

УДК 577.15.02

ХИМИЧЕСКИЕ, ФИЗИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

*Можаяев В. В., Мартинек К., **Березин И. В.***

Проблема взаимосвязи структуры и стабильности белков включает в себя два основных вопроса. Во-первых, как выявить те молекулярные особенности строения белков, которые ответственны за их стабильность? Во-вторых, как, зная общие молекулярные причины стабильности, изменить структуру конкретного белка, чтобы увеличить его стабильность, т. е. стабилизировать его? В настоящем обзоре сделана попытка представить современное состояние как первой — фундаментальной, так и второй — прикладной сторон этой проблемы.

Библиография — 250 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1659
II. Теоретические и экспериментальные подходы к выяснению взаимосвязи между структурой и стабильностью белков	1660
III. Молекулярные причины стабильности белков	1668
IV. Нужны ли биотехнологии термостабильные биокатализаторы?	1676
V. Методы получения стабильных ферментных катализаторов	1677

I. ВВЕДЕНИЕ

Проблема взаимосвязи структуры и стабильности белков является одной из ключевых в современной белковой химии [1]. Только ее решение позволит вплотную подойти к реализации давнишней мечты исследователей, работающих в области белковой химии: предсказать [1, 2] пространственную структуру белка, исходя из его известной аминокислотной последовательности, и попытаться синтезировать [3] молекулы белковой природы с заранее заданными свойствами.

С другой стороны, одна из центральных задач химической (инженерной) энзимологии состоит в том, чтобы создать стабилизированные ферментные препараты для различных технологических областей [4—11]. Путь к созданию стабилизированных ферментов наметился несколько десятилетий тому назад, когда многие лаборатории в мире стали выяснять и изучать молекулярные механизмы или, по крайней мере, молекулярные причины инактивации белка, см. обзоры [12, 13]. Лишь после этого «подготовительного этапа» стало возможным непосредственно приступить к разработке методов целенаправленного воздействия на структуру ферментов, чтобы подавить эти ранее установленные инактивационные механизмы. Наибольшего развития пока достигли химические и физические методы стабилизации ферментов, см. обзоры [14—19]. Однако нет сомнений, что предложенный недавно биологический подход (применение методов генетической инженерии) [20—22] заслуживает не меньшего внимания.

В настоящем обзоре рассмотрен весь этот химико-физико-биологический комплекс взаимосвязанных вопросов. Излагаемый материал разделен на три несколько обособленных раздела. Сперва кратко обсуждены экспериментальные и теоретические подходы, используемые для установления взаимосвязи между стабильностью белков и их структурой. Затем рассмотрены сами молекулярные причины стабильности белков. Этот вопрос неоднократно поднимался в литературе, по крайней мере со времен работ Бресслера и Талмуда [23]. Современный уровень

проблемы достаточно полно отражен в недавних публикациях, например, в монографии Шульца и Ширмера [1]. Поэтому здесь мы попытаемся главным образом ответить на вопрос: что нужно сделать с белком (как заменить его структуру), чтобы придать ему большую стабильность. И наконец, в последнем разделе показано, как это в настоящее время можно сделать, т. е. рассмотрены экспериментальные методы получения высокостабильных биокатализаторов.

II. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ВЫЯСНЕНИЮ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И СТАБИЛЬНОСТЬЮ БЕЛКОВ

Решить проблему взаимосвязи структуры и стабильности белка в наиболее общем виде означает: рассчитать свободную энергию белка, исходя из его пространственной структуры. В принципе, для этого можно было бы попытаться рассчитать по отдельности энергию каждого из стабилизирующих (водородные связи, гидрофобные, электростатические и дисперсионные взаимодействия, и т. п.) и дестабилизирующих (в первую очередь, неблагоприятный энтропийный вклад напряженной конформации) факторов и просуммировать их. К сожалению, сделать это корректно не удастся [1, 24]. Причина в том, что вклад каждой из перечисленных выше компонент в свободную энергию белка составляет десятки-сотни ккал/моль [25, 26]. Это много, если учесть, что белки в целом характеризуются относительно низкой стабильностью; экспериментально определяемая свободная энергия стабилизации (нативной формы по отношению к денатурированной) для подавляющего большинства глобулярных белков составляет величину от 5 до 15 ккал/моль [27].

Другой общий (экспериментальный) путь решения задачи состоит в следующем: выбирают два различающихся по стабильности белка и, сравнивая их структуры, пытаются выяснить, какие структурные особенности отвечают за повышенную стабильность одного из них. Встает однако вопрос: какую пару белков выбрать для сравнения? Если взять два произвольных белка, то они по своей стабильности с большой вероятностью окажутся в среднестатистическом диапазоне значений свободной энергии: 5—15 ккал/моль. Следовательно, различия в стабильности будут мизерные, и их вряд ли удастся отождествить с какими-то определенными особенностями структуры, особенно на фоне больших структурных различий, характерных для функционально отличающихся белков.

Эта же особенность строения белков (малые различия в стабильности на фоне большого структурного разнообразия) приводит, по-видимому, к тому, что работы обобщающего характера [28—31] имеют относительно малую предсказательную ценность. Иными словами, попытки проанализировать известные структуры нескольких десятков белков, чтобы найти корреляцию между их стабильностью и некоторыми общими структурными параметрами (гидрофобностью [28—30], объемом [30] или содержанием тех или иных аминокислотных остатков [31]), не дали однозначных выводов.

Наиболее плодотворным оказалось сравнение стабильности белков, достаточно близких друг к другу по структуре. Таким структурным родством характеризуются, как правило, белки, выполняющие одну и ту же биологическую функцию.

Типичный эксперимент по выяснению взаимосвязи между структурой и стабильностью состоит из трех этапов. Сперва выбирают два (или несколько) функционально родственных белка из разных источников и получают их в максимально чистом виде. Затем сравнивают следующие характеристики белков: 1) аминокислотные составы и первичные структуры; 2) пространственные трехмерные структуры и показатели их конформационной изменчивости; 3) устойчивость к действию обратимых денатурантов и к необратимой инактивации; 4) зависимость функциональной (каталитической) активности от температур.

И наконец, пытаются скоррелировать полученные количественные характеристики стабильности (такие как температура обратимой денатурации, оптимальная температура ферментативной активности, значения равновесных или кинетических параметров денатурации — ΔG , ΔH и ΔS и т. п.) с теми структурными различиями, которые удалось выявить.

Откуда берут функционально родственные, но различающиеся по стабильности белки? Прежде всего их находят в природе. Во-первых, это родственные белки из разных мезофильных источников. Во-вторых, проводят сравнение родственных белков из термофилов и мезофилов. И, в-третьих, сравнивают белки диких штаммов с мутантно измененными белками. Объекты для исследования получают также искусственным путем. Для этой цели в настоящее время используют три метода: «сайт-направленный» мутагенез, иммобилизацию и химическую модификацию. Рассмотрим, какую информацию для изучения взаимосвязи структуры и стабильности белков удастся получить, применяя каждый из этих подходов.

1. Гомологичные белки мезофильных организмов

Сравнение структуры ферментов, выполняющих одинаковые функции у эволюционно отдаленных организмов, давно используют для выяснения механизмов ферментативного катализа [32]. Однако для изучения взаимосвязи структуры и стабильности белков этот подход применяется значительно реже. Дело в том, что различия в первичных структурах родственных мезофильных белков могут быть весьма большими. Например, у двух наиболее различающихся белков семейства глобинов только 16% всех аминокислотных остатков занимают в первичных структурах одинаковые положения [33]. С другой стороны, различия в стабильности гомологичных белков, как правило, очень незначительные — не более 1—3 ккал/моль. Поэтому возникает почти непреодолимая задача, которая уже обсуждалась выше: как интерпретировать маленькие изменения в стабильности на фоне больших различий в структуре.

Тем не менее, сравнение гомологичных белков мезофильных организмов дает некоторую полезную информацию о взаимосвязи их структуры и стабильности [33—36]. Во-первых, иногда удастся найти такие родственные белки, которые отличаются всего лишь 1—2 аминокислотными остатками, что естественно облегчает задачу по выяснению их роли в стабильности сравниваемых белков [19]. Во-вторых, нередко удастся выявить «инвариантные положения» в белках (замена аминокислотных остатков в этих положениях недопустима, поскольку приводит к разрушению структуры). Как правило, инвариантные положения находятся либо во внутренних участках глобулы [33—36], либо в областях межсубъединичных контактов [36] и соприкосновения соседних α -спиралей [33]. К инвариантным также относятся аминокислоты, участвующие в координации гема [34], а также фрагменты активных центров ферментов [36].

2. Сравнение белков из термофильных и мезофильных организмов

О существовании жизни в экстремальных условиях известно с давних пор, историю развития проблемы, см. [37]. Только в середине 60-х гг. удалось показать, что устойчивость микроорганизмов к экстремальным условиям, как правило, связана с повышенной стабильностью составляющих их биомолекул, в первую очередь, белков [38].

Поиск различий в структурах родственных термофильных и мезофильных белков имеет то преимущество перед сравнением между собой мезофильных объектов, что диапазон различий в их стабильности гораздо шире, и, следовательно, выше вероятность обнаружить те структурные различия, которые существенны для стабильности. К настоящему времени выделены в высокоочищенном виде около ста термофильных

белков и изучены их свойства. Молекулярные причины повышенной стабильности термофильных белков обсуждены в ряде обзоров и монографий [19, 37—49].

3. Мутантно измененные белки и белки диких штаммов

Под действием неблагоприятных внешних воздействий, химических агентов, облучения и некоторых других факторов в природе происходит явление, так называемого, мутагенеза [50]. На уровне клеток и целых организмов мутагенез выражается в изменении морфологии и функции и зачастую приводит к вырождению. На молекулярном уровне происходит замена нуклеотидов, включение новых или пропуск отдельных оснований (или даже больших областей генома). В результате синтезируются белки с измененной структурой: с заменой одного (наиболее частый случай) или нескольких аминокислотных остатков на другие; с полипептидной цепью, разделенной на ряд ковалентно не связанных между собой фрагментов, или, наоборот, с ковалентно сшитыми полипептидными цепями [50].

Сравнение структур мутантных белков и белков диких штаммов активно используется при выяснении механизмов ферментативного катализа [51, 52], в частности, для выявления существенных в катализе аминокислотных остатков [53]. Используя этот подход, удалось получить также информацию о роли отдельных аминокислот и более сложных структурных факторов в стабильности белков; некоторые примеры см. в обзоре [19].

4. Искусственно измененные белки

Существуют, по крайней мере, три пути получения искусственно измененных белков: сайт-направленный мутагенез (с привлечением аппарата генетической инженерии), иммобилизация и химическая модификация.

а) Метод сайт-направленного мутагенеза

Этот метод состоит в том, что, используя манипуляции на уровне генов, для белков с известной третичной структурой получают аналоги, отличающиеся заменой всего лишь одного аминокислотного остатка в строго заданном положении [54]¹. Последние достижения в сайт-направленном мутагенезе [20, 55] сделали метод доступным для ряда лабораторий. Так, мутантно измененные белки «искусственного происхождения» стали использовать для изучения роли определенных аминокислотных остатков в катализе [56]. Этим путем получены ферменты с улучшенной активностью и измененной субстратной специфичностью [57, 58]. Как и в случае мутантов природного происхождения, белки с заменой аминокислотных остатков в определенном положении, полученные искусственным (генетически инженерным) путем, могут дать информацию о роли отдельных структурных элементов также и в стабильности белков.

б) Иммобилизация ферментов

Ее следует понимать прежде всего как способ существенного ограничения подвижности молекул белков (или их фрагментов) в пространстве или относительно друг друга [59—61]. В последние годы этот метод активно используется в биотехнологии [4—11], в частности, для стабилизации ферментов [14—19]. Бытует однако мнение, что иммобилизационный метод хорош только для решения чисто прикладных задач, но не дает новой информации для фундаментальной науки. Это мнение основано на давнишнем предубеждении, что в результате иммобилизации структура фермента изменяется по сравнению с нативной. Однако в последние годы физическими методами было показано, что это далеко

¹ Методический аппарат сайт-направленного мутагенеза будет рассмотрен ниже.

не так: во многих случаях в результате иммобилизации конформация ферментов вообще не изменяется или меняется лишь незначительно, см. обзор [62]. Более того, выбрав подходящий метод иммобилизации, можно быть уверенным, что конформации нативного и иммобилизованного ферментов будут близки [62]. Поэтому иммобилизованные ферменты оказались удачными моделями при изучении целого ряда процессов *in vivo* [62, 63]. Они также дают полезную информацию о взаимосвязи структуры и стабильности белков. Так, с помощью иммобилизации была выявлена важная роль в стабильности белка флуктуаций его структуры.

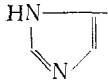

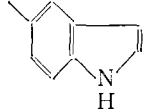
в) Химическая модификация белков

Этот метод используется как подход не только к стабилизации ферментов [64—66], но и к выяснению взаимосвязи между структурой и стабильностью белков [19, 66].

Основная проблема при использовании модификационного подхода в том, чтобы получить препарат белка, в котором промодифицирована лишь одна определенная функциональная группа (или определенный ряд групп). Сложность такой целенаправленной модификации задана тем, что функциональные группы белков проявляют одни и тот же тип реакционной способности: все они потенциально нуклеофилы и доноры или акцепторы протонов (табл. 1). Поэтому модификация белков «в лоб» произвольным реагентом приводит к конкуренции разных функциональных групп белка за этот реагент и обычно заканчивается неудачей — неспецифической модификацией. Тем не менее успехи в селективной модификации привели к тому, что практически для любой из функциональных групп белков найдено несколько реагентов, затрагивающих лишь эту определенную группу (примеры в табл. 1). Более того, даже

Таблица 1

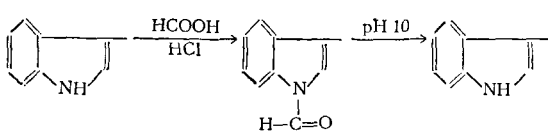
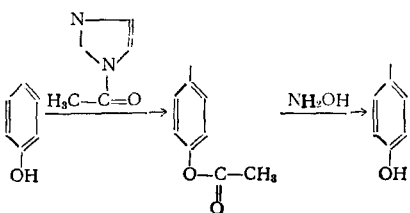
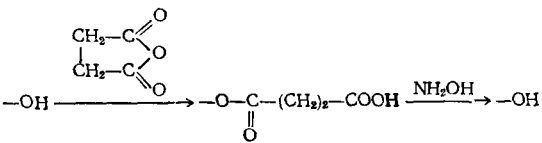
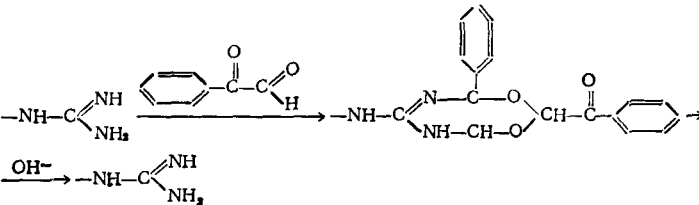
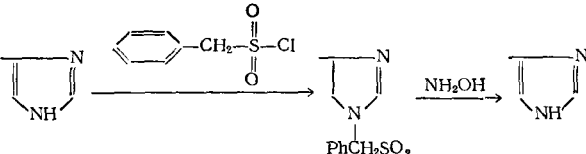
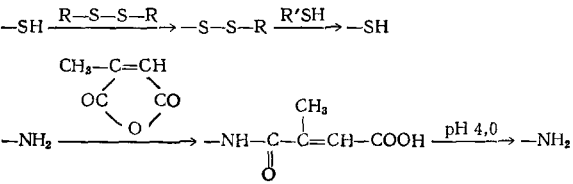
Функциональные группы в белках, которые могут быть подвергнуты специфической модификации [72]

Группа	Аминокислотный остаток	Значения pK_a	Примеры селективных реагентов *
α -COOH	Концевая аминокислота	$<1-6,8$	Карбодимид \dagger ; нуклеофил
β -COOH	Asp	$<1-6,8$	то же
γ -COOH	Glu	$<1-6,8$	»
	His	$6,4-7,5$	диэтилпирокарбонат
$-SH$	Cys	$8,0-9,5$	N-этилмаленимид; дисульфиды
α -NH ₂	концевая аминокислота	$7,3->12$	дансилхлорид; метил-ацетимидат
ϵ -NH ₂	Lys	$7,3->12$	то же
	Tyr	$9,4->12$	тетранитрометан; N-ацетилимидазол
$-NH-C(=NH)-NH_2$	Arg	$11,5->12$	2,3-бутандион; фенилглюксаль
$-OH$	Ser, Thr	>12	—
	Trp	>12	N-бромсукцинимид
$-S-CH_3$	Met	—	хлорамин Т; H ₂ O ₂

* Взяты из [89].

