

5. ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОФІЗИКИ

Молекулярна біофізика вивчає структуру біологічно важливих молекул і фізичні фактори, що її визначають. Предметом молекулярної біофізики також є вивчення змін структури макромолекул при здійснення ними функціональної активності. Молекулярна біофізика ґрунтується на законах атомної і молекулярної фізики і тісно пов'язана з молекулярною біологією, біохімією і фізіологією.

Рівні структурної організації біологічних макромолекул

У біологічних системах зустрічаються порівняно невеликі молекули і молекули дуже великих розмірів - макромолекули. Прикладами біологічних макромолекул є білки і нуклеїнові кислоти.

Макромолекули є полімерами і складаються з великого числа з'єднаних між собою залишків невеликих молекул - мономерів. Так, білки складаються з амінокислот, нуклеїнові кислоти - з нуклеотидів.

Деякі важливі особливості структури макромолекул проявляються вже на рівні молекул-мономерів. Зокрема для амінокислот і моносахаридів властива *хіральність*. Їх молекули асиметричні і можуть існувати в двох формах, які є як би дзеркальними відображеннями один одного: їх не можна поєднати ніяким поворотом в просторі, як неможливо поєднати праву і ліву руку («хейр» (грец) – «рука»). Такі молекули є оптично активними, тобто мають здатність обертати площину поляризації плоскополяризованого світла проти годинникової стрілки (лівообертальні, L-ізомери молекули) або за годинниковою стрілкою (правообертальні, D-ізомери молекули) (рис. 5.1).

При штучному синтезі хіральных молекул отримують *рацемічну суміш* (*рацемат*), яка складається порівну з L-форм і D-форм і тому не має оптичної активності. Живі організми накопичують і синтезують тільки одну форму таких молекул: амінокислоти в біоб'єктах присутні переважно в L-формі, а вуглеводи - в D-формі.

Для макромолекул характерно кілька рівнів організації. Їх основою є *первинна структура* - послідовність мономерів в ланцюгу полімерної молекули, які зв'язані між собою міцними ковалентними зв'язками. *Вторинною структурою* називається впорядкована просторова організація окремих ділянок полімерного ланцюга. *Третинна структура* - це просторова укладка всього ланцюга. *Четвертинна структура* - просторове

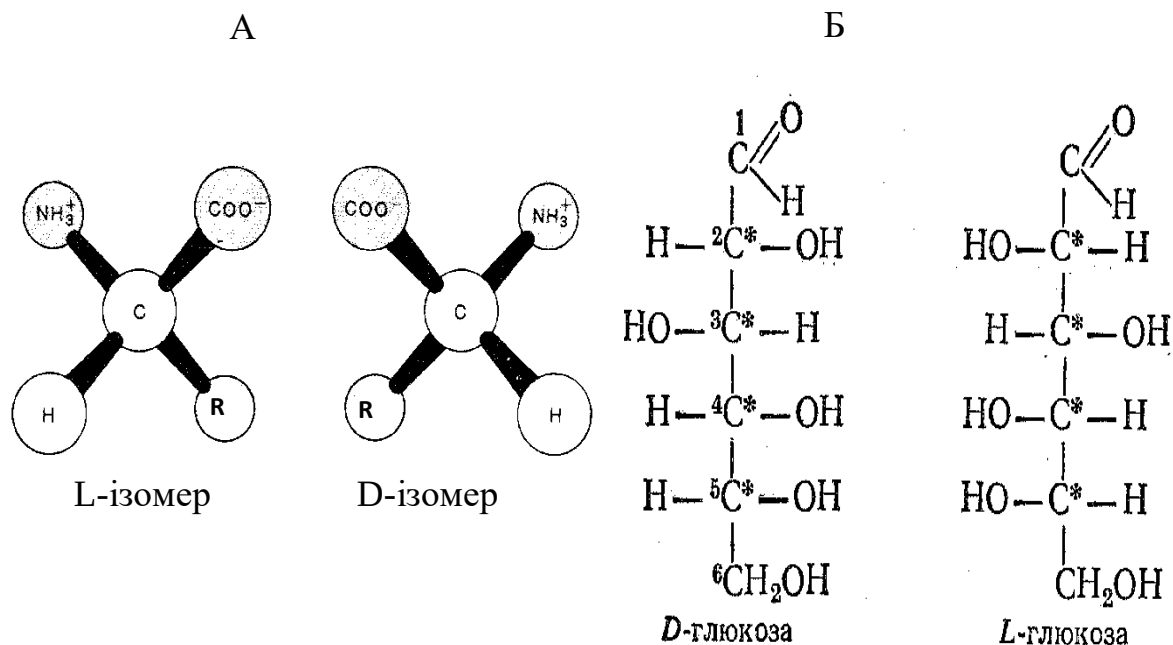


Рис. 5.1 Хіральні молекули, які мають оптичну активність: А) амінокислоти (в загальному вигляді); Б) моносахариди (на прикладі глюкози)

розташування декількох пов'язаних між собою полімерних ланцюгів з утворенням надмолекулярного комплексу. У стабілізації вторинної, третинної і четвертинної структури макромолекул основну роль відіграють слабкі (нековалентні) зв'язки.

