

УДК 577.15.02

**ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ
ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ
ПОСЛЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ
ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП**

Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В.

Рассмотрены основные структурные и физико-химические факторы, определяющие стабильность белковых макромолекул в растворе, особенности строения белков из термофильных микроорганизмов. Проанализирован механизм изменения термостабильности белков и ферментов после химической модификации их боковых функциональных групп и экспериментальные данные по влиянию химической модификации на термостабильность белков. Показана зависимость эффекта стабилизации и изменений в структуре белковых макромолекул от степени модификации, природы модифицируемых групп и групп, вводимых в белки при модификации (их заряда, гидрофобности). На конкретных примерах показана большая практическая значимость метода химической модификации для получения стабилизированных форм биокатализаторов.

Библиография — 178 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1852
II. Стабильность биомакромолекул как функция их структуры	1853
III. Механизм изменения термостабильности белков и ферментов после химической модификации их функциональных групп	1863

I. ВВЕДЕНИЕ

Проблема стабильности глобулярных белков (и ферментов), т. е. проблема установления взаимосвязи между структурой и стабильностью биомакромолекул была и остается одной из самых важных, сложных и до сих пор нерешенных проблем современной физической химии биополимеров. Проблема повышения стабильности ферментов по отношению к различным денатурирующим воздействиям для нужд практики тесно связана с первой, поскольку без знания основных структурных факторов, определяющих стабильность белковой глобулы, невозможно целенаправленно изменять ее. Важность и необходимость решения этих проблем обусловлена развитием современной биотехнологии, требующей проведения многих ферментативных процессов в экстремальных условиях (в частности, при повышенных температурах).

Множество данных свидетельствует, что, по-видимому, не существует одного всеобщего принципа образования стабильной белковой конформации и, следовательно, не существует одного универсального метода стабилизации белков. Установленные в последние годы корреляции между первичной структурой и стабильностью биомакромолекул оказываются справедливыми лишь для ограниченного числа белков внутри определенного класса [1]. Сравнение первичной, вторичной и третичной структур ферментов, выделенных из термофильных источников и отличающихся более высокой стабильностью, с их лабильными аналогами, несмотря на отдельные общие закономерности, вскрывает многообразие структурных особенностей термофильных белков и ферментов, обуславливающих их повышенную стабильность. Тем не менее знание основных структурных факторов, определяющих стабильность нативной конформации белка в растворе, дает возможность сформулировать основные принципы ее стабилизации.

Одним из наиболее широко используемых методов изменения свойств (в частности стабильности) белков и ферментов в растворе является химическая модификация их функциональных групп, не входящих в активный центр. Химическая модификация часто является первой стадией при получении стабилизованных нерастворимых препаратов ферментов. Во многих случаях изменение стабильности фермента в результате ковалентной иммобилизации обусловлено не только и не столько его связями (ковалентными и нековалентными) с носителем, сколько химической модификацией его функциональных групп. Химически модифицированные стабилизованные растворимые ферменты имеют ряд преимуществ по сравнению с нерастворимыми, в частности обладают более высокой катализитической активностью и, что важно для их медицинского применения, меньшей антигенностью.

Стабилизация ферментов в природе осуществляется в результате мутаций, т. е. замены небольшого числа одних аминокислотных остатков на «подходящие» другие как внутри, так и на поверхности белковой глубины. Такая стабилизация, по-видимому, является следствием «естественног о отбора», происходящего в результате изменения условий существования данного класса микроорганизмов (например, при повышении температуры), когда из множества модифицированных с помощью мутаций изоферментов «выживают» лишь те, которые обладают достаточно стабильной конформацией в экстремальных условиях. Искусственная же стабилизация ферментов путем химической модификации может осуществляться лишь при модификации доступных в данных условиях модифицирующим агентом боковых остатков, число которых в каждом белке не столь уж велико. Набор пригодных для белков методов химической модификации пока невелик по сравнению с возможностями природных мутаций.

В опубликованных в последние годы обзорах [2—5], посвященных стабилизации белков и ферментов в растворе, влияние химической модификации на их стабильность рассматривается исключительно феноменологически. При этом некоторые авторы полагают невозможным прогнозирование эффектов модификации [5]. Литературные данные по этому вопросу немногочисленны, неполны и характеризуются различием критериев определения стабильности белков, что затрудняет их сопоставление и сравнение. В данном обзоре проведен анализ литературных и собственных результатов авторов по влиянию химической модификации на стабильность белков и ферментов, что дало возможность сформулировать некоторые общие закономерности и механизм изменения стабильности биомакромолекул в результате химической модификации их функциональных групп. Знание этих закономерностей может помочь исследователям, правильно выбрав метод модификации, добиться успеха в получении ферментных препаратов с заданной стабильностью. С теоретической точки зрения — это один из важных подходов к выявлению взаимосвязи между структурой и стабильностью биомакромолекул.

Анализу работ по влиянию химической модификации на стабильность белков и ферментов предшествует рассмотрение главных факторов, определяющих стабильность макромолекулы в растворе и возможные взаимосвязи между стабильностью и структурными параметрами макромолекул [6, 7].

II. СТАБИЛЬНОСТЬ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ КАК ФУНКЦИЯ ИХ СТРУКТУРЫ

1. Основные структурные и физико-химические факторы, определяющие стабильность белковых макромолекул в растворе

Нативная конформация белка, имеющая в данных физических условиях минимум Гиббсовской свободной энергии (G_u), представляет собой трехмерную структуру, которая определяется аминокислотной последовательностью и данным микроокружением [8], и обладает гибкостью и

внутренней динамикой, необходимыми для проявления функциональной активности белка [9]. Анализ трехмерных структур множества глобулярных белков показывает, что все аминокислотные остатки по их локализации в глобуле разделяются на три типа: 1) гидрофобные, предпочтительно находящиеся внутри молекулы (Cys, Ile, Leu, Met, Val, Trp, Phe); 2) гидрофильные, предпочтительно локализующиеся в поверхностном слое (Asp, Glu, Lys, Asn, Gln, Pro, Arg, Ser, Thr); 3) нейтральные и амбивалентные, безразличные в отношении локализации на поверхности или во внутреннем объеме молекулы (Ala, His, Gly, Tyr) [10, 11]. Для белков характерна тенденция предпочтительного кооперирования одних аминокислотных остатков с другими [12, 13], что приводит к образованию в макромолекуле структурных доменов: кластеров из гидрофобных или гидрофильных аминокислот [14, 15]. Так, высокая степень взаимной кооперативности была выявлена между парами остатков: Glu—Lys, Met—Arg, Asn—Trp, Gln—Pro [12].

Переход биополимера без разрыва ковалентных связей из нативного состояния (Н), в котором он проявляет свою функциональную активность *in vivo* или *in vitro*, в денатурированное (Д) с обратимо или необратимо утраченной активностью является денатурационным переходом [16, 17]. Основным признаком кооперативной системы является наличие взаимодействия между отдельными звеньями, энергия которого больше энергии теплового движения (kT) [18]. Величина энергии кооперативного взаимодействия является решающей для реализации того или иного кинетического механизма кооперативного перехода из упорядоченного состояния в хаотичное. Возможны три типа взаимодействий в системе: 1) слабое, 2) сильное, 3) промежуточный случай. В первом случае кинетические закономерности перехода системы из упорядоченного состояния в хаотичное не отличаются от закономерности перестройки отдельного звена. В случае сильного взаимодействия звеньев система может перестраиваться как единое целое только после того, как одновременно на всех связях системы произойдет флукуационное накопление энергии, достаточной для их разрушения. Такие переходы (в частности, плавление твердых тел) отличаются высокими энергиями активации. В белках реализуется третий, промежуточный, тип взаимодействий, и денатурационный переход в белке протекает по кооперативному механизму. Тем не менее белки более похожи на твердые тела, нежели на жидкие, и энталпия плавления белковой структуры — существенный фактор стабильности белков [19].

Для описания денатурационного перехода между Н и Д состояниями наиболее часто используется механизм «все или ничего», предложенный *a priori* [20]. Чтобы этот переход был корректно проанализирован с позиции теории двух состояний и были бы получены истинные термодинамические параметры перехода, он должен удовлетворять ряду тестов, сформулированных в [20]. Согласно большому количеству экспериментальных данных, теория двух состояний может использоваться в первом приближении практически для всех небольших по размерам глобулярных белков [7].

Мерой стабильности белка служит изменение Гиббсовской свободной энергии ($\Delta G_{\text{ден}}$) при полном и обратимом разворачивании белка [6, 7]:

$$\Delta G_{\text{ден}} = G_{\text{д}} - G_{\text{н}}$$

где $G_{\text{н}}$ и $G_{\text{д}}$ — свободные энергии нативной и денатурированной форм; $\Delta G_{\text{ден}}$ — свободная энергия стабилизации белка, а $-\Delta G_{\text{ден}}$ — его дестабилизации. Численное значение $\Delta G_{\text{ден}}$ для белковой макромолекулы измеряется, как правило, при разрушении ее нативной структуры под действием нагревания, изменения рН, добавок органических растворителей и т. д., поэтому эта величина имеет смысл только по отношению к определенному типу денатурации [7].

Если процесс денатурации обратим, то $\Delta G_{\text{ден}}$ определяют, измеряя константы равновесия между нативной и денатурированной формами белка или находя с помощью сканирующего микрокалориметра теплоту

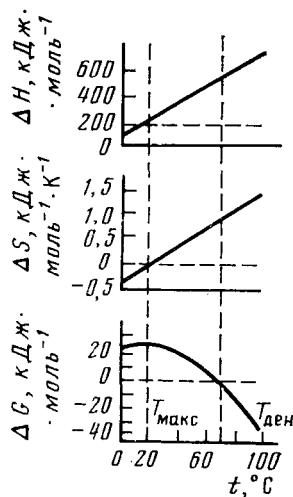


Рис. 1. Энталпия и энтропия денатурации и изменение $\Delta G_{\text{ден}}$ для цитохрома b_5 (pH 7,4) в зависимости от температуры [6]

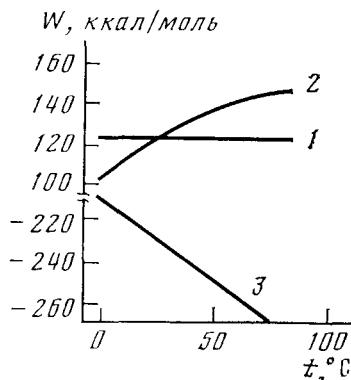


Рис. 2. Влияние температуры на общий вклад в $\Delta G_{\text{ден}}$ (W) нативного химотрипсиногена водородных связей (1), гидрофобного связывания (2) и конформационной энтропии (3) [40]

денатурации. В литературе стабильность белков часто характеризуют средней температурой перехода в денатурированное состояние, $T_{\text{ден}}$ (или $T_{\text{пп}}$), при которой денатурировано 50% белка и $\Delta G_{\text{ден}}=0$, либо температурой максимальной стабильности белка, $T_{\text{макс}}$, при которой $\Delta G_{\text{ден}}$ имеет максимальную величину (рис. 1), либо средней концентрацией денатурирующего агента и т. п. В случае необратимой денатурации (вследствие вторичных процессов) кинетическую стабильность белков чаще характеризуют константой скорости ($k_{\text{ин}}$) изменения какого-либо свойства белка (КД- или УФ-спектров, флуоресценции, а для ферментов — их активности). Причем в общем случае сохранение активности ферментов может и не быть идентичным стабильности всей белковой глобулы.

Стабильность белка в растворе определяется рядом факторов, связанных со структурными характеристиками молекулы [20, 21]. Увеличение конформационной энтропии ($\sim 2-6$ э. е. на один развернувшийся остаток) понижает $\Delta G_{\text{ден}}$. Водородные связи между пептидными группами в биомолекуле (энергия одной связи $\sim 1,4$ ккал/моль [17]) повышают $\Delta G_{\text{ден}}$. Дальнодействующие электростатические взаимодействия заряженных групп на поверхности белка в зависимости от pH среды могут либо стабилизировать (при pH, близких к изоэлектрической точке), либо destabilizировать (при крайних значениях pH) нативную конформацию макромолекулы. Гидрофобное взаимодействие боковых неполярных остатков стабилизирует нативную конформацию белков в водных растворах (ΔG системы при переносе алифатического бокового остатка из воды в неполярный растворитель уменьшается на $\sim 2,8$ ккал/моль [22]). Внутримолекулярные солевые связи (энергия одной связи $\sim 1-3$ ккал/моль), которые реализуются либо в виде единичных электростатических «скрепок», либо в составе некоторого пространственно ограниченного кластера, образованного несколькими группами зарядов различного знака, стабилизируют нативную конформацию белка. Причем в кластерах одна ионогенная группа может принимать участие в двух, трех или четырех ионных взаимодействиях [23-29]. Специфические ковалентные сшивки полипептидной цепи (в частности, S-S-связи) стабилизируют белки не только за счет уменьшения энтропии разворачивания глобулы [6], но и за счет энталпийного вклада ($\sim 1,8$ ккал/моль на одну S-S-связь [30]). Простетические группы, образуя ковалентные, ионные или координационные связи с белком, стабилизируют макромолекулу в це-

лом [31, 32]. Координационные связи ионов металлов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} очень важны для стабилизации нативной конформации многих белковых молекул [33, 34].

Таким образом, полная свободная энергия денатурации белка ($\Delta G_{\text{ден}}$) включает в себя сумму энергий всех типов взаимодействий, указанных выше. Стабильность нативной конформации белка достигается в результате смещения энталпийной и энтропийной функций по температурной шкале (рис. 1) [6] и отражает тонкий баланс между стабилизирующими и дестабилизирующими вкладами взаимодействий различного типа. При физиологических температурах величины $\Delta G_{\text{ден}}$ различных глобулярных белков различаются незначительно и варьируются от 5 до 15 ккал/моль [7]. Однако даже незначительное изменение баланса различных взаимодействий в белке может сильно изменить его стабильность, как это будет видно ниже при рассмотрении экспериментальных данных для стабилизированных белков и ферментов.

Анализ основных энергетических характеристик структуры белка показывает [6], что: 1) белок должен быть стабилен при определенных внешних условиях для сохранения своих специфических структурных и функциональных свойств; поэтому резерв стабильности белка должен значительно превышать RT — минимальное необходимое значение; 2) белок не должен быть слишком «жестким», т. е. структурные изменения в ходе функционирования белка должны происходить без больших энергетических затрат и в то же время система белок — вода должна быть способна к обмену энергией в ходе функционирования без своего разрушения; 3) так как стабильность белка не коррелирует с его молекулярным весом, размер макромолекулы должен быть минимальным, чтобы облегчить ее сворачивание, транспорт и функционирование. Этот принцип реализуется образованием внутримолекулярных доменов или субъединичной структуры [7]. В противоположность бытовавшей ранее на основании данных рентгеноструктурного анализа точке зрения о «жесткой» структуре белка, термодинамические данные подтверждают существование флюктуаций в белковой структуре [35]. Амплитуды флюктуаций атомов около их средних значений больше для менее стабильных белков и меньше — для более стабильных [36]. В соответствии с предложенным механизмом динамической стабилизации белковой структуры [37], внутренняя мобильность кластеров гидрофобных аминокислотных остатков в макромолекуле обуславливает общую стабильность ее нативной конформации [38].

Кинетическую стабильность белка ($\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}$) характеризуют константой инактивации ($k_{\text{ин}}$) и активационными параметрами, определяемыми из температурной зависимости $k_{\text{ин}}$. Данные по изучению кинетических и термодинамических параметров денатурации белков показывают, что эти параметры часто изменяются параллельно при изменении условий денатурации [20, 39]. Это указывает на то, что внутримолекулярные взаимодействия, которые обуславливают термодинамическую стабильность ($\Delta G_{\text{ден}}$), определяют и их кинетическую стабильность ($\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}$).

Одним из наиболее распространенных типов денатурации является термоденатурация, которой уделено главное внимание в данном обзоре. Повышение температуры по-разному влияет на внутримолекулярные взаимодействия в белках (рис. 2): 1) уменьшается степень структурированности воды, и до $\sim 60^{\circ}\text{C}$ возрастает сила гидрофобных взаимодействий; 2) увеличивается конформационная энтропия, что делает доступными конформации белка с большей свободной энергией, т. е. более развернутые формы макромолекулы; 3) ослабляются другие внутримолекулярные взаимодействия, стабилизирующие белок (солевые, координационные и т. д.) [40].

Для большинства глобулярных белков зависимость $\Delta G_{\text{ден}}$ от температуры описывается кривыми (рис. 1 и 3), проходящими через максимум $\Delta G_{\text{ден}}^{\text{макс}}$ при температуре максимальной стабильности белка ($T_{\text{макс}}$) и имеющими верхний ($T_{\text{ден}}$) и нижний температурные пределы стабильности.

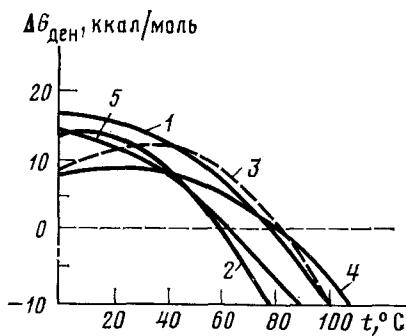


Рис. 3

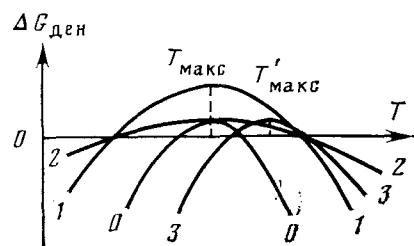


Рис. 4

Рис. 3. Величины $\Delta G_{\text{ден}}$ глобулярных белков в зависимости от температуры, измеренные с помощью микрокалориметрии; 1 — лизоцим, 2 — α -химотрипсин, 3 — метмиоглобин, 4 — цитохром c , 5 — рибонуклеаза [21]

Рис. 4. Гипотетические кривые зависимости $\Delta G_{\text{ден}}$ от температуры для глобулярных белков из термофильных источников, 0 — мезофильный белок, 1 — термофильный белок с большей $\Delta G_{\text{ден}}$ (повышение кривой 0), 2 — термофильный белок с большим температурным интервалом стабильности (выравнивание кривой 0), 3 — термофильный белок со сдвинутым максимумом стабильности (сдвиг кривой 0 от $T_{\text{макс}}$ до $T'_{\text{макс}}$) [60]

сти белка (при $\Delta G_{\text{ден}} = 0$). Величина $T_{\text{макс}}$ обычно значительно ниже физиологических температур [7] и для многих глобулярных белков находится в интервале от -3 до $+10^\circ\text{C}$, что важно для практических целей и позволяет хранить белки долгое время при этих температурах [2]. При повышении температуры вплоть до 55°C экспонирование в раствор внутренних аминокислотных остатков и увеличение подвижности отдельных участков полипептидной цепи приводят к обратимому локальному расширению нативной белковой макромолекулы [20, 41]. Выше 55°C эти изменения становятся необратимыми и белок приобретает полностью развернутую структуру.

