тоже проста: быть как можно длиннее и прочнее.

7.2.2 Мембранные белки

Мембранные белки, например, такие как родопсин, переносчики ионов и многие переносчики электронов в дыхательной цепи, состоят из гидрофобной части, погруженной в липидный бислой, и более гидрофильной части, экспонированной в водную фазу. Примером может служить Ca-ATФаз , ионный насос, переносящий ионы кальция из клеточного сока в окружающую клетки жидкости, либо во внутриклеточные резервуары, образованные мембранами эндоплазматического ретикулума

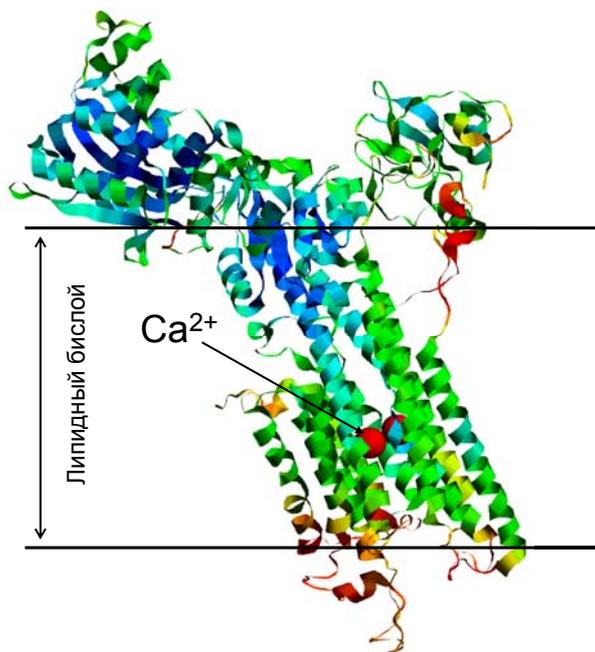


Рис. 4 цв. Вкл. Ca^{2+} -АТФаза. Элементы вторичной структуры (α -спирали и β -листы) показаны в виде лент, неупорядоченные цепи – в виде нитей. Изменение цвета от синего к красному соответствует изменению тепловой подвижности атомов от меньшей к большей.

Как видно на рис. 4 цв. Вкл., белок (образованный в данном случае одной полипептидной цепью) состоит из мембранного участка, представленного в основном довольно длинными α -спиралями, и двух внеклеточных доменов, образованных короткими отрезками

α -спирали, β -листками и неупорядоченными петлями полипептидной цепи. Пучок α -спиралей, пронизывающих липидный бислой – типичное строение внутримембранной части любого интегрального мембранного белка.

На срезах, проведенных вдоль плоскости мембраны, такие пучки могут образовывать сквозные каналы для ионов или молекул. На рисунке 5 цв. вкл. показан вид сверху на мембранный фрагмент белка Са-АТФазы (стереопара). Внутри просвета между тяжами α -спиралей видны два иона кальция. Возможно, именно тут проходит сквозной канал через мембрану, по которому кальций перемещается при работе АТФазы (подробнее о работе этого фермента см. раздел 10.6).

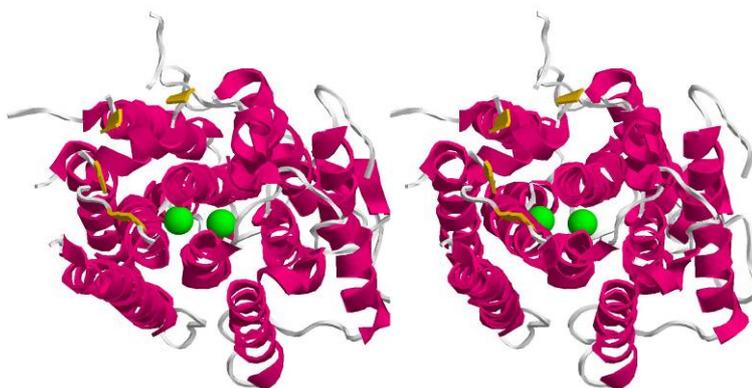


Рис.5 цв. вкл. Внутримембранный фрагмент молекулы Са²⁺-АТФазы: вид сверху (стереоизображение). Удалены фрагменты молекулы, выступающие за границы мембраны (см. Рис. 7.2). Альфа-спирали показаны красным цветом, неупорядоченные цепи – серым. Можно видеть пучок α -спиралей, уходящий в глубь липидного бислоя. В центре пучка просвет, в котором находятся два иона кальция (зеленые сферы)..

Чтобы увидеть стереоизображение, нужно свести глаза к переносице, а затем медленно их разводить, пока два изображения не сольются. При этом левый глаз будет видеть правую часть рисунка, а правый глаз – левую.

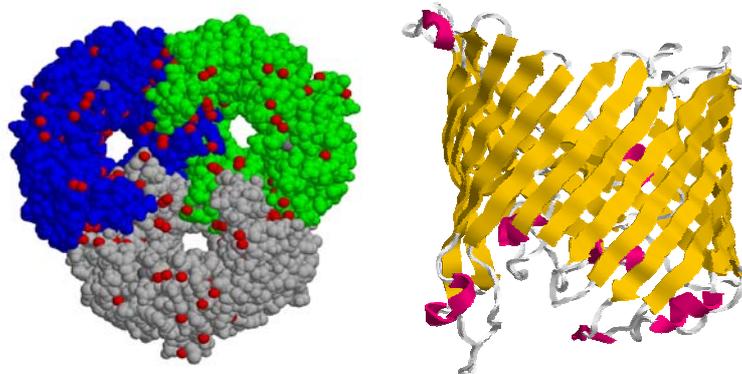


Рис. 6 цв. вкл. Порин; А — вид молекулы порина со стороны плоскости мембраны. Видны три субъединицы, каждая из которых состоит из одной полипептидной цепи и образует канал в мембране; Б — показана одна из субъединиц «сбоку», т.е в разрезе мембраны. Видно, что стенки поры состоят из сетки бета-листов.

На рисунке 6 цв. вкл. дано изображение молекулы белкового канала – порина. Порин – это мембранный белок бактерий, аналогом которого считают белок наружной мембраны митохондрий, известный под тем же названием, а также под названием VDAC (voltage dependent anion channel). Порин создает в мембране большие отверстия, через которые проходят относительно крупные органические молекулы, такие как сахароза, но не проходят белки. Как видно на рисунке слева, порин состоит из трех субъединиц. Справа показан вид одной из субъединиц «сбоку», т.е. на разрезе мембраны. Видно, что стенки порина образованы скрещенными бета–листами довольно значительной длины.

«якорная» часть любого мембранного белка, состоит ли она из α –спиралей или β –листов, всегда гидрофобна, т.е. хорошо растворяется в липидах. Напротив, внемембранные домены либо вообще гидрофильны, и тогда пептидные петли свободно плавают в воде, либо – что бывает чаще – представляют собой клубок, гидрофильный снаружи и гидрофобный – внутри.

7.2.3 Глобулярные белки

Глобулярные белки можно разделить на α – белки, β –белки, α –, β – белки и другие. Классическим примером α –белка могут служить белки семейства гемоглобинов: миоглобин, субъединицы гемоглобина и растительный белок леггемоглобин. На рисунке 7 цв. Вкл. показана структура миоглобина, первого белка, структура которого была расшифрована методом рентгеноструктурного анализа кристаллов. Большая часть полипептидной цепи уложена в α –спиральные структуры, β –листов нет вовсе, неупорядоченных цепей только-только хватает, чтобы отрезки α –спиралей уложились в компактную глобулу.

