

11;12

Самоорганизация и супермолекулярная химия пленки белка от нано- до макромасштаба

© Е. Рапис

Лаборатория прикладной физики Тель-Авивского университета,
64230 Рамат-Авив, Израиль

(Поступило в Редакцию 25 сентября 2003 г.)

Представлены экспериментальные данные, позволяющие визуально (оптический, поляризационный, электронный сканирующий, конфокальный лазерный микроскопы) наблюдать неизвестную ранее неравновесную супрамолекулярную модификацию самоорганизации белка „протос“, возникающую при конденсации открытой неравновесной системы белок–вода. Этот процесс сопровождается появлением жидкокристаллической фазы эпитаксиально растущих наноструктурных вихреобразных его пленок на нано- и макроуровнях. Открытие модели спонтанной самоорганизации протеина позволяет документально изучать и фиксировать неравновесную нелинейную динамику конденсации и самоорганизации белка с его супермолекулярной архитектурой и функцией нано- и макромасштабе в абиотических и в биотических условиях. Этот метод может быть положен в основу создания атласа для диагностики различных белков, а также патологических процессов в живом организме, нарушающих процесс самоорганизации протеина.

Введение

До настоящего времени о самоорганизации протеина и его супрамолекулярной химии в мезо- и макромасштабе имеются немногочисленные данные [1–6].

Преимущественно структурообразование белка изучается на молекулярном уровне методом рентгеноструктурного анализа, способным устанавливать решетку дальнего порядка с сильными ковалентными химическими связями. Благодаря этому методу достигнуты большие успехи в визуализации структур белка на уровне А [7–10]. Этот метод и сегодня доминирует в быстроразвиваемом в последние годы направлении биологической науки, названном протеомикой [11–15]. Последнее ставит самые широкие задачи в понимании работы белка, его архитектуры и функции от атома до клетки.

В связи с этим стали появляться новые идеи, говорящие о том, что структура индивидуальных молекул часто неинформативна относительно функции по сравнению со структурами большого комплекса [7]. При этом в противоположность folding протеина (т.е. свертывание его молекулярных цепей) может быть дана оценка нековалентных супрамолекулярных комплексов с их уникальной структурой и биологической функцией [7]. Постепенно складывается представление о том, что именно на наноуровне природа создает свои ключевые функционирующие содружества, где происходит синтез полимеров, клеточный рост, деление и т.д. [2].

Известно, что в формировании архитектуры и функции биологических систем и белка в частности, вплоть до макроуровня наряду с ковалентными связями особую роль играет супрамолекулярная химия, обладающая слабыми нековалентными ван-дер-ваальсовыми связями. Однако изучение такого рода химии в белке, связанной с его самоорганизацией в мезо- и макромасштабе, находится на самом начальном этапе.

Не существует пока общепризнанных методов топологического (морфологического) анализа белка на макроскопическом и наноуровне при спонтанной биологической его самоорганизации со специфической супрамолекулярной химией.

Наряду с этим в последнее десятилетие супрамолекулярная химия, ее топология активно изучается при взаимодействии биологии и физической химии, приобретая все более глобальную значимость [1,2]. Это направление становится новым самостоятельным междисциплинарным разделом, супрамолекулярной наукой, особенно эффективно развиваемой Lehn J.M. и его школой [1,2,15–18]. В ее рамках изучается путь перехода от простого деления конденсирующейся материи в направлении повышения сложности при самоорганизации.

Из накопленных в этой области знаний следует, первым звеном агрегации является молекулярное узнавание, приводящее к супрамолекулярным каталитическим реакциям. Во вторую очередь возникает самосборка, т.е. простое соединение (коллекция) и агрегация компонентов. И наконец, вершиной является спонтанный процесс самоорганизации, который осуществляет программу системы, способной генерировать определенно организованную дискретную, алгоритмически повторяющуюся и функционирующую супрамолекулярную архитектуру от нано- до макроуровня. Это следует из коллективного поведения таких сообществ, как молекулярные кристаллы, жидкие кристаллы, мицеллы, полимеры и коллоиды [2,6].

Литературные данные свидетельствуют о том, что под временным кинетическим контролем возникает неравновесный процесс, определяя появление упорядоченных когерентных диссипативных структур, обладающих иерархическими связями и нелинейной динамикой.

