ФИЗИКА ЖИЗНЕННЫХ ПРОЦЕССОВ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
ГЛАВНАЯ РЕДАКЦИЯ
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МОСКВА 1975

М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
ГЛАВНАЯ РЕДАКЦИЯ
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МОСКВА 1975

57.04
В 71
УДК 577.3

Молекулярная биофизика, М. В. Волькенштейн. Монография. Изд-во «Наука». Главная редакция физико-математической литературы.

Монография посвящена молекулярно-физическим основам явлений жизни, причем биофизика рассматривается как область физики. Во введении излагаются общие проблемы взаимосвязи физики и биологии, термодинамика и теория информации применительно к биологическим процессам. Далее рассматриваются химические основы биофизики и физика макромолекул. Центральное место в монографии занимают проблемы физики белков и, в частности, физики ферментативных процессов. Отдельные главы посвящены теоретическим основам рентгенографических, оптических и спектроскопических методов исследования биополимеров, а также физике нуклеиновых кислот и их функционированию в биосинтезе белка. Книга основана на достижениях современной науки и, в частности, на работах автора и его сотрудников.

Табл. 62, рис. 227, библиогр. 1296 назв.

Михаил Владимирович Волькенштейн

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА
(Серия: «Физика жизненных процессов»)

М., 1975 г., 616 стр. с илл.

Редактор *Н. А. Райская*
Техн. редактор *Н. Я. Мурашова*
Корректор *Е. Я. Строева*

Сдано в набор 1/XI 1974 г. Подписано к печати 25/IV 1975 г.
Бумага 60×90¹/₁₆, тип. № 1. Физ. печ. л. 38,5.
Условн. печ. л. 38,5. Уч.-изд. л. 39,33. Тираж 6700 экз.
Т-06584. Цена книги 2 р. 72 к. Заказ № 395

Издательство «Наука»
Главная редакция физико-математической литературы
117071, Москва, В-71, Ленинский проспект, 15

Ордена Трудового Красного Знамени
Ленинградская типография № 2
имени Евгении Соколовой Союзполиграфпрома
при Государственном комитете Совета Министров СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
198052, Ленинград, Л-52, Измайловский проспект, 29

В $\frac{21005-064}{053(02)-75}$ 131-74

© Русское издание.
Главная редакция
физико-математической литературы
издательства «Наука», 1975 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 8

Глава 1

Биология и физика 11

§ 1.1. Введение 11
§ 1.2. Финализм и каузальность 18
§ 1.3. Термодинамика и биология 22
§ 1.4. Теория информации и биология 29
§ 1.5. Кооперативность 37
§ 1.6. Биофизика 46
Литература 52

Глава 2

Химические осиовы биофизики 54

§ 2.1. Химия и биология 54
§ 2.2. Аминокислоты 55
§ 2.3. Свойства электролитов 61
§ 2.4. Аминокислотный состав белков 68
§ 2.5. Первичная структура белков 73
§ 2.6. Асимметряя биологических молекул 79
§ 2.7. Нуклеиновые кислоты 82
§ 2.8. Углеводы и липиды 91
§ 2.9. Кофакторы, витамины, гормоны 94
§ 2.10. Важнейшие биохимические процессы 102
§ 2.11. Квантовая биохимия 108
Литература 115

Глава 3

Физика макромолекул 117

§ 3.1. Полимерные цепи 117
§ 3.2. Внутреннее вращение и поворотная изомерия 121
§ 3.3. Поворотно-изомерная теория макромолекул 127
§ 3.4. Макромолекула — кооперативная система 137
§ 3.5. Особенности макромолекулы как статистической системы 142
§ 3.6. Определение молекулярных весов макромолекул 146
§ 3.7. Оптические методы исследования макромолекул 156
§ 3.8. Полиэлектролиты 167
Литература 173

Глава 4

Физика белка 176

§ 4.1. Биологические функции белков 176
§ 4.2. Конформации полипептидной цепи 178
§ 4.3. Ван-дер-ваальсовы силы 189

§ 4.4. Водородная связь и структура воды 196
§ 4.5. Переходы спираль — клубок 207
§ 4.6. Белковая глобула и гидрофобные взаимодействия 219
§ 4.7. Структура и устойчивость глобулы 230
§ 4.8. Денатурация белков 242
§ 4.9. Первичная структура цепи и пространственное строение глобулы 249
§ 4.10. Фибриллярные белки 254
Литература 260

Глава 5

Рентгенография, оптика и спектроскопия биополимеров 265
§ 5.1. Рентгеноструктурный анализ 265
§ 5.2. Рентгенография фибриллярных структур 276
§ 5.3. Рассеяние рентгеновских лучей макромолекулами в растворе . . 281
§ 5.4. Электронные спектры биополимеров 284
§ 5.5. Теория оптической активности 290
§ 5.6. Теория оптической активности биополимеров 304
§ 5.7. Спектрополяриметрия биополимеров 315
§ 5.8. Люминесценция биополимеров 320
§ 5.9. Колебательные спектры биополимеров 326
§ 5.10. Спектры ядерного и электронного парамагнитного резонанса . . 334
Литература 346

Глава 6

Физика ферментов 354
§ 6.1. Химическая кинетика и катализ 354
§ 6.2. Кинетика простых ферментативных реакций 360
§ 6.3. Термодинамика ферментативных реакций 367
§ 6.4. Химические аспекты ферментативной активности 373
§ 6.5. Конформационные свойства ферментов 387
§ 6.6. Влияние pH среды на фермент 394
§ 6.7. Физические аспекты ферментативной активности 399
§ 6.8. Металлоферменты 410
Литература 417

Глава 7

Кооперативные свойства ферментов 421
§ 7.1. Строение и свойства миоглобина и гемоглобина 421
§ 7.2. Феноменологическая теория равновесных свойств гемоглобина . . 433
§ 7.3. Эффект Фарадея 439
§ 7.4. Магнитное оптическое вращение в гемсодержащих белках . . . 446
§ 7.5. Аллостерические ферменты 451
§ 7.6. Кинетика сложных ферментативных реакций 462
§ 7.7. Химическая релаксация 473
Литература 479

Глава 8

Физика нуклеиновых кислот 483
§ 8.1. Молекулярная биология 483
§ 8.2. Структура нуклеиновых кислот 489
§ 8.3. Внутримолекулярные взаимодействия в двойной спирали 501
§ 8.4. Термодинамика переходов спираль — клубок 507
§ 8.5. Кинетика денатурации ДНК 520
§ 8.6. Взаимодействия ДНК с малыми молекулами 528
§ 8.7. Редупликация ДНК 536
Литература 548

Глава 9

Биосинтез белка 553
§ 9.1. Проблема генетического кода 553
§ 9.2. Биосинтез белка 560
§ 9.3. Транскрипция 565
§ 9.4. Транспортные РНК 570
§ 9.5. Рибосомы 577
§ 9.6. Генетический код 583
§ 9.7. Физический смысл генетического кода 589
§ 9.8. Трансляция 595
§ 9.9. Мутации 600
Литература 603

Заключение 608
Предметный указатель 613

Биофизика — старая наука. Уже давно ставились и решались физические проблемы, связанные с жизнедеятельностью организмов, такие, например, как определение скорости распространения нервного возбуждения (Гельмгольц) или нахождение спектральных основ цветного зрения (Максвелл). Физические методы применялись в биологии издавна — достаточно упомянуть о микроскопе. Однако лишь во второй половине XX века физика объединилась с биологией в изучении основных явлений жизни и началось формирование теоретической и экспериментальной биофизики как обширной и разнообразной области физики, а не подсобного раздела физиологии. Развитие биофизики непосредственно связано с решающими достижениями биологии, прежде всего молекулярной, с возникновением кибернетики, с успехами физики конденсированных систем (в частности, физики полимеров).

Современное состояние естествознания не только допускает, но и требует монографического изложения основ биофизики. Такое изложение должно исходить из представления о биофизике как области физики. Согласно этому представлению исследование относится к биофизике, если задача его поставлена как физическая задача. Иными словами, задачи биофизики состоят в познании явлений жизни, основанном на общих принципах физики, и изучении атомно-молекулярной структуры вещества. Методы решения этих задач могут быть и нефизическими.

Построение биофизики в целом требует молекулярного обоснования. В настоящей книге излагается молекулярная биофизика — физика белков и нуклеиновых кислот. Это область биофизики, наиболее развитая в настоящее время. В молекулярной биофизике мы встречаемся со специфическими свой-

ствами и строением очень сложных молекул, определяющими явления жизни, но важнейшие проблемы биологии, прежде всего проблема развития, остаются пока за ее пределами. Однако, как показывают исследования последних лет, к изучению этих проблем можно и должно подойти, опираясь на хорошо разработанные молекулярные представления. Тем самым, молекулярная биофизика должна служить основой для рассмотрения процессов жизнедеятельности клеток и организмов на всех уровнях структуры и функциональности. От молекул мы переходим к надмолекулярным системам, к клеткам и организмам. Физическое истолкование явлений регуляции и развития требует как молекулярно-физических, так и общих феноменологических представлений. Однако изложение биофизики клетки и более сложных живых систем выходит за рамки этой книги. Соответственно в первой главе дается лишь краткая характеристика общетеоретических основ биофизики — термодинамики открытых систем и теории информации.

Молекулярная биофизика может быть определена как область перекрывания молекулярной физики (в частности, физики макромолекул) и молекулярной биологии. Следовательно, она является частью обеих этих областей естествознания. Она развивалась одновременно с молекулярной биологией и неотделима от нее.

Молекулы, которыми занимается биофизика, характеризуются многими особенностями, отличающими их от молекул неживой природы. Белки — самые сложные из известных нам молекул. Будучи макромолекулами, белки и нуклеиновые кислоты не являются статистическими системами, в отличие от макромолекул синтетических полимеров. Это — динамические системы, своего рода машины, поведение которых определяется положением и функциональностью каждого элемента, образующего молекулу. Основная задача молекулярной биофизики состоит в исследовании специфических особенностей, определяющих строение и свойства биологических молекул. Физическая теория, с которой приходится иметь дело в молекулярной биофизике, есть теория строения и физических свойств этих молекул и одновременно теория методов исследования, применяемых в эксперименте.

«Молекулярная биофизика» предназначена для физиков и биофизиков, научных работников, аспирантов и студентов старших курсов. Основное внимание в книге обращено на теоретические основы молекулярной биофизики и применяемых в ней методов. В ряде разделов излагаются оригинальные результаты, полученные автором и его сотрудниками.

Биофизика, равно как и биология, сейчас стремительно развивается. Наши знания непрерывно обогащаются, многие представления быстро устаревают. Попытка изложить современную биофизику должна состоять в фиксации принципиальных и надежно установленных положений и в указании дальнейших путей развития. Нужно по возможности отграничиться от всего преходящего. В этом и состоит основная трудность — в какой мере она преодолена, будет судить читатель.

Я благодарю за помощь в работе над рукописью Г. В. Гурского, Н. Г. Есипову, А. М. Жаботинского, В. И. Иванова, М. А. Лившица, А. И. Полетаева, В. Г. Туманяна и Ю. А. Шаронова и особенно Н. А. Райскую.

М. Волькенштейн

БИОЛОГИЯ И ФИЗИКА

§ 1.1. ВВЕДЕНИЕ

Тела неживой и живой природы равно построены из атомов и молекул. Тем самым они подчиняются единым законам, выражающим строение и свойства вещества и поля. Современная физика обращается к изучению жизни. Проблема соотношения физики и биологии стала сейчас особенно актуальной.

Тесная связь биологии и физики представлялась очевидной на ранних этапах развития естествознания. В дальнейшем, по мере углубления биологических знаний, раскрывавших сложность и своеобразие явлений жизни, пути биологии и физики все более расходились. Основные биологические закономерности — прежде всего дарвиновский закон естественного отбора — рассматривались как совершенно несовместимые с физикой.

Иначе развивалось взаимодействие биологии с химией. Химия жизни, органическая химия поначалу была совершенно отделена от неорганической. Казалось, что вещества, фигурирующие в живых организмах, принципиально не могут быть получены *in vitro*. Их можно проанализировать, но не построить. Возникновение органического вещества требует участия особого агента — жизненной силы. Органическая химия считалась надежной опорой витализма.

Но химия перешагнула этот рубеж. В 1777 г. Лавуазье показал, что дыхание и горение имеют общую природу — они сводятся к окислению органических веществ с образованием воды и углекислого газа. В 1828 г. Вёлер впервые синтезировал органическое соединение — мочевину $CO(NH_2)_2$ — из неорганических исходных веществ. В дальнейшем органическая химия перестала быть химией живого и превратилась в химию соединений углерода. Исходя из успехов химии, наиболее дальновидные мыслители прошлого века отвергли витализм во имя материалистического естествознания. «...Химия подводит к органической жизни, и она продвинулась достаточно далеко вперед, чтобы гарантировать нам, что *она одна* объяснит нам диалектический переход к организму» — писал Энгельс ([1], стр. 198). «Остается добиться еще только одного: объяснить возникновение жизни из неорганической природы. На

современной ступени развития зто означает не что иное, как следующее: изготовить белковые тела из неорганических веществ» ([1], стр. 156).

Эти представления привели Энгельса к его формуле жизни: «Жизнь — зто способ существования белковых тел, существенным моментом которого является *постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой...*» ([1], стр. 244). В этой формуле указаны основные особенности жизни, познание которой сводится к искусственному синтезу белка.

Сейчас мы понимаем, что дело обстоит не так просто — сегодня некоторые белки уже синтезированы, но это совсем не означает решения проблемы. Если организм — белковая система, то надо понять, как она работает. Как справедливо писал Энгельс, необходимым условием ее работы является обмен веществ с окружающей средой. Тем самым, речь идет об открытой белковой системе.

Последующее развитие науки показало, что белки действительно ответственны за функционирование живого организма. Однако для жизнедеятельности необходимы многие другие вещества — низко- и высокомолекулярные — и прежде всего нуклеиновые кислоты. Без многообразия веществ, взаимодействующих друг с другом, без химической гетерогенности жизнь невозможна. Индивидуальное химическое соединение любой сложности — будь то белок или нуклеиновая кислота — не живет. Бессмысленно говорить о живых молекулах. Живой организм и любая его функциональная часть — всегда сложная гетерогенная система взаимодействующих злементов — больших и малых молекул, ионов и надмолекулярных структур.

Передовые идеи XIX века не могли еще преодолеть витализм. Это направление мысли нашло новые аргументы в самом развитии естествознания.

В XIX веке были созданы две великие зволюционные теории. Второе начало термодинамики (Клаузиус, Гиббс, Больцман) дает закон зволюции вещества в изолированной системе к его наиболее вероятному состоянию, характеризуемому максимальной неупорядоченностью, максимальной энтропией. Напротив, теория биологической эволюции (Дарвин) выражает возрастание упорядоченности и сложности живых систем, начиная с примитивных микроорганизмов и кончая *Homo sapiens* с его мыслящим мозгом. Между этими двумя теориями действительно имеется несоответствие — биологическая эволюция, филогенез, а также онтогенез никак не согласуются с равновесной термодинамикой изолированных систем.

В то же время в XIX веке биология оказала мощное воздействие на развитие физики. Закон сохранения энергии, первое начало термодинамики, был открыт Майером, Джоулем и

Гельмгольцем. Как известно, Майер исходил в своей работе из наблюдений над живым организмом, над людьми. Менее известно, что Гельмгольц также исходил из биологических явлений, из четкой антивиталистической концепции. Он писал: «По Шталю, силы действующие в живом теле, суть физические и химические силы органов и веществ, но какая-то присущая телу жизненная душа или жизненная сила может связывать или освобождать их деятельность... Я нашел, что теория Шталя приписывает всякому живому телу свойства так называемого *perpetuum mobile* (вечного двигателя)... Таким образом я натолкнулся на вопрос, какие отношения должны существовать между различными силами природы, если принять что *perpetuum mobile* вообще невозможно...» [2].

Основной вопрос, с ответа на который должно начинаться построение и изучение биофизики, т. е. физики живой природы, — это вопрос о соотношении биологических и физико-химических явлений. Либо в биологии содержится нечто принципиально чуждое физике и химии, либо жизнь есть особое проявление физических и химических процессов, протекающих в сложных открытых системах. *Tertium non datur.* Либо биология противостоит физике, либо противоречия между биологией и физикой кажущиеся, и витализм в любой его форме несостоятелен.

Современный витализм не отрицает применимости законов физики к исследованию явлений жизни, но, как мы увидим, утверждает, что здесь нужна новая, еще не созданная физика. Вместе с тем физическая трактовка важнейших биологических процессов зачастую рассматривается как недопустимый редукционизм, как сведение сложных биологических законов к более простым — физическим.

Однако рассуждения о «сводимости» или «несводимости» лишены содержания. Речь идет не о поглощении биологии физикой, но о выяснении единства живой и неживой природы. Физика, как общая наука о веществе и полях, никак не проще биологии. Следует говорить не о редукционизме, но об интеграции различных областей знания. Так, сейчас совершенно ясно, что в химических превращениях нет никаких явлений помимо физических, и химия «сводится» к физике. Это ни в коей мере не отменяет самостоятельности и значимости химии, напротив, химия получает более глубокое и общее обоснование.

В то же время вопрос о достаточности современной физики для познания жизненных явлений имеет реальный смысл. В связи с этим следует остановиться на концепциях, предложенных некоторыми биологами и физиками.

Берталанффи на протяжении ряда лет развивал идеи, относящиеся к так называемой общей теории систем (см. [3]).

Берталанффи считает биологические явления познаваемыми средствами точной науки. Мнимое противоречие с термодинамикой снимается, если учесть, что организмы — открытые системы, обменивающиеся с окружающей средой и веществом и энергией. Между тем каноническая термодинамика относится к изолированным системам. Поэтому для физического истолкования биологических явлений необходима термодинамика открытых систем, неравновесная термодинамика. Берталанффи усматривает основу теоретической биологии в теории систем. Система — совокупность объектов, взаимодействующих друг с другом. Свойства системы нельзя представить суммой свойств образующих систему элементов. Рассмотрение системности позволяет исследовать проблемы целостности, динамического взаимодействия и организации. Для биологии эти проблемы — основные.

Еще до построения термодинамики открытых систем Бауэр писал о неравновесных свойствах организмов. Основной закон биологии по Бауэру гласит: «...живые системы никогда не бывают в равновесии и исполняют за счет своей свободной энергии постоянную работу против равновесия, требуемого законами физики и химии при существующих внешних условиях» [4]. Идеи Бауэра остались непонятыми его современниками, как, впрочем, и некоторыми новейшими комментаторами (см., например, [5]). Бауэр приближался к современной биофизике, но сегодня его работы сохранили главным образом исторический интерес. Существенно то, что Бауэр доказывал возможность атомно-молекулярного истолкования жизни: «...неравновесное состояние живой материи и, следовательно, ее постоянно сохраняющаяся работоспособность обусловливаются... молекулярной структурой живой материи, а источником работы, производимой живыми системами, служит в конечном счете свободная энергия, свойственная этой молекулярной структуре, этому состоянию молекул» [4].

Бор рассматривал проблему соотношения физики и биологии на основе принципа дополнительности [6]. Он считал, что собственно биологические законы дополнительны к законам, которым подчиняются неживые тела. Нельзя одновременно определить физико-химические свойства организма и явления жизни — познание одного исключает познание другого. Жизнь следует рассматривать «...как основной постулат биологии, не поддающийся дальнейшему анализу, подобно тому, как существование кванта действия... образует элементарную основу атомной физики» [6], стр. 37). Таким образом, Бор считал биологические и физико-химические исследования дополнительными, т. е. несовместимыми, хотя и не противоречащими друг другу. Эта концепция не имеет ничего общего с витализмом, так как она отрицает существование какой-либо границы при-

менения физики и химии к решению биологических проблем. «...Ни один результат биологического исследования не может быть однозначно описан иначе, как на основе понятий физики и химии, совершенно так же, как всякое описание опыта даже в атомной физике должно в конечном счете опираться на понятия, необходимые для сознательной регистрации чувственных восприятий» ([6]), стр. 37).