Таблица 2

Реакции обратимой защиты аминокислотных остатков в белках

Аминокислота	Реакции	Ссылки
Met	$-S-CH_3 \xrightarrow[pH\ 3]{\text{окисление}} S(=O)-CH_3 \xrightarrow{RSH} -S-CH_3$	[90]
Trp		[91]
Tyr		[92]
Ser, Thr		[93]
Arg		[94]
His		[95]
Cys	$-SH \xrightarrow{R-S-S-R} -S-S-R \xrightarrow{R'SH} -SH$	[96]
Lys		[97]

для реагентов, обладающих групповой специфичностью, часто удается подобрать условия, при которых избирательно модифицируется только один тип аминокислотных остатков. Для этого либо варьируют значение pH (поскольку реакционной способностью обладает, как правило, лишь одна из форм — протонированная или депротонированная), либо используют реакции обратимой модификации (табл. 2), с помощью которых предварительно блокируют конкурирующие за реагент другие группы белка.

Потенциал метода химической модификации воистину огромен [67—89]. Однако в приложении его к изучению взаимосвязи между структурой и стабильностью белков имеется ряд методических трудностей,

которые зачастую носят принципиальный характер. Рассмотрим наиболее важные из этих затруднений и постараемся наметить пути их преодоления.

1. Существует опасность, что модификация затронет инвариантные элементы белковой структуры и приведет к нежелательным конформационным изменениям вплоть до денатурации белка [72, 84]. Чтобы проверить такую возможность, продукт химической модификации необходимо проанализировать физическими методами и выяснить, различаются ли конформации нативного и модифицированного белков. В случае таких различий необходимо сменить модифицирующий агент.

2. Иногда модификацию белков приходится проводить в довольно жестких условиях, при которых могут протекать нежелательные побочные процессы (табл. 3). Чтобы избежать побочных реакций, нередко приходится предварительно защищать «уязвимые» функциональные группы (см. табл. 2), а после проведения модификации «защиту снять» в мягких условиях.

Таблица 3

Нежелательные побочные реакции при модификации функциональных групп в белках [84]

Функциональная группа	Условия	Результат
Пептидная связь	pH 8—12	гидролиз
»	pH 1—5	N—O-ацильный сдвиг
SH-Группа	окисление	S—S-связь, S—O-кислоты
S—S-Связь	восстановление	SH-группы, новые S—S-связи
»	pH 8—12	гидролиз, β-элиминирование
S—CH ₃ метионина	окисление	оксипроизводное
Амидная группа	pH 8—12	гидролиз
O-Гликозильная группа	pH 8—12	β-элиминирование
O-Фосфатная группа	pH 8—12	β-элиминирование

3. Только в редких случаях удастся промодифицировать белок так, чтобы в нем оказался затронутым лишь один определенный аминокислотный остаток. Обычно в результате химической модификации получают набор производных белка, различающихся как по числу промодифицированных групп, так и по порядковым номерам в первичной структуре остатков, затронутых модификацией. Это естественно приводит к существенной неоднородности продуктов химической модификации белков [72, 84]. Сложность разделения продуктов задана тем, что модифицированные белки зачастую слабо отличаются друг от друга по физическим свойствам (заряд, молекулярный вес, форма и т. п.). Здесь особенно полезным должен оказаться метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [98].

4. Еще одна серьезная проблема состоит в том, как идентифицировать продукты химической модификации белка. Для этой цели наиболее часто используют метод аминокислотного анализа. Метод однако имеет тот недостаток, что обработку белка перед непосредственным определением аминокислотного состава проводят в весьма жестких условиях (концентрированная HCl, температура выше 100°), чтобы прогидролизовать все пептидные связи. При этом, естественно, рвутся и другие химические связи (менее прочные, чем пептидные) и химически разрушаются некоторые аминокислоты. Поэтому идентификацию ряда аминокислот (Cys, Trp, Met) и продуктов некоторых типов химической модификации (окисление, ацилирование), либо вообще невозможна методом аминокислотного анализа, либо дает неточные результаты [85, 86]. К счастью, это затруднение преодолевают [85], используя некоторые методические ухищрения (например, конкурентные реакции за функциональные группы или метод радиоактивных индикаторов).

Другой способ преодолеть эту сложность — определить степень модификации в мягких условиях. Хорошим подспорьем для этого являются

Спектрофотометрическое определение некоторых функциональных групп в белках

Реакции	λ , нм	Молярное поглощение	Ссылки
$-\text{SH} + ^-\text{OOC}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{COO}^- \rightarrow -\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{COO}^- + -\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{COO}^-$	412	13 600	[99]
$\text{Indole} + \text{BrCH}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2\text{OH} \rightarrow \text{Indole-CH}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2\text{OH}$	410	18 000	[100]
$-\text{NH}_2 + \text{HO}_3\text{S}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3 \rightarrow -\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3$	420	13 000	[101]
$-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} + \text{N} \equiv \text{N}^+ - \text{N} \begin{matrix} \text{CH}=\text{NH} \\ \text{N}=\text{N} \end{matrix} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2 - \text{N} \equiv \text{N} - \text{N} \begin{matrix} \text{CH}=\text{NH} \\ \text{N}=\text{N} \end{matrix}$	550	13 800	[102]
$\text{Imidazole} + \text{N} \equiv \text{N}^+ - \text{N} \begin{matrix} \text{CH}=\text{NH} \\ \text{N}=\text{N} \end{matrix} \rightarrow \text{Imidazole} - \text{N} \equiv \text{N} - \text{N} \begin{matrix} \text{CH}=\text{NH} \\ \text{N}=\text{N} \end{matrix}$	480	20 500	[102]

ся реакции спектрофотометрического титрования оставшихся непромодифицированными функциональных групп белков с помощью хромофорных реагентов (некоторые примеры см. в табл. 4). Для определения точного места локализации модифицированного аминокислотного остатка используют методы установления первичной структуры [103].

Таким образом возникающие трудности удастся, в принципе, преодолеть и можно приступить к поиску взаимосвязи между стабильностью и структурой белка. Эксперимент необходимо начинать со сравнения конформаций нативного и модифицированного белков. Дело в том, что иногда увеличение [104, 105] или уменьшение [106, 107] стабильности белков в результате химической модификации обусловлено именно конформационными изменениями. Такие данные имеют ограниченную ценность, поскольку их трудно интерпретировать и еще труднее предсказать.

Чаще всего приходится иметь дело с продуктом химической модификации, который хотя и не отличается конформационно от нативного белка, но его стабильность ниже или выше. Для выяснения молекулярных причин (де)стабилизации используют следующие методические приемы.

Увеличение степени модификации (числа промодифицированных функциональных групп). Если (де)стабилизационный эффект изменяется при этом монотонно (плавно), то это скорее всего означает, что в белке при модификации не возникают (или не исчезают) какие-то специфические взаимодействия, например, солевые мостики или водородные связи. Иначе наблюдаемая зависимость имела бы дискретный вид: действительно, трудно представить, чтобы модификация каждого последующего остатка генерировала или разрушала бы солевой мостик или водородную связь. Более вероятно, что плавный вид зависимости (де)стабилизационного эффекта от степени модификации отражает равномерное изменение какого-либо интегрального параметра глобулы (гидрофобности или поверхностного заряда).

Изменение длины модифицирующего агента при заданной степени модификации. Для этой цели удобно использовать гомологические ряды модификаторов: аминов, альдегидов, имидатов. Анализ вида зависимости (де)стабилизационного эффекта от длины реагента оказывается полезным для выяснения влияния на стабильность белков таких интегральных параметров, как поверхностная гидрофобность или заряд [66].

Влияние температуры на (де)стабилизационный эффект иногда помогает выяснить [66], какой тип взаимодействий в белке вносит решающий вклад в стабилизацию. В частности, если стабилизационный эффект возрастает с увеличением температуры, то это является серьезным указанием на усиление в белке гидрофобных взаимодействий.

В заключении этой части обзора обратим внимание на возможность одной принципиальной ошибки при интерпретации экспериментальных данных. Иногда путем химической модификации удается существенно затормозить определенный механизм инактивации, свойственный нативному белку. Например, термоннаktivация бычьего сывороточного альбумина в растворе обусловлена в основном его агрегацией [108]. Введя избыточный отрицательный заряд на поверхность белка (например, цитраконилированием), агрегацию удастся полностью предотвратить. Наблюдаемое в этом случае на опыте [108] замедление инактивации обусловлено не внутренней стабилизацией белка (вызванной его модификацией), а сменой инактивационного механизма. Поэтому при работе с модифицированными, а также иммобилизованными или мутантно измененными белками, всегда нужно убеждаться, что механизмы их инактивации идентичны механизмам для нативных белков.

III. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРИЧИНЫ СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ

Основные молекулярные причины стабильности белков проанализированы нами недавно [19]. Здесь рассмотрим их лишь с той целью, чтобы выяснить, оставила ли природа резервы (и какие) для искусственного увеличения стабильности белка.

1. Связывание катионов металлов, субстратов, простетических групп и других низкомолекулярных лигандов

Наиболее общее объяснение фактам стабилизации ферментов при их взаимодействии с лигандами дал Шеллман [109]. Имеется, по крайней мере, два состояния белка — нативное и денатурированное, и любое соединение, в принципе, способно связаться как с одним, так и с другим. Преимущественное связывание с одной из форм белка неизбежно стабилизирует ее по отношению к другой на величину свободной энергии образования соответствующего комплекса. Известно, что связывание эффекторов ферментативной активности происходит в области активного центра или вблизи него. Поэтому для образования фермент-лигандного комплекса необходимо, чтобы белок находился в нативной конформации; связывания с денатурированной формой, как правило, не происходит. Именно поэтому специфические низкомолекулярные лиганды обычно стабилизируют белки [109].

Чтобы получить путем взаимодействия с эффекторами искусственно-стабилизированные ферментные препараты, обратим внимание на то, что при таких взаимодействиях белки часто претерпевают конформационные изменения [110], т. е. переходят в другие, иногда более стабильные конформации. Следует попытаться закрепить эту стабильную конформацию, например, с помощью иммобилизации [111]; критический анализ этого подхода дан в обзоре [62].

2. Белок-белковые и белок-липидные взаимодействия

Белки *in vivo* часто взаимодействуют с другими белковыми молекулами, липидами, полисахаридами [112]. Образующиеся при этом структуры можно условно разделить на два принципиально различающихся типа: во-первых, комплексы с небольшим числом, либо белок-белковых контактов (например, субъединичные ферменты [113] или ассоциаты протеаз с белковыми ингибиторами [114]), либо белок-липидных контактов (типа комплексов альбумина с жирными кислотами [115]), во-вторых системы с большим числом взаимосвязанных, согласованных контактов разного типа (белок-белковых, белок-липидных, липид-липидных), как, например, в биологических мембранах [116]. Взаимодействие белка с другими молекулами как в тех, так и в других типах структур может существенно увеличить его стабильность.

Механизм стабилизации при образовании отдельных белок-белковых или белок-липидных контактов, в принципе, понятен [114]. На поверхности белков наряду с полярными и заряженными группами имеются «гидрофобные кластеры», и их контактирование с водой термодинамически невыгодно. При образовании комплекса молекула липида или белка «садится» на этот кластер и, тем самым, закрывает его от контакта с растворителем [117]. Наблюдаемое значение свободной энергии стабилизации составляет несколько ккал/моль на один белок-белковый контакт [113, 114].

Такие белок-белковые или белок-липидные контакты создают также искусственно: в присутствии липидов [118, 119] или высоких концентраций белков (например, альбумина) [120, 121] стабильность некоторых ферментов заметно возрастает.

Менее однозначным представляется механизм стабилизации ферментов при их включении в биологические мембраны. Действительно, здесь наряду с обсужденным выше «эффектом экранирования» должны играть

важную роль также и многие другие факторы. Среди них в первую очередь выделим изменение жесткости белковой молекулы за счет много-точечного взаимодействия ее с другими белками и липидами и рассмотрим влияние этого фактора на стабильность.

3. Жесткость белковой молекулы

Она определяет способность макромолекулы принимать различные состояния в конформационном пространстве [122] и непосредственно связана со стабильностью белка. Действительно, в основе как процесса денатурации белка (проявление его нестабильности), так и флуктуаций вокруг некоторого среднестатистического состояния (проявление его «нежесткости» или гибкости) лежат одни и те же молекулярные механизмы: колебательные и вращательные движения в макромолекуле. Разница между этими процессами лишь в том, что при денатурации имеет место кооперативный конформационный переход всей глобулы [26], тогда как локальные флуктуации структуры затрагивают лишь отдельные участки глобулы без существенного изменения общей конформации [123].

В данном обзоре мы не будем пытаться дать строгое термодинамическое определение жесткости [122, 123] или связать ее с термодинамическими параметрами стабильности белка [124]. Несомненно, что многие факторы, определяющие стабильность белка (в первую очередь, гидрофобные взаимодействия), влияют и на его жесткость [122, 124]. Здесь мы рассмотрим лишь один вопрос: как влияет на жесткость и стабильность белка такой фактор как иммобилизация — естественная или искусственная.

В природе белки в мембранах находятся в естественно-иммобилизованном состоянии; это следует понимать так, что в результате взаимодействия с другими белками и липидами их поступательная диффузия, а также колебательные и вращательные движения существенно ограничены. Степень иммобилизации белков в мембране во многом зависит от целостности мембраны и ее структурированности. При изменении последнего параметра (например, при фазовом переходе в мембране) «степень иммобилизации» белков существенно изменяется [125], что приводит к изменениям каталитических свойств мембранных ферментов [125, 126]. Однако до последнего времени практически отсутствовали данные по влиянию структурированности мембран на стабильность мембранных ферментов.