Самоорганизация создает суперструктуры в качестве функционирующих супрамолекулярных материалов, свойства которых зависят от их природы, конституции и взаимодействий между ними [16]. При ком-

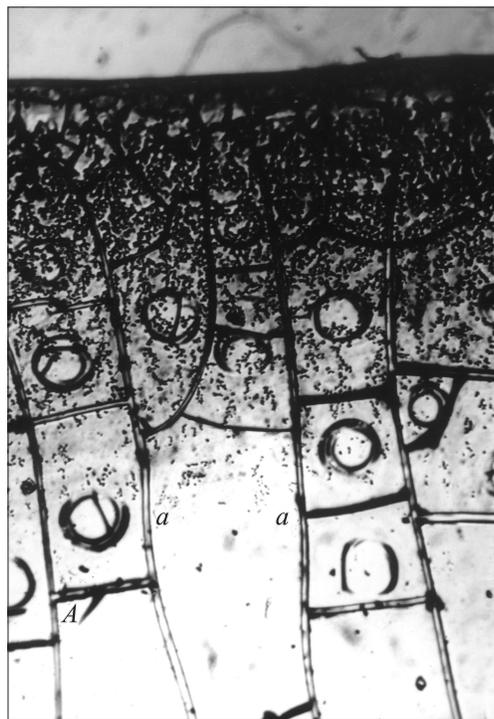


Рис. 1. Неравновесная пленка белка „протос“. Геометрически подобные блоки (клетки) с ядрами. Оптич. микр. Ув. 200.

бинации химических полимеров с супрамолекулярной химией появляются домены (рис. 1) с образованием супрамолекулярных цепей из мономерных комплексов.

Таким образом, возникает особый вид строения блоков (рис. 1) и пленок мембран, образующих системные сети с определенными квазикристаллическими структурами, достигающими макромасштаба с автокатализом и комплементарностью [2]. Появление зон, блоков играет большую роль в самоорганизации сложной материи и в развитии живых клеток [2]. Следовательно, описанные особенности супрамолекулярной химии относят к поведению и органических полимеров при их самоорганизации, и живых систем.

Это подтверждается многочисленными исследованиями феноменологических и функциональных свойств органических полимеров. Так, чаще всего определяется фазовое состояние эпитаксиально растущих жидкокристаллических пленок с формированием трехмерных супрамолекулярных диссипативных наноструктур конусо-видной формы с нуклеацией и фрактальной геометрией, вортексами со спиральной и киральной симметрией. Такой материал обладает свойствами полупроводников, проводников с оптической активностью, анизотропией, часто имеет ферро- и антиферромагнитную поляризованность [19–25].

Отсюда становится ясным, что белок как один из наиболее активно работающих в живом органических полимеров, нельзя полноценно изучать без характеристики его супрамолекулярной химии и ее структуры. Это является принципиально важным для понимания про-

цесса самоорганизации и самосборки сложных белковых систем, достигающих клеточного и макроуровня.

Для изучения супрамолекулярной архитектуры белка, связанной с нековалентной химией, чрезвычайно эффективным оказался проведенный нами опыт визуального анализа динамики процесса самоорганизации коллоидальной системы белок–вода [4,5,25,26].

Методика

Мы провели экспериментальные исследования с относительно быстрым и медленным удалением воды (ее испарением) из коллоидной системы белок–вода с дальнейшей динамической визуализацией процесса конденсации и самоорганизации белка в равновесных и в неравновесных условиях *in vitro*. Коллоидная система белок–вода различной природы (альбумин, глобулин, гемоглобин, лизоцим, гаммаглобулин и др.) помещали на твердую смачиваемую подложку (стекло или пластмассу) и высушивали в открытой системе (1-я серия исследований) при комнатной температуре и атмосферном давлении и в закрытой системе под покровным стеклом (2-я серия исследований). Таким образом изменяли кинетику процесса конденсации белка. Динамику самоорганизации визуализировали с помощью оптического, поляризационного, электронного, сканирующего, конфокального лазерного микроскопов. Проведено 3 тысячи опытов. Подробно методика описана ранее [5,26–27].

Результаты

Опыты показали, что в открытой системе белок–вода (1-я серия исследований) *in vitro* в естественных условиях (при комнатной температуре, атмосферном давлении, без каких-либо добавок и вмешательств) при относительно быстром испарении воды возникали автоволновые процессы в возбужденной активной неравновесной системе. Происходила самоорганизация в одном белке с появлением неравновесной посттрансляционной его модификации, названной „протос“ с особыми видами симметрии диссипативных наноструктур на мезо- и макроуровне (рис. 1–6).

