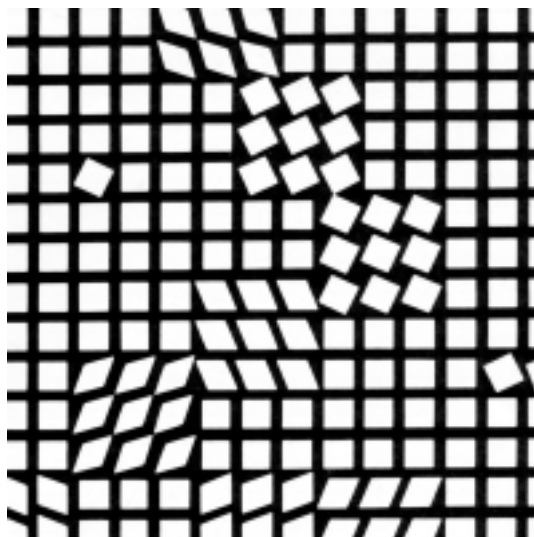


Часть вторая  
Молекулярная биофизика

III  
Пространственная организация биополимеров



VII  
Пространственные конфигурации  
полимерных молекул

VIII  
Различные типы взаимодействий  
в макромолекулах

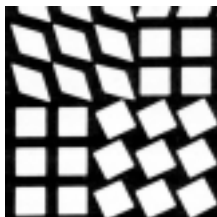
IX  
Конформационная энергия  
и пространственная организация биополимеров

Основу структурной организации живого составляют макромолекулы, прежде всего важнейшие биополимеры — белки и нуклеиновые кислоты. Специфика полимерных молекул в отличие от малых молекул определяется большим числом однотипных звеньев (мономеров), связанных в линейную цепь. Тепловое движение входящих в полимерную цепь атомов и атомных групп, повороты и вращение их вокруг единичных связей обуславливают большое число внутренних степеней свободы макромолекулы. Это заставляет рассматривать макромолекулы как макроскопическую систему, статистический характер поведения которой проявляется в наличии средних значений таких параметров, как размеры, форма, степень, свернутости макромолекулы. Вместе с тем существующие между атомами химические связи и взаимодействия ближнего и дальнего порядка накладывают определенные ограничения на число возможных конформаций макромолекул. Изменение конформации биополимеров, происходящие в процессах клеточного метаболизма и трансформации энергии, также носят вполне определенный характер и отражают внутримолекулярную динамическую организацию биополимеров. Таким образом, своеобразие биологической макромолекулы как физического объекта заключается в тесном сочетании статистических и детерминистских (механических) особенностей ее поведения: с одной стороны, большое число взаимодействующих атомов и внутримолекулярных степеней свободы и, как следствие, возможность осуществления огромного числа разных конформаций, с другой — определенный химический характер и конформационные изменения при функционировании биополимеров.

В макромолекулах происходят сложные процессы трансформации энергии, включающие миграцию энергии электронного возбуждения и транспорт электронов. В основе функционирования макромолекул лежат электронно-конформационные взаимодействия (ЭКВ), которые проявляются в самых различных процессах, где участвуют биологически активные макромолекулярные комплексы.

▽ Основная проблема заключается в том, чтобы раскрыть природу взаимодействий атомных групп, определяющих конформационные особенности и внутреннюю динамику биологических макромолекул, механизмы взаимодействия электронных и конформационных переходов, и на этой основе понять механизмы функционирования биополимеров в живых системах. Именно это и составляет предмет молекулярной биофизики. □

## Пространственные конфигурации полимерных молекул



## § 1. Статистический характер организации полимеров

Каждое макросостояние полимера характеризуется определенными значениями молекулярных параметров и может быть осуществлено большим количеством микросостояний или конформаций. Тепловое движение и вращение вокруг единичных связей, составляющих полимерную цепь атомов, должны приводить к значительной свернутости цепи и образованию клубка. Такой клубок обладает целым набором большого числа конформаций, которые цепь может принимать в процессе микроброуновского движения ее частей. Здесь употребляется термин «конформация» в «микросмысле». Он означает определенное с точностью до амплитуд валентных колебаний расположение атомов в полимере. Ясно, что взаимозависимость такого движения звеньев будет наиболее сильно проявляться у соседних звеньев и ослабляться по мере увеличения расстояния между ними.

**Свободно-сочлененная цепь.** Будем считать, что полимерная цепь состоит из ряда прямолинейных сегментов, каждый из которых включает определенное число отдельных звеньев. Внутри каждого сегмента сохраняется абсолютная корреляция в ориентации звеньев, но зато между сегментами эта корреляция полностью отсутствует. Начало и конец модельной цепи совпадают, конечно, с таковыми для реальной цепи. Такая модельная цепь, состоящая из отдельных сегментов, взаимно независимых в отношении своей ориентации в пространстве, называется свободно-сочлененной (рис. VII.1).

Разбиение реальной цепи на статистические сегменты должно происходить так, чтобы число звеньев  $m$ , входящих в состав сегмента, было достаточно большим для обеспечения независимой ориентации сегментов. С другой стороны, число сегментов  $N$ , равное  $N = n/m$ , где  $n$  — полное число звеньев в цепи, не должно быть мало ( $N \geq 10$ ), иначе становится невозможным статистическое рассмотрение поведения свободно-сочлененной цепи. Статистические свойства последней удобнее всего рассмотреть на примере определения среднего расстояния между концами цепи (рис. VII.1). Очевидно, для абсолютно вытянутой нити, состоящей из сегментов, каждый из которых характеризуется вектором  $\mathbf{l}_i$  ( $i = 1, 2, \dots, N$ ), радиус-вектор  $\mathbf{h}$  между концами цепи равен

$$\mathbf{h} = \sum_{i=1}^N \mathbf{l}_i. \quad (\text{VII.1.1})$$

Реальная длинная цепная молекула принимает огромное количество конфигураций, так что  $\mathbf{h}$  может иметь, вообще говоря, любые значения в диапазоне от  $\mathbf{h} = 0$  (концы цепи совпали) до  $\mathbf{h} = Nl$  ( $l = |l|$  вытянутая цепь). Ясно, что в клубке эти разные значения  $\mathbf{h}$  принимаются с разной вероятностью. Вероятность того, что определенный сегмент находится в определенном положении относительно другого сегмента, может быть выражена через функцию распределения  $W_a$  вектора расстояния между сегментами цепи.