Навколо одинарних ковалентних зв'язків можливо обертання, в ході якого утворюються різні поворотні ізомери. Вони визначають *конформацію макромолекули* - засіб укладки полімерного ланцюга без розриву ковалентних зв'язків, який реалізується за рахунок розриву одних і утворення інших слабких зв'язків. Зі зміною конформації макромолекул тісно пов'язане їх функціонування.

Різні види взаємодій в макромолекулах

Структура біологічних макромолекул визначається сильними і слабкими зв'язками між атомами і групами атомів. Зв'язок називається сильним, якщо він не порушується під впливом безладного теплового руху частинок. Сильним хімічним зв'язком є ковалентний зв'язок, за допомогою якої мономерні утворюють первинну структуру макромолекул. Ковалентним є також дисульфідний зв'язок, представлений в третинній структурі білка.

Крім сильних зв'язків між деякими групами молекул існують слабкі зв'язки. Вони стабілізують просторову структуру макромолекул, яка

відрізняється тонкою організацією і високою специфічністю, що обумовлює їх біологічну активність.

Один слабкий зв'язок не може забезпечити стійкість структури. Проте частини однієї молекули пов'язані великим числом таких зв'язків, внаслідок чого виявляється їхня *кооперативність*: енергія, необхідна для їхнього розриву, значно більша, ніж сума енергії окремих слабких зв'язків.

Слабкі зв'язки допускають певну рухливість структури біологічних макромолекул, що дозволяє таким молекулам виконувати їх функції.

До слабких зв'язків відносяться: сили Ван-дер-Ваальса, іонні зв'язки, іон - дипольні взаємодії, водневі зв'язки і гідрофобні взаємодії.

Ван-дер-ваальсові сили. Ван-дер-ваальсовими силами називаються міжмолекулярні взаємодії, обумовлені полярністю молекул. В них атоми значно розрізняються за електронегативністю. В результаті зміщення спільної електронної пари, яка утворюється при формуванні між ними зв'язку, на одному з атомів виникає надлишок негативного заряду, а на другому - надлишок позитивного заряду. Така молекула представляє собою *диполь* - систему з двох зарядів, розташованих на невеликій відстані один від одного. У зв'язку з цим між молекулами-диполями, які в цілому є електронейтральними, можуть виникати сили, що мають електричну природу - *ван-дер-ваальсові сили*.

Іонні зв'язки в макромолекулах існують між залишками формуючих їх молекул, які знаходяться в іонізованій формі при нейтральному значенні рН. Так, серед залишків амінокислот, які утворюють молекули білків, деякі виявляються зарядженими негативно, а інші - позитивно, і між ними виникають електростатичні взаємодії.

Величина енергії іонного зв'язку сильно залежить від оточення взаємодіючих заряджених груп: за відсутності води іонні сили достатньо великі, а у водному оточенні - вони значно зменшуються, оскільки молекули води взаємодіють із зарядженими групами і екранують їх. В водному розчині енергія іонних взаємодій приблизно дорівнює енергії слабкою водневого зв'язку. Поряд з цим, в глибині макромолекули, де контакт заряджених груп з водою обмежений, енергія іонних взаємодій може бути значно більше.

Іон - дипольні взаємодії так само, як і іонні, є електростатичними. Вони здійснюються між іонізованими атомними групами і полярними залишками макромолекул.

Водневі зв'язки виникають між групами, що містять атом водню (ОН, NH, SH), і більш електронегативними (ніж водень) атомами кисню, азоту, сірки та ін. Водневі зв'язки можуть утворюватися між різними молекулами і між частинами однієї молекули. Поодинокі водневі зв'язки дуже слабкі. Проте велике їх число сприяє кооперативності.

Гідрофільні і гідрофобні взаємодії грають істотну роль в стабілізації вторинної, третинної і четвертинної структури макромолекул. В реалізації таких взаємодій велику роль відіграють особливості структури води, яка служить середовищем для біологічних макромолекул.

Вода має цілу низку унікальних властивостей, які відрізняють її від інших рідин. Вона має порівняно високі величини температур плавлення, кипіння і випаровування, питомої теплоємності, поверхневого натягу. Важливою особливістю води є зменшення її густини при перетворенні в лід.

