

PROTEIN  
CONFORMATIONAL  
DYNAMICS  
FROM THE PHYSICAL  
POINT OF VIEW

K. V. SHAITAN

*The modern ideas in the theory of protein dynamics are considered. The elasticity and viscosity of protein globule are discussed. A general picture of dynamical control of proteins functioning is presented.*

**Излагаются современные представления о конформационной динамике белков. Рассмотрены механические свойства белковых глобул, их упругость и вязкость. Обсуждена роль динамики белков в механизмах их функционирования.**

## КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКА С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ФИЗИКИ

К. В. ШАЙТАН

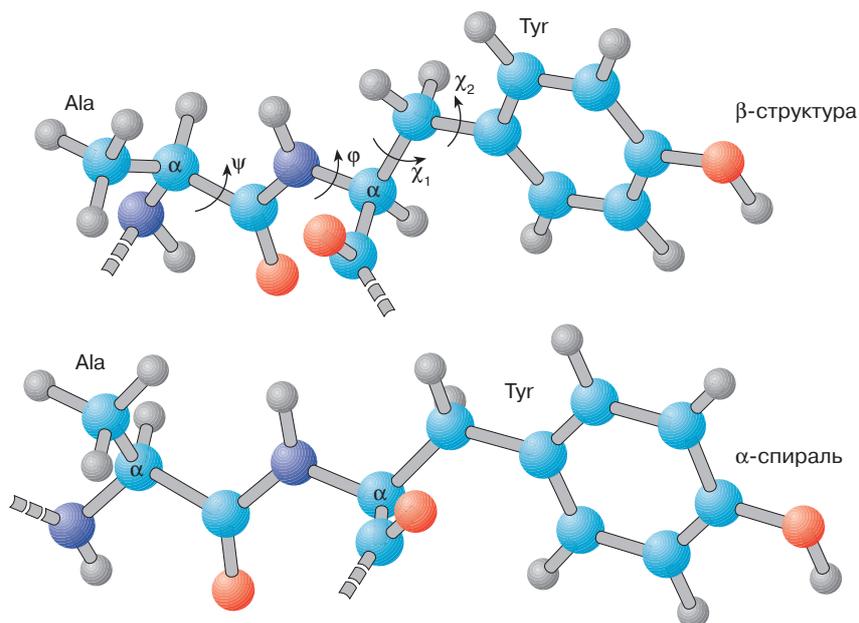
Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

### ВВЕДЕНИЕ

Со времен знаменитой работы Ж. Перрена, посвященной броуновскому движению (1908 год) в науке твердо установлено, что атомы и молекулы при температуре выше абсолютного нуля находятся в непрерывном и самопроизвольном тепловом движении. Это движение играет исключительно важную роль практически во всех процессах и явлениях, так или иначе связанных с атомными и молекулярными частицами. Биологические системы и молекулы белков, в частности, не являются здесь исключением. Динамическое поведение молекул тесно связано с их пространственной химической структурой. Особенности строения и основные степени свободы, определяющие динамическое поведение белков, кратко описаны ниже.

Как известно, белковая глобула состоит из полипептидной цепи, которая определенным образом уложена и образует уникальную пространственную структуру белка. Рассмотрим фрагмент полипептидной цепи, состоящий, например, из двух аминокислотных остатков аланина и тирозина (рис. 1). Остаток аланина содержит  $\text{CH}_3$ -группу, присоединенную к  $\text{C}_\alpha$  углеродному атому. Остаток тирозина содержит существенно более массивную группировку  $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ , связанную с другим  $\text{C}_\alpha$  углеродным атомом в пептидной цепи.  $\text{C}_\alpha$ -атомы в основной цепи соединяются с помощью пептидной группы  $-\text{CO}-\text{NH}-$ . Пунктиром на рис. 1 обозначены места присоединения следующих аминокислотных остатков с образованием пептидной группы [1].