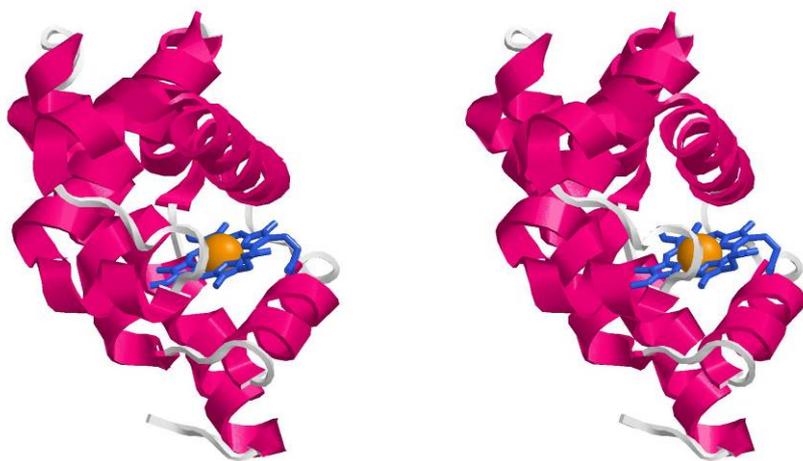
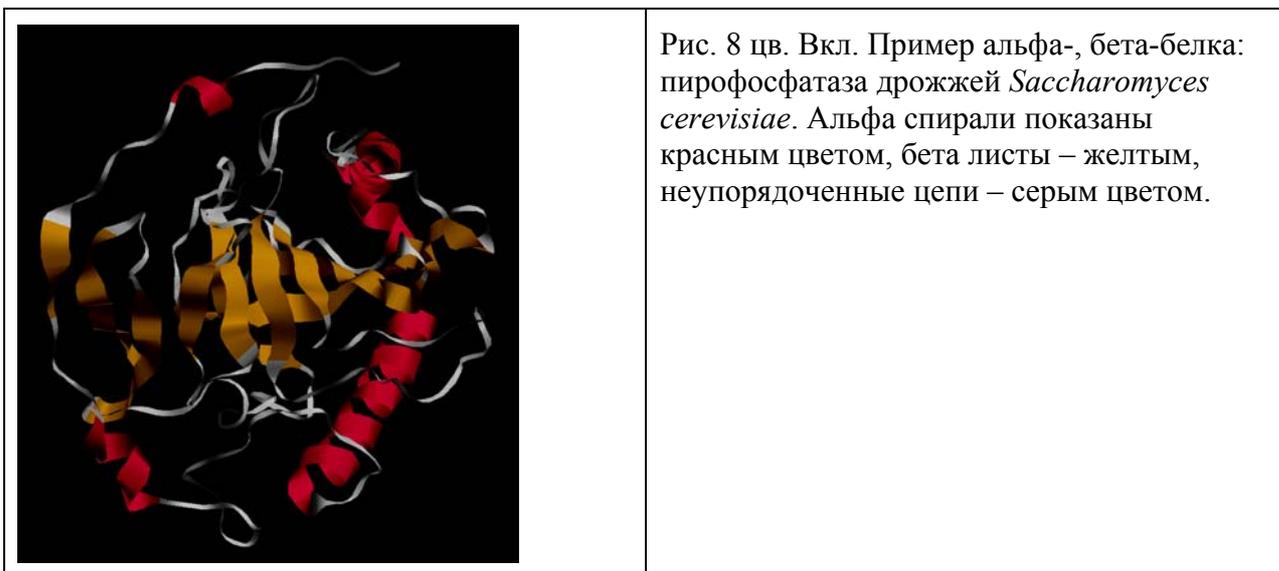


Рис. 7 цв. вкл. Миоглобин (стереопара). Бета-листы должны быть показаны желтым цветом, но их нет. Альфа спирали показаны красным цветом, неупорядоченные полипептидные участки – серым. Порфириновое кольцо гема (только связи, но не атомы) показано синим цветом. Атом железа показан в виде желтой сферы с радиусом Ван-дер-Ваальса.

Порин, рассмотренный выше (см. рис. 6 цв. Вкл.) может служить примером белка, у которого центральные части субъединиц полностью сложены из β –листов.



Немало белков содержат в срединной части сочетание α -спиралей и β -листов. Структура одного из таких белков, пиррофосфатазы дрожжей, представлена на рисунке 8 цв. Вкл.

На поверхности глобулярных белков располагаются полярные (гидрофильные) группы, тогда как внутренняя часть глобулы гидрофобна. Обнаженная гидрофобная поверхность в водной среде существовать не может: глобулы, имеющие такие поверхности, будут образовывать четвертичную структуру или собираться в неупорядоченные агрегаты.

Теория белка, согласно которой молекула белка представляет собой как бы каплю жира, окруженную гидрофильной оболочкой, была выдвинута отечественными учеными С.Е. Бреслером и Д.Л. Талмудом еще в начале сороковых годов прошлого столетия и оказалась абсолютно верной. На рисунке 9 цв. Вкл. показаны срезы через глобулу миоглобина, причем слева показаны все аминокислоты, справа – только гидрофобные, а в центре – только гидрофильные. Видно, что гидрофобные аминокислотные остатки расположены по поверхности белковой молекулы, а гидрофильные – внутри.

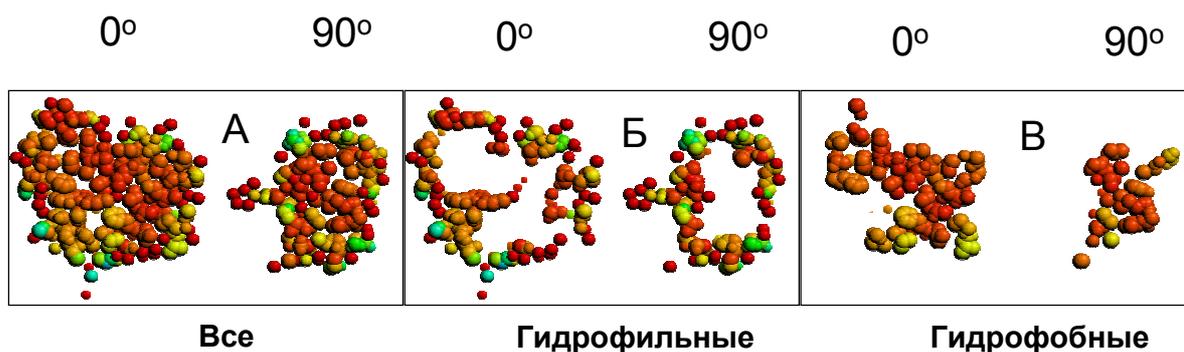


Рис. 9 цв. Вкл. Срезы через глобулу миоглобина. Срезы толщиной примерно в один атом сделаны через центр тяжести молекулы. Они идут в двух взаимно перпендикулярных направлениях на каждой из трех пар изображений (изображения справа повернуты на 90° по сравнению с изображениями слева). Красным цветом даны незаряженные, синим – заряженные группы.

A — показаны все аминокислотные остатки, *Б* — показаны только гидрофильные аминокислоты, *B* — показаны только гидрофобные аминокислоты. Видно, что

центральную часть молекулы занимают гидрофобные остатки, а гидрофильные расположены по периферии молекулы.

7.3 Как знание структуры молекулы белка помогает понять механизм ее работы

Проблема связи строения белковой молекулы с функциями, которая эта молекула выполняет, не может быть раскрыта сколь-нибудь полно в сравнительно кратком лекционном курсе. В сущности, каждый белок, выполняет свою собственную функцию и имеет для этого уникальную структуру, а известных структур белков сейчас насчитывается около 5 тысяч. Поэтому мы ограничимся всего несколькими примерами, выбранными весьма произвольно.

7.3.1 Каталаза, как она устроена, работает и защищается

Каталаза – широко распространенный фермент, который разлагает пероксид водорода с образованием кислорода и воды. Схема работы каталазы показана на рис 7.1.