Вода оказывает дестабилизирующее действие на белковую макромолекулу. Из практики известно, что лиофилизованные белки сохраняются намного дольше, чем в растворе. При содержании воды более 0,75 г/г белка степень гидратации не влияет на $T_{\text{ден}}$ и $\Delta H_{\text{ден}}$ белка [42—44]. При содержании воды ниже 0,75 г/г белка величина $\Delta H_{\text{ден}}$ постепенно уменьшается, а $T_{\text{ден}}$ незначительно увеличивается. При содержании воды ниже 0,4 г/г белка $T_{\text{ден}}$ резко возрастает на 30—40° С. Эти факты отражают существование в белках различных типов связанный воды. Небольшое число молекул воды прочно связано с белком и система может рассматриваться как единое целое. Менее прочно связанная вода распределяется по всей поверхности глобулы, взаимодействуя с ее гидрофильными остатками. Следующий слой является переходным к общему объему воды [43]. Большой вклад в $\Delta H_{\text{ден}}$ белка вносит ΔH разрушения гидрофобных контактов при его разворачивании, т. е. ΔH упорядочивания молекул воды вокруг экспонированных неполярных групп белка. С уменьшением содержания воды уменьшается гидратация неполярных остатков в денатурированном состоянии белка, вследствие чего падает $\Delta H_{\text{ден}}$ белка [44]. Так как разворачивание молекулы белка при денатурации обусловлено конкурированием молекул воды за водородные связи с белковыми остатками, то при очень малом содержании воды белковая молекула полностью не разворачивается.

Хотя не выявлена корреляция между физико-химическими свойствами белков и их стабильностью, однако анализ данных для большого числа белков позволил предположить [7], что: 1) белки, в ходе функционирования образующие комплексы с другими биомакромолекулами, имеют, как правило малые значения $\Delta G_{\text{дек}}$ (α -лактальбумин, цитохромы c и b_5); 2) белки, реагирующие с низкомолекулярными соединениями или с отдельными участками других макромолекул, имеют большие величины $\Delta G_{\text{дек}}$ (миоглобин, различные гидролитические ферменты).

На основании многочисленных данных обнаружена хорошая корреляция между стабильностью белков *in vivo* и *in vitro* [45—48]. Это обусловлено тем, что одной из причин инактивации белков и ферментов в клетке является протеолиз их денатурированных (развернутых) конформеров, скорость которого лимитируется скоростью разворачивания нативной конформации [47]. Скорость оборота белка *in vivo* коррелирует с его $T_{\text{ден}}$ и со стабильностью по отношению к кислотной и механической денатурации [46, 48]. Для некоторых белков стабильность хорошо коррелирует со скоростью метаболизма [49].

Однако в целом термостабильность белка не коррелирует ни с $\Delta G_{\text{ден}}$, измеренной в стандартных условиях, ни с $T_{\text{ден}}$, т. е. эти величины сами по себе не могут быть объективной мерой термостабильности при сравнении различных белков [1, 7]. Например, цитохром *c* и лизоцим имеют одинаковые $T_{\text{ден}}$, но максимальные величины $\Delta G_{\text{ден}}$ различаются примерно в два раза. α -Химотрипсин и лизоцим при определенных температурах имеют почти одинаковые $\Delta G_{\text{ден}}$, но их $T_{\text{ден}}$ различаются на 20°С (рис. 3). Термостабильность белка корректно описывается только полной зависимостью $\Delta G_{\text{ден}}$ от температуры в достаточно широком интервале температур. Особенно важно это иметь в виду при сравнении стабильности модифицированного или иммобилизованного фермента с нативным, поскольку соотношение их $\Delta G_{\text{ден}}$ при одной фиксированной температуре не может быть экстраполировано на другие температуры.

Таким образом, знание главных факторов, обусловливающих стабильность нативной конформации белка в растворе, делает очевидными те общие принципы, которыми следует руководствоваться при получении препаратов белков и ферментов, имеющих повышенную стабильность в определенном интервале температур: 1) введение дополнительных внутримолекулярных связей (солевых, водородных), усиление гидрофобных взаимодействий будет увеличивать $\Delta G_{\text{ден}}$ белка (одна дополнительная связь с энергией 1—3 ккал/моль может существенно увеличить стабильность белка); 2) уменьшение конформационной подвижности фрагментов полипептидной цепи за счет образования дополнительных внутримолекулярных (ковалентных или нековалентных) «сшивок» в глобуле (дополнительные S—S-связи, координационные связи с ионами металлов и т. д.) будет уменьшать конформационную энтропию [6], и тем самым увеличивать $\Delta G_{\text{ден}}$.

Как будет показано ниже, эти принципы реализуются в природе при создании белков и ферментов с повышенной стабильностью (ферменты из термофильных микроорганизмов) и на практике при получении стабилизованных ферментов путем их химической модификации или иммобилизации.

2. Взаимосвязь между стабильностью биомакромолекул и их первичной, вторичной и третичной структурами

Для выявления главных структурных факторов, количественно связанных со стабильностью биомакромолекул, в последние годы сделан ряд попыток нахождения корреляции между стабильностью и первичной, вторичной и третичной структурами белков. С этой целью сравнивали аминокислотный состав белков с различной стабильностью, изучали физико-химические причины повышенной стабильности белков и ферментов, выделенных из термофильных источников, а также влияние точечных мутаций на стабильность белков и ферментов.

а) Корреляции между первичной структурой и стабильностью белков

На примере 14 белков выявлена эмпирическая зависимость $T_{\text{ден}}$ от индекса гидрофобности (X_1) и среднего объема аминокислотных остатков (X_2) белка:

$$T_{\text{ден}} = 226,81 - 0,01270X_1 + 3,847X_2$$

из которой видно, что основной вклад в величину $T_{\text{ден}}$ вносит средний

объем аминокислотных остатков — X_2 , а не их гидрофобность. Максимально стабилизируют белки остатки Glu, а дестабилизируют — остатки Ser [50]. Однако для большего числа белков корреляция между $T_{\text{деп}}$ и X_2 не проявлялась [51].

Предложенная в работе [52] корреляция между гидрофобностью и термостабильностью белков впоследствии не была подтверждена [53].

Явная взаимосвязь обнаружена между $T_{\text{деп}}$ и отношением $S_{\text{n}}/S_{\text{д}}$, где S_{n} и $S_{\text{д}}$ — площади поверхности белка, доступные растворителю в нативном и денатурированном состоянии, соответственно. $S_{\text{n}} = 11,116 \text{ M}^{2/3}$, а $S_{\text{д}} = 1,44 \text{ M}$ (M — молекулярная масса белка). Для 20 изученных белков $T_{\text{деп}}$ линейно растет с ростом $S_{\text{n}}/S_{\text{д}}$, т. е. с уменьшением M . С ростом M отношение $S_{\text{n}}/S_{\text{д}}$ падает, и уменьшается термостабильность белка. При одном и том же $S_{\text{n}}/S_{\text{д}}$ величина $T_{\text{деп}}$ больше для субъединичных белков, чем для мономерных. Термостабильность полипептидной цепи большого размера может увеличиться путем: 1) ассоциации глобулярных субъединиц в олигомер; 2) сворачивания с образованием множества глобулярных доменов. В этих случаях при неизменной M будет увеличиваться $S_{\text{n}}/S_{\text{д}}$ (и $T_{\text{деп}}$). Отклонения от линейности для некоторых белков могут объясняться влиянием на стабильность таких внутримолекулярных взаимодействий, как S—S-связи, связывание ионов металлов, кофакторов и др. [53].

Микростабильность белковой глобулы отличается от ее макростабильности ($G_{\text{деп}}$) тем, что первая характеризует локальное разворачивание белка и определяется по скорости водородного обмена протонов внутренней части макромолекулы с водой [54]. Микростабильность, т. е. «жесткость» белковой глобулы, не характеризует макромолекулу в целом. Она зависит от степени насыщения белка неполярными контактами и увеличивается с ростом гидрофобного ядра макромолекулы. В то же время $\Delta G_{\text{деп}}$ не зависит от гидрофобности белковой глобулы, а находится в прямой зависимости от числа внутримолекулярных сшивок, уменьшающих конформационную энтропию разворачивания ($\Delta S_{\text{конф}}$) полипептидной цепи (аналогично влияет связывание ионов M^{2+} и кофакторов) [54].

Специфическое предпочтительное кооперирование различных аминокислотных остатков в белках друг с другом, которое было найдено из их трехмерных структур [12, 13], по-видимому, определяет повышенную или пониженную стабильность того или иного белка при повышении температуры [55]. Сравнение $T_{\text{деп}}$ и аминокислотного состава для большого числа белков позволило установить связь между содержанием каждого из аминокислотных остатков и $T_{\text{деп}}$ белка. Все аминокислотные остатки делятся на стабилизирующие (положительная корреляция с $T_{\text{деп}}$) и дестабилизирующие (отрицательная корреляция с $T_{\text{деп}}$). Наибольший стабилизирующий эффект имеет комбинация из заряженных и неполярных спиралеобразующих остатков (I): Asp, Cys, Lys, Glu, Leu, Arg, Trp, Туг, а дестабилизирующий — из нейтральных и коротких неполярных остатков (II): Ala, Asn, Gly, Gln, Ser, Thr, Val, Туг. Общая корреляция записывается уравнением

$$T_{\text{деп}} = 64,46202 + 0,89432 Y_1 - 0,59065 Y_2$$

где Y_1 и Y_2 — процентное содержание в белке стабилизирующих (I) и дестабилизирующих (II) аминокислотных остатков. Не влияют на стабильность белка остатки Phe, Ile, Met, His, Asp и Pro [55]. Верхний предел стабильности белка, соответствующий 100%-ному содержанию в нем остатков I группы, равен $T_{\text{деп}} = 164,3^\circ\text{C}$, а нижний предел стабильности, соответствующий 100%-ному содержанию II группы остатков составляет $T_{\text{деп}} = 5,4^\circ\text{C}$. Однако предложенная корреляция между $T_{\text{деп}}$ и аминокислотным составом белка справедлива лишь для небольших по размерам компактных мономерных белков. Причем гем или S—S-связи оказывают меньшее влияние на стабильность белка, чем его аминокислотный состав [55].

Недостатком всех рассмотренных выше корреляций является то, что, во-первых, они справедливы лишь для ограниченной группы белков и

ферментов, как правило, той, для которой выводилась данная корреляция. Во-вторых, в качестве общего критерия термостабильности использовалась $T_{\text{ден}}$, которая, как уже отмечалось выше, не может служить объективной мерой стабильности белка в широком температурном интервале (рис. 3). Нахождение простой корреляции термостабильность — структура, по-видимому, невозможно из-за сложной зависимости $\Delta G_{\text{ден}}$ белка от температуры [7]:

$$\Delta G_{\text{ден}}(T) = \Delta H_{\text{ден}}(T_{\text{ден}} - T)/T_{\text{ден}} - \int\limits_T^{T_{\text{ден}}} \Delta C_p dT + T \int\limits_T^{T_{\text{ден}}} \Delta C_p d \ln T$$

В перспективе, вероятно, необходимо установление связи не между $T_{\text{ден}}$ белков, а между $\Delta G_{\text{ден}}(T)$ и структурой макромолекул. Кроме того, в силу многообразия структурных факторов, ответственных за стабильность нативной конформации белка, существование такой корреляции возможно лишь среди ограниченного числа однотипных глобулярных белков.

б) Физико-химические причины повышенной стабильности ферментов из термофильных источников

Более перспективным с точки зрения нахождения функции стабильность — структура, возможно, является сравнение структур белков и ферментов, выделенных из термофильных микроорганизмов (т-ферментов) и обладающих повышенной термостабильностью, с их мезофильными аналогами (м-ферментами), имеющими сходные с т-ферментами структуры. Такое сравнение позволяет выявить главные структурные особенности т-ферментов, ответственные за их повышенную термостабильность.

Термостабильность микробных ферментов коррелирует с температурными условиями существования микроорганизмов [56]. При низких температурах культивирования ($<50^{\circ}\text{C}$) синтезируются м-ферменты, а при высоких ($>50^{\circ}\text{C}$) — т-ферменты [57, 58]. т-Ферменты также устойчивы по отношению к другим типам денатурации: мочевиной, гуанидингидрохлоридом, pH и органическими растворителями [59].

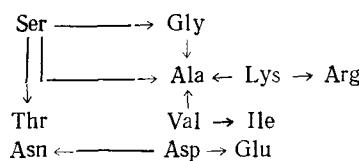
Повышенная термостабильность т-белка по сравнению с м-белком может быть результатом (рис. 4): 1) увеличения энергии активации процесса денатурации; 2) увеличения свободной энергии денатурации $\Delta G_{\text{ден}}$; 3) выравнивания профиля свободной энергии денатурации; 4) сдвига профиля $\Delta G_{\text{ден}}$ [60]. Для большинства т-ферментов стабильность увеличивается за счет повышения кривой зависимости $\Delta G_{\text{ден}}$ от температуры (от кривой 0 до 1 на рис. 4). К такому изменению $\Delta G_{\text{ден}}$ приводят дополнительные гидрофобные, водородные, солевые и S—S-связи, существующие в т-ферментах по сравнению с м-ферментами. В тоже время для т-ферментов $\Delta G_{\text{ден}}$ может изменяться в соответствии с кривой 2 (рис. 4), как для т-фосфоглицераткиназы [60].

Термофильные белки и ферменты обладают большей как термодинамической, так и кинетической стабильностью. Поскольку по абсолютной температурной шкале разница между 35°C ($T_{\text{ден}}$ для м-ферментов) и 80°C ($T_{\text{ден}}$ для т-ферментов) относительно мала ($\sim 15\%$), то даже небольшие различия в энергии активации и в $\Delta G_{\text{ден}}$ для т- и м-ферментов могут приводить к значительным различиям в их термостабильности при незначительном отличии их структур. Расчет показывает, что уменьшение $k_{\text{ин}}$ в 10 раз при 70°C требует увеличения $\Delta G_{\text{ден}}$ всего на 1,56 ккал/моль. Для увеличения $T_{\text{ден}}$ от 35 до 45°C для полипептидной цепи с $M=35\,000$ требуется увеличить число водородных связей лишь на 3%. Различия в $\Delta G_{\text{ден}}$ и $\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}$ для белков до 10 ккал/моль могут быть получены при замене одного или двух аминокислотных остатков в молекуле [53].

в) Принципиальные различия в структурах ферментов из термофильных и мезофильных источников

Принципиальные различия в аминокислотном составе т- и м-ферментов выявлены при сравнении аминокислотного состава большого числа т- и м-ферментов. На примере ферредоксинов, глицеральдегид-3-фосфат-

дегидрогеназ и лактатдегидрогеназ были выявлены следующие направления преимущественного обмена аминокислотных остатков при переходе от м- к т-ферментам [61]:



Указанные замены увеличивают гидрофобность, спиралеобразующую и складкообразующую способность остатков. При этом несколько увеличивается объем внутренних остатков и достигается более плотная упаковка структуры белковой глобулы. На основании структурных исследований показана главная роль стабилизирующих дополнительных ионных пар в этих т-ферментах [62]. Для т-лактатдегидрогеназы (ЛДГ) характерно большее содержание Ala, Gly и заряженных остатков, а в м-ЛДГ содержится больше Ser, Thr, Gln, Asn и полярных остатков. Хотя содержание гидрофобных остатков в обоих ферментах одинаково, но в т-ферменте они находятся только внутри глобулы, а в м-ферменте — также и на поверхности. Для т- и м-ЛДГ пространственное расположение заряженных и полярных остатков также различно [62]: в т-ЛДГ заряженные остатки располагаются только на поверхности молекулы, а в м-ЛДГ и внутри. Таким образом в т-ЛДГ распределение аминокислотных остатков в молекуле термодинамически более выгодно.

Анализ аминокислотного состава 14 т-ферментов и 207 м-ферментов показал, что термофильные ферменты содержат больше Gly, Arg, Glx, но меньше Asx и Ser [63]. Отмечается также положительная корреляция между термостабильностью и соотношением Arg и Lys в белке [64]. Аргинин является наиболее гидрофильной аминокислотой и его локализация на поверхности более выгодна по сравнению с Lys. Резонансная структура иона гуанидиния позволяет ему образовывать больше одной связи с анионными остатками. т-Ферменты характеризуются также большим содержанием α -спиралей и β -структур, чем м-ферменты. Увеличенное содержание Glu в т-ферментах улучшает их способность связывать ионы металлов. Возможно, что это — одна из главных причин повышенной стабильности т-ферментов [63].

На примере 34 т-ферментов и 208 м-ферментов установлена положительная корреляция между термостабильностью и алифатическим индексом белка (A), который определяли по формуле:

$$A = \chi_{\text{Ala}} + a\chi_{\text{Val}} + b(\chi_{\text{Ile}} + \chi_{\text{Leu}}),$$

где $a = 2,9 \pm 0,1$; $b = 3,9 \pm 0,1$, а χ — содержание остатков Ala, Val, Ile и Leu в белке (в молярных процентах). Поскольку содержание этих остатков в т-ферментах значительно больше, чем в м-ферментах, то каждый т-фермент имеет больший алифатический индекс, чем его мезофильный аналог [65].