Длины полипептидных цепей молекул белков находятся в диапазоне от нескольких десятков до тысяч звеньев. В пептидной цепи различают два типа степеней свободы. Первый — высокочастотные ( $\sim 10^{13} \text{ c}^{-1}$ ) колебания длин жестких валентных связей и валентных углов с амплитудами смещений атомов до  $\sim 0,1 \text{ \AA}$ . Второй обусловлен значительно более мягкими конформационными степенями свободы, связанными с вращениями вокруг одинарных связей. Линейный масштаб смещений атомов при этом достигает нескольких ангстрем. При повороте на полный угол  $360^\circ$ , если нет дополнительных стерических ограничений, обычно преодолеваются от 2 до 4 небольших потенциальных барьеров высотой от 2 до 5 ккал/моль (рис. 2) [2]. Напомним, что при



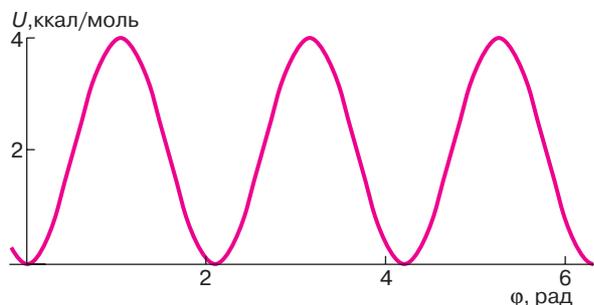
**Рис. 1.** Фрагмент полипептидной цепи, состоящей из остатков аланина (Ala) и тирозина (Tyr). Голубым цветом обозначены атомы углерода, синим – азота, красным – кислорода, серым – водорода. Пунктиром показаны места присоединения следующих аминокислотных остатков. Обозначены  $\alpha$ -углеродные атомы в основной цепи, к которым присоединены боковые группы. Вверху показан фрагмент в конформации  $\beta$ -структуры. Вращением по торсионным углам  $\varphi$ ,  $\psi$  и  $\chi_{1,2}$  осуществляется переход между различными конформациями. Внизу – тот же фрагмент в конформации  $\alpha$ -спирали (атом водорода при  $\alpha$ -углеродном атоме тирозинового остатка не виден)

комнатной температуре средняя тепловая энергия, сосредоточенная на степени свободы, составляет 0,6 ккал/моль и вероятность тепловой флуктуации, необходимой для преодоления таких барьеров, весьма высока. (Смещения с подобной амплитудой для жестких степеней свободы требовали бы энергий свыше 100 ккал/моль.)

В пептидах конформационные степени свободы (двугранные или торсионные углы) имеют определенные обозначения в соответствии с рис. 1. Двугранные углы, связанные с вращением в боковых группах аминокислотных остатков, обозначаются

как  $\chi_n$ , причем  $n$  увеличивается по мере удаления от  $C_\alpha$ -атома. Углы вращения вокруг связей между  $C_\alpha$ -атомом и CO- и NH-группами в пептидной связи обозначаются как  $\psi$  и  $\varphi$  соответственно. Вращение вокруг пептидной связи CO–NH (торсионный угол  $\omega$ ) обычно сильно заторможено.

Определенный набор значений всех двугранных торсионных углов, отвечающий одному из локальных минимумов потенциальной энергии, задает конформацию молекулы. На рис. 1 показан дипептидный фрагмент в конформациях отвечающих  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слою соответственно. Переход из одной конформации в другую или конформационный переход осуществляется за счет поворотов вокруг одинарных химических связей с преодолением потенциальных барьеров, разделяющих локальные минимумы потенциальной энергии (см. рис. 2).



**Рис. 2.** Характерный профиль потенциальной энергии при вращении вокруг одинарной химической связи. Высота барьеров около 4 ккал/моль

### СВРАЧИВАНИЕ ПОЛИПЕПТИДА В БЕЛКОВУЮ ГЛОБУЛУ

Наличие относительно мягких конформационных степеней свободы не является чем-то уникальным для белков и свойственно подавляющему большинству органических соединений. Именно конформационные степени свободы определяют упругие свойства и гибкость полимерных цепей. Эти же степени свободы играют важнейшую роль в структурообразовании и функционировании белков.