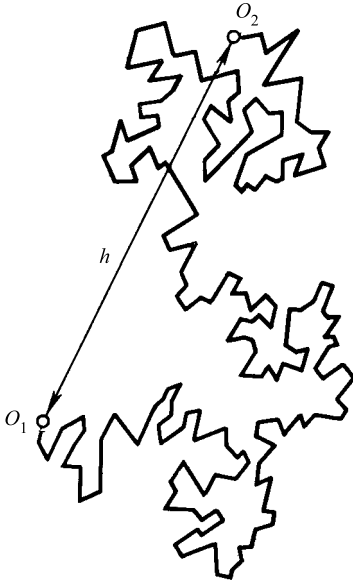


Рис. VII.1

Свободно-сочлененная цепь ( $O_1 - O_2$ ) (по В. Н. Цветкову, В. Е. Эскину, С. Я. Френкелю, 1964):

$h$  — расстояние между концами цепи

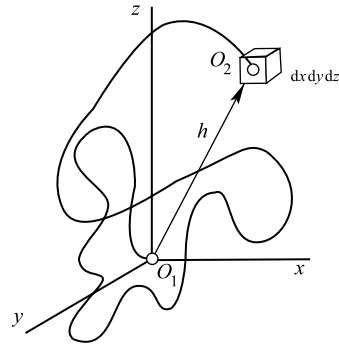


Рис. VII.2

К выводу функции распределения величин вектора для свободно-сочлененной цепи (объяснение см. в тексте) (по В. Н. Цветкову, В. Е. Эскину, С. Я. Френкелю, 1964)

Функция  $W_a$  называется функцией распределения величины  $a$  или плотностью вероятности нахождения данного значения  $a$ , если произведение  $W_a da$  равно вероятности нахождения значения переменной  $a$  в интервале от  $a$  до  $a + da$ . Можно показать, что для очень длинной цепи функция распределения расстояния между концами является гауссовой.

Длина вектора  $\mathbf{h}$  равна

$$h = (x^2 + y^2 + z^2)^{1/2},$$

где  $x$ ,  $y$ ,  $z$  — проекции  $\mathbf{h}$  на оси координат (рис. VII.2). Функции распределения координат  $x$ ,  $y$ ,  $z$  конца цепи являются гауссовыми и имеют вид

$$\begin{aligned}
 W_x &= \left( \frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{1/2} \exp[-3x^2/(2Nl^2)], \\
 W_y &= \left( \frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{1/2} \exp[-3y^2/(2Nl^2)], \\
 W_z &= \left( \frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{1/2} \exp[-3z^2/(2Nl^2)].
 \end{aligned}
 \tag{VII.1.2}$$

Так как переменные  $x$ ,  $y$ ,  $z$  являются независимыми случайными величинами, то вероятность попадания конца цепи в элемент объема  $d\tau = dx dy dz$  в окрестности точки  $(x, y, z)$  равна произведению вероятностей трех независимых событий, или

$$W_\tau d\tau = \left( \frac{3}{2\pi Nl^2} \right)^{1/2} \exp[-3h^2/(2Nl^2)] d\tau,
 \tag{VII.1.3}$$

где  $h^2 = x^2 + y^2 + z^2$ .

Для ансамбля систем из  $n$  молекул произведения  $W_\tau d\tau$  равно относительному числу  $dn/n$  молекул, конец которых попадает в элемент объема  $d\tau$  при закреплении начала всех цепей в точке  $O_1$ . Очевидно, что средняя величина вектора  $\mathbf{h}$  равна нулю, так как все его направления в пространстве равновероятны при закреплении начала молекулы в начале координат. Вероятность того, что вектор  $\mathbf{h}$  имеет длину  $h$ , не зависит от направления  $\mathbf{h}$  и, очевидно, пропорциональна произведению  $W_\tau$  на объем шарового слоя  $4\pi h^2 dh$ , в котором находятся концы всех векторов длиной от  $h$  до  $(h + dh)$ :

$$W_h dh = W_\tau 4\pi h^2 dh = \frac{4h^2}{\sqrt{\pi}} \left( \frac{3h^2}{2Nl^2} \right)^{3/2} \exp[-3h^2/(2Nl^2)] dh.
 \tag{VII.1.4}$$

Произведение  $W_h dh$  равно относительному числу молекул  $dn/n$ , для которых длина вектора  $\mathbf{h}$  заключена в интервале от  $h$  до  $(h + dh)$  (рис. VII.3).


Распределение (VII.1.3) может быть представлено в следующем виде:

$$W_\tau dh = \left( \frac{3}{2\pi \bar{h}^2} \right)^{3/2} \exp[-3h^2/(2\bar{h}^2)] d\tau.
 \tag{VII.1.5}$$

В полимерной цепи, где все валентные углы фиксированы и одинаковы, вокруг всех одинарных связей разрешено свободное вращение (рис. VII.4), для  $h^2$  имеем при  $N \gg 1$

$$\bar{h}^2 = Nl^2 \frac{1 + \cos\theta}{1 - \cos\theta},
 \tag{VII.1.6}$$

причем при фиксированных валентных углах остается в силе распределение (VII.1.5).