При сравнении третичных структур т- и м-ферментов были обнаружены дополнительные две солевые и водородные связи в т-ферредоксине [23, 66]. Причиной повышенной стабильности т-триозофосфатизомеразы являются дополнительные солевые и гидрофобные связи между субъединицами [66]. Две дополнительные меж- и внутрисубъединичные солевые связи стабилизируют т-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу [23, 67—69], а дополнительные солевые связи, гидрофобные взаимодействия и связи с дополнительными ионами Ca^{2+} обусловливают стабилизацию термолизина [70—72]. Дополнительная солевая связь между Asp (201) (в м-ферменте — Asn (201)) и остатком His повышает энергию активации термоденатурации т-тирофилазы [73]. Из десяти ионных пар в т-ЛДГ — восемь образованы остатками Arg, а в различных м-ЛДГ найдено только 2, 4 или 6 ионных пар, которые вместо Arg содержат Lys [62]. Главная роль в стабилизации т-ЛДГ приписывается дополнительным поверхностным солевым связям, образуемым остатками Arg а так-

же некоторому усилинию внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий вследствие уменьшения числа гидрофобных остатков на поверхности глобулы и их увеличению — внутри [62]. Для других термофильных ферментов, третичные структуры которых подробно не изучены, большую термостабильность по сравнению с м-ферментами объясняют большим числом водородных связей и более сильным межсубъединичным взаимодействием в случае энолазы [74, 75], большим числом внутримолекулярных сшивок (S—S-связей) для железосерного белка [76] и глутаминсингтетазы [77], защитным эффектом поверхностных углеводов в β -глюкозидазе [78] либо изменением конформации в случае дегидрогеназы [79].

Таким образом, высокая термостабильность ферментов из термофильных микроорганизмов обусловлена исключительно малым числом дополнительных (по сравнению с м-ферментами) связей как внутри, так и на поверхности макромолекулы. Для большинства т-белков это главным образом солевые связи, как следует из сравнения третичных структур т- и м-ферментов.

г) Точечные мутации и стабильность белка

Изучение влияния точечных мутаций (меняющих только один-два аминокислотных остатка в полипептидной цепи) на стабильность белка может дать также ценную информацию о взаимосвязи между структурой и стабильностью. В отличие от т-ферментов,

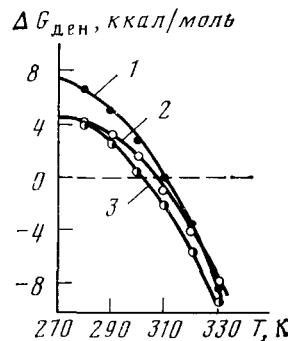
где выбор наиболее стабильной формы из множества мутантных форм осуществляется естественным путем, искусственные мутации случайны по своему влиянию на стабильность белка. Это роднит их с химической модификацией.

Замена одного остатка Trp (138) на Tug в лизоциме фага T4 (полипептид без S—S-связей) уменьшает $\Delta G_{\text{ден}}$ (и $T_{\text{ден}}$) во всем температурном интервале от 0 до 60° С на 2—3 ккал/моль (рис. 5) [80]. При этом $\Delta H_{\text{ден}}$ уменьшается на 20 ккал/моль. Замена еще двух остатков Trp на Tug еще более уменьшает $\Delta G_{\text{ден}}$ при всех изученных температурах (рис. 5). Хотя общая конформация лизоцима после мутаций практически не изменяется, одним из возможных объяснений столь сильного уменьшения $\Delta H_{\text{ден}}$ после мутации и его компенсации за счет одновременного уменьшения и $\Delta S_{\text{ден}}$ было бы локальное разворачивание молекулы [80].

Рис. 5. Величина $\Delta G_{\text{ден}}$ в зависимости от температуры для нативного (1) и мутантных форм (2, 3) лизоцима при pH 2,0, 2 — Trp (138) заменен на Tug, 3 — Trp (138), (126) и (158) заменены на Tug [80]

Одноточечные замены на Thr в лизоциме фага T4 не изменяют его третичной структуры, но уменьшают $T_{\text{ден}}$ на 5; 14 и 9° соответственно [81, 82]. Первая мутация увеличивает $\Delta H_{\text{ден}}$, а вторая и третья — уменьшают ее. Наибольший дестабилизирующий эффект ($T_{\text{ден}}$ уменьшается на 14°) оказывает замена Arg (96) на His. По мнению авторов, это объясняется ослаблением гидрофобных взаимодействий в молекуле и возможным нарушением α -спирали между аминокислотными остатками в положении 82—90 [81].

Замещение Glu (49) на Met в α -субъединице триптофансингтетазы из *E. coli* дает в два раза (при 58° С) более стабильный мутант по отношению к термоденатурации и к денатурации мочевиной [82]. Пространственная структура фермента при этом не изменяется. По мнению авторов, усиление гидрофобных взаимодействий в мутанте при замене гидрофильного Glu, находящегося в гидрофобном ядре, на Met обеспечивает наблюдаемый эффект стабилизации. Варьирование природы аминокислотного остатка в положении 49 выявило интересную зависимость: замена заряженного Glu (49) на полярные незаряженные остатки Tug, Ser, Gln увеличивает стабильность α -субъединицы триптофансингтетазы



Glu (128) на Lys, Arg (96) на His и Ala (146) на Thr в лизоциме фага T4 не изменяют его третичной структуры, но уменьшают $T_{\text{ден}}$ на 5; 14 и 9° соответственно [81, 82]. Первая мутация увеличивает $\Delta H_{\text{ден}}$, а вторая и третья — уменьшают ее. Наибольший дестабилизирующий эффект ($T_{\text{ден}}$ уменьшается на 14°) оказывает замена Arg (96) на His. По мнению авторов, это объясняется ослаблением гидрофобных взаимодействий в молекуле и возможным нарушением α -спирали между аминокислотными остатками в положении 82—90 [81].

Замещение Glu (49) на Met в α -субъединице триптофансингтетазы из *E. coli* дает в два раза (при 58° С) более стабильный мутант по отношению к термоденатурации и к денатурации мочевиной [82]. Пространственная структура фермента при этом не изменяется. По мнению авторов, усиление гидрофобных взаимодействий в мутанте при замене гидрофильного Glu, находящегося в гидрофобном ядре, на Met обеспечивает наблюдаемый эффект стабилизации. Варьирование природы аминокислотного остатка в положении 49 выявило интересную зависимость: замена заряженного Glu (49) на полярные незаряженные остатки Tug, Ser, Gln увеличивает стабильность α -субъединицы триптофансингтетазы

по отношению к гуанидингидрохлориду при рН 9,0, а при рН 7,0 и 5,5 — дестабилизирует фермент, наиболее ярко это выражено в случае Gln [84]. Замена же Glu (49) на гидрофобные аминокислотные остатки Met и Val значительно (на 5 ккал/моль) увеличивает стабильность триптофансинтетазы по отношению к гуанидингидрохлориду при всех значениях рН (особенно при рН 7,0 и 9,0). По мнению авторов [83], Glu (49) находится в гидрофобном окружении, поэтому, естественно, любое уменьшение гидрофильности остатка в положении 49 будет вызывать увеличение стабильности фермента. Замена в α -субъединице триптофансинтетазы Gly (211) на Arg или Glu несколько увеличивает термостабильность фермента ($\Delta G_{\text{ден}}$ при 57,8°C увеличивается на 0,1 и 0,6 ккал/моль, а $T_{\text{ден}}$ — на 0,2 и 1,8° соответственно) [85]. В то же время $\Delta H_{\text{ден}}$ увеличивается в результате этих мутаций на 17 и 15 ккал/моль. Было доказано, что конформации нативного фермента и двух мутантов близки. По-видимому, участок цепи, содержащий Gly (211), расположен на поверхности молекулы и не участвует в каких-либо значительных взаимодействиях, поэтому замещение Gly на более объемные заряженные остатки Glu и Arg вызывает только малые изменения в нековалентных взаимодействиях на поверхности белка [85].

Работы по точечным мутациям показывают, что даже замена одного аминокислотного остатка вызывает заметное изменение стабильности белка. В зависимости от локализации заменяемого остатка, его ближайшего окружения и природы замещающего остатка после мутации стабильность будет увеличиваться или уменьшаться так же, как и в случае химической модификации (что будет показано в следующем разделе). Мутации, увеличивающие полярность внутри глобулы белка (гидрофобного ядра), будут уменьшать его стабильность, а увеличивающие гидрофильность — стабилизировать. Мутации поверхностных аминокислотных остатков будут слабо влиять на стабильность макромолекулы.

В заключение необходимо подчеркнуть, что стабильность белка очень чувствительна не только к изменению его конформации, но и к незначительному варьированию первичной структуры (как видно на примере точечных мутаций). Поэтому изменение стабильности белка (в частности, термостабильности) — чувствительный тест на изменения в структуре белка, которые могут быть ниже пределов разрешения как структурного анализа, так и других физико-химических методов [7, 86].

III. МЕХАНИЗМ ИЗМЕНЕНИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ ПОСЛЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП

Метод химической модификации широко используется для идентификации групп, входящих в активные центры ферментов, для исследования топографии и конформации биомакромолекул [87]. В последние годы в связи с проблемой стабилизации биокатализаторов все большее внимание уделяется химической модификации функциональных групп белка, не входящих в активный центр [2—4]. Химической модификации, как правило, доступны лишь поверхностные или находящиеся вблизи поверхности в данных условиях группы белка. В зависимости от условий (рН, температура и т. д.) число поверхностных, т. е. доступных растворителю, групп изменяется.

Реакционноспособные группы белка можно разделить на три группы: 1) кислые (COOH-группы C-концов и остатков Asp, Glu), 2) основные (α -NH₂-группы N-концов, остатки Lys, Arg, OH-группы остатков Tyr, Ser, Thr и углеводов в гликопротеинах; 3) нейтральные (имидазольная группа His) [88]. Реагенты, наиболее часто используемые для химической модификации белков и ферментов с целью их стабилизации или изменения структуры, приведены в табл. 1.

Для модификации аминогрупп используются ангидриды и хлорангидриды карбоновых кислот, имидоэфиры, альдегиды, хлор- и сульфопроизводные три- или динитробензола. Остатки Arg модифицируются раз-

ТАБЛИЦА 1

Изменение структуры и стабильности белков и ферментов в результате химической модификации их функциональных групп

Белок	Модифицирующий агент	Модифицируемые остатки ^a	Получаемые производные	Степени модификации			Ссылки
				Не влияющее на структуру и термостабильность	Повышающие термостабильность ^b	Разворачивающие и дестабилизирующие молекулу ^b	
Альбумин бычьи, сывороточный	янтарный ангидрид ⁶	Lys (59)	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^{\ominus}$	до 60% (до 30—34 остатков)	—	более 80%	[90—92]
	метилацетимидат ⁶	»	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHC} \begin{array}{c} \text{NH}_2^{\oplus} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{Cl}^{\ominus}$	до 100%	—	—	[92]
	масляный ангидрид	»	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	до 90%	—	более 90%	[93]
Иммуноглобулин G человека	янтарный ангидрид ⁶	Lys ² (90)	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^{\ominus}$	до 87% (до 78 остатков)	—	более 87% (расширение молекулы, уменьшение β -складок за счет электростатического отталкивания)	[90]
	цитраконовый ангидрид ⁶	»	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHCCH}=\text{C} \begin{array}{c} \text{CO}^{\ominus} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \end{array}$	малые степени модификации	—	—	[94]
	изоцианат калия ⁶	»	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHCNH}_2$	до 100%	—	—	[94]
	ацетилацетон ⁶	Lys (29)	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{EN}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CCH}_3$	—	—	от 1 до 6 Lys	[95]
Лейциновзывающий белок	»	Arg (7)	$\text{ENHC} \begin{array}{c} \text{NH}_2^{\oplus} \\ \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array} \rightarrow \text{E—NH—C} \begin{array}{c} \text{N}=\text{C} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} \end{array} \\ \diagdown \\ \text{N}=\text{C} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} \end{array} \end{array}$	до 3-x Arg	—	—	[95]
11S глобулин	уксусный ангидрид ⁶	Lys ²	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHCOCH}_3$	до 21%	—	более 21%	[96]

Овальбумин	янтарный ангидрид ⁶	Lys ² (19)	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^{\ominus}$ 	до 66%	—	—	более 66% (Разворачивание глобулы белка)	[97]
Цитохром <i>c</i>	тетранитрометан	Тут (4)	$\text{E}-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} \rightarrow \text{E}-\text{C}_6\text{H}_3\text{NO}_2\text{OH}$	—	1 остаток (увеличение $T_{\text{ден}}$)	2 остатка (сильное разворачивание)	—	[98]
Цитохром <i>c-552</i>	уксусный ангидрид ⁶	Lys ² (4)	$\text{E}-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHCOCH}_3$	до 100%	—	—	—	[99]
Цитохром <i>c</i> лошади	4-хлор-3,5-динитробензойная кислота	Lys (19)	$\text{E}-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{E}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3\text{NO}_2\text{COO}^{\ominus}$	2 остатка (7 и 60) вдали от верха и дна гемовой щели	2 остатка (27 и 72) на фронтальной поверхности вблизи экспонированной кромки гема (образование новых поверхностных солевых связей)	Lys (13) наверху гемовой щели (разрушение солевой связи Lys (13) — Glu (90) сильно уширяет гемовую щель); лизины 8, 86, 87 наверху щели (дестабилизация вследствие уменьшения электростатического потенциала в этой области)	[29, 100, 101]	
	янтарный ангидрид	Lys	$\text{ENH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{ENHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^{\ominus}$ 	до 95% (до 18 остатков), по отношению к денатурации мочевиной стабильность не изменяется	—	100%	—	[102]
	малеиновый ангидрид ⁶	Lys	$\text{E}-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow \text{E}-\text{NHCH}=\text{CHCO}^{\ominus}$ 	—	—	—	модификация всех 19 остатков	[103]
Миоглобин	бромацетат	His (12)	$\text{E}-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow$ 	до 50—58% (6—7 остатков)	—	—	—	[104]

ТАБЛИЦА 1 (продолжение)

Белок	Модифицирующий агент	Модифицируемые остатки ^a	Получаемые производные	Степени модификации			Ссылки
				Не влияющие на структуру и термостабильность	Повышающие термостабильность ^b	Разворачивающие и дестабилизирующие молекул ^b	
Миоглобин	иодацетамид		$\begin{array}{c} \text{E}-\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{E}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2 \\ \text{E}-\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{E}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2 \end{array}$	до 50–58% (6–7 остатков)	—	—	[104]
β -Лактоглобулин	янтарный ангидрид	Lys ^c (16)	$\text{E}-\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{E}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^+$	—	1–3 остатка (небольшое увеличение стабильности по отношению к денатурации мочевиной)	от 4 до 10 остатков (меньшая стабильность); более 10 остатков (разворачивание белка и в отсутствие мочевины)	[102]
Рибонуклеаза	янтарный ангидрид	Lys ^c (11)	$\text{E}-\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{E}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^{\ominus}$	до 100% (по отношению к денатурации мочевиной)	—	—	[102]
	уксусный ангидрид	Lys	$\text{E}-\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{E}-\text{NHCH}_3^+$	—	малые степени модификации: некоторая стабилизация	все 11 остатков	[105]
	N-ацетилгомоцистеинолактон	Lys	$\text{E}-\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{E}-\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH})\text{COCH}_3$	—	8 остатков: увеличение стабильности	—	[106]
Глюкоамилаза	акрилоилхлорид	Lys	$\text{E}-\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{E}-\text{NHCH}=\text{CH}_2$	до 66% остатков	—	более 66% остатков: стабильность резко падает; 100% остатков: стабильность при 65° С уменьшается в 2,5 раза	[107]

Пероксидаза хрина	уксусный и энантон- вый ангидриды	Lys (6), OH-группы Tyr (5), Ser (25), Thr (25), и углеводных остатков	$E-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow E-\text{NHCOCH}_2\text{-R}$ $E-\text{OH} \rightarrow E-\text{OCOR}$	до 2-х остатков Lys, до 30 поверхност- ных OH-групп	3—4 остатка Lys (ниже 75°C $k_{\text{ин}}$ падает с ростом степени модифи- кации) стабилиза- ция за счет уси- ления прочности связи гем—белок	6 остатков Lys, более 30 групп OH (когда затра- гиваются и внутренние OH-группы)	[34, 108, 109]
α -Амилаза	тринитробензол- сульфокислота	Lys (6)	$E-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow E-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{NO}_2$	—	3 остатка те же эф- фекты, что и в предыдущем слу- чае	6 остатков: уменьшение стабильности (ослабле- ние связи гем—белок)	[108]
α -Амилаза	<i>n</i> -нитрофенилацетат	Lys	$E-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow E\text{NHCOCH}_3$	—	—	с ростом степени модифи- кации от 1,5 до 11,5 остатков, конформация белка приближается к денатурированной, рас- тет $k_{\text{ин}}$ при т-рах ниже 67°C, ΔH^{\neq} (ΔS^{\neq}) уменьшаются	[110, 111]
Миозин	β -нафтохинон-4- сульфоновая кис- лота	Lys			с ростом степени модификации от 1 до 15 остатков растет термоста- бильность	—	[112]
Лактатдегид- рогеназа	<i>o</i> -метилизомочевина	Lys	$E-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow E-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}_2$	—	4—5 остатков на субъединицу: рез- кое увеличение стабильности (об- разование более прочных солевых связей между COO^- и введенны- ми группами гуа- нидина); от 5 до 15 остатков: не- значительное по- вышение стабиль- ности	—	[113]

ТАБЛИЦА 1 (окончание)

Белок	Модифицирующий агент	Модифицируемые остатки ^a	Получаемые производные	Степень модификации			Ссылки
				Не влияющие на структуру и термостабильность	Повышающие термостабильность ^b	Разворачивающие и дестабилизирующие молекул ^b	
Лактатдегидрогеназа	метил-4-гидрокси-3-нитробензимидат	Lys	$E-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow E-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH}_2)-\text{C}_6\text{H}_3\text{NO}_2-\text{OH}$	с ростом степени модификации от 5 до 30 остатков стабильность увеличивается в 2—6 раз при 60° С	41 остаток на тетramer: стабильность уменьшается в 86 раз при 60° С	[114]	
α -Химотрипсин	янтарный ангидрид	Lys ^c (17)	$E-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow E-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}^{\ominus}$	до 50% модификации; при 100% модификации: структура близка к нативной, не значительное повышение стабильности	от 60 до 95%: резкое увеличение термостабильности (~ 20 раз)	более 95%: резкое падение стабильности (~ до нативного)	[115, 116]
	акролеин (с последующим восстановлением NaBH_4)	Lys	$E-\text{NH}_3^{\oplus} \rightarrow E-\text{NH}_2-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	до 50%: небольшое повышение стабильности	от 50 до 95%: резкое увеличение термостабильности (в ~120 раз при 95% модификации); причина: изменение конформации после модификации	более 95%: резкое падение стабильности (до нативного)	[116]

^a В скобках указано общее количество данных остатков в белке.