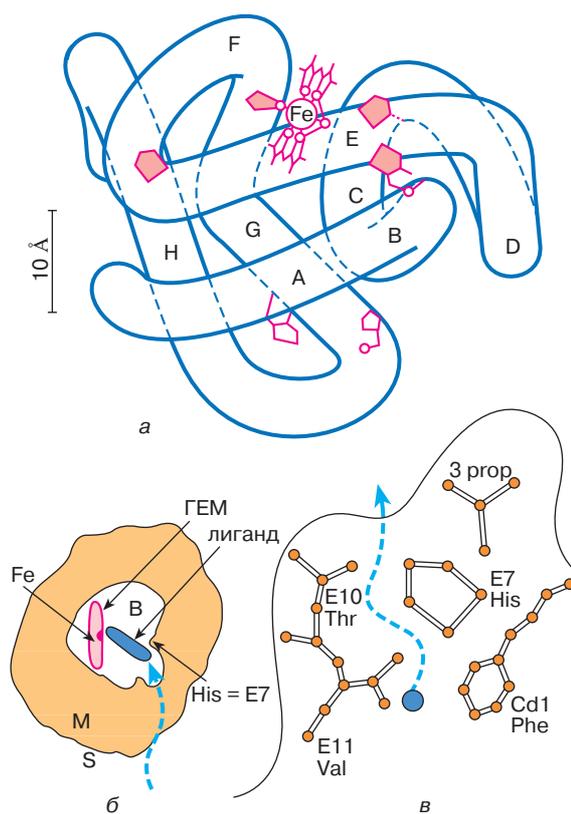
Особенно наглядно роль конформационной подвижности можно проследить на примере сворачивания полипептидной цепи в уникальную третичную структуру, соответствующую белковой глобуле, которой отвечает определенная конформация цепи. С точки зрения физики это очень непростая проблема.

Хорошо известно, например, что в водном растворе при изменении pH многие белки денатурируют – переходят из компактной глобулярной формы в форму рыхлого клубка, то есть структуры с практически случайными конформациями звеньев. При обратном изменении pH в течение десятков секунд происходит восстановление строго определенной третичной структуры белковой глобулы. Понятно, что процессы денатурации и ренатурации происходят за счет конформационных движений полипептидной цепи. Сделаем несколько простых численных оценок. Предположим, что белок состоит примерно из 100 аминокислотных остатков, то есть мы имеем примерно 400 конформационных степеней свободы. Допустим, что по каждому торсионному углу имеются примерно три локальных минимума потенциальной энергии, отвечающие возможным метастабильным конформациям. Легко понять, что общее число возможных конформаций полипептидной цепи составит порядка  $3^{400}$ , то есть  $\sim 10^{191}$ . Чтобы представить, сколь огромно это число, предположим, что конформации перебираются с частотой  $\sim 10^{13} \text{ с}^{-1}$  – частотой атомных колебаний. Даже в этих сверхблагоприятных условиях полипептидной цепи весьма скромного по размерам белка пришлось бы затратить на сворачивание порядка  $10^{178} \text{ с}$ , или примерно  $10^{170}$  лет. Это совершенно неправдоподобное время, так как даже возраст Вселенной, по имеющимся оценкам, не многим более  $10^{10}$  лет. Возникшее несоответствие носит название парадокса Ливенталя и обусловлено предположением о случайном характере сворачивания белковой глобулы за счет перебора примерно одинаковых по энергии конформаций полипептидной цепи. Разрешение данного парадокса состоит в очевидном неслучайном характере сворачивания полипептидных цепей. Отметим, что способностью свернуться в уникальную третичную структуру обладают полипептидные цепи не с любой аминокислотной последовательностью. Конформационные движения при определенном сочетании аминокислотных остатков оказываются определенным образом скоррелированы (взаимозависимы). Это одна из новых глав современной науки о физике белка, но ее обсуждение выходит далеко за рамки данной статьи. Мы только хотим показать, что детали механизма конформационной подвижности белка оказываются существенными уже на стадии формирования глобулы.