Исходя из того же принципа дополнительности, говорили о несовместимости познания морфологического строения и функциональности, гомологии и аналогии, среды и внутреннего состояния, наследственности и адаптируемости. Изучая одну сторону биологического явления, мы так сильно влияем на другую, что она становится принципиально непознаваемой. Так как в жизни одновременно проявляются все некоммутирующие факторы, она непознаваема. Можно изучить атомно-молекулярную структуру организма, но для этого он должен быть убит [7].

В сущности эта точка зрения не нова. Еще Гёте устами Мефистофеля говорил:

«Кто хочет живое описать и познать,
Пытается дух из него изгнать.
И вот он держит все части в руках,
Но связи духовной в них нет — лишь прах.
«*Enheiresin naturae*» — вот химии слово,
Самой над собой посмеяться готовой».

«*Enheiresin naturae*» — повадка природы, способ ее действия. Гёте считал, что организм столь разнообразен и неисчерпаем, что невозможно выбрать достаточное число исходных точек для его обозрения, развить у себя достаточное число органов, для того чтобы расчленить организм без того, чтобы его убить.

Взгляды Бора изменялись по мере развития современной биологии. Позднее он говорил о дополнительности между практически применяемыми в биологии соображениями физико-химического характера и понятиями, прямо связанными с целостностью организма и выходящими за рамки физики и химии ([6], стр. 107). Применение принципа дополнительности в биологии Бор аргументировал уже не постулативным характером понятия жизни, но чрезвычайной сложностью организма как целостной системы. В своем последнем выступлении на эту тему [8] Бор говорил только о практической, но не о принципиальной дополнительности, связанной с неисчерпаемой сложностью жизни (см. также письмо Бора к автору этих строк, опубликованное в [9]).

В 1945 г. Шредингер написал книгу, посвященную связи биологии с физикой [10]. В этой книге глубоко и содержательно

рассмотрены три проблемы, имеющие фундаментальное значение для биофизики.

Первая проблема — термодинамические основы жизни. Отличие живого организма от тел неживой природы состоит в исключительно высокой упорядоченности организма, подобного в этом смысле «апериодическому кристаллу», к способности этой упорядоченности поддерживать себя и производить упорядоченные явления. Речь идет о саморегуляции и самовоспроизведении организмов и клеток. Шредингер объяснил эту особенность тем, что организм — открытая система, существующая в неравновесном состоянии благодаря потоку энтропии во внешнюю среду. Организмы непрерывно создают «порядок из порядка», «извлекают упорядоченность из окружающей среды» в виде «хорошо упорядоченного состояния материи в пищевых продуктах». Шредингер отвечает на вопрос о причине макроскопичности, многоатомности организма. В системе, состоящей из малого числа атомов, флуктуации должны уничтожать упорядоченность. Именно благодаря многоатомности организм существует в соответствии с законами термодинамики.

Вторая проблема — молекулярные основы жизни. Шредингер аргументирует материалистическое представление о молекулярной природе генов и ставит вопросы о структуре вещества наследственности и причинах его устойчивого воспроизведения в ряду поколений. Ответы на эти вопросы дала молекулярная биология, возникновение которой было в большой степени стимулировано книгой Шредингера.

Третья проблема — квантовомеханические закономерности, отчетливо выраженные в радиобиологических явлениях. Обсуждая труды Тимофеева-Ресовского, Дельбрюка и др., Шредингер отмечает соответствие биологических процессов законам квантовой физики.

Книга Шредингера очень важна, так как в ней не только показано отсутствие противоречий между физикой и биологией, но и начертаны пути развития биофизики, реализованные в дальнейшем.

Эльзассер противопоставлял физику биологии [11]. Запас информации, содержащейся в исходной зародышевой клетке, зиготе, значительно меньше, чем во взрослом многоклеточном организме. Возрастание объема информации, с точки зрения Эльзассера, физически необъяснимо — это специфическая для живых систем «биотонная» закономерность. Далее эти представления будут рассмотрены подробно (стр. 33).

Вигнер считал, что саморепродукция биологических молекул и организмов противоречит квантовой механике [12]. Вероятность существования саморепродуцирующихся состояний практически равна нулю. Можно представить гамильтониан,

управляющий поведением сложной системы, беспорядочной симметричной матрицей. Пусть состояние организма описывается N-мерным вектором $\mathbf{v}$; аналогичный многомерный вектор для пищи обозначим $\mathbf{w}$. Общий вектор для системы организм + пища имеет вид

$$\Phi = \mathbf{v} \times \mathbf{w}. \tag{1,1}$$

После репродукции получаем

$$\Psi = \mathbf{v} \times \mathbf{v} \times \mathbf{r}, \tag{1,2}$$

где $\mathbf{r}$ — R-мерный вектор, описывающий результаты обмена веществ и координаты двух организмов. Если «матрица столкновений» S, создающая конечное состояние в результате взаимодействия организма и пищи, беспорядочна, стохастична, то вектор Ψ преобразуется при «столкновении» по закону

$$v_k v_\lambda r_\mu = \sum_{k', \lambda', \mu'} S_{k\lambda\mu,\, k'\lambda'\mu'} v_{k'} w_{\lambda'\mu'}. \tag{1,3}$$

Число таких уравнений равно N^2R. Число неизвестных (N значений v плюс R значений r плюс NR значений w) много меньше числа уравнений, так что было бы чудом, если бы неизвестные удовлетворяли написанному соотношению. Вигнер вслед за Эльзассером считал редупликацию биологических макромолекул «биотонным» явлением.

В действительности, как показал Эйген [13], матрица S не беспорядочна. Вигнер не учитывает инструктирующих функций информационных макромолекул. Все рассуждения Вигнера поэтому не имеют отношения к действительности, и вывод о необходимости модификации квантовой механики применительно к биологии оказывается ложным. В то же время применение квантовой механики к макроскопическим системам требует специального рассмотрения.

В важной работе Эйгена [13], посвященной самоорганизации и эволюции биологических макромолекул, убедительно аргументируется тезис о достаточности современной физики для объяснения биологических явлений.

Живой организм представляет собой открытую, саморегулируемую и самовоспроизводящуюся гетерогенную систему, важнейшими функциональными веществами которой служат биополимеры — белки и нуклеиновые кислоты. Такая система подлежит комплексному физическому и химическому исследованию. Ее познание должно опираться на раскрытие физических особенностей жизни — на физическое рассмотрение развития организма, его неравновесности, упорядоченности, системности.

§ 1.2. ФИНАЛИЗМ И КАУЗАЛЬНОСТЬ

Прежде чем перейти к обсуждению физических основ жизненных явлений, остановимся на важной их особенности, обычно воспринимаемой как противоречащая физике.

В биологии естественно возникает финалистическая трактовка изучаемых явлений. Развитие зиготы во взрослый организм можно описывать, пользуясь понятием цели: целью развития является создание организма. Его структура целесообразна, она соответствует условиям существования. Уже на ранней стадии эмбриогенеза определенные группы клеток предназначены для развития в определенный орган, и этим задается их функциональность на всех уровнях вплоть до молекулярного. Также описывается и филогенез — эволюционное развитие. Оно направлено в сторону наибольшей приспособленности популяции — элементарной эволюционирующей системы — к внешним условиям.

В этом смысле организм подобен машине, построенной по плану для достижения определенной цели. Конечно, научная биология далека от телеологического рассмотрения процессов развития. Достижение цели в онтогенезе и филогенезе является следствием реальных причин (естественного отбора и т. д.). Подчеркивая наличие некоторого плана развития, Моно вводит понятие телеономии [14], имея в виду причинную обусловленность (каузальность) развития. Исключительная сложность и историчность филогенетического и онтогенетического развития организма — живой машины — определяют его финалистическое описание, не свойственное обычной физике и химии. Очевидна бессодержательность такого, например, утверждения: «Ионы натрия и хлора взаимодействуют друг с другом с тем, чтобы построить кубический кристалл». Напротив, утверждение «...по той причине, что ионы Na и Cl имеют такие-то заряды и радиусы, кристалл NaCl должен быть кубическим» имеет ясный смысл.

Физики обычно спрашивают «почему?», в биологии часто ставится вопрос «для чего?».

Понятие целесообразности тесно связано с понятием оптимальности. Оптимальность означает достижение некоторого результата («цели») ценою наименьшей затраты энергии, времени возникновения системы, наилучшим образом выполняющей определенные функции и т. д.

Биологический финализм выражает, с одной стороны, сложность биологических явлений и структур, препятствующую их каузальному объяснению на атомно-молекулярном уровне. С другой стороны, финализм характеризует необратимость и «антиэнтропийность» развития, реализующего план, программу, инструктирующее действие информации (стр. 37).

В действительности нет противоречия между финализмом и каузальностью и нет противоречия между физикой и биологией в этом аспекте. В сущности финализм возникает в физике всякий раз, когда ее принцип формулируется как вариационный. Приведем примеры.

Состояние устойчивого движения сохраняется при малых возмущениях. Возмущение не может его изменить. Отсюда следует финалистическая формулировка — система стремится сохранить свое состояние. Напротив, неустойчивое состояние при малом возмущении необратимо изменяется — система стремится перейти в другое состояние (рис. 1.1, переход маятника из состояния *2* в состояние *1*).

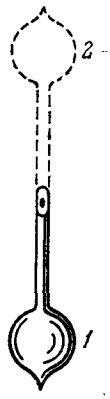


Рис. 1.1. Устойчивое (*1*) и неустойчивое (*2*) равновесия физического маятника.

Весьма общая формулировка закона движения механических систем заключена в принципе наименьшего действия Гамильтона. Функция Лагранжа системы, зависящая от обобщенных координат q, скоростей $\dot{q}$ и времени t $L(q, \dot{q}, t)$, удовлетворяет условию

$$S = \int_{t_1}^{t_2} L(q, \dot{q}, t)\, dt = \text{мин.} \qquad (1,4)$$

Иными словами, вариация δS равна нулю. Действие S, выражаемое интегралом, минимально (т. е. система движется между двумя наборами координат $q^{(1)}$, $q^{(2)}$ и скоростей $\dot{q}^{(1)}$, $\dot{q}^{(2)}$, отвечающих моментам времени t_1 и t_2, таким образом, чтобы S имело минимальное значение). «Цель механической системы состоит в ее наименьшем действии». Движение системы в этом смысле оптимально.

Но выражение (1,4) эквивалентно уравнениям движения Лагранжа

$$\frac{d}{dt}\frac{\partial L}{\partial \dot{q}} - \frac{\partial L}{\partial q} = 0. \qquad (1,5)$$

Функция Лагранжа L равна разности кинетической и потенциальной энергий системы

$$L = \sum_a {}^1/_2 m_a v_a^2 - U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \ldots), \qquad (1,6)$$

где m_a — масса, $\mathbf{r}_a$ — радиус-вектор, v_a — скорость a-й материальной точки. Уравнения (1,4) и (1,5) можно переписать в виде уравнений движения Ньютона

$$m_a \frac{d^2\mathbf{r}_a}{dt^2} = -\frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}_a}. \qquad (1,7)$$

Финалистическое выражение (1,4) сводится к каузальным уравнениям (1,7), описывающим движение как результат действия сил. Другие примеры финалистически формулируемых законов физики: принцип Ферма в оптике, принцип Ле Шателье в термодинамике, правило Ленца в электродинамике. Число таких примеров в сущности неограниченно.

Уравнения движения (1,7) механики обратимы, так как они содержат лишь вторые производные по времени и, следовательно, не изменяются при замене знака времени на противоположный, т. е. при $t \to -t$. Однако эти уравнения имеют решения, отвечающие как устойчивым, так и неустойчивым равновесиям и движениям. Так, оба состояния равновесия маятника, изображенные на рис. 1.1, не противоречат статике. Но состояние *1* устойчиво, а состояние *2* неустойчиво. Малые силы и малые отклонения от начального состояния материальной системы обязательно существуют и возмущают равновесия и движения. В состоянии *1* эти возмущения несущественны, напротив, состояние *2* резко изменяется под их влиянием. Равновесия и движения, слабо изменяющиеся при возмущениях, устойчивы, сильно изменяющиеся — неустойчивы.

Но что означает «слабо» и «сильно»? Общая задача об устойчивости движения была решена в классической работе Ляпунова в 1892 г., сформулировавшего критерии устойчивости [15] (см. также [16]). Если при *сколь угодно малом* (но не равном нулю) возмущении величина рассматриваемой характеристики в возмущенном движении будет со временем все более и более отклоняться от ее величины в невозмущенном движении, то последнее неустойчиво по отношению к этой характеристике. Движение маятника при его малых отклонениях от положения равновесия *1* описывается уравнением

$$\ddot{\varphi} + \omega^2 \varphi = 0, \tag{1,8}$$

где φ — угол отклонения, ω — круговая частота колебаний, равная

$$\omega = 2\pi \sqrt{g/l}, \tag{1,9}$$

g — ускорение силы тяжести, l — длина маятника. Решение уравнения (1,8):

$$\varphi \equiv x = A \cos(\omega t + \alpha), \quad \dot{\varphi} \equiv y = A\omega \sin(\omega t + \alpha) \tag{1,10}$$

(A — амплитуда колебания, $A \cos \alpha$ — начальное отклонение). Исключая время t из выражений для x и y, получаем набор траекторий движения на фазовой плоскости x, y, отличающихся друг от друга значениями A:

$$\frac{x^2}{A^2} + \frac{y^2}{A^2\omega^2} = 1. \tag{1,11}$$

Это уравнения эллипсов (рис. 1.2). Уравнение движения на фазовой плоскости, имеющее вид

$$\frac{dy}{dx} = -\omega^2 \frac{x}{y}, \tag{1,12}$$

есть уравнение интегральной кривой с особой точкой $x = 0$, $y = 0$, через которую ни одна интегральная кривая не проходит. Вблизи нее интегральные кривые замкнуты и не имеют особенностей. Такая точка называется центром. Движения вокруг центра — периодические.

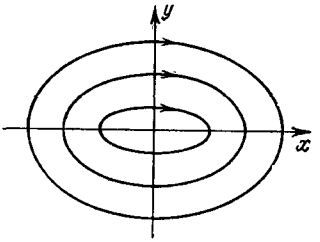


Рис. 1.2. Фазовые траектории маятника.

Состояние равновесия устойчиво, если для любой заданной области ε допустимых отклонений от состояния равновесия имеется область $\delta(\varepsilon)$, окружающая это состояние и обладающая тем свойством, что ни одно движение, начинающееся внутри δ, никогда не достигнет границы области ε. И, наоборот, состояние равновесия неустойчиво, если имеется область ε, для которой область $\delta(\varepsilon)$ не существует. В нашем примере условие устойчивости колебаний маятника имеет вид:

если для $t = 0$

$$|x(0)| < \delta \quad \text{и} \quad |y(0)| < \delta', \tag{1,13}$$

то для $0 < t < \infty$

$$|x(t)| < \varepsilon \quad \text{и} \quad |y(t)| < \varepsilon'. \tag{1,14}$$

Особая точка типа центра соответствует устойчивому состоянию равновесия [17].

Вопросы устойчивости важны в теории автоматического регулирования, в теории колебательных движений и т. д. Очевидно, что проблема устойчивости динамического состояния биологической системы неизбежно возникает и в биофизике.

Идеальные уравнения механики обратимы, тогда как теория устойчивости встречается с необратимостью. Состояние устойчивого движения сохраняется при малых возмущениях. Возмущение не может его изменить. Отсюда следует финалистическая формулировка — система стремится сохранить свое состояние. Напротив, неустойчивое состояние при малом возмущении изменяется необратимо.

В общем случае состояние физической системы характеризуется не механическими, но термодинамическими условиями. Второе начало термодинамики — стремление энтропии изолированной системы к максимуму (финалистическая формулиров-

ка) — можно записать в вариационной форме:

$$(\delta S)_{eq} = 0, \tag{1,15}$$

где индекс eq относится к состоянию равновесия. Очевидно, что термодинамическая трактовка биологических явлений — прежде всего процессов развития — должна исходить из рассмотрения необратимых переходов в открытых системах. Финализм связан с неустойчивостью соответствующих состояний. Главные трудности определяются не статическим, но динамическим, «машинным», характером биологических систем. Это, однако, никоим образом не означает противоречия между биологией и физикой.

§ 1.3. ТЕРМОДИНАМИКА И БИОЛОГИЯ

Физическое рассмотрение любых систем — в том числе и живых — начинается с их феноменологического, термодинамического описания. Дальнейшее исследование дает такому описанию атомно-молекулярное содержание.

Главные термодинамические особенности живой системы состоят в том, что такие системы открыты и неравновесны. Соответственно необходима не термостатика, но термодинамика в истинном смысле этого слова, учитывающая изменения термодинамических величин во времени. Неравновесная термодинамика смыкается с кинетикой. Здесь мы ограничимся некоторыми основными положениями.

Общее изменение энтропии dS в открытой неравновесной системе складывается из изменения энтропии в результате ее продукции внутри системы d_iS и потока энтропии из внешней среды в систему и из системы в среду d_eS

$$dS = d_iS + d_eS. \tag{1,16}$$

Построим мысленно адиабатическую оболочку вокруг системы. Тогда $d_eS = 0$ и, согласно второму началу,

$$dS = d_iS > 0. \tag{1,17}$$

Если продукция энтропии определяется химическими реакциями, то

$$d_iS = -\frac{1}{T}\sum_k \mu_k\, dn_k, \tag{1,18}$$

где μ_k — химический потенциал k-й компоненты, dn_k — изменение ее молярного содержания.

Введем координату химической реакции ξ, выражающую степень прохождения реакции, определив ее уравнением

$$dn_k = \nu_k d\xi, \tag{1,19}$$

где ν_k — стехиометрические коэффициенты реакции. Так, например, при окислении глюкозы $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ имеем

$$\nu_{C_6H_{12}O_6} = -1, \quad \nu_{O_2} = -6, \quad \nu_{CO_2} = 6, \quad \nu_{H_2O} = 6.$$

Подставляя (1,19) в (1,18), получаем

$$d_i S = -\frac{d\xi}{T}\sum_k \mu_k \nu_k = \frac{A\,d\xi}{T}. \tag{1,20}$$

Величина

$$A = -\sum_k \mu_k \nu_k \tag{1,21}$$

называется *сродством*. Согласно (1,20) $A > 0$. В состоянии равновесия $A = 0$, равно, как и $d\xi$. В самом деле,

$$A = RT\left[\ln K - \ln \prod_k a_k^{\nu_k}\right], \tag{1,22}$$

где K — константа равновесия, a_k — активность k-й компоненты.

Продукция энтропии (в единицу времени) равна

$$\frac{d_i S}{dt} = \int \sigma\, dV \geqslant 0. \tag{1,23}$$

Продукция энтропии в единице объема $\sigma \geqslant 0$, так как неравенство (1,23) справедливо для любого макроскопического объема. Величина σ называется *функцией диссипации*.

В случае химической реакции

$$\sigma = -\frac{d\xi}{dt}\frac{1}{T}\sum_k \mu_k \nu_k = \frac{Av}{T} \geqslant 0, \tag{1,24}$$

где v — скорость химической реакции. При одновременном протекании многих реакций имеем

$$\sigma = \frac{1}{T}\sum_l A_l v_l \geqslant 0. \tag{1,25}$$

Изолированная реакция, для которой $A_1 v_1 < 0$, невозможна. Однако если одновременно протекает реакция, для которой $A_2 v_2 > 0$, то первая реакция возможна, если $A_1 v_1 + A_2 v_2 > 0$. Такое суммирование отвечает термодинамическому сопряжению реакций. Благодаря термодинамическому сопряжению в открытых системах протекают процессы, не реализуемые в изолированных системах.