^b В скобках приведены физико-химические причины, обуславливающие данное изменение структуры и стабильности белка.

^c В этих работах термостабильность не изучалась.

^d При ацилировании ломимо NH_2 -групп Lys модифицируются SH -группы Cys, OH -группы Tyr, Ser, Thr [117, 118], что не учитывалось авторами данных работ.

^e E — фермент или белок.

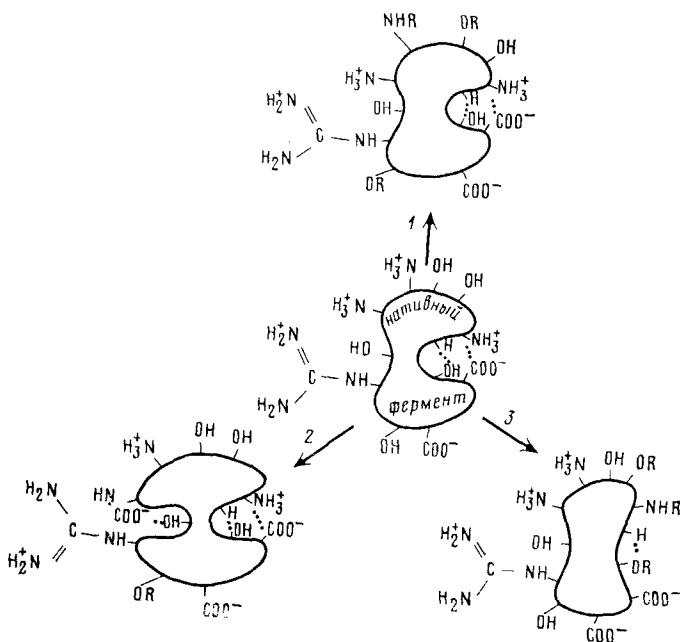


Рис. 6. Схематическое представление различных типов функциональных групп ферментов; модификации групп: 1 — I типа, 2 — II типа, 3 — III типа [121]

личными дикетонами. Нитрование или иодирование белков приводит к модификации остатков Туг и Тгр. Остатки Сер, Тгр и OH-группы углеводных остатков в гликопротеидах ацилируются ангидридами и хлорангидридами кислот. Бромацетат и иодацетамид модифицируют остатки His. Карбоксильные остатки Glu и Asp модифицируются с помощью карбодиимидов или реагента Вудворда [119, 120]. Указанные группы белков используются и при ковалентной иммобилизации, причем изменение стабильности биокатализатора может быть в большей степени связано с модификацией его первичной структуры.

Одни и те же функциональные группы белков и ферментов играют различную роль в стабилизации их нативной структуры в зависимости от локализации в глобуле и от того, участвуют они или нет во внутримолекулярных взаимодействиях, стабилизирующих или дестабилизирующих макромолекулу. Можно выделить три типа функциональных групп, доступных для модификации (рис. 6). *Функциональные группы I типа* расположены на поверхности глобулы. Это хорошо гидратированные, полярные или заряженные группы, которые в данных условиях не взаимодействуют друг с другом, а только с растворителем или ионами из раствора. *Функциональные группы II типа* расположены на или вблизи поверхности белка. В нативном ферменте они имеют неблагоприятное окружение (заряженные группы в гидрофобном окружении или в окружении одноименно заряженных групп) и дестабилизируют белковую глобулу. Число групп этого типа в белке обычно невелико. *Функциональные группы III типа* удалены от поверхности глобулы и образуют внутримолекулярные солевые или водородные связи, стабилизирующие фермент. Эти группы недоступны для модификации в обычных условиях и модифицируются только при разрыхленной конформации белка (при повышенной температуре, крайних значениях рН или в присутствии органических растворителей).

Химическая модификация функциональных групп различного типа будет по-разному влиять на структуру и стабильность фермента. Наблюдаемый эффект будет также зависеть от природы остатков, вводимых в фермент при модификации. Модификация групп I типа будет в общем случае мало изменять конформацию и стабильность фермента, вне за-

вистимости от природы модифицирующего агента и степени модификации. Если же при этом в фермент вводится большое число объемных гидрофобных или одноименно заряженных остатков, то может произойти частичное разворачивание молекулы и ее дестабилизация. В том же случае, когда введенные остатки образуют дополнительные нековалентные связи (солевые, водородные) с соседними группами белка, стабильность фермента может даже возрасти. Наибольшего эффекта стабилизации следует ожидать при модификации групп II типа, когда снимаются взаимодействия, дестабилизирующие нативную конформацию. Именно при модификации групп II типа большое влияние на термостабильность будут оказывать степень модификации, заряд и гидрофобность вводимых остатков. Модификация групп III типа должна уменьшать термостабильность фермента из-за разрушения внутримолекулярных связей, стабилизирующих его нативную конформацию. Структура фермента после такой модификации приближается к денатурированной.

Следовательно, в зависимости от того, какую роль в поддержании нативной структуры фермента играют те или иные функциональные группы, модификация этих групп либо не будет влиять на термостабильность (группы I типа), либо будет стабилизировать (группы II типа) или дестабилизировать фермент (группы III типа). Можно ожидать, что для каждого конкретного фермента соотношение между количеством групп каждого типа различно. Малая степень модификации определенных групп фермента соответствует скорее всего модификации групп I типа, средняя — I и II типа, а при исчерпывающей модификации в ферменте могут быть модифицированы также группы III типа. После модификации групп III типа в белке нарушается вся система внутримолекулярных стабилизирующих взаимодействий, поэтому дестабилизирующий эффект вследствие модификации этих групп будет перекрывать стабилизирующее влияние модификации групп II типа.

Анализ данных табл. 1 показывает, что в общем случае возможны три типа модификации функциональных групп белка: 1) модификация с изменением заряда аминокислотных остатков, которая меняет электростатические взаимодействия групп на или вблизи поверхности белка, его изоэлектрическую точку и, следовательно, может изменить конформацию глобулы [89]; 2) модификация с введением гидрофобных групп в белок, которая может по-разному влиять на свойства белка в зависимости от локализации и природы введенной гидрофобной группы, оказывая наибольшее влияние на конформацию, растворимость и поверхностные характеристики белка; 3) введение гидрофильных групп в молекулу белка, которое мало влияет на его свойства, так как поверхность белковой глобулы гидрофильна.

Проведенный выше анализ проблемы стабильности глобулярных белков и особенностей строения т-белков позволяет сделать некоторые предположения о возможности стабилизации ферментов в результате их химической модификации: 1) стабильность может увеличиться при образовании в белке после модификации даже малого числа дополнительных нековалентных связей; 2) большое стабилизирующее влияние будет оказывать модификация с введением заряженных групп, если возможно образование дополнительных солевых связей; 3) замена аминогрупп Lys на аргининоподобные при амидировании или гуанидировании должна увеличивать стабильность белка; 4) при прочих равных условиях гидрофобизация молекулы белка вряд ли может заметно повысить ее стабильность. Эти закономерности находят свое подтверждение на практике, как будет показано ниже.

Главной сложностью при анализе литературных данных является трудность сопоставления результатов, полученных различными авторами на разных объектах, поскольку в литературе почти отсутствуют работы по систематическому и всестороннему изучению влияния модификации на структуру и стабильность белков. Авторы используют различные критерии стабильности, хотя единственной объективной мерой стабильности, как уже отмечалось, может служить только $\Delta G_{\text{ден}}$, а в случае не-

обратимой термоинактивации — $\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}$. Для количественной характеристики процесса термоденатурации удобно использовать константу равновесия ($K_{\text{ден}}$), связанную с $\Delta G_{\text{ден}}$:

$$\ln K_{\text{ден}} = - \frac{\Delta G_{\text{ден}}}{RT}$$

а для необратимой термоинактивации — константу скорости — $k_{\text{ин}}$, связанную с $\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}$ [3]:

$$\ln k_{\text{ин}} = \ln \frac{k_B T}{h} - \frac{\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}}{RT}$$

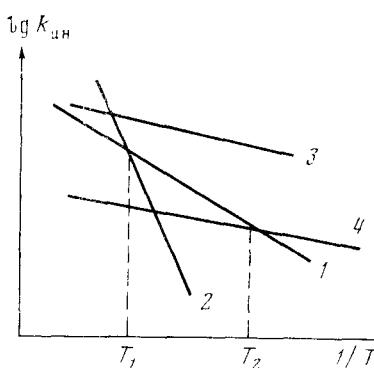
где k_B — константа Больцмана.

При сравнении термостабильности нативного и модифицированного ферментов необходимо сравнивать температурные зависимости $\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}$ ($K_{\text{ден}}$) или $\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}$ ($k_{\text{ин}}$). Эффект стабилизации (θ^t) при данной температуре определяется как отношение $k_{\text{ин}}$ нативного фермента к $k_{\text{ин}}$ модифицированного, т. е. $\theta^t = \frac{k_{\text{ин,н}}}{k_{\text{ин,мод}}} t$. Если это отношение больше единицы, то модификация стабилизирует фермент при данной температуре, если меньше — дестабилизирует. Чем больше $\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}$, тем более стабилен фермент (тем меньше $k_{\text{ин}}$). Изменение $\Delta G_{\text{ден}}^{\neq}$ после модификации фермента может быть обусловлено преобладающим изменением энタルпийного члена (ΔH^{\neq}) или энтропийного (ΔS^{\neq}) согласно уравнению:

$$\Delta G_{\text{ден}}^{\neq} = \Delta H^{\neq} - T \Delta S^{\neq}$$

Величина ΔH^{\neq} определяется из экспериментально измеряемой энергии активации процесса термоинактивации (E_a): $\Delta H^{\neq} = E_a - RT$. При изменении E_a процесса термоинактивации после модификации фермента можно наблюдать два возможных случая (рис. 7) [3, 86]:

Рис. 7. Гипотетические аррениусовские зависимости $\lg k_{\text{ин}}$ для нативного (1), модифицированного или иммобилизованного (2, 3, 4) фермента; T_1 и T_2 — изокинетические температуры для случая низкотемпературной (T_1) и высокотемпературной (T_2) стабилизации [3]



1) увеличение E_a (и ΔH^{\neq}) для модифицированного фермента. В зависимости от масштаба изменения ΔS^{\neq} аррениусовские зависимости $k_{\text{ин}}$ нативного и модифицированного ферментов пересекаются вне или в пределах изученного температурного интервала (рис. 7, кривые 1 и 2). Модифицированный фермент будет более стабилен, чем нативный, при температурах ниже изокинетической. Эффект стабилизации будет возрастать с уменьшением температуры. Это случай «низкотемпературной стабилизации» фермента;

2) уменьшение E_a (и ΔH^{\neq}) после модификации (рис. 7, кривые 1 и 3). Эффект стабилизации будет наблюдаться лишь при температурах выше изокинетической и будет тем больше, чем выше температура, при которой он рассматривается. Это случай «высокотемпературной стабилизации» [3].

Если после модификации величина ΔH^{\neq} мало изменяется, то эффект стабилизации (дестабилизации) обусловлен лишь уменьшением или

увеличением ΔS^\ddagger . Следовательно, изучение температурных зависимостей $k_{\text{ин}}$ позволяет выявить те условия, в которых модифицированный фермент стабильнее нативного и насколько (и наоборот). Знание температурных зависимостей $k_{\text{ин}}$ позволяет объективно оценивать эффекты стабилизации (или дестабилизации) фермента после его модификации. Недостаточная информативность многих литературных данных по стабильности объясняется тем, что они были получены при одной температуре.

1. Анализ экспериментальных данных по влиянию химической модификации на структуру и термостабильность белков и ферментов

В данной главе рассмотрены работы по влиянию химической модификации монофункциональными агентами. Мы не останавливаемся на результатах по модификации бифункциональными агентами, поскольку на эффекты одноточечной модификации в этом случае накладываются эффекты ковалентного межмолекулярного или межсубъединичного связывания, а также образования внутримолекулярных сшивок, что затрудняет однозначную интерпретацию результатов.

а) Влияние степени модификации на структуру и стабильность белков и ферментов

Модификация ~50% боковых остатков часто не изменяет конформацию, гидродинамические свойства и константу седиментации белка (табл. 1). По-видимому, в этом случае модифицируются наиболее доступные поверхностные группы I типа. Для ряда белков и ферментов (цитохром *c*, пероксидаза хрена, химотрипсин) при определенной степени модификации наблюдаются локальные изменения конформации, свидетельствующие об увеличении числа и энергии внутримолекулярных связей [29, 108, 109, 116]. Одновременно отмечали увеличение стабильности макромолекул: преобладающее увеличение $\Delta H_{\text{ден}}^\ddagger$ по сравнению с $\Delta S_{\text{ден}}^\ddagger$. В этом случае, по-видимому, модифицировались группы II типа. Из табл. 1 видно, что в белках и ферментах содержится очень мало групп II типа (от одной до пяти). При высоких степенях модификации, затрагивающих внутренние, маскированные в нативной конформации группы, которые участвуют в главных стабилизирующих белок взаимодействиях, конформация макромолекулы резко изменяется, приближаясь к денатурированной. Стабильность белка уменьшается за счет преобладающего уменьшения $\Delta H_{\text{ден}}^\ddagger$ над $\Delta S_{\text{ден}}^\ddagger$ (табл. 1). Следовательно, в этом случае модифицируются функциональные группы III типа.

Наиболее часто для модификации используются различные ацилирующие агенты (табл. 1). Многие авторы *a priori* считают, что модифицируются лишь NH₂-группы Lys, однако SH-группы Cys, OH-группы Тир, Сер, Тир и углеводных остатков также легко ацилируются [34, 117, 118], и изменение свойств ацилированных белков может быть обусловлено модификацией всех указанных групп, а не только аминогрупп. С учетом этого некоторые литературные данные могли бы иметь несколько иную интерпретацию. Влияние степени модификации на стабильность изучено лишь для небольшого числа белков и ферментов (табл. 1). На некоторых из этих работ следует остановиться подробнее.

Интересные результаты по влиянию степени модификации на структуру и стабильность получены для цитохрома *c* — белка с известной третичной структурой. Стабильность цитохрома *c* определяется стабильностью его конформации с закрытой структурой гемовой щели [29, 101] и обусловлена двумя связями: солевой — между Lys (13) и Glu (90) «наверху» щели и водородной — между Lys (79) и карбонилом остатка (47) на «дне» щели. Модификация Lys (13) приводит к резкому уширению щели и дестабилизации белка ($k_{\text{ин}}$ увеличивается в диапазоне температур 25—60° С). Модификация двух Lys, далеких от «дна» и «верха» ге-

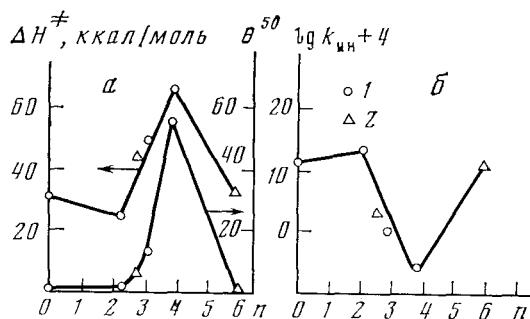


Рис. 8. Влияние числа модифицированных ϵ - NH_2 -групп Lys (n) в пероксидазе на ΔH^\ddagger необратимой термоинактивации и на эффект стабилизации ($0 = k_{inh}$, нат./ k_{inh} , мод.) при 50°C (a) и на $\lg k_{inh}$ при 50°C (b) (pH 7,0); пероксидазу модифицировали энантовым ангидридом (1) и TNBC (2) [121]

мовой щели, не влияет на конформацию и стабильность белка. Две NH_3^+ -группы Lys на фронтальной поверхности молекулы дестабилизируют ее вследствие электростатического отталкивания, поэтому изменение их заряда на противоположный стабилизирует цитохром с вследствие уменьшения отталкивания или образования новых поверхностных солевых связей. Модификация трех Lys, расположенных «наверху» щели в области стабилизирующей белок солевой связи Lys (13)—Glu (90), несколько уменьшает его стабильность вследствие конкуренции введенных карбоксидинитрофенильных остатков, имеющих отрицательный заряд, с Glu (90) за Lys (13) [29].

С увеличением степени модификации аминогрупп бактериальной α -амилазы *n*-нитрофенилацетатом до 10,5 группы при 75°C термостабильность увеличивается [110]. Температурные зависимости k_{inh} для α -амилазы с различной степенью модификации пересекаются в одной точке, при 67°C , и имеют $E_a(\Delta H^\ddagger)$ меньше, чем нативный фермент, и тем меньше, чем выше степень модификации [111]. Это означает, что при температурах ниже 67°C термостабильность ацетилированной α -амилазы ниже, чем нативной и тем меньше, чем выше степень модификации. Выше 67°C наблюдается обратная зависимость термостабильности от степени модификации [110]. Это пример «высокотемпературной стабилизации». По мнению авторов [111], уменьшение $\Delta H^\ddagger(\Delta S^\ddagger)$ процесса термоинактивации с 83 до 46 ккал/моль при модификации 11,5 остатков Lys обусловлено изменением конформации фермента в направлении частично развернутого активированного состояния.

