

периментально определенные Тенфордом, и оценки различных вкладов в эти величины, полученные Даннилом [106] (см. также [107]).  $\Delta F$  для Гли принято за нуль, так как он не содержит боковой группы. Первые 10 аминокислот можно условно считать гидрофобными, вторые 10 — гидрофильными. Очевидно, что эта классификация не совпадает с классификацией по полярности, т. е. по дипольным моментам. Сильно полярный Арг имеет ту же гидрофобность, что и неполярный Ала, благодаря наличию объемистого углеводородного остатка.

Учет степени гидрофобности аминокислотных остатков дает информацию о степени стабилизации глобулярной макромолекулы белка гидрофобными взаимодействиями. Однако такого рода оценки недостаточны. Необходимо рассматривать реальную структуру глобулы и учитывать весь баланс происходящих в ней взаимодействий. Упрощенная теория Фишера не обеспечивает этого.

Распределение остатков между внешним слоем и ядром глобулы должно зависеть от свободных энергий их взаимодействия с водой и соседними остатками. В равновесных условиях должно быть соответствующее больцмановское распределение. Брандтс развил и уточнил идею Фишера [107]. Он рассматривал три типа остатков: гидрофобные, находящиеся преимущественно внутри глобулы (Ала, Вал, Лей, Фен и т. д.), гидрофильные, преимущественно располагающиеся на поверхности (в частности, все заряженные остатки), и нейтральные (Гли, Сер, Цис и, вероятно, Асп и Гли), локализующиеся внутри и снаружи глобулы. Числа заполнения внутренних и внешних ячеек для каждого типа остатков взвешиваются в соответствии со свободной энергией переноса остатка извне вовнутрь и со статистическим вырожждением. Это дает возможность написать статистическую сумму для глобулы и построить статистико-термодинамическую теорию денатурации (см. §§ 4.7, 4.8).

#### § 4.7. СТРУКТУРА И УСТОЙЧИВОСТЬ ГЛОБУЛЫ

Мы располагаем следующими источниками информации о структуре глобулы:

1. Данные рентгеноструктурного анализа, в идеале позволяющие локализовать каждый атом в молекуле белка (см. § 5.1).
2. Данные оптических и спектроскопических измерений, дающие возможность оценить долю остатков, находящихся в  $\alpha$ -спиральной, в кросс  $\beta$ - и в неупорядоченной формах (см. гл. 5).
3. Данные, полученные путем изучения дейтериевого обмена, позволяющие оценить долю остатков, соединенных водородными связями.

4. Данные, полученные каноническими методами исследования макромолекул, в частности полиэлектролитов, позволяющие определить размеры и форму глобулы и заряды на глобуле (см. гл. 3).

5. Данные теоретических и полуэмпирических расчетов.

Рассмотрим структуру миоглобина и гемоглобина. Эти важные белки были первыми, детально изученными методом рентгеноструктурного анализа; о них будет идти речь и в дальнейшем (см. гл. 7).

На рис. 4.23 изображена структура миоглобина [108]. Молекула содержит простетическую группу гема (см. стр. 99), указанную стрелкой. На рис. 4.23 показаны спиральные и неспиральные участки. Число  $\alpha$ -спиральных участков равно 8. Около

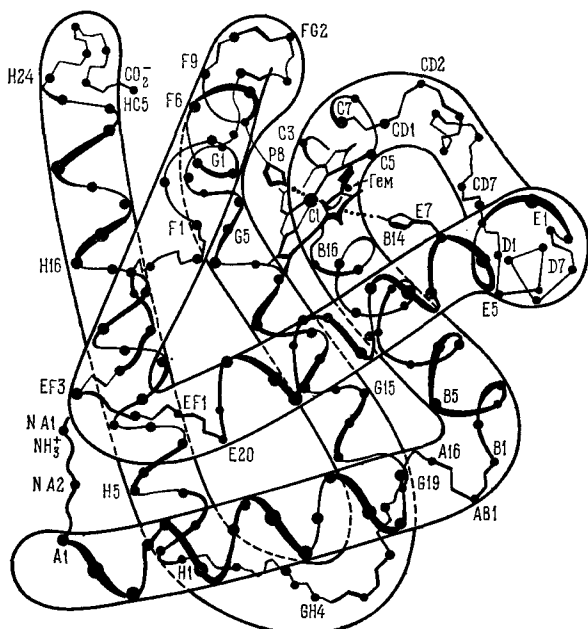


Рис. 4.23. Структура миоглобина.