Пионерскую работу в этом направлении выполнил Велкер [127]. Obligатный термофильный штамм *Bacillus stearothermophilus* он выращивал при температурах от 55 до 70°С и обнаружил, что с увеличением температуры выращивания существенно возрастает прочность клеточной мембраны (о которой судил по разрушению протопластов клеток при повышенных температурах, табл. 5). Одновременно с ужением структуры мембраны существенно возрастает термостабиль-

Таблица 5

Влияние температуры роста (T_p) культуры на свойства мембраны клеток *Bacillus stearothermophilus* и термостабильность ферментов [127]

T_p , °С	Разрушение протопластов (%)				Степень инактивации (%)					
					свободная Ш. Ф.*		мембранная Ш. Ф.		NADH-оксидаза	
	65°	70°	75°	80°	65°	70°	65°	70°	75°	80°
55	0	100	100	100	100	100	87	100	100	100
60	0	80	100	100	100	100	0	92	90	100
65	0	0	70	100	100	100	0	20	75	84
70	0	0	10	100	100	100	0	5	0	10

* Ш. Ф. — щелочная фосфатаза.

ность мембранных ферментов; это отмечено как для периферической щелочной фосфатазы, так и интегральной NADH-оксидазы, см. табл. 5. Возрастание термостабильности наблюдается лишь для ферментов, входящих в состав мембраны. При извлечении из мембраны стабильность щелочной фосфатазы, во-первых, сильно падает, а, во-вторых, становится независимой от температуры, при которой данную культуру микроорганизмов выращивали (см. табл. 5). Таким образом, эти данные подтверждают ранее высказанную гипотезу [128, 129] о стабилизирующем влиянии мембранной структуры на белки.

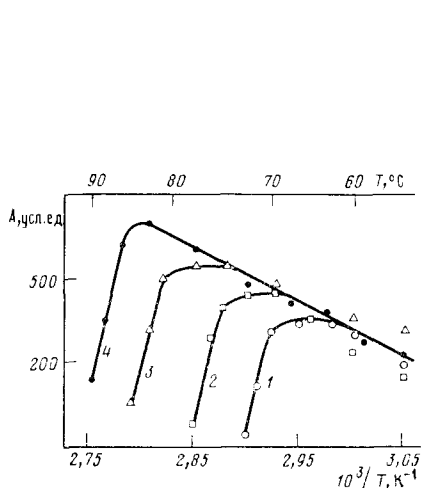


Рис. 1

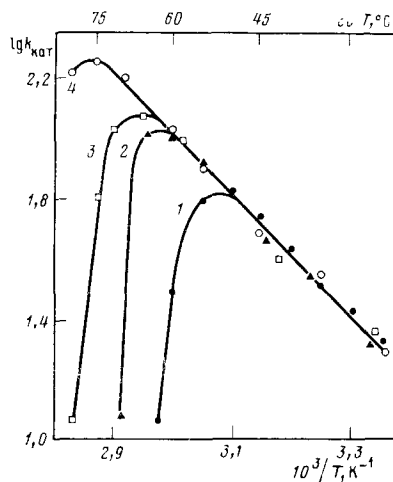


Рис. 2

Рис. 1. Температурная зависимость каталитической активности (A) мембранного фермента NADH-оксидазы из клеток *Bacillus stearothermophilus*, выращенных при температурах: 55° (кривая 1); 60° (кривая 2); 65° (кривая 3) и 70° (кривая 4) [127]

Рис. 2. Температурная зависимость каталитических констант гидролиза $k_{кат}$ специфического субстрата, катализируемого трипсином: 1 — свободный фермент; 2, 3 и 4 — фермент, ковалентно иммобилизованный в полиакриламидном геле 5, 8 и 15 связями соответственно [130]

Весьма поучительным является сравнение термостабильности ферментов, иммобилизованных естественным (в биомембране) и искусственным (на полимерном носителе) путями. На рис. 1 представлена температурная зависимость каталитической активности интегрального мембранного фермента NADH-оксидазы [127]. Видно, чем жестче мембрана, в которую включен фермент (т. е. чем выше температура, при которой культуру выращивали), тем выше температурный оптимум каталитической активности. Подобное семейство экспериментальных кривых получено [130] для искусственно иммобилизованного трипсина, молекулы которого присоединяли к носителю различным числом связей (рис. 2). Совпадение вида температурных зависимостей на рис. 1 и 2 нам кажется неслучайным. По-видимому, оно отражает одну и ту же тенденцию: увеличение стабильности фермента за счет ужесточения его структуры. Различие состоит только в том, как это ужесточение достигается: либо за счет более сильного структурирования природой белок-липидной матрицы мембраны *in vivo*, либо путем увеличения числа связей между молекулой фермента и искусственной полимерной матрицей *in vitro*.

4. Солевые мостики

Из всех стабилизирующих факторов, в основе которых лежат электростатические взаимодействия, наибольший вклад в стабилизацию белков вносят ионные пары (или по другому солевые мостики).

Ионных пар в белках относительно немного [131, 132]. Однако они вносят существенный вклад в стабилизацию белков — вплоть до 5 ккал/

/моль на одну ионную пару, если она расположена внутри глобулы, и 1—2 ккал/моль, если на поверхности [1, 113]. Неслучайно поэтому природа охотно пользуется ими, когда создает термофильные белки с повышенной стабильностью [19].

Приведем лишь один пример. Глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа из умеренного термофила *Bacillus stearothermophilus* имеет трехмерную структуру, схожую с ферментом из мышцы кролика [133], лишь с небольшим, но существенным отличием: термофильная дегидрогеназа в области межсубъединичных контактов имеет кооперативную систему дополнительных солевых мостиков, которой нет в мезофильном ферменте. Это и есть главная молекулярная причина того, что как денатурация, так и оптимум каталитической активности термофильного фермента наблюдается при более высокой температуре, чем для фермента из мышцы кролика [133].

Можно попытаться создать в белке дополнительные ионные пары искусственным путем, например, методами сайт-специфического мутагенеза или химической модификации. Однако для успеха, т. е. реализации солевого мостика, необходимы детальные знания о пространственной структуре белков. По-видимому, перспективность этого подхода будет возрастать по мере получения новой информации о структуре белков, в первую очередь, методом рентгеноструктурного анализа [134].

5. Водородные связи

В белках водородные связи играют важную структурную роль; они поддерживают пространственную организацию вторичных структур (α -спиралей, β -структур, поворотов). Принято считать, что образование водородной связи в белке — энергетически выгодный процесс. Энергию водородной связи часто рассчитывают как результат двух событий: разрыва «старых» водородных связей между полярным атомом (например, кислородом амидной группы) и молекулой воды и завязывание «новых» водородных связей между полярными атомами в молекуле белка и оценивают в 1—2 ккал/моль. Однако при таком рассмотрении не учитывается, что параллельно происходит термодинамически невыгодный процесс погружения полярного атома или группы (например, амидной) внутрь гидрофобного ядра глобулы. Учет энергетики этого процесса приводит к выводу [1], что свободная энергия образования водородной связи в белке близка к нулю. Иными словами, водородная связь оказывается ценой, которую белку приходится платить за особенности своей структуры. Поэтому, на наш взгляд, не имеет смысла пытаться (например, методами белковой инженерии), искусственно вводить в белки водородные связи.

6. Дисульфидные мостики

Представления о стабилизации белков S—S-связями пришли в химию белков из полимерной химии. В середине 50-х гг. было показано [135, 136], что внутримолекулярное сшивание макромолекул придает им дополнительную жесткость и увеличивает их стабильность. Природа такой стабилизации — энтропийная [135]: в результате появления сшивки в макромолекуле (S—S-связи в белке) существенно уменьшается энтропия развернутой формы и за счет этого увеличивается разность свободных энергий между нативным и денатурированным состояниями белка. Значение этого стабилизирующего вклада в белках составляет вплоть до 4—5 ккал/моль на одну S—S-связь [137].

Современные методы белковой химии открывают богатые возможности для введения в белки внутримолекулярных сшивок. Во-первых, можно использовать бифункциональные модифицирующие агенты [133]. Разработанные методы палочения «молекулярных скобок» позволяют в основном сшивать поверхностные области в белке. Другой подход — введение сшивки внутрь белковой молекулы. Здесь инструментом мо-

жет служить метод сайт-направленного мутагенеза. Этим методом удалось, например, ввести S—S-связь в лизоцим T4 — белок, в котором их нет [139].

7. Низкое содержание аминокислот, подвергающихся окислительной модификации

Один из распространенных механизмов инактивации белков — окисление (например, при повышенной температуре) существенных для структуры аминокислотных остатков [12, 13]. В первую очередь окислительной модификации подвергаются SH-группа цистеина и индольное кольцо триптофана. Поэтому неслучайно, что в высокостабильных термофильных белках содержится значительно меньше этих лабильных аминокислот (в первую очередь, Cys) [19].

Для стабилизации неустойчивых к окислению ферментов существуют, по-видимому, два пути. Первый — скопировать тот прием, который использовала природа в термофильных ферментах: уменьшить количество SH-групп. Для этого стоит попытаться методом сайт-специфического мутагенеза заменить наиболее склонные к окислению остатки Cys (если, конечно, они не участвуют в катализе) на другие, менее лабильные, но близкие по свойствам (геометрии, гидрофобности) [140]. Другой путь методически более прост: создать вокруг фермента микроокружение, которое бы экранировало его от инактивирующего фактора (кислорода). Таким экраном, например, с успехом служит заряженный полиэлектrolит: он «обволакивает» фермент и существенно затрудняет доступ к нему кислорода. «Высаливание» кислорода полиэлектrolитной матрицей позволило в тысячи раз повысить стабильность лабильных гидрогеназ [141].

8. Компактная упаковка аминокислотных остатков

Молекула белка в растворе представляет собой компактно упакованную структуру; плотность упаковки аминокислотных остатков в глобуле близка к той, которая характерна для кристаллов органических молекул [1]. Тем не менее внутри белка имеются «пустоты», которые заполнены молекулами воды (5—15 молекул на белок с молекулярным весом 20 000—30 000). Контакт полярных молекул воды с гидрофобным ядром белка термодинамически невыгоден и дестабилизирует белок.

Стабильность белка, в принципе, можно повысить путем его дальнейшей компактизации, т. е. «поджатием» белковой структуры с одновременным удалением молекул воды из внутренних областей. Подобный путь использовала природа для создания термофильных ферментов; в их структуре некоторые внутренние аминокислотные остатки заменены (по сравнению с соответствующими мезофильными аналогами) на более объемные [19]. Идею компактизации белка можно положить также в основу искусственной стабилизации, если попытаться осуществить замену подходящих аминокислотных остатков, например, методом сайт-направленного мутагенеза. При этом необходимо учитывать, что замена аминокислотных остатков на некоторые другие недопустима, поскольку может привести к серьезным нарушениям в структуре белка [142].

9. Гидрофобные взаимодействия

К настоящему времени представления о природе гидрофобных взаимодействий и их роли в стабильности белков сложились в стройную систему [143—145]. В белках около половины всего объема занимают аминокислоты с неполярными боковыми радикалами. Их контакт с водой термодинамически невыгоден, поскольку внедрение неполярного фрагмента в воду делает ее структуру более упорядоченной. Такое структурирование воды уменьшает энтропию системы и, следовательно, увели-

Показатели гидрофобности аминокислот

Аминокис- лота	ΔG переноса, ккал/моль *	f , %**	H_f , усл. ед.***	Аминокис- лота	ΔG переноса, ккал/моль *	f , %**	H_f , усл. ед.***
Trp	-3,77	0,27	12,95	His	-0,87	0,17	12,84
Phe	-2,87	0,50	13,43	Thr	-0,07	0,23	11,65
Tyr	-2,67	0,15	12,29	Ser	-0,07	0,22	11,26
Ile	-3,15	0,60	14,77	Asn	-0,09	0,12	11,00
Leu	-2,17	0,45	14,10	Gln	0,00	0,18	11,28
Val	-1,87	0,54	15,07	Asp	-0,66	0,15	10,97
Pro	-2,77	0,18	11,19	Glu	-0,67	0,07	11,19
Ala	-0,87	0,38	12,28	Lys	-1,64	0,03	10,80
Met	-1,67	0,40	14,33	Arg	-0,85	0,01	11,49
Cys	-1,52	0,50	14,93	Gly	-0,10	0,36	12,01

* Свободная энергия переноса из воды в органический растворитель [151].

** Доля запрятанных внутрь глобулы остатков [152].

*** Гидрофобность окружения в белках [153].

чивает ее свободную энергию². Поэтому при организации структуры белка (сворачивании) проявляется тенденция: убрать от контакта с водой как можно больше неполярных фрагментов в белке, запрятать их внутрь глобулы [147]. Тем самым ослабляется влияние неблагоприятного энтропийного фактора, усиливаются гидрофобные взаимодействия и увеличивается стабильность белка³.

Как только возникло представление о гидрофобных взаимодействиях, как стабилизирующем для белков факторе, появились попытки скоррелировать стабильность белка с величиной его гидрофобности. Для этого естественно понадобилось найти количественный критерий гидрофобности. Тэнфорд с соавт. предложили [149, 150] использовать величину свободной энергии переноса аминокислот из воды в органическую фазу. Согласно этой классификации чем более отрицательно для аминокислоты значение ΔG -переноса, тем она более гидрофобна (табл. 6). Создание количественной шкалы гидрофобности стимулировало поиск корреляции между стабильностью белка и его валовой гидрофобностью, рассчитанной как сумма гидрофобностей всех составляющих его аминокислот. Однако однозначных выводов из корреляций получить не удалось как в случае мезофильных белков [28—30], так и при сравнении термофильных и мезофильных белков [154, 155].

В первой части обзора мы уже отмечали одну из причин несостоятельности этого подхода: слишком малые различия в стабильности белков на фоне больших различий в структуре.

Другая причина заключается в том, что при определении аминокислотного состава белков методом аминокислотного анализа, как правило, находят суммарное содержание Asp + Asn и Glu + Gln, т. е. кислоты и соответствующего амида, и не учитывают, в какой форме находятся эти аминокислоты. Различия же в гидрофобности кислотной и амидной форм велики (ср. Asp и Asn, Glu и Gln в табл. 6). Так, например, высокостабильный ферредоксин из *Clostridium thermosaccharolyticus* отличается от обычного по стабильности белка из *Clostridium tartarivorum* [156] только тем, что в положениях 31 и 44 находятся остатки Glu, а не

² Структурированные кластеры молекул воды удавалось раньше регистрировать только вокруг маленьких органических молекул [143]. Недавно при рентгеноструктурном анализе мембранного белка крамина удалось наблюдать пентагональный кластер, который образуют молекулы воды вокруг неполярного фрагмента поверхности белка [146]. Таким образом, впервые показано, что белковая молекула качественно не изменяет характера взаимодействия неполярных фрагментов с водой, т. е. гидрофобные взаимодействия как в случае маленьких молекул, так и макромолекул имеют одинаковую (энтропийную) природу.

³ Точка зрения на энтропийную природу гидрофобных взаимодействий в настоящее время является преобладающей, но не единственной, см., например, обзор [148].

Gln. С помощью обычного аминокислотного анализа выявить это отличие не удалось. Разобраться в этом вопросе авторам помогло лишь сравнение данных рентгеноструктурного анализа для двух белков [156].