Для пероксидазы хрена, как было показано нами, наблюдается «низкотемпературная стабилизация» после модификации остатков Lys три-нитробензолсульфокислотой (TNBC) или энантовым ангидридом [108]. Аррениусовские зависимости $\lg k_{inh}$ нативного фермента и пероксидазы с различным числом модифицированных остатков Lys так же, как и для α -амилазы, пересекаются в изокинетической точке ($\sim 75^\circ\text{C}$). Модификация двух аминогрупп почти не изменяет ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger термоинактивации фермента. Для пероксидазы с 3—4 модифицированными группами ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger намного больше, чем у нативной, и увеличиваются с ростом степени модификации (рис. 8). Стабильность таким образом модифицированной пероксидазы во много раз выше, чем нативной, при всех температурах ниже 75°C , и разница в их стабильности тем больше, чем ниже температура денатурации. Например, при 50°C модифицированный фермент в ~ 100 раз стабильнее нативного. Модификация всех шести имеющихся в пероксидазе остатков Lys уменьшает ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger термоинактивации и соответственно термостабильность фермента (рис. 8). Таким образом мы смогли выделить в пероксидазе три типа остатков Lys по их доступности и роли в стабилизации глобулы: два остатка на поверхности фермента, модификация которых не изменяет термостабильность независимо от природы модифицирующего агента (группы I типа); два остатка, моди-

фикация которых стабилизирует фермент, и эффект стабилизации зависит от природы вводимых остатков (группы II типа); два остатка, расположенные внутри глобулы, модификация которых дестабилизирует пероксидазу (группы III типа). Увеличение термостабильности после модификации 3—4 остатков Lys коррелирует с изменениями в спектрах кругового дихроизма пероксидазы, свидетельствующими об увеличении прочности связи гем — белок после модификации [108, 109]. Такая взаимосвязь понятна, ибо лимитирующей стадией процесса термоинактивации пероксидазы является диссоциация гем-белкового комплекса с последующей денатурацией и агрегацией апобелка.

При ацетилировании пероксидазы, как было показано нами [34], наряду с остатками Lys при 0—22°C модифицируются также поверхностные (до 30 групп) OH-группы Tug, Ser, Thr и углеводной части фермента, которые относятся к I типу: их модификация независимо от степени не влияет на термостабильность фермента во всем исследованном интервале температур (60—80°C) [34]. При повышенной температуре (40°C) помимо поверхностных трех NH₂- и OH-групп (группы I и II типов) ацилируются внутренние: одна OH-группа Tug и OH-группы других остатков (группы III типа). При этом стабильность пероксидазы снижается в ~8 раз при 50°C по сравнению с нативной и в 100 раз по сравнению с пероксидазой с тремя ацилированными аминогруппами. Наблюдаемый эффект дестабилизации обусловлен исключительно модификацией внутренних OH-групп фермента [34]. После удаления модификации с этих групп с помощью гидроксиламина термостабильность фермента вновь резко увеличивается (в 100 раз), т. е. становится такой же, как у пероксидазы с тремя модифицированными аминогруппами (рис. 8). Особенность важной для стабильности нативной пероксидазы является одна внутренняя OH-группа Tug.

Почти полная модификация аминогрупп α -химотрипсина янтарным ангидридом мало изменяет структуру молекулы (как видно из спектров поглощения и кругового дихроизма), а также его кинетические свойства [115]. Термостабильность химотрипсина при алкилировании 60% его аминогрупп акролеином и сукцинилировании увеличивается незначительно. При 60—95% степени модификации термостабильность фермента резко возрастает (в 20 и 100 раз соответственно), а при полном замещении аминогрупп — падает до уровня нативного фермента [116]. Авторы ввели понятие о наличии в ферменте нескольких «ключевых» групп, модификация которых резко увеличивает его термостабильность.

Таким образом, структура и стабильность белков и ферментов существенно зависят от степени модификации их функциональных групп. Для большого числа других белков зависимость термостабильности от степени модификации также проходит через максимум (табл. 1): для рибонуклеазы [102, 105, 106], глюкоамилазы [107] и гуанидированной лактатдегидрогеназы [113, 114]. И почти в каждом белке можно выявить группы I, II и III типов.

Локальная химическая модификация, так же как точечные мутации, позволяет выявить роль отдельных аминокислотных остатков в стабилизации нативной конформации белка. При трансаминировании N-концевая аминогруппа основного панкреатического ингибитора трипсина заменяется на кетонную, при этом удаляется одна солевая или водородная связь. В присутствии 6M гуанидингидрохлорида $T_{\text{дев}}$ понижается после модификации с 75 до 68°C, а при pH 1,0 ни нативный, ни модифицированный белки не денатурируют до 82°C. Следовательно, солевая связь NH₃⁺...COO⁻ стабилизирует ингибитор при нейтральных pH, но не при кислых, где группа COOH протонирована. Авторы считают, что одна солевая связь с энергией ~1 ккал/моль может играть важную роль в стабилизации нативной конформации ингибитора [122].

В панкреатическом ингибиторе проводили также три другие локальные модификации: 1) восстанавливали одну S—S-связь; 2) расщепляли пептидную связь Lys—Ala; 3) удаляли остатки Ala (16) и Arg (17) из активного центра. При этом наблюдали лишь локальные изменения кон-

формации вблизи области модификаций, а общая конформация модифицированных молекул соответствовала структуре нативного ингибитора. Стабильность же глобулярной конформации модифицированного белка заметно уменьшалась, более быстрым становился обмен внутренних амидных протонов белка с растворителем [123].

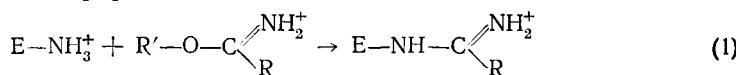
После восстановления связи S(14)–S(38) (соединение (I)) полученные SH-группы ингибитора модифицировали заряженными остатками: иодацетамидом (ввели нейтральную группу (соединение (II)); иодуксусной кислотой (ввели отрицательно заряженную группу (соединение (III)); этиленимином (ввели положительно заряженную группу (соединение (IV)). Пространственные структуры восстановленного (I) и трех модифицированных белков оказались почти идентичны, однако $T_{\text{дew}}$ изменились: для (I) и (II) $T_{\text{дew}} = 76^\circ\text{C}$, для (III) $T_{\text{дew}} = 79^\circ\text{C}$, для (IV) $T_{\text{дew}} = 70^\circ\text{C}$. Таким образом, максимальная стабильность восстановленного ингибитора достигалась при модификации SH-групп отрицательно заряженными группами, поскольку расщепляемая S–S-связь локализована в положительно заряженном кластере из остатков Lys и Arg, и введенные группы образуют с ними новые ионные пары, стабилизирующие белок. В то же время введение положительно заряженной группы по той же причине дестабилизировало ингибитор [124].

Локальная химическая модификация наглядно демонстрирует тот факт, что модификация групп, участвующих в стабилизирующих белок взаимодействиях, уменьшает его стабильность. Повышение стабильности белка после модификации наблюдается лишь при образовании новых дополнительных связей, в частности солевых.

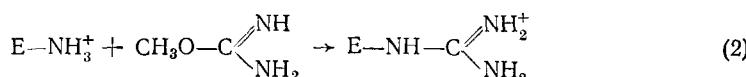
б) Влияние природы вводимых при модификации остатков

Природа модифицирующего агента оказывает заметное влияние на стабильность макромолекулы прежде всего при модификации групп II типа. Возможные случаи модификации можно разделить на несколько групп: 1) модификация с сохранением заряда модифицируемых групп; 2) модификация незаряженных остатков незаряженными агентами; 3) модификация с изменением заряда модифицируемых групп; 4) модификация с изменением гидрофобности вводимых остатков.

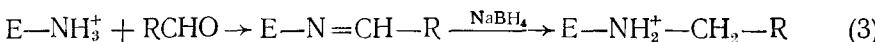
Модификация с сохранением заряда модифицируемых групп. Для модификации остатков Lys с сохранением их положительного заряда используются главным образом три реакции модификации. Аминирования с помощью имидоэфиров:



Гуанидирование *o*-метилизомочевиной:



Модификация альдегидами с последующим восстановлением образовавшихся оснований Шиффа:



В двух первых случаях в белок вводятся аргининоподобные группы, и р_K остатков Lys после модификации увеличивается с 10,5 до 12,5 [125]. В третьем случае первичная аминогруппа заменяется на вторичную, р_K которой несколько снижается.

Напомним, что повышенное содержание остатков Arg по сравнению с остатками Lys характерно для многих т-ферментов (гл. II). Например, для менее стабильных протеаз: свиного химотрипсина и трипсина соотношение Arg:Lys составляет 4:14 и 2:14 соответственно. А для более стабильной — эластазы соотношение Arg:Lys = 12:3 [126]. Поэтому логично ожидать повышения стабильности белков и ферментов после гуанидирования остатков Lys. Действительно, после модификации остат-

ков Lys в семи белках из шести различных классов *o*-метилизомочевиной стабильность их увеличивается (возрастает ΔG процесса внутреннего и внешнего тритиевого обмена). Это обусловлено уменьшением конформационной подвижности локальных сегментов белковой структуры [126].

Гуанидирование 15 остатков Lys в лактатдегидрогеназе не приводит к заметным изменениям конформации белка, но значительно увеличивает термостабильность фермента, что, по мнению авторов, обусловлено образованием солевых связей $\text{COO}^- \dots \text{NH}_2=\text{C}(\text{NH}_2)\text{E}$ как внутри субъединиц, так и между ними [113]. Несколько меньший эффект стабилизации наблюдали при ацетамидинировании того же фермента [127]. Модификация же лактатдегидрогеназы формальдегидом с последующим восстановлением азометиновых связей уменьшала ее термостабильность и даже вызывала частичную диссоциацию тетрамера [128]. Таким образом, на примере лактатдегидрогеназы выявляется важная роль солевых связей в стабилизации этого белка: чем выше заряд на модифицированных остатках Lys, тем сильнее электростатические взаимодействия, стабилизирующие макромолекулу.

Ацетамидинирование ряда других ферментов: термофильной глутаминсингетазы [129] и пероксидазы [34] также увеличивало их термостабильность, при этом наблюдались лишь локальные изменения конформации белка. Увеличение стабильности трипсина после ацетамидинирования Lys объяснялось, в частности, и уменьшением его автолиза [130].

В то же время избыточное гуанидирование белков путем превращения их COOH-групп в аминогруппы с последующей модификацией *o*-метилизомочевиной должно, по-видимому, приводить к их дестабилизации вследствие электростатического отталкивания большого числа положительно заряженных групп, как было показано для химотрипсиногена [131].

Таким образом амидинирование и гуанидирование белков, полностью сохраняющее их физико-химические свойства, может быть простым и удобным общим методом их стабилизации. Механизм стабилизации состоит, по-видимому, в том, что аргининоподобные остатки имеют большую, чем Lys гидрофильность, что уменьшает возможность нахождения их внутри гидрофобного ядра молекулы по сравнению с Lys. Аргининоподобные остатки увеличивают жесткость белковой глобулы, и, имея большее, чем Lys значение pK , образуют более прочные солевые связи в белке [126].

Менее однозначные результаты получены при изучении стабильности белков, в которых остатки Lys подвергали восстановительному алкилированию (реакция (3)).

Так, модификация аминогрупп пропионовым или глутаровым альдегидом уменьшала термостабильность химотрипсина при 60°C в 1,5—3 раза в зависимости от pH, а модификация акролеином увеличивала его термостабильность в 100 раз в тех же условиях [116, 132]. Модификация глутаровым альдегидом уменьшала термостабильность трипсина [133], но увеличивала термостабильность гликогенфосфорилазы b [134] и β -глюкозидазы [135]. К сожалению, данные по стабильности белков, модифицированных глутаровым альдегидом, трудно интерпретировать из-за сложности и неоднозначности процессов, происходящих при модификации [88].

В общем случае нужно отметить, что при алкилировании аминогрупп белков сохраняется их положительный заряд, но вводятся гидрофобные остатки, нахождение которых на поверхности макромолекулы часто невыгодно. После модификации уменьшается также и способность аминогруппы образовывать солевые связи. По-видимому, это и есть главные причины уменьшения термостабильности большинства белков и ферментов после восстановительного алкилирования.

Модификация незаряженных остатков незаряженными агентами. В данном случае речь идет прежде всего о модификации полярных OH-

групп остатков Ser, Thr, Туг, остатков ароматических аминокислот и углеводных групп в гликопротеидах. Основные используемые для этой цели реакции: 1) ацилирование ангидридами монокарбоновых кислот; 2) окисление углеводных остатков; 3) нитрование или иодирование остатков Туг или Тгр.

Ацилирование до 30 поверхностных OH-групп ангидридами монокарбоновых кислот в пероксидазе хрена не влияет на ее термостабильность [34].

Многие растительные белки и ферменты содержат ковалентно связанные углеводные остатки, образующие полярную «шубу» для макромолекул, которая защищает их от протеолиза и стабилизирует их третичную структуру [136]. Поэтому, как правило, окисление углеводных остатков периодатом натрия или удаление их с помощью ферментов уменьшает термостабильность гликопротеидов: инвертазы [136], целлюлазы из термофильных грибов [77], т-глюкозидазы из *Micog tiehei* УН-10 [137], каталазы [138]. Эффект дестабилизации, как и следовало ожидать, зависит от степени модификации углеводных остатков. Например, дегликозилирование 20% углеводных остатков в каталазе *A. niger* не влияет на стабильность фермента, а после окисления 40% углеводных остатков $T_{1/2}$ ¹ за 10 мин уменьшается с 75 до 72°C [138]. Эффект дестабилизации для глюкозооксидазы, 50% углеводных остатков которой окислены периодатом, обнаруживается только в присутствии денатурирующих агентов: додецилсульфата натрия или мочевины. В этом случае ΔH^\ddagger фермента уменьшается в 1,3 раза [139, 140]. В некоторых случаях, как, например, для пероксидазы хрена, окисление углеводных остатков не изменяет термостабильности фермента [141].

С другой стороны, ковалентное присоединение к белкам и ферментам полисахаридов всегда, как правило, увеличивает их термо- и рН-стабильность, устойчивость к протеолизу [2, 3]. Причина универсального стабилизирующего действия ковалентно связанных с белком полиолов становится ясной при изучении влияния добавок сахарозы и других полиолов на стабильность белков в растворе. Установлено, что растворы сахаров — менее благоприятный растворитель, чем вода, для ароматических и алифатических аминокислот [142]. Сахара увеличивают поверхностное натяжение воды и повышают ее структурированность вблизи поверхностных аминокислотных остатков белка тем больше, чем больше экваториальных OH-групп в их молекуле. Это делает термодинамически менее выгодной развернутую (денатурированную) конформацию макромолекулы и сдвигает равновесие между нативным и денатурированным белком в сторону нативного, что приводит к увеличению $\Delta G_{\text{ден}}$ [143]. Таким образом, стабилизация белков в растворе сахаров или после их ковалентного присоединения обусловлена усилением внутриглобулярных гидрофобных взаимодействий. Стабилизирующее действие добавок глицерина реализуется по иному механизму: глицерин понижает поверхностное натяжение воды и взаимодействует главным образом с полярными группами на поверхности белковой молекулы [143]. Увеличение концентрации глицерина в растворе белка приводит к уменьшению $\Delta H_{\text{ден}}^\ddagger$ (и $\Delta S_{\text{ден}}^\ddagger$) цитохрома P-450 [144, 145].

Нитрование термолизина тетранитрометаном уменьшает в два раза его активность и термостабильность, а процент содержания α -спиралей не изменяется. Показано, что в ферменте модифицируются остатки Туг и Тгр, которые, вероятно, находятся в гидрофобной области молекулы, поэтому модификация их с введением нитрогруппы дестабилизирует фермент [146].

Модификация с изменением заряда модифицируемых групп. Изменение заряда (снятие или замена на противоположный) функциональных групп белка происходит при модификации заряженных остатков Lys, Arg, Glu, Asp и при ацилировании ангидридами дикарбоновых кислот

¹ $T_{1/2}$ — температура, при которой инактивируется 50% фермента за определенный выбранный промежуток времени.

поларных остатков Ser, Thr, Thr. Модификация, изменяющая знак модифицируемой группы, дает возможность выявить влияние как общего заряда молекулы, так и локального электростатического взаимодействия на структуру и стабильность белка. Заряженные и поларные остатки находятся, как правило, на поверхности глобулы белка и могут участвовать в локальных взаимодействиях, стабилизирующих или дестабилизирующих нативную конформацию молекулы. Поскольку солевые связи как внутри глобулы, так и вблизи поверхности макромолекулы играют существенную роль в ее стабилизации, то их образование или разрушение в результате модификации должно сильно отразиться на стабильности. Большинство работ по влиянию модификации на стабильность белков и ферментов посвящено ацилированию их аминогрупп, положительный заряд которых снимается или заменяется на противоположный. Такая модификация может затрагивать также SH- и OH-группы [118].

Одними из первых были работы по изучению стабильности ацилированного трипсина [147—149]. Эти данные, правда, нелегко интерпретировать однозначно, так как блокировка аминогрупп Lys в трипсине кроме всего прочего уменьшает автолиз, за счет чего увеличивается стабильность фермента [147]. Например, ацетилтрипсин более стабилен, чем нативный, в щелочной среде при 25°С, но менее стабилен в кислой. Термостабильность его также ниже, чем нативного фермента. Модификация трипсина различными ангидридами моно- и дикарбоновых кислот показала, что при одинаковой степени модификации аминогрупп при 100°С и pH 5,5 наименее стабильны производные монокарбоновых кислот. Стабильность увеличивается в ряду: ацетил-, пропионил-, бутирил-, диэтилацетил-, фталил- < β -сульфопропионил- < итаконил- < нативный < < сукцинил- < цитраконилтрипсин [148, 150]. Сукцинилтрипсин стабильнее нативного также и при pH > 5. По мнению авторов, электростатическое отталкивание введенных одноименно заряженных COO-групп — фактор, стабилизирующий фермент. В то же время ацилирование оказывает малое влияние на денатурацию трипсина мочевиной [149]. Таким образом, снятие заряда с аминогрупп уменьшает термостабильность трипсина, а замена на отрицательный заряд — несколько увеличивает.

Ацетилирование щелочной фосфатазы повышает ее термостабильность при 30°С и pH от 4,0 до 11,0. Авторы считают, что защитный эффект ацетилирования при щелочных pH — общий эффект для многих белков, который удивителен тем, что ацетилирование сильно увеличивает и без того большой при щелочных pH общий отрицательный заряд молекулы фермента [151]. Ацилирование увеличивает стабильность термолизина [152], но уменьшает термостабильность субтилизина и ферредоксина [153, 154].