75% остатков из общего числа 153 принадлежит этим участкам, обозначаемым буквами от А до Н (считая от N-конца цепи); внутри каждого  $\alpha$ -спирального участка остатки нумеруются от 1 до  $n$ . Межспиральные, неупорядоченные, участки обозначаются АВ, CD и т. д., концевые участки — NA и HC [109]. Молекула гемоглобина имеет *четвертичную* структуру: она состоит из четырех глобул — двух, обозначаемых  $\alpha$ , и двух, обозначаемых  $\beta$ . Строение каждой глобулы весьма сходно со строением Mb.

Детальный анализ структуры этих белков приводит к важным выводам [110—113]. «Внутренность» молекулы миоглобина заполнена плотно упакованными неполярными боковыми цепями аминокислотных остатков. То же справедливо для каждой из четырех цепей гемоглобина [114]. Число внутренних остатков равно 36 и включает два Гис, связанных с гемом. С учетом Гли, но не Про, общее число неполярных остатков в цепях гемоглобина лошади равно 72 (в каждой из двух  $\alpha$ -цепей) и 78 (в каждой из двух  $\beta$ -цепей). Многие остатки Гли и Ала, будучи слабо гидрофобными, располагаются на поверхности молекулы. Объемистые неполярные боковые цепи, не находящиеся внутри глобулы, спрятаны в выемке вблизи поверхности, что сводит до минимума контакты с водой. Все боковые цепи, ионизируемые при нейтральном рН, находятся на поверхности глобулы. То же справедливо для других полярных боковых цепей, за исключением связанных с гемом Гис и Тре С4, которые соединены водородной связью [110]. В целом в миоглобине из 77 полярных групп (включая Три) только 5—6 расположено внутри глобулы, а остальные находятся на ее поверхности [114]. Изучение гемоглобинов различных видов позвоночных (приматы, лошадь, свинья, кролик, лама, карп, минога) и миоглобинов кашалота и человека показало, что при замещениях 33 внутренних остатков в подавляющем большинстве случаев сохраняется их неполярный характер (табл. 4.12) [111]. Эти остатки не контактируют с водой. Напротив, на поверхности глобулы имеется 10 инвариантно неполярных остатков.

Таблица 4.12

Замещения 33 внутренних остатков

Индекс остатка	Наблюдаемые остатки	Индекс остатка	Наблюдаемые остатки
A8	Вал, Иле, Лей	E15	Вал, Лей, Фен
A11	Ала, Вал, Лей	E18	Гли, Ала, Иле
A12	Три, Фен	E19	Вал, Лей, Иле
A15	Вал, Лей, Иле	F1	Лей, Иле, Фен, Тир
B6	Гли	FG5	Вал, Иле
B9	Ала, Иле, Сер, Тре	G5	Фен, Лей
B10	Лей, Иле	G8	Вал, Лей, Иле
B13	Мет, Лей, Фен	G11	Ала, Вал, Цис
B14	Лей, Фен	G12	Лей, Иле
C4	Тре	G16	Лей, Вал, Сер
CD1	Фен	H8	Лей, Фен, Мет, Три, Тир
CD4	Фен, Три	H11	Ала, Вал, Фен
D5	Вал, Лей, Иле, Мет	H12	Вал, Лей, Фен
E4	Вал, Лей, Фен	H15	Вал, Фен
E8	Гли, Ала	H19	Лей, Иле, Мет
E11	Вал, Иле	H23	Тир
E12	Ала, Лей, Иле		

Таким образом, исследование миоглобина и гемоглобина подтверждает основное положение, изложенное в предыдущем параграфе, а именно, важнейшее значение гидрофобных взаимодействий, приводящих к образованию неполярного ядра глобулы.

Вместе с тем в этих исследованиях выявляются важные особенности спиральных участков белковой цепи в глобуле. Анализ участков А, В, Е, G и H  $\alpha$ -спиралей свидетельствует о периодическом расположении в них неполярных аминокислотных остатков [111]. Спиральные последовательности ориентированы в глобуле таким образом, что эти остатки оказываются расположенными именно в ядре глобулы. Спирализация полипептидной цепи термодинамически выгодна для целого ряда аминокислотных остатков, так как она обеспечивает насыщение водородных связей. Но  $\alpha$ -спирализация (равно как и образование  $\beta$ -форм) определяется, вместе с тем, и гидрофобными взаимодействиями. Иными словами, вторичная структура стабилизируется пространственной структурой (третичной структурой) белка.