В то же время при замедленном испарении воды в закрытой (под покровным стеклом) равновесной системе при тех же условиях температуры и давления установлен другой процесс — кристаллизация структур белка с решеткой дальнего порядка независимо от размера с иным видом симметрии (2-я серия исследований). Подробно результаты изложены ранее [5,26–27].

Итак, проведенные опыты позволили наблюдать и реально изучать процесс самоорганизации (самосборки при конденсации) протеина, выявлять характер и феноменологию структур, их симметрию в неравновесных условиях *in vitro* принципиально отличного от кристаллизации протеина [8–10].

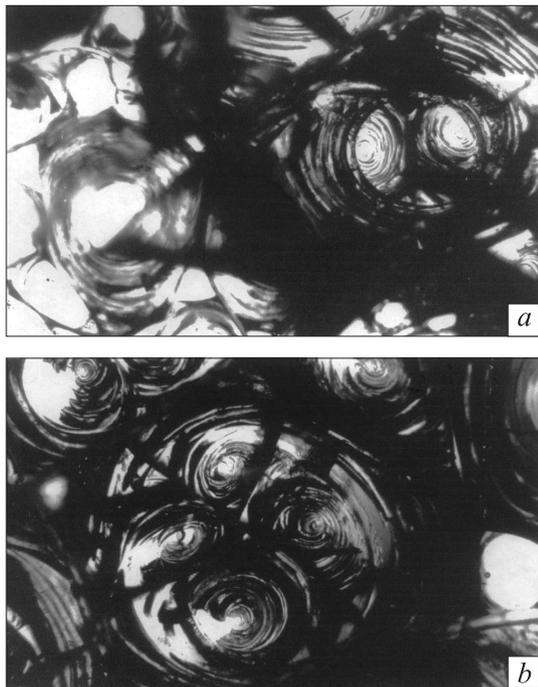


Рис. 2. *a, b* — деление неравновесной пленки белка серией крупномасштабных дефектов (прямолинейных и спиральных) на клетки с ядрами ракушечного типа. Трехмерные вихри противоположного вращения. Зеркальная симметрия и некоторая асимметрия „Кипы“ пленок с зонами аттракции. Деление центра поля первичной „материнской“ спирали на 2, 4 и больше маленьких „дочерних“ вихрей. Оптич. микр. Ув. 185.

Показано, что в модификации белка „протос“ *in vitro* появляются аналогичные формы и масштабы симметрии белка *in vivo*. Показано, что самоорганизация (самосборка) протеина возникает при различной относительно быстрой дегидратации системы белок–вода. Это может происходить в живом при гидролизе АТФ (аденин-три-фосфорная кислота) при фосфорилизации белка и при простом испарении воды в открытой системе *in vitro*.

Обсуждение результатов

Опыты показали, что критическим фактором для возникновения супрамолекулярной химии со свойственной ей архитектурой и функцией являлась относительно высокая (по сравнению с закрытой системой) скорость процесса конденсации системы белок–вода. При этом самоорганизация (самосборка) протеина возникла только в открытой, далекой от равновесия системе белок–вода. В этих условиях поведение и феноменология протеина совпадает с описанными выше свойствами супрамолекулярной химии органических полимеров [19–25], а именно возникла фаза эпитаксиально растущих („кип“) жидкокристаллических пленок с формированием трехмерных супрамолекулярных наноструктур конусообразной формы с „вортексами“ противоположного вращения

с нелинейной динамикой, автокатализом и самокомплементарностью (рис. 2–6) с оптической активностью, анизотропией и т.д.

В других условиях эксперимента — в закрытой и более равновесной системе белок–вода при конденсации не возникает фазы жидкого кристалла с когерентными синхронными автокаталитическими процессами самоорганизации белка с супрамолекулярной химией, а появляются кристаллические его структуры с решеткой дальнего порядка [5,26–27].

Итак, казалось бы, одни и те же химические реакции, сопровождающие конденсацию белка–дегидратация (агрегация, полимеризация), в разных кинетических условиях дают принципиально различный результат. Кроме того, в появлении высокой неравновесности процесса при относительно невысокой скорости испарения растворителя большую роль играет исходная высокая вязкость коллоидального раствора белок–вода. В этом случае появляется особый вид турбулентности — „эластическая турбулентность“ [28].