Укажем на еще один источник ошибок, который возникает при анализе корреляций между валовой гидрофобностью и стабильностью белков. Иногда стабильный термофильный белок сравнивают по гидрофобности не с его менее стабильным мезофильным гомологом, а с неким среднестатистическим мезофильным белком [157]. Это методически абсолютно неверно; обсуждение этого вопроса, см. в обзоре [19].

Имеет ли смысл (даже при правильном учете всех факторов и корректном сравнении) искать корреляции между стабильностью и общей гидрофобностью белков? Такая корреляция, по-видимому, была бы справедливой лишь для некоторого «идеализированного» белка (его иногда представляют в виде капли масла, отделенной от контакта с растворителем частотой полярных и заряженных групп [158]). Действительно, в таком гипотетическом белке все неполярные аминокислоты участвовали бы в гидрофобных взаимодействиях. Хотя такая упрощенная картина верно передает общую тенденцию к усилению в белках гидрофобных взаимодействий, ее не наблюдается на практике. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, около 50% площади поверхности реальных белков занимают неполярные аминокислоты [114, 145, 147, 159]. Часто они организуются в поверхностные гидрофобные кластеры [145]. Это имеет важное функциональное значение, поскольку позволяет белкам за счет гидрофобных взаимодействий связываться с другими белками (полиферментные комплексы), липидами (биологические мембраны), полисахаридами (клеточная стенка), субстратами и эффекторами (ферментативный катализ и его регуляция), т. е. в конечном счете правильно функционировать [160, 161]. Однако для белков в свободном, несвязанном состоянии (энзимологам чаще приходится иметь дело именно с такими объектами) расположение неполярных аминокислот на поверхности «вредно» для их стабильности, поскольку приводит к проигрышу в свободной энергии за счет ослабления гидрофобных взаимодействий.

Неидеальность строения белков (с точки зрения максимальной реализации в них гидрофобных взаимодействий) привела к необходимости искать новые подходы к определению шкалы гидрофобности аминокислот. Стало очевидным, что шкала [149, 150], составленная на основании экстракционной модели, неправильно отражает многие тенденции в сворачивании белка. Поэтому было предложено оценивать гидрофобность аминокислот на основании статистических данных по их расположению в пространственной структуре белков [152, 153, 162, 163].

Статистическая шкала Чотиа [152] отражает распределение аминокислот в объеме белковой глобулы: чем чаще аминокислота встречается внутри белковых глобул и чем реже на поверхности, тем она считается более гидрофобной. Другая статистическая шкала, составленная Поннусвэми с соавт. [153], основана на том, что гидрофобность определяется тем микроокружением, в котором находится данный аминокислотный остаток. В этом случае более гидрофобной считается та аминокислота, которая в белковой глобуле окружена более гидрофобными соседями. При этом гидрофобность микроокружения рассчитывают как сумму гидрофобностей [149, 150] для ближайших соседних в третичной структуре аминокислот.

Сравнение этих двух статистических шкал гидрофобности [152, 153] показывает (см. табл. 6), что они довольно хорошо согласуются между собой, несмотря на то, что в их основу положены разные принципы. Так, в обеих шкалах наиболее гидрофобны Ile, Val и Cys, а наименее гидрофобны Lys, Arg, Asp, Glu, Asn, Gln. С другой стороны, наблюдаются заметные расхождения между данными статистических шкал и экстракционной (тэнфордовской) шкалой. Так, наиболее гидрофобный в экстракционной шкале Trp занимает промежуточное положение в статистических шкалах, а наиболее близкие ему по гидрофобности Tyr и Pro следуют в

статистических шкалах [152, 153] отнести скорее к гидрофильным аминокислотам.

Причины этих расхождений впервые проанализировал Чотна [152, 159]. Он пришел к выводу, что введение в аминокислоту полярного атома уменьшает ее гидрофобность на 1—1,5 ккал/моль. Неслучайно поэтому, что самые гидрофобные в экстракционной шкале аминокислоты (Trp и Tyr) не относятся к числу самых гидрофобных в статистических шкалах (см. табл. 6). Хотя большая площадь на поверхности обеспечивает им высокую гидрофобность, наличие полярного атома существенно уменьшает выгодность их пребывания внутри белковой глобулы.

Имеются еще и другие причины несоответствия между экстракционной [149, 150] и статистическими шкалами гидрофобности [152, 153]. Классификация по экстракционным свойствам составлена лишь на основе модельных экспериментов (перенос вещества из водной фазы в органическую), и поэтому никак не учитывает того факта, что рассматриваемые аминокислоты на самом деле входят в состав полипептидных цепей. Иными словами, в реальных белках им приходится соседствовать с другими аминокислотами, которые, в принципе, влияют на геометрию и энергию своих соседей [164]. Кроме того, в белках реализуется принцип плотной упаковки [1, 140, 147], и поэтому при сворачивании наиболее объемные аминокислоты (Trp, Tyr) вынуждены оставаться на поверхности глобулы, чтобы не нарушить компактность структуры.

Итак, имеются три основных фактора, препятствующих реализации в белках гидрофобных взаимодействий с максимальной выгодой для стабильности пространственной структуры. Во-первых, это необходимость обеспечить достаточно плотную упаковку аминокислот в белке. Во-вторых, на геометрию и энергию аминокислот влияет микроокружение, т. е. их соседи в третичной структуре. В-третьих, на поверхности белка при сворачивании должны оставаться гидрофобные кластеры, которые *in vivo* обеспечивают взаимодействие белка с другими молекулами. Следовательно, вряд ли стоит пытаться найти корреляцию между стабильностью белка и его валовой гидрофобностью. В качестве более подходящего параметра было предложено [154] использовать содержание алифатических аминокислот, поскольку они действительно чаще находятся внутри белка, чем на поверхности. В работе [165] определен так называемый алифатический индекс белка:

$$A = X_{Ala} + aX_{Val} + b(X_{Ile} + X_{Leu})$$

где X_{Ala} , X_{Val} , X_{Ile} и X_{Leu} — молярные доли соответственно Ala, Val, Ile, Leu в белках, a и b — численные коэффициенты, определяемые размерами аминокислотных остатков. Из рис. 3 видно, что у более стабильных белков из термофильных организмов алифатический индекс действительно существенно выше, чем у мезофильных белков.

Из рассмотренного материала вытекают следующие закономерности связи гидрофобных взаимодействий в белках с повышенной стабильно-

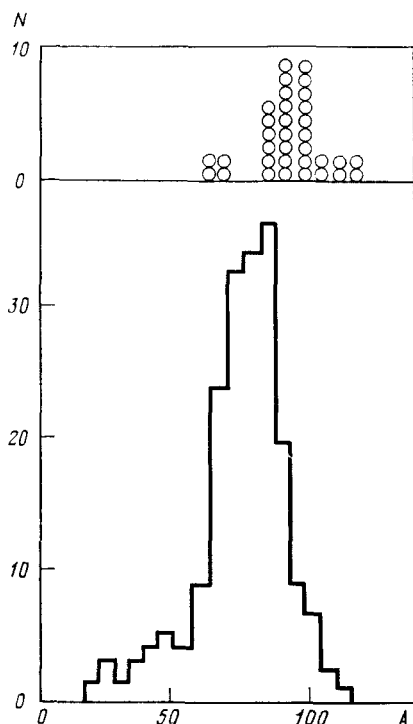


Рис. 3. Распределение величины алифатического индекса (A) среди 34 белков из термофильных бактерий (верхняя часть рисунка) и 208 белков мезофильных организмов (нижняя часть) [165]; N — число белков

стью. В самом общем виде можно сказать, что увеличение стабильности белков *in vivo* (например, термофильных ферментов) происходит не только и не столько ценой увеличения общей гидрофобности [166], сколько за счет более «правильного» расположения в глобуле неполярных аминокислот [167]. Иными словами, чем больше неполярных фрагментов белка спрятано внутрь глобулы и чем меньше их экспонировано в растворитель, тем белок стабильнее. Количественное описание этой картины дали Ли и Ричардс [147], которые ввели понятие «площади доступной (растворителю) поверхности». В работе [159] показано, что изменение суммарной свободной энергии гидрофобных взаимодействий в белке (ΔG_h) следующим образом зависит от изменения площади доступной поверхности (ΔA_s):

$$\Delta G_h = \sigma \cdot \Delta A_s$$

где σ — коэффициент пропорциональности, численно равный примерно 25 кал/моль·Å². Из уравнения следует, что уменьшение площади поверхности гидрофобного контакта с водой должно привести к усилению внутренних гидрофобных взаимодействий в белке и, следовательно, стабилизировать его. Это действительно наблюдается при сравнении термофильных ферментов с соответствующими мезофильными [168, 169], при сравнении структур ряда мезофильных гомологов [170], а также из анализа стабильности мутантно измененных белков [161, 171].

Подводя итоги этого раздела, отметим, что стабилизация белков путем усиления в них гидрофобных взаимодействий представляется весьма перспективным подходом для практики [19, 161]. Следует попытаться либо уменьшить гидрофобный характер поверхности белка, либо усилить его внутреннюю гидрофобность.

IV. НУЖНЫ ЛИ БИОТЕХНОЛОГИИ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ?

Применение в биотехнологии термостабильных биокатализаторов имеет ряд преимуществ [14—17, 172].

Выигрыш в скоростях процессов. Согласно правилу Вант Гоффа при повышении температуры на 10° скорость химических, в том числе и катализируемых ферментами, реакций возрастает в среднем в 2—3 раза.

Возможность сдвига термодинамического равновесия. Положение равновесия химической реакции зависит от температуры. Согласно принципу Ле-Шателье, повышая температуру, удастся сдвинуть равновесие в сторону синтеза для тех реакций, которые протекают с поглощением тепла (эндотермические реакции). К сожалению, термохимия ферментативных реакций, имеющих практическую значимость, изучена пока недостаточно подробно. В качестве примера важной реакции, для которой с ростом температуры равновесие сдвигается в неблагоприятную сторону, приведем образование пептидной связи [173]. Действительно, как показано в [174], лишь уменьшив температуру для катализируемого химотрипсином пептидного синтеза, удастся повысить выход конечного продукта — дипептида.

Увеличение продолжительности работы биокатализатора. В реально внедренных в практику биотехнологических процессах остаются высокими экономические затраты, приходящиеся на долю самих ферментов [175, 176]. Очевидно, что стабилизация ферментов позволяет снизить эти затраты путем продления срока их работы.

Высокая стабильность к другим денатурирующим воздействиям. Как правило, ферменты, стабильные к действию высоких температур, проявляют повышенную устойчивость также и к другим денатурирующим воздействиям: концентрированным растворам денатурантов, экстремальным значениям pH, деструкции протеазами. Это справедливо, например, для природных термостабильных ферментов из термофильных микроорганизмов [177, 178]. Практическая значимость такой универсальной стабилизации велика, так как ферментативную трансформацию многих природных соединений и препаративный синтез ряда веществ можно провес-

ти в нужном направлении только в органических растворителях или водно-органических смесях с высоким содержанием органической компоненты [179, 180].

Повышение эффективности катализируемого процесса за счет увеличения растворимости и летучести реагентов и уменьшения вязкости растворов при повышенных температурах. С увеличением температуры, как правило, возрастает растворимость исходных реагентов, что позволяет работать с их более концентрированными растворами и, согласно закону действующих масс, повысить абсолютные выходы конечных продуктов. Если в результате нагревания удалось существенно увеличить летучесть одного из конечных продуктов, то равновесие синтетической реакции сильно смещается в сторону конечных продуктов, и следовательно возрастает их выход. Уменьшение вязкости при нагревании позволяет ускорить, а значит повысить эффективность, тех процессов, в кинетике которых существенную роль играет диффузия.

Стерилизация продуктов в ходе реакции и уменьшение вероятности микробного заражения реакторов. С последним фактором всегда приходится считаться при проведении биотехнологических процессов, и при повышенных температурах его роль, как правило, удается существенно уменьшить.

Процесс легко остановить простым охлаждением.

Однако работа при повышенных температурах имеет и некоторые недостатки. Один из них — рост скорости некоторых побочных процессов, в первую очередь, высокотемпературного окисления [13], рацемизации аминокислот и их производных [181]. Поэтому экономически обоснованный выбор режима — высоко- или низкотемпературного — задача, имеющая самостоятельное решение для каждого конкретного случая [182].

V. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ

1. Поиск в мезофильных источниках ферментов с повышенной термостабильностью

Этот подход наиболее старый, традиционный и в специальных комментариях, по-видимому, не нуждается. Логическим его развитием явился поиск ферментов в источниках, которые самой природой приспособлены для существования в высокотемпературном режиме.

2. Выделение ферментов из термофильных источников

Гомогенный препарат термофильного фермента впервые получили 25 лет назад [183]. С тех пор неоднократно обсуждались достоинства использования термофильных ферментов в биотехнологии. Кроме тех преимуществ термостабильных биокатализаторов, о которых говорилось выше, и которые в равной степени относятся к термофильным ферментам, отметим еще один. Термофильные микроорганизмы предпочтительнее мезофильных с микробиологической точки зрения. Так, широкомасштабное выращивание термофильных штаммов несколько дешевле, чем мезофильных, из-за снижения энергетических затрат (не нужно охлаждать растущую биомассу) [172]. Важно и то, что хотя термофильные ферменты очень стабильны, они не достигли абсолютного предела стабильности: остается некоторый резерв для дополнительной стабилизации. Так, иммобилизовав термофильные аспарагиназу [172] и протеазу [184], удалось в 10 раз увеличить и без того высокую устойчивость этих ферментов к необратимой термoinактивации.

Тем не менее, в литературе практически отсутствуют сведения об использовании термофильных ферментов в биотехнологической практике. На наш взгляд, это связано с тем, что, хотя для термофильных ферментов максимальная каталитическая активность достигается при более высоких (на 20—40°) температурах, сами значения активностей в температурных оптимумах мезофильных и термофильных ферментов часто со-

впадают [48, 169, 185—188]. Сообщения о том, что в оптимуме температуры каталитическая активность термофильного фермента выше, чем у соответствующего мезофильного, появляются лишь эпизодически [189].

В температурных оптимумах не только равны величины каталитической активности термофильного и мезофильного фермента, но близки и их термостабильности [169]. Таким образом, при сравнении термофильных и мезофильных ферментов проявляется та же корреляция, которая ранее [190—194] была обнаружена для мезофильных белков: чем больше каталитическая активность, тем меньше стабильность белка. Иными словами, достигая большей стабильности, термофильным ферментам приходится частично жертвовать своей каталитической активностью [187].

С другой стороны, термофильные ферменты обладают свойством, которое делает их незаменимыми для целей биотехнологии: способностью изменять субстратную специфичность при варьировании температуры. Это свойство особенно ярко проявляется у тех ферментов (протеазы, нуклеазы и др.), которые действуют на высокомолекулярные субстраты. Причина состоит в том, что сами субстраты (т. е. белки и нуклеиновые кислоты) претерпевают температурно-зависимые конформационные изменения [195]; при этом в растворитель экспонируются все новые пептидные и нуклеотидные связи субстратов и становятся доступными действию ферментов. Появление такой новой специфичности [196] представит, по-видимому, интерес для бурно развивающейся генетической инженерии, которой необходим набор рестриктаз с различной специфичностью [197]. Можно надеяться, что термофильные рестриктазы станут новыми и высокоэффективными инструментами генетической инженерии.