Птицын рассмотрел влияние гидрофобных взаимодействий на степень спиральности полипептидной цепи [101]. Имеется ряд данных, свидетельствующих об этом влиянии на структуру синтетических полиаминокислот. Фасман проанализировал стабильность таких полимеров по отношению к действию дихлор- и дифторуксусной кислот и показал, что стабильность поли-L-метионина, поли-L-аланина и поли-L-лейцина значительно выше, чем у поли-L-карбобензокси-L-лизина  $(-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5)_n$  и поли- $\gamma$ -бензил-L-глутамата  $(-(\text{CH}_2)_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5)_n$  [115]. Включение неполярных боковых групп в водорастворимые полипептиды увеличивает стабильность их спиральных конформаций. Это подтверждается данными для ряда других синтетических полипептидов [116—120].

Солевые связи в белках также стабилизируются водным окружением, так как при их образовании освобождаются ориентированные молекулы воды, окружающие заряженные группы. Тем самым появление солевой связи сопровождается увеличением энтропии воды. Этот выигрыш в свободной энергии более значителен, чем ее выигрыш, определяемый кулоновым взаимодействием зарядов [87]. Однако воздействие воды на солевую связь отлично от гидрофобного взаимодействия — солевые связи усиливаются, а гидрофобные ослабевают при добавлении неводных растворителей [101].

Рентгенографические исследования других белков подтверждают изложенные представления о влиянии водного окружения на глобулярную структуру.

Таким образом, физическая природа взаимодействий, формирующих глобулу, более или менее ясна. Однако если не считать весьма грубых оценок, проблему теоретического расчета

глобулярной структуры никоим образом нельзя считать решенной. Тем не менее сделаны серьезные попытки таких расчетов.

Шерага рассмотрел теоретические аспекты проблемы глобулы [4, 121] в предположении, что нативная конформация полипептидной цепи в растворе отвечает минимуму функции, равной сумме потенциальных энергий всех внутримолекулярных взаимодействий и свободной энергии всех взаимодействий белка с растворителем. Принято считать, что нативной конформации глобулы соответствует минимальная свободная энергия (см. [122]). Трудность состоит в том, что нативное состояние представляет собой набор близких друг к другу конформационных микросостояний (вследствие лабильности неупорядоченных участков глобулы).

Шерага проводит вычисление статистического интеграла для системы глобула — растворитель, учитывающего как внутривнутрипептидные взаимодействия, так и взаимодействия с растворителем. Интегрирование проводится по всем конформациям системы. Потенциальную энергию внутривнутрипептидных взаимодействий определяют по стерическим картам.

Электростатические взаимодействия находят по закону Кулона, причем основная трудность здесь состоит в оценке диэлектрической проницаемости. Можно считать, что на малых расстояниях от зарядов в белковой глобуле  $\epsilon \approx 3,0$  [123]. Для водородных связей разумно воспользоваться потенциалом типа потенциала Морзе. Энергию, расходуемую на изменения валентных углов, находят с помощью спектроскопических данных по константам упругости для деформационных колебаний. Подробное описание метода расчета содержится в обзоре Шераги [4].

Т а б л и ц а 4.13

## Свободная энергия процесса удаления молекулы растворителя

Атом или группа атомов	Число сольватации (число молекул H <sub>2</sub> O)	Свободная энергия удаления одной молекулы растворителя, ккал/моль	Атом или группа атомов	Число сольватации (число молекул H <sub>2</sub> O)	Свободная энергия удаления одной молекулы растворителя, ккал/моль
H	2	0,31	N <sup>+</sup> (гуаниидин)	6	1,20
O (карбоинил)	4	0,94	CH (алиф.)	2	-0,13
O (гидроксил)	6	0,85	CH <sub>2</sub> (алиф.)	3	-0,13
O <sup>-</sup> (карбоксил)	5	4,80	CH <sub>3</sub> (алиф.)	8	-0,13
N (амид)	2	0,63	C (аром.)	2	0,11
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (амин)	5	15,40	CH (аром.)	3	0,11
N <sup>+</sup> (имндазол)	3	3,30	S	6	-0,17

Растворитель (вода) меняет выражение для энергии полипептида двояким образом. Во-первых, появляется ряд новых членов, описывающих взаимодействия атомов полипептида с растворителем (их приближенная оценка дана Гибсоном и Шерагой [123]). Вычисляется количество воды, удаляемое из окружения каждого атома. Выше приведена таблица соответствующих изменений свободной энергии (табл. 4.13) [4]. Во-вторых, присутствие растворителя меняет энергию взаимодействия любой пары атомов полипептида.