## БЕЛКОВАЯ ГЛОБУЛА – ТВЕРДОЕ ТЕЛО ИЛИ ЖИДКОСТЬ?

Итак, глобула сформировалась. В ней присутствуют элементы вторичной структуры, например достаточно протяженные  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слои, уложенные определенным образом и формирующие как бы каркас макромолекулярной структуры (рис. 3). Между элементами вторичной структуры определенным образом уложены не спирализованные участки полипептидной цепи, в части глобулы могут присутствовать молекулы воды, гидратирующие полярные группы. Характерный линейный размер глобулы, например миоглобина, около  $40 \text{ \AA}$  (рис. 3). Каковы общие физические характеристики белковой глобулы? На что был бы похож материал, из которого сделана глобула, если глобулу можно было бы взять в руки?

Ответ на этот вопрос имеет непростую историю. Практически до начала 80-х годов считалось, что белок скорее похож на органические кристаллы. В этом убеждали данные рентгеноструктурного анализа, которые показывали, что атомы в глобуле



**Рис. 3.** Структура белка миоглобина (а); буквами обозначены  $\alpha$ -спиральные участки; схема канала для диффузии лиганда в миоглобине (б); проникновение лиганда через флуктуирующую щель, образованную аминокислотными группами (в)

уложены очень плотно и каждый из них, как в кристалле, четко знает свое место. Так как периодичности (как в кристаллах) в расположении атомов в глобуле не наблюдается, то появился даже термин для описания физического состояния глобулы — “апериодический кристалл”. Этот термин был заимствован из известной книги Э. Шрёдингера “Что такое жизнь с точки зрения физики?” (“What is Life? The Physical Aspect of the Living Cell”), впервые изданной в 1943 году. Справедливости ради отметим, что в этой книге с апериодическим кристаллом сравнивалась хромосома, а не белковая глобула.

Аргументом в пользу квазитвердотельного состояния белковой глобулы явились и измерения модуля Юнга глобулы. Напомним, что модуль Юнга характеризует упругие свойства материала. Типичное значение этой величины для влажного белка составляет  $\sim 10^{10}$  эрг/см<sup>3</sup> (или около 1 ГПа), что близко к соответствующим значениям для молекулярных кристаллов и стеклообразных полимеров. Для справки: модуль Юнга стали равен 200 ГПа, древесины — 10, оргстекла — 4, капрона и полипропилена — около 1, полиэтилена высокого давления — 0,2, полиуретана — 0,01 ГПа. Отметим, что при дегидратации белка его модуль Юнга повышается примерно в 5–6 раз, а при денатурации модуль Юнга белка уменьшается примерно в тысячу раз и его упругость становится близкой к упругости резины и других материалов, состоящих из полимерных клубков. Итак, похожа ли белковая глобула на шарик из капрона или органического стекла? В конце 70-х годов стало окончательно ясно, что непохожа.

Наглядно это обстоятельство было продемонстрировано на примере диффузии лиганда (окиси углерода) в миоглобине. Схема эксперимента довольно проста. Молекула СО связывается с атомом железа в активном центре (с гемом) миоглобина (см. рис. 3). Далее после короткой лазерной вспышки происходит диссоциация комплекса СО–гем. Молекула окиси углерода выбрасывается на периферию глобулы и затем происходит рекомбинация СО с гемом за счет диффузии лиганда в белке. Оказалось, что диффузия лиганда в миоглобине идет достаточно эффективно, с энергией активации около 10 ккал/моль, и происходит за доли микросекунды (при комнатных температурах). Более удивительным оказалась зависимость скорости внутриглобулярной диффузии от вязкости растворителя. Если молекула миоглобина была бы подобна твердому телу или микрокристаллику, то влияние внешней среды на внутриглобулярные процессы должно было быть сильно ограниченным.