3. Синтез высокостабильных ферментов при введении термофильной ДНК в мезофильную культуру

В конце 70-х гг. появились сообщения [198—200] о том, что если в клетки мезофила (например *Bacillus subtilis*) ввести ДНК родственного термофила (например, *Bacillus caldolyticus*), то при повышенной температуре мезофильная культура трансформируется в термофильную. При этом трансформант теряет способность расти при обычной температуре, но приобретает новое свойство — расти при повышенной температуре [198]. При этом весь биосинтетический аппарат трансформанта приобретает повышенную термостабильность [198, 199], и в клетке начинается синтез высокостабильных ферментов [200].

В начале 80-х гг. стали использовать [201, 202] другой вариант этого генетического подхода: в мезофильную культуру вводят не целиком молекулу термофильной ДНК, а лишь ее фрагмент — ген, кодирующий определенный белок. Несомненное достоинство этого подхода в том, что нужный стабильный фермент удастся получить с высоким выходом (даже в десятки раз большим, чем при выделении из термофильной культуры) [202]. Другое преимущество состоит в том, что существенно упрощаются операции выделения и очистки белка. Действительно, за счет того, что при повышенной температуре практически все белки, синтезируемые мезофильной культурой, за исключением нужного высокостабильного, денатурируют, удастся достичь высокой степени очистки белка ценой малых затрат времени и оборудования.

4. Метод белковой инженерии

В начале 70-х гг. впервые [203] были проведены успешные эксперименты по созданию рекомбинантной ДНК. Стало ясно, что в руках исследователей появился новый мощный инструмент для широкомасштабного получения природных соединений и синтеза не существующих в природе биологических молекул с широким спектром свойств. На этой основе сформировалось новое научно-техническое направление — генетическая инженерия. Под генетической инженерией понимают обычно конструиро-

вание *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), их введение в клетки и последующий биосинтез клетками несвойственных им биологических молекул. В настоящее время успехи генетической инженерии у нас в стране [204] и за рубежом [205, 206] общепризнаны, а перспективы обнадеживают.

Остановимся лишь на одном из вариантов генетико-инженерного подхода — сайт-направленном мутагенезе [54—58] или «белковой инженерии» [20]. Этот метод позволяет получать измененные белки, отличающиеся от белков-прототипов заменой, например, всего лишь одного аминокислотного остатка в определенном положении в его структуре. Для биотехнологии метод интересен прежде всего тем, что позволяет целенаправленно изменять структуру ферментов, их каталитические свойства и стабильность [20]. Рассмотрим как это делается.

Прежде всего устанавливают первичную структуру исходного фермента [103], а затем его третичную структуру [134]. Тогда становится возможной следующая стадия — выбор места замены аминокислотного остатка. Эта стадия не связана с такими трудоемкими операциями, как выращивание белковых кристаллов, определение аминокислотной последовательности или расшифровка рентгенограмм, которые приходится проводить на предыдущей стадии. Однако именно она является ключевой, поскольку определяет свойства конечного продукта. Далее нужно перейти с языка структуры белка (аминокислотной последовательности) к генетическому коду. Для этого в первичной структуре белка выбирают олигопептидный фрагмент (4—6 аминокислотных остатков), в середине которого находится аминокислота, подлежащая замене, и синтезируют [210] олигодезоксирибонуклеотид, включающий 12—18 оснований и кодирующий последовательность аминокислот в выбранном олигопептиде. Именно на этой стадии и программируется мутация: вместо нуклеотидного триплета, кодирующего «нативную аминокислоту», в синтетический олигонуклеотид путем химического синтеза вводят другой триплет, который кодирует новый (запланированный на предыдущей стадии) аминокислотный остаток. Дальнейшие операции сводятся к генетико-инженерным манипуляциям. Во-первых, находят (или создают искусственным путем) однонитевую плазмиду, в состав которой входит ген, кодирующий данный белок. Во-вторых, ферментативным путем, используя ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы, на основе однонитевой плазмиды и синтезированного нуклеотида создают гетеродуплексную двунитевую плазмиду. При этом олигонуклеотид иницирует синтез двунитевой области, выполняя роль затравки. Поскольку на однонитевых молекулах ДНК, как на матрицах, синтезируются гомодуплексные плазмиды наряду с гетеродуплексными, их разделяют, основываясь на различной устойчивости к нагреванию гомо- и гетеродуплексных плазмид. Затем гетеродуплексные двунитевые плазмиды вводят в удобную клетку-хозяин, в которой они превращаются в две гомодуплексные: одна содержит ген нативного белка, а другая — мутантного. На клеточном уровне проводят разделение двух генов и их последующее клонирование. Конечным результатом многостадийного процесса являются клетки-трансформанты, в которых осуществляется биосинтез мутантного белка, отличающегося от исходного заменой одного аминокислотного остатка в строго заданном месте.

Метод сайт-специфического мутагенеза появился в начале 80-х гг. и делает только первые шаги [20, 207]. Тем не менее даже первые достижения метода впечатляют. Рассмотрим некоторые из них, касающиеся получения стабилизированных белков.

В молекуле лизоцима фага Т4 нет S—S-связей, но имеются две SH-группы. Одна из них, принадлежащая остатку Cys-97, расположена в третичной структуре вблизи N-концевой области. Методом белковой инженерии остаток Ile-3 заменили на цистеин. Поскольку в третичной структуре мутантно измененного лизоцима остатки Cys-3 и Cys-97 оказались рядом, то в слабоокислительной среде в белке образовалась S—S-связь. Конформации нативного и мутантно измененного ферментов идентичны, не различаются и их каталитические свойства [139]. Однако му-

тантно измененный лизоцим отличается от нативного существенно более высокой термостабильностью (рис. 4). Причина такой стабилизации заключается в ужесточении структуры белка в результате введения S—S-связи [139]. Действительно, если в мутанто измененном лизоциме расщепить S—S-связь, то его стабильность практически неотличима от стабильности исходного белка (см. рис. 4).

Другим примером мутации, направленной на увеличение стабильности, служит α -субъединица триптофансинтазы. Было получено несколько форм фермента, отличающихся друг от друга тем, что аминокислотный остаток Glu-49, находящийся в гидрофобном ядре глобулы, заменяли на другую аминокислоту [208]. В результате таких замен не изменяется ни конформация, ни функциональная активность α -субъединицы триптофансинтазы. Однако белок оказывается тем стабильнее, чем более гидрофобная аминокислота была введена в положение 49. Из корреляции на

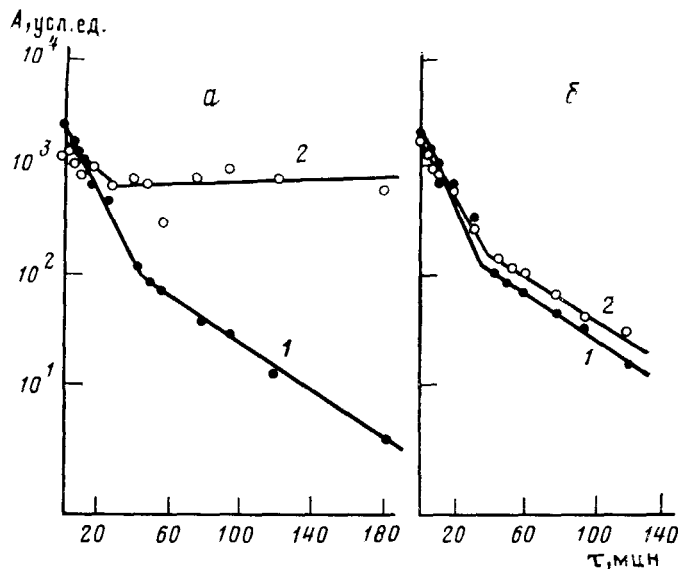


Рис. 4. Кинетика термoinактивации лизоцима Т4 дикого штамма (кривые 1) и лизоцима Т4 с заменой Пе-3→Сус и последующим окислением тетрапнатом натрия (кривые 2): в отсутствие (а) и в присутствии (б) 10 мМ β -меркаптоэтанола [139], А — каталитическая активность

рис. 5 следует, что метод сайт-специфического мутагенеза дает уникальную возможность увеличить внутреннюю гидрофобность (а значит и стабильность) белка путем замены полярных аминокислот на более гидрофобные. При этом естественно надо специально обращать внимание на то, что эти замены не должны нарушать компактную упаковку (конформацию) белка.

Пример того, как методом сайт-специфического мутагенеза можно получать белки, устойчивые к окислительной инактивации, дает работа [209]. В субтилилизине остаток Met-222, находящийся в районе активного центра, легко вступает в окислительные реакции, что приводит к инактивации фермента. Методом белковой инженерии его заменили на другие остатки, при этом активность фермента не очень сильно уменьшилась (в пределах 10 раз), но существенно возросла стабильность к инактивации H_2O_2 (рис. 6). Причина стабилизации в том, что убрав из активного центра легко окисляющийся остаток Met (заменив его на другие, менее склонные к окислению остатки Ser, Ala, Leu), удалось устранить саму причину окислительной инактивации [209].

Однако аппарат белковой инженерии непрост. Для успешной работы в этой области требуется кооперация специалистов по структуре и химии белка и нуклеиновых кислот, молекулярной и клеточной генетике и дру-

гим разделам биохимии и молекулярной биологии. Работу необходимо вести на высочайшем экспериментальном уровне с привлечением последних достижений в этих областях, требуются большие материальные затраты. Поэтому традиционные методы, такие как иммобилизация и химическая модификация, давно используемые для стабилизации ферментов, пока успешно конкурируют с белковой инженерией.

5. Иммобилизация ферментов

Созданию стабилизированных ферментных препаратов на основе метода иммобилизации посвящен ряд специальных обзоров [14—19]. Поэтому здесь мы остановимся лишь на главных достижениях иммобилизационного подхода.

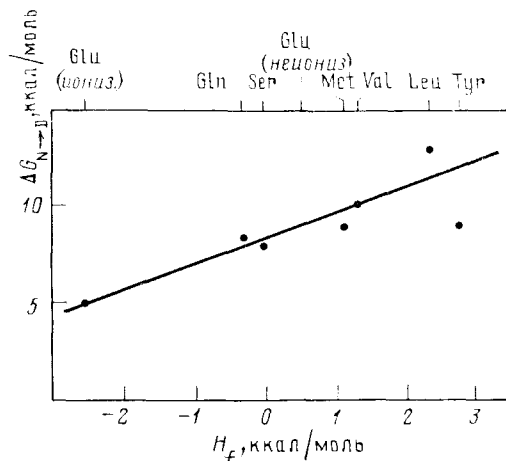


Рис. 5. Зависимость свободной энергии стабилизации ($\Delta G_{N \rightarrow D}$) нативной конформации α -субъединицы триптофансинтазы *Escherichia coli* от гидрофобности (H_f), аминокислотного остатка в положении 49 [208]; гидрофобности аминокислот соответствуют данным Тэйлора [150]

Еще в 1954 г. Ламри и Эйринг сформулировали [211] общие представления об инактивации ферментов, которые остаются справедливыми до сих пор [12, 13]. Инактивацию было предложено рассматривать как двустадийный процесс:



где N, D и I соответственно нативная, обратимо денатурированная и необратимо инактивированная формы фермента. Любая инактивация, как правило, начинается с обратимого конформационного изменения (стадия $N \rightleftharpoons D$ на схеме), которое часто охватывает всю глобулу. За обратимой стадией разворачивания следуют необратимые процессы ($D \rightarrow I$ на схеме), такие как агрегация [212], ковалентная модификация аминокислотных остатков [12, 13], и необратимые конформационные изменения [213—215].

Общий подход к стабилизации ферментов, основанный на методе иммобилизации, состоит в том, чтобы существенно затормозить или подавить первичное разворачивание белковой молекулы (стадию $N \rightleftharpoons D$ на схеме) [216]. Для этой цели наиболее плодотворным оказалось многоточечное присоединение молекулы белка к поверхности носителя [217, 218]. Такой иммобилизационный подход позволил в сотни и тысячи раз замедлить как обратимую [130, 219], так и необратимую [217, 218] термоинактивацию ферментов, их обратимое разворачивание под действием химических реагентов [220] и диссоциацию олигомерных ферментов на субъединицы, см. литературу к обзору [216].

Иммобилизационные подходы оказались также чрезвычайно полезными для подавления необратимых вторичных процессов (стадия $D \rightarrow I$

на схеме). Так, если инактивация обусловлена белок-белковыми взаимодействиями (агрегация или автолиз), то, иммобилизовав ферменты, ее, как правило, удается полностью предотвратить, см. обзоры [14—17, 62]. Иммобилизация также помогает защитить ферменты от инактивации химической модификацией. Такую защиту осуществляют двумя путями. Во-первых, фермент иммобилизуют внутри носителя, который «экранирует» его от контакта с инактивирующими молекулами. Примером такого подхода служит защита от окислительной инактивации гидрогеназ, включенных в полиэлектролитные носители [118]. Во-вторых, для иммобилизации подбирают носитель, содержащий функциональные группы, конкурирующие за вещество-инактиватор или вызывающие его разложение.

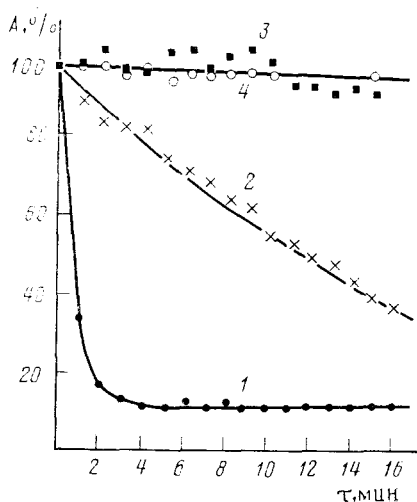


Рис. 6. Кинетика инактивации (под действием 1 М H_2O_2) субтилизина дикого типа (кривая 1) и мутантных форм, у которых в положении 222 находятся остатки Cys (кривая 2), Ala (кривая 3) или Ser (кривая 4) [209]; A — каталитическая активность

Например, если инактивация происходит под действием перекисных или супероксидных радикалов, то для защиты от них фермент иммобилизуют совместно с пероксидазой или каталазой, катализирующими разложение этих радикалов [13].

6. Химическая модификация ферментов

Первые удачные работы по стабилизации ферментов их химической модификацией были выполнены [221] в середине 50-х гг. До сих пор, однако, встречается мнение [65], что вряд ли можно сформулировать достаточно общие правила для получения стабилизированных ферментных препаратов путем химической модификации. Анализ многочисленных работ, выполненных в этом направлении, см. обзоры [18, 64—66], позволил нам прийти к некоторым выводам о причинах стабилизации белков при их ковалентной модификации.

В результате модификации белок иногда переходит в отличную от нативной, более стабильную конформацию [104, 105].

Стабилизация происходит при модификации «ключевых» функциональных групп [64] (их также называют группами II типа [66]).

Новые функциональные группы, введенные в белок в результате химической модификации, способны образовать дополнительные водородные связи или солевые мостики [222].

Химическая модификация неполярными соединениями усиливает в белках гидрофобные взаимодействия [223].