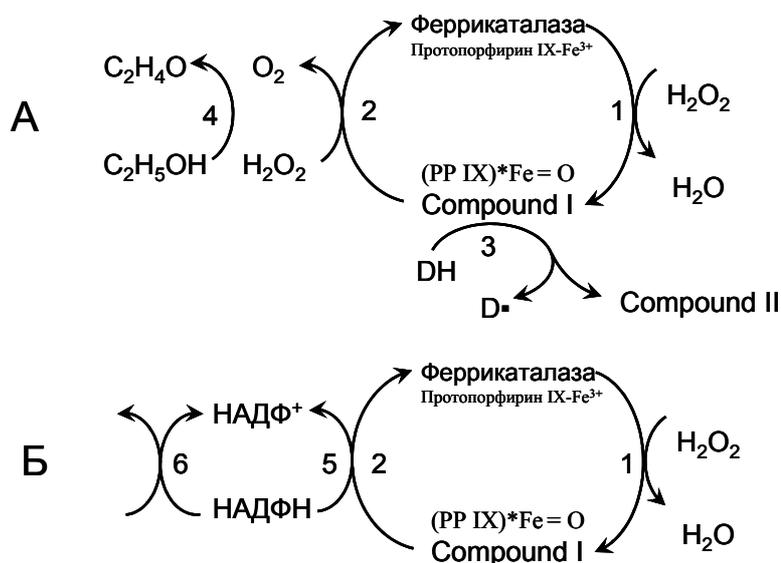


Рис. 7.1. Схема работы каталазы

А – работа активного центра. В покоем состоянии активный центр каталазы (гем) представляет собой комплекс гематопорфирин IX-Fe(III). Такой фермент часто называют **феррикаталазой**. Феррикаталаза реагирует с двумя молекулами пероксида водорода (реакции 1 и 2). В этом цикле промежуточное состояние фермента получило название Соединение I (**Compound I**). При недостатке пероксида реакция 2 задерживается и Compound I захватывает электрон от какой-то группы внутри белка (DH), превращаясь в неактивную форму каталазы Compound II (реакция 3). Это может привести к необратимой инактивации фермента. В условиях эксперимента этого можно избежать, добавив этанол или другой восстановитель, который регенерирует феррикаталазу из Compound I (реакция 4).

Б – защита каталазы от инактивации кофактором НАДФН. Каталаза млекопитающих имеет центр связывания НАДФН с высоким сродством. НАДФН восстанавливает Compound I и тем самым регенерирует феррикаталазу, спасая фермент от инактивации (реакция 5). Окисленный пиридиннуклеотид НАДФ⁺ отщепляется от апофермента и восстанавливается обратно до НАДФН

за счет внутриклеточных субстратов окисления.

Исходная молекула каталазы в покоем состоянии содержит в активном центре комплекс протопорфирина IX-Fe(III) и называется феррикаталазой. В реакции с первой молекулой пероксида водорода железо гема связывает атом кислорода, а на порфириновом кольце образуется свободный радикал. Эта промежуточная форма фермента носит название Compound I. При этом пероксид водорода восстанавливается с образованием молекулы воды. Compound I – мощный окислитель, и если в районе активного центра появляется вторая молекула пероксида водорода, она окисляется с образованием молекулярного кислорода и воды. Таким образом, превращение пероксида водорода в воду и кислород требует постоянного перехода феррикаталазы в Compound I и обратно.

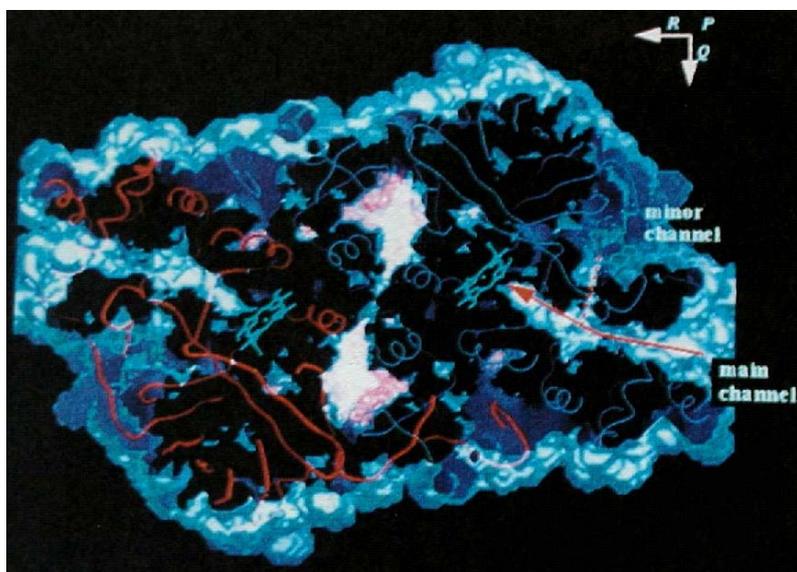


Рис. 10 цв. вкл. Каналы внутри молекулы каталазы.

Все эти реакции происходят в активном центре фермента, который запрятан глубоко внутри молекулы белка. Данные рентгеновской кристаллографии показывают, что пероксид водорода проникает внутрь молекулы каталазы по длинному сужающемуся каналу (см. рис. 10 цв. Вкл.), при этом в канале могут перемещаться как молекулы воды, так и молекулы субстрата. Однако ни те, ни другие не перемещаются совершенно свободно, а как бы перепрыгивают с одного фиксированного положения на другое. Это доказывается тем, что молекулы воды хорошо видны на картах электронной плотности (рис. 11 цв. Вкл.). Если бы молекулы воды не были фиксированы, то в разных ячейках кристалла они занимали бы разное положение, и рассеяние ими рентгеновских лучей не дало бы дифракционной картины. Точнее сказать, рассеяние рентгеновских лучей молекулами воды не дало бы определенного вклада в рефлексы от белкового кристалла.

Не совсем понятно, зачем понадобилось создание такого сложного пути к активному центру, но его существование создает трудности как в притоке субстрата, так и в оттоке продуктов реакции. В результате может сложиться такая ситуация, когда после взаимодействия феррикаталазы с первой молекулой пероксида водорода Compound I не

встретит вторую молекулу, и появится вероятность его взаимодействия с химическими группами внутри самой молекулы белка. Эксперименты показывают, что в подобной ситуации Compound I подвергается одноэлектронному восстановлению с образованием так называемого Compound II – неактивной формы каталазы (реакция 3 на рис. 7.1). В условиях эксперимента этого можно избежать, если ввести в систему какой-нибудь искусственный восстановитель, например, этанол, который восстанавливает Compound I обратно в феррикаталазу и тем самым избавляет фермент от саморазрушения.

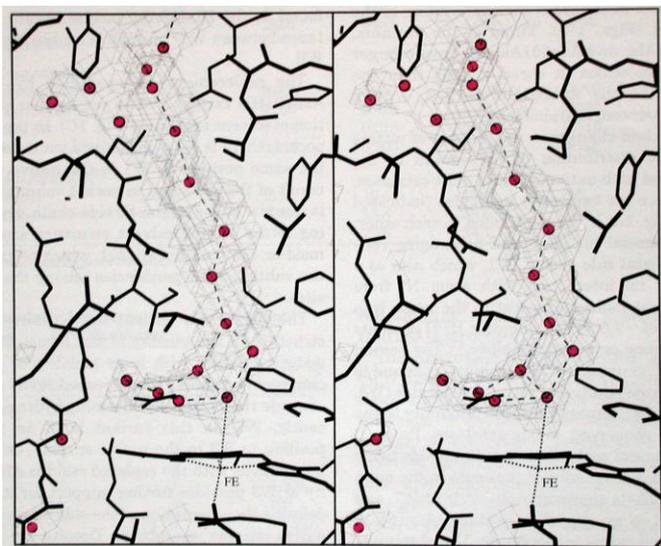


Рис. 11 цв. вкл.
Стереорисунг структуры большого канала внутри молекулы каталазы. Взято из работы Melik-Adamyan, W., J. Bravo, et al. (2001). *Proteins* **44**(3): 270-81. с разрешения автора. Показаны только химические связи. Красные кружочки – атомы кислорода молекул воды. Внизу виден гем с атомом FE в центре.

В природных условиях этанол не может быть подходящим восстановителем для такой цели; вместо этого используется НАДФН (Б на рис. 7.1). Киркман и Гестани обнаружили в 1984г., что каталаза млекопитающих содержит прочно связанный НАДФН. Позднее были получены кристаллы каталазы, содержащие НАДФН и выяснена пространственная структура этого ферментного комплекса. Как видно на рис. 12 цв. Вкл., НАДФН находится на периферии белковой молекулы; окисления он по-видимому выходит в раствор, где восстанавливается в цикле трикарбоновых кислот. Расстояние между гемом и НАДФН в каталазе составляет почти 20 Å, и здесь мы впервые сталкиваемся с проблемой механизма переноса электронов между отдаленными группами белка, которую мы рассмотрим несколько позже.