 **Гибкость полимера.** Сворачивание гибкой цепи в клубок определяется ее термодинамической гибкостью: чем больше гибкость, тем меньше  $\bar{h}^2$  при заданных  $N$

и  $l$ . В растворе наиболее вероятная конформация полимера — свернутый клубок, в котором энтропия системы максимальна. При растяжении полимера происходит разворачивание клубка и уменьшение числа возможных конформаций, что сопровождается уменьшением энтропии.  $\square$

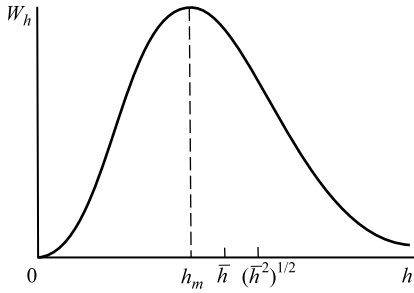


Рис. VII.3

График функции распределения (по В. Н. Цветкову, В. Е. Эскину, С. Я. Френкелю, 1964)

Найдем среднее значение  $W_h$  и среднеквадратичное  $(\bar{h}^2)^{1/2}$  значение  $h$ :

$$\bar{h} = (1/n) \int_0^n h dn = \int_0^\infty h W_h dh = \sqrt{[8/(3\pi)] N l^2};$$

$$\bar{h}^2 = (1/n) \int_0^n h^2 dn = \int_0^\infty h^2 W_h dh = N l^2;$$

$$(\bar{h}^2)^{1/2} = \sqrt{N l^2}.$$

Величина  $R = (\bar{h}^2)^{1/2}$  характеризует средние размеры клубка, которые пропорциональны корню квадратному из числа его сегментов

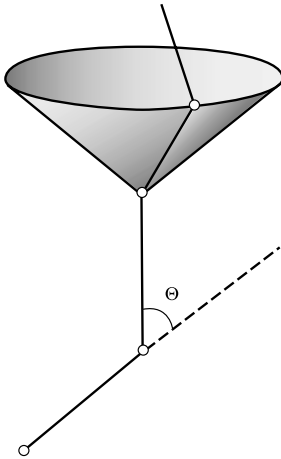


Рис. VII.4

Цепь с фиксированными валентными углами (по М. В. Волькенштейну, 1975)

Энтропия  $S$ , соответствующая расстоянию между концами цепи, определяется формулой

$$S = k_B \ln W_\tau(h) = l - 3k_B h^2 / (2N l^2), \quad (\text{VII.1.7})$$

где  $W_\tau(h)$  задается согласно (VII.1.5). Отсюда сила, необходимая для расчленения полимерной цепи, равна

$$f = -T \left( \frac{\partial S}{\partial h} \right)_T = \frac{3k_B T}{N l^2} h. \quad (\text{VII.1.8})$$

Таким образом, возникновение упругой силы носит энтропийный характер, а сама она пропорциональна абсолютной температуре. Набухание отдельной макромолекулы в растворе в результате проникновения растворителя внутрь клубка, подобно растяжению каучука, также переводит ее в менее вероятную конформацию. Возникающая при этом упругая сила энтропийной природы в конце концов приводит к тому, что набухание прекращается.

Описанное явление лежит в основе эластичности полимеров типа каучука. Высокая эластичность каучука имеет в основном энтропийную природу. При растяжении каучука изменение свободной энергии  $dF = dU - TdS$  приводит к возникновению упругой силы  $f$  и требует работы, пропорциональной величине растяжения  $dL$  и, следовательно, равной  $dF = fdL$ . Отсюда

$$f = \left( \frac{dF}{dL} \right)_T \simeq -T \left( \frac{dS}{dL} \right)_T \quad (\text{VII.1.9})$$

так как внутренняя энергия каучука в первом приближении не зависит от деформации, т. е.  $\left( \frac{dU}{dL} \right)_T \simeq 0$ . Значение производной энергии в формуле (VII.1.9) может быть рассчитано аналогично тому, как это было сделано выше для отдельной полимерной цепи.

**Персистентная длина.** Отклонения от гауссовой статистики могут наступать при небольшом числе, меньшем 20–50, связей в полимерной цепи и молекулярных массах в несколько сотен единиц. Однако известны полимеры (ДНК в форме двойной спирали, спиральные полипептиды — производные целлюлозы), в которых даже при молекулярных массах в несколько сотен тысяч цепь не подчиняется гауссовой статистике, а длина сегмента цепи существенно увеличивается. Такие жесткие молекулы моделируются червеобразной цепью, у которой в пределе среднее значение угла  $\theta$  между звеньями стремится к 0 при уменьшении длины звена  $l \rightarrow 0$ , а цепь имеет непрерывную кривизну (рис. VII.5). Среднее значение  $\cos \psi$  между касательными к двум участкам цепи, разделенным достаточно большой длиной  $s$  вдоль нити, убывает экспоненциально с ростом  $s$ :

$$\cos \psi(s) \sim \exp(-s/a), \quad (\text{VII.1.10})$$

где  $a$  — персистентная длина. Из (VII.1.10) видно, что косинус угла между касательными к цепи, разделенными длиной  $a$  вдоль цепи ( $s = a$ ), уменьшается в  $e$  раз. Короткий по сравнению с  $a$  участок цепи ведет себя как твердый стержень, а разные сегменты длиной  $a$  вращаются практически независимо друг от друга. Для червеобразной цепи среднеквадратичное расстояние связано с ее персистентной