Инвертазу из пекарских дрожжей модифицировали цитраконовым ангидридом, ацетимидаэфиром и карбодиимидом в присутствии этилендиамина. Замена знака в группах NH₃⁺ и COO- на противоположный существенно дестабилизировала фермент (65°С), а модификация с сохранением положительного заряда на аминогруппах — не влияла на стабильность. Авторы делают вывод, что нативная структура инвертазы стабилизируется солевыми связями NH₃⁺ ... COO-, разрушение которых при модификации либо амино-, либо карбоксильных групп дестабилизирует фермент [155].

При одинаковой степени модификации NH₂-групп α -химотрипсина наибольший стабилизирующий эффект оказывает модификация фермента акролеином (сохраняется положительный заряд) [116, 153]. Меньшая стабилизация наблюдается при ацилировании уксусным, янтарным, цитраконовым ангидридами, возможно, из-за того, что, в отличие от первой модификации, помимо NH₂-групп в ферменте были ацилированы и другие функциональные группы, модификация которых могла дестабилизировать фермент.

Термостабильность пепсина увеличивается при 30° С в 10—20 раз (в зависимости от избытка используемого нуклеофилла) при модификации его COOH-групп с помощью карбодиимида и метилового эфира глицина. Стабилизация фермента обусловлена уменьшением общего отрицательного заряда после модификации, поскольку нативный пепсин быстро денатурирует при pH 7,0 вследствие электростатического отталкивания большого числа отрицательно заряженных COOH-групп [156].

Снятие заряда в результате модификации с остатка лизина (13), образующего солевую связь, которая является главной для поддержания открытой структуры щели гема в цитохроме *c*, полностью дестабилизирует белок. В то же время модификация со снятием заряда с остатков Lys, дестабилизирующих нативный белок, делает гемовую щель более закрытой [29].

При каждой степени модификации аминогрупп лактатдегидрогеназы из сердца свиньи нейтрализация положительного заряда после модификации их метил-4-гидрокси-3-нитробензимидатом (аминофенолятная форма) (табл. 1), так же как и ацетилирование, сильно дестабилизирует фермент. В то же время аминофенольная форма модифицированных аминогрупп (сохраняется положительный заряд) увеличивает стабильность фермента, так же как его ацетамидинирование и гуанидирование [114].

Снятие положительного заряда практически со всех аминогрупп малатдегидрогеназы после ацетилирования или модификации метил-4-гидрокси-3-нитробензимидатом на 16—17 и 7° соответственно уменьшает $T_{1/2}$ (за 20 мин) фермента. Уменьшение стабильности, по-видимому, обусловлено нарушением межсубъединичных взаимодействий, в которых участвуют остатки Lys [157].

Влияние заряда на аминогруппе на термостабильность пероксидазы из хрена определено из сравнения стабильности фермента, четыре аминогруппы которого были модифицированы ацетамидатом, масляным, янтарным и малеиновым ангидридами [34, 158]. Ацетамидинирование, сохраняя положительный заряд на аминогруппе, добавляет небольшой по объему метильный остаток и удлиняет «ножку» у положительного заряда примерно на 1,5 Å. После модификации масляным ангидридом положительный заряд аминогруппы исчезает, а при сукцинилировании и маленировании вводится отрицательный заряд. Все три типа введенных остатков имеют сходное строение. После ацетамидинирования ΔH^* процесса термоинактивации пероксидазы и, следовательно, термостабильность при температурах ниже 75° С несколько увеличивается; в 2,5 раза увеличивается после модификации масляным ангидридом и в 3 раза — после модификации янтарным и малеиновым ангидридами. Это объясняется уменьшением не общего, а локального положительного заряда макромолекулы. Возможно, две аминогруппы пероксидазы находятся в гидрофобной полости или в положительно заряженном кластере групп и дестабилизируют нативную структуру фермента. Модификация их со снятием положительного заряда или введением отрицательного способствует образованию в молекуле дополнительных солевых связей, увеличивающих прочность связи гем — белок, т. е. термостабильность фермента. Даже незначительное удлинение «ножки» у положительного заряда аминогруппы после ацетамидинирования несколько увеличивает термостабильность пероксидазы. В то же время появление отрицательного заряда у большого числа поверхностных OH-групп пероксидазы при сукцинилировании не влияет на термостабильность фермента [34].

Таким образом, данные по модификации функциональных групп с изменением заряда показывают различную роль заряженных аминокислотных остатков в стабилизации нативной структуры ферментов. В трипсине, субтилизине, инвертазе, лактат- и малатдегидрогеназе аминогруппы остатков Lys участвуют в образовании внутримолекулярных солевых связей или в поддержании пространственной структуры нативного фермента. Снятие заряда с этих групп дестабилизирует ферменты. Наоборот, в ряде ферментов: пероксидазе, цитохроме *c*, химотрипсине,

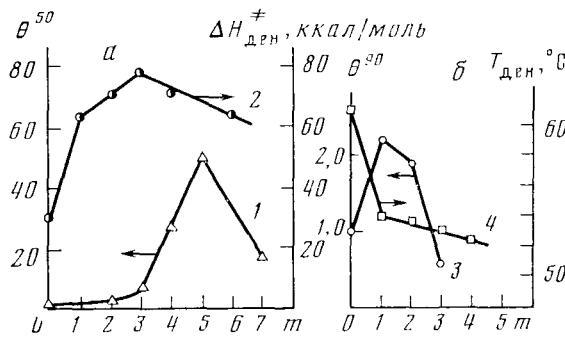


Рис. 9. Зависимость стабильности ферментов от гидрофобности вводимых при модификации остатков, n — число С-атомов в остатке для модифицированных производных типа: $\text{ENHC}_n\text{H}_{2n+1}$ для фосфорилазы b (1a) [159], $\text{E}(\text{NHCOC}_n\text{H}_{2n+1})_4$ для пероксидазы хрена (2a) [86, 108], $\text{E}(\text{NHCOC}_{n+8}\cdot\text{H}_{2n+17}\text{O}_{5-n})_7$ для термолизина (3б) [152] и $\text{E}(\text{NHCOC}_n\text{H}_{2n+1})_{11}$ для рибонуклеазы (4б) [162]; в качестве меры стабильности использовали эффект стабилизации ($\theta = k_{\text{ин. пат.}}/k_{\text{ин. мод.}}$) при 50°C (1a) и 90°C (3б), энзимальную процесса денатурации ($\Delta H_{\text{деп}}^{\neq}$) (2a) и среднюю температуру денатурации ($T_{\text{деп}}$) (4б)

пепсине и др. выявлены амино- или карбоксильные группы, дестабилизирующие нативный белок вследствие неблагоприятных электростатических взаимодействий. Их модификация с изменением заряда позволяет достигнуть высоких эффектов стабилизации (до 100 раз для пероксидазы и химотрипсина).

Влияние гидрофобности вводимых остатков. При одной и той же степени модификации и при использовании модифицирующих агентов со сходной химической структурой в ряде работ проанализировано влияние гидрофобности вводимых остатков на стабильность белков и ферментов. Для выяснения этого влияния в «чистом» виде более корректно сравнивать свойства не нативного и модифицированных ферментов, а членов ряда модифицированных ферментов между собой, которые отличаются друг от друга лишь длиной включенных в них углеводородных остатков. Хотя число работ, посвященных этому вопросу, невелико, они позволяют выявить общую зависимость термостабильности ферментов от гидрофобности введенных групп, имеющую вид кривой с максимумом (рис. 9). Такие зависимости были получены для фосфорилазы b [159], α -амилазы [110], пероксидазы хрена [86, 108] и термолизина [152], доступные аминогруппы которых были алкилированы или ацилированы рядом агентов с различной гидрофобностью. Во всех случаях наблюдалось увеличение термостабильности ферментов после их модификации (производные типа $\text{E}(\text{NHR})_n$ или $\text{E}(\text{NHCOR})_n$, где n — постоянно для каждого фермента, а R — варьируется).

В фосфорилазе $b \sim 10\%$ остатков Lys модифицировали альдегидами монокарбоновых кислот (от C_2 до C_7), восстанавливали азометиновые связи с помощью NaBH_4 (при этом сохранялся положительный заряд на аминогруппе). Термостабильность при 0 и 50°C увеличивалась с ростом длины углеводородного остатка R в ряду производных $\text{E}(\text{NHR})_n$ от C_2 до C_5 , а далее уменьшалась (рис. 9). При использовании полярного — глицеринового альдегида стабилизирующий эффект почти не наблюдался [159].

Для бактериальной α -амилазы, аминогруппы которой были модифицированы n -нитрофениловыми эфирами монокарбоновых кислот (C_1 , C_7 , C_{15}), наибольший эффект стабилизации наблюдался при введении группы CH_3 , а для C_7 - и C_{15} -производных стабильность уменьшалась с ростом длины углеводородного остатка [110]. Поскольку данные для других производных в этом ряду отсутствуют, то не известно, какова должна быть оптимальная для стабилизации длина углеводородного остатка. Возможно, что она находится в диапазоне от C_1 до C_7 .

В ряду препаратов ацилированной ангидридами монокарбоновых кислот пероксидазы (производные $E(NHCOR)_4$, где $R=C_nH_{2n+1}$), термостабильность ($\Delta H_{\text{ден}}^{\ddagger}$) увеличивается с ростом вводимого углеводородного остатка R от C_1 до C_3 , а при дальнейшем возрастании R от C_3 до C_6 $\Delta H_{\text{ден}}^{\ddagger}$ уменьшается (рис. 9). Каждый последующий член ряда отличается от предыдущего лишь добавлением четырех CH_2 -групп. Инкремент $\Delta(\Delta H_{\text{ден}}^{\ddagger})$ на одну метиленовую группу составляет 1,5–2 ккал/моль [86, 108].

Гидрофобность вводимых остатков можно варьировать не только изменением их размера, но и путем замены гидрофильных групп в R на гидрофобные. Так, например, семь доступных аминогрупп термолизина модифицировали рядом производных нормальных карбоксильных кислот (производные $E(NHCOR)_7$, где $R=C_{n+8}H_{2n+17}O_{5-n}$). Увеличение гидрофобности в этом ряду достигалось за счет замены эфирной группы на метиленовую. Метиленовая группа увеличивает гидрофобность аминокислотного бокового остатка \sim на 0,7 ккал/моль, а эфирная группа уменьшает ее на $\sim 0,7$ ккал/моль. Таким образом, замещение одной эфирной группы на метиленовую увеличивает гидрофобность остатка на $\sim 1,4$ ккал/моль. Гидрофобность остатков увеличивается при изменении n от 1 до 5. При $n=4$ и 5 получаются нерастворимые и малоактивные производные, которые далее не исследовались. Термостабильность других производных при $n=1$ –3 при 80 и 90°С изменялась как показано на рис. 9, т. е. проходила через максимум при $n=1$ [152].

Несомненно, что гидрофильность поверхности ферментов важна для их растворимости и проявления катализической активности в водных растворах. Во всех рассмотренных случаях наибольшая стабилизация белков достигается при определенной и сравнительно небольшой длине углеводородного остатка R : для пероксидазы — при C_3 , для фосфорилазы — при C_5 (рис. 9). По-видимому, взаимодействие введенных углеводородных остатков оптимальной для каждого фермента длины с его близлежащими гидрофобными группами приводит к наибольшей стабилизации третичной структуры белка. Когда же размеры R начинают превышать размеры гидрофобной полости в молекуле фермента, то частичное экспонирование остатка R в раствор, термодинамически невыгодное, приводит к уменьшению эффекта стабилизации ($\Delta H_{\text{ден}}^{\ddagger}$ уменьшается), а в некоторых случаях — к дестабилизации. Аналогичные эффекты стабилизации различных белков отмечались при солюбилизации ими небольших количеств углеводородов [160, 161]. Зависимость ΔH тепловой денатурации белков в присутствии углеводородов также проходит через максимум, и инкремент $\Delta(\Delta H)$ на одну CH_2 -группу солюбилизированного углеводорода составляет ~ 2 ккал/моль.

Зависимость термостабильности от гидрофобности вводимых остатков проходит через максимум, т. е. введение гидрофобных остатков определенных размеров в белок может стабилизировать его только в том случае, когда сама по себе модификация не уменьшает стабильность фермента (или увеличивает ее). В тех же случаях, когда модификация дестабилизирует фермент, увеличение длины гидрофобных остатков приводит к прогрессирующему, хотя и не очень значительному, уменьшению стабильности макромолекулы. Например, для рибонуклеазы, модифицированной различными сукцинимидами (производные $E(NHCOR)_{11}$, где $R=C_nH_{2n+1}$), термостабильность резко уменьшается при использовании производного C_1 . Рост остатка R от C_1 до C_1 приводит лишь к незначительному дальнейшему уменьшению термостабильности фермента (рис. 9). По мнению авторов, дестабилизация фермента после модификации сходна с денатурацией рибонуклеазы спиртами [162].

Введение очень объемных гидрофобных остатков в любом случае, независимо от того, стабилизирует или дестабилизирует фермент сама по себе данная модификация, будет сильно уменьшать его стабильность. Несмотря на то что ацетамидинирование лактатдегидрогеназы стабилизирует фермент [127], при использовании очень объемного гидрофобного

агента: метил- ϵ -(N-2,4-динитрофенил)-аминокарбонимидата термостабильность модифицированного фермента становится меньше, чем у нативного. Это обусловлено сильной гидрофобизацией глобулы фермента и нарушением благоприятных для стабильности связей остатков Lys с другими вследствие введения больших и объемных заместителей, несмотря на сохранение у них положительного заряда [163]. Таким образом, введение больших по размерам гидрофобных остатков может свести на нет стабилизирующую действие модификации.

Не всегда наблюдаемое изменение термостабильности ферментов после модификации связано с влиянием гидрофобности вводимых остатков. Например, ацилирование α -амилазы различными N-гидроксисукцинидами и 1-гидроксибензтиазолом увеличивает термостабильность фермента при 60°C в ряду: нативная α -амилаза ($E-NH_2$) \leqslant диметилкарбомоилированная ($E-NHCON(CH_3)_2$), этоксиформилированная ($E-NHCOOC_2H_5$) $<$ формилированная ($E-NHCHO$) $<$ ацетилированная ($E-NHCOC_2H_5$) $<$ диметилпропаноилированная ($E-NHCOC(CH_3)_2$). Увеличение термостабильности в этом ряду коррелирует не с изменением гидрофобности вводимого остатка, а с ослаблением донорности амидного азота [164].

В заключение следует отметить, что «чистый» вклад гидрофобности вводимых остатков в наблюдаемый эффект стабилизации — дестабилизации модифицированных ферментов весьма невелик по сравнению с эффектами локального или общего изменения заряда молекулы. Например, для пероксидазы ацетилирование четырех аминогрупп увеличивает ΔH^\ddagger термоинактивации в два раза (от 30 до 65 ккал/моль), а дополнительный вклад в стабильность (в увеличение ΔH^\ddagger) введенных четырех CH_2 -групп не превышает 6—8 ккал/моль.

2. Физико-химические закономерности изменения стабильности ферментов после их химической модификации и иммобилизации

Данные предыдущего параграфа ясно показывают, что химическая модификация функциональных групп ферментов, не входящих непосредственно в активный центр, монофункциональными агентами может оказывать сильное влияние на их структуру и стабильность. Рассмотренные работы подтверждают гипотезу о существовании в белках и ферментах трех типов функциональных групп, модификация которых по-разному влияет на их структуру и стабильность.

Изменение термостабильности ферментов в результате их химической модификации является следствием локальных или общих изменений в пространственной структуре белка, в конформационной подвижности отдельных фрагментов полипептидной цепи. Несмотря на значительное изменение стабильности белка, вариации в его структуре часто могут быть столь невелики, что не всегда обнаруживаются из анализа спектров поглощения, флуоресценции или кругового дихроизма [127, 129, 165, 166]. Стабильность белков поэтому является наиболее чувствительным тестом на любое изменение их структуры [7, 86].

Взаимосвязь между изменениями структуры и термостабильности после химической модификации, вклад групп белка различного типа четко прослежен лишь для нескольких ферментов, например для пероксидазы из хрена [34, 86, 108, 109]. Модификация групп I типа (до 30 поверхностных OH-групп и двух ϵ -NH₂-групп Lys) не влияет на структуру и стабильность пероксидазы, независимо от степени модификации. Модификация двух других ϵ -NH₂-групп Lys (группы II типа) со снятием положительного заряда уменьшает конформационную подвижность белка в гемсвязывающей области, что отражается в КД-спектрах пероксидазы. Следствием этого является заметное увеличение стабильности фермента. Наконец, модификация внутренних OH- и ϵ -NH₂-групп (III типа) приводит к уменьшению интенсивности полос гема и ароматических аминокис-

лот в КД-спектрах, что свидетельствует об ослаблении связи гем-белок и приближении структуры фермента к термоденатурированной. Термостабильность такого фермента ниже, чем нативного [108].

Анализ литературных данных показывает, что, как и в случае белков и ферментов из термофильных источников (гл. II), главной причиной повышения стабильности модифицированных ферментов является образование дополнительных связей (солевых, водородных) внутри и на поверхности молекулы, усиление гидрофобных взаимодействий в белке, а также упрочение связи белка с простетическими группами, ионами металлов и т. д.

Анализ температурных зависимостей $k_{ин}$ нативных и модифицированных (в том числе иммобилизованных) ферментов показывает, что эффект стабилизации изменяется в зависимости от температуры. Термин «стабилизация» имеет смысл только для конкретной температурной области. Вряд ли возможна «абсолютная стабилизация», т. е. случай, когда отношение $k_{ин}$ нативного и иммобилизованного фермента одинаково в достаточно большом интервале температур. Это возможно только тогда, когда $\Delta H_{ден}^{\neq}$ нативного и модифицированного фермента одинаковы, а $\Delta S_{ден}^{\neq}$ модифицированного фермента меньше, чем нативного, на ощущимую величину. Однако во всех известных в литературе случаях $\Delta H_{ден}$ и $\Delta S_{ден}$ ($\Delta H_{ден}^{\neq}$ и $\Delta S_{ден}^{\neq}$) процесса термоденатурации ферментов изменяются симбатно после их химической модификации или иммобилизации. Это объясняется, по-видимому, существованием для белковых систем в растворе эффекта компенсации, который определяется скорее всего свойствами воды [167]. Этот эффект состоит в том, что несмотря на большие изменения $\Delta H_{ден}$ (или $\Delta H_{ден}^{\neq}$) величины $\Delta G_{ден}$ (или $\Delta G_{ден}^{\neq}$) после химической модификации или иммобилизации ферментов в большинстве случаев мало изменяются из-за компенсирующего действия энтропийного члена $T \cdot \Delta S_{ден}$. Увеличение $\Delta G_{ден}$ происходит либо за счет большего роста $\Delta H_{ден}$, чем $\Delta S_{ден}$, либо за счет более сильного уменьшения $\Delta S_{ден}$ чем $\Delta H_{ден}$.