Всі перераховані унікальні властивості води пояснюються тим, що між її молекулами внаслідок їх електричної полярності утворюється велика кількість водневих зв'язків. Вони сприяють тому, що вода як речовина має певну структуру.

Полярність молекули води є результатом великої різниці в електронегативності атомів водню і кисню, внаслідок чого негативні електричні заряди в молекулах води виявляються віддаленими від позитивних (рис. 5.2). Тому вони є диполями.

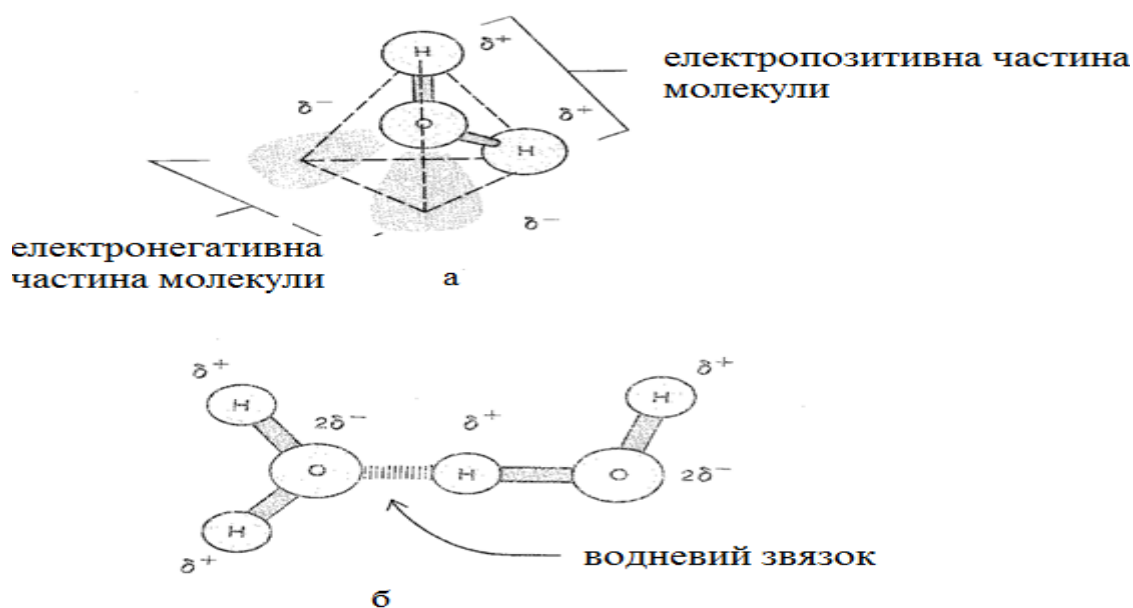


Рис. 5.2. Полярність молекули води (а) і утворення водневого зв'язку між двома молекулами води (б)

Завдяки полярності дві сусідні молекули води можуть утворювати водневий зв'язок (рис. 5.3 б), а при наявності сукупності молекул води - велику кількість таких зв'язків. При цьому атом кисню молекули води пов'язаний з атомами водню двох сусідніх молекул, а її два атоми водню - з атомами кисню ще двох молекул води. Таким чином, кожна з молекул води утворює водневі зв'язки з чотирма сусідніми молекулами. Ці зв'язки складають тетраедричну геометричну структуру (рис. 5.3).

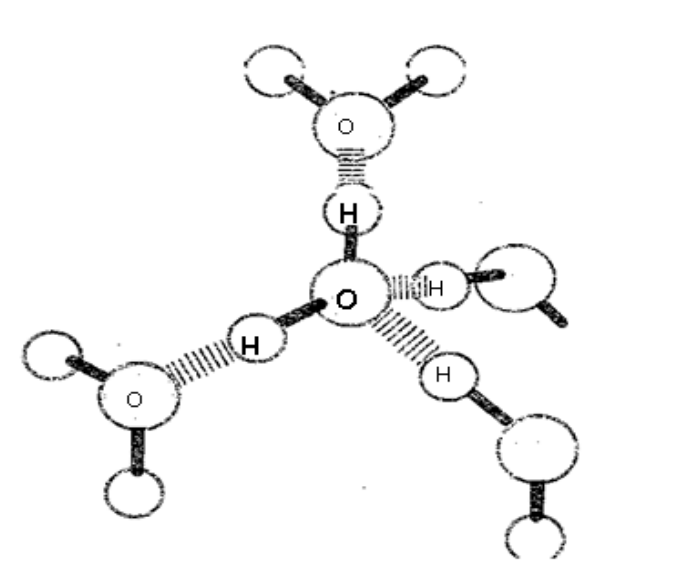


Рис. 5.3. Зв'язок молекули води (в центрі) з чотирма сусідніми молекулами води

Однією з найбільш обґрунтованих моделей рідкого стану води є *модель «мерехтливих кластерів»*. Кластери - це короткоживучі впорядковані скупчення молекул води, поєднаних водневими зв'язками. В цілому вони утворюють структуру, яка при зниженні температури нижче точки замерзання формує кристалічну решітку льоду. Час життя кластерів 10^{-10} - 10^{-11} с: вони безперервно розпадаються і утворюються знову. В цілому, вода являє собою суміш поодиноких (вільних) молекул і кластерів.