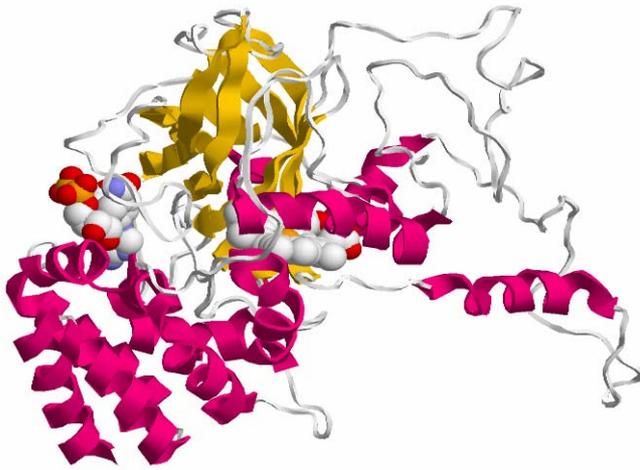
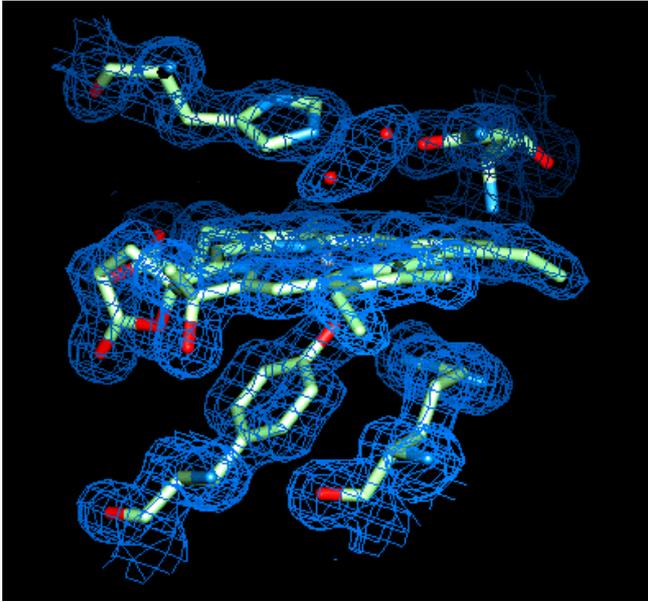


Рис. 12 цв. вкл. Структура каталазы из печени быка. Расстояние между гемом и НАДФН составляет примерно 20 А.

Как мы видим, даже схематическое рассмотрение механизма процессов в этом ферменте потребовало знания атомной структуры его молекулы. Тем более, знание структуры необходимо для понимания механизма самого каталитического акта. Структура активного центра каталазы показана на рис.13 цв. вкл. Мы видим, что железо, связанное с четырьмя атомами азота порфирина, соседствует с одной стороны с имидазольной группой гистидина, а с другой стороны – с заряженным карбоксилем аспарагиновой кислоты. Для каталитического действия важно не только, какие атомы окружают ион железа, но и на каком расстоянии они находятся. Гемоглобины, которые имеют центр связывания кислорода, в общих чертах сходный с активным центром каталазы, выполняет тем не менее совершенно другую функцию. Только детальное рассмотрение взаимодействия атомов с позиций квантовой механики позволяет по-настоящему понять механизм работы не только каталазы, но и любого другого фермента. Но чтобы квантовая механика заработала, нужно знание расстояния между атомами, длины существующих химических связей, углов между связями, распределения зарядов и т.д., а все эти сведения на сегодняшний день дают главным образом данные белковой кристаллографии, полученные с высоким (атомным) разрешением.

Рис. 13 цв. вкл. Активный центр каталазы *Penicillium vitale* с двумя молекулами воды, включающий гем (плоская группа в центре рисунка), аминокислотные остатки гистидина-63 и аспарагина (вверху), и аминокислотные остатки тирозина-350 и аргинина (внизу).



7.3.2 Перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий

В настоящее время хорошо изучены участники переноса электронов от субстратов на кислород, которые представляют собой белковые комплексы, встроенные во внутреннюю мембрану митохондрий или других внутриклеточных мембран. На рис. 7.2 дана схема переноса электронов по так называемой дыхательной цепи внутренней мембраны митохондрий человека и животных. В переносе электронов от водорастворимых молекулярных субстратов (НАДФН или сукцината) участвуют четыре дыхательных комплекса. Перенос электронов между комплексами осуществляется за счет диффузии относительно небольших молекул: в липидной фазе мембран – это коэнзим Q (убихинон), а в водной фазе – это цитохром *c*. Однако ученых давно волновал вопрос о том, каким образом переносятся электроны не между белковыми комплексами, а внутри их самих. Еще в 30-е годы Н. Риль, а несколько позднее – А. Сцент-Дьердьи высказали предположение, что белки обладают свойствами полупроводников, в которых, как известно, электроны могут перемещаться по так называемым зонам проводимости на сравнительно большие расстояния. Однако, позднее было показано, что данные о переносе энергии электронного возбуждения в белковых системах, на которые ссылались эти авторы, объясняются не полупроводниковыми свойствами белка, а индуктивно-резонансным переносом энергии электронного возбуждения по механизму Ферстера-Вавилова (Ю.А.Владимиров, С.В.Конев, 1958). Позднее в опытах по фотопроводимости белковых пленок было показано, что энергия, необходимая для появления подвижных электронов в белковых системах, во много раз превышает энергию химических реакций в биологических структурах. Таким образом, полупроводниковый механизм не может объяснить переноса электронов по структуре дыхательных переносчиков.

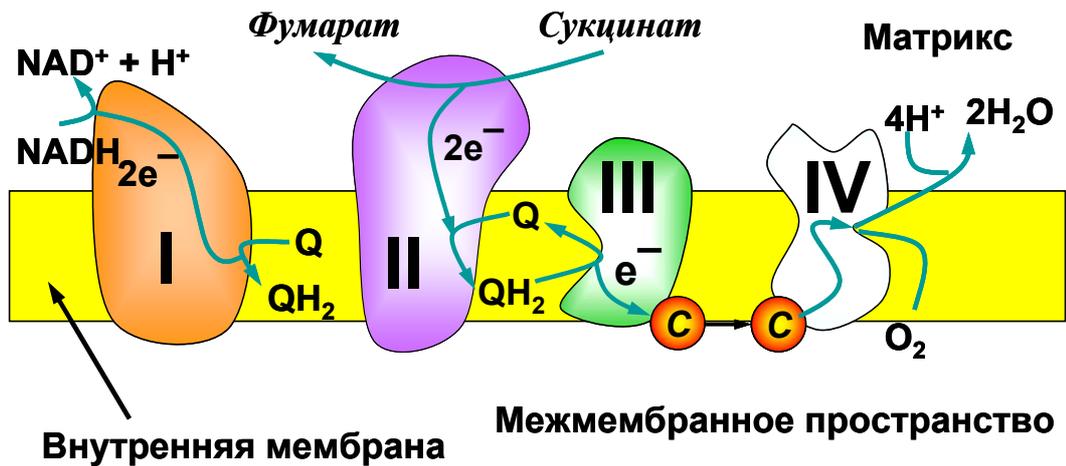


Рис. 7.2. Схема строения дыхательной цепи (цепи переноса электронов) во внутренней мембране митохондрий человека.

I – IV – дыхательные комплексы, c – цитохром c .