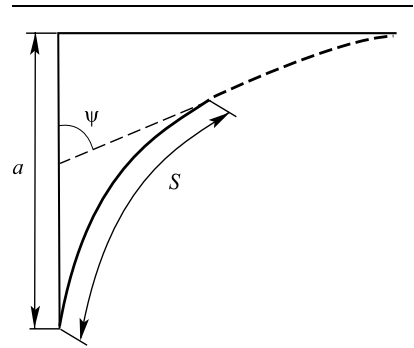


Рис. VII.5

Червеобразная цепь с непрерывной кривизной (по В. Н. Цветкову, В. Е. Эскину, С. Я. Френкелю, 1964):

$a$  — персистентная длина,  $\psi$  — угол между касательными к двум участкам цепи, разделенным достаточно большой длиной  $S$

длиной:

$$\bar{h}^2 = 2a^2 \left( \frac{L}{a} - 1 + \exp(-L/a) \right). \quad (\text{VII.1.11})$$

где  $L$  — контурная длина цепи.

При бесконечно жесткой цепи (жесткий стержень)  $a \rightarrow \infty$  и  $\bar{h}^2 \simeq L^2$ . Напротив, в случае гибкого стержня  $a \ll L$  образуется обычный гауссовый клубок, где  $\bar{h}^2 = 2aL$ .

Для молекулы ДНК, представляющей собой жесткий полимер, персистентная длина составляет 50–60 нм, что намного больше, чем у большинства обычных гибких полимерных молекул. Жесткость ДНК определяется взаимодействием плоских ароматических колец: пар оснований, расположенных стопкой вдоль оси спирали и соединенных сахарофосфатными связями.

Рассмотренные сравнительно простые модели, не учитывающие реальных сил взаимодействия между элементами цепи, позволяют тем не менее рассчитывать ряд макроскопических усредненных параметров и понять природу фундаментального свойства полимеров — гибкости. Такие характеристики, как высоко-эластичность в блочном состоянии, ряд оптических и гидродинамических свойств индивидуальных макромолекул, могут быть описаны на этой основе.

## § 2. Объемные взаимодействия и переходы глобула – клубок в полимерных макромолекулах

▽ Все взаимодействия между атомами независимо от их конкретной физической природы при формировании различных макромолекулярных структур и переходов между ними можно разделить на два типа: взаимодействия ближнего порядка между атомами соседних звеньев и дальние взаимодействия или объемные эффекты между атомами, которые хотя и отстоят по цепи далеко друг от друга, но случайно сблизилась в пространстве в результате изгиба цепи. □

**Клубок и глобула.** Рассмотрим однородную последовательность одинаковых звеньев вдоль единой цепи, или гомополимер (И. М. Лифшиц). Не конкретизируя физическую природу звеньев и их взаимодействий, зададим геометрические размеры гомополимера среднеквадратичным расстоянием  $\bar{h}^2$  между его концами, а внутреннюю пространственную структуру — пространственным распределением плотности звеньев  $n(x)$ . Вследствие объемных взаимодействий плотность числа звеньев в пространстве, занятом молекулой, может меняться от точки к точке. В полимерной нити вследствие взаимосвязи звеньев или линейной памяти изменение плотности в одной точке пространства связано с изменением плотности в другой точке, т. е. существует пространственная корреляция плотности. Если в макромолекуле полностью отсутствуют всякие объемные взаимодействия, то она не имеет достоверной пространственной структуры. В этом состоянии флуктуации плотности — порядка самой плотности. Такое состояние носит название клубка. Радиус корреляции  $\xi$  здесь того же порядка, что размеры макромолекулы [ $R = (\bar{h}^2)^{1/2}$ ]:  $\xi \sim R$ , где  $R \sim lN^{1/2}$ .

Наличие объемных взаимодействий может привести к осуществлению такого состояния, в котором флуктуации плотности малы по сравнению с самой плотностью. Такое плотное образование называется глобулой. В нем радиус корреляции



флуктуаций плотности много меньше размеров макромолекулы:  $\xi \ll R$ , причем  $R \sim N^{1/3}$ . Глобула в отличие от клубка обладает определенной компактной пространственной структурой. Сердцевина большой глобулы пространственно однородна с постоянной концентрацией звеньев  $n_0$ .

**Условия существования клубка и глобулы.** В каких же условиях образуются клубок и глобула? Вследствие объемных взаимодействий сблизившиеся участки могут либо притягиваться, либо отталкиваться друг от друга. Повышение температуры приводит к увеличению отталкивания между мономерами, понижение — способствует их взаимному притяжению. Существует температура, при которой отталкивание мономеров полностью компенсируется их взаимным притяжением. Эта температурная точка называется  $\Theta$ -точкой или  $\Theta$ -температурой. В  $\Theta$ -точке объемные взаимодействия отсутствуют, и макромолекула представляет собой клубок с размерами  $R \sim lN^{1/2}$ , который очевидно, сохраняется и при повышении температуры  $T > \Theta$ . Однако в области  $T > \Theta$  из-за увеличения сил отталкивания размеры клубка возрастают:  $R > lN^{1/2}$ . Таким образом,

$$\bar{R}^2 = \alpha(\bar{R}^2)_0, \tag{VII.2.1}$$

где  $(\bar{R}^2)_0$  вычислено без учета дальних объемных взаимодействий;  $\alpha$  — коэффициент набухания макромолекулы;  $\alpha > 1$  в области  $T > \Theta$  и  $\alpha = 1$  при  $T = \Theta$ .