Правильна кристалічна решітка зберігається в кластерах не завжди. Молекули води можуть знаходитись не тільки в вузлах кристалічної решітки - в вершинах тетраедрів, але і всередині них. З ростом температури зростає число вільних молекул, а кількість і розміри кластерів зменшуються.

Гідрофільні і гідрофобні взаємодії. Всі речовини діляться за ступенем своєї розчинності в воді на дві групи: гідрофільні і гідрофобні.

Гідрофільними є речовини, які добре розчиняються у воді. Такі сполуки є, найчастіше, полярними, тобто їх молекули мають властивості диполів. Потрапляючи в воду, гідрофільні молекули встановлюють водневі зв'язки з водою, вбудовуються в каркас її водневих зв'язків, мало руйнують його і тому добре розчиняються.

Вода може утворювати гідратну оболонку молекул гідрофільних сполук. В її складі час осілого життя молекул води значно триваліший, ніж у вільному стані.

На відміну від гідрофільних речовин, *гідрофобні сполуки* є неполярними і погано розчиняються у воді. Вони не здатні встановлювати з нею водневі зв'язки, а також руйнують ті зв'язки, що існують між молекулами води (рис. 5.4). В умовах порушення регулярної структури її молекули змушені групуватись на поверхні гідрофобних молекул, намагаючись утворити з ними нові водневі зв'язки. Це призводить до ущільнення розташування молекул води, яке стає більш впорядкованим. Час їх "осілого" життя збільшується. В результаті навколо кожної гідрофобної частинки в воді утворюється ущільнений упорядкований каркас з її молекул. Цей процес призводить до загального зменшення ентропії системи «вода-гідрофобні частинки». Така зміна є термодинамічно невигідною. Тому гідрофобні частинки відштовхують воду і зближуються між собою.

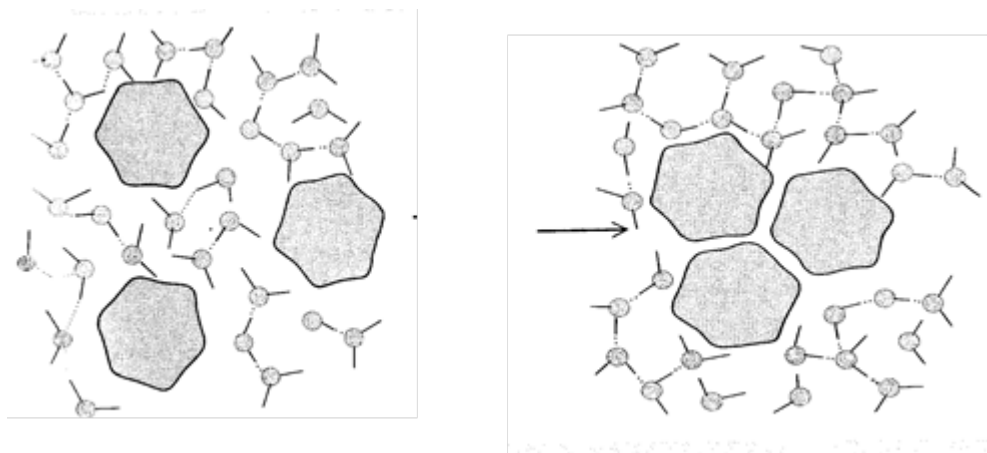


Рис. 5.4. Зближення гідрофобних частинок, оточених молекулами води

Ефект зближення гідрофобних частинок, що усуває або зменшує термодинамічно невигідний їх контакт з молекулами води, представляє собою *гідрофобну взаємодію*. Вона не пов'язана з існуванням особливих сил тяжіння між гідрофобними молекулами, а має ентропійну природу.

Гідрофобні взаємодії грають важливу роль в стабілізації макромолекул. У водному середовищі між полярними групами білка і молекулами води утворюються водневі зв'язки. Їх енергія приблизно однакова з енергією таких зв'язків, що виникають між окремими атомними групами білкової молекули і стабілізують її вторинну і третинну структуру. У зв'язку з цим взаємодія полярних груп білка з водою могла би призводити до виникнення його пухкої структури. Однак цього не відбувається завдяки гідрофобним взаємодіям, які сприяють збереженню компактності і впорядкованості макромолекул у водному середовищі.