Между тем, данные, полученные методом белковой кристаллографии, показывают, что электрон преодолевает значительное расстояние при переносе от одного ред-окс центра к другому (см. рис. 14 цв. Вкл.). В настоящее время предложено два механизма переноса электронов в дыхательной цепи: 1) перенос за счет теплового движения подвижных доменов белка на гибкой полипептидной цепи. Пример такого переноса приводят З.Жанг и сотр. в работе 1998г. В дыхательном Комплексе III электроны переносятся от гема цитохрома c через железо-серный кластер путем колебательного движения железо-серного кластера, который прикреплен к остальной части комплекса гибкой полипептидной цепью (см. рис. 7.3). В одном положении FeS -группа контактирует с гемом цитохрома C и забирает электрон, а в другом положении касается гемма b_L цитохрома B и отдает электрон. Движение подвижного домена – совершенно хаотическое, и перенос электрона происходит по законам термодинамики в сторону уменьшения свободной энергии системы.

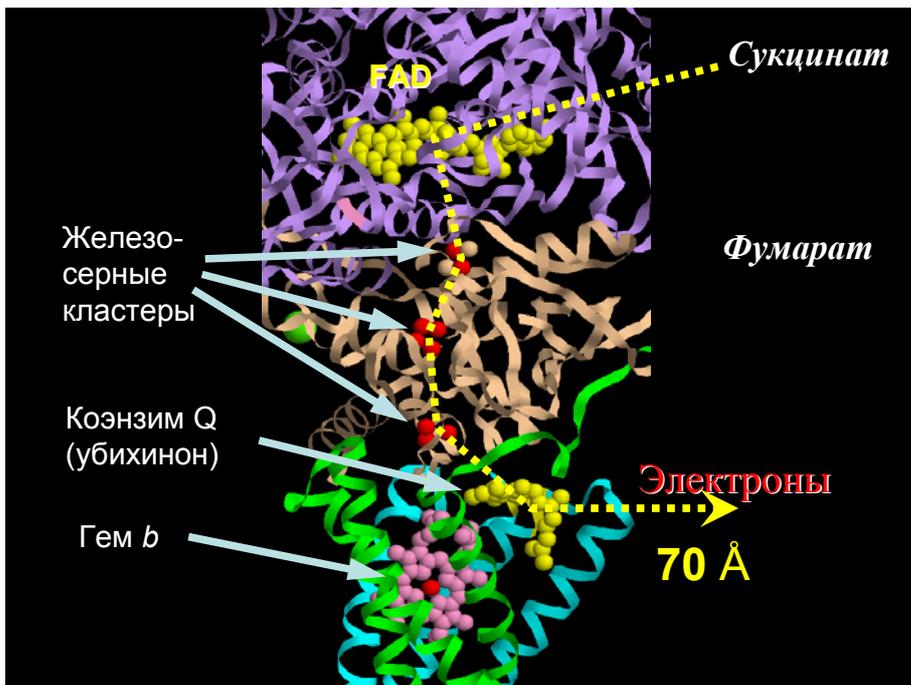


Рис. 14 цв. Вкл. Путь переноса электронов в дыхательном Комплексе III.

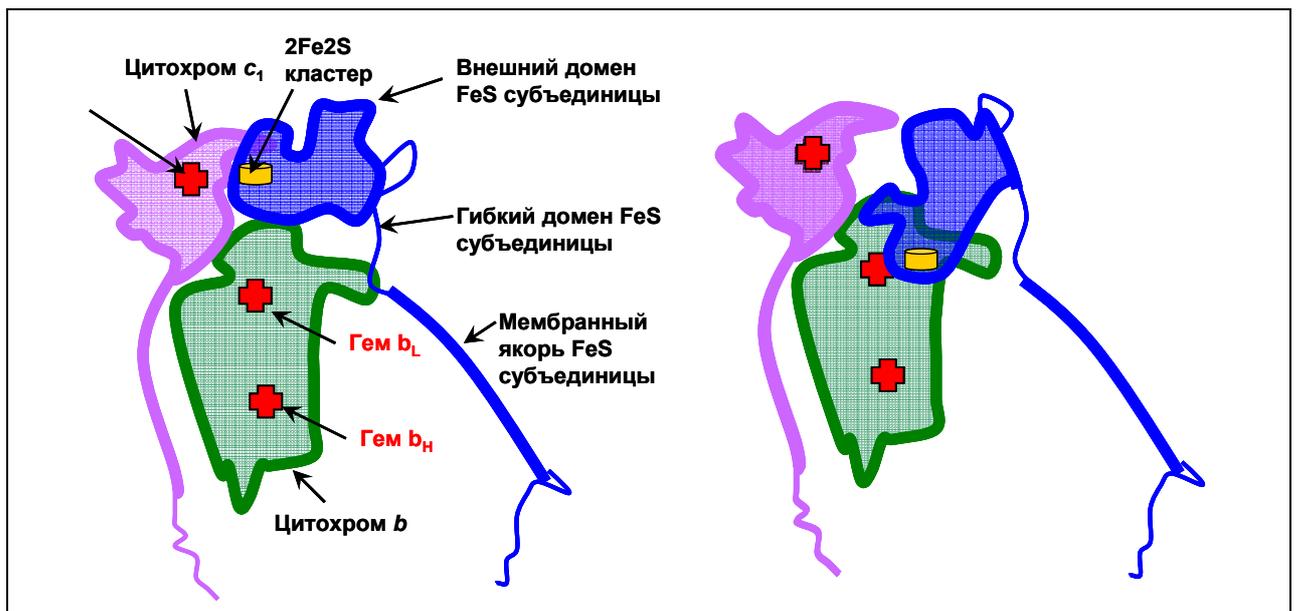


Рис. 7.3 Эстафетный перенос электронов в *bc1* комплексе. На рисунке схематически изображены контуры белков, входящих в *bc1* комплекс дыхательной цепи митохондрий (комплекс III). В действительности известна полная структура этих комплексов, полученная методом рентгеноструктурного анализа кристаллов в нескольких состояниях комплексов, но на рисунке для простоты приведены только контуры белков и активные центры/ C[tfv] построенные по данным статьи Дурузо и сотрудииков (Darrouzet, E., et al., *Large scale domain movement in cytochrome bc1: a new device for electron transfer in proteins*. Trends Biochem. Sci., 2001. **26**(7): p. 445-461.). Слева показано расположение цитохромов c_1 , b и субъединицы комплекса, содержащей железо-серные кластеры, в момент, когда 2Fe2S-центр сближен с гемом цитохрома c_1 и получает от него электрон. Справа показан другой момент, когда головка 2Fe2S-субъединицы в водной фазе повернута таким образом, что железо-серный центр сближен с одним из гемов цитохрома b и

может отдать ему электрон.

Существует и другой, возможно даже более важный, механизм переноса электронов, который связан с его волновыми свойствами. Волна, как известно, не имеет точной локализации, поэтому электрон, находящийся в каком-то одном центре, в принципе может оказаться где-то по соседству. Вероятность такого «туннельного» переноса электронов зависит от времени. За большее время вероятность переноса, естественно, выше. На рис. 7.4 показана зависимость времени переноса от расстояния между ред-окс центрами. Типичное время переноса электрона между соседними центрами в дыхательных переносчиках – 1 мс. За это время электрон в среднем способен преодолеть расстояние 16-18 Å. Общий путь электрона внутри белковой структуры, например, дыхательного Комплекса III, составляет примерно 70 Å (рис. 14 цв.вкл.), а расстояния между парами соседних переносчиков как раз и равны примерно 16-18 Å.