Гидрофилизация поверхностных групп белка приводит к уменьшению площади неблагоприятного контакта внешних гидрофобных остатков с водой [19].

Какие из перечисленных механизмов можно положить в основу общих подходов к стабилизации ферментов?

1. Вряд ли имеет смысл пытаться ковалентной модификацией перевести белок в другую, отличную от нативной и более стабильную конформацию. Дело в том, что характер конформационных изменений, вызванных модификацией, в подавляющем большинстве случаев непредсказуем.

2. Рассмотрим концепцию «ключевых функциональных групп» [64]. Эксперимент по химической модификации часто выглядит следующим образом: стабильность белка не меняется по мере увеличения степени модификации вплоть до достижения какого-то критического значения, при котором стабильность резко возрастает [224]. Наблюдаемой зависимости дается следующее объяснение [64, 66]: при малых степенях модификации (небольших избытках модифицирующего реагента) в белке затрагиваются, главным образом, те функциональные группы, которые лежат на поверхности и не играют важной роли в структуре и стабильности белка. Однако при большом избытке модифицирующего реагента модификации подвергаются некоторые функциональные группы в более глубоких слоях белковой глобулы. Модификация этих групп, названных «ключевыми», улучшает баланс внутримолекулярных взаимодействий в белке и стабилизирует его.

Реализация идеи о модификации «ключевых» функциональных групп в белке встречает однако ряд трудностей. Самая главная состоит в том, как выявить, какие функциональные группы являются «ключевыми». Сделать это *a priori*, например, исходя из пространственной структуры белка, вряд ли возможно. Единственный разумный путь — установить их эмпирически, т. е. изучая зависимость стабильности белка от концентрации модифицирующего агента (степени модификации). Проводить такие исследования надо исключительно тщательно, поскольку существует реальная опасность «не разглядеть», пропустить эти «ключевые» группы. Действительно, вслед за модификацией «ключевых» групп обычно затрагиваются более глубокие аминокислотные остатки в белке, что, как правило, дестабилизирует его [64, 66]. Поэтому, если в эксперименте случайно пропущено «ключевое» значение степени модификации белка, то эффект стабилизации вообще не удастся обнаружить. Кроме того для каждого конкретного белка и каждого нового типа функциональных групп (например, COOH —, NH_2 —, SH — и др.) эмпирический поиск «ключевых групп» надо проводить заново.

3. Можно попытаться ввести в молекулу белка путем его модификации полярные или заряженные группы, надеясь, что они завяжут с уже имеющимися в белке функциональными группами новые солевые мостики. К сожалению, реализовать этот подход на практике нелегко. Для этой цели следовало бы вооружиться картинками пространственной структуры белков и искать в них некомпенсированные полярные и заряженные группы, которые могли бы, в принципе, образовать новые водородные связи и электростатические взаимодействия. Затем в белке надо найти подходящую «якорную» группу, расположенную вблизи некомпенсированной полярной и заряженной группы. Выбрав или синтезировав подходящий химический реагент, в котором с одной стороны находилась бы группа, специфически реагирующая с якорной группой, а с другой стороны — расположенный на заданном расстоянии заряженный или полярный фрагмент, можно попытаться осуществить целенаправленную модификацию. Провести такой филигранный эксперимент не просто.

4. По мнению некоторых исследователей [223], стабильность белков можно увеличить путем их гидрофобизации. Однако экспериментально данные по влиянию гидрофобной модификации на стабильность белков противоречивы. Наряду со стабилизирующими эффектами [223] известны случаи, когда стабильность гидрофобизованных белков существенно ниже, чем у нативных [225—227]. Это кажущееся противоречие имеет следующее объяснение. Если на поверхность белка ввести гидрофобный остаток (например, CH_3 -группу), то это должно дестабилизировать белок. Действительно, в результате модификации белок приобретает по-

вый термодинамически невыгодный контакт гидрофобной CH_3 -группы с водой. Из этого общего правила есть однако исключения. Как мы отмечали выше, на поверхности белков наряду с полярными и заряженными аминокислотами имеются и гидрофобные, которые часто организуются в поверхностные гидрофобные кластеры [228, 229]. Если промодифицирована функциональная группа, находящаяся вблизи такого кластера, то модифицирующий агент подходящей длины закроет от контакта с растворителем этот кластер. Можно представить себе ситуацию, когда взаимодействие модифицирующего реагента с кластером не изменит или даже уменьшит площадь невыгодного контакта гидрофобной поверхности белка с водой. В любом случае, однако, в результате модификации появляется дополнительный контакт двух гидрофобных поверхностей. Это должно повысить стабильность белка [223].

В пользу такой точки зрения говорят также факты увеличения стабильности некоторых белков [230, 231] в результате комплексообразования с неполярными молекулами (бензолом, жирными кислотами). Взаимодействие белков с такими соединениями можно представить так, как это описано выше. Однако поскольку это относительно слабое, нековалентное взаимодействие, то комплекс белок-лиганд легко диссоциирует, если из системы удалить избыток неполярного вещества. Поэтому образование таких нековалентных комплексов вряд ли можно положить в основу общего метода стабилизации ферментов.

Особенно эффективной с точки зрения стабилизации должна быть модификация, позволяющая ввести молекулы неполярной природы внутрь гидрофобного ядра белка [19]. Суть подхода, позволяющего осуществить это, состоит в том, что исходным состоянием для модификации является не свернутая (нативная) конформация белка, а развернутое состояние (статистический клубок). К этому состоянию можно перейти, если подействовать на белок сильным денатурантом (мочевиной) с одновременным расщеплением S-S -связей [232] (в тех белках, в которых они есть). Структуру развернутого белка можно попытаться изменить согласно одному из трех предложенных путей. Во-первых, сворачивать его в «ненативных» условиях, т. е. нехарактерных для процесса сворачивания *in vivo*. Есть надежда, что белок свернется в другую конформацию — также каталитически активную, но с большей стабильностью. В частности, если проводить сворачивание в условиях, благоприятствующих усилению гидрофобных контактов (концентрированные растворы солей, повышенные температуры и т. п.), то, возможно, удастся получить конформацию белка, в которой неполярные аминокислоты будут более «правильно» упакованы (внутренность белка станет более гидрофобной, а поверхность более полярной). Во-вторых, сворачивать белок в присутствии веществ, которые могут с ним многоточечно нековалентно взаимодействовать. Здесь, на наш взгляд, наиболее перспективны соединения неполярной и дифильной природы. Первые могут захватываться внутрь гидрофобного ядра при сворачивании белка, а вторые «встраиваться» в сворачивающийся белок, контактируя своим неполярным фрагментом с гидрофобными областями в белке, а полярные или заряженные фрагменты экспонируя в растворитель. В-третьих, развернутый белок можно сначала модифицировать химическим реагентом, а потом свернуть.

В настоящее время описанный выше подход активно разрабатывается [233]. Остановимся только на одном экспериментальном результате. Имобилизованный трипсин переводили в развернутое состояние и далее сворачивали при разных температурах. Трипсин, свернувшийся при температуре 50° и выше, оказался [19] более термостабильным, чем исходный фермент или фермент, сворачивание которого проводили при обычных ($20\text{--}35^\circ$) температурах. Эти результаты согласуются с данными, полученными *in vivo* для термофильных микроорганизмов [46, 47, 234—236]. Эти организмы синтезируют два набора ферментов: стабильных и лабильных, причем при высоких температурах существенно выше содержание стабильных форм. «Высокотемпературные» и «низкотемпературные» белки, по-видимому, являются изоформами одних и тех же фермен-

тов, обладающих одинаковой первичной структурой [46, 47]. Следовательно, как и в модельных экспериментах, в зависимости от температуры биосинтеза белок *in vivo* также сворачивается либо в более, либо в менее стабильную конформацию.

5. И наконец, рассмотрим подход к стабилизации ферментов, который недавно был предложен нами [19] и в настоящее время успешно развивается [237, 238]. Он основан на предположении, что контактирование гидрофобных участков поверхности белка с водой термодинамически невыгодно и, следовательно, дестабилизирует белок. Идея подхода состоит в том, чтобы методом химической модификации уменьшить площадь контакта с водой гидрофобных кластеров на поверхности белка.

Прежде чем перейти к реализации этого подхода, необходимо выбрать критерий гидрофобности химических соединений. До сих пор при обсуждении влияния химической модификации на стабильность белков этому вопросу не уделяли достаточного внимания; см., например, обзоры [64—66]. Иногда вывод о том, привела ли химическая модификация белка к его гидрофобизации или гидрофилизации представляется очевидным и не требующим точных количественных оценок. В качестве примера очевидной гидрофобизации приведем модификацию α -химотрипсина алифатическими альдегидами [224]. Действительно, в этом случае аминокетты фермента после восстановления образующегося основания Шиффа трансформируются в $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$. Однако вряд ли из общих соображений даже качественно можно оценить, как изменяется гидрофильность аминокетты при ее модификации янтарным ангидридом (когда NH_2 -группа трансформируется в $-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$). Тем не менее такую модификацию часто относят к гидрофилизации.

В качестве количественного критерия гидрофобности мы выбрали предложенный Ганшем с сотр. [239, 240] коэффициент распределения P рассматриваемого соединения между водой и несмешивающейся органической фазой. Согласно этому критерию, чем более положительное значение P , т. е. чем более охотно вещество предпочитает органическую фазу перед водной, тем оно гидрофобнее. Основываясь на принципе аддитивности свободных энергий [241], можно рассчитывать гидрофобности различных функциональных групп и атомов. Например, гидрофобный инкремент атома Cl (π_{Cl}) рассчитывается на основании экспериментально определенных коэффициентов распределения двух соединений: хлористого бензола и бензола:

$$\pi_{\text{Cl}} = \log_{\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}} - \log_{\text{C}_6\text{H}_6} = 2,84 - 2,13 = 0,71$$

Основываясь на этом приеме, были рассчитаны [239, 240] гидрофобные инкременты наиболее часто встречающихся в биохимии функциональных групп и атомов (всего более 150). Некоторые значения π приведены в табл. 7. В свою очередь, этим путем можно решать и обратную задачу — оценивать гидрофобность сложных соединений.

Таблица 7

Параметры гидрофобности для некоторых химических групп [240]

Группа	π_{Ar}	π_{Alk}	Группа	π_{Ar}	π_{Alk}	Группа	π_{Ar}	π_{Alk}
H	0	0,23	OH	-0,67	-1,64	COOH	-0,32	-1,11
CH ₃	0,56	0,77	SH	0,39	-0,23	COO ⁻	-4,36	-5,19
C ₂ H ₅	1,02	1,43	OCH ₃	-0,02	-1,54	COCH ₃	-0,55	-1,13
CH(CH ₃) ₂	1,53	1,84	NHCH ₃	-0,47	-1,38	CO ₂ CH ₃	-0,01	-0,72
C ₃ H ₇	1,55	1,97	CN	-0,57	-1,27	C ₃ H ₇ COOH	-0,29	—
C ₆ H ₁₁	2,51	—	NO ₂	-0,28	-1,16	N(CH ₃) ₂	0,18	-0,64
C ₆ H ₅	1,96	1,90	NH ₂	-1,23	-1,54	N ⁺ (CH ₃) ₃	-5,96	—

* Значение π для заместителя в ароматическом ядре.

** Значение π для заместителя в алифатическом соединении.

Мы предлагаем применить вышеописанный подход [239, 240] для оценки вклада, который вносит химический реагент (модификатор) в изменение гидрофобности белка. Количественный анализ этого аспекта позволяет по-новому взглянуть на некоторые экспериментальные данные по химической модификации белков. Так, окисление остатка Met-192 в α -химотрипсине до более гидрофильной формы $S(O)CH_3$ приводит к увеличению конформационной стабильности белка на 2,1 ккал/моль. С другой стороны, разница в инкрементах свободной энергии экстракции этих групп из воды в органический растворитель — $2,3RT(\pi_{SOCH_3} - \pi_{SCH_3})$ составляет весьма близкую величину 2,5 ккал/моль ([240], с. 52). На этом основании можно предположить, что стабилизация химотрипсина, наблюдаемая при окислении всего лишь одного остатка Met [242], обусловлена именно гидрофилизацией поверхностного гидрофобного кластера в белке.

Другим примером гидрофилизации служит модификация аминогрупп белка (например, *o*-метилизомочевинной) с переводом их в аргининоподобные структуры. Из табл. 6 видно, что Arg несколько более гидрофилен, чем Lys. Поэтому многочисленные примеры [243—248] стабилизации белков при гуанидинировании остатков Lys можно объяснить уменьшением поверхности гидрофобного контакта белка с водой.

Большого эффекта стабилизации удалось добиться путем аминирования остатков тирозина в трипсине [237]. В молекуле этого фермента четыре остатка тирозина расположены на поверхности [249]. Появление в ароматическом кольце тирозина аминогруппы увеличивает его гидрофильный характер на 1,24 ккал/моль. В результате такой гидрофилизации стабильность по отношению к необратимой денатурации трипсина, в котором промодифицированы два и более тирозильных остатка, возросла более, чем в 100 раз [237].

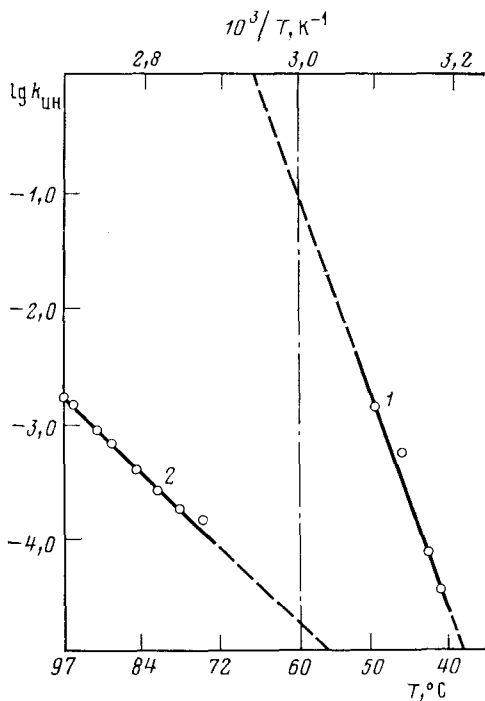


Рис. 7. Температурная зависимость констант скорости термоннактизации ($k_{ин}$) нативного α -химотрипсина (прямая 1) и α -химотрипсина, модифицированного диангидридом пиромеллитовой кислоты (прямая 2); степень модификации ацилированного препарата максимальная [238]

Метод стабилизации, направленный на гидрофилизацию поверхностных гидрофобных кластеров в белке [19], достиг наиболее значительных успехов при ацилировании α -химотрипсина диангидридом пиромеллитовой кислоты [238]. Показано, что модификация затрагивает, в основном, аминогруппы белка, причем при модификации каждой группы в молекулу фермента вводится три новых карбоксильных группы. Таким образом, препарат с максимальной степенью модификации обогащен по

крайней мере на 50 групп COOH [238]. При слабощелочных pH (условия термоинактивации) все карбоксилы депротонированы и, следовательно, достигнута весьма существенная гидрофилизация поверхности белка (см. табл. 7). Модифицированный фермент настолько стабильнее нативного, что экспериментально не удается подобрать температуру, при которой кинетику инактивации этих двух препаратов можно сравнить. Чтобы все-таки оценить разницу в их стабильности, экспериментальные данные (рис. 7) пришлось экстраполировать к некоторому среднему значению температуры. При температуре 60°, например, эффект стабилизации составляет более, чем 10³, а с повышением температуры, как видно из рис. 7, становится еще больше.