Біофізика білків

Білки відіграють визначну роль в структурній організації і функціонування клітини. Структура білкових молекул задована в генетичній інформації, в реалізації якої провідна роль також належить білкам.

Велика частина синтезованих в організмі білків служить структурними елементами тканин. Деякі з білків є ферментами, кожен з яких є специфічним каталізатором певної хімічної реакції в організмі. Білки м'язової і кісткової тканини є обов'язковими компонентами скорочувальних і рухових систем. Спеціальні білки виконують транспортну функцію в мембранах клітин; є біологічно активними речовинами, які регулюють функції організму, або рецепторами до таких речовин; виконують захисні функції, беручи участь в реакціях імунітету і т.д.

Молекули білків дуже великі: їх молекулярна маса становить від 6000 до 1000000 і більше а.о.м. Вони представляють собою полімери, які утворюються комбінацією залишків двадцяти різних амінокислот (рис. 5.5). Число амінокислотних залишків в різних білках становить від декількох десятків до сотень тисяч.

Розрізняють декілька рівнів організації структури молекул білків: первинну, вторинну, третинну і четвертинну. Властивості білків визначаються особливостями їх просторової структури.

Первинна структура - це послідовність амінокислотних залишків, які поєднані між собою ковалентними пептидними зв'язками. Саме первинна структура безпосередньо задована в молекулах ДНК і відтворюється в процесі синтезу білка. В теперішній час аналіз розташування амінокислотних залишків в білкових молекулах проводиться спеціальними приладами

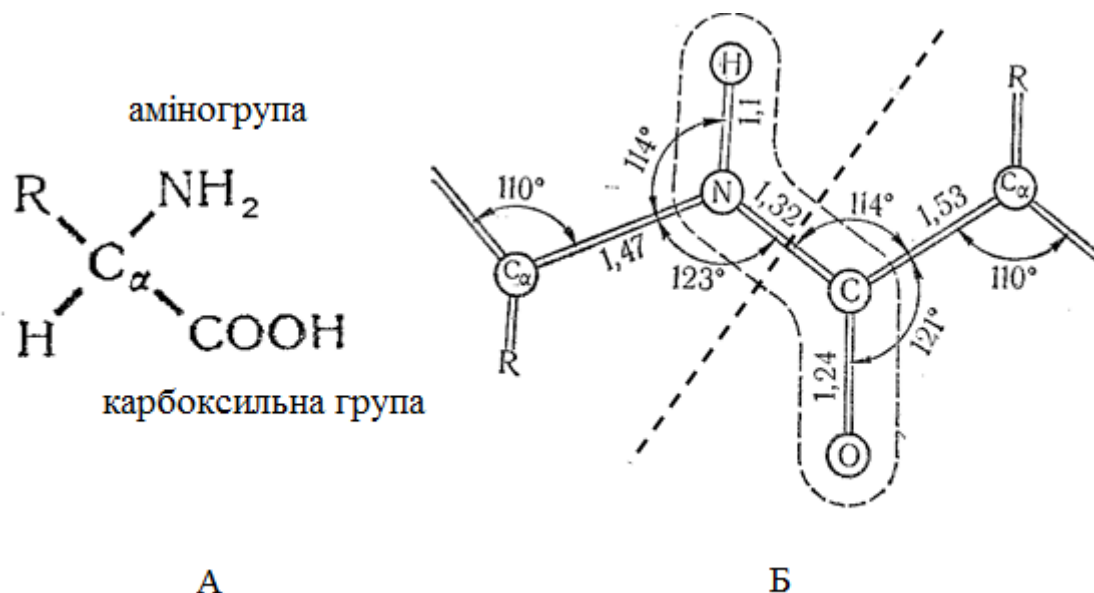


рис. 5.5 загальна формула амінокислоти (А) і пептидний зв'язок між двома амінокислотами (Б)

автоматично. Первинну структуру білка можна записати за допомогою скорочених позначень послідовно розташованих амінокислот.

Всі амінокислоти побудовані за одним типом і мають тричленний остов, із середнім атомом якого (C_α) пов'язаний певний радикал (рис. 5.5 А). Пептидний зв'язок утворюється між атомом вуглецю (карбону) карбоксильної групи однієї амінокислоти і атомом нітрогену (азоту) аміногрупи іншої амінокислоти ($N-C$ - зв'язок) (рис. 5.5 Б).

Пептидні зв'язки є жорсткими і не допускають можливість обертання ланцюга навколо себе. Однак інші типи зв'язків в його складі до певної міри рухливі. Вони дозволяють поліпептидному ланцюгу згинатися і міняти форму, що призводить до утворення вторинної і третинної структури білкової молекули, а також сприяє змінам її конформації.