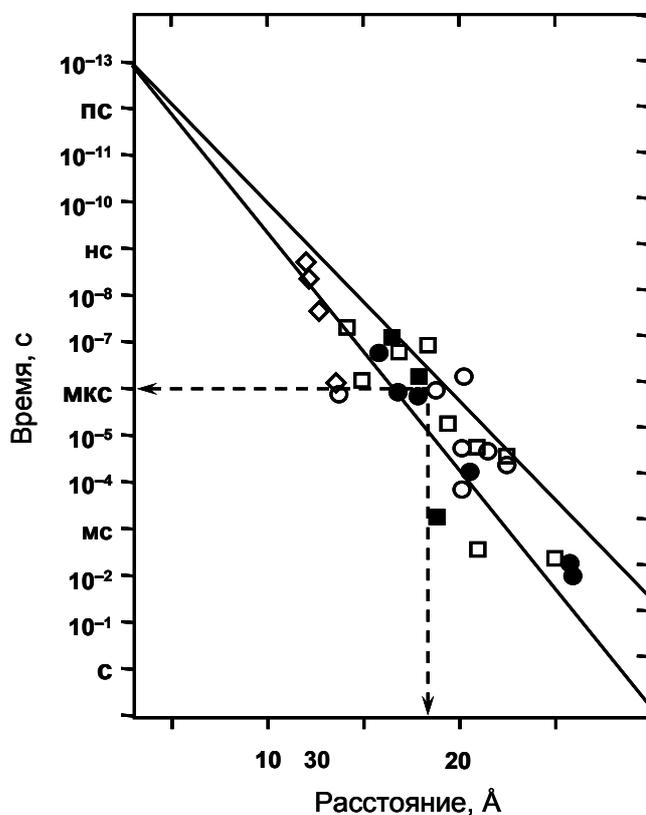


Рис. 7.4 Расстояния туннельного перемещения электрона в белках.

Показана зависимость этой величины от времени для пяти белков, модифицированных путем присоединения красителя рутениевого красного, который в условиях эксперимента выделяет электрон при вспышке света. Азурин представлен черными кружочками; цитохром с – светлыми кружочками; миоглобин – черными квадратами; цитохром b562 – светлыми квадратами и высокопотенциальный железосерный белок – светлыми ромбиками

(График взят из статьи Winkler J. R. Electron tunneling pathways in proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* 2000, 4:192–198). Прямые на графике представляют собой факторы убыли расстояния (distance decay factors) равные 1.0 (верхняя прямая) и 1.2 Å⁻¹ (нижняя прямая).

Таким образом, перенос электронов по туннельному механизму хорошо объясняет экспериментальные данные. Мы не имеем здесь возможности подробно останавливаться на проблеме о преимущественных путях распространения электрона по механизму туннелирования; скажем только, что в настоящее время существуют теоретические работы, в которых вычисляются такие преимущественные пути. В качестве примера на рис. 15 цв. Вкл. показана структура цитохромоксидазы и обозначены «трубы», по которым, согласно расчетам, могут переноситься электроны между тремя ред-окс центры в этом дыхательном Комплексе IV. Таким образом, расшифровка атомной структуры

белковых комплексов в цепи переноса электронов, которая еще не вполне закончилась, позволяет объяснить молекулярные механизмы переноса электронов в биологических объектах. Здесь мы стоим на пороге новой науки, которую можно назвать молекулярной биоэлектроникой и которая обещает внести существенный вклад как в медико-биологическую науку, так и в техническую электронику будущего.

7.3.3 Утечка электронов и образование свободных радикалов

Ранее уже говорилось о том, какую большую роль в возникновении и развитии болезней человека играют свободные радикалы. Как уже упоминалось, значительное количество

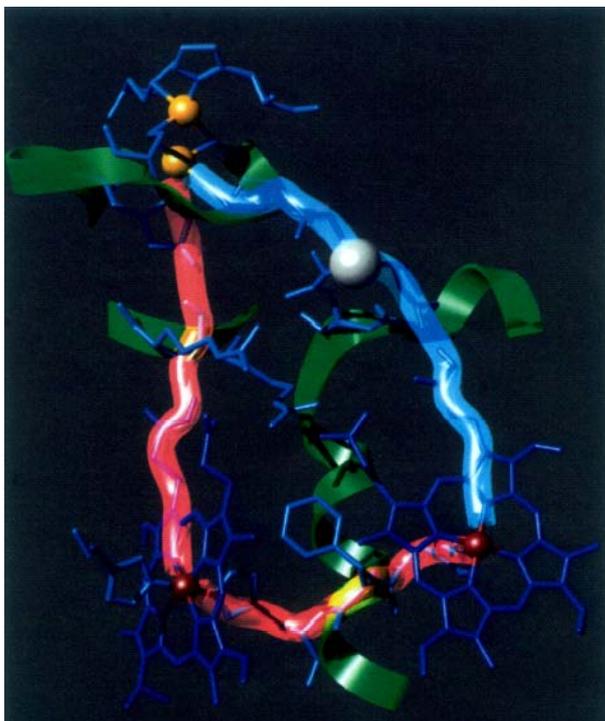


Рис. 15 цв. вкл. Туннельные трубы, по которым идет транспорт электронов в цитохром-оксидазе .

По этим трубам (показаны стрелками) преимущественно происходит туннельный перенос электронов между CuA и гемом цитохрома а (левая труба); между CuA и гемом цитохрома а3 (правая труба) и между этими двумя электронными потоками (нижняя труба). Взято из обзора Винклера с небольшими добавками(Winkler J. R . **Electron tunneling pathways in proteins**Current Opinion in Chemical Biology 2000, 4:192–198).

радикалов образуется в цепи переноса электронов митохондрий. По-видимому, не в одном, а в нескольких местах дыхательной цепи электроны

сворачивают с правильной дороги и непосредственно реагируют с молекулами кислорода, образуя супероксидный радикал, дальнейшее преобразование которого приводит к образованию других, более опасных, радикалов и повреждению клеточных структур. Имеющиеся данные указывают на то, что электроны попадают на кислород при его взаимодействии с органическими радикалами, образующимися в качестве промежуточных переносчиков в дыхательной цепи. Спорным остается пока вопрос о том, это радикалы флавинов или убихинона. По крайней мере в некоторых случаях доказано участие радикалов флавин-нуклеотидов. В работе Янковской и сотр. на основании данных структуры дыхательного комплекса II (сукцинат дегидрогеназа) был рассмотрен вопрос о причинах образования супероксида на флавиновом центре этого комплекса. Авторы сопоставили структуру и свойства двух родственных белковых комплексов: сукцинат убихинон редуктазы (SQR) и хинон фумарат редуктазы (QFR), выделенных из бактерий (рис. 16 цв. Вкл.). Комплекс SQR – аналог сукцинат дегидрогеназного комплекса млекопитающих (дыхательный Комплекс II). Методами молекулярной биологии один из этих комплексов может быть встроен в дыхательную цепь бактерий. Оказалось, что при

одном и том же субстрате оба комплекса одинаково хорошо работают в дыхательной цепи: бактерии дышат и живут. Однако, при этом бактерии с QFR выделяют в 25 раз больше супероксида, чем бактерии с SQR. Авторы обнаружили, что причиной такого различия является разница в распределении электронной плотности между переносчиками при работе в цепи переноса электронов. В стационарном состоянии электронная плотность на флавине в SQR составляла всего 2% от той, которая соответствует полному переходу флавина в восстановленную (радикальную) форму. В QFR в аналогичной ситуации электронная плотность была 100%. Ясно, что в последнем случае вероятность переноса электрона на кислород с образованием супероксида была в 50 раз выше, чем в первом (см. таблицу 7.1).

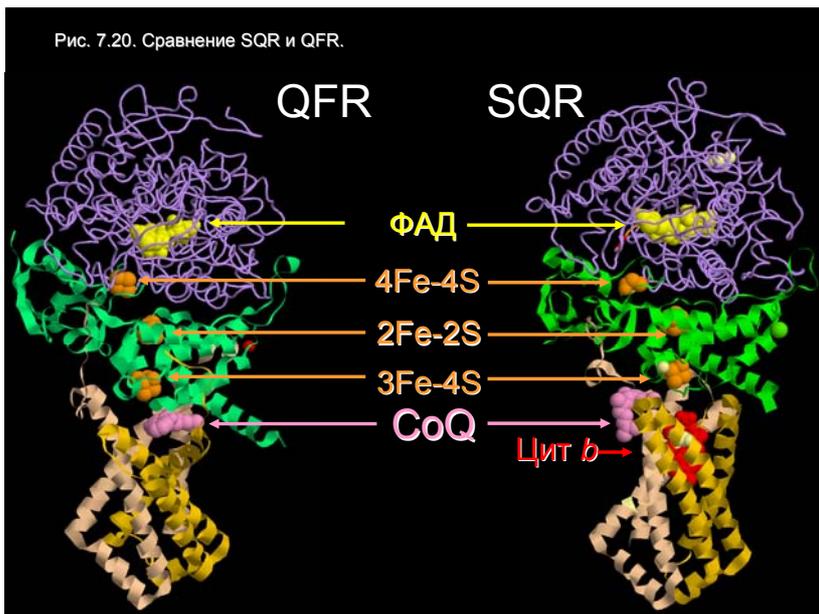


Рис. 16 цв. вкл. Сравнение структур двух родственных белковых комплексов SQR и QFR.