В общем случае функция диссипации σ выражается суммой произведений некоторых *потоков* J (в химической реакции v)

и их макроскопических причин — обобщенных *сил* X (в химической реакции A/T), т. е.

$$\sigma = \sum_l J_l X_l. \tag{1,26}$$

Потоки и силы взаимозависимы. Их связь легко устанавливается для одного потока, возникающего под действием одной силы. Таковы решения уравнения теплопроводности Фурье (поток тепла, сила — разность температур), уравнения диффузии Фика (поток вещества, сила — разность концентраций) и т. д. В химических реакциях мы имеем дело со скалярными потоками и силами. Таким образом, в линейном приближении потоки пропорциональны силам

$$J_i = \sum_{k=1}^{n} L_{ik} X_k, \quad i = 1, 2, \ldots, n, \tag{1,27}$$

где L_{ik} — так называемые *феноменологические коэффициенты*. Для химических реакций

$$v_l = \frac{d\xi_l}{dt} = \sum_k L_{lk} A_k / T. \tag{1,28}$$

Линейное приближение справедливо вблизи состояния равновесия. В этой области, как показал Онзагер [18], совершив соответствующее преобразование координат, всегда можно выбрать потоки и силы так, чтобы матрица, образованная коэффициентами L_{lk}, была симметрична

$$L_{lk} = L_{kl}. \tag{1,29}$$

Справедливость условия (1,29) можно доказать, исходя из теории флуктуаций и принципа макроскопической обратимости. Казимир в дальнейшем обобщил это условие [19].

Близость к равновесию для химического процесса означает, что

$$A_k \ll RT. \tag{1,30}$$

Представим соотношение (1,28) в виде

$$v_i = \frac{1}{T} \sum_k L_{ik} \sum_l \left(\frac{dA_k}{d\xi_l}\right)_{T,\,p} \delta\xi_l. \tag{1,31}$$

Матрицу L_{ik} и тензор $(\partial A_k/\partial \xi_l)_{T,\,p}$ можно диагонализировать. Тогда последнее соотношение линейно трансформируется и принимает вид

$$v_l' = \frac{d\xi_l'}{dt} = -\frac{\delta\xi_l'}{\tau_l}, \tag{1,32}$$

где ξ_i' — нормальная координата, являющаяся линейной комбинацией исходных ξ_l, τ_i — время релаксации системы к ее равновесному состоянию, имеющее вещественное и положительное значение.

Решение уравнения (1,32) описывает приближение к равновесию

$$\delta\xi_i' = \delta\xi_{i0}' \exp(-t/\tau_i). \tag{1,33}$$

Условие стабильности равновесного состояния имеет вид $\sigma \geqslant 0$ или

$$\sigma = \frac{1}{T^2} \sum_{l,\,k} L_{lk} A_l A_k \geqslant 0. \tag{1,34}$$

Любая флуктуация $\delta\xi_k$ вблизи равновесного состояния может только уменьшить энтропию (ср. стр. 22), т. е.

$$\delta_i S \leqslant 0, \tag{1,35}$$

или

$$\delta_i S = \frac{1}{T} \sum_k A_k \delta\xi_k \leqslant 0. \tag{1,36}$$

Разлагая A_k в ряде по $\delta\xi_k'$ вблизи положения равновесия и диагонализуя тензор, имеем, учитывая, что в равновесии $A_k = 0$,

$$A_k = A_k^{(\mathrm{eq})} + \left(\frac{\partial A_k'}{\partial \xi_k'}\right)_{\mathrm{eq}} \delta\xi_k' + \ldots = \left(\frac{\partial A_k'}{\partial \xi_k'}\right)_{\mathrm{eq}} \delta\xi_k' + \ldots \tag{1,37}$$

Следовательно,

$$\delta_i S = \frac{1}{T} \sum_k \left(\frac{\partial A_k'}{\partial \xi_k'}\right)_{\mathrm{eq}} (\delta\xi_k')^2 \leqslant 0. \tag{1,38}$$

Это действительно так, ибо $(\partial A_k'/\partial \xi_k') < 0$.

Если система открытая и $d_e S \neq 0$, то при постоянных граничных условиях система стремится к неравновесному *стационарному состоянию*, в котором

$$dS = d_i S + d_e S = 0,$$

или

$$d_e S = -d_i S < 0. \tag{1,39}$$

Стационарное состояние поддерживается оттоком энтропии в окружающую среду.

Рассмотрим изолированную систему, состоящую из организма и некоторой внешней среды. Организм получает из этой среды питательные вещества, кислород, воду и в свою очередь выделяет в нее различные вещества. Между организмом и средой

осуществляется теплообмен. В таких условиях практически находится космонавт в космическом корабле. Организм космонавта — открытая система по отношению к кораблю, но корабль в целом хорошо изолирован. Общее изменение энтропии всей системы, согласно второму началу,

$$dS = dS_1 + dS_2 > 0,$$

где dS_1 и dS_2 — изменение энтропии космонавта и окружающей среды соответственно. Космонавт — открытая система, и, следовательно,

$$dS_1 = d_iS_1 + d_eS_1.$$

Изменение энтропии среды, окружающей космонавта, происходит лишь в результате обмена веществом и энергией с космонавтом. Предположим, что в самой среде нет продукции энтропии. Тогда $dS_2 = -d_eS_1$ и, значит, $dS = d_iS_1 > 0$.

Если состояние космонавта стационарно, то

$$dS_1 = 0, \quad d_eS_1 = -d_iS_1 < 0, \quad dS_2 = dS = d_iS_1 > 0.$$

Таким образом, стационарное состояние космонавта поддерживается возрастанием энтропии в окружающей среде, определяемым оттоком в нее энтропии из организма космонавта, компенсирующим продукцию энтропии в организме. В этом и состоит смысл слов Шредингера: «организм питается отрицательной энтропией». Помимо возрастания энтропии среды за счет выделения тепла космонавтом, S_2 возрастает вследствие того, что энтропия веществ, выделяемых космонавтом, выше энтропии потребляемых им веществ. Стационарное состояние космонавта будет сохраняться до тех пор, пока не истощатся питательные вещества в окружающей среде или пока необратимые процессы в организме космонавта не приведут к его изменению (старение). В этом смысле стационарное состояние не вечно. Его реализация определяется наличием двух шкал времени — времени обмена энтропией с окружающей средой и гораздо более длительного времени исчерпания запасов питательных веществ и (или) старения организма. Приведенный расчет относится только к быстрому процессу обмена, но не к медленному необратимому процессу.

Поясним эту ситуацию еще одним элементарным примером. Рассмотрим два больших тепловых резервуара, находящихся при температурах T_1 и T_2 и соединенных друг с другом тонким проводником тепла. В проводнике устанавливается постоянный поток тепла, любой его отрезок находится в стационарном состоянии. Стационарность сохранится, пока сколько-нибудь заметно не изменятся температуры T_1 и T_2, которые медленно выравниваются. Время установления стационарного состояния тем

меньше времени достижения окончательного равновесного состояния с одинаковыми температурами резервуаров, чем больше последние. При расчете стационарного режима в быстрой временной шкале, отвечающей времени установления стационарного состояния, температуры T_1 и T_2 считаются постоянными — они изменяются в медленной шкале времени. Таким образом, стационарное состояние реализуется на фоне крупномасштабного необратимого процесса.

Само существование жизни, существование биосферы можно приближенно рассматривать как стационарный процесс, осуществляемый на фоне грандиозного необратимого процесса охлаждения Солнца. Состояние биосферы стационарно лишь в ограниченном временном интервале, так как популяция вида *Homo sapiens* непрерывно возрастает и уничтожает другие виды — растения и животных, за исключением культурных видов, чьи популяции также возрастают. *Homo sapiens* разрушает биогеоценозы в масштабе всей биосферы.

Пусть в стационарном состоянии потоки J_k и коэффициенты L_{ik} постоянны. Продукция энтропии (функция диссипации) σ зависит от обобщенных сил X_k. Как показали Пригожин и Гландсдорф [20, 21], σ минимальна в стационарном состоянии по отношению к изменениям X_k. Иными словами,

$$d_x\sigma = \sum_k J_k\, dX_k \leqslant 0. \tag{1,40}$$

По мере приближения к стационарному состоянию продукция энтропии убывает, стремясь к минимуму, т. е. к $d_x\sigma = 0$. Для химической реакции

$$T d_x\sigma = \sum_k v_k\, dA_k \leqslant 0. \tag{1,41}$$

Знак равенства относится к стационарному состоянию. Всегда можно образовать такие линейные комбинации v_k и A_k, чтобы все A_k были независимы. В этом случае равенство $d_x\sigma$ нулю означает, что в стационарном состоянии все $v_k^{(0)} = 0$. При возмущении стационарного состояния

$$v_k = v_k^{(0)} + \delta v_k = \delta v_k, \quad A_k = A_k^{(0)} + \delta A_k.$$

Вариация продукции энтропии, вызванная флуктуациями сродства, определяется соотношением

$$T\delta_x\sigma = \sum_k v_k \delta A_k = \sum_k \delta v_k \delta A_k \geqslant 0, \tag{1,42}$$

или в общем случае

$$\delta_x\sigma = \sum_k \delta J_k \delta X_k \geqslant 0. \tag{1,43}$$

Это — условие стабильности стационарного состояния. Оно выполняется вблизи состояния равновесия в линейном приближении неравновесной термодинамики. В этом случае система, выведенная из стационарного состояния, возвращается к нему без осцилляций.

Рассмотрим в качестве примера простую автокаталитическую реакцию вблизи равновесия

$$B + C \underset{k_-}{\overset{k_+}{\rightleftarrows}} 2C.$$

Ее кинетическое уравнение записывается в виде

$$v = k_+[B][C] - k_-[C]^2. \tag{1,44}$$

При постоянном [B] имеем

$$\delta v = k_+[B]\,\delta[C] - 2k_-[C]\,\delta[C] \tag{1,45}$$

и, так как вблизи равновесия $k_+[B] \approx k_-[C]$, то

$$\delta v = -k_-[C]\,\delta[C]. \tag{1,46}$$

Вместе с тем (ср. (1,22))

$$A = RT\left\{\ln K - \ln\frac{[C]}{[B]}\right\}. \tag{1,47}$$

Следовательно,

$$\delta A = -RT\delta[C]/[C] \tag{1,48}$$

и

$$T\delta_x\sigma = \delta A\delta v = RTk_-\,(\delta[C])^2 \geqslant 0, \tag{1,49}$$

т. е. условие (1,43) выполняется.

Линейная неравновесная термодинамика, развитая Пригожиным [20] (см. также [22—24]), дает общее объяснение «антиэнтропийности» биологических процессов, раскрывая возможность существования открытой системы в стационарном, но неравновесном состоянии. Исследования ряда биофизических явлений, в частности мембранного транспорта, показывают, что соотношения Онзагера (1,29) зачастую в них выполняются [25]. Однако линейная неравновесная термодинамика заведомо неприменима к рассмотрению онтогенеза и филогенеза, к процессам возникновения организованных структур из неорганизованных, к периодическим процессам. Биология требует нелинейной термодинамики. В биологии мы встречаемся с ситуациями, далекими от равновесия, в которых стационарные состояния могут быть неустойчивыми, т. е. условие (1,43) может не соблюдаться.

Неприменимость линейной термодинамики к процессам развития очевидна из элементарных соображений. Вблизи равно-

весия любой катализатор (фермент) в равной мере ускоряет и прямую и обратную реакции. Рассмотрим ту же автокаталитическую реакцию вдали от равновесия. Если $k_-[C] \ll k_+[B]$, то

$$v = k_+[B][C] \tag{1,50}$$

и при [B] = const

$$\delta v = k_+[B]\delta[C], \tag{1,51}$$

т. е. по-прежнему

$$\delta A = -RT\frac{\delta[C]}{[C]}. \tag{1,48}$$

Имеем

$$T\delta_x\sigma = \delta A\delta v = -RTk_+\frac{[B]}{[C]}(\delta[C])^2 \leqslant 0. \tag{1,52}$$

Стационарное состояние неустойчиво в случае автокаталитической реакции. Показано, что такие нестабильности лежат в основе роста и эволюции. Пригожин и его сотрудники установили, что сочетание автокаталитических реакций и процессов транспорта может привести в условиях, далеких от равновесия, к образованию упорядоченных *диссипативных* структур, определяемых диссипацией энергии, а не консервативными молекулярными силами [21, 26]. Эйген построил на этой основе молекулярную теорию самоорганизации биополимеров, их естественного отбора и эволюции [13].

§ 1.4. ТЕОРИЯ ИНФОРМАЦИИ И БИОЛОГИЯ

Феноменологическое рассмотрение живых систем, естественно, пользуется понятиями теории информации. Существование и развитие клетки и организма, являющихся открытыми и саморегулируемыми системами, требует генерации и передачи информации по каналам прямой и обратной связи.

Теория связи применяет количественную меру уже имеющейся информации, т. е. меру количества сведений, содержащихся в некотором сообщении. Такая теория исследует способы кодирования сообщения, использования избыточности (см. далее), оптимизации, преодоления «шумов» и т. д.

Количество информации при выборе P_1 событий из P_0 равновероятных событий определяется как

$$I = K\log P_0/P_1, \tag{1,53}$$

где K — численный коэффициент. Если $P_1 = 1$, то

$$I = K\log P_0. \tag{1,54}$$

При таком определении получается аддитивность информации при перемножении независимых вероятностей. Так, результат бросания одной игральной кости дает количество информа-

ции $K \log 6$, результат бросания двух костей дает вдвое большее количество информации $2K \log 6 = K \log 36$. Для количественных расчетов нужно определить основание логарифмов и значение K. Пользуясь основанием 2 и принимая $K = 1$, имеем

$$I = \log_2 P_0. \qquad (1,55)$$

Такое определение количества информации отвечает задачам с некоторым числом n различных независимых выборов, каждый из которых сводится к двоичной альтернативе. При этом $P_0 = 2^n$ и, согласно (1,55),

$$I = \log_2 2^n = n \text{ бит}.$$

Единицей информации служит один *бит*, отвечающий одному выбору из двух равновероятных возможностей (т. е. $P_0 = 2$). При бросании кости $I = \log_2 6 = 2{,}585$ *бит*.

Сколько бит информации содержит произвольное трехзначное число? Первая цифра имеет 9 различных значений — от 1 до 9, вторая и третья — по 10 значений — от 0 до 9. Имеем

$$I = \log_2 9 + 2 \log_2 10 = 2{,}64 + 2 \cdot 3{,}32 = 9{,}28 \text{ бит}.$$

Принятое определение информации соответствует двоичной системе исчисления, в которой любое число записывается в виде степеней числа 2 посредством цифр 0 и 1. Одна десятичная единица дает 3,32 *бит*, т. е. двоичная запись числа требует в среднем в 3,32 раза больше цифр, чем десятичная.

Если исходные события не равновероятны и распределение вероятностей задано, то количество информации при выборе одного или нескольких событий меньше, чем в случае равновероятности. Задание распределения вероятностей означает наличие некоторой предварительной информации о получаемом сообщении. Эта предварительная информация вычитается из получаемой.

Допустим, что имеется сообщение, содержащее G последовательных ячеек — скажем, текст из G последовательных букв. В каждой из G ячеек может находиться одна из M букв (для русского языка $M = 32$). В сообщении содержится N_1 букв А, N_2 букв Б и т. д. Имеем

$$G = \sum_{l=1}^{l=M} N_l.$$

Вероятность появления данной буквы равна

$$p_l = N_l/G,$$

причем

$$\sum_{l=1}^{M} p_l = 1.$$

Общее число P сообщений, т. е. последовательностей из G букв M-буквенного языка, равно

$$P = \frac{G!}{\prod_{j=1}^{M} N_j!}.$$

Вводя натуральные логарифмы, получаем информацию, содержащуюся в одном сообщении:

$$I = K \ln P = K\left[\ln(G!) - \sum_{j=1}^{M} \ln(N_j!)\right] \approx$$

$$\approx K\left(G \ln G - \sum_{j=1}^{M} N_j \ln N_j\right).$$

Здесь предполагается, что G, $N_j \gg 1$ и применима теорема Стирлинга. Следовательно,

$$I \approx -KG \sum_{j=1}^{M} \frac{N_j}{G} \ln \frac{N_j}{G} = -KG \sum_{j=1}^{M} p_j \ln p_j. \qquad (1{,}56)$$

Мы получили формулу Шеннона. Переходя к двоичному определению информации, примем, что

$$K = (\ln 2)^{-1}.$$

Тогда

$$I = -G \sum_{j=1}^{M} p_j \log_2 p_j.$$

Количество информации, приходящейся на одну букву, равно

$$i = I/G = -\sum_{j=1}^{M} p_j \log_2 p_j.$$

В действительности настоящий языковый текст содержит меньшее количество информации, так как в нем имеются добавочные ограничения. Вероятности последовательного появления букв взаимосвязаны — они образуют *цепь Маркова*, т. е. вероятность появления данной буквы зависит от того, какие буквы ей предшествовали. Так, в русском языке появление гласной вслед за гласной гораздо менее вероятно, чем после согласной. Любая корреляция событий уменьшает количество информации, содержащееся в сообщении о них.

Все изложенное существенно для теории и практики связи. Но теория информации имеет и прямое физическое содержание. Подобно количеству информации, энтропия выражается

как логарифм термодинамической вероятности — числа микросостояний, реализующих данное макросостояние, т. е.

$$S = k \ln W, \tag{1,57}$$

где $k = 1{,}38 \cdot 10^{-16}$ *эрг·град*$^{-1}$ — постоянная Больцмана.

Сопоставим формулы (1,54) и (1,57). Представление количества информации в виде

$$I = k \ln P \tag{1,58}$$

позволяет выражать информацию в энтропийных единицах. Имеет ли, однако, это реальный смысл? Уменьшение числа микросостояний системы означает увеличение количества информации о системе и одновременно уменьшение энтропии. Таким образом, информация эквивалентна негэнтропии — энтропии со знаком минус. Пусть число микросостояний убывает от P_0 до P_1. Количество получаемой при этом информации составляет

$$I = k \ln (P_0/P_1) = S_0 - S_1,$$

т. е. I равно уменьшению энтропии или увеличению негэнтропии. Негэнтропийное толкование информации было предложено Сциллардом [27].

При смешении N_1 молекул газа 1 и N_2 молекул газа 2 энтропия образовавшейся смеси больше энтропии разделенных газов S_0 на величину энтропии смешения

$$\Delta S = S - S_0 = -kN (p_1 \ln p_1 + p_2 \ln p_2) > 0,$$

где $N = N_1 + N_2$, $p_1 = N_1/(N_1 + N_2)$, $p_2 = N_2/(N_1 + N_2)$. Это равносильно уменьшению количества информации на ту же величину. Значит, исходная информация составляла

$$I_0 = -kN (p_1 \ln p_1 + p_2 \ln p_2).$$

Полученное выражение совпадает с формулой Шеннона. Один бит информации эквивалентен $k \ln 2$, т. е. $\sim 10^{-16}$ *эрг·град*$^{-1}$ — весьма малой величине.

В таком определении нет ничего субъективного. Получение информации о физической системе требует реальных физических воздействий на нее. Нельзя получить информацию о событиях в адиабатически изолированной системе. Любой опыт, дающий информацию о некоторой системе, приводит к увеличению энтропии системы или ее окружения, причем, в соответствии со вторым началом, это увеличение энтропии всегда превышает количество полученной информации. Информация оплачивается энтропией, так как наблюдение связано с увеличением энтропии, с необратимым процессом.

Жидкость обладает большей энтропией, чем кристалл, так как ее состояние может быть реализовано бóльшим числом спо-

собов распределения молекул, чем состояние кристалла. При кристаллизации жидкости мы получаем информацию о расположении молекул в узлах кристаллической решетки. Жидкость нужно охладить, что невозможно в адиабатическом процессе. Для ее охлаждения необходим холодильник, температура и энтропия которого будут возрастать. Возрастание энтропии холодильника превысит получаемую информацию о кристалле, выраженную в энтропийных единицах.

Анализируя второе начало термодинамики, Максвелл предложил фантастический мысленный опыт. Представим себе сосуд с газом, разделенный на две части перегородкой с дверцей. Дверцей управляет «демон», находящийся в одной половине сосуда. Он пропускает в свою половину быстрые молекулы и выпускает из нее медленные. В результате возникает разность температур между двумя половинами сосуда, что противоречит второму началу термодинамики, так как демон не затрачивает никакой энергии.