Таким образом, гидрофилизация поверхности химотрипсина (введением большого числа карбоксилатных анионов) позволяет достичь [238] огромных стабилизационных эффектов. Раньше эффекты такого порядка наблюдались только при многоточечном связывании фермента с поверхностью носителя [130, 217, 218]; см. также обзоры [11—19]. Тысяче- (и более) кратные стабилизационные эффекты [238] являются пока рекордными при использовании низкомолекулярных модификаторов белка. Модифицированный пиромеллитовым диангидридом химотрипсин по стабильности не уступает протеазам из экстремальных термофилов [250], наиболее стабильным из всех известных к настоящему времени протеолитическим ферментам.

* * *

В настоящем обзоре мы попытались ответить на два вопроса. Во-первых, как выявить структурные детерминанты стабильности белка (т. е. те структурные особенности, внутри- и межмолекулярные взаимодействия, которые обеспечивают белкам повышенную стабильность). И, во-вторых, какие подходы и методические приемы надо использовать, чтобы, зная эти структурные детерминанты стабильности белков, получить стабилизированные препараты ферментов для биотехнологии. Мы не разделяем чувства пессимизма, которое часто высказывается по поводу возможности познать молекулярные причины стабильности белков и применить их на практике для создания стабилизационных подходов. Наоборот, успехи, достигнутые к настоящему времени, весьма обнадеживают. Мы уверены, что новые методы и идеи (некоторые из них обсуждены или предложены в настоящем обзоре) дадут дополнительный импульс для работы в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шульц Г., Ширмер Г. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982. 354 с.
2. Ptitsyn O. B., Finkelstein A. V. Quart. Rev. Biophys., 1980, v. 13, p. 339.
3. Merrifield R. B. Adv. Enzymol., 1969, v. 32, p. 221.
4. Katchalski-Katzir E., Freeman A. Trends in Biochem. Sci., 1982, v. 7, p. 427.
5. Введение в прикладную энзимологию/Под ред. Березина И. В., Мартиника К. М.: Изд-во МГУ, 1982. 382 с.
6. Химическая энзимология/Под ред. Березина И. В., Мартиника К. М.: Изд-во МГУ, 1983. 276 с.
7. Klibanov A. M. Science, 1983, v. 219, p. 722.
8. Мартинек К. В кн.: Биотехнология/Под ред. Баева А. А., М.: Наука, 1984. 411 с.
9. Handbook of Enzyme Biotechnology/Ed. Wiseman A., II ed. L.: Halsted Press, 1985. 562 p.
10. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology/Ed. Wiseman A. L.: John Wiley, 1977—1985, v. 1—11.
11. Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes./Ed. Colowick S. P., Kaplan N. O.: N. Y.: Academic, Pt A, 1976, v. 44; Pt B—D, 1987, v. 135—137.
12. Mozhaev V. V., Martinek K. Enzyme Microbial Technol., 1982, v. 4, p. 299.
13. Klibanov A. M. Adv. Appl. Microbiol., 1983, v. 29, p. 1.
14. Martinek K., Klibanov A. M., Berezin I. V. J. Solid-Phase Biochem., 1978, v. 2, p. 343.
15. Klibanov A. M. Analyt. Biochem., 1979, v. 92, p. 1.
16. Мартинек К., Березин И. В. Успехи химии, 1980, т. 49, с. 737.
17. Martinek K., Mozhaev V. V., Berezin I. V. In: Enzyme Engineering-Future Directions/Ed. Wingard L. B., Jr., Berezin I. V. N. Y.: Plenum: 1980, p. 3.
18. Schmid R. D. Adv. Biochem. Engin., 1979, v. 12, p. 41.
19. Mozhaev V. V., Martinek K. Enzyme Microbial Technol., 1984, v. 6, p. 50.
20. Ulmer K. M. Science, 1983, v. 219, p. 666.

21. Wallace R. B., Schold M., Johnson M. J., Dembek P., Ilakura K. *Nucleic Acid Res.*, 1981, v. 9, p. 3647.
22. Zoller M. J., Smith M. *Nucleic Acid Res.*, 1982, v. 10, p. 6487.
23. Бресслер С. Е., Талмуд Д. Л. Докл. АН СССР, 1944, т. 43, с. 326, 367.
24. Finney J. L., Gellatly B. J., Golton I. C., Goodfellow J. *Biophys. J.*, 1980, v. 32, p. 17.
25. Брандтс Д. Ф. В сб.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М.: Мир, 1973, с. 174.
26. Кушнер В. П. Конформационная устойчивость и денатурация биополимеров. Л.: Наука, 1977. 254 с.
27. Privalov P. L. *Adv. Prot. Chem.*, 1979, v. 33, p. 167.
28. Bigelow C. C. *J. Theor. Biol.*, 1967, v. 16, p. 187.
29. Goldsack D. E. *Biopolymers*, 1970, v. 9, p. 247.
30. Bull H. B., Breese K. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, v. 156, p. 604.
31. Ponnuswamy P. K., Muthusamy R., Manavalan P. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1982, v. 4, p. 186.
32. Smith E. L. In: *The Enzymes* v. 1/Ed. Boyer P. D. III ed., N. Y.: Academic, 1970, p. 267.
33. Lesk A. M., Chothia C. J. *Mol. Biol.*, 1980, v. 136, p. 225.
34. Warne P. K. *Biochemistry*, 1975, v. 14, p. 3518.
35. Wong A. K. C., Liu T. S., Wang C. C. *J. Mol. Biol.*, 1976, v. 102, p. 287.
36. Olsen K. W., Moras D., Rossman M. G., Harris J. I. *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, p. 9313.
37. Brock T. D. *Science*, 1967, v. 158, p. 1012.
38. Singleton R., Jr., Amelunxen R. E. *Bacteriol. Rev.*, 1973, v. 37, p. 320.
39. *Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms*/Ed. Zuber H. Berlin: Birkhauser verlag, 1976. 372 p.
40. *Extreme Environments: Mechanisms of Microbial Adaptation*/Ed. Heinrich M. R. N. Y.: Academic, 1976. 526 p.
41. Логинова Л. Г., Егорова Л. А. Новые формы термофильных бактерий. М.: Наука, 1977. 175 с.
42. *Microbial Life in Extreme Environments*/Ed. Kushner D. J. L.: Academic, 1978. 468 p.
43. Brock T. D. *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperature*. N. Y.: Springer, 1978. 465 p.
44. *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*/Ed. Shilo M. Weinheim: Chemie verlag, 1978. 513 p.
45. *Biochemistry of Thermophily*/Ed. Friedman S. M. N. Y.: Academic, 1978. 338 p.
46. Amelunxen R. E., Murdock A. L. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 1978, v. 6, p. 343.
47. Ljungdahl L. G. In: *Advances in Microbial Physiology*/Ed. Rose A. H., Morris J. G. N. Y.: Academic, 1979, v. 19, p. 149.
48. Jaenicke R. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1981, v. 10, p. 1.
49. Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, с. 1445.
50. Orgel L. E. *Adv. Enzymol.*, 1965, v. 27, p. 289.
51. Schlesinger M. J. In: *The Enzymes*, v. 1/Ed. Boyer P. D. III ed., N. Y.: Academic, 1970, p. 241.
52. Волькенштейн М. В. *Молекуляр. биология*, 1985, т. 19, с. 55.
53. Anfinsen C. B., Corley L. F. *J. Biol. Chem.*, 1969, v. 244, p. 5149.
54. Hutchinson C. A., Phillips S., Edgell M. H., Gillam S., Janke P., Smith M. J. *Biol. Chem.*, 1978, v. 253, p. 6551.
55. Zoller M. J., Smith M. *Methods Enzymol.*, 1983, v. 100, p. 468.
56. Winter G., Fersht A. R. *Trends Biotechnol.*, 1984, v. 2, p. 115.
57. Winter G., Fersht A. R., Wilkinson A. J., Zoller M., Smith M. *Nature*, 1982, v. 299, p. 756.
58. Dalbadie-McFarland G., Neitzel J., Riggs A. D., Richards J. H. In: *Enzyme Engineering*/Ed. Laskin A. I., Tsao G. T., Wingard L. B., Jr. N. Y.: New York Academy of Sciences, 1984, v. 7, p. 232.
59. Katchalski E., Silman I., Goldman R. *Adv. Enzymol.*, 1971, v. 34, p. 445.
60. Sundaram P. V., Pye E. K. In: *Enzyme Engineering*, v. 2/Ed. Pye E. K., Wingard L. B., Jr. N. Y.: Plenum, 1974, p. 449.
61. Zaborsky O. R. *Immobilized Enzymes*. Cleveland: CRC Press, 1973.
62. Martinek K., Mozhaev V. V. *Adv. Enzymol.*, 1985, v. 57, p. 179.
63. Bickerstaff G. F. In: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*/Ed. Wiseman A. L.: John Wiley, 1984, v. 9, p. 162.
64. Torchilin V. P., Martinek K. *Enzyme Microbial Technol.*, 1979, v. 1, p. 74.
65. Branner-Jorgensen S. *Biochem. Soc. Transact.*, 1983, v. 11, p. 20.
66. Кутузова Г. Д., Угарова Н. Н., Березин И. В. *Успехи химии*, 1984, т. 53, с. 1852.
67. Herriott R. M. *Adv. Prot. Chem.*, 1947, v. 3, p. 169.
68. Cecil R., McPhee J. R. *Adv. Prot. Chem.*, 1959, v. 14, p. 255.
69. Fraenkel-Conrat H. In: *The Enzymes*, v. 1/Ed. Boyer P. D. II ed., N. Y.: Academic, 1959, p. 589.
70. Cohen L. A. *Annu. Rev. Biochem.*, 1968, v. 37, p. 695.
71. Shaw E. In: *The Enzymes*, v. 1/Ed. Boyer P. D. III ed. N. Y.: Academic, 1970, p. 91.
72. Cohen L. A. *Ibid.*, 1970, p. 147.
73. Spande T. F., Witkop B., Degani Y., Patchornik L. A. *Adv. Prot. Chem.*, 1970, v. 24, p. 97.
74. Stark G. R. *Adv. Prot. Chem.*, 1970, v. 24, p. 261.

75. *Habeeb A. F. S. A.* In: Chemistry of the Cell Interface, Pt B./Ed. Brown H. D. N. Y.: Academic, 1971, p. 259.
76. *Means C. E., Feeney R. E.* Chemical Modification of Proteins. San Francisco: Holden Day, 1971. 254 p.
77. *Riordan J. F., Sokolovsky M.* Accounts Chem. Res., 1971, v. 4, p. 353.
78. *Freedman R. B.* Quart. Rev. Chem. Soc., 1971, v. 25, p. 431.
79. *Friedman M.* The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Groups in Amino Acids, Peptides and Proteins. Elmsford: Pergamon, 1973. 485 p.
80. *Jocelyn P. C.* Biochemistry of the SH Group. L.: Academic, 1972, 404 p.
81. *Торчинский Ю. М.* Сера в белках. М.: Наука, 1977. 302 с.
82. *Thomas J. O.* In: Comparison to Biochemistry. Selected Topics for Further Study/Eds. Bull A. T., Laguado J. R., Thomas J. O., Tipton K. F. L.: Longman, 1974, p. 87.
83. *Heinrikson R. L., Kramer K. J.* In: Progress in Bioorganic Chemistry v. 3./Ed. Kaiser E. T., Kezdy F. J. N. Y.: Wiley and Sons, 1974, p. 141.
84. *Feeney R. E., Osuga D. T.* In: Methods of Protein Separation, v. 1/Ed. Catsipoolas N. N. Y.: Plenum, 1975, p. 127.
85. *Glazer A. N.* In: The Proteins, v. 2/Ed. Neurath H., Hill R. L. N. Y.: Plenum, 1976, p. 1.
86. *Atassi M. Z.* In: Immunochemistry of Proteins, v. 1/Ed. Atassi M. Z. N. Y.: Plenum, 1977, p. 1.
87. *Brocklehurst K.* Int. J. Biochem., 1979, v. 10, p. 259.
88. *Moore B. R., Free S. J.* Int. J. Biochem., 1985, v. 17, p. 283.
89. *Lundblad R. L., Noyes C. M.* Chemical Reagents for Protein Modification. Boca Raton: CRC Press, 1985.
90. *Jori G., Galliazzo G., Marzotto A., Scoffone E.* Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 154, p. 1.
91. *Previero A., Coletti-Previero A., Cavadore J.-C.* Ibid., 1967, v. 147, p. 453.
92. *Kress L. F., Noda L. J.* Biol. Chem., 1967, v. 242, p. 558.
93. *Gounaris A. D., Perlmann G. E. J.* Biol. Chem., 1967, v. 242, p. 2739.
94. *Takahashi K. J.* Biol. Chem., 1968, v. 243, p. 6171.
95. *Schmir G. L., Jones W. M., Cohen L. A.* Biochemistry, 1965, v. 4, p. 539.
96. *Riordan J. F., Vallee B. L.* Biochemistry, 1964, v. 3, p. 1768.
97. *Nieto M. A., Palacian E.* Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 749, p. 204.
98. *Lottspeich F., Henschen A., Hupe K.-P., Lottspeich F., Voelter W.* Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1985, p. 139.
99. *Ellman G. L.* Arch. Biochem. Biophys., 1959, v. 82, p. 70.
100. *Barman T. E., Koshland D. E., Jr. J.* Biol. Chem., 1967, v. 242, p. 5771.
101. *Fields R.* Biochem. J., 1971, v. 124, p. 581.
102. *Sokolovsky M., Vallee B. L.* Biochemistry, 1966, v. 5, p. 3574.
103. *Methods in Enzymology, Enzyme Structure/Ed. Colowick S. P., Kaplan N. O.* N. Y.: Academic, 1967, v. 11.
104. *Urabe I., Nanjo H., Okada H.* Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 302, p. 73.
105. *Tsai C. S., Tsai Y.-H., Lauzon G., Chen S. T.* Biochemistry, 1974, v. 13, p. 440.
106. *Qasim M. A., Salahuddin A.* Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 536, p. 50.
107. *Dahlqvist-Edberg U.* Acta Chem. Scand., 1984, B 38, S. 267.
108. *Barker S. A., Gray C. J., Lomath A. W.* Biochem. Soc. Transact., 1979, v. 7, p. 5.
109. *Schellman J. A.* Biopolymers, 1976, v. 15, p. 999.
110. *Citri N.* Adv. Enzymol., 1973, v. 37, p. 397.
111. *Royer G. P., Uy R. J.* Biol. Chem. 1973. v. 248, p. 2627.
112. *Sandermann H. Y.* Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 515, p. 209.
113. *Klotz J. M., Langerman N. R., Darnall D. W.* Annu. Rev. Biochem., 1970, v. 39, p. 25.
114. *Chothia C., Janin J.* Nature, 1975, v. 256, p. 705.
115. *Boyer P. D., Ballou G. A., Luck J. M. J.* Biol. Chem., 1947, v. 167, p. 407.
116. *Singer S. J., Nicholson G. L.* Science, 1972, v. 175, p. 720.
117. *Chothia C.* Nature, 1975, v. 254, p. 304.
118. *Klibanov A. M., Kaplan N. O., Kamen M. D.* Arch. Biochem. Biophys., 1980, v. 199, p. 545.
119. *Уваров В. Ю., Бачманова Г. И., Арчаков А. И., Сухомудренко А. Г., Мясоедова К. Н.* Биохимия, 1980, т. 45, с. 1463.
120. *Lee M. B., Bolger C. D., Bridges C. M.* Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 242, p. 226.
121. *Ogasahara K., Yutani K., Imanishi A., Isemura T. J.* Biochem., 1970, v. 67, p. 83.
122. *Williams R. J. P.* Biol. Rev., 1979, v. 54, p. 389.
123. *Karplus M., McCammon J. A.* CRC Crit. Rev. Biochem., 1981, v. 9, p. 293.
124. *Privalov P. L., Tsalkova T. N.* Nature, 1979, v. 280, p. 693.
125. *McElhaney R.* Curr. Top. Membrane and Transport, 1982, v. 17, p. 317.
126. *De Kruyff B., van Dijk P. W. M., Goldbach R. W., Demel R. A., van Deenen L. L. M.* Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 330, p. 269.
127. *Welker N. E.* In: Extreme Environments. Mechanisms of Microbial Adaptation/Ed. Heinrich M. R. N. Y.: Academic, 1976. p. 229.
128. *Brock T. D.* Nature, 1967, v. 214, p. 882.
129. *Александров В. Я.* Клетки, макромолекулы и температура. Л.: Наука, 1975. 253 с.
130. *Mozhaev V. V., Siksnis V. A., Torchilin V. P., Martinek K.* Biotechnol. Bioengin., 1983, v. 25, p. 1937.
131. *Perutz M. F.* Science, 1978, v. 201, p. 1187.