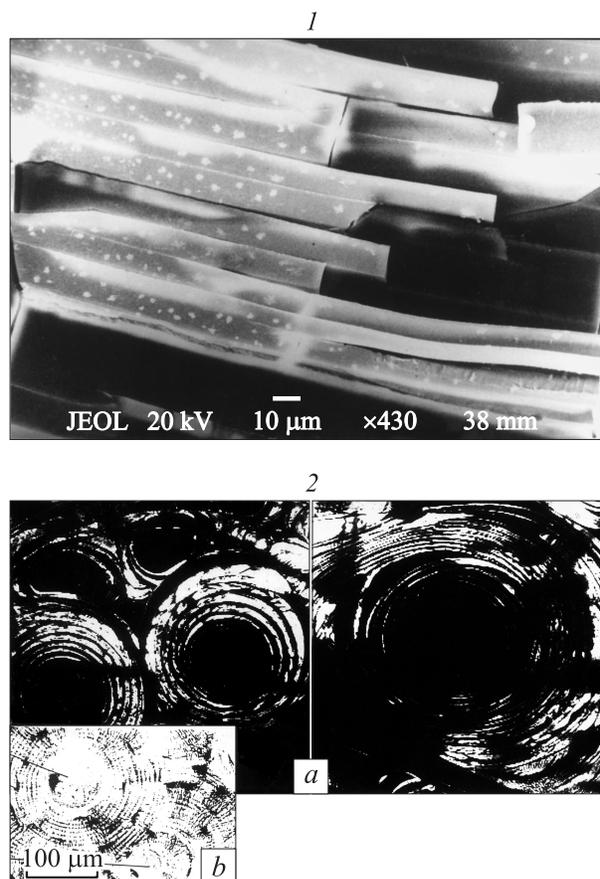


Рис. 3. 1 — электрономикрограмма пленок белка в форме параллелепипедов (вид сбоку на сколе) „Кипы“ подобных пленок ровно разрезаны дефектами образуют ступени с гладкой поверхностью и островками агрегатов в их толще. Электронный сканирующий микроскоп *in vitro*. JEOL. Ув. 10 000 с размерами деталей 10 микрометров. 2 — электрономикрограммы вихреобразных структур белка *in vitro* (а) подобны срезу трубчатых костей человека (b).



Рис. 4. Образование мелких отростков, „веток“, возникающих с двух противоположных сторон „материнской“ пленки протеина *in vitro*, что отражает свойства зеркальной симметрии, которая наблюдается при росте трав, деревьев (ветки, листья). *a* — форма, аналогичная травинке; *b* — форма, подобная рыбьему скелету. Оптич. микр. с ультрафиолетовым фильтром. Ув. 200.

Именно высокая неравновесность заставляет систему идти к стабилизации от неравновесности к равновесному состоянию путем диссипации энергии, генерирующей процесс самоорганизации. Последний идет через конформационные переходы, рождая энергию для действующего „мотора“ белка. Это совпадает с представлениями [1,2] о том, что „самоорганизация является источником сил, которые ведут к развитию биологического мира от неживой материи“ [2].

Особо следует подчеркнуть, что проведенные опыты определенно показали возможность самоорганизации белка *in vitro* из его открытой системы с водой без каких-либо других ингредиентов живого, т.е. абиотических условиях в отсутствие энергии АТФ, которая до настоящего времени считается необходимым источником для самоорганизации белка.

Результаты наших исследований позволили установить, что для самоорганизации белка и образования его супрамолекулярной химии необходимо и достаточно энергии, возникающей при конденсации неравновесной системы белок–вода *in vitro*. Из этого следует гипотеза о том, что в живом организме действует тот же механизм самоорганизации белка, поскольку известно, что АТФ, связанная с протеином, быстро гидролизует (забирает воду), создавая условия для высокой скорости дегидратации системы белок–вода и ее выраженную неравновесность *in vivo*. Для доказательства именно такого сценария самоорганизации белка в сложной неравновесной и нелинейной системе живого [29,30] нами проведено сравнительное морфологическое изучение архитектуры неравновесной формы белка „протос“ на стекле (*in vitro*) и в живом (*in vivo*). И в одном и в другом случае наблюдались спиральная, зеркальная, киральная, радиальная,