В хороших растворителях притяжение атомов цепи и растворителя больше, чем между атомами цепи, что равносильно увеличению их взаимного отталкивания в таком растворителе (область  $T > \Theta$ ; здесь  $\alpha > 1$ ). Наоборот, в плохих растворителях взаимное притяжение звеньев полимера больше, чем их притяжение к молекулам растворителя (область  $T < \Theta$ ;  $\alpha < 1$ ). В области  $T < \Theta$  в объемном взаимодействии преобладают силы притяжения, которые могут привести к конденсации полимерного клубка в плотную слабо флуктуирующую глобулу. Эта глобула стабилизируется самосогласованным сжимающим полем, обусловленным силами притяжения между мономерами.

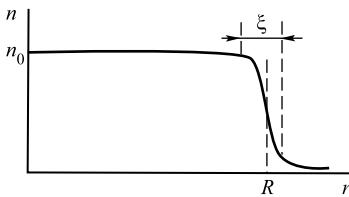


Рис. VII.6

Распределение плотности звеньев в глобуле (по И. М. Лифшицу, А. Ю. Гроссбергу, А. Р. Хохлову, 1979):

$R_i \sim N^{1/3}$  — радиус глобулы,  $R \ll lN^{1/2}$ ;  $N$  — число звеньев,  $l$  — длина звена,  $\xi$  — радиус корреляции звеньев в глобуле ( $\xi \ll R$ )

Профиль плотности для большой глобулы представляет собой «размытую ступеньку», а в ее сердцевине сохраняется некая постоянная концентрация звеньев  $n_0$

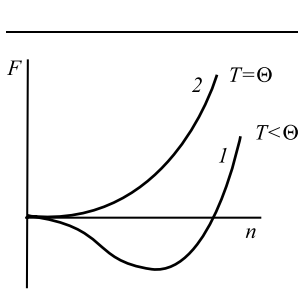
Рассмотрим вначале полимерную цепь без объемных взаимодействий, но во внешнем сжимающем поле  $\varphi(x)$ , которое отражает взаимодействие гомополимера с окружающей средой. Оно может представлять собой, например, пространственную неоднородность растворителя, наличие в нем поверхностей раздела фаз, инородных частиц. Однако для реальных растворов полимеров  $\varphi(x)$  может рассматриваться

как самосогласованное поле, образованное всеми элементами системы. Оказывается, что глобула обладает дискретным спектром значений свободной энергии. Температура выше критической приводит к исчезновению дискретного спектра и глобулярного состояния, которое, следовательно, может быть сформировано внешним полем лишь при достаточно низких температурах. В такой глобуле концы цепи статистически независимы, т. е. радиус корреляции много меньше размеров макромолекулы, что и соответствует глобулярному состоянию цепи. В реальных макромолекулах объемные взаимодействия в отсутствие внешнего поля создают самосогласованное поле, приводящее к образованию глобулы. Характер распределения плотности в глобуле имеет вид, приведенный на рис. VII.6.

**Энергия взаимодействия звеньев.** Таким образом, изменение температуры приводит к изменению размеров макромолекулы, что выражается в соответствующем изменении средней плотности числа мономерных звеньев, и, как следствие, к изменению энергии их взаимодействия. Отсюда ясно, что вклад сил притяжения и отталкивания в свободную энергию взаимодействия  $F$  звеньев зависит от числа  $n$ . При малом  $n$  свободная энергия взаимодействия может быть разложена в ряд по степеням  $n$ :

$$F = V k_B T (B n^2 + C n^3 + \dots), \quad (\text{VII.2.2})$$

где  $V$  — объем системы;  $B$  и  $C$  — коэффициенты разложения, называемые вириальными коэффициентами ( $B$  — второй вириальный коэффициент,  $C$  — третий и т. д.).



Очевидно, первое слагаемое в правой части равенства (VII.2.2), пропорциональное  $\sim n^2$ , описывает вклад парных столкновений звеньев, второе — вклад тройных и т. д. Если энергия притяжения при столкновениях велика по сравнению с  $k_B T$ , то силы притяжения сталкивающихся частиц играют наиболее важную роль, давая отрицательный вклад в общую энергию системы ( $B < 0$ ). В результате макромолекула сжимается относительно размеров идеального клубка. Обратная картина наблюдается, когда энергия притяжения меньше  $k_B T$ , а силы отталкивания дают в свободную энергию положительный вклад, вызывая набухание клубка ( $B > 0$ ). В отсутствие объемных взаимодействий при  $\Theta$ -температуре

$$B(\Theta) = 0, \quad (\text{VII.2.3})$$

случаю плохого растворителя соответствует условие  $B < 0$ , случаю хорошего растворителя с отталкивающимися звеньями полимера соответствует  $B > 0$ . Типичный вид зависимости свободной энергии (глобулы) от  $n$  приведен на рис. VII.7 (кривая 1).

Этому графику соответствуют, очевидно, отрицательное значение второго вириального коэффициента ( $B < 0$ ) и положительное значение третьего ( $C > 0$ ). Таким образом, в простейшем случае, когда  $B < 0$ , вклад отталкивания ( $C > 0$ ) доминирует уже при столкновениях трех частиц. При изменении температуры и других

Рис. VII.7  
Зависимость свободной энергии глобулы (1) и клубка (2) от плотности звеньев (по И. М. Лифшицу, А. Ю. Гросбергу, А. Р. Хохлову, 1979)

условий в растворе вириальные коэффициенты изменяются и, следовательно, меняется величина  $F$ .

**Переходы клубок — глобула.** Когда  $F$  перестает иметь минимум при отличных от нуля значениях  $n$  (рис. VII.7, кривая 2), глобула распадается и происходит переход глобула — клубок. Точке перехода соответствует условие  $F = 0$ .