Проведение таких расчетов для белков до сих пор не осуществлено. Очевидно, что они встречаются с громадными трудностями. В работах [121, 124] даны некоторые приближенные оценки статистических весов для стабильных конформаций белка и рассмотрена роль крутильных колебаний.

Для рассмотрения процесса денатурации (см. следующий параграф) можно воспользоваться упрощенным выражением статистической суммы. Согласно Шеллману, статистическую сумму для одномерного полипептида, содержащего спиральные и неупорядоченные участки, можно представить в виде

$$Z_{(1)} = 1 + \exp(-3\Delta S/R) \sum_{n=1}^N (N-n+1) \{\exp[(\Delta H - T\Delta S)/RT]\}^{n-3}, \quad (4,84)$$

где  $N$  — число звеньев в цепи,  $n$  — число остатков в спиральном участке,  $\Delta H = 1000$  кал/моль,  $\Delta S \approx 3,2$  э. е. — разности энтальпий и энтропий спирализованных и неспирализованных звеньев. Имеется  $N-n+1$  способ образовать спираль из  $n$  звеньев в цепи из  $N$  остатков. На каждом конце цепи не хватает по три водородных связи. Для трехмерной системы необходимо ввести в  $Z$  множитель  $q(n)$ , учитывающий эффекты, возникающие при помещении боковых привесков в сферически свернутую систему. Следовательно [107],

$$Z_{(3)} = Z_{(1)} q(n). \quad (4,85)$$

Как уже сказано (см. стр. 230), можно рассматривать три класса остатков — гидрофобные ( $\Gamma$ ), гидрофильные ( $\Pi$ ) и нейтральные ( $\Pi$ ). Имеем  $n = n^\Gamma + n^\Pi + n^H$  и  $n^\Gamma = n_{вн}^\Gamma + n_{сн}^\Gamma$  и т. д., где нижние индексы вн и сн обозначают остатки, расположенные внутри и снаружи сферы соответственно. Число способов распределения трех типов остатков между внутренними и наружными «ячейками» равно

$$\Omega(n) = \frac{(n_{вн}^\Gamma + n_{сн}^\Gamma)!}{n_{вн}^\Gamma! n_{сн}^\Gamma!} \frac{(n_{вн}^\Pi + n_{сн}^\Pi)!}{n_{вн}^\Pi! n_{сн}^\Pi!} \frac{(n_{вн}^H + n_{сн}^H)!}{n_{вн}^H! n_{сн}^H!}. \quad (4,86)$$

Число внутренних и наружных «ячеек» определяется по Фишеру (см. стр. 226) следующим образом:

$$N_{\text{вн}} = \frac{4\pi}{3} \frac{(r-d)^3}{V_{\text{ак}}}, \quad N_{\text{сн}} = \frac{4\pi}{3} \frac{[r^3 - (r-d)^3]}{V_{\text{ак}}},$$

где  $V_{\text{ак}}$  — объем одного аминокислотного остатка, примерно равный  $125 \text{ \AA}^3$ ;  $d \approx 4 \text{ \AA}$ . Получаем [107]

$$q(n) = \Omega(n) [\exp(-\Delta F^r/RT)]^{n_{\text{вн}}} [\exp(-\Delta F^u/RT)]^{n_{\text{п}}} [\exp(-\Delta F^h/RT)]^{n_{\text{н}}}; \quad (4,87)$$

здесь  $\Delta F^r$ ,  $\Delta F^u$ ,  $\Delta F^h$  — изменения свободной энергии при переносе остатка снаружи внутрь. Брандтс принимает  $\Delta F^r = 25,746 T - 0,20265 T^2 + 0,00077576 T^3$  (данные для Вал),  $\Delta F^u = \infty$ ,  $\Delta F^h = 0$ . Соответственно все полярные остатки фиксированы снаружи. Расчет показывает, что доля погребенных гидрофобных остатков зависит от числа звеньев в цепи  $N$  более плавно, чем при ее вычислении по методу Фишера.