Бриллюэн рассмотрел этот парадокс с позиций теории информации [28]. Для того чтобы увидеть молекулу, демон должен ее осветить, т. е. располагать источником излучения, не находящимся в равновесии с окружающей средой. Такой источник имеет меньшую энтропию, чем среда, т. е. обладает негэнтропией, которую демон превращает в информацию. Полученная информация используется для понижения энтропии газа, т. е. для увеличения негэнтропии. Расчет полного изменения энтропии показывает, что энтропия системы в целом (газ и источник света) не уменьшится, а возрастет, и, следовательно, второе начало справедливо.

Как уже говорилось (стр. 16), Эльзассер утверждал, что развитие многоклеточного организма из зиготы несовместимо с законами физики. Он считал возрастание запаса информации при морфогенезе, при росте организма, «биотонным». Эти представления об эпигенезе в развитии противостоят концепции преформизма, согласно которой вся информация о будущем организме уже заключена в зиготе.

Оценить количество информации, содержащееся в клетке и в организме, трудно. Можно считать, что информация (т. е. упорядоченность), обеспечивающая биологическую функциональность, полностью определяется атомной структурой [29, 30]. Данков и Кастлер оценили количество информации, требуемое для отбора одного атома из всего набора атомов в клетке и задания его положения с точностью, определяемой тепловыми колебаниями при температуре тела [30]. По их оценке на один атом приходится 24,5 *бит*, на одну клетку *Esherichia coli* — порядка 10^{10} *бит*, на одну зиготу млекопитающего — порядка 10^{15} *бит*, на человеческий организм — порядка 10^{25} *бит* (т. е.

10^9 *эрг/град* ~ 24 *кал/град* в энтропийной мере). Если считать эти расчеты имеющими реальный смысл, то, несомненно, $I_2 \equiv I_{\text{орг}} \gg I_{\text{зиг}} \equiv I_1$. Эльзассер считает недоступным физическому пониманию возрастание количества информации с I_1 до I_2, т. е. соответствующую убыль энтропии. Однако в действительности здесь нет трудности.

Изменение количества информации в открытой системе можно представить в виде, подобном выражению (1,16),

$$\Delta I = \Delta_i I + \Delta_e I.$$

Член $\Delta_i I < 0$ выражает уменьшение I вследствие внутренних процессов, для которых $\Delta_i S > 0$. В развивающемся организме $\Delta_e I > 0$. Имеем

$$I_2 = I_1 + \Delta_e I + \Delta_i I.$$

Так как $I_2 \gg I_1$, очевидно, что $\Delta_e I \gg I_1 - |\Delta_i I|$. Информация черпается открытой системой из окружающей среды, энтропия которой возрастает. Организм, растущий из зиготы, подобен в этом смысле кристаллу, растущему из зародыша, помещенного в насыщенный раствор. В обоих случаях возрастание упорядоченности, возрастание количества информации, перекрывается увеличением энтропии окружающей среды — холодильника при кристаллизации. Концепция Эльзассера виталистична; неявным образом предполагается несоблюдение второго начала в живой природе. Равен, подвергший критике идеи Эльзассера, считает, что во всех клетках организма содержится одна и та же генетическая информация. Развитие организма означает не увеличение количества информации, но увеличение избыточности, т. е. многократное ее повторение [31]. Равен трактует зиготу как канал связи, причем родительские организмы служат источником информации, а вырастающий организм — ее приемником. Развитие сводится к декодированию информации. Равен исходит из возможности абсолютной оценки количества информации в зиготе и организме. В действительности, как показал Аптер [32] (см. также [33, 57]), такая оценка всегда относительна и условна. Тождество генов в клетках организма не означает избыточности. Развитие есть результат взаимодействия различных частей эмбриона, информация содержится не только в хромосомах, но и во всех внутри- и межклеточных взаимоотношениях. Концепции преформизма и эпигенеза в сущности непригодны для описания развития, которое нельзя свести к увеличению или сохранению количества информации. Задача состоит не в таком описании, но в выяснении сущности развития, его физической природы, его атомно-молекулярных основ.

Информационные подходы, оперирующие понятием количества информации, существенны в теоретической биологии и био-

физике не потому, что они решают контроверзу преформизм—эпигенез, в сущности лишенную содержания. Их смысл в другом. Во-первых, перевод биологических концепций на язык теории информации позволяет сделать эти концепции более ясными и строгими и вложить в них новое содержание. Такую работу провел Шмальгаузен, раскрывший некоторые информационные аспекты эволюционной теории [34, 35]. Во-вторых, исследование клетки, организма как сложной саморегулируемой системы требует информационного подхода, поскольку управление, регуляция, осуществляется посредством прямых и обратных информационных потоков. Задача биофизики в этой области состоит в выяснении материальной природы запасания, кодирования, передачи и рецепции информации в живых системах. Проблема генетического кода (см. ниже гл. 9) имеет ясный информационный смысл. Вопросы о количестве генетической информации, кодируемой в молекулах ДНК, о помехоустойчивости кода, о механизмах реализации информационной программы вполне содержательны.

Информация в организме передается молекулами и ионами, она имеет химическую природу. Рецепция информации сводится к узнаванию молекул молекулами, она определяется их взаимодействиями. Именно в таком смысле организм есть химическая машина, и в этом его отличие от «роботов», созданных руками человека. В современных кибернетических устройствах сигналы имеют электрическую или магнитную природу, в организме сигналами служат молекулы.

Кастлер ввел в рассмотрение молекулярной информации принцип сигнатуры [29]. Взаимодействие молекул означает передачу информации. При этом обычно передается не вся информация, содержащаяся в молекуле, но лишь некоторая ее часть, именуемая *сигнатурой*. Сигнатурой молекулы служат те ее особенности, благодаря которым она участвует в данной реакции. Понятия однозначности и многозначности молекулярных сигнатур, надежности их действия имеют реальный физический смысл.

Всякая передача информации не идеальна — в ходе передачи происходит частичное разрушение информации вследствие помех или ошибок. Такие помехи или ошибки называются *шумами*. Рассмотрим передачу генетической информации (см. [36]).

Количество информации в генетическом сообщении равно

$$I \leqslant I_0 - I_n,$$

где I_0 — исходное количество информации, I_n — «шумовые» потери вследствие ошибок в процессе удвоения хромосом в зародышевой или соматической клетках, а также ошибок в рецепции генетической информации, т. е. в синтезе белка (см. ниже

гл. 9). I_n можно выразить через вероятность прочтения или перехода от «буквы» сорта i к «букве» сорта j (кодирование), которую мы обозначим через $p_i(j)$. Вероятность появления «буквы» i обозначим через $p(i)$. Тогда

$$I = I_0 + \sum_{i,\,j} p(i)\, p_i(j) \log_2 p_i(j).$$

Допустим, что на генетическую систему оказывается некоторое воздействие, характеризуемое мерой λ. Например, λ есть доза ионизирующего излучения. Имеем

$$\frac{dI}{d\lambda} = \log_2 e \sum_{i,\,j} \left\{ p(i) \frac{dp_i(j)}{d\lambda} + p(i) \ln p_i(j) \frac{dp_j(j)}{d\lambda} + \right.$$
$$\left. + p_i(j) \ln p_i(j) \frac{dp(i)}{d\lambda} \right\}.$$

Производная $dI/d\lambda$ возрастает до бесконечности за счет второго члена в правой части уравнения, если $p(i)$ и $dp_i(j)/d\lambda$ отличны от нуля, а одна из вероятностей $p_i(j)$ стремится к нулю. Так как

$$\sum_j p_i(j) = 1,$$

то в идеальном случае, когда одна из величин $p_i(j) = 1$, остальные равны нулю. Отсюда следует $dI/d\lambda \to \infty$, и система оказывается неустойчивой. Это означает, что неустойчива система, состоящая из совокупности организмов, содержащих тождественные гены. В реальной совокупности должен быть шум, т. е. генетические сообщения в разных изогенных организмах не тождественны друг другу. В них должны возникать мутации. Согласно принципу Данкова [30], оптимум, достигаемый естественным отбором, вовсе не означает создания идеальной системы без шумов. При передаче сообщения борьба с шумами производится посредством избыточной информации. Так, терпящий бедствие корабль многократно передает сигнал SOS, чтобы увеличить вероятность его рецепции. Принцип Данкова утверждает, что оптимальное количество избыточной информации в эволюции вида и особи равно не тому количеству, которое уничтожает все ошибки, но тому, которое минимизирует сумму стоимости ошибок и стоимости их исправления. Допускается столько ошибок, сколько совместимо с дальнейшим существованием, и используется минимальное количество избыточной информации. Тем самым достигается некое стационарное состояние. Эти соображения можно, очевидно, сформулировать на языке термодинамики, перейдя к энтропийной мере информации.

Сказанным, в общем, исчерпываются возможности теории информации, оперирующей только понятием об ее количестве. Очевидно, из адекватности количества информации и негэнтро-

пии следует, что при объяснении биологических процессов понятие количества информации не может дать бо́льшего, чем понятие энтропии. Здесь не рассматривается генерация информации и ее инструктирующее значение, определяющее ту или иную биологическую функцию носителя информации. При исследовании развивающейся и эволюционирующей системы необходимо ввести понятие *ценности информации* для реализации конкретного процесса, эквивалентное ее программирующему, инструктирующему, значению. Ценность информации выражает ее содержание, тогда как количество информации не имеет отношения к ее содержанию. Содержание можно оценить лишь применительно к определенным физическим процессам.

Эйген впервые предпринял попытку дать количественное физическое определение ценности информации, содержащейся в биологически функциональных макромолекулах в процессе их естественного отбора [13]. *Селективная ценность* по Эйгену есть безразмерный кинетический параметр, характеризующий автокаталитический синтез макромолекулярных цепей, который происходит за счет цепей с меньшей ценностью, подвергающихся деструкции. Процесс протекает в стационарной открытой системе, далекой от равновесия. Теория Эйгена согласуется с теорией возникновения диссипативных структур Пригожина и Гланздорфа и описывает некий начальный этап добиологической эволюции.

Теория Эйгена, имеющая важное значение для биофизики, основывается на реальных свойствах биологических макромолекул. Изложение, анализ, уточнение и дальнейшее развитие этой теории возможны лишь после детального ознакомления с биологическими макромолекулами. Обсуждение теории Эйгена выходит за рамки этой книги.

§ 1.5. КООПЕРАТИВНОСТЬ

Построение физики живых систем требует исследования своеобразных микроскопических, атомно-молекулярных свойств.

Клетка, организм — гетерогенные конденсированные системы, построенные из квазикристаллических тел (надмолекулярные структуры) и жидкостей, из больших и малых молекул. Надмолекулярные структуры в организме высокоупорядочены и представляют собой преимущественно линейные и двумерные системы. В качестве линейных систем укажем на миофибриллу мышцы, аксон нервной клетки, условно двумерных — различные клеточные и внутриклеточные мембраны, β-формы белковых структур. Говоря о квазикристалличности такого рода структур, мы имеем в виду именно их высокую упорядоченность, выражающуюся в ряде случаев в периодичности строения. Вместе

с тем высокая упорядоченность (в одном, двух и трех измерениях) свойственна и молекулярному уровню организации. Макромолекулы биополимеров — белков и нуклеиновых кислот — характеризуются не только заданной генетически последовательностью мономерных звеньев, но и определенной структурой целостной системы.

Введенное Шредингером понятие апериодического кристалла применимо и к молекулярному, и к надмолекулярному, и к организменному уровню строения живой системы.

Конденсированные системы, состоящие из большого числа частиц, кооперативны. Иными словами, свойства таких систем определяются взаимодействием частиц, и их нельзя понять при исследовании отдельной частицы. Специфическая особенность конденсированной системы — ее способность изменять свое состояние и структурную организацию в целом, т. е. претерпевать фазовый переход (в частности, переход порядок — беспорядок). Именно применительно к фазовым превращениям Фаулер ввел понятие кооперативности. Кооперативный переход может осуществляться как самоусиливающееся превращение. Рассмотрим простой пример — уравнение состояния реального газа Ван-дер-Ваальса

$$(p + N^2a/V^2)(V - Nb) = NkT, \qquad (1,59)$$

где N — число молекул газа ($N \gg 1$). Сожмем газ при температуре ниже критической. Уменьшение объема V приводит к увеличению внутреннего давления a/V^2, что в свою очередь вызывает уменьшение объема и т. д. Переход продолжается до полного превращения газа в жидкость. Это — типичный пример кооперативного процесса, идущего по принципу «все или ничего».

Термодинамика дает условия равновесия фаз (см. [37]). Две фазы находятся в равновесии, если равны их температуры, давления и химические потенциалы, т. е. если

$$T_1 = T_2, \quad p_1 = p_2, \quad \mu_1(p, T) = \mu_2(p, T). \qquad (1,60)$$

Так как химические потенциалы зависят от p и T, равновесие возможно, вообще говоря, лишь при определенных значениях этих величин. Условие равенства химических потенциалов эквивалентно условию

$$H_2 - H_1 - T_{\text{пер}}(S_2 - S_1) = 0,$$

где H — энтальпия, S — энтропия. Следовательно, температура перехода

$$T_{\text{пер}} = \frac{\Delta H}{\Delta S}; \qquad (1,61)$$

здесь ΔH — количество тепла, поглощаемого или выделяемого при переходе (например, при плавлении и кристаллизации соответственно). Энтальпия испытывает разрыв в таком переходе, называемом *фазовым переходом первого рода*. Разрыв энталь-

пии, а также энтропии и объема определяется скачкообразным изменением структуры вещества. В переходах кристалл — жидкость происходит очевидное разрывное изменение симметрии — элемент симметрии либо есть, либо его нет — он не может исчезать или появляться постепенно. Поэтому нет критического состояния для перехода кристалл — жидкость. Переход жидкость — газ, напротив, может совершаться непрерывно через критическую область, так как симметрия в этих состояниях одинакова (см. [37]). Обычный переход жидкость — газ при температурах ниже критической является фазовым переходом первого рода. Переходы между различными кристаллическими модификациями также являются *переходами первого рода* с изменением симметрии.

В тех случаях, когда структура системы меняется непрерывно, а симметрия — скачком, также происходит фазовый переход, но с иными особенностями [37]. Представим совокупность электронных спинов в ферромагнитном веществе в виде регулярной двумерной решетки, в узлах которой расположены стрелки. Пусть спины сначала расположены так, что стрелки с равной вероятностью направлены вверх и вниз. Будем одну за другой поворачивать вверх стрелки, направленные вниз. При повороте вверх последней стрелки симметрия изменится скачком. Вещество перейдет из парамагнитного в ферромагнитное состояние. Такой переход (а также переходы порядок — беспорядок в бинарных сплавах и др.) является фазовым *переходом второго рода* [37—42]. Он характеризуется непрерывным изменением энтальпии, удельного объема и т. д., но разрывным изменением их производных — теплоемкости, коэффициента теплового расширения, сжимаемости и т. д.

Таким образом, фазовые переходы означают наличие особенностей на кривых зависимостей термодинамических величин от внешних параметров, в частности от температуры. Термодинамические величины выражаются через статистическую сумму системы Z, т. е.

$$Z = \sum_r g_r \exp(-E_r/kT), \tag{1,62}$$

где E_r — энергия r-го состояния частиц, образующих ансамбль, g_r — статический вес этого состояния. Выражения для свободной и внутренней энергий и теплоемкости (в расчете на один моль) имеют вид

$$F = -RT \ln Z, \tag{1,63}$$

$$E = RT^2 \frac{d \ln Z}{dT}, \tag{1,64}$$

$$c_V = R \frac{d}{dT}\left(T^2 \frac{d \ln Z}{dT}\right). \tag{1,65}$$

Особенности могут возникать лишь вследствие взаимодействия частиц, определяющего зависимость состояния каждой частицы от состояний остальных частиц [39].

Теоретический вывод уравнения Ван-дер-Ваальса выходит за пределы термодинамики, он основывается на молекулярной модели. Методология теоретического исследования кооперативной системы состоит в том, что строится молекулярная модель такой системы, вычисляется отвечающая этой модели статистическая сумма и из нее определяются термодинамические функции, которые сравниваются с опытом.

Рассмотрим простейшие модели кооперативных систем. Общий подход при упрощенном статистическом расчете системы основывается на *приближении молекулярного поля.* Частица подвергается действию сил, создаваемых другими такими же частицами. Она находится в силовом поле, которое представляется неким средним значением, — в молекулярном поле. Состояния частицы рассматриваются методами статистической механики, и определяется среднее поле, создаваемое данной частицей и влияющее на соседние частицы. Это среднее поле должно совпадать с молекулярным, т. е. быть самосогласованным. В сущности тот же метод применяется при выводе уравнения Ван-дер-Ваальса [39].

Рассмотрим модель ферромагнетика Изинга [40] — спиновую решетку (см. стр. 139). Состояние j-й стрелки ($j = 1, 2, 3, \ldots, N$, N — полное число стрелок) можно охарактеризовать параметром σ_j, принимающим значения $+1$ и -1 в зависимости от направления стрелки. Энергия взаимодействия соседних спинов равна

$$E_{\text{вз}} = -\sum_{i,\ j} \mathscr{E}\sigma_i\sigma_j, \qquad (1{,}66)$$

т. е. энергия пары параллельных стрелок меньше энергии пары антипараллельных стрелок на $2\mathscr{E}$.

Ферромагнетизм действительно определяется параллельной установкой электронных спинов. Энергия $2\mathscr{E}$ характеризует их обменное взаимодействие, создающее преимущество параллельной установки. Представим взаимодействие средним магнитным полем H', действующим на каждый спин. Считаем, что H' пропорционально намагниченности M, т. е. разности между числами спинов, смотрящих вверх и вниз

$$H' = \beta M. \qquad (1{,}67)$$

Намагниченность M равна магнитному моменту единицы объема, т. е. числу спинов в единице объема n, умноженному на средний магнитный момент спина $\bar{\mu}$. Статистическая сумма для спина равна

$$Z = \exp(\mu H_{\text{эфф}}/kT) + \exp(-\mu H_{\text{эфф}}/kT) \equiv 2\,\mathrm{ch}(\mu H_{\text{эфф}}/kT), \qquad (1{,}68)$$

так как спин (магнитный момент которого μ) может находиться лишь в двух состояниях — параллельном и антипараллельном полю $\mathbf{H}_{эфф}$. Свободная энергия (ср. (1,63))

$$F = -kT \ln Z = -kT \ln \{2 \operatorname{ch} (\mu H_{эфф}/kT)\} \tag{1,69}$$

и

$$\bar{\mu} = -\frac{\partial F}{\partial H_{эфф}} = \mu \operatorname{th} (\mu H_{эфф}/kT). \tag{1,70}$$

Следовательно,

$$M = n\bar{\mu} = n\mu \operatorname{th} (\mu H_{эфф}/kT). \tag{1,71}$$

При наличии внешнего поля H получим

$$H_{эфф} = H + H' = H + \beta M$$

и

$$M = n\mu \operatorname{th} \left\{ \frac{\mu}{kT} (H + \beta M) \right\}. \tag{1,72}$$

Это трансцендентное уравнение дает самосогласованное определение M, т. е. H'.

Пусть данный спин имеет z ближайших соседей, из них вверх смотрят в среднем z_+, вниз z_-. Имеем

$$z_+ + z_- = z, \quad z_+ - z_- = zM/n\mu.$$

Положим

$$\mu H' = \mathscr{E} (z_+ - z_-) = z\mathscr{E} \frac{M}{n\mu};$$

тогда $\beta = z\mathscr{E}/n\mu^2$ и

$$M/n\mu = \operatorname{th} \left(\frac{\mu H}{kT} + \frac{z\mathscr{E}}{kT} \frac{M}{n\mu} \right). \tag{1,73}$$

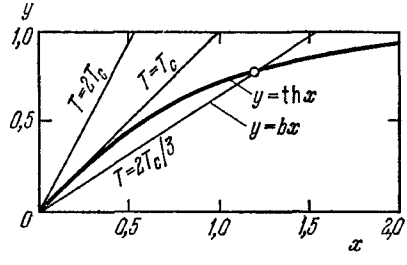


Рис. 1.3. Кривые намагничивания.