Несоответствие реальной картины процесса диффузии “твердотельным” представлениям было продемонстрировано и путем компьютерного моделирования динамики диффузии СО в миоглобине. Работа Карплюса с соавторами (1979 год) была одной из первых демонстраций возможностей моле-

кулярной динамики в приложении к белковым проблемам. Если задать все силы, которые действуют между атомами в молекуле белка, то можно написать уравнения движения (уравнения Ньютона), решения которых определяют изменения координат атомов во времени. Одна из проблем состоит в том, что для белка нужно решить систему из многих тысяч взаимозависимых уравнений. В настоящее время такая проблема под силу мощному домашнему компьютеру, а 20 лет назад потребовались усилия наиболее мощного суперкомпьютера. Результаты расчета выводятся на дисплей в виде “молекулярного кино”, где можно наблюдать за динамикой процесса.

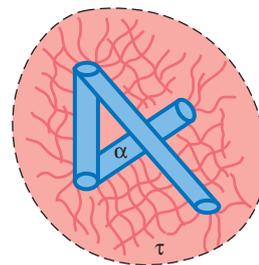
При моделировании динамики диффузии лиганда в миоглобине оказалось, что если воспользоваться твердотельной моделью глобулы, то есть разрешить атомам только колебаться вблизи положений равновесия, как это происходит в кристаллических решетках, то энергия активации диффузии лиганда достигает величин 100 ккал/моль и процесс при обычных температурах практически заморожен. Однако если включить конформационные степени свободы полипептидной цепи, то оказывается, что процесс диффузии идет достаточно эффективно по двум возможным путям (или каналам) внутри глобулы с разумной энергией активации порядка 10 ккал/моль (см. рис. 3). Ситуация примерно такая, как если бы лиганд проходил через систему случайно распахивающихся и закрывающихся дверей или через флуктуирующие щели. Причем акт диффузии наблюдается только тогда, когда просвет щели, образованной аминокислотными остатками, превышает ван-дер-ваальсовский диаметр лиганда. Энергия активации диффузии при этом составляет порядка 10 ккал/моль — энергия раскрытия щели на величину 1 Å (см. рис. 3).

На этом примере видно, что модель капронового шарика или микрокристаллика не очень подходит к белковой глобуле. В белке наблюдаются флуктуации положений отдельных групп с амплитудами 1 Å, что много больше амплитуд валентных колебаний и колебаний атомов в узлах кристаллической решетки (<0,1 Å). Кроме того, энергии активации диффузии лигандов в белках составляют 10 ккал/моль, что близко к типичным значениям энергий активации диффузии в жидкости, например в глицерине.

Наиболее полную информацию о динамических свойствах белков удалось получить с помощью эффекта Мёссбауэра [3]. Первые эксперименты проводились в лабораториях Р.Л. Мёссбауэра в Мюнхене, В.И. Гольданского и Г.И. Лихтенштейна в Москве и Черноголовке в конце 70-х — начале 80-х годов. У нас нет возможности подробно обсуждать метод мёссбауэровской спектроскопии. Отметим только, что данный метод основан на изучении спектра  $\gamma$ -излучения от некоторых ядер, например от <sup>57</sup>Fe. Эти спектры очень чувствительны к атомным смещениям в доли ангстрем за времена порядка наносекунд.