Описанные статистико-механические расчеты полезны главным образом для рассмотрения процессов интегрального разрушения глобулы — ее денатурации (см. ниже). Подчеркнем снова, что белковая глобула — не статистическая, но динамическая система, подобная машине, работа которой зависит от расположения и взаимодействия всех ее деталей.

Вместе с тем глобулярное состояние полимерной цепи характеризуется общими особенностями. Лифшиц [1] рассмотрел гомополимерную глобулу как систему с линейной памятью (см. стр. 143). Энергию цепи можно представить в виде

$$E_M = E_{\alpha_1} + U_{\alpha_1\alpha_2} + E_{\alpha_2} + U_{\alpha_2\alpha_3} + \dots + U_{\alpha_{N-1}\alpha_N} + E_{\alpha_N}, \quad (4,88)$$

где индекс  $\alpha_i$  указывает состояние  $i$ -го звена в цепи, содержащей  $N$  звеньев.  $M$  обозначает совокупность всех состояний  $\alpha_i$ . Статистическая сумма для такой цепи имеет вид

$$\begin{aligned} Z_N &= \sum_M \exp(-E_M/kT) = \sum_{\alpha_i} \exp\left(-\frac{E_{\alpha_1} + E_{\alpha_N}}{2kT}\right) \prod_i G_{\alpha_i, \alpha_{i-1}} = \\ &= \sum_{\alpha, \beta=1}^r \exp\left(-\frac{E_{\alpha} + E_{\beta}}{2kT}\right) (G^{N-1})_{\alpha\beta}. \end{aligned} \quad (4,89)$$

$G$  — матрица, построенная из элементов  $G_{\alpha\alpha'}$ , т. е. матрица перехода,  $r$  — число различных состояний (ротамеров) каждого звена. Эта формула подобна (3,30) (см. стр. 138). Собственные значения матрицы находятся из векового уравнения

$$\|G_{\alpha} - \lambda \delta_{\alpha\beta}\| = 0, \quad (4,90)$$

и для  $N \gg 1$  имеем

$$Z_N = \lambda_m^N, \quad (4,91)$$

где  $\lambda_m$  — наибольшее собственное значение.

Полипептидная цепь может свернуться в глобулу под действием некоторого поля, зависящего от координат звеньев. В этом случае вместо  $G_{\alpha_i, \alpha_{i-1}}$  напишем

$$G(x, x') = Cg(x, x') \exp(-E(x)/kT), \quad (4,92)$$

где  $E(x)$  — энергия звена в отсутствие внешнего поля,  $C$  — нормирующий множитель,  $x' = x + l\xi$ ,  $l$  — длина звена,  $g(x, x')$  — корреляционная функция. В отсутствие внешнего поля (индекс 0) имеем

$$g_0(x, x') = g_0(x - x').$$

При наличии внешнего поля  $g_0(x - x')$  переходит в  $g_0(x - x') \exp(-U(x)/kT)$ , где  $U(x)$  — энергия звена во внешнем поле. Статистический интеграл принимает вид

$$Z_N(x) = C^N \int \dots \int \exp\left(-\frac{E}{kT}\right) \prod_{j=1}^N g_0(x_{j+1} - x_j) \times \\ \times \exp(-U(x_j)/kT) d^3x_2 \dots d^3x_{N-1}. \quad (4,93)$$

Введем обозначение

$$C^{-N} Z_N(x) = \psi_N(x). \quad (4,94)$$

Тогда

$$\psi_{N+1}(x) = \exp(-U(x)/kT) \hat{g}_0 \psi_N(x),$$

где

$$\hat{g}_0 \psi_N(x) = \int g_0(x - x') \psi_N(x') d^3x'.$$

Следовательно,

$$\psi_{N+1}(x) = \exp(-U(x)/kT) \int g(y) \psi_N(x + y) d^3y$$

и при условии

$$\int g(y) d^3y = 1$$

получаем

$$\int g(y) \psi(x + y) d^3y = \psi(x) + \nabla \psi \int g(y) y d^3y + \\ + 1/2 \nabla_i \nabla_j \psi \int y_i y_j g(y) d^3y + \dots \quad (4,95)$$

После усреднения находим

$$\psi_{N+1}(x) \approx \exp(-U(x)/kT) [\psi_N(x) + a^2 \nabla^2 \psi_N(x)], \quad (4,96)$$



где  $a^2 = 1/6 \langle y^2 \rangle$ . В отсутствие внешнего поля  $U(x) = 0$  и

$$\psi_{N+1} - \psi_N = a^2 \nabla^2 \psi_N$$

и при  $N \gg 1$

$$\frac{\partial \psi_N}{\partial N} = a^2 \nabla^2 \psi_N. \quad (4,97)$$

Если  $\psi_0(x)$  есть  $\delta$ -функция от  $x$ , то  $\psi_N \propto N^{-3/2} \exp(-x^2/4a^2N)$ , т. е. получается гауссово распределение.