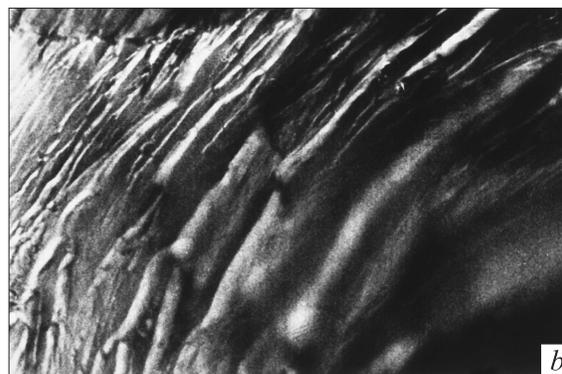


Рис. 5. *a* — видны фрактальные свойства структур с уменьшением объема элементов по мере удаления их от основания. *b* — диблоки, соединяющиеся в один корпус, образуют триблочные структуры белка с конусовидными вершинами. Зоны сочленения фрактальных элементов подобны „самокомплементарному“ соединению фрагментов в биологических объектах типа „ключ к замку“. Отчетливо видны утолщения зон сочленения, спиральное закручивание пленок, дискретность, дихотомия. Оптич. микр. Ув. 320.



Рис. 6. *a* — конусообразные (остроконечные) самоподобные фрактальные пленки уменьшающегося размера. Спиральные воронкообразные структуры типа ракушек, *in vitro*. Оптик. микр. с ультрафиолетовым фильтром, *b* — аналогичные формы конусообразных фрактальных структур, *in vivo* в гребне насекомого.

продольная симметрия, а также симметрия „дикобраза“ и фрактальная геометрия от нано- до макромасштаба (рис. 1–6).

О том же свидетельствуют многочисленные факты биологии. Так, о способности белка работать не только в живом организме, но и в пробирке и на стекле в абиотических условиях — *in vitro*, говорят данные многочисленных биохимических, гистохимических, иммунологических и других исследований (например, опыты Анфинсена, реакции антигена с антителом и т.д.).

Кроме того, в биологии широко известны свойства белка в живом, которые полностью совпадают с феноменологией органических полимеров с их супрамолекулярной химией, а именно наличие фазы жидких кристаллов со спиральными воронкообразными структурами с кипами пленок от нано- до макромасштаба, с фрактальной геометрией (рис. 3,6), оптической активностью, двойным лучепреломлением [5] и другими свойствами автокатализа и катализа, самокомплементарностью и комплементарностью (взаимодействие антигена и антитела). Так устроены многие тканевые элементы белковой природы в живом организме: кости, волосы, нервная, мышечная, соединительная ткани (коллагеновые волокна), фибрин и т.д. И в то же время известно, что в живом всегда открытая, далекая от равновесия, очень динамичная система, необходимая для возникновения процесса самоорганизации с диссипативными структурами [29–32].

Еще более убедительными доказательствами гипотезы служат новые достижения в исследовании наноструктур. Согласно [33], область наноструктур оказалась ареной, на которой сходится биология, физика и электронная инженерия. Самое интересное, что, с одной стороны, органические полимеры (протеин, ДНК) [33] начали использовать для создания электронных приборов [33,34], а с другой стороны, стали искусственно моделировать молекулы белка, его наноструктуры, клетки и ткани, которые начинают использовать в медицине для замены живых тканей [3,36,37].

В целом все приведенные данные позволяют считать, что в живых биологических системах белки различной природы имеют единый код супрамолекулярной химии и ту же физическую сущность — конденсацию неравновесной открытой системы белок–вода, рождающую в процессе самоорганизации одну и ту же архитектуру и функцию *in vivo* и *in vitro*.

В заключение считаю своим приятным долгом поблагодарить за моральную помощь в проведении исследований, в обсуждении полученных результатов, выдвинутых гипотез и высказанные при этом ценные замечания и предложения профессоров А. Амусьи, А. Ареля, Е. Бруудо, В. Буравцева, А. Ботина, В. Волкова, Е. Гольбрайх, А. Заикина, М. Клигера, Л. Маневича, С. Моисеева, Ю. Неемана, И. Пригожина.