На рис. 10 приведена экспериментальная компенсационная зависимость между $\Delta H_{ден}^{\neq}$ и $\Delta S_{ден}^{\neq}$ термоинактивации для ряда нативных и модифицированных ферментов. Связь между $\Delta H_{ден}^{\neq}$ и $\Delta S_{ден}^{\neq}$ указывает существующие пределы варьирования этих параметров при изменении природы модифицирующего агента (или носителя для иммобилизованных ферментов) или при различных степенях модификации. Все точки на компенсационной зависимости, лежащие левее точек, соответствующих нативным ферментам, соответствуют препаратам модифицированного или иммобилизованного фермента, для которых $\Delta H_{ден}^{\neq}$ и $\Delta S_{ден}^{\neq}$ меньше, чем у нативного. Такие препараты стабильнее нативных при температурах выше изокинетической («высокотемпературная стабилизация»). Все препараты, для которых точки лежат справа от точки, соответствующей нативному ферменту, обладают большими $\Delta H_{ден}^{\neq}$ и $\Delta S_{ден}^{\neq}$, чем нативный. Эти соединения стабильнее нативного фермента при температурах ниже изокинетической («низкотемпературная стабилизация»). Если для различных производных фермента изокинетические температуры близки, то модифицированные ферменты будут тем стабильнее при температурах ниже изокинетической, чем больше для них $\Delta H_{ден}^{\neq}$. Так как нативный и модифицированный (иммобилизованный) ферменты имеют различные температурные зависимости $k_{ин}$ ($K_{ден}$), то в общем случае всегда существует температурная область, где стабильнее нативный фермент, и область, где стабильнее модифицированный или иммобилизованный фермент (см. рис. 7). При приближении к изокинетической точке различие в стабильности нативного и модифицированного ферментов уменьшается, а вдали от нее — возрастает.

Работы по сравнению кинетических и термодинамических параметров термоинактивации нативных и модифицированных белков и ферментов показывают, что во многих случаях эти параметры меняются парал-

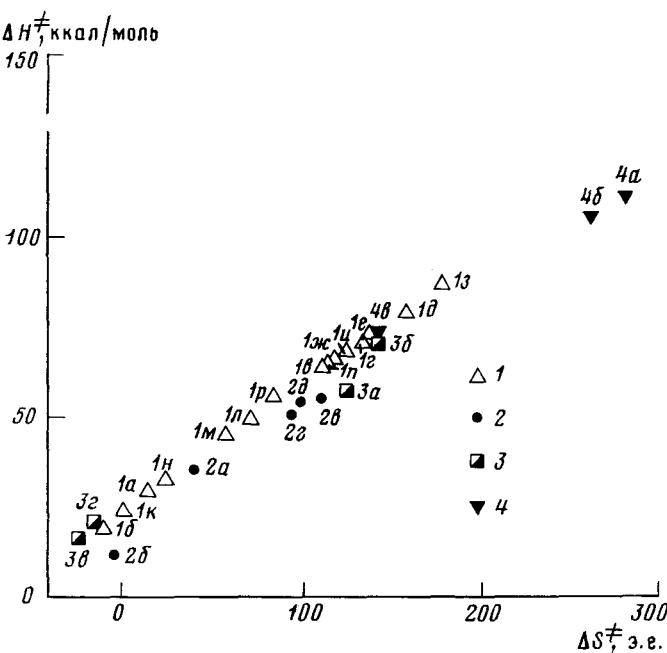


Рис. 10. Компенсационная зависимость между ΔH^{\ddagger} и ΔS^{\ddagger} термоинактивации растворимых (нативных и модифицированных) и иммобилизованных ферментов; 1 — пероксидаза хрена: нативная (a), иммобилизованная в поликариламидном геле (b), модифицированная (четыре NH₂-группы) уксусным (c), пропионовым (d), масляным (e), валериановым (f), энантовым (g), янтарным (h), малеиновым (i) ангидридами, модифицированная энантовым ангидридом (k — две NH₂-группы, l — три NH₂-группы); конъюгаты пероксидазы с альбумином (n — фракция I, p — фракция II); 2 — люцифераза светляков: нативная (a), иммобилизованная на ультрагеле (b), ультратредексе (c), целлофане (d), сефарозе (e), активированных бромцианом; 3 — α -химотрипсин: нативный (a), растворимые конъюгаты с декстраном (b), с альгинатом натрия (c), иммобилизованный на КМ-целлюлозе (d); 4 — β -галактозидаза: нативная (a), модифицированная красителем (b) и затем сорбированная на ДЭАЭ-сепадексе (g) по данным [39, 86, 108, 158, 168, 169, 172, 175, 178]

лько [20, 39, 168]. Увеличение или уменьшение $\Delta H_{\text{ден}}^{\ddagger}$ и $\Delta S_{\text{ден}}^{\ddagger}$ термоинактивации ферментов после их химической модификации или иммобилизации может объясняться изменением их термодинамической стабильности и, следовательно, изменением относительного вклада различных факторов, которые определяют термодинамическую стабильность белковой глобулы фермента в растворе.

Стабилизация ферментов в растворе после химической модификации их функциональных групп обусловлена, как правило, увеличением $\Delta H_{\text{ден}}^{\ddagger}$ и $\Delta S_{\text{ден}}^{\ddagger}$ термоинактивации. Это «низкотемпературная стабилизация» ферментов при температурах ниже изокинетической (рис. 7, кривые 1 и 2), которая находится, как правило, выше 50°С. Химическая модификация ферментов, приводящая к увеличению внутримолекулярных взаимодействий в глобуле, увеличивает $\Delta G_{\text{ден}}$ модифицированного фермента по сравнению с нативным, и тогда $\Delta G_{\text{ден, мод}} - \Delta G_{\text{ден, нат}} > 0$. Образование дополнительных внутримолекулярных связей при модификации увеличивает $\Delta H_{\text{ден}}$, а введение дополнительных остатков — $\Delta S_{\text{ден}}$ (главным образом за счет увеличения конформационной энтропии). Чем больше рост $\Delta H_{\text{ден}}$ преобладает над ростом $\Delta S_{\text{ден}}$, т. е. чем больше образуется дополнительных связей при введении данного числа остатков, тем выше лежит изокинетическая температура для нативного и модифицированного ферментов, и тем шире интервал экспериментальных температур, где $\Delta G_{\text{ден, мод}} > \Delta G_{\text{ден, нат}}$, т. е. модифицированный фермент стабильнее нативного. Аналогично изменяются в этом случае и активационные параметры термоденатурации фермента после химической модификации. Если в результате химической модификации происходит усиление вну-

тромолекулярных взаимодействий в глобуле фермента за счет образования дополнительных связей, то $\Delta H_{\text{ден}}^{\neq}$ и $\Delta S_{\text{ден}}^{\neq}$ модифицированного фермента больше, чем нативного. В этом случае наблюдается «низкотемпературная стабилизация» (рис. 7, кривые 1 и 2). При увеличении температуры инактивации как в нативном, так и в модифицированном ферментах происходит ослабление внутримолекулярных стабилизирующих взаимодействий и увеличение конформационной энтропии ($\Delta S_{\text{конф}}^{\neq}$) (стр. 1856). В результате этого разность $\Delta G_{\text{ден, мод}}^{\neq} - \Delta G_{\text{ден, нат}}^{\neq}$ становится тем меньше, чем выше температура инактивации, и равна нулю при изокинетической температуре. При температурах выше изокинетической нативный фермент становится стабильнее модифицированного.

Если в результате модификации произошло разрушение стабилизирующих фермент взаимодействий (в частности, при модификации групп III типа), то структура его становится близкой к денатурированной. После модификации $\Delta H_{\text{ден}}^{\neq}$ и $\Delta S_{\text{ден}}^{\neq}$ уменьшаются (рис. 7, кривые 1 и 3), однако в силу преобладающего уменьшения $\Delta H_{\text{ден}}^{\neq}$ над $\Delta S_{\text{ден}}^{\neq}$ в этом случае изокинетическая температура высока, и модифицированный фермент имеет меньшую стабильность, чем нативный, практически во всем экспериментальном интервале температур.

Стабилизация ферментов после иммобилизации при многоточечном взаимодействии с носителем (ковалентном и нековалентном) обусловлена, как правило, преобладающим уменьшением $\Delta S_{\text{ден}}^{\neq}$ над уменьшением $\Delta H_{\text{ден}}^{\neq}$ термоинактивации. Это «высокотемпературная стабилизация» ферментов [39, 169—178] (табл. 2). Уменьшение $\Delta H_{\text{ден}}^{\neq}$ и $\Delta S_{\text{ден}}^{\neq}$ ($\Delta H_{\text{ден}}$ и $\Delta S_{\text{ден}}$) после иммобилизации ферментов можно объяснить следующим образом. При взаимодействии фермента с матрицей (образовании внешних связей) нарушаются связи внутри его молекулы, что сопровождается уменьшением $\Delta H_{\text{ден}}$. Одновременно с этим в силу ковалентного и нековалентного закрепления полипептидной цепи в нескольких точках происходит уменьшение $\Delta S_{\text{конф}}$. Чем сильнее уменьшение ΔS (ΔS^{\neq}) (чем больше точек связывания фермента с носителем) по сравнению с ΔH , тем ниже лежит изокинетическая температура для нативного и иммобилизованного ферментов и тем больше интервал экспериментальных температур, в котором иммобилизованный фермент стабильнее нативного, тем больше эффект стабилизации ($\Delta G_{\text{ден, имм}}^{\neq} - \Delta G_{\text{ден, нат}}^{\neq}$) при температурах выше изокинетической (рис. 7, кривые 1 и 4). Вероятно, при многоточечной иммобилизации белок закрепляется в конформации, близкой к денатурированной [168, 176]. Это может быть одной из главных причин низкой активности ферментов после их многоточечной иммобилизации. В случае отсутствия внешних связей фермента с носителем (при включении в полимерный гель) термодинамические параметры денатурации могут не изменяться [174].

Ферменты, функционирующие в мембранных структурах, в водных растворах могут иметь конформацию, отличающуюся от нативной. Для таких белковых макромолекул при удачном выборе носителя после иммобилизации структура будет ближе к нативной, чем в растворе. И следует ожидать, что для такого иммобилизованного фермента величины $\Delta H_{\text{ден}}^{\neq}$ и $\Delta S_{\text{ден}}^{\neq}$ возрастут. Подобный экспериментальный факт мы наблюдали, например, для люциферазы светляков, иммобилизованной на полисахаридных носителях [175]. Для фермента в растворе $\Delta H_{\text{ден}}^{\neq}$ составляла 35 ккал/моль, а для иммобилизованного на сефарозе — 54 ккал/моль [175]. Подобных эффектов следует ожидать и для других ферментов, функционирующих в природе в иммобилизованном состоянии.

* * *

Во многих случаях модификация ферментов монофункциональными агентами заметно повышает устойчивость биокатализаторов к действию

ТАБЛИЦА 2

Изменение термодинамических параметров обратимой и необратимой термоинактивации ферментов в результате их модификации или иммобилизации

Фермент	ΔH^0 , ккал/моль	ΔH^{\neq} , ккал/моль	ΔS^0 , э.е	ΔS^{\neq} , э.е	Эффект стабилизации(θ) ^а	Ссылки
Пероксидаза нативная	—	31	—	14	1,0(56)	[86, 108]
модифицированная ангидридами монокарбоновых кислот включенная в полиакриламидный гель	—	64—87	—	110—178	32—90(56)	[86, 108]
—	—	20	—	—10	0,06(56)	[169]
α -Химотрипсин ^б нативный	—	109	—	259	1,0	[170]
включенный в полиакриламидный гель	—	14	—	—36	420(60) ^в	[170]
включенный в полиметакрилатный гель	—	34	—	21	$T_i=48^\circ\text{C}$ 680(60) ^в	[170]
$T_i=41^\circ\text{C}$	—	—	—	—	—	—
α -Химотрипсин нативный растворимомодифицированный: на сополимере акриловой и мадиеновой кислот на полималеиновой кислоте	223 110	165 38	692 346	435 44	—	[39]
Трипсин нативный	30	67	93	142	—	[171]
иммобилизованный на сепароне с глюкозой на целлюлозе	10	45	30	62	—	[171]
—	—	23	—	—6	—	[171]
β -Галактозидаза нативная	—	121	—	282	1,0	[172]
иммобилизованная на ДЭАЭ-сепадексе	—	73	—	142	0,14(60) ^в	[172]
$T_i=70^\circ\text{C}$	—	—	—	—	—	—
Декстррансахарараза ^б нативная	—	90	—	223	1,0	[173]
иммобилизованная на аминированном стекле	—	25	—	6	7,5(35)	[173]
$T_i=29^\circ\text{C}$	—	—	—	—	—	—
Глюкоамилаза ^б нативная	—	99	—	228	1,0	[174]
иммобилизованная на сульфопропилсепадексе	—	64	—	126	0,42(57)	[174]
$T_i=70^\circ\text{C}$	—	—	—	—	—	—
Люцифераза светляков нативная	—	35	—	40	1,0	[175]
иммобилизованная на ультрагеле	—	12	—	—3	0,25(25)	[175]
на BrCN-сепарозе	—	54	—	100	72(25)	[175]

^а В скобках указана температура, при которой измерялся эффект стабилизации, в °С

^б Величины ΔH^{\neq} и ΔS^{\neq} и эффект стабилизации(θ) рассчитаны нами из температурных зависимостей $\lg k_{\text{ин}}$, приведенных в данных работах.

^в Величины рассчитаны на основании экстраполяций, сделанных авторами данной работы.

^г T_i — изокинетическая температура.

температуры, экстремальных pH и органических растворителей. В большинстве случаев эффект стабилизации не превышает 10—20 раз, но в некоторых случаях — достигает 100 и более раз [108, 116]. Для достижения максимального эффекта стабилизации следует учитывать те закономерности, которые были выявлены из анализа, проведенного в данном обзоре. Модификация ферментов с введением углеводных остатков,

амидинирование, гуанидирование, как правило, увеличивают стабильность ферментов (в худшем случае — не уменьшают). Наиболее сильное влияние на стабильность оказывает модификация с изменением заряда функциональных групп. Кроме того, следует избегать модификации внутренних групп (III типа) фермента, используя для модификации как можно более мягкие условия (низкие температуры, минимальные концентрации органических добавок), высокой степени модификации и введения в фермент слишком объемных гидрофобных остатков.

При разработке методов стабилизации путем химической модификации необходимо получать данные о термостабильности ферментов в широком интервале температур в зависимости от степени модификации, природы модифицируемых групп и модифицирующего агента. Такой анализ позволяет не только оптимизировать условия получения, но и применения биокатализатора. Как было показано выше, химически модифицированные растворимые ферменты чаще более стабильны при температурах ниже 50—60° С. Для работы при более высоких температурах (60—70° С) целесообразнее использовать ферменты, иммобилизованные на полимерных матрицах, для которых характерна высокотемпературная стабилизация, хотя нередко иммобилизация сопровождается снижением катализической активности, в частности из-за приближения структуры фермента к денатурированной.

Весьма перспективным является использование нескольких аддитивных стабилизирующих воздействий, что позволяет достичь наибольших эффектов стабилизации [34].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, с. 1445.
2. Schmid R. D. Adv. Biochem. Eng. 1979, v. 12, p. 41.
3. Угарова Н. Н. В сб.: Итоги науки и техники. Биологическая химия./Под ред. В. Л. Кретовича, И. В. Березина. М.: ВИНИТИ, 1978, т. 12, с. 92.
4. Ulbrich R., Schellenberger A. Wiss Z.—Martin-Luther-Univ., Halle-Wittenberg, Math.-Naturwiss. reihe, 1979, B. 28, № 3, S. 75.
5. Torchilin V. P., Martinek K. Enzyme Microb. Technol., 1979, v. 1, p. 74.
6. Privalov P. L. Adv. Protein Chem., 1979, v. 33, p. 167.
7. Pfeil W. Mol. Cell. Biochem., 1981, v. 40, p. 3.
8. Nemethy G., Scheraga H. A. Quart. Rev. Biophys. 1977, v. 10, № 3, p. 240.
9. Karplus M., McCammon J. A. CRC Crit. Rev. Biochem., 1981, v. 9, № 4, p. 293.
10. Wertz D. H., Scheraga H. A. Macromolecules, 1978, v. 11, p. 9.
11. Meirovitch H., Scheraga H. A. Ibid., 1980, v. 13, p. 1406.
12. Manavalan P., Ponnuswamy P. K. Arch. Biochem. Biophys., 1977, v. 184, p. 476.
13. Ponnuswamy P. K., Prabhakaran M., Manavalan P. Biochim. biophys. Acta, 1980, v. 623, p. 301.
14. Meirovitch H., Scheraga H. A. Macromolecules, 1981, v. 14, № 2, p. 340.
15. Wodak Sh. J., Janin J. Biochemistry, 1981, v. 20, p. 6544.
16. Жоли М. В кн.: Физическая химия денатурации белков. М.: Мир, 1968, с. 9.
17. Кущнер В. П. В кн.: Конформационная изменчивость и денатурация биополимеров. Л.: Наука, 1977, с. 6.
18. Лихтенштейн Г. И., Трошкина Т. В. Молекулярн. биология, 1968, т. 2, с. 654.
19. Bello J. J. Theoret. Biol., 1977, v. 68, p. 139.
20. Брандтс Дж. Ф. В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973, с. 174.
21. Privalov P. L., Khechinashvili N. N. J. Molec. Biol., 1974, v. 86, p. 665.
22. Дженкс В. В кн.: Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 303.
23. Perutz M. F. Science, 1978, v. 201, p. 1187.
24. Лихтенштейн Г. И. В кн.: Состояние и роль воды в биологических объектах. М.: Наука, 1967, с. 101.
25. Vincent J.-P., Chicheportiche R., Lazdunski M. Europ. J. Biochem., 1971, v. 23, p. 401.
26. Brown L. R., De Marco A., Richarz R., Wagner G. Ibid., 1978, v. 88, p. 87.
27. Levitt M., Warshel A. Nature, 1975, v. 253, p. 694.
28. Ахрем А. А., Родионов М. А., Галактионов С. Г. Вестн. АН БССР. Сер. хим., 1977, с. 122.
29. Osheroff N., Borden D., Koppenol W. H., Margoliash E. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 1689.
30. Johnson R. E., Adams P., Rupley J. A. Biochemistry, 1978, v. 17, p. 1479.
31. Ottesen M. Methods Biochem. Anal. 1971, v. 20, p. 135.
32. Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Бровко Л. Ю. Биохимия, 1975, т. 40, с. 297.
33. Filimonov V. V., Pfeil W., Tsalkova T. N., Privalov P. L. Biophys. Chem., 1978, v. 8, p. 117.
34. Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 75.