Вторинна структура білка представляє собою впорядковану укладку поліпептидного ланцюга, стабілізовану водневими зв'язками між амінокислотами. Така структура характеризує конформацію локальних ділянок ланцюга: в одній і тій же молекулі білка можуть зустрічатися різні типи вторинної структури, а також неупорядковані ділянки.

Зустрічаються два типи вторинної структури білкових молекул: альфа-спіраль і бета-структура (рис. 5.6).

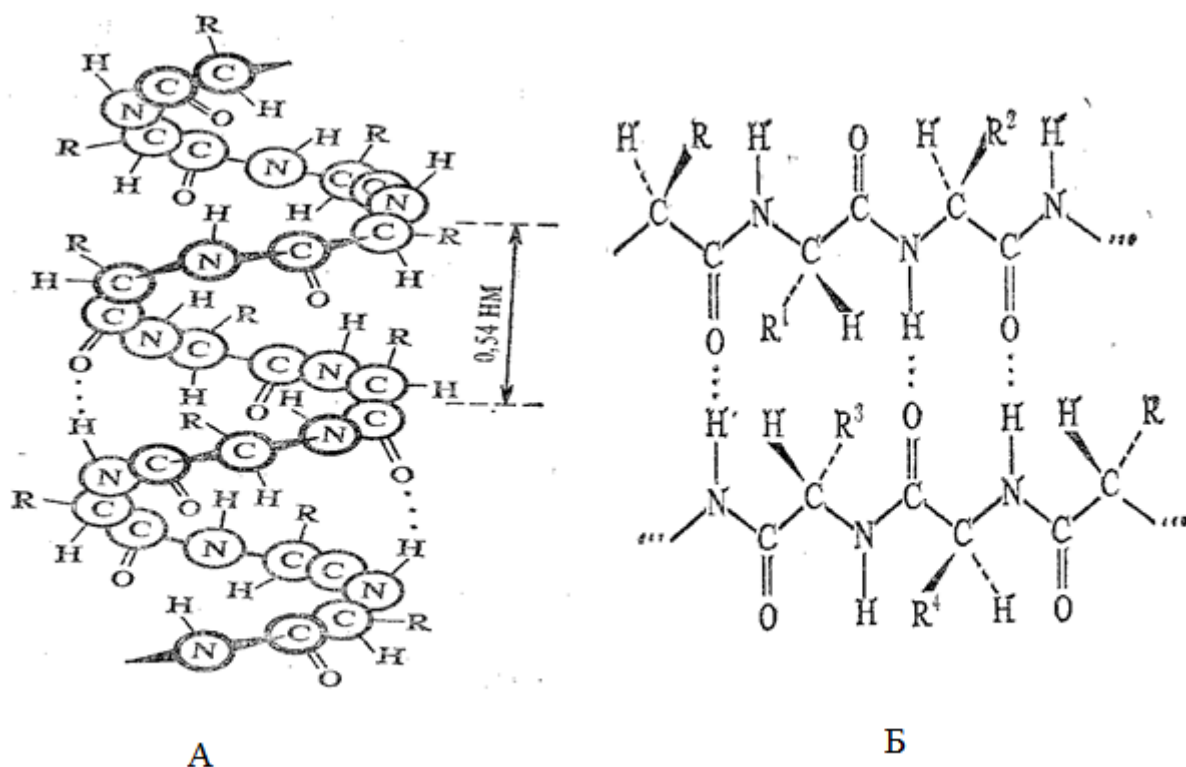


Рис. 5.6. Вторинна структура білка: А). α -спіраль; Б). β -структура

Найбільш розповсюдженою і енергетично вигідною вторинною структурою є правозакручена альфа-спіраль (Л. Поллінг, Р. Корі). Вона утворюється, якщо поліпептидний ланцюг обертати вправо навколо альфа-карбонів атомів таким чином, щоб кут повороту залишався кожен раз однаковим. В альфа-спіралі остов білкової молекули закручений так, що радикали амінокислот звернені назовні.

Стабільність вторинної структури забезпечується водневими зв'язками між NH-групою однієї амінокислоти і CO-групою іншої амінокислоти, яка розташована через три амінокислоти поліпептидного ланцюга. Таким чином, на один виток альфа-спіралі доводиться в середньому 3,6 амінокислотних залишків. Відстань між сусідніми витками складає близько 0,54 нм.

Крім альфа-спіралі можливі також інші спіральні структури білкових молекул.

В бета-структурі остови поліпептидних ланцюгів утворюють складчасту конфігурацію. Така структура нагадує складений гармошкою аркуш паперу. Вона стабілізована, як і альфа-спіраль, водневими зв'язками

між NH- і CO-групами. Однак зближення цих груп, що належать різним амінокислотам, забезпечується утворенням складок поліпептидного ланцюга.