Сам метод обладает рекордным энергетическим разрешением порядка  $10^{-8}$  эВ и позволяет в принципе восстановить временную зависимость атомных смещений. Применение метода мёссбауэровской спектроскопии к белкам привело к парадоксальным на первый взгляд результатам. Температурные зависимости интенсивности спектра вели себя подобно зависимостям для жидкостей, а зависимости ширины спектра от температуры оказались похожими на соответствующие зависимости для твердых тел. То есть с точки зрения динамики белковая глобула оказалась не похожей ни на твердые кристаллические тела, ни на простые жидкости. Разрешение этого парадокса привело к представлениям о механизме ограниченной диффузии для движений белковых групп [4]. Дело в том, что достаточно широкоамплитудные ( $\sim 1$  Å) конформационные движения групп около положений равновесия не вписываются в имеющийся свободный объем или средние межатомные расстояния внутри глобулы. Поэтому смещения атомов в плотной среде на величину  $0,1$  Å и более требует определенной подстройки окружения или образования флуктуационной дырки. Ситуация чем-то похожа на перемещения пассажира в битком набитом автобусе. Поэтому конформационные движения осуществляются малыми случайными шажками, требующими энергии активации для преодоления сопротивления “соседей” или для образования дырки. Этот механизм движения практически такой же, как и для диффузии в жидкости. С помощью мёссбауэровской спектроскопии можно даже измерить вязкость такой квазжидкости. При комнатной температуре эффективная микровязкость белковой глобулы составляет 100 пуаз [4]. Напомним, что при той же температуре вязкость воды примерно  $0,01$  пуаз, вязкость оливкового масла 1 пуаз, вязкость чистого (без примесей воды) глицерина около 10 пуаз, того же порядка и вязкость касторового масла. Величина 100 пуаз характеризует вязкость застывающей в жаркий летний день капельки сосновой смолы. При понижении температуры до  $-100^\circ\text{C}$  микровязкость глобулы возрастает более чем в 100 раз и белок переходит в замороженное стеклообразное состояние. Подчеркнем, однако, что в отличие от жидкостей атомные группы в белке прочно связаны и могут перемещаться в весьма ограниченных пределах, как это происходит в твердых телах.

На рис. 4 представлена упрощенная схема устройства белковой глобулы, которая поможет понять ее основные свойства как механической системы. Элементы вторичной структуры образуют довольно жесткий спиральный каркас. Характерные времена изгибных флуктуаций этого каркаса с амплитудами в несколько ангстрем составляют микросекунды и более. Спиральный каркас окружен значительно более быстро движущимися боковыми группами с характерными временами микроконформационных смещений порядка десятков наносекунд и ме-



**Рис. 4.** Модель армированной капли для белковой глобулы:  $\alpha$  – относительно жесткие спиральные структуры с модулем Юнга порядка 1 ГПа;  $\tau$  – жидкоподобные области с эффективной вязкостью порядка 100 пуаз и характерным временем релаксации порядка 10 нс

нее. Эти боковые группы образуют как бы жидкоподобную “опушку” с вязкостью около 100 пуаз вокруг жесткого каркаса с модулем упругости 1 ГПа. То есть с точки зрения механики глобулу можно представить как армированную каплю [4, 5].

#### КОНФОРМАЦИОННАЯ РЕЛАКСАЦИЯ

Подобная двойственная вязкоупругая природа белковой глобулы не является чем-то уникальным. Все тела в той или иной мере обладают вязкоупругими свойствами. Наше ощущение этих свойств зависит от значений характерного времени, определяющего подстройку структуры материала в ответ на приложенную силу. Это характерное время для вязкоупругих материалов называется временем максвелловской релаксации и определяется отношением вязкости материала  $\eta$  к модулю Юнга  $E$ :  $\tau_M = \eta/E$ . Так, например, для хорошей стали вязкость составляет  $10^{22}$  пуаз (единица СГС). Разделив эту величину на модуль Юнга получим время релаксации (или время развития необратимых деформаций)  $10^{10}$  с или порядка сотен лет. Для жидкой воды модуль Юнга составляет величину 1 ГПа и время релаксации  $10^{-12}$  с. То есть на временах порядка или короче этой величины жидкая вода ведет себя как абсолютно твердое тело. Для белковой глобулы, беря отношение микровязкости к модулю Юнга, получаем  $\tau_M = 10^{-8}$  с. Это и есть характерное время конформационной релаксации белка.