35. Cooper A. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, v. 73, p. 2740.
36. Gurd F. R. N., Rothgeb M. Adv. Protein Chem., 1979, v. 33, p. 73.
37. Simon J. J. Theoret. Biol., 1981, v. 90, p. 487.
38. Wüthrich K., Wagner G., Richarz R., Braun W. Biophys. J., 1980, v. 32, p. 549.
39. Бессмертная Л. Я., Козловой Л. В., Антонов В. К. Биохимия, 1977, т. 42, с. 1825.
40. Brandts J. F. In: Thermobiology. London — New York: Acad. Press, 1967, p. 25.
41. Lassman G., Lasch J., Ebert B., Damerau W., Kudernatsch W. Acta biol. med. German., 1976, B. 35, № 3—4, S. 343.
42. Fujita Y., Noda Y. Koen Yoshishu — Tanpakushitsu Kozo Toronkai, XXX, 1979, p. 1. Tokyo Daigaku Rigakubu: Tokyo. C. A., 1980, v. 92, № 9, 71335y.
43. Fujita Y., Noda Y. Int. J. Peptide Protein Res., 1981, v. 18, p. 12.
44. Fujita Y., Noda Y. Bull. Chem. Soc. Japan, 1981, v. 54, p. 3233.
45. Pace C. N. Crit. Rev. Biochem., 1975, v. 3, № 1, p. 1.
46. Pace C. N., Fisher L. M., Cupo J. F. Acta biol. med. German., 1981, B 40, № 10—11, S. 1385.
47. Daniel R. M., Cowan D. A., Morgan H. W., Curran M. P. Biochem. J. 1982, v. 207, p. 641.
48. McLendon G., Radany E. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 6335.
49. McLendon G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, v. 77, p. 959.
50. Bull H. B., Breese K. Arch. Biophys. Biochem., 1973, v. 158, p. 681.
51. Stellwagen E., Wilgus H. Nature, 1978, v. 275, p. 342.
52. Bigelow Ch. C. J. Theoret. Biol., 1967, v. 16, p. 187.
53. Goldsack D. E. Biopolymers, 1970, v. 9, p. 247.
54. Privalov P. L., Tsalkova T. N. Nature, 1979, v. 280, p. 693.
55. PonnuSwamy P. K., Muthusamy R., Manavalan P. Int. J. Biol. Macromol., 1982, v. 4, p. 186.
56. Билай Т. И. В кн.: Термостабильные ферменты грибов. Киев: Наукова думка, 1979, с. 10.
57. Habertich H.-U., Zuber H. Arch. Microbiol., 1974, v. 98, № 2, p. 275.
58. Küttner G. A. S., Bekheit abd el Samei M., Sauer G. Acta biol. med. German., 1979, B. 38, № 10, S. K19.
59. Atkinson A. J. Appl. Chem. Biotechnol., 1976, v. 26, p. 577.
60. Nojima H., Imai A., Oshima T., Noda H. J. Mol. Biol., 1977, v. 116, p. 429.
61. Argos P., Rossman M. G., Grau U. M., Zuber H., Frank G., Traitschin J. D. Biochemistry, 1979, v. 18, p. 5698.
62. Zuber H. In: Structural and Functional Aspects of Enzymes Catalysis/Eds by H. Eggerer, R. Huber. Berlin — Heidelberg — New York: Springer Verlag, 1981, p. 114.
63. Singleton R., Middaugh Ch. R., MacElroy R. D. Int. J. Peptide Protein Res., 1977, v. 10, p. 39.
64. Merkler D. J., Farrington G. K., Wedler F. C. Ibid., 1981, v. 18, p. 430.
65. Imai A. J. Biochem. 1980, v. 88, p. 1895.
66. Perutz M. F., Raidt H. Nature, 1975, v. 255, p. 256.
67. Hocking J. D., Harris J. I. In: Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms. Basel — Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 121.
68. Hocking J. D., Harris J. I. Europ. J. Biochem., 1980, v. 108, p. 567.
69. Walker J. E., Wonacott A. J., Harris J. I. Ibid., 1980, v. 108, p. 581.
70. Pangburn M. K., Levy P. L., Walsh K. A., Neurath H. In: Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms. Basel — Stuttgart: Birkhäuser verlag, 1976, p. 19.
71. Grandi C., Vita C., Dalzoppo D., Fontana A. Int. J. Peptide Protein Res., 1980, v. 16, p. 327.
72. Barach J. T., Adams D. M. Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 485, p. 417.
73. Rüegg Ch., Ammer D., Lerch K. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, p. 6420.
74. Stellwagen E., Barnes L. D. In: Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms. Basel — Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 223.
75. Bocci E., Veronese F. M., Fontana A. Ibid., 1976, p. 229.
76. Ohnishi T., Blum H., Sato S., Nakazawa K., Hon-nami K., Oshima T. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 345.
77. Wedler F. C., Hoffman F. M., Kenney R., Carfi J. In: Enzymes and Proteins from thermophilic microorganisms. Basel — Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 187.
78. Hayashida Sh., Yoshioka H. Agr. Biol. Chem., 1980, v. 44, p. 481.
79. Oshima T., Sakaki Y., Wakayama N., Watanabe K., Ohashi Z., Nishimura S. In: Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms. Basel — Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1976, p. 273.
80. Elwell M. L., Schellman J. A. Biochim. biophys. Acta, 1977, v. 494, p. 367.
81. Grütter M. G., Hawkes R. B., Matthews B. W. Nature, 1979, v. 277, p. 667.
82. Schellman J. A., Lindorfer M., Hawkes R., Grütter M. Biopolymers, 1981, v. 20, p. 1989.
83. Yutani K., Ogasahara K., Sugino Y., Matsushiro A. Nature, 1977, v. 267, p. 274.
84. Yutani K., Ogasahara K., Kimura A., Sugino Y. J. Mol. Biol., 1982, v. 160, p. 387.
85. Matthews C. R., Crisanti M. M., Gepner G. L., Velecelebi G., Sturtevant J. M. Biochemistry, 1980, v. 19, p. 1290.
86. Угарова Н. Н., Рожкова Г. Д., Березин И. В. Биохимия, 1978, т. 43, с. 1382.
87. Wiseman A. In: Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. 1978, v. 2, p. 280.
88. Иммобилизованные ферменты. Т. 1/Под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартинека. М.: Изд-во МГУ, 1976, с. 38.

89. Feeney R. E. In: Food Proteins. Improvement through chemical and enzymatic modification/Eds. by R. E. Feeney, J. R. Whitaker. Washington: Amer. Chem. Soc., 1977, p. 3.
90. Habeeb A. F. S. A. Arch. Biochem. Biophys., 1967, v. 121, p. 652.
91. Jonas A., Weber G. Biochemistry, 1970, v. 9, p. 4729.
92. Avruch J., Reynolds J. A., Reynolds J. H. Ibid., 1969, v. 8, p. 1855.
93. Oakes J. J. Chem. Soc. Faraday Trans., I, 1976, v. 72, p. 228.
94. Nakagawa Y., Capetillo S., Jirgensons B. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, p. 5703.
95. Гаврилова Н. А., Гринкевич Х. А., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1979, т. 5, с. 1176.
96. Yamauchi F., Ono H., Kamata Y., Shibasaki K. Agr. Biol. Chem., 1979, v. 43, p. 1309.
97. Kidwai Sh. A., Ansari A. A., Salanuddin A. Biochem. J., 1976, v. 155, p. 171.
98. Pal P. K., Verma B., Myer Y. P. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 4325.
99. Aviram I. Arch. Biochem. Biophys., 1977, v. 181, p. 199.
100. Brautigan D. L., Ferguson-Miller Sh., Margoliash E. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 130.
101. Brautigan D. L., Ferguson-Miller Sh., Tarr G. E., Margoliash E. Ibid., 1978, v. 253, p. 140.
102. Hollecker M., Creighton Th. E. Biochim. biophys. Acta, 1982, v. 701, p. 395.
103. Schejter A., Zuckerman M., Aviram I. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 7042.
104. Clark J. F., Gurd F. R. N. Ibid., 1967, v. 242, p. 3257.
105. Puett D. Ibid., 1973, v. 248, p. 3566.
106. Reiner R., Siebenick H.-U., Christensen I., Döring H. J. Mol. Catal., 1977, v. 2, p. 119.
107. Герасимас В. Б., Черноглазов В. М., Клесов А. А. Биохимия, 1980, т. 45, с. 1086.
108. Ugarova N. N., Rozhkova G. D., Berezin I. V. Biochim. biophys. Acta, 1979, v. 570, p. 31.
109. Угарова Н. Н., Рожкова Г. Д., Березин И. В. Биохимия, 1978, т. 43, с. 1242.
110. Urabe I., Okada H. Proc. IV IFS Ferment. Technol. Today, 1972, p. 367.
111. Urabe I., Nanjo H., Okada H. Biochim. biophys. Acta, 1973, v. 302, p. 73.
112. Ito T., Ando N. Agr. Biol. Chem., 1975, v. 39, p. 575.
113. Minotani N., Sekiguchi T., Bautista J. G., Nosoh Y. Biochim. biophys. Acta, 1979, v. 581, p. 334.
114. Müller J. Ibid., 1981, v. 669, p. 210.
115. Shiao D. F., Lumry R., Rajender Sh. Europ. J. Biochem., 1972, v. 29, p. 377.
116. Torchilin V. P., Maksimenko A. V., Smirnov V. N., Berezin I. V., Klitanov A. M., Martinek K. Biochim. biophys. Acta, 1979, v. 567, p. 1.
117. Gounaris A. D., Perlman G. E. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, p. 2739.
118. Riordan J. F., Vallee B. L. In: Methods in Enzymology/Ed. by S. P. Colowick, N. O. Kaplan. New York — London: Acad. Press, 1972, v. 25, p. 494.
119. Carraway K. L., Koshland D. E. Ibid., 1972, v. 25, p. 616.
120. Bodlaender P., Feinstein G., Shaw E. Biochemistry, 1969, v. 8, p. 4941.
121. Кутузова Г. Д. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1981.
122. Brown L. R., De Marco A., Richarz R., Wagner G., Wüthrich K. Europ. J. Biochem., 1978, v. 88, p. 87.
123. Wagner G., Tschesche H., Wüthrich K. Ibid., 1979, v. 95, p. 239.
124. Wagner G., Kalb (Gilboa) A. J., Wüthrich K. Ibid., 1979, v. 95, p. 249.
125. Hunter M. J., Ludwig M. L. Methods in Enzymology. New York — London: Acad. Press, 1972, v. 25, p. 585.
126. Cupo P., El-Deiry W., Whitney Ph. L., Awad W. M. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 10828.
127. Tuengler P., Pfleiderer G. Biochim. biophys. Acta 1977, v. 484, p. 1.
128. Tsai C. S. Bioorg. Chem., 1980, v. 9, p. 176.
129. Sekiguchi T., Oshiro S., Goingo E. M., Nosoh Y. J. Biochem., 1979, v. 85, p. 75.
130. Nureddin A., Inagami T. Biochem. J., 1975, v. 147, p. 71.
131. Cupo P., El-Deiry W. S., Whitney Ph. L., Awad W. M. Arch. Biochem. Biophys., 1982, v. 216, p. 600.
132. Максименко А. В., Торчилин В. П., Клибанов А. М., Мартинек К. Вестн. Моск. ун-та. Сер. хим., 1978, т. 19, с. 590.
133. Казанская Н. Ф., Кост О. А., Березин И. В. Биоорган. химия, 1975, т. 1, с. 1337.
134. Wang J. H.-Ch., Tu J.-I. Biochemistry, 1969, v. 8, p. 4403.
135. Woodward J., Whaley K. S., Sachry G. S., Wohlpart D. L. Biotechnol. Bioeng. Symp. 1981, v. 11, p. 619.
136. Tashiro Y., Trevithick J. R. Canad. J. Biochem. 1977, v. 55, p. 249.
137. Yoshioka H., Hayashida Sh. Agr. Biol. Chem., 1981, v. 45, p. 571.
138. Wasserman B. P., Hultin H. O. Arch. Biochem. Biophys., 1981, v. 212, p. 385.
139. Nakamura S., Hayashi S. FEBS Letters, 1974, v. 41, p. 327.
140. Nakamura S., Hayashi S., Koga K. Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 445, p. 294.
141. Березин И. В., Угарова Н. Н., Фельдман Д. П. Биохимия, 1977, т. 40, с. 926.
142. Uedaira Hat., Uedaira His. Bull. Chem. Soc. Japan, 1980, v. 53, p. 2451.
143. Arakawa T., Timasheff S. N. Biochemistry, 1982, v. 21, p. 6536.
144. Metelitsa D. I., Eryomin A. N., Usanov S. A. Acta biol. med. German., 1982, B. 41, S. 17.
145. Еремин А. Н., Метелица Д. И. Биохимия, 1982, т. 47, с. 1186.
146. Ohta Y., Tanabe S., Hachimori A., Samejima T. J. Biochem. 1974, v. 76, p. 871.
147. Sri Ram J., Terminiello L., Bier M., Nord F. F. Arch. Biochem. Biophys., 1954, v. 52, p. 464.
148. Terminiello L., Bier M., Nord F. F. Ibid., 1958, v. 73, p. 171.

149. Riordan J. F., Bier M., Nord F. F. *Ibid.*, 1960, v. 90, p. 125.
150. Barker S. A., Gray C. J., Lomath A. W. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 1976, v. 26, p. 576.
151. Cohen W., Bier M., Nord F. F. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, v. 67, p. 479.
152. Urabe I., Yamamoto M., Yamada Y., Okada H. *Biochim. biophys. Acta*, 1978, v. 524, p. 435.
153. Barker S. A., Gray C. J., Lomath A. W. *Biochem. Soc. Transactions*, 1979, v. 7, p. 5.
154. Wada K. *J. Biochem.*, 1979, v. 86, p. 1747.
155. Woodward J., Wiseman A. *Biochim. biophys. Acta*, 1978, v. 527, p. 8.
156. Chin-Yung Ma, Nakay Sh. *J. Agr. Food Chem.*, 1980, v. 28, p. 834.
157. Mueller J., Klein C. *Biochim. biophys. Acta*, 1982, v. 707, p. 133.
158. Угарова Н. Н., Бровко Л. Ю., Рожкова Г. Д., Березин И. В. *Биохимия*, 1977, т. 42, с. 1212.
159. Shatsky M. A., Ho H. C., Wang J. H.-Ch. *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 303, p. 298.
160. Измайлова В. Н., Ребиндер П. А. В кн.: *Структурообразование в белковых системах*. М.: Наука, 1974, с. 28.
161. Gumpen S., Hegg P. O., Martens H. *Biochim. biophys. acta*, 1979, v. 574, p. 189.
162. Leach S. J., Boyd H. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1973, v. 5, p. 239.
163. Karmeyer W., Pfleiderer G. *Biochim. biophys. Acta*, 1977, v. 481, p. 328.
164. Hora J. *Ibid.*, 1973, v. 310, p. 264.
165. Алфимова Е. А., Лихтенштейн Г. И. В кн.: *Молекулярная биология*, Т. 8. М.: Изд. ВИНИТИ, 1976, с. 127.
166. Citi N. In: *Advances in Enzymology*/Ed. by A. Meister. London: John Wiley Sons, 1973, v. 37, p. 397.
167. Ламри Р., Билтгенен Р. В кн.: *Структура и стабильность биологических макромолекул*. М.: Мир, 1973, с. 7.
168. Козлов Л. В. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, с. 1243.
169. Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Артамонов И. Д., Березин И. В. *Биохимия*, 1976, т. 41, с. 1662.
170. Martinsek K., Klibanov A. M., Goldmacher V. S., Berezin I. V. *Biochim. biophys. Acta*, 1977, v. 485, p. 1.
171. Туркова Я., Козлов Л. В., Бессмертная Л. Я., Кудрявцева Л. В., Красильникова В. М., Антонов В. К. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, с. 108.
172. Баева В. С., Козлов Л. В., Антонов В. К. *Биохимия*, 1977, т. 42, с. 706.
173. Kaboli H., Reilly P. J. In: *Proc. of III Joint US/USSR Enzyme Engineering*. Tallin, 1978, ed. Bungay, NSF, Washington, p. 102.
174. Moriyama Sh., Noda A., Nakanishi K., Matsuno R., Kamikubo T. *Agr. Biol. Chem.*, 1980, v. 44, p. 2047.
175. Ugarova N. N., Brovko L. Yu., Kost N. V. *Enzyme Microb. Technol.*, 1982, v. 4, p. 224.
176. Brynda E., Bleha M. *Biopolymers*, 1977, v. 16, p. 1945.
177. Кулес Ю. Ю. *Биохимия*, 1979, т. 44, с. 417.
178. Кинстлер О. Б., Козлов Л. В. Там же, 1977, т. 42, с. 1674.

Московский государственный
университет, химический факультет