При наличии поля и  $N \gg 1$  уравнение (4,96) переходит в

$$\frac{\partial \psi_N}{\partial N} = \psi_N [\exp(-U/kT) - 1] + a^2 \exp(-U/kT) \nabla^2 \psi_N. \quad (4,98)$$

Ищем его решение в виде

$$\psi_N(x) = \sum_q \exp(-\lambda_q N) C_q \psi^{(q)}(x_0) \psi^{(q)}(x). \quad (4,99)$$

Имеем

$$\exp(-\lambda_q) \psi^{(q)}(x) = \exp(-U(x)/kT) \hat{g}_0 \psi^{(q)}(x).$$

Следовательно,

$$\exp(-\lambda_q) \psi^{(q)} = \exp(-U/kT) (\psi^{(q)} + a^2 \nabla^2 \psi^{(q)})$$

и

$$\nabla^2 \psi^{(q)} + (1/a^2) [1 - \exp(U/kT - \lambda_q)] \psi^{(q)} = 0. \quad (4,100)$$

Выражение (4,99) перепишем в виде

$$\begin{aligned} \psi_N = \exp(-\lambda_0 N) \psi^{(0)}(x_0) \psi^{(0)}(x) + \\ + \sum_{q \neq 0} \exp[-(\lambda_q - \lambda_0) N] \psi^{(q)}(x_0) \psi^{(q)}(x). \end{aligned} \quad (4,101)$$

При  $\lambda_1, \lambda_2, \dots > \lambda_0$  и  $N \gg 1$  имеем

$$\psi_N \approx \exp(-\lambda_0 N) \psi^{(0)}(x_0) \psi^{(0)}(x). \quad (4,102)$$

Поэтому

$$Z_N = Z_N^{(0)} \exp(-\lambda_0 N), \quad (4,103)$$

и свободная энергия равна

$$F - F_0 = -kT \ln \frac{Z_N}{Z_N^{(0)}} = kT N \lambda_0, \quad (4,104)$$

где  $F_0$  — свободная энергия в отсутствие внешнего поля, т. е. при  $U = 0$ .

Функции  $\psi^{(q)}(x)$  описывают состояния звеньев. Исследуем уравнение (4,100). Введем обозначение  $\varphi = U/kT$ . Предположим, что  $\varphi - \lambda \ll 1$ , если  $\psi$  заметно отличается от нуля. Тогда

$$\nabla^2 \psi + \frac{\lambda - \varphi}{a^2} \psi = 0 \quad (4,105)$$

(индекс  $(q)$  мы здесь опустили). Последнее уравнение аналогично уравнению Шредингера. Однако параметр  $\lambda$  характеризует здесь свободную энергию системы, которая оказывается, вообще говоря, «квантованной», — она принимает дискретные значения при соответствующих значениях потенциальной энергии  $\varphi$ .

Допустим, что потенциальная яма имеет вид

$$\varphi = \begin{cases} 0, & |x| > R, \\ -U_0/kT, & |x| < R. \end{cases} \quad (4,106)$$

Тогда при  $|x| < R$

$$\nabla^2\psi + \kappa^2\psi = 0. \quad (4,107)$$

При  $U_0 \gg kT$  получаем собственные функции

$$\psi = \frac{\sin \kappa R}{\kappa R}, \quad \text{где } \kappa R = m\pi, \quad m = 1, 2, \dots, \quad (4,108)$$

и собственные значения

$$\kappa^2 = \frac{\lambda + U_0/kT}{a^2} = \left(\frac{m\pi}{R}\right)^2. \quad (4,109)$$

Для основного уровня  $m = 1$  и

$$\lambda = -U_0/kT + (\pi a/R)^2, \quad (4,110)$$

т. е. свободная энергия равна

$$F - F_0 = -NU_0 + NkT(\pi a/R)^2. \quad (4,111)$$

Найдем уравнение состояния глобулы. Давление равно

$$p = -\frac{\partial F}{\partial V} = -\frac{\partial F}{4\pi R^2 \partial R} = \frac{2}{3}\pi^2 NkT (a/R)^2 \frac{1}{V}, \quad (4,112)$$

т. е.

$$pV = \frac{2}{3}\pi^2 (a/R)^2 NkT. \quad (4,113)$$

Упругая сила  $p$ , препятствующая деформации глобулы, так же как и в случае статистического клубка, имеет энтропийную природу.