Таблица 7.1

	SQR	SQR без гема	QFR
ФАД	0,02	0,18	1,0
2Fe-2S	0,43	0,84	0,65
4-Fe-4S	0,00	0,00	0
3Fe-4S	0,87	0,98	0,34
Гем <i>b</i>	0,68		

Цифры показывают число избыточных электронов у каждого из центров (доля восстановленной формы переносчика в стационарном состоянии цепи переноса электронов) (с небольшими купюрами и добавлениями цит по Yankovskaya, V., R.e. Rob

Horse, S. Toernroth, C. Luna-Chavez, H. Miyoshi, C. Leger, B. Byrne, G. Cecchini, and S. Iwata. Science, 2003. 299: p. 700-704).

Причина, очевидно, заключается в некотором различии молекулярной структуры этих комплексов. Частично это обусловлено тем, что сукцинатдегидрогеназа имеет дополнительный гем типа *b*, которого нет в QFR и функция которого может заключаться в «оттягивании» электронов от флавинового центра. Это видно из того, что при удалении гема *b* из SQR выделение супероксида увеличивалось в 8 раз. Но оно все равно оставалось в 6 раз ниже, чем в QFR. Это различие связано, очевидно, с изменениями в укладке полипептидных цепей этих двух комплексов.

Существуют генные болезни, связанные с мутациями в зоне дыхательного Комплекса II человека. К ним относятся атрофия оптического нерва, образование некоторых видов опухолей (параганглиома, феохромоцитомы), миопатии и энцефалопатии. Имеются основания думать, что развитие этих болезней связано с избыточным образованием свободных радикалов в клетках больных людей.

В настоящее время патология как наука все больше переходит на молекулярно-клеточный уровень. Большая часть болезней человека связана с теми или иными нарушениями обмена веществ. Исполнительные механизмы этих нарушений в большинстве случаев лежат в изменениях пространственной структуры белковых молекул и связанным с этим извращенном функционировании (malfunction) белковых молекул.

7.4 Перспективы практического применения

Само по себе знание механизма работы белков и причин нарушений нормальной работы важно для биологии и медицины как фундаментальной науки. Приложения фундаментальных знаний не всегда заметны и порой неожиданны. Но о некоторых очевидных путях использования знаний белковой структуры уже можно говорить с определенностью. Приведем три примера.

7.4.1 Конструирование новых лекарственных препаратов (драг-дизайн)

Определение структуры белков в настоящее время представляет собой неотъемлемую часть фармацевтических исследований, причем самые большие фармацевтические компании располагают оборудованием для кристаллографии. Ряд небольших компаний специализировались на определении структуры с целью разработки лекарств, используя современные автоматизированные технологии (называемые high-throughput). К числу таких компаний относятся Astex Technology Ltd (Cambridge, UK), Integrative Proteomics, Inc. (Toronto, Canada), Plexxikon, Inc. (San Francisco, USA), Proteros Biostructures, GmbH (Martinsreid, Germany), Structural GenomiX, Inc. (San Diego, USA), Syrrx, Inc. (San Diego, USA) and TRIAD Therapeutics (San Diego, USA). Все они были созданы недавно.

Дело в том, что знание трехмерной структуры белков-мишеней – это отправная точка для конструирования лекарств путем выяснения топографии контактирующих поверхностей лиганда (связываемой молекулы, например, субстрата, ингибитора или лекарства) и его белковых мишеней. Эти две поверхности должны повторять форму друг друга и содержать как можно больше точек притяжения, например, противоположных зарядов, участников водородных связей или просто гидрофобных групп. Такого рода информация

может помочь химикам синтезировать новые вещества, которые должны лучше взаимодействовать с белками, а это будет усиливать действие лекарственного препарата и сделает действие лекарства более избирательным. Сейчас в продаже уже имеется несколько лекарств, которые были созданы этим методом, названным драг-дизайн (конструирование лекарств). Чаще всего в качестве примера приводят лекарства против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такие как ампренавир (Agenerase) и нелфинавир (Viracept), которые были созданы на основе использования структуры кристаллов ВИЧ протеазы.

Одним из способов «подгонки» структуры лекарственного препарата к ложу для субстрата, которое имеется в активном центре белка-мишени, служит последовательный подбор фрагментов будущего лекарства с целью последующего синтеза окончательного препарата. Вначале с помощью компьютерных программ подбирают молекулярные фрагменты, соответствующие форме и свойствам поверхности полости в активном центре белка. Пространственную структуру таких, обычно небольших, молекул, как правило, можно найти в огромной базе данных структур малых органических молекул. Чтобы убедиться в том, что подобранный фрагмент действительно вписывается в активный центр белка и как именно, проводят кристаллографическое исследование. Для этого молекулу-фрагмент лекарства растворяют (обычно в диметилсульфоксиде) и добавляют к изолированному белковому кристаллу. Примерно через час молекулы фрагмента проникают в активные центры белковых молекул в кристалле и можно начинать измерять дифракцию рентгеновских лучей. Подобрав таким способом несколько фрагментов, заполняющих разные области активного центра, синтезируют окончательную молекулу лекарства, в которой эти фрагменты соединены таким образом, что теперь уже вся молекула оптимальным образом встраивается в молекулу-мишень. Таким образом осуществляется «стыковка» (docking) лекарства с белком-мишенью. Хотя большую часть этого процесса осуществляет компьютер, кристаллографическое исследование структуры необходимо как для его начала, так и для его завершения.

В истории фармацевтики с целью драг-дизайна были изучены приблизительно 500 мишеней. Это не так уж мало, тем не менее, возможности тут далеко не исчерпаны. Следует помнить, что в геноме человека содержится 40,000 генов, что соответствует даже большому количеству белков, которые могут быть синтезированы. Многие из них, если не большая их часть, могут быть потенциальными мишенями для новых лекарств различного молекулярного веса и структуры, а главное – разнообразного действия.

7.4.2 Молекулярная биоэлектроника и нанотехнологии

Совершенно иные перспективы применения знаний структуры белков может найти при использовании белковых молекул в качестве элементов для вычислительной техники. В частности, большие надежды возлагаются на использование светочувствительных белков, таких как родопсин или бактериородопсин, в качестве ячеек памяти. Ячейка памяти в современном компьютере при подаче на нее электрического импульса переходит в новое состояние, которое может быть определено при прохождении второго (считывающего) импульса. Вместо электрического потенциала записывающим сигналом может быть свет лазера, под влияние которого изменяются оптические свойства ячейки. Другой луч может обнаружить, произошли ли изменения в данной ячейке. Бактериородопсин, светочувствительный белок галофильной водоросли, под действием света может переходить из исходного состояния (назовем его формой В) в некое измененное состояние (форму М), при этом изменяется поглощение этого белка (Рис 7.5). На этом основано применение бактериородопсина в качестве запоминающего элемента. В блоке трехмерной памяти молекулы бактериородопсина помещены в гель (см. Рис 7.6). Имеются устройства

фокусировки и развертки лазерных пучков, благодаря которым в каждый момент времени свет попадает на одну определенную молекулу. Первый луч записывающий, второй – считывающий. Благодаря малым размерам ячейки и однозначному ответу белковых молекул на сигнал, память, построенная из бактериородопсина, обещает существенно превзойти память, построенную на полупроводниковых материалах, как по плотности записи, так и по быстродействию.