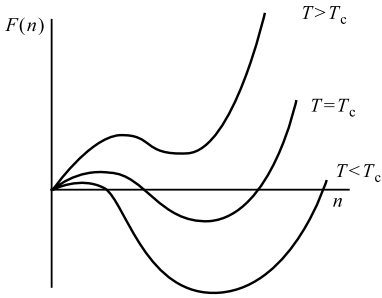


Рис. VII.8  
 Пример зависимости свободной энергии от плотности в случае отрицательного значения третьего вириального коэффициента в  $\Theta$ -точке (по И. М. Лифшицу, А. Ю. Гроссбергу, А. Р. Хохлову, 1979):

$T_c$  — температура перехода клубок–глобула

▽ Переходы между состояниями клубка и глобулы — это переходы между разными фазами, что сопровождается изменением агрегатного состояния макромолекулы. Известно, что фазовые переходы первого рода происходят между двумя состояниями, каждое из которых стабильно по одну сторону от точки перехода и метастабильно по другую. Переход между ними при изменении внешнего параметра (температура) сопровождается тепловым эффектом (например, плавление льда и образование жидкой водной фазы). □

Фазовые переходы второго рода происходят без тепловых эффектов, причем в области перехода существует лишь один минимум свободной энергии. При фазовых переходах первого рода энтропия и внутренняя энергия меняются скачком вследствие затраты конечной теплоты перехода и конечного изменения удельного объема системы. В точке перехода второго рода теплоемкость меняется скачком, энтропия и внутренняя энергия — непрерывно, а удельный объем системы не испытывает скачка. Примером фазовых превращений второго рода могут быть процессы перехода гелия в сверхтекучее состояние и металлов в сверхпроводящее состояние из ферромагнитного в парамагнитное в точке Кюри. Эти превращения связаны с кооперативным изменением направления ориентации спинов электронов в решетке металла от хаотического до параллельного при уменьшении температуры. При этом структура системы меняется непрерывно, а симметрия — скачком, т. е. новые магнитные свойства проявляются скачком. Фазовые переходы определены строго для случая, когда число частиц в системе  $N \rightarrow \infty$ . В реальных полимерах, где  $N$  — большое, но конечное число, существует конечная ширина температурного перехода  $\Delta T$ . Конформационный переход является фазовым, если его ширина стремится к нулю:  $\Delta T \rightarrow 0$  при  $N \rightarrow \infty$ .

На рис. VII.7 кривая 2 соответствует  $\Theta$ -условиям, когда второй вириальный коэффициент обращается в нуль ( $B = 0$ ), а  $F$  становится положительной величиной. Таким образом, в этом приближении температура перехода  $T_c$  клубок–глобула

совпадает с  $\Theta$ -температурой. Вблизи точки перехода плотность падает, а сам переход идет непрерывно, как переход второго рода. Возможны, однако, и другие случаи, когда температура перехода клубок–глобула не совпадает с  $\Theta$ -условиями. Например, если в  $\Theta$ -точке  $C < 0$ , то зависимость  $F(n)$  имеет вид, приведенный на рис. VII.8. Здесь переход клубок–глобула в точке  $T = T_c$  происходит при  $T_c > \Theta$  (кривая 2) и носит характер резкого перехода первого рода.

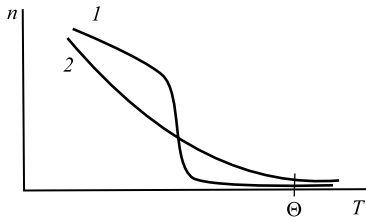


Рис. VII.9

Температурная зависимость средней плотности в пределах макромолекулы в области перехода клубок–глобула (по И. М. Лифшицу, А. Ю. Гроссбергу, А. Р. Хохлову, 1979):

1 — жесткая цепь, 2 — гибкая цепь

В целом показано (И. М. Лифшиц, А. Ю. Гроссберг, А. Р. Хохлов), что в случае жесткой цепи переход клубок–глобула происходит как фазовый переход первого рода, хотя и с малой теплотой перехода. Конечный скачок плотности наблюдается несколько ниже  $\Theta$ -точки, причем  $(T_c - \Theta)/\Theta \sim 1/N^{1/2}$ . В случае гибких цепей переход происходит как плавный переход второго рода, растянутый на всю  $\Theta$ -область (рис. VII.9). □

### § 3. Фазовые переходы в белках

Изложенные выше представления справедливы для гомополимеров, обладающих линейной памятью. Однако здесь еще не учитываются различная природа мономерных звеньев, что справедливо в случае гетерополимеров, а также специфика некоторых видов объемных взаимодействий в макромолекуле. Все эти вопросы будут освещены в последующих разделах, касающихся закономерностей конформационных превращений реальных биополимеров.

Рассмотрим кратко основные особенности структурных перестроек белков в процессе температурной денатурации и сопоставим их с изложенными выше результатами теории.