Решая это уравнение графически, находим пересечение кривой $y = \operatorname{th} (a + x)$ с прямой $y = bx$, где

$$x = \frac{z\mathscr{E}}{kT} \frac{M}{n\mu}, \quad a = \frac{\mu H}{kT}, \quad b = \frac{kT}{z\mathscr{E}}.$$

При $a = 0$ (т. е. в отсутствие внешнего поля H) получаем результат, показанный на рис. 1.3. Система спонтанно намагничивается, т. е. в отсутствие внешнего поля M становится отличным от нуля при

$$T < T_c = z\mathscr{E}/k. \tag{1,74}$$

Здесь T_c — так называемая *температура Кюри*, температура фазового перехода ферромагнетик — парамагнетик.

Приближение молекулярного поля обосновывается в методе Брэгга — Вильямса.

Пусть N — полное число спинов, из них N_+ смотрят вверх, N_- — вниз. Число возможных микросостояний

$$W = \frac{N!}{N_+!N_-!}. \tag{1,75}$$

Используя формулу Стирлинга, получим выражение для энтропии

$$S = k \ln W = -k\left(N_+ \ln \frac{N_+}{N} + N_- \ln \frac{N_-}{N}\right). \tag{1,76}$$

Введем величину x как меру отклонения N_+ и N_- от среднего их значения в отсутствие взаимодействия $N/2$:

$$N_+/N = {}^1/_2(1+x), \quad N_-/N = {}^1/_2(1-x).$$

Тогда (1,76) примет вид

$$S = -kN\{{}^1/_2(1+x)\ln {}^1/_2(1+x) + {}^1/_2(1-x)\ln {}^1/_2(1-x)\}. \tag{1,77}$$

Для энергии взаимодействия спинов (ср. (1,66)) получаем

$$E = -\mathscr{E}(N_{++} + N_{--} - N_{+-}), \tag{1,78}$$

где N_{++} — число пар соседних спинов, смотрящих вверх, N_{--} — число пар соседних спинов, смотрящих вниз, N_{+-} — число пар, в которых соседние спины смотрят в разные стороны. Общее число пар соседних спинов равно ${}^1/_2\,(zN)$.

Средние значения чисел N_{++}, N_{--} и N_{+-} равны

$$\left.\begin{aligned} \bar{N}_{++} &= {}^1/_2 zN_+ \frac{N_+}{N} = {}^1/_8 zN(1+x)^2, \\ \bar{N}_{+-} &= zN_+ \frac{N_-}{N} = {}^1/_4 zN(1-x^2), \\ \bar{N}_{--} &= {}^1/_2 zN_- \frac{N_-}{N} = {}^1/_8 zN(1-x)^2. \end{aligned}\right\} \tag{1,79}$$

Подставляя эти значения в выражение (1,78), получаем

$$E = -{}^1/_2 z\mathscr{E}Nx^2. \tag{1,80}$$

Найдем теперь свободную энергию $F = E - TS$ и из условия минимума F определим наиболее вероятное значение x. Из $\partial F/\partial x = 0$ получаем

$$\operatorname{th}\left(\frac{z\mathscr{E}}{kT}x\right) = x, \tag{1,81}$$

что совпадает с (1,73). Приближение молекулярного поля эквивалентно приближению, в котором энтропия системы принимается равной энтропии смешения ее компонент, а энергия получается усреднением по всем возможным конфигурациям.

Более точное решение задачи Изинга дает приближение Бете — Пайерлса (см. [41]), или *квазихимическое приближение*, в котором учитывается локальная корреляция спинов. Рассматривается узел решетки и z его ближайших соседей и определяются вероятности распределения направлений спинов в этих z узлах при данном направлении спина в заданном узле. В приближении Брэгга — Вильямса ближний порядок, т. е. величина $\overline{N}_{++}$, определяется дальним порядком N_+, т. е.

$$\overline{N}_{++} = zN_+^2/2N.$$

Напротив, в квазихимическом приближении эти величины вычисляются независимо, но определяются через один и тот же параметр решетки. Принимается, что

$$\frac{\overline{N}_{++}\overline{N}_{--}}{\overline{N}_{+-}^2} = {}^1/_4 \exp(-\mathscr{E}/kT), \tag{1,82}$$

тогда как в приближении Брэгга — Вильямса, согласно (1,79),

$$\frac{\overline{N}_{++}\overline{N}_{--}}{\overline{N}_{+-}^2} = {}^1/_4. \tag{1.83}$$

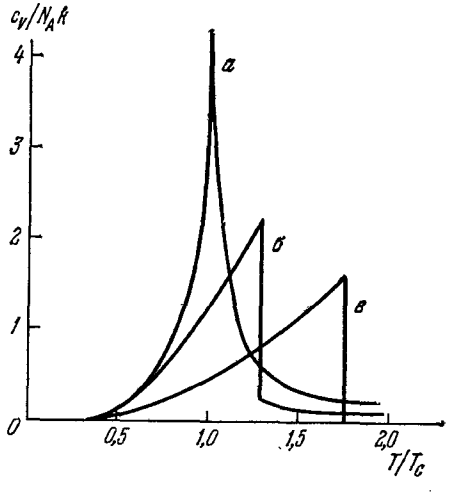


Рис. 1.4. Скачки теплоемкости при фазовом переходе второго рода. (объяснения в тексте).

Коэффициент $^1/_4$ появляется потому, что состояния $+\,+$ и $-\,-$ имеют числа симметрии, равные 2, — эти состояния не меняются при перемене соседних спинов местами. Формула (1,82) сходна с выражением для константы равновесия «химической реакции»

$$2(+\,-) \rightarrow (+\,+) + (-\,-).$$

Поэтому приближение и называется квазихимическим.

Строгое вычисление статистической суммы для двумерной задачи Изинга было выполнено Онзагером (см. [41, 42]). Для трехмерной задачи не удалось получить аналитическое выражение, но найдены численные решения.

На рис. 1.4 показаны скачки теплоемкости в точке Кюри (фазовый переход второго рода), вычисленные по Брэггу —

Вильямсу (*а*), методом квазихимического приближения (*б*) и строгим методом (*в*).

В биологических системах фигурируют одномерные, двумерные и трехмерные кооперативные системы, содержащие большое число статистических элементов. Это соответственно макромолекулы биополимеров (белков и нуклеиновых кислот), надмолекулярные мембранные структуры и т. д. Глобулы белков в растворах и в надмолекулярных структурах могут рассматриваться как трехмерные кооперативные системы. Физические свойства указанных структур кооперативны, т. е. они существенным образом зависят от взаимодействия элементов. Кооперативность — принципиальная особенность молекулярно-биологических систем, определяющая широкий круг явлений (см. [43]). Методы исследования кооперативных процессов имеют большое значение в теоретической биофизике.

Все изложенное относится к статистической физике кооперативных систем, находящихся в условиях термодинамического равновесия. Несмотря на то, что биосистемы неравновесны, статистическая теория дает многое для их понимания. Не менее существенно, однако, исследование кинетики кооперативных процессов.

Термодинамическая резкость фазового перехода не означает аномально большой его скорости. Так, жидкость может кристаллизоваться достаточно медленно при температуре фазового перехода. В самом деле, скорость кристаллизации определяется факторами, не фигурирующими в статистической термодинамике, а именно, скоростью образования зародышей кристаллов, т. е. скоростью нуклеации и скоростью роста кристаллов.

Кинетический процесс, т. е. процесс перехода вещества из одного состояния в другое, зачастую требует энергии активации. Исходное и конечное состояние разделены активационным барьером. Константа скорости процесса, т. е. число переходов через барьер в данном направлении в единицу времени, выражается *формулой Аррениуса*

$$k = A \exp[-E^*/RT], \qquad (1,84)$$

где E^* — энергия активации, A — предэкспоненциальный множитель. Смысл этой формулы раскрывается в теории абсолютных скоростей реакций, изложенной далее (см. § 6.1).

В некоторых процессах E^* — константа, не зависящая от температуры. В самоусиливающемся кооперативном процессе константа скорости сама меняется по мере прохождения процесса; иными словами E^* меняется в ходе превращения. Так, вязкое течение жидкости кооперативно, ибо перемещающиеся частицы взаимодействуют с соседними. Для перемещения они должны «растолкать» соседей и тем самым преодолеть некото-

рый энергетический барьер, т. е. обладать энергией активации. Ситуация подобна той, с которой встречается человек, продвигающийся к выходу в переполненном автобусе. Для того чтобы он мог пройти, должны переместиться остальные пассажиры. Энергия активации в кооперативном процессе зависит от числа частиц, уже преодолевших барьер. Чем больше людей вышло из автобуса, тем легче пробраться к выходу.

В отсутствие кооперативности зависимость логарифма скорости процесса от обратной температуры линейна — из (1,84) следует $\ln k = \ln A - E^*(RT)^{-1}$. Кооперативность нарушает эту линейность. Формально кооперативность выражается в том, что E^* сама зависит от температуры.

В отличие от термодинамики кооперативных процессов, их кинетика разработана совершенно недостаточно. В сущности физика пока не располагает полной кинетической теорией кристаллизации или плавления. Однако были предложены некоторые приближенные подходы к одномерным задачам, особенно существенным для биофизики (матричный синтез биополимеров) (см., например, [43, 44]).

Понятие кооперативных процессов, введенное применительно к фазовым превращениям в ансамблях, содержащих большое число частиц, трактуется в современной биофизике расширительно. Любые явления, определяемые взаимодействием даже малого числа элементов системы, принято называть *кооперативными*. В этом смысле кооперативна, например, протекающая в две стадии химическая реакция типа

$$A + B \rightleftarrows AB, \quad AB + B \rightleftarrows AB_2,$$

если константы равновесия первой и второй стадий различаются. В данном случае изотерма связывания вещества B веществом A может иметь особенность (например, точку перегиба), тогда как при равенстве обеих констант эта изотерма плавно идет к насыщению подобно изотерме Лэнгмюра. S-образность кривой связывания, как правило, свидетельствует о кооперативности системы (см. ниже гл. 7).

При дальнейшем расширении понятия можно считать кооперативной и гетерогенную систему, свойства которой существенно зависят от взаимодействий между ее однородными и неоднородными элементами. Мы переходим, тем самым, от понятия кооперативности к более широкому понятию системности в том смысле, в каком его вводит Берталанффи [3].

Статистическая физика не располагает пока методами, позволяющими рассматривать поведение совокупности многих взаимодействующих разнородных элементов, в которой каждый сорт элементов представлен малым их числом. Поведение такой совокупности определяется не статистическими, но динамиче-

скими законами. Взаимодействие элементов приводит к *организации* системы, т. е. к пространственной и временной упорядоченности элементов и процессов, развивающихся в системе. Вопреки утверждению Берталанффи, понятие организации естественно возникает и в обычной физике, непосредственно не учитывающей индивидуальности элементов системы. Так, конденсация газа в жидкость, кристаллизация жидкости, спонтанное намагничивание ферромагнетика означают организацию. Другой пример, не относящийся к системе, содержащей большое число элементов,— распределение электронов в атоме по оболочкам. Организующим принципом здесь является принцип Паули. Главное отличие организованной биологической системы от организованной, упорядоченной системы, изучаемой обычной физикой, состоит в том, что биологическая система неравновесна, открыта и гетерогенна. Это создает большие и еще далеко не преодоленные трудности в развитии соответствующих разделов биофизики, рассмотрение которых выходит за рамки этой книги.

§ 1.6. БИОФИЗИКА

Биофизика есть физика живых организмов. Термодинамический и теоретико-информационный анализ явлений жизни снял кажущиеся противоречия между физикой и биологией. Нельзя не согласиться с Эйгеном, когда он утверждает, что современная физика в принципе достаточна для объяснения явлений жизни, для обоснования биологии [13]. Такое обоснование требует введения новых понятий (например, понятия селективной ценности информации), но не построения принципиально новой физики. Новая физика, скажем, квантовая механика или теория относительности, возникала в результате установления границ применимости ранее принятых представлений. В биологии мы пока не встречаемся с такими границами для физики.

Биофизическое исследование начинается с постановки физической проблемы, формулируемой на основе общих законов физики и атомно-молекулярных (т. е. квантовомеханических) представлений. Путь биофизики идет через феноменологию (прежде всего через термодинамику и теорию информации), к атомно-молекулярному исследованию живого тела. Живое тело принципиально макроскопично, состоит из очень большого числа атомов, молекул, звеньев полимерных цепей, обладающих в той или иной мере независимыми степенями свободы. Упорядоченность биологической системы и ее способность к развитию не могли бы существовать, если бы система была микроскопической и, значит, подверженной очень большим флуктуациям [10].

Биологическая проблема может решаться средствами физики (скажем, с помощью электронного микроскопа), но от этого ис-

следование еще не становится биофизическим. И, напротив, физическая задача может решаться биологическими средствами. Так, постановка проблемы генетического кода — соответствия между последовательностью аминокислотных остатков в белковой цепи и последовательностью нуклеотидов в ДНК — есть постановка физической задачи, основанная на физико-химической гипотезе о существовании кода. Решение этой физической задачи было, однако, получено с помощью чисто биологических и химических методов (см. § 9.6).

Постановке физической проблемы всегда предшествует большая работа в области биологии, физиологии, биохимии, цитологии и т. д. Биофизика — обширное поприще новых крупных открытий, решений подлинных загадок природы. Может показаться, что к какой бы биологической проблеме ни обратился физик, он сравнительно быстро придет к такому открытию, ибо мощь его идей и методов очень велика. Однако истинная ситуация оказывается иной. Сложность биологических объектов и явлений затрудняет формулировку физической задачи. Постановка такой задачи возможна лишь после глубокого биологического исследования.

Итак, работа в области биофизики требует от исследователя очень серьезных усилий. На перекрестке наук это неизбежно. Биофизик — это физик, обладающий широкой биологической эрудицией и вместе с тем способный поставить и решить физическую задачу. Биологическая эрудиция подразумевает не только знание специальных областей биологии, непосредственно относящихся к теме работы, скажем, молекулярной биологии или физиологии. Не знает биологии тот, кто чужд живой природе, не знаком с зоологией и ботаникой. Именно знание этих основ биологии (а физики иногда относятся к ним с пренебрежением) формирует биологическое мировоззрение, без которого построение подлинной биофизики невозможно.

Конечные цели биологии и биофизики едины — они состоят в познании сущности жизненных явлений. Едины и прикладные задачи в медицине и фармакологии, в сельском хозяйстве и технике. Но, будучи частью физики, биофизика не должна рассматриваться как вспомогательная биологическая дисциплина. Подчеркнем еще раз, что применение методов физики и математики к решению биологических проблем еще не означает биофизического исследования. Без математического аппарата вообще невозможно никакое точное знание. Современный зоолог прибегает к изощренным математическим приемам при изучении динамики популяций, но от этого он не становится ни математиком, ни, тем более, биофизиком.

Существенны не методы, но физические, физико-математические идеи, постановка и решение физических задач.

Современную биофизику разделяют на три области: молекулярную биофизику, биофизику клетки, биофизику сложных систем. Хотя это деление условно, сегодня оно целесообразно.

Молекулярная биофизика — область перекрывания молекулярной физики и молекулярной биологии. Это — молекулярная физика биологических процессов, биологически функциональных молекул.

Молекулярная физика и молекулярная биофизика решают три группы задач. Они исследуют строение молекул, их равновесные взаимоотношения и свойства и кинетику их взаимодействий и превращений. Исследование строения производится с помощью ряда физических методов.

Теория строения электронной оболочки молекулы и явлений, им определяемых, — квантовая механика, квантовая химия. Вся химия — явление химической связи, превращение связей в реакциях — подчиняется квантовомеханическим закономерностям. В биофизике квантовая механика играет ту же роль, что в химии и физике молекул — она является основой понимания структуры молекул, природы их взаимодействий, их электронных (например, спектральных) свойств. Однако во многих случаях проблемы, связанные с электронными свойствами молекул, могут решаться и с помощью полуэмпирической классической теории, в частности применяющей так называемую валентно-оптическую схему (см. [45, 46]).

Существенная особенность основных биологически-функциональных веществ — их макромолекулярность. Белки и нуклеиновые кислоты — большие молекулы, биополимеры. Поэтому молекулярная биофизика есть преимущественно макромолекулярная биофизика или физика биополимеров. В ней широко применяются методы теоретической и экспериментальной физики, ранее разработанные для изучения макромолекул небиологического происхождения.

Невозможно провести границу между молекулярной биофизикой и биофизической химией, так же как нельзя провести границу между молекулярной физикой и физической химией. Классификация областей знания имеет всегда исторический и не строго определенный характер. Молекулярная физика и соответствующие разделы физической химии различаются не столько объектами и содержанием исследований, сколько идейными подходами, определяемыми до некоторой степени соответствующими традициями.

В тех случаях, когда биофизика изучает биомолекулы *in vitro*, применимы представления равновесной термодинамики, и в этом смысле исследование денатурации белка не отличается от исследования любого физико-химического процесса в нежи-

вой системе. Экспериментальное изучение и теоретические расчеты равновесий имеют весьма важное значение и для открытой живой системы, давая опорную информацию, без которой нельзя обойтись. Так, изучение редупликации ДНК *in vitro*, реализованной в опытах Корнберга (см. § 8.7), необходимо для понимания удвоения ДНК в делящихся клетках, являющихся открытыми системами. Количественные характеристики равновесий, найденные *in vitro*, существенны и для объяснения свойств соответствующих систем *in vivo*.

Те же соображения справедливы для кинетических исследований. Вся кинетика ферментативных процессов, изученная *in vitro*, и в этом отношении не отличающаяся от кинетики любых других химических реакций, служит основой для исследования этих процессов в организме.

Физика ферментов становится одной из центральных областей молекулярной биофизики [47]. Ее задачи — разработка экспериментальных и теоретических методов исследования ферментов и ферментативных процессов, раскрытие физических и физико-химических механизмов ферментативного катализа. Проблемы молекулярной кинетики в биофизике широки и разнообразны — это и активный транспорт, и ионный обмен, и механохимические процессы.

Возникновение молекулярной биофизики связано с развитием молекулярной биологии. Это — новая область биофизики, о существовании которой еще нельзя было говорить несколько десятилетий тому назад.

Биофизика клетки — условное наименование самой старой, традиционной области биофизики. Это — физика вычлененных процессов в живом организме, контактирующая с физиологией. Вычленение означает мысленный (и экспериментальный) разрыв связей этих процессов с единой живой системой — прием, совершенно необходимый на определенном уровне исследования. Можно указать три наиболее развитых области биофизики клетки — биофизика сократительных систем (прежде всего биофизика мышечной деятельности), биофизика нервной проводимости и биофизика органов чувств. Уже Гельмгольц подверг ряд относящихся сюда проблем строгому физико-химическому анализу. Сеченов говорил, что физиология есть физико-химия живого организма.

Физиология издавна применяет физические методы. На этом основании ряд физиологических исследований зачастую отождествляется с биофизическими. В силу сказанного выше такое отождествление незаконно, пока решаемая задача формулируется как физиологическая, а не физическая. Так, изучение полета насекомых, количественная регистрация нервных импульсов, взмахов крыльев и т. д. остается чисто физиологическим, пока не

поставлена задача выяснения механизма соответствующего автоколебательного процесса.

Вычленение объекта исследования из организма — мышцы или нервного аксона — позволяет установить основные закономерности, сохраняющие свое значение и в целостной системе. Кальмар *Loligo*, из которого извлечен аксон, мертв, но, изучая этот аксон, можно понять процессы, протекающие в живом кальмаре и в конечном счете в организме любого животного.

Сегодня биофизика клетки смыкается с молекулярной биофизикой. Знание надмолекулярной и молекулярной структур мышцы, нерва и т. д. является необходимым для молекулярного истолкования соответствующих процессов. Проблемы биофизики клетки значительно сложнее проблем молекулярной биофизики, так как они относятся к изучению гетерогенных надмолекулярных систем, а не отдельных молекул и их взаимодействий.