132. Barlow D. J., Thornton J. M. J. Mol. Biol., 1983. v. 168, p. 867.
133. Walker J. E. In: Proteins: Structure, Function and Industrial Applications/Ed. Hofmann E. Oxford: Pergamon, 1978, p. 211.
134. Бландел Т., Джонсон Л. Кристаллография белка. М.: Мир, 1979.
135. Schellman J. A. Compt. rend. Ser. Chim., 1955, v. 29, p. 230.
136. Flory P. J. J. Amer. Chem. Soc., 1956, v. 78, p. 5222.
137. Thornton J. M. J. Mol. Biol., 1981, v. 151, p. 261.
138. Martinek K., Torchilin V. P. Methods Enzymol., 1987, in press.
139. Perry L. J., Wetzel R. Science, 1984, v. 226, p. 555.
140. Richards F. M. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1977, v. 6, p. 151.
141. Klibanov A. M., Kaplan N. O., Kamen M. D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 3640.
142. Kolaskar A. S., Ramabrahman V. Int. J. Biol. Macromol., 1981. v. 3, p. 171.
143. Kauzmann W. Adv. Prot. Chem., 1959, v. 14, p. 1.
144. Scheraga H. A. In: The Proteins/Ed. Neurath H., II ed. N. Y.: Academic, 1963, v. 1.
145. Tanford C. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, II ed. N. Y.: John Wiley, 1980. 175 p.
146. Teeter M. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, p. 6014.
147. Lee B., Richards F. M. J. Mol. Biol., 1971, v. 55, p. 379.
148. Hvidt A. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1983, v. 12, p. 1.
149. Tanford C. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 84, p. 4240.
150. Nozaki Y., Tanford C. J. Biol. Chem., 1971, v. 246, p. 2211.
151. Jones D. D. J. Theor. Biol., 1975, v. 50, p. 167.
152. Janin J., Chothia C. J. Mol. Biol., 1976, v. 105, p. 1.
153. Ponnuswamy P. K., Prabhakaran M., Manavalan P. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 623, p. 301.
154. Singleton R., Jr. In: Extreme Environments. Mechanisms of Microbial Adaptation/Ed. Heinrich M. R. N. Y.: Academic, 1976, p. 189.
155. Stellwagen E., Wilgus H. In: Biochemistry of Thermophily/Ed. Friedman S. M. N. Y.: Academic, 1978, p. 223.
156. Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K. T., Himes R. H., Akagi J. M. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, p. 5215.
157. Howard R. L., Becker R. R. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 3186.
158. Waugh D. F. Adv. Prot. Chem., 1954, v. 9, p. 326.
159. Creighton T. E. In: Proteins. N. Y.: W. H. Freeman, 1983. 583 p.
160. Srere P. A. Trends Biochem. Sci., 1984, v. 9, p. 387.
161. Stellwagen E. In: Enzyme Engineering/Eds. Laskin A. I., Tsao G. T., Wingard L. B., Jr. N. Y.: Acad. Sci., 1984, v. 7, p. 1.
162. Rackovsky S., Scheraga H. A. Proc. Nat. Acad. Sci., 1977, v. 74, p. 5248.
163. Janin J. Nature, 1979, v. 277, p. 491.
164. Manavalan P., Ponnuswamy P. K. Arch. Biochem. Biophys., 1977, v. 184, p. 476.
165. Ika A. J. Biochem., 1980, v. 88, p. 1895.
166. Merkle D. J., Farrington C. K., Wedler F. C. Int. J. Peptide Protein Res., 1981, v. 18, p. 430.
167. Round Table and General Discussion on Structure and Function of Thermophilic Enzymes and Proteins. In: Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms/Ed. Zuber H. Basel: Birkhauser, 1976, p. 354.
168. Argos P., Rossmann M. G., Grau U. M., Zuber H., Frank G., Tratschin J. D. Biochemistry, 1979, v. 18, p. 5698.
169. Zuber H. In: Structural and Functional Aspects of Enzyme Catalysis/Ed. Eggerer H., Huber R. Berlin: Springer, 1981, p. 114.
170. Olsen K. W., Thornton N. L., Hamrick-Turner J., Herrera A. H. Fed. Proc., 1983, v. 42, p. 1996.
171. Grütter M. G., Hawkes R. B. Naturwissensch., 1983, B. 70, S. 434.
172. Daniel R. M., Cowan D. A., Morgan H. W. Chemistry in New Zealand, 1981, v. 45, p. 94.
173. Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983. 367 с.
174. Nilsson K., Mosbach K. Biotechnol. Bioeng., 1984, v. 26, p. 1146.
175. Lilly M. D., Aunstrup K. In: Applied Biochemistry and Bioengineering/Ed. Wingard L. B., Jr., Katchalski E., Goldstein L. N. Y.: Academic, 1979, v. 2, p. 1, 28.
176. Беккер М. Е. Биотехнология микробного синтеза. Рига: Зинатне, 1980.
177. Oshima T. In: Enzyme Engineering/Ed. Broun G. B., Nancke G., Wingard L. B., Jr. N. Y.: Plenum, 1978, v. 4, p. 41.
178. Veronese F., Boccu E., Schiavon O., Grandi C., Fontana A. J. Appl. Biochem. 1984, v. 6, p. 39.
179. Мартинек К., Семенов А. Н. Успехи химии, 1981, т. 50, с. 1376.
180. Fukui S., Tanaka A. Endeavour, 1985, v. 9, p. 10.
181. Schwass D. E., Finley J. W. J. Agric. Food Chem., 1984, v. 32, p. 1377.
182. Sonnleitner B., Grueninger H., Lajorce R., Baier U., Fiechter A. Proc. Third Europ. Congress Biotechnol., Weinheim: Chemie Verlag, 1984, v. 1, p. 29.
183. Manning G. B., Campbell L. L. J. Biol. Chem., 1961, v. 236, p. 2952.
184. Cowan D. A., Daniel R. M. Biotechnol. Bioeng., 1982, v. 24, p. 2053.
185. Ljundahl L. G., Sherod D. In: Extreme Environments. Mechanisms of Microbial Adaptation/Ed. Heinrich M. R. N. Y.: Academic, 1976, p. 147.
186. Zuber H. In: Biochemistry of Thermophily/Ed. Friedman S. M. N. Y.: Academic, p. 267.

187. Zuber H. In: Strategies of Microbial Life in Extreme Environments/Ed. Shilo M. Weinheim, Chemie verlag, 1979, p. 393.
188. Fontana A. Proc. Third Europ. Congress Biotechnol. Weinheim: Chemie, 1984, v. 1, p. 221.
189. Cass K. H., Stellwagen E. A. Arch. Biochem. Biophys., 1975, v. 171, p. 682.
190. Jolles J., Dianoux A. C., Hermann J., Niemann B., Jolles P. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 128, p. 568.
191. Osborne W. R. A., Tashian R. E. Biochem. J., 1974, v. 141, p. 219.
192. McLendon G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, v. 77, p. 959.
193. Pfeil W. Mol. Cell. Biochem., 1981, v. 40, p. 3.
194. Wiseman A. Biochem. Soc. Transact., 1983, v. 11, p. 18.
195. Edelhoch H., Osborne J. C., Jr. Adv. Prot. Chem., 1976, v. 30, p. 183.
196. McConnel D. J., Searcy D. G., Sutcliffe J. G. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, p. 1729.
197. Янулайтис А. А. Журн. Всесоюзн. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1984, т. 29, с. 133.
198. Friedman S. M., Mojica-a T. In: Biochemistry of Thermophily/Ed. Friedman S. M. N. Y.: Academic, 1978, p. 179.
199. Johnson E. J. In: Strategies of Microbial Life in Extreme Environments/Ed. Shilo M. Weinheim: Chemie, 1978, p. 471.
200. Amelunxen R. E., Murdock A. L. In: Microbial Life at Extreme Environments/Ed. Kushner D. L.: Academic, 1978, p. 217.
201. Tanaka T., Kawano N., Oshima T. J. Biochem. 1981, v. 89, p. 677.
202. Hirata H., Negoro S., Okada H. Appl. Environm. Microbiol., 1985, v. 49, p. 1547.
203. Jackson D. A., Symons R. H., Berg P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, p. 2904.
204. Баев А. А. Журн. Всесоюзн. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1984, т. 29, с. 124.
205. Methods in Enzymology, Recombinant DNA, Pt A/Ed. Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Academic, 1979, v. 68.
206. Methods in Enzymology, Recombinant DNA, Pt B/Ed. Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Academic, 1983, p. 100.
207. Yanchinski S. New Scientist, 1984, v. 103, p. 27.
208. Yutani K., Ogasahara K., Aoki K., Kakuno T., Sugino Y. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, p. 14076.
209. Estell D. A., Graycar T. P., Wells J. A. J. Biol. Chem., 1985, v. 260, p. 6518.
210. Alvarado-Urbina G., Sathe G. M., Liu W.-C., Gillen M. F., Duck P. D., Bender R., Ogilvie K. K. Science, 1981, v. 214, p. 270.
211. Lumry R., Eyring H. J. Phys. Chem., 1954, v. 58, p. 110.
212. Жолы М. Физическая химия денатурации белков. М.: Мир, 1968. 361 с.
213. Мартинек К., Можаяев В. В., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1978, т. 239, с. 483.
214. Klibanov A. M., Mozhaev V. V. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, v. 83, p. 1012.
215. Martinek K., Mozhaev V. V., Berezin I. V. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 615, p. 426.
216. Аренс А. К., Березин И. В., Кулис Ю. Ю., Мартинек К., Можаяев В. В., Полторацк О. М., Торчилин В. П., Чухрай Е. С. Докл. АН СССР, 1985, т. 283, с. 1212.
217. Martinek K., Klibanov A. M., Goldmacher V. S., Berezin I. V. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 485, p. 1.
218. Martinek K., Klibanov A. M., Goldmacher V. S., Tchernysheva A. V., Mozhaev V. V., Berezin I. V., Glotov B. O. Ibid., 1977, v. 485, p. 13.
219. Koch-Schmidt A.-C., Mosbach K. Biochemistry, 1977, v. 16, p. 2105.
220. Gabel D. Europ. J. Biochem., 1973, v. 33, p. 348.
221. Sri Ram J., Terminiello L., Bier M., Nord F. F. Arch. Biochem. Biophys., 1954, v. 52, p. 464.
222. Müller J. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 669, p. 210.
223. Shatsky M. A., Ho H. C., Wang J. H. Ibid., 1973, v. 303, p. 298.
224. Torchilin V. P., Maksimenko A. V., Smirnov V. N., Berezin I. V., Klibanov A. M., Martinek K. Ibid., 1979, v. 567, p. 1.
225. Urabe I., Yamamoto M., Yamada Y., Okada H. Ibid., 1978, v. 524, p. 435.
226. Kagawa Y., Nukiwa N. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, v. 100, p. 1370.
227. Curo J. F., Pace C. N. Biochemistry, 1983, v. 22, p. 2654.
228. Krigbaum W. R., Komoriya A. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 576, p. 204.
229. Choithia C. Annu. Rev. Biochem., 1984, v. 53, p. 537.
230. Измайлова В. Н., Ребиндер П. А. Структурообразование в белковых системах. М.: Наука, 1974. 267 с.
231. Gumpen S., Hegg P. O., Martens H. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 574, p. 189.
232. Anfinsen C. B., Scheraga H. A. Adv. Prot. Chem., 1975, v. 29, p. 205.
233. Можаяев В. В., Родионова М. В. Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия, 1986, т. 27, с. 304.
234. Isono K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, v. 41, p. 852.
235. Habershtich H. U., Zuber H. Arch. Microbiol., 1974, v. 98, p. 275.
236. Heinen W., Lauwers A. M. Ibid., 1983, v. 134, p. 247.
237. Можаяев В. В., Мелик-Нубаров Н. С., Мартинек К., Березин И. В. Докл. АН СССР, т. 288, с. 1006.
238. Шикинис В. А., Галкантайте Н. З., Денис Г. Й., Буткус Э. В., Можаяев В. В., Мартинек К., Березин И. В. Там же, 1986, т. 288, с. 1508.
239. Leo A., Hansch C., Elkins D. Chem. Rev., 1971, v. 71, p. 525.

240. *Hansch C., Leo A.* In: *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. N. Y.: John Wiley, 1979. 63 p.
241. *Cohen A., Edsal J.* In: *Proteins, Amino Acids and Peptides*. N. Y.: Reinhold, 1943.
242. *Stoesz J., Lumry R. W.* *Biophys. Chem.*, 1979, v. 10, p. 105.
243. *Tuengler P., Pfeleiderer G.* *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 484, p. 1.
244. *Minotani N., Sekiguchi T., Bautista J. G., Nosoh Y.* *Ibid.*, 1979, v. 581, p. 334.
245. *Sekiguchi T., Oshiro S., Goingo E., Nosoh Y.* *J. Biochem.*, 1979, v. 85, p. 75.
246. *Cupo P., El-Deiry W., Whitney P. L., Awad W. M., Jr.* *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, p. 10828.
247. *Fojo A. T., Whitney P. L., Awad M. W., Jr.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, v. 224, p. 636.
248. *Shibuya H., Abe M., Sekiguchi T., Nosoh Y.* *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 708, p. 300.
249. *Kenner R. A., Walsh K. A., Neurath H.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, v. 33, p. 353.
250. *Taguchi H., Hamaoki M.* *J. Biochem.*, 1983, v. 93, p. 7.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, Химический факультет