**Температурная денатурация.** Белковые глобулы претерпевают переходы типа порядок–беспорядок в относительно малом интервале возмущающей переменной (температура) и в этом смысле напоминают фазовые переходы первого рода. Простая термодинамическая трактовка температурных переходов биополимеров состоит в том, что денатурацию рассматривают как обычную мономолекулярную реакцию перехода из нативной формы  $A$  в денатурированную форму  $B$ :  $A \rightleftharpoons B$ . В прямых калориметрических измерениях тепловых эффектов определяют изменение энтальпии, сопровождающее эти переходы. Простейшая термодинамическая интерпретация калориметрических данных основана на уравнении Кирхгофа зави-

симости энтальпии  $\Delta H$  процесса от температуры:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p(T) dT, \quad (\text{VII.3.1})$$

где  $C_p(T)$  — теплоемкость при постоянном давлении, зависящая от температуры;  $T_1$ ,  $T_2$  — пределы температурных изменений. В обычных измерениях к образцу, помещенному в калориметр, подводят теплоту с постоянной скоростью  $dQ/dt = v_Q$  и регистрируют скорость повышения температуры образца:  $dT/dt = v_T$ . Теплоемкость  $C_p$  находят по формуле

$$C_p = v_Q/v_T. \quad (\text{VII.3.2})$$

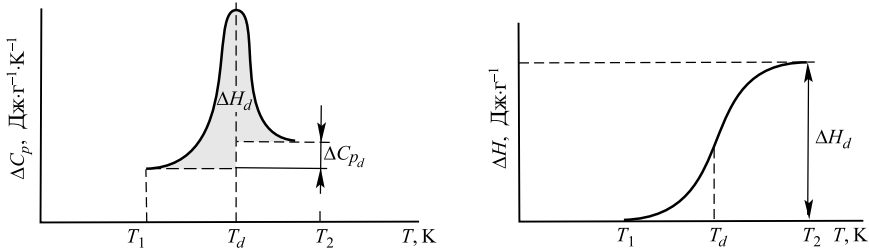


Рис. VII.10

Изменение теплоемкости  $\Delta C_p$  и энтальпии  $\Delta H$  в области тепловой денатурации биополимеров (по Г. М. Мревлишвили, 1981):

$T_1$  — температура начала процесса плавления,  $T_d$  — температура максимума теплопоглощения («температура плавления»),  $T_2$  — температура конца процесса плавления,  $\Delta H_d$  — энтальпия плавления,  $\Delta C_{p,d}$  — возможное изменение теплоемкости после тепловой денатурации

Чувствительность современных микрокалориметров такова, что они регистрируют изменение теплового потока до  $10^{-7}$  Вт. На рис. VII.10 приведены типичные кривые изменения энтальпии  $\Delta H$  и теплоемкости в области тепловой денатурации биополимеров. Весь температурный интервал  $(T_1, T_2)$  разделяется на две области: денатурационную  $(T_d, T_2)$  и неденатурационную  $(T_1, T_d)$ . Внутри каждой из этих областей соотношение форм  $A$  и  $B$  меняется в каждой точке перехода в зависимости от температуры образца. В процессе тепловой денатурации происходит изменение теплоемкости биополимера при переходе его от нативного (спиральное, глобулярное) состояния в денатурированное (клубкообразное). Изменение энтальпии этого перехода вычисляется по формуле

$$\Delta H_{\text{ден}} = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT - \int_{T_1}^{T_d} C_{p(\text{нат})} dT - \int_{T_d}^{T_2} C_{p(\text{ден})} dT = \Delta H_d - \int_{T_1}^{T_d} \Delta C_{p,d} dT, \quad (\text{VII.3.3})$$

где  $\Delta H_d$  — молярная энтальпия перехода;  $T_d$  — температура перехода (максимум пика плавления);  $C_p$  нат,  $C_p$  ден,  $\Delta C_{p,d}$  — теплоемкости биополимера в нативном, денатурированном состояниях и разность этих величин при температуре перехода  $T_d$  соответственно. Изменение энтропии в этом же процессе составляет

$$\Delta S_{\text{ден}} = \frac{\Delta H_d}{T_d} - \int_{T_1}^{T_d} \frac{\Delta C_{p,d}}{T} dT, \quad (\text{VII.3.4})$$

а свободная энергия Гиббса  $\Delta G$  меняется как

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{ден}} &= \Delta H_{\text{ден}} - T_1 \Delta S_{\text{ден}}, \\ \Delta G_{\text{ден}} &= \Delta H_d \frac{T_d - T_1}{T_d} - \int_{T_1}^{T_d} \frac{T - T_1}{T} \Delta C_{p,d} dT. \end{aligned} \quad (\text{VII.3.5})$$

Было показано, что молекула белка может претерпевать обратимые конформационные переходы в частично дезорганизованное состояние не только при нагревании, но и охлаждении раствора (Привалов). В этом состоянии (холодовая денатурация) нарушена третичная структура, видимо, за счет уменьшения гидрофобных взаимодействий при охлаждении. При нагревании, наоборот, увеличение диссипативных сил происходит быстрее, чем гидрофобных, что вызывает денатурацию. В обоих случаях денатурация осуществляется как кооперативный переход между двумя состояниями — нативным и денатурированным — по принципу «все или ничего». Однако при тепловой денатурации энтальпия и энтропия белка растут, а при холодной денатурации они уменьшаются.

**Связь со структурными изменениями.** Из многочисленных экспериментальных данных следует, что денатурационное изменение удельной теплоемкости весьма существенно и в случае глобулярных белков  $\Delta C_{p,d}$  может составлять 0,4–0,6 Дж · г<sup>-1</sup> · К<sup>-1</sup>, уменьшаясь, однако, до 0,25–0,3 Дж · г<sup>-1</sup> · К<sup>-1</sup> для растворов ДНК и коллагена. Наблюдаемые изменения удельной теплоемкости могут быть вызваны, очевидно, термическим возбуждением внутримолекулярных степеней свободы в биополимерных цепях, что сопровождается также изменением энтропии. Однако сильные изменения  $\Delta C_{p,d}$ , которые по крайней мере на порядок больше соответствующих температурных изменений теплоемкостей малых молекул, не могут быть объяснены только таким образом. В качестве дополнительного фактора называют изменение числа контактов гидрофобных групп белка с растворителем (о природе гидрофобных взаимодействий см. § 4 гл. IX).