Возвращаясь к вопросу, поставленному в заголовке предыдущего раздела, следует, по-видимому, ответить на него следующим образом. Белковая глобула при обычных температурах сочетает свойства очень вязкой капельки жидкости и не очень упругого твердого тела. Сочетание таких свойств оказывается весьма удачным для обеспечения функционирования белков. Упругий каркас поддерживает структуру с точностью до нескольких ангстрем, формируя группы активного центра в конфигурации, близкой к наиболее благоприятной для осуществления функционального акта. Химические

изменения, происходящие в активном центре, сопровождаются перемещениями атомов и групп на расстояния около 1 Å. Жидкоподобная внутрибелковая среда, характеризующаяся достаточно быстрыми временами конформационной релаксации, не является непреодолимым препятствием для движения атомных групп в определенных пределах, необходимых для проведения реакции. Но эта же среда будет резко тормозить перемещения атомных групп, геометрия которых не вписывается в пределы, определяемые упругими (жесткими) элементами данной белковой глобулы. Тем самым создаются физические предпосылки регуляции стереоспецифичности биохимических реакций.

Перераспределение химических связей в ходе акта химической реакции изменяет распределение электронной плотности в реагирующих молекулах, изменяя тем самым баланс сил внутри белковой глобулы, что приводит к тому, что равновесная конформация белка до и после реакции различны. Это явление называется электронно-конформационным взаимодействием, а соответствующее изменение структуры – электронно-конформационным переходом [2, 4, 5]. Этот переход можно также рассматривать и как конформационную релаксацию под действием нескомпенсированных сил, возникающих после акта перераспределения электронной плотности или иных изменений в активном центре белка. Один из известнейших и впечатляющих примеров связан с присоединением молекулы кислорода к гемоглобину. Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц, подобных молекуле миоглобина. Присоединение очень небольшой по размерам молекулы кислорода к гемоглобину вызывает существенные изменения конформации белка – поворот субъединиц на углы порядка 10°. Этот пример показывает, насколько тонким является баланс сил, стабилизирующих конформацию белковой глобулы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Динамическое поведение белковых глобул определяется их конкретной химической структурой,

наличием у полипептидной цепи конформационных степеней свободы, обусловленных относительно легким вращением атомных групп вокруг одинарных химических связей. Белковая глобула является весьма плотным образованием, ее сжимаемость ниже, чем у простых органических жидкостей. Вторичные структуры полипептидной цепи формируют каркас молекулы белка, сравнимый по упругим характеристикам с куском капрона. Боковые аминокислотные группы формируют вокруг каркаса относительно подвижную жидкоподобную среду с эффективной вязкостью, сравнимой с вязкостью застывающей в жаркий день капельки смолы. Характерные амплитуды движений этих групп составляют порядка ангстрема, а времена релаксации – порядка наносекунд. Подобная структура типа армированной капли оказывается выгодной для организации стереоспецифичных химических реакций, обеспечивающих функционирование белков.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.
2. *Волькенштейн М.В.* Физика и биология. М.: Наука, 1980. 152 с.
3. *Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р.* Физика в мире полимеров. М.: Наука, 1989. 206 с.
4. *Гольдманский В.И., Крупянский Ю.Ф., Шайтан К.В., Рубин А.Б.* // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 761–774.
5. *Шайтан К.В., Рубин А.Б.* // Молекуляр. биология. 1980. Т. 14. С. 1323–1335; 1982. Т. 16. С. 1004–1018.
6. *Шайтан К.В.* // Биофизика. 1994. Т. 39. С. 949–967.

\* \* \*

Константин Вольдемарович Шайтан, доктор физико-математических наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Область научных интересов – динамика биомолекулярных систем и теория элементарного акта функциональных процессов. Автор свыше 100 научных статей и двух монографий.