Современная биофизика сложных систем посвящена исследованию физических основ поведения организма или некой его функциональной подсистемы как целого. Здесь на первый план выступают те особенности, от которых практически полностью отвлекается молекулярная биофизика и почти полностью — биофизика клетки. Это — свойства организма как открытой системы, саморегуляция и самовоспроизведение. Сложной системой в этом смысле является не только организм, но и популяция, и биогеоценоз, и биосфера в целом. Биофизика сложных систем объединяется с теоретической биологией.

Центральная проблема теоретической биологии и биофизики сложных систем — проблема развития (филогенеза и онтогенеза). Дифференциация клеток, возникновение сложного организма из зиготы ставят перед наукой множество нерешенных вопросов. Их решение будет иметь громадное теоретическое и практическое значение (проблема рака!).

Методы исследования в биофизике сложных систем специфичны. Сегодня они состоят в экспериментальном и теоретическом моделировании, в разработке адекватного математического аппарата, позволяющего интерпретировать сложные явления регуляции, и т. д. Сложная биологическая система изучается в ее динамике, во взаимоотношениях с окружающей средой. Такая система существует, сохраняя неравновесное стационарное состояние или необратимо изменяясь. Надо думать, что исследование периодических процессов, изучение «биологических часов» может очень помочь пониманию внутренних связей в сложной системе. Считая некое радиоэлектронное устройство черным ящиком, мы испытываем его в различных колебательных режимах и в результате раскрываем его внутреннюю структуру.

Таким образом, сегодня биофизика сложных систем — феноменологическая область физики, широко применяющая пред-

ставления кибернетики, математическое моделирование. Математическая биофизика Рашевского [48] полностью относится к этой области.

Соотношение между биофизикой сложных систем и другими разделами биофизики, охарактеризованными выше, подобно соотношению между феноменологической термодинамикой и молекулярной физикой. В основе поведения сложной биологической системы лежат свойства биологических молекул и образуемых ими структур. Дальнейшее развитие биофизики должно привести к ее интеграции — к общему молекулярному истолкованию свойств таких систем. Уже сегодня мы говорим о молекулярных основах эволюции [13, 49]. Однако ряд биологических явлений возникает только на уровне сложной системы. Так, высшая нервная деятельность, в основе которой лежат молекулярные процессы, реализуется лишь в сложной системе.

О возможности молекулярного истолкования поведения подобных систем уже свидетельствуют некоторые результаты *исследования молекулярных регуляторных систем*, *например* оперона в молекулярной генетике или биохимических реакций, катализируемых аллостерическими ферментами (см. ниже гл. 7).

Очевидно, что необходимо именно общее молекулярное истолкование сложной системы и ее поведения. Описание и объяснение ее конкретного функционирования, естественно, должно проводиться на основе физико-математического моделирования, кибернетики, теории регулирования. Так, зная электронные основы работы транзистора, мы не прибегаем к квантовой теории твердого тела при расчете радиоэлектронных схем.

Мы видим, что биофизика *сама* является сложной системой знаний. Как и физика неживой природы, она содержит феноменологические и атомно-молекулярные разделы.

В литературе приходится встречаться с односторонним определением содержания биофизики. Биофизика отождествляется с *физической химией* [50], с *физиологией* [51], с *теорией сложных систем* [52]. В ряде монографий и курсов биофизики можно найти глубокое изложение отдельных проблем [52—56], но в этих трудах, зачастую имеющих хрестоматийный характер, отсутствует последовательно развитая физическая концепция. Сегодня остро ощущается необходимость построения биофизики как неотъемлемой части физики.

Надо сказать несколько слов о радиобиологии. Воздействие коротковолновой радиации на организм, клетки, надмолекулярные биологические структуры и биологические молекулы подлежит физическому истолкованию. Однако радиобиология изучает жизнь в аномальных условиях (если отвлечься от фона космической радиации). Это — специальная область, чрезвычайно развившаяся за последние десятилетия вследствие громадного ее

практического значения, в частности медицинского. Радиобиология требует специального монографнческого рассмотрения. В этой книге радиобиологические проблемы не затрагиваются.

В конечном счете обоснование биофизики следует искать в атомно-молекулярной структуре и функциональности. Эта книга посвящена физике главных для жизни веществ — белков и нуклеиновых кислот. Построение и стремительное развитие молекулярной биологии, происходившее в тесной связи с физикой, привели к тому, что молекулярная биофизика стала сегодня хорошо разработанной областью науки. На основе молекулярной биофизики должна строиться физика надмолекулярных систем, физика процессов развития, физика жизни в целом.

Литература

1. *Ф. Энгельс*, Диалектика природы, Госполитиздат, М., 1955.
2. *H. Helmholtz*, Über sich selbst, Teubner, 1966.
3. *L. von Bertalanffy*, General System Theory, George Braziller, 1968.
4. *Э. С. Бауэр*, Теоретическая биология, изд. ВИЭМ, 1935.
5. *Б. П. Токин*, Теоретическая биология и творчество Э. С. Бауэра, изд. ЛГУ, 1965.
6. *Н. Бор*, Атомная физика и человеческое познание, ИЛ, 1961.
7. *A. Meyer-Abich*, Acta Biotheor. **11**, 11 (1955).
8. *Н. Бор*, УФН **76**, 21 (1962).
9. *М. В. Волькенштейн*, Перекрестки науки, «Наука», 1972.
10. *Э. Шредингер*, Что такое жизнь с точки зрения физики, ИЛ, 1947; 2-е изд., Атомиздат, 1972.
11. *W. Elsasser*, The Physical Foundation of Biology, Pergamon Press, 1958.
12. *Е. Вигнер*, Этюды о симметрии, «Мир», 1971.
13. *М. Эйген*, Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул, «Мир», 1973; УФН **109**, 545 (1973).
14. *J. Monod*, Le hasard et la necéssité, Seuil, 1971.
15. *А. М. Ляпунов*, Общая задача об устойчивости движения, Гостехиздат, 1950.
16. *Н. Г. Четаев*, Устойчивость движения, Гостехиздат, 1946.
17. *А. А. Андронов, А. А. Витт, С. Э. Хайкин*, Теория колебаний, Физматгиз, 1959.
18. *L. Onsager*, Phys. Rev. **37**, 405; **38**, 2265 (1931).
19. *H. Casimir*, Rev. Mod. Phys. **17**, 343 (1945).
20. *И. Пригожин*, Введение в термодинамику необратимых процессов, ИЛ, 1961.
21. *П. Глансдорф, И. Пригожин*, Термодинамическая теория структуры, стабильности и флуктуаций, «Мир», 1973.
22. *С. де Гроот*, Термодинамика необратимых процессов, ИЛ, 1956.
23. *К. Денбиг*, Термодинамика стационариых иеобратимых процессов, ИЛ, 1954.
24. *Р. Хаазе*, Термодинамика необратимых процессов, «Мир», 1967.
25. *A. Katchalsky, P. Curran*, Nonequilibrim Thermodynamics in Biophysics, Harvard Univ. Press, 1965.
26. *И. Пригожин, Г. Николис*, УФН **109**, 517 (1973).
27. *L. Szillard*, Z. Phys. **53**, 840 (1929).
28. *Л. Бриллюэн*, Наука и теория информации, Физматгиз, 1960.
29. *Г. Кастлер*, Возникновение биологической организации, «Мир», 1967.

30. *Г. Кастлер*, в сб. «Теория информации и биологии», ИЛ, 1960.
31. *Х. Равен*, Оогенез, «Мир», 1964.
32. *М. Аптер*, Кибернетика и развитие, «Мир», 1970.
33. *M. Apter, L. Wolpert*, J. Theor. Biol. 8, 244 (1965).
34. *И. И. Шмальгаузен*, Кибернетические вопросы биологии, «Наука», Новосибирск, 1968.
35. *И. И. Шмальгаузен*, Факторы эволюции, «Наука», 1968.
36. *Г. Йокки*, в сб. «Теория информации в биологии», ИЛ, 1960.
37. *Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц*, Статистическая физика, «Наука», 1964.
38. *М. А. Леонтович*, Введение в термодинамику, Гостехиздат, 1950.
39. *Р. Кубо*, Статистическая механика, «Мир», 1967.
40. *E. Ising*, Z. Phys. **31**, 253 (1925).
41. *К. Хуанг*, Статистическая механика, «Мир», 1966.
42. *Т. Хилл*, Статистическая механика, «Мир», 1966.
43. *М. В. Волькенштейн*, Биофизика 6, 257 (1961).
44. *М. В. Волькенштейн, Ю. Я. Готлиб, О. Б. Птицын*, ФТТ 3, 420 (1961).
45. *М. В. Волькенштейн*, Молекулярная оптика, Гостехиздат, 1951.
46. *М. В. Волькенштейн*, Строение и физические свойства молекул, изд. АН СССР, 1955.
47. *М. В. Волькенштейн*, Физика ферментов, «Наука», 1967.
48. *N. Rashevsky*, Mathematical Biophysics, Univ. Chicago Press, 1960.
49. *К. Анфинсен*, Молекулярные основы эволюции, ИЛ, 1962.
50. Биофизика, ред. Б. Н. Тарусов, О. Р. Кольс, изд-во «Высшая школа», 1968.
51. Лекции по биофизике, ред. П. О. Макаров, изд. ЛГУ, 1968.
52. *W. Beier*, Biophysik, Thieme, 1968.
53. *В. Байер*, Биофизика, ИЛ, 1962.
54. *Ю. Аккерман*, Биофизика, «Мир», 1964.
55. Современные проблемы биофизики, тт. 1, 2, ИЛ, 1961.
56. *Р. Сетлоу, Э. Поллард*, Молекулярная биофизика, «Мир», 1964.
57. *Л. А. Блюменфельд*, Проблемы биологической физики, «Наука», 1974.

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОФИЗИКИ

§ 2.1. ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ

Организм живет в результате химических превращений веществ, поступающих в него извне, и выделения веществ в окружающую среду. Биология и биофизика неразрывно связаны с химией.

Никакие физические методы сами по себе не были бы в состоянии раскрыть структуру сложных молекул без химических исследований. Напротив, химия установила детальное строение сложнейших биоорганических веществ — стероидов, порфириновых соединений, гормонов и т. д. Химические и физико-химические методы являются определяющими в раскрытии структуры биополимеров — белков и нуклеиновых кислот.

Химия изучает строение веществ и их превращения в химических реакциях. Развитие биохимии привело к подробной расшифровке важнейших процессов, протекающих в живых организмах, процессов, в которых принимает участие множество соединений.

Нужно отметить несколько основных принципов химии жизни, а именно единство химических механизмов в живой природе, гетерогенность живой химической системы, особо важную роль тонких индивидуальных особенностей молекул, принцип химической, молекулярной сигнализации. Эти принципы неоднократно обсуждаются в последующем изложении. Здесь мы ограничимся основными положениями и немногими примерами.

Грандиозное многообразие биологических видов и индивидуумов не означает чрезвычайного разнообразия химических соединений, определяющих их существование, и характера протекающих в организме реакций. Напротив, основные вещества и основные химические механизмы едины во всей живой природе. Все белки строятся из ограниченного числа аминокислотных звеньев, все нуклеиновые кислоты — из еще меньшего числа нуклеотидов. Одни и те же атомные структуры фигурируют в самых разнообразных организмах — это относится не только к биополимерам, но и к малым молекулам. Основные химические источники энергии одинаковы во всей живой природе. К ним относится прежде всего аденозинтрифосфат (АТФ). Однотипны и

фундаментальные процессы — подавляющему большинству организмов свойственно дыхание, приводящее к окислению органических соединений до углекислого газа и воды. Разнообразие организмов определяется разнообразием комбинаций одних и тех же соединений и атомных групп и разнообразием их соотношений в пространстве и времени.

Химическая гетерогенность живой системы означает не только наличие различных молекул в клетках. Для жизни обязательны пространственная гетерогенность, т. е. разделение веществ в пространстве полупроницаемыми перегородками — мембранами, и наличие концентрационных градиентов.

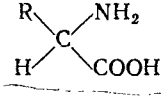
В обычной химии малые различия в строении молекул, например различие между метильной группой и этильной, не сказываются существенным образом на свойствах сложной молекулы. В биоорганической химии малые различия между молекулами имеют важное значение. Особенно существенны конформационные различия, возникающие в результате поворотов вокруг единичных связей. Химия сравнительно недавно обратилась к изучению конформаций. Между тем, именно конформационные свойства определяют биологическую функциональность биополимеров, равно, как и малых молекул.

Таким образом, жизнь характеризуется химической индивидуализацией молекул, не имеющей особого значения в обычной химии. Биологическне молекулы и макромолекулы имеют строго определенные состав и химическое строение, в отличие, скажем, от синтетического полимера, всегда представляющего собой некую смесь макромолекул различной длины с различными «дефектами» строения. Свойства данного белка индивидуальны и определенны, свойства синтетического полимера имеют смысл усредненной характеристики, ибо к нему неприменим закон постоянства состава.

Дадим краткие характеристики основных биополимеров — белков, нуклеиновых кислот и углеводов, мономеров, из которых они строятся, а также ряда важнейших для биологии низкомолекулярных соединений, биорегуляторов.

§ 2.2. АМИНОКИСЛОТЫ

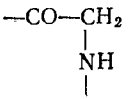
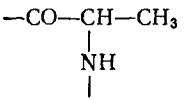
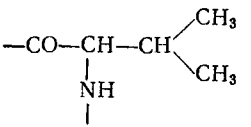
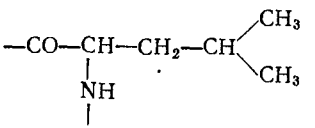
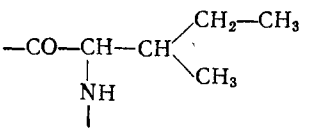
Химическое строение α-аминокислот, остатки которых фигурируют в белках и в полипептидах (белковые цепи длиною до 100 звеньев):

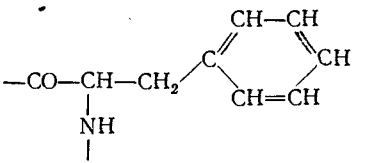
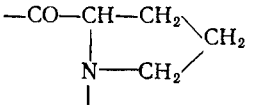
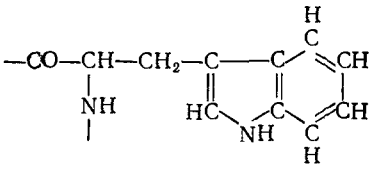
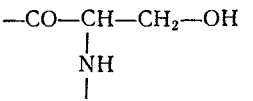
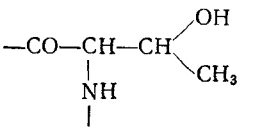
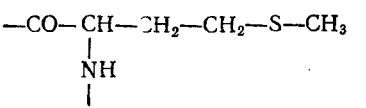


где R — какой-либо радикал — углеводородный или содержащий, помимо C и H, другие атомы, например O, S, N. Приведенная

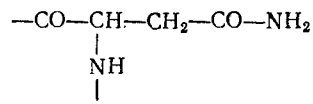
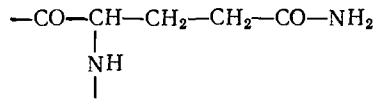
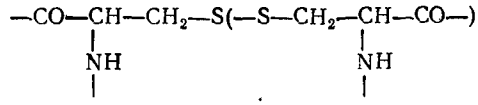
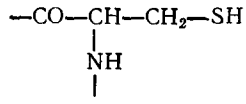
Таблица 2.1

Канонические аминокислотные остатки

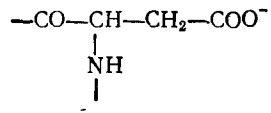
№	Название остатка и аминокислоты	Обозначение остатка	Краткое обозначение	Структурная формула
		I. Нейтральные остатки		
1	Глицил Глицин	Гли (Gly)	*G*	
2	Аланил Аланин	Ала (Ala)	*A*	
3	Валил Валин	Вал (Val)	*V*	
4	Лейцил Лейцин	Лей (Leu)	*L*	
5	Изолейцил Изолейцин	Иле (Ile)	*I*	

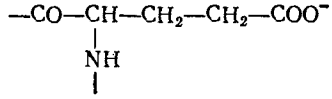
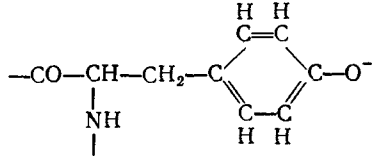
6	Фенилаланил Фенилаланин	Фен (Phe)	*F*	
7	Пролил Пролин	Про (Pro)	*P*	
8	Триптофанил Триптофанин	Три (Trp)	*W*	
9	Серил Серин	Сер (Ser)	*S*	
10	Треонил Треонин	Тре (Thr)	*T*	
11	Метионил Метионин	Мет (Met)	*M*	

Продолжение

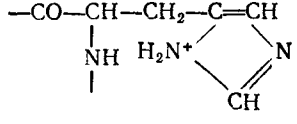
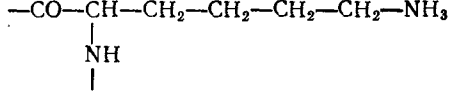
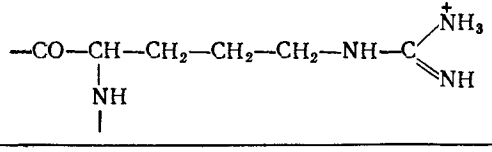
№	Название остатка и аминокислоты	Обозначение остатка	Краткое обозначение	Структурная формула
12	Аспарагинил Аспарагин	Асн Асп — NH_2 (Asn)	*N*	
13	Глутаминил Глутамин	Глн Глу — NH_2 (Gln)	*Q*	
14	Цистинил Цистин	Цис (—S—) (Cys)	*C*	
14а	Цистеинил Цистеин	Цис—SH (Cys — SH)	*C*	

II. Кислотные остатки (в виде анионов) –

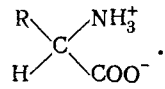
15	Аспартил Аспарагиновая кислота	Асп (Asp)	*D*	

16	Глутамил Глутаминовая кислота	Глу (Glu)	*E*	
17	Тирозил Тирозии	Тир (Tyr)	*Y*	

III. Основные остатки (в виде катионов)

18	Гистидил Гистидии	Гис (Hys)	*H*	
19	Лизил Лизии	Лиз (Lys)	*K*	
20	Аргинил Аргиниии	Арг (Arg)	*R*	

здесь формула в сущности не точна. Ряд фактов свидетельствует о том, что в нейтральной среде аминокислоты являются диполярными ионами, или цвиттерионами (см. стр. 67)



При поликонденсации аминокислот в белковую цепь образуется пептидная связь —NH—CO— и выделяется вода (см. стр. 118).

Все природные белки строятся, как правило, из двадцати канонических аминокислотных остатков, приведенных в табл. 2.1. Из них 19 — действительно аминокислотные остатки, но Про — остаток иминокислотный, соответствующий иминокислоте пролину. Остатки цистеинила (Цис—SH) в белке часто попарно соединяются друг с другом ковалентной дисульфидной связью, образуя Цис—S—S—Цис.

Двадцать остатков содержат двадцать различных радикалов R. В табл. 2.1 остатки разделены по электрохимическим свойствам.

Если классифицировать их по химическому строению, то мы убедимся в большом разнообразии остатков. Перечислим их.

А. *Алифатические аминокислотные остатки* (15): Ала, Арг, Асп, Асн, Вал, Гли, Глу, Глн, Иле, Лей, Лиз, Мет, Сер, Тре, Цис (Цис—SH).

В том числе:

а. Углеводородные остатки (5): Ала, Вал, Гли, Иле, Лей.

б. Остатки, содержащие гидроксильную группу: Сер, Тре.

в. Кислотные остатки (содержащие COOH): Асп, Глу.

г. Остатки, содержащие амидную группу $-CONH_2$: Асн, Глн.

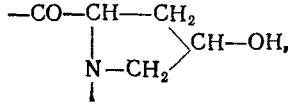
д. Остатки, содержащие аминогруппу (основную): Арг, Лиз.