В условиях сильных гидрофобных взаимодействий разрушение элементов вторичной структуры, погруженных в гидрофобное ядро, энергетически невыгодно. В силу этого изменение плотности в гидрофобном ядре возможно только при движениях участков вторичной структуры ( $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -«листья») как целого. Именно поэтому изменение плотности в гидрофобном ядре при денатурации не является локальным, а затрагивает, по существу, все гидрофобное ядро целиком со смещением элементов «структурного каркаса». Расширение молекулы вблизи нативного состояния происходит с сохранением грубых черт пространственной структуры.

При этом оказывается, что на пути такого аффинного расширения возникает состояние, когда силы притяжения (ван-дер-ваальсовы, см. §1 гл. VIII) уже сильно ослаблены, а соответствующее увеличение подвижности боковых групп еще не наступило (Е. М. Шахнович). Это приводит к тому, что денатурационный переход в белковой глобуле происходит со скачком объема, т. е. является внутримолекулярным фазовым переходом первого рода, связанным с нарушением плотной упаковки в ядре. На изменение структуры биополимера указывают также заметные изменения теплоемкости нативного белка в физиологической области температур задолго до регистрации главного денатурационного процесса. Оценки показывают, что высота барьера этого переходного состояния, называемого расплавленной глобулой, составляет около 20 ккал/моль.

В расплавленной глобуле разрешены независимые вращения боковых цепей, однако в нее закрыт доступ молекулам воды. В денатурационном состоянии вода проникает внутрь, дестабилизируя белок, объем которого увеличивается. В нативном состоянии белка вода наоборот, играет стабилизирующую роль за счет гидрофобных взаимодействий. Состояние расплавленной глобулы может играть определенную функциональную роль, облегчая взаимодействие белка с лигандами (Птицын, Бычкова).

Термодинамическое описание температурных переходов в белке связано с критическими температурами. Мы видели в (VII, §2), что существует температура  $T_0$  перехода клубок – глобула, которая зависит от характера взаимодействий в цепи. В гетерополимерной цепи, где энергии взаимодействий между отдельными звеньями различны, происходит дальнейший переход при критической температуре  $T_C < T_0$  от неорганизованной глобулы с большими количеством равновероятных состояний в «замороженное» фазовое состояние. Здесь уже образуется расплавленная глобула с переходом в нативную структуру, обладающую уникальной и единственной конформацией. Итак, температура сворачивания цепи  $T_C$  в нативную конформацию отличается от температуры  $T_0$  уплотнения клубка до глобулы.

Существенные тепловые перестройки макромолекулы с изменением температуры являются фактором, имеющим принципиальное значение в интерпретации температурных кривых перехода порядка – беспорядок в биополимерах. Действительно, если в процессе изменения теплоемкости в зависимости от температуры происходит изменение структуры макромолекулы, то общее изменение величин  $\Delta H_{\text{ден}}$  и  $\Delta S_{\text{ден}}$  должно включать в себя вклад от  $\Delta H$  и  $\Delta S$ , связанных с собственно процессом перестройки макромолекулы. Проводя измерения при разных температурах, исследователь, строго говоря, имеет дело с разными макромолекулярными структурами, для каждой из которых выполняются соотношения (VII.3.3) и (VII.3.4). Однако фактически измеренные значения  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  отражают не только температурную зависимость этих величин, а, скорее, сложные изменения конструкции самой системы. Влияние состава, рН растворителя на денатурационные кривые явно указывает на происходящие при этом химические нарушения, влияющие в итоге на микроструктуру белка в исходном состоянии.

Уровень термостабильности белков с различными пространственными структурами значительно варьирует в зависимости от условий их структурообразования и участия в комплексах на высоких уровнях организации биосистем. Так, температура денатурации коллагена, важнейшего системного белка организма, лежит в

области температур фибриллогенеза, соответствующих температурам среды обитания (Есипова, 1972).

Степень термостабильности белка и его поведение при денатурации зависит от свойств доменов, которые связаны с участками повышенной плотности в глобулярных белках (Макаров, 1996). Распределение зарядов и дипольных моментов в пространстве глобул влияет на размеры кооперативных областей — энергетических доменов. Перераспределение зарядов под действием условий среды приводит к изменению размера домена и свойств белка. Путем точечных мутаций можно заменять отдельные аминокислоты белка и тем самым влиять на распределение зарядов в критических точках, ответственных за термостабильность. Так, замена гистидина в тетрацитохроме в лиганде атома железа на остаток метионина привела к направленной модификации и увеличению термостабильности белка за счет связи железа с серой метионина.

∎ Таким образом, статистическая картина фазовых переходов усложняется вследствие наложения структурных перестроек, которые зависят от физической природы сил взаимодействия мономерных звеньев и не обязательно усредняются по всему пространственному объему, занятому макромолекулой. Феноменологически можно считать, что температурные переходные кривые биополимеров соответствуют фазовым переходам первого рода, хотя в отличие от плавления обычных кристаллов здесь нет резкого разрыва термодинамических функций  $H$  и  $S$  из-за гетерогенности и малых размеров молекулы белка. Вместе с тем резкое изменение теплоемкости при переходе скорее напоминает переход второго рода. □

В целом процесс образования глобулы в растворе полипептидных цепей и перехода ее затем в клубкообразное состояние при нагревании термодинамически неизбежен. Однако детали конструкции глобулы, ее структурные перестройки можно расшифровать лишь путем изучения конкретной природы объемных взаимодействий. Без решения этой проблемы невозможно понять, а тем более предсказать, свойства и особенности функционирования биополимеров в различных внешних условиях.