При произвольной форме потенциальной ямы для уровня, близкого к дну ямы, можно считать потенциальную энергию квадратично зависящей от  $x$ . Уравнение приобретает форму, характерную для гармонического осциллятора

$$\nabla^2\psi + (1/a^2)(\lambda - \varphi_0 - \frac{1}{2}\beta^2 x^2)\psi = 0, \quad (4,114)$$

с собственными значениями

$$E_m \equiv \frac{\lambda_m - \varphi_0}{a^2} = \omega(m + \frac{1}{2}), \quad m = 0, 1, 2, \dots, \quad (4,115)$$

где

$$\omega = \beta/a,$$

Для основного уровня  $m = 0$  и

$$\lambda_0 = \varphi_0 + 1/2 a \beta. \quad (4,116)$$

Можно переписать  $\varphi_0 + 1/2 \beta^2 x^2$  в виде

$$\frac{U_0}{kT} + \frac{1}{kT} \left| \frac{\partial^2 U}{\partial x^2} \right|_{x=0} \frac{x^2}{2}. \quad (4,117)$$

Значит,  $\beta^2 = \frac{1}{kT} \left| \frac{\partial^2 U}{\partial x^2} \right|_{x=0}$  и, следовательно,

$$\lambda_0 = \frac{U_0}{kT} + \frac{1}{2} a \sqrt{\frac{1}{kT} \left| \frac{\partial^2 U}{\partial x^2} \right|_{x=0}}. \quad (4,118)$$

Достаточно сильное поле вызывает «схлопывание» гомополимерного клубка в глобулу, т. е. своего рода фазовый переход клубок — глобула. При достаточно высокой температуре в потенциальной яме нет уровня свободной энергии; первый уровень возникает при некоторой критической температуре  $T_{кр}$ .

Статистический анализ, проведенный в работе [178], показывает, что глобула имеет специфическое строение. При  $T > T_{кр}$  или в отсутствие взаимодействия и внешних полей цепь пребывает в состоянии рыхлого статистического клубка, причем флуктуации его плотности имеют порядок величины самой плотности. Клубок совершает непрерывные макроскопические пульсации, и плотность не является термодинамически достоверной величиной (ср. стр. 145). Глобула образуется при включении достаточно большого сжимающего поля или при наличии объемного взаимодействия. Ее структура зависит от характера поля или взаимодействия.

Ввиду изотропности функции корреляции, глобула, сформированная в отсутствие внешних полей, состоит из плотного сферического ядра, вокруг которого плотность постепенно убывает до нуля, т. е. глобула имеет «опушку». С уменьшением температуры плотность в опушке падает подобно плотности пара над жидкой каплей. Вследствие взаимосвязи звеньев в цепи при достаточно низкой температуре короткая цепь может образовать глобулу без опушки непосредственно из клубка. В работе [178] показано, что переходы между тремя возможными состояниями гомополимерной цепи (клубок, глобула с опушкой, глобула без опушки) являются фазовыми переходами первого рода; там же построена соответствующая фазовая диаграмма.

Ядро глобулы подобно кристаллу, а не жидкости, оно характеризуется нулевой конфигурационной энтропией. Самоорганизация структуры глобулы означает выбор одной наиболее выгодной микроструктуры. Качественное рассмотрение гетерополимерной глобулы (см. [178]) показывает, что среди всех возможных последовательностей мономеров вдоль цепи имеется

лишь очень малая доля таких, которые могут образовать третичную структуру, подобную по своей упорядоченности аperiодическому кристаллу. Лишь такая структура биологически функциональна.