е. Остатки, содержащие серу: Мет, Цис (Цис—SH).

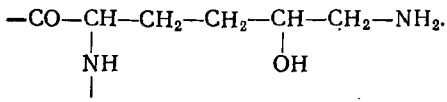
Б. *Аминокислотные остатки, содержащие π-электронные циклы*: Гис, Тир, Три, Фен.

В. *Иминокислотный остаток* — Про.

Помимо 20 канонических аминокислотных остатков, в белках встречаются производные некоторых из них. Среди этих минорных остатков особенно важен оксипролил (Опро)



так как он присутствует в значительном количестве в одном из универсальных белков животных организмов — в коллагене (см. § 4.10). В ряде ферментов фигурирует оксилизил (Олиз)



В белках некоторых морских организмов присутствуют дийодтирозил, дибромтирозил и т. д. Многие неканонические аминокислоты (орнитин, α, γ-диаминовалериановая кислота, α, δ-диаминомасляная кислота и т. д.) фигурируют не в белках, а в низкомолекулярных пептидах и участвуют в процессах метаболизма.

Все функциональное многообразие белков определяется многообразием последовательностей 20 аминокислотных остатков в полипептидных цепях. Разнообразие этих остатков определяется радикалами R; немногих типов таких атомных групп достаточно для обеспечения любых молекулярно-биологических процессов.

§ 2.3. СВОЙСТВА ЭЛЕКТРОЛИТОВ

Свободные аминокислоты и входящие в состав белков основные и кислотные остатки являются электролитами. Функционируя в водной среде, они диссоциируют на ионы. Рационально пользоваться следующим определением Бренстеда: *кислота* — молекула, от которой отщепляется протон; *основание* — молекула, присоединяющая протон. Сам растворитель — вода — выступает как кислота в реакции $H_2O \rightleftarrows H^+ + OH^-$ и как основание в реакции $H_2O + H^+ \rightleftarrows H_3O^+$ (ион оксония).

Вода — чрезвычайно слабый электролит, ее константа диссоциации очень мала. При 25 °С в чистой воде, т. е. при $[H_2O] = 1$,

$$[H^+][OH^-] = K[H_2O] = 10^{-14} \ (моль \cdot л^{-1})^2.$$

Так как $[H^+] = [OH^-]$, концентрация водородных ионов в воде составляет 10^{-7}. Удобно пользоваться отрицательным десятичным логарифмом этой величины, обозначаемым pH. Для воды, т. е. для нейтральной среды pH = 7. Соответственно, для кислот pH < 7, а для оснований pH > 7.

Биологические электролиты обычно слабые, иными словами, они мало диссоциированы. *Константа диссоциации* кислоты, т. е. константа равновесия K реакции $HA \rightleftarrows H^+ + A^-$ равна

$$K = \frac{a_H a_A}{a_{HA}}, \qquad (2.1)$$

где $a_H = a_A$ и a_{HA} — активности соответствующих веществ в растворе. В растворах, близких к идеальным, активности практически равны молярным концентрациям. Поэтому

$$[H^+]^2 = K[HA],$$

и пользуясь отрицательным десятичным логарифмом K, обозначаемым pK, имеем

$$pH = {}^1/_2(pK - \lg [HA]). \qquad (2,2)$$

Степень ионизации слабой кислоты в воде определяется как

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]} \approx \frac{[H^+]}{[HA]} = \sqrt{\frac{K}{[HA]}}. \qquad (2,3)$$

Степень диссоциации кислоты, сила кислоты, растет с K, т. е. убывает с ростом pK, сила основания убывает с ростом K, т. е. растет с pK. Условие $[A^-] = [H^+]$ соблюдается только в нейтральном растворе. Вообще говоря,

$$pH = pK \pm \lg(a_A/a_{HA}),$$

или (в идеальном растворе)

$$pH = pK \pm \lg\frac{\alpha}{1-\alpha}. \qquad (2,4)$$

Знак плюс отвечает кислоте, знак минус — основанию, для которого

$$\alpha = \frac{[HA]}{[A^-] + [HA]},$$

что соответствует реакции $A^- + H^+ \rightleftarrows HA$, где A^- — основание.

Для неидеального раствора

$$pH = pK + \lg\frac{\gamma_{A^-}}{\gamma_{HA}} \pm \lg\frac{\alpha}{1-\alpha}, \qquad (2,5)$$

где γ — коэффициенты активности.

Неидеальность раствора электролита определяется нехимическими взаимодействиями молекул и ионов. При достаточно высокой концентрации ионов каждый из них окружен ионной атмосферой — ионами противоположного знака. Теория Дебая — Хюккеля позволяет вычислить термодинамические характеристики и, следовательно, коэффициенты активности для неидеальных растворов электролитов.

Рассматриваемая совокупность ионов есть кооперативная система с сильным взаимодействием (см. § 1.5). В отличие от решетки Изинга, здесь взаимодействия медленно ослабевают с расстоянием между частицами, так как они имеют электроста-

тический характер, следуют закону Кулона. Однако для такой системы применимо приближение молекулярного поля (см. стр. 40).

Пусть в единице объема раствора содержится по n_i ионов сорта i ($i = 1, 2, 3, \ldots, N$) с зарядами $e_i = |e| z_i$, где $|e|$ — абсолютная величина заряда электрона, z_i — число положительных или отрицательных зарядов на ионе (валентность иона). Так как раствор в целом электрически нейтрален, то

$$\sum_{i=1}^{N} e_i n_i = 0. \tag{2,6}$$

На каждый ион действуют электростатические силы, созданные другими ионами. В приближении молекулярного поля на данный ион действует некоторое среднее поле окружающих ионов. Если последние одинаковы, то такое же среднее поле характеризует действие выбранного иона на остальные. Это означает, что поле является самосогласованным. Электростатическое поле потенциально. Средний потенциал поля $\psi(r)$ должен, согласно законам электростатики, удовлетворять уравнению Пуассона

$$\Delta\psi(r) = -\frac{4\pi}{\varepsilon}\rho(r) = -\frac{4\pi}{\varepsilon V}\sum_i e_i n_i \exp[-e_i\psi(r)/kT]. \tag{2,7}$$

Здесь V — объем системы, ε — диэлектрическая проницаемость раствора, ρ — численная плотность ионов, зависящая от расстояния r до данного иона. В соответствии с больцмановской статистикой $\rho(r)$ выражается экспоненциально через свободную энергию иона $e_i\psi$. При $e_i\psi \ll kT$ получаем, разлагая экспоненту в ряд и ограничиваясь линейными членами,

$$\Delta\psi(r) = \varkappa^2\psi(r), \tag{2,8}$$

где $\varkappa$ — параметр Дебая — Хюккеля, *радиус ионной атмосферы*, определяемый следующим образом:

$$\varkappa^2 = \frac{4\pi}{V\varepsilon kT}\sum_i e_i^2 n_i. \tag{2,9}$$

Выражение для плотности $\rho(r)$ в уравнении (2.7) соответствует среднему полю, задаваемому распределением ионов. В свою очередь поле влияет на это распределение.

Пользуясь граничным условием $\psi(\infty) = 0$, находим решение уравнения (2.7)

$$\psi(r) = \frac{A\exp(-\varkappa r)}{r}. \tag{2,10}$$

Для нахождения A предположим, что ионы имеют конечный диаметр a. Потенциал иона на расстояниях $r \leqslant a$ равен $\psi_i = e_i/\varepsilon r$. Напишем условие непрерывности электрической индукции при $r = a$:

$$-\varepsilon \frac{\partial \psi}{\partial r}\Big|_{r=a} = \frac{\varepsilon A}{r^2} \exp(-\varkappa r)(1+\varkappa r)\Big|_{r=a} = \frac{e_i}{a^2}.$$

Следовательно, средний потенциал поля равен

$$\psi(r) = \frac{e_i}{\varepsilon r} \frac{\exp[-\varkappa(r-a)]}{1+\varkappa a}. \qquad (2,11)$$

Вычислим теперь свободную энергию взаимодействия ионов. Система, состоящая из центрального иона и окружающей его ионной атмосферы, подобна гальваническому элементу, который можно разряжать бесконечно медленно, обратимо и изотермично. Будем постепенно уменьшать заряды ионов от e_i до 0. При $r = a$ из (2.11) следует

$$\psi = \frac{e_i}{\varepsilon a(1+\varkappa a)}. \qquad (2,12)$$

Часть среднего потенциала, зависящая от зарядов ионной атмосферы, а не от собственного заряда иона, равна

$$\psi_e = \frac{e_i}{\varepsilon a(1+\varkappa a)} - \frac{e_i}{\varepsilon a} = -\frac{e_i \varkappa}{\varepsilon(1+\varkappa a)}. \qquad (2,13)$$

При убывании зарядов ионов от e_i до ηe_i $(\eta < 1)$ $\varkappa$ также убывает до $\eta\varkappa$ в силу (2,9). Следовательно, ψ_e убывает до $\eta^2\psi_e$, и соответствующее изменение свободной энергии равно

$$F_e = -\sum_i \frac{n_i e_i^2}{\varepsilon} \varkappa \int_0^1 \frac{\eta^2 d\eta}{1+\eta\varkappa a} = -\sum_i \frac{n_i e_i^2}{3\varepsilon} \varkappa g(\varkappa a), \qquad (2,14)$$

где

$$g(x) = \frac{3}{x^3}\{\ln(1+x) - x + {}^1/_2 x^2\} = 1 - {}^3/_4 x + {}^3/_5 x^2 + \ldots$$

Согласно (2,9) при $\varkappa a \ll 1$ получаем

$$F_e = -\sum_i \frac{n_i e_i^2 \varkappa}{3\varepsilon} = -{}^1/_3 \left(\frac{\sum n_i e_i^2}{\varepsilon}\right)^{3/2} \left(\frac{4\pi}{kT}\right)^{1/2} = -\frac{\varkappa^3 kT}{12\pi}. \qquad (2,15)$$

Такова свободная энергия взаимодействия ионов. Изменение свободной энергии при удалении иона данного сорта из раствора равно

$$\frac{\partial F_e}{\partial n_i} = -\frac{e_i^2 \varkappa}{2\varepsilon} = kT \ln \gamma_i, \qquad (2.16)$$

где γ_i — коэффициент активности ионов сорта i. Имеем

$$\ln \gamma_i = -\frac{1}{2} \frac{e^2 z_i^2}{\varepsilon kT} \varkappa = -\frac{e^3 z_i^2 (2\pi)^{1/2}}{(\varepsilon kT)^{3/2}} J^{1/2}, \qquad (2,17)$$

где величина

$$J = \frac{1}{2} \sum_i n_i z_i^2 \qquad (2,18)$$

называется *ионной силой* раствора. Ионная сила, pH и pK — важнейшие характеристики раствора электролита.

Мы видим, что коэффициент активности ионов данного сорта зависит от концентраций ионов всех остальных сортов.

Изложенная теория Дебая — Хюккеля относится к сильным электролитам. Аминокислоты — слабые электролиты. Однако при больших ионных силах коэффициенты активности аминокислот отличны от единицы и на опыте определяют не pK, а эффективные константы диссоциации

$$pK' = pK + \lg(\gamma_{A^-}/\gamma_{HA}). \qquad (2,19)$$

Для одноосновных электролитов отношение γ_{A^-}/γ_{HA} мало отличается от единицы и pK′ достаточно близко к pK — разница составляет 0,1—0,2. Следовательно,

$$pH \approx pK \pm \lg \frac{\alpha}{1-\alpha}. \qquad (2,20)$$

При титровании слабой кислоты сильным основанием (скажем, NaOH) идет реакция

$$HA + Na^+ + OH^- \rightarrow A^- + Na^+ + H_2O.$$

Следовательно, $[A^-] \approx [Na^+]$. Для степени ионизации имеем

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]} \approx \frac{c_{Na}}{c_{HA}}, \qquad (2,21)$$

т. е. α равно отношению концентраций сильного и слабого электролита. Определение α, pH и, следовательно, pK производится путем титрования кислоты щелочью или основания кислотой. Для грубых определений применяются химические индикаторы. Гораздо более точные результаты дает *потенциометрический метод*, основанный на регистрации потенциала на электроде, помещенном в раствор. Этот потенциал непосредственно связан с активностью иона (например, протона) в растворе. При титровании активность меняется, меняется и потенциал электрода. Для определения pH применяется стеклянный электрод. Этот электрод и электрод сравнения (обычно каломельный) помещаются в раствор с известной концентрацией исследуемого вещества. Разность потенциалов при надлежащей градуировке измеряется

непосредственно в единицах pH. pK определяется из значений pH в точке нейтрализации по формуле (2,4). Методы титрования биологически функциональных веществ описаны в [1].

Аминокислоты — *амфотерные* электролиты, характеризуемые двумя значениями pK, а именно величинами pK_1 и pK_2, отвечающими титрованию щелочью (нейтрализация COO^--группы) и кислотой (нейтрализация NH_3^+-группы) соответственно. В табл. 2.2 приведены некоторые значения pK_1, pK_2 и pH. Последняя величина отвечает *изоэлектрической точке*. Если аминокислота заряжена положительно, она движется к катоду, если отрицательно, — к аноду. В изоэлектрической точке молекула амфотерного электролита нейтральна — она остается неподвижной и не участвует в электропроводности. Для pH_i имеем

$$pH_i = {}^1/_2\,(pK_1 + pK_2).$$

В нижней половине таблицы приведены константы ионизации аминокислот, содержащих ионогенные группы в боковой цепи. pK_1 всюду относится к карбоксильной группе. pK_3 — отрицательный десятичный логарифм третьей константы диссоциации (при наличии в аминокислоте добавочной ионогенной группы).

Таблица 2.2

Электрохимические константы аминокислот [2]

	pK_1	pK_2	pK_3	pH_i
Глицин	2,35	9,78		6,1
Аланин	2,34	9,87		6,1
Валин	2,32	9,62		6,0
Лейцин	2,36	9,60		6,0
Серин	2,21	9,15		5,7
Пролин	1,99	10,60		6,3
Триптофан	2,38	9,39		5,9
Аспарагиновая кислота	2,09	3,87 (COOH)	9,82 (NH_3^+)	3,0
Глутаминовая кислота	2,19	4,28 (COOH)	9,66 (NH_3^+)	3,2
Тирозин	2,20	9,11 (NH_3^+)	10,1 (OH)	5,7
Цистеин	1,96	8,18 (NH_3^+)	10,28 (SH)	5,07
Аргинин	2,02	9,04 (NH_3^+)	12,48 (гуанидин)	10,8
Лизин	2,18	8,95 (α-NH_3^+)	10,53 (ε-NH_3^+)	9,7
Гистидин	1,77	6,10 (имидазол)	9,18 (NH_3^+)	7,6

Изучение электрохимических свойств аминокислот доказывает их диполярную природу (стр. 60). Теплоты реакций ионизации органических кислот

$$RCOOH \rightleftarrows RCOO^- + H^+$$

невелики, они имеют порядок величины 1 *ккал/моль*. Напротив, для реакций диссоциации замещенных ионов аммония

$$R\overset{+}{N}H_3 \rightleftarrows RNH_2 + H^+$$

эти теплоты примерно равны 12 *ккал/моль*. Аминокислоты в кислом растворе характеризуются теплотами ионизации от 1,3 до 2,1 *ккал/моль*, в щелочном — от 10 до 13 *ккал/моль*. Следовательно, идут соответственно реакции

$$H_3\overset{+}{N}—CHR—COO^- + H^+ \rightleftarrows H_3\overset{+}{N}—CHR—COOH,$$

$$N_3\overset{+}{H}—CHR—COO^- + OH^- \rightleftarrows H_2N—CHR—COO^- + H_2O.$$

Другими доказательствами диполярного строения аминокислот являются сильное повышение диэлектрической проницаемости при их растворении в воде, большая плотность и высокие температуры плавления твердых аминокислот, что связано с сильным электростатическим взаимодействием.

Из изложенного следует необходимость работы с биологическими веществами при постоянных значениях pH. Стабилизация pH достигается с помощью *буферных растворов*. В присутствии нейтральных солей диссоциация слабых кислот и оснований не зависит от разведения. Рассмотрим раствор слабой кислоты HA и ее натриевой соли NaA. Напишем реакцию диссоциации кислоты:

$$HA \rightleftarrows H^+ + A^-.$$

Константа равновесия $K_к$ этой реакции равна

$$K_к = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}, \qquad (2,22)$$

и так как $[A^-] = [H^+]$, то

$$[H^+] = \sqrt{K_к [HA]}. \qquad (2,23)$$

В присутствии соли NaA, которая диссоциирована гораздо сильнее кислоты, $[A^-] \approx [NaA]$. Следовательно,

$$K_к = \frac{[H^+][NaA]}{[HA]} \qquad (2,24)$$

и

$$[H^+] = K_к \frac{[HA]}{[NaA]}. \qquad (2,25)$$

Концентрация ионов H^+ зависит от отношения концентраций кислоты и соли, но не от степени разведения. Так, в растворе 0,1 *N* уксусной кислоты и 0,1 *N* уксуснокислого натрия pH = = 4,628. При десятикратном разведении раствора водой pH = = 4,670, при стократном разведении pH = 4,73.

При добавлении к 1 *л* воды 1 *см*^{3} 0,01 *N* HCl величина pH уменьшается от 7 до 5. При добавлении такого же количества HCl к раствору 0,1 *N* CH_3COOH и 0,1 *N* CH_3COONa эта величина убывает с 4,628 до 4,540. Для стабилизации pH применяются ацетатные, фосфатные и другие буферы (см. [1, 3]).

§ 2.4. АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ

Белки — высокомолекулярные соединения со строго определенным химическим строением и молекулярным весом. Молекула белка состоит из одной или нескольких полипептидных цепей, образовавшихся в результате поликонденсации аминокислот.

Сейчас разработаны хорошие методы выделения и очистки белков [1]. Удается получить белки и в кристаллической форме. Вместе с тем многие важные белки до сих пор в чистом виде не выделены (например, ацетилхолинэстераза). Методы идентификации характерных групп и связей в белках описаны в биохимической литературе (см., в частности, [2]).

При объединении аминокислот в белковую цепь образуются *пептидные связи* —NH—CO—. На одном конце цепи находится $—COO^-$-группа (С-конец), на другом — группа $—N^+H_3$ (N-конец). Молекулярные веса белков варьируют в широких пределах — от нескольких десятков тысяч (рибонуклеазы) до нескольких миллионов (гемоцианины). Характерные молекулярные веса отдельных полипептидных цепей, входящих в состав молекулы белка, порядка 20 000, что соответствует примерно 150—180 аминокислотным остаткам (средний молекулярный вес аминокислотного остатка равен 117). По установившейся терминологии молекулы, содержащие менее 100 аминокислотных остатков, называют не белками, а *полипептидами*. Таковы некоторые гормоны, например инсулин, адренокортикотропин (см. стр. 74). Полипептидами часто называют также синтетические полиаминокислоты и их производные.

Полинг и Кори установили методом рентгеноструктурного анализа модельных низкомолекулярных соединений, например амидов $R—CO—NH_2$,что пептидная (амидная) связь имеет специфическое строение, показанное на рис. 2.1 [4]. Четыре атома —CO—NH — расположены в одной плоскости. Длина связи N—C, равная 1,32 Å, значительно меньше длины этой связи в алифатических аминах, где она составляет 1,47 Å. Это означает сопряжение связей N—C и C=O, перекрывание их элек-

тронных оболочек, сопровождаемое сдвигом электронной плотности от азота к кислороду. Связь N—C должна считаться не единичной, но частично двойной. Плоское строение пептидной связи определяет особенности структуры полипептидной цепи в целом (см. § 4.2).