Бета-структура може формуватися одним ланцюгом або декількома розташованими поруч поліпептидними ланцюгами (до 6).

Вторинна структура білків залежить від їх первинної структури. Наявність певних амінокислотних залишків в даному фрагменті поліпептидного ланцюга визначає тип його структури. Тому різним білкам властива неоднакова вторинна структура.

Третинна структура утворюється на основі вторинної і представляє собою впорядковану укладку поліпептидного ланцюга у просторі. Третинна структура утворюється в результаті виникнення всіх видів слабких взаємодій між радикалами амінокислот (рис. 5.7). Можливо також формування ковалентного зв'язку – дисульфідного містку, якщо в молекулі білка присутні залишки амінокислоти цистеїну, які містять SH-групи.

Зв'язки можуть виникати між амінокислотними залишками, які відстоять досить далеко один від одного у поліпептидному ланцюзі. В результаті він може складним чином згинатися в тривимірному просторі і приймати певну форму, утворюючи клубок (глобулу). При цьому утворюється така третинна структура білкової молекули, яка є термодинамічно найбільш стійкою.

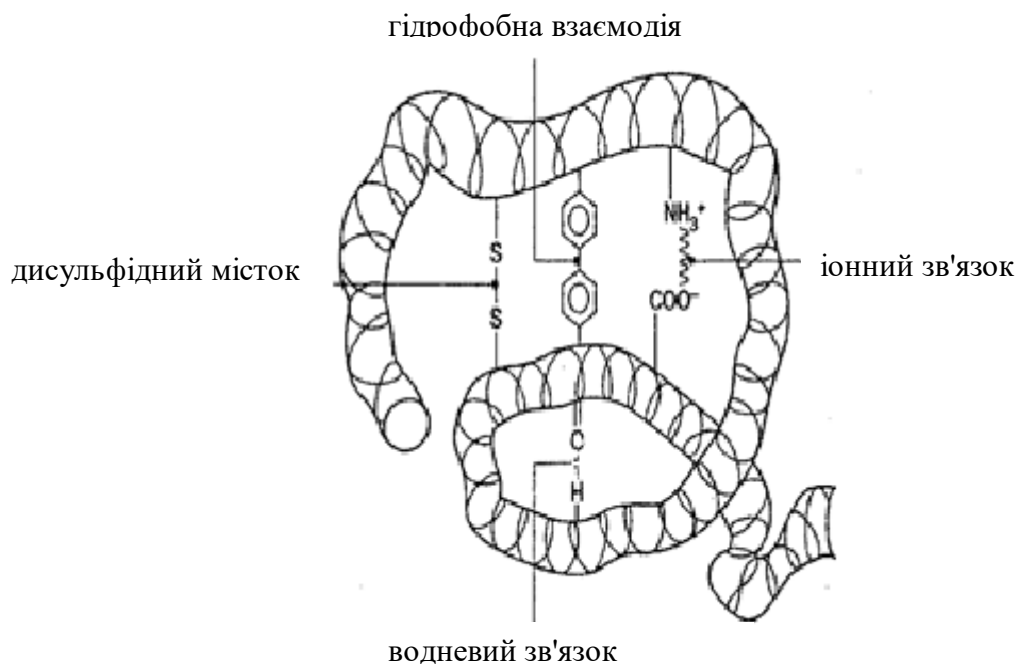


Рис. 5.7. Формування третинної структури молекули білка за рахунок слабких взаємодій і дисульфідного зв'язку

Білкові молекули, які можуть перебувати в третинній структурі, саме завдяки її особливостям набувають певної функціональної. Наприклад, при формуванні третинної структури в молекулі білка з'являються активні центри, що складаються з декількох амінокислотних радикалів, які в первинній структурі можуть відстояти далеко один від одного.

Найбільш важливу роль у формуванні третинної структури білка у водному середовищі відграють гідрофобні взаємодії. Білкова молекула «прагне» прийняти таку третинну структуру, яка дозволить гідрофільним амінокислотним залишкам знаходитись зовні (в контакті з водою), а гідрофобним радикалам – бути орієнтованими всередину глобули.

Великі білкові молекули можуть складатися з окремих глобулярних компонентів, відносно слабо пов'язаних між собою, які називаються *доменами*. Їх часто можна виділити з молекули без втрати ними функціональних властивостей. У зв'язку з цим домен можна розглядати як відносно автономну структурну одиницю макромолекули.

Третинна структура білкової молекули не є жорсткою і має певну рухливість. На конформацію цієї структури можуть впливати теплові флуктуації, біологічно активні речовини-регулятори, а також виконання білкової молекулою її функцій. Зміна третинної структури білків значно змінює їх біологічну активність.