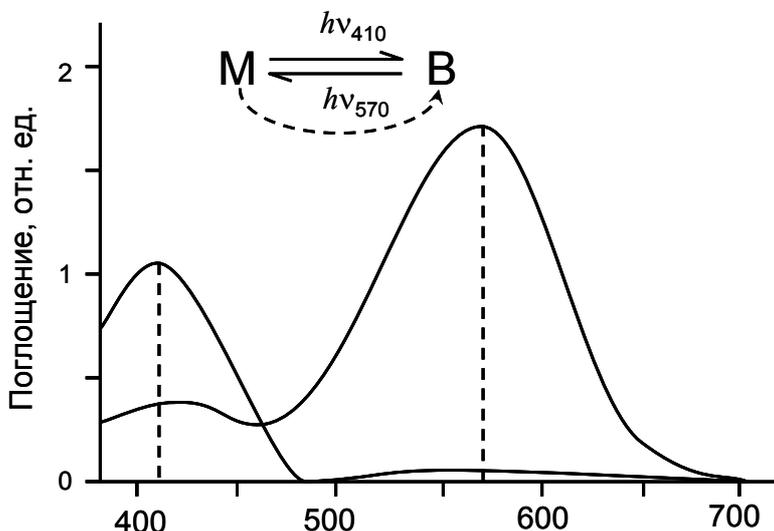


Рис. 7.5. Спектры поглощения **В** и **М** состояний бактериородопсина. Фиолетовое **В** состояние - исходное состояние БР после световой адаптации. **М** – интермедиат, спектр которого сильно сдвинут в голубую область от **В**. Для фотохромных применений фотохимическое взаимное преобразование **В** и **М** используется из-за большого фотохромного сдвига (приблизительно в 160 нм).

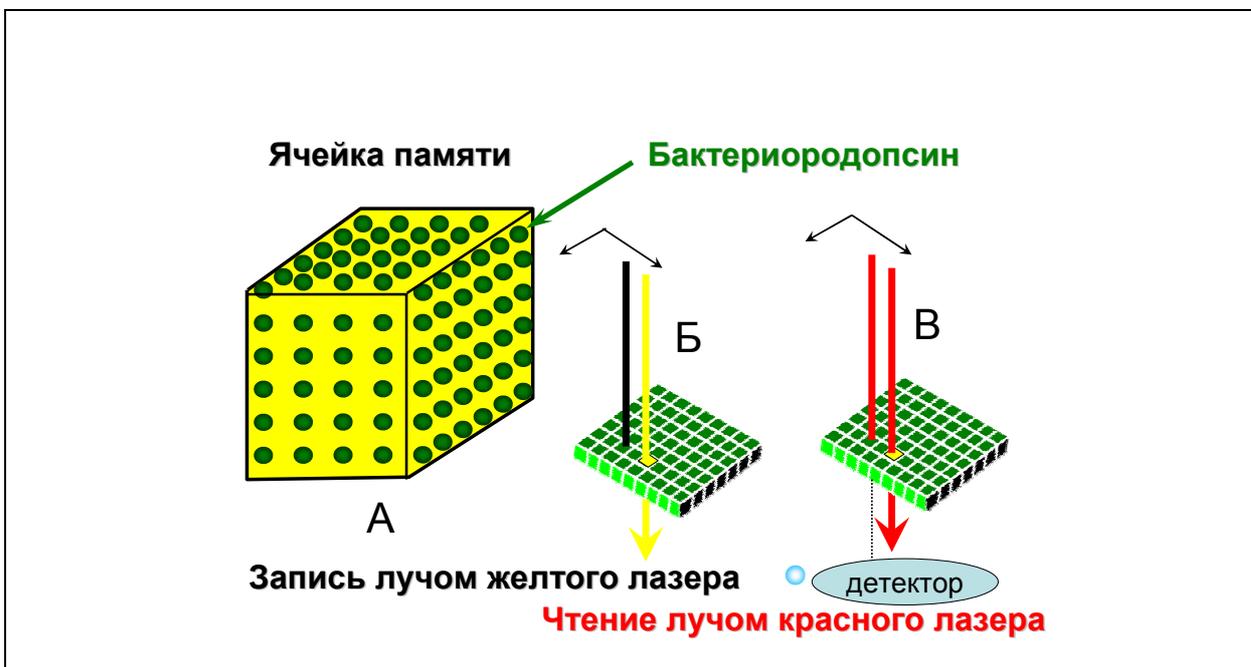


Рис. 7.6. Создание ячейки памяти, в которой светочувствительными элементами служат молекулы бактериородопсина (БР).

Молекулы белка закреплены в прозрачном геле (слева). Развертка лазерных лучей по двум осям осуществляется специальным устройством, получившем название пространственный светомодулятор (SLM – *space light modulator*). Сфокусированный на определенной глубине слоя яркий луч желтого лазера включается при прохождении определенной ячейки, вызывая в

молекуле родопсина фотохимическое превращение (В ® М переход). После такой записи информация считывается слабым лучом красного лазера. Если считывающий (красный) луч лазера поглощается неизменной молекулой БР (форма В), то этот сигнал воспринимается детектором света как компьютерный 0. Измененная молекула (форма М) приобретает пропускание в красной области (где исходный БР свет пропускает плохо). Световой сигнал, воспринимаемый детектором, оказывается в этом случае более интенсивным и воспринимается как компьютерная 1. На рисунке ячейка (молекула БР), измененная записывающим лучом, показана желтым квадратиком.

7.4.3 Биомолекулярные роботы?

Обычно с понятием робот связывают что-то очень большое и сильное. Однако для таких задач, как, например, медицина, более полезны были бы, наоборот, сверхминиатюрные роботы, способные проникать в любое место нашего организма, в мельчайшие кровеносные сосуды, быть может – внутрь определенных клеток. Расшифровка структуры белковых молекул привела к интересному выводу, что самые миниатюрные механические, оптические и электрические приборы и машины были давным-давно созданы Природой на основе белковых структур. Самое маленькое колесо в Природе – это вращающаяся часть фермента АТФазы из митохондрий и бактерий. Основная же часть этого фермента представляет собой крошечный электромотор, который использует энергию электричества, правда не электронов в металлических проводах, а протонов в водном растворе. Впрочем, существуют и другие белки, способные как раз преобразовывать электронное электричество, текущее по белкам дыхательной цепи, в протонное электричество, которое накапливается в виде разности потенциалов на клеточных мембранах. Генераторы протонного электричества могут работать не только на топливе, т.е. на энергии окисления органических молекул, но и от света, что происходит, например, в молекуле бактериородопсина и в фотосинтетических центрах хлоропластов высших растений. Достижения науки в этой области, основанные на расшифровке атомной структуры биомолекул, поистине грандиозны и многообещающи. Если есть все элементы для построения молекулярного робота, то почему бы не начать создавать сами роботы? С использованием белковой инженерии и нанотехнологий, включая наноэлектронику. Но это – тема Ваших будущих исследований, дорогие студенты..

Рентгеноструктурный анализ белковых кристаллов – основной метод изучения пространственной структуры белковых молекул. В сочетании с другими биофизическими методами, в первую очередь с ядерным магнитным резонансом высокого разрешения и компьютерным расчетом укладки полипептидных цепей, белковая кристаллография позволяет раскрыть и объяснить механизм узнавания белками субстратов, ингибиторов, регуляторов, гормонов и лекарств; механизмы ферментативного катализа, процессов переноса электронов; молекулярные механизмы преобразования энергии в живых клетках и многое другое. Знания о расположении атомов и функционировании активных центров лежат в основе всей современной молекулярной биологии и протеомики, служат путеводной нитью в белковой и геномной инженерии. Создание новых лекарственных препаратов на основе этих знаний, драг-дизайн, стало уже практикой в работе фармацевтических фирм. Будущее компьютерных технологий многие связывают с созданием базовых элементов компьютера, ячеек памяти и управляемых триггеров, с использованием белковых молекул, структура которых может быть усовершенствована методами молекулярной биологии под контролем данных рентгеноструктурного анализа

белков. Мировая наука вкладывает большие средства в развитие белковой кристаллографии, поскольку синхротронные станции, дифрактометры и высокопроизводительные расчетные и графические станции. Россия имеет замечательные традиции в этой области.