Химическое, и, тем самым, биологическое поведение белка определяется его аминокислотным составом и последовательностью остатков в цепи — *первичной структурой*. Современные методы позволяют определить аминокислотный состав белка без особых затруднений. Белок расщепляется на аминокислоты в результате *гидролиза* — реакции, обратной поликонденсации,

$$-CHR_1-NH-CO-CHR_2- + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow -CHR_1-NH_2 + HOOC-CHR_2-$$

Гидролитическое расщепление происходит при действии на белок кислот, щелочей, а также протеолитических ферментов (протеаз), катализирующих разрыв пептидной связи. Получаемый гидролизат представляет собой смесь аминокислот. Качественное определение его состава производится с помощью характерных химических реакций, в ряде случаев дающих окрашенные продукты (см. [2]). Количественное определение состава гидролизата осуществляется путем его разделения на чистые аминокислотные фракции. Для этой цели пользуются хроматографией.

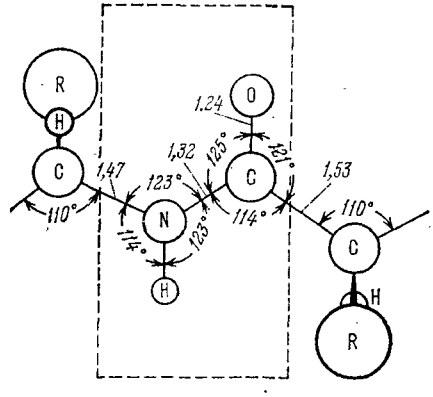


Рис. 2.1. Пептидная связь.

Хроматография — метод разделения веществ в газовой смеси или в растворе, основанный на пропускании газа или жидкости через пористые сорбенты. Этот метод был открыт в 1903 г. Цветом [5]. (Описание различных вариантов методов, применяемых для разделения и анализа белков и аминокислот, см. в [1].)

Представим себе колонку из пористого сорбента (скажем, набитую порошком Al_2O_3). Нальем сверху небольшое количество исследуемого раствора, целиком сорбируемого в колонке, и будем пропускать через нее с некоторой скоростью чистый растворитель. Растворитель будет вымывать, элюировать сорбированные вещества, и они будут смещаться в низ колонки. Перемещение слабо сорбируемого вещества происходит быстрее, чем

вещества, сорбируемого сильнее. Исследуемое вещество сорбируется в верхней части колонки и десорбируется в нижней ее части. Вследствие этого возникает максимум адсорбции, т. е. в сорбенте образуются зоны адсорбированного вещества, перемещающиеся по колонке с различной скоростью, так как сорбция зависит от химического строения вещества (и от природы сорбента). Если различия в сорбции значительны, то через некоторое время зоны, содержащие отдельные компоненты смеси, полностью разделяются, и оказывается возможным извлечь эти компоненты. Сущность хроматографии состоит в многократном повторении актов адсорбции — десорбции, приводящем в конечном счете к разделению компонент смеси. Очевидно, что в основе хроматографии находятся динамические, кинетические явления.

Для понимания хроматографии нужно рассматривать явления адсорбции и (или) ионного обмена в гетерогенных системах и распределения веществ между двумя жидкими фазами.

Молекулярная адсорбция в простейшем случае описывается изотермой Лэнгмюра

$$m = \frac{kc}{1 + Ac}, \tag{2,26}$$

где m — количество адсорбированного вещества, c — его концентрация в растворе, A и k — константы. В более сложных случаях полезно эмпирическое уравнение Фрейндлиха

$$m = Bc^{\varepsilon}, \tag{2,27}$$

где B и ε — константы.

Об ионном обмене сказано далее. Распределение вещества между двумя жидкими фазами следует из условия равенства его химических потенциалов в равновесии

$$\mu_i^{(1)} = \mu_i^{(2)}$$

или

$$\mu_i^{(1)}(0) + RT \ln a_i^{(1)} = \mu_i^{(2)}(0) + RT \ln a_i^{(2)}. \tag{2,28}$$

Следовательно, отношение активностей a компонент в обеих фазах постоянно

$$\frac{a_i^{(1)}}{a_i^{(2)}} = \text{const}, \tag{2,29}$$

т. е. активность (концентрация) вещества в одной фазе линейно зависит от его активности (концентрации) в другой фазе.

Рассмотрим *равновесную* хроматографию, считая, что равновесие между веществом на твердом сорбенте и в растворе устанавливается мгновенно, и можно пренебречь продольной диффузией.

Уравнение материального баланса при перемещении однокомпонентного вещества сверху вниз в колонке имеет вид

$$-\frac{\partial c}{\partial x}=\alpha\frac{\partial c}{\partial V}+\rho\frac{\partial m}{\partial V}, \qquad (2,30)$$

где m — количество вещества, сорбированного 1 *г* сорбента, ρ — число граммов сорбента на 1 *см* длины колонки, c — концентрация вещества, V — объем протекшего раствора (*мл*), α — доля объема пор в колонке, x — расстояние от верха колонки. Последнее уравнение можно переписать в виде

$$-w\frac{\partial c}{\partial x}=\alpha\frac{\partial c}{\partial t}+\rho\frac{\partial m}{\partial t}, \qquad (2,31)$$

где w — скорость протекания раствора. Задача состоит в решении такого рода уравнений, т. е. в нахождении зависимости m и c от w, t и x. Эти зависимости дают законы деформирования границ хроматографических зон.

Если раствор представляет собой смесь двух веществ, то они сорбируются в разных местах колонки. При протекании раствора сначала из колонки выходит первая, более подвижная, а затем обе компоненты в виде исходного раствора. Выходная кривая (зависимость концентрации на выходе от объема V протекшего раствора) имеет вид, показанный на рис. 2.2. Она позволяет производить фронтальный анализ. Концентрация первой компоненты на первой ступени обозначена c_{11}, концентрации второй компоненты на первой и второй ступенях c_{12} и c_{22}. Объемы V_1 и V_2 называют объемами задержки. При лэнгмюровских изотермах адсорбции

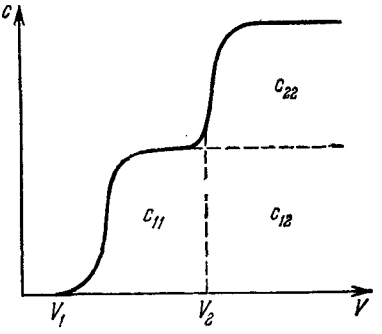


Рис. 2.2. Выходная кривая.

$$m_1=\frac{k_1c_{12}}{1+l_1c_{12}+l_2c_{22}}, \quad m_2=\frac{k_2c_{22}}{1+l_1c_{12}+l_2c_{22}}, \qquad (2.32)$$

где m_1 и m_2 — количества первой и второй компонент в адсорбированном состоянии на 1 *г* сорбента, k_i и l_i — константы. Вместе с тем

$$m_2=V_2c_{22}, \quad m_1=V_2c_{12}-(V_2-V_1)c_{11}. \qquad (2,33)$$

Из (2.32) и (2.33) следует, что

$$c_{12}=c_{11}\frac{1-V_1/V_2}{1-k_1/k_2}. \qquad (2,34)$$

Значения V_1 и V_2 определяют из хроматографических опытов с отдельными компонентами. Таким образом можно найти c_{12}, если известна величина c_{11}.

В действительности установление равновесия происходит отнюдь не мгновенно. Поэтому зоны несколько размываются. Теория объясняет это размытие. Распределение концентрации в зоне оказывается гауссовым.

Теория и методы хроматографии описаны в обширной монографической и журнальной литературе (см., например, [1, 6—10]). Здесь мы ограничиваемся лишь краткими сведениями о хроматографическом анализе белковых гидролизатов (ср. [1, 2, 10]).

Весьма наглядно двумерное разделение аминокислот на бумаге — метод «отпечатков пальцев». В этом случае сорбентом

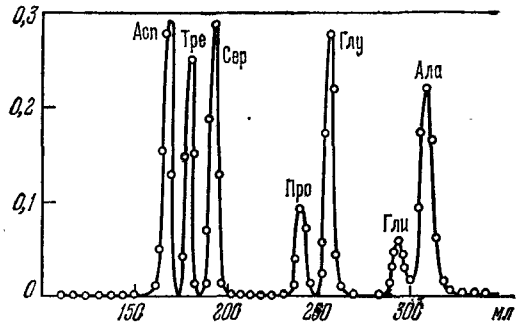


Рис. 2.3. Часть концентрационной кривой гидролизата рибонуклеазы.
По оси ординат — интенсивность окраски с нингидрином.
По оси абсцисс — объем элюата.

служит плотная фильтровальная бумага. На краю прямоугольного листа помещают каплю анализируемого гидролизата. Затем лист подвешивают к лотку со специальным растворителем и промывают им. Через определенное время бумагу высушивают, лист поворачивают на 90° и вновь промывают уже другим растворителем. Лист снова высушивают, обрызгивают растворами веществ, дающих цветные реакции с аминокислотами, и нагревают. На листе появляются цветные пятна, отвечающие разным аминокислотам. По их положению можно определить аминокислотный состав белка. Вырезая участки бумаги с пятнами и элюируя из них аминокислоты растворителями, можно определить весовое содержание аминокислот.

Совершенным методом исследования аминокислотного состава белков является хроматография на ионнообменных смолах, в частности на катионообменнике Дауэкс-50, содержащем сульфогруппы, связывающие NH_3^+-группы аминокислот. Элюция производится при разных pH, концентрациях буфера и темпера-

гурах. Аминокислоты вымываются в определенной последовательности. Небольшие порции элюата одинакового объема собирают автоматически в пробирки при помощи коллектора. Каждую фракцию смешивают с дающим окраску реагентом (нингидрин), нагревают в стандартных условиях и определяют на фотометре интенсивность окраски. Проводят калибровку для каждой аминокислоты, учитывающую зависимость поглощения света от концентрации. Площадь каждого «пика» отвечает количеству данной аминокислоты в гидролизате (рис. 2.3) [11]. Вся процедура сейчас автоматизирована и установление аминокислотного состава белка не составляет проблемы.

§ 2.5. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называется ее *первичной структурой*. Определение первичной структуры производится путем частичного гидролиза белка с помощью специфических протеаз, катализирующих расщепление пептидной связи лишь между определенными остатками. Так, трипсин атакует лишь те пептидные связи, которые образованы СО-группами остатков основных аминокислот — Арг или Лиз. В результате образуется смесь коротких полипептидных цепей, *олигомеров*. Такие короткие цепи называются *пептидами*. Их исследование производится посредством химических и физико-химических методов (хроматография, масс-спектроскопия). Воздействуя другим ферментом, можно «разрезать» белок по другим связям, получить смесь других пептидов. N- и С-концевые остатки белка (см. стр. 68) определяются в результате их химической модификации, предшествующей частичному гидролизу. Зная строение пептидов, полученных при специфическом расщеплении различными ферментами, можно установить первичную структуру белка. Допустим, что белковая цепь имеет структуру

$$А \rightarrow Б \rightarrow В \rightarrow Г \rightarrow А \rightarrow Д \rightarrow Е \rightarrow В \rightarrow А \rightarrow Ж \rightarrow З \rightarrow$$
$$\rightarrow Е \rightarrow Ж \rightarrow Б \rightarrow В \rightarrow А,$$

где буквами обозначены остатки, стрелками — пептидные связи —NH—CO—. Подействуем на белок ферментом, разрывающим связь группы CO с остатком А. Получим пептиды А, $Б \rightarrow В \rightarrow Г \rightarrow А$, $Д \rightarrow Е \rightarrow В \rightarrow А$, $Ж \rightarrow З \rightarrow Е \rightarrow Ж \rightarrow Б \rightarrow В \rightarrow А$. Подействуем на белок другим ферментом, разрывающим связи с остатками Г и Е. Получим $А \rightarrow Б \rightarrow В \rightarrow Г$, $А \rightarrow Д \rightarrow Е$, $В \rightarrow А \rightarrow Ж \rightarrow З \rightarrow Е$, $Ж \rightarrow Б \rightarrow В \rightarrow А$. Последовательность пептидов нам неизвестна, но она легко устанавливается, так как

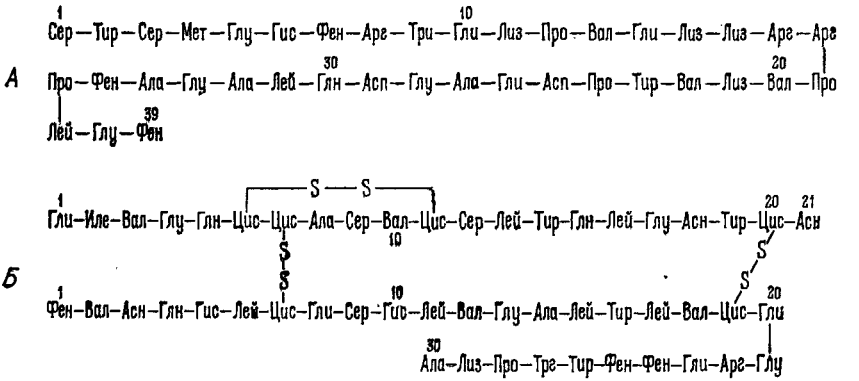


Рис. 2.4. Первичная структура β-кортикотропина свиньи (*А*) и инсулина быка (*Б*).

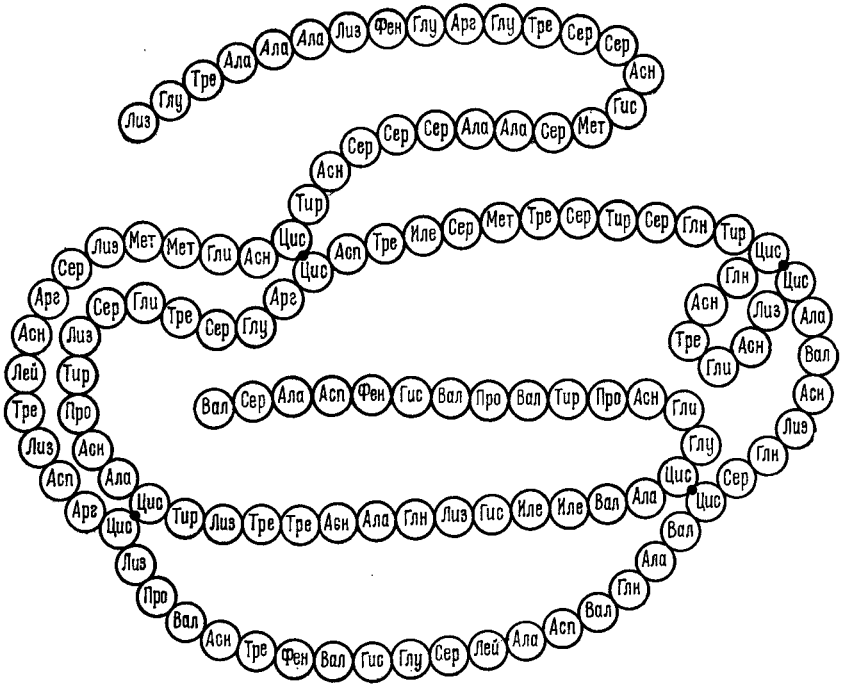


Рис. 2,5. Первичная структура рибонуклеазы быка.

их можно скомбинировать лишь одним единственным способом [2]:

А Б→В→Г→А, Д→Е→В→А, Ж→З→Е→Ж→Б→В→А,
А→Б→В→Г А →Д→Е В→А →Ж→З→Е Ж→Б→В→А.

С помощью этого метода Сэнгер впервые определил структуру инсулина [12]. В дальнейшем была установлена первичная

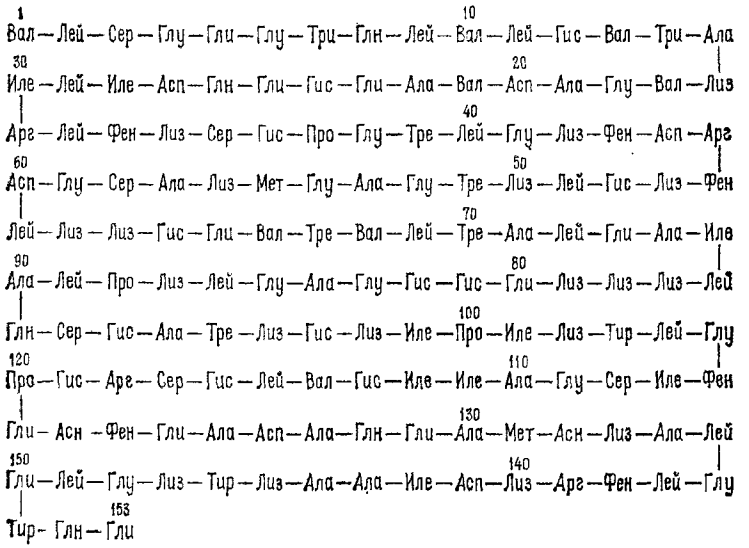


Рис. 2.6. Первичная структура миоглобина.

структура большого числа белковых цепей. Отметим определение одной из длиннейших последовательностей — звеньев аспартатаминотрансферазы [66]. Сводка таких данных, полученных до 1968 г., приведена в атласе [13].

Каждая белковая цепь имеет определенную первичную структуру, и в этом смысле есть текст, написанный двадцатибуквенным алфавитом. Выше приведены первичные структуры двух пептидных гормонов — кортикотропина и инсулина (рис. 2.4) — и белков — рибонуклеазы (рис. 2.5) и миоглобина (рис. 2.6). Белковый текст содержит определенную информацию. Оценим ее количество. На каждом месте находится один из 20 возможных остатков. Количество информации в цепи из N остатков (в предположении об их равновероятности) составляет

$$I = N \log_2 20 = N \cdot 4{,}32 \text{ бит}.$$

В действительности I меньше, так как частоты появления разных остатков неодинаковы. Вместе с тем анализ последовательностей в белках и их фрагментах показал, что между соседними остатками в дипептидах нет значимой корреляции [14]. Вопрос о корреляции на больших расстояниях между остатками нельзя считать решенным.

Первичная структура белка имеет, как уже сказано, определяющее значение для его функции. Это подтверждается прежде всего двумя группами фактов. Во-первых, различиями и сходством структур однотипных белков разных видов и, во-вторых, патологическими изменениями функций белков при замещениях (мутационных) аминокислотных остатков.

В работах Марголиаша и сотрудников (см. [15, 16]) проведено сопоставление цитохромов *c*, гемоглобинов и других белков различных видов. В табл. 2.3 приведены данные, относящиеся к цитохромам *c*. Функция цитохрома — участие в окислительном фосфорилировании — во всех разнородных организмах одна и та же. Вариации в первичной структуре характеризуют вид животного и являются его однозначным и ярким выражением. Сравнительное исследование первичных структур позволяет проследить за ходом биологической эволюции.

Мутации выражаются в изменении первичной структуры белков, в замещении аминокислотных остатков, т. е. в искажениях белкового текста. «Опечатка» в белковом тексте всегда имеет серьезные биологические последствия. Эти явления детально изучены на гемоглобине.

Известен ряд наследственных заболеваний крови — анемий. При так называемой серповидноклеточной анемии, распространенной в некоторых районах Африки, Юго-Восточной Азии, Средиземноморья, эритроциты имеют форму серпов. В этом случае гемоглобин (S-гемоглобин, в отличие от нормального A-гемоглобина) имеет кристаллоподобную структуру, эритроциты слипаются и подвергаются гемолизу — распаду. Тяжелые нарушения кровообращения, вызванные этим заболеванием, зачастую приводят к смерти в раннем возрасте. Средиземноморская анемия (T-гемоглобин) выражается в распаде эритроцитов, малокровии, компенсаторном разрастании кроветворной ткани костного мозга, вызывающем скелетные деформации, в увеличении печени и селезенки. Другие анемии также весьма опасны. Эти заболевания наследуются рецессивно в соответствии с законом Менделя. Иными словами, анемия резко проявляется у гомозиготных, но не у гетерозиготных особей. Поддержание высокого уровня SA-гетерозигот в названных районах оказалось связанным с распространением в них малярии. Малярия является в этих районах одной из главных причин смертности. SA-гетерозиготы

Таблица 2.3

Первичная структура цитохрома *с*

Лошадь

Ацетил — Гли — Асп — Вал — Глу — Лиз — Гли — Лиз — Лиз —
— Иле — Фен — Вал — Глн — Лиз — Цис — Цис — Ала — Глн — Цис —
— Гнс — Тре