Четвертинна структура властива білкам, які складаються з декількох субодиниць, тобто білкових молекул меншого розміру. Окремі субодиниці поєднуються за рахунок взаємодії амінокислотних радикалів на поверхнях, які контактують між собою. Формування комплексу надає субодиницям нові властивості, які не характерні для кожної окремої субодиниці. Прикладами білків в четвертинній структурі є молекула гемоглобіну, натрій-калієвий насос мембран клітин.

Найбільш стабільною є первинна структура білка, утворена міцними ковалентними зв'язками. Вторинна, третинна і четвертинна структури білкової молекули є менш стійкими, оскільки вони утворюються за рахунок слабких взаємодій. При зміні температури, кислотності, іонного складу середовища їх сила змінюється, що призводить до порушення структури білкової молекули. Вона перетворюється в клубок з випадковим розташуванням окремих ділянок поліпептидного ланцюга. Цей процес називається *переходом спіраль - клубок, або плавленням білкової ланцюга*.

Згортання білкової молекули в правильну тривимірну структуру називають *фолдингом* (fold - складати, згинати). Встановлено, що він практично повністю визначається первинною структурою білка, тобто послідовність амінокислот поліпептидного ланцюга визначає його вторинну і третинну структури.

Фолдинг білка можна спостерігати після оборотної його денатурації (наприклад, викликані підвищенням температури). Така денатурація характеризується порушенням вторинної і третинної структур білкової молекули. Вони можуть швидко (протягом декількох секунд) спонтанно відновлюватися при зниженні температури до початкового значення.

Фолдинг білкових молекул відбувається складнішим чином. У клітині є спеціальні допоміжні білки - шаперони, які допомагають формуванню тривимірної структури білкових молекул після їх синтезу. Шаперони сприяють утворенню правильних зв'язків між окремими ділянками поліпептидного ланцюга і перешкоджають формуванню невірних зв'язків. Спеціальні ферменти, що прискорюють фолдинг називаються фолдазами.

В процесі функціонування білкових молекул змінюється їх конформація. Ці зміни пов'язані з внутрішньомолекулярними перетвореннями, тривалість яких становить 0,01 - 0,001с, а іноді - на кілька порядків менше. Відомості про такі перетворення стали доступними завдяки таким сучасним методам дослідження, як радіоспектроскопія електронного парамагнітного резонансу і ядерного магнітного резонанс, люмінесцентний аналіз. Їх застосування дозволило дослідити зміни структури білкових молекул-ферментів в деяких реакціях, молекул гемоглобіну при приєднанні до них кисню, молекул зорового пігменту сітківки при попаданні на них світла та ін.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте рівні організації білкової молекули і хімічні зв'язки, якими вони забезпечуються.
2. Опишіть модель мерехтливих кластерів стану води як речовини.
3. Поясніть сутність і термодинамічну природу гідрофобних взаємодій.
4. Поясніть, що таке кооперативність хімічних зв'язків.
5. Вкажіть, яку роль відіграє фіксація просторової структури білка слабкими взаємодіями у здійсненні його функціональної активності.
6. Охарактеризуйте фолдинг білкової молекули.

Виберіть правильні відповіді:

1. Вкажіть хімічний зв'язок або фізико-хімічну взаємодію, за допомогою якої утворюється первинна структура білка:

- А. водневий Б. іонний В. ковалентний
Г. гідрофобний Д. слабкий

2. Вкажіть хімічний зв'язок або фізико-хімічною взаємодію, за допомогою якої утворюється вторинна структура білка:

- А. водневий Б. іонний В. ковалентний
Г. гідрофобний Д. слабкий

3. Третинна структура білка представляє собою:

- А. глобулу Б. ланцюжок В. спіраль
Г. місток Д. складку

4. Термодинамічна природа гідрофобних взаємодій полягає у:

- А. використанні енергії АТФ для їх здійснення
Б. зменшення ентропії системи
В. перетворенні теплової енергії в хімічну
Г. збільшенні ентропії системи
Д. збільшенні вільної енергії системи.

5. Вкажіть зв'язок або взаємодію, що відіграє основну роль в формуванні четвертинної структури білкової молекули на основі усіх попередніх:

- А. пептидний Б. водневий В. гідрофобний
Г. іонний Д. ковалентний

6. Мономерами білкової молекули служать:

- А. пептиди Б. моносахариди В. амінокислоти
Г. аміноспирти В. аміногрупи

7. Зміни конформації білкової молекули зумовлені:

- А. розривом пептидних зв'язків Б. розривом слабких зв'язків
В. утворенням пептидних зв'язків Г. змінами числа амінокислот