Найдем условие возникновения упорядоченной третичной структуры глобулы. Цепь может иметь множество различных конформаций, отвечающих одной и той же энергии  $E$  (в ее величину входит энергия цепи и энтропия любых деформаций, не меняющих третичную структуру). Оптимальной упорядоченной конформации цепи соответствует  $E = E_0$ . При больших перестройках цепи  $E - E_0$  равно по порядку величины объемной энергии  $N\mathcal{E}$ . Конформационная энтропия  $S$ , являющаяся функцией от  $E$ , выражается через логарифм числа конформаций, отвечающих энергии  $E$ . При небольших  $E - E_0$  имеем

$$S(E) = (1/\gamma)(E - E_0) = N\mathcal{E}/\gamma,$$

где  $\gamma$  определяется энергией боковых взаимодействий, приходящихся на одно звено. Для общей свободной энергии получим

$$F \approx N\mathcal{E}(1 - T/\gamma).$$

Следовательно, при  $T > \gamma$  термодинамически выгодна смесь множества конформационных состояний, т. е. третичная структура подобна жидкости. Для возникновения кристаллоподобной структуры необходимо условие  $T < \gamma$ . Но и в этом случае в системе могут происходить локальные нарушения порядка, изменяющие энтропию на  $k \ln c$ , где  $c$  — концентрация локальных дефектов. В глобуле дефекты связаны с топологическими изменениями, с изменениями конформации в целом. Характерная энергия дефекта  $\tilde{E}$  может быть существенно различной в зависимости от того, находится ли дефект в глубине глобулы ( $\tilde{E}_1$ ) или на ее поверхности ( $\tilde{E}_2$ ). Внутри глобулы минимальная концентрация дефектов пропорциональна  $N^{-1}$ , а на поверхности —  $N^{-2/3}$ . Поэтому «объемные» и «поверхностные» топологические нарушения изменяют свободную энергию соответственно на величины  $\tilde{E}_1 - kT \ln N$  и  $\tilde{E}_2 - 2/3 kT \ln N$ . Отсюда следует, что требование устойчивости относительно локальных нарушений имеет вид

$$N < N_{\text{кр}} \approx \exp(\tilde{E}/kT). \quad (4,119)$$

Тем самым, очень длинная цепь не может свернуться в одну глобулу, она должна образовать несколько глобул. Возможно, что именно этим ограничением определяются относительно малые размеры молекул моноглобулярных белков, содержащих обычно около 150 аминокислотных остатков и имеющих молекулярный вес порядка 20 000.

Для самоорганизации кристаллоподобной структуры глобулы необходима ее компактность и достаточно большое поверхностное

натяжение, что накладывает жесткие ограничения на первичную структуру цепи.

Работы [1, 178] имеют принципиальное значение для физики белка. Статистико-термодинамический анализ, основанный на учете линейной памяти в цепи, объясняет общие свойства белковых глобул. Необходимо дальнейшее развитие этих идей применительно к гетерополимерным цепям. В то же время решение проблемы самоорганизации глобулы требует исследования и кинетических факторов. По-видимому, для надежной самоорганизации в длинной цепи необходимо, чтобы кинетические и термодинамические требования совпадали, т. е. чтобы энергетически оптимальная конформация цепи обладала простейшей топологией и была кинетически достижимой.

#### § 4.8. ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ

Как уже указывалось выше (см. стр. 223), сравнительно мягкие воздействия на белок, не разрывающие пептидных связей, могут привести к утрате биологической функциональности — происходит *денатурация* белка. Она может быть вызвана нагреванием, механическим воздействием (ультразвук), изменением рН, действием различных химических агентов (например, мочевины). Денатурация состоит в разрушении пространственной структуры белковых молекул при сохранении первичной структуры цепей. Денатурированная молекула белка оказывается в состоянии статистического клубка с ограничениями, налагаемыми дисульфидными связями, или без них. Для глобулярных белков процесс денатурации сводится к переходу глобула — клубок.

Изучение денатурации дает информацию о природе и устойчивости нативной структуры. Интерпретация экспериментальных данных трудна, так как взаимодействия внутри глобулы и на ее поверхности многообразны, а параметры перехода имеют суммарный характер.

Глобула имеет фиксированную компактную структуру, она является аperiодическим кристаллом. Переход глобула — клубок отличен от переходов  $\alpha$ -спираль — клубок и  $\beta$ -форма — клубок, так как он происходит в трехмерной системе. Кооперативность перехода определяется не только взаимодействиями между соседними звеньями данной цепи, но и взаимодействиями других пространственно сближенных участков цепи или цепей. Кооперативность глобулы определяется не только взаимодействиями (водородные связи и т. д.), но и геометрическими факторами упаковки [2].

На рис. 4.24 показаны результаты исследования термической денатурации глобулярного белка химотрипсिनогена, полученные