Список литературы

- [1] *Lehn J.M.* Supramolecular Chemistry. New York. 1995. Ch. 9.
- [2] *Lehn J.M.* // PNAS. 2002. Vol. 99. N 8. P. 4763–4768.
- [3] *Stupp S.* et al. // Science. 1997. Vol. 276. P. 384–389.
- [4] *Pralle M., Whitaker C., Braun P., Stupp S.* // Macromolecules. 2000. Vol. 33. N 10. P. 3550–3555.
- [5] *Panuc E.* Белок и жизнь (самосборка и симметрия наноструктур белка). Иерусалим; Москва: ЗЛ „Милта-ПКПТИТ“, 2002. 257 с.
- [6] *Suarez M., Lehn J.M.* et al. // J. Am. Chem. Soc. Vol. 120. P. 9526–9532.
- [7] *Sali A., Glaeser R.* et al. // Nature. 2003. Vol. 422. P. 216–225.
- [8] *Knowles J.* // Science. 2003. Vol. 299. P. 2002–2003.
- [9] *Zhang H., Yang Z., Shen Y., Tong L.* // Science. 2003. Vol. 299. P. 2064–2067.
- [10] *Lahiri S., Zhang G.* et al. // Science. 2003. Vol. 299. P. 2067–2071.
- [11] *Hahash S.* // Nature. 2003. Vol. 422. P. 226–231.
- [12] *Marte B.* // Nature. 2003. Vol. P. 191–195.
- [13] *Phizicky E.* et al. // Nature. 2003. Vol. 422. P. 208–215.
- [14] *Tyers M.* et al. // Nature. 2003. Vol. 422. P. 193–197.
- [15] *Lehn J.M.* // Chem. Eur. J. 2000. Vol. 6. P. 2097–2108.
- [16] *Lehn J.M.* // Supramolecular Science: Where It Is and Where It Is Going / Ed. R. Ungaro, E. Dalcanale. Dordrecht (The Netherlands): Kluwer, 1999. P. 287–304.
- [17] *Lehn J.M.* // Chem. Eur. J. 2000. Vol. 6. P. 2097–2108.
- [18] *Lehn J.M.* // Supramolecular Polymers / Ed. A. Ciferri. New York, 2000. P. 615–641.
- [19] *Berl V., Krische M.J., Hue I., Lehn J.M., Schmutz M.* // Chem. Eur. J. 2000. Vol. 6. P. 1938–1946.
- [20] *Supramolecular Polymers* / Ed. A. Cifferri. New York: Dekker, 2000.
- [21] *Tschierske C.* // Nature. 2002. Vol. 413. P.682–683.
- [22] *Sawamura M.* et al. // Nature. 2002. Vol.419. P. 702–706.
- [23] *Perele V.* et al. // Nature. 2002. Vol. 417. P. 384–387.
- [24] *Hudson S.* et al. // Science. 1997. Vol 278. P. 443–452.
- [25] *Meyer F.* et al. // Nature. 2001. Vol. 412. P. 516–520.
- [26] *Rapis E., Gasanowa G.* // Tech. Phys. 1991. Vol. 36. N 4. P. 406–412.
- [27] *Panuc E.* // ЖТФ. 2000. Т. 70. Вып. 1. С. 122–133.
- [28] *Groisman A., Steinberg V.* // Nature. 2000. Vol. 409. P. 53–55.
- [29] *Eigen M.* // Naturwissenschaften. 1971. Vol. 58. P. 465–523.

- [30] Self-organizing Systems / F.E. Yates. New York: Plenum Press, 1987.
- [31] *Brackmann S.* // Biophys. Chem. 1997. Vol. 66. P. 133–143.
- [32] *Пригожин И., Стенгерс И.* Порядок из хаоса. М.: Прогресс, 1986. 432 с.
- [33] *Homepage J. Rundqvist I.* Nanostructure: Stockholm: Physics Royal Institute of Technology, 2003. Vol. 24. P. 10044.
- [34] *Bard A.* Integrated Chemical Systems: A Chemical Approach to Nanotechnology. New York: Wiley, 1994.
- [35] *Chandross E.* et al. // Chem. Rev. 1999. Vol. 99. P. 1641–1990.
- [36] *Menger F.* et al. // Chem. Int. Ed. Engl. 1995. Vol. P. 2091–2106.
- [37] *Paleos C.* et al. // Chem. Viol. Chem. 2001. Vol. 2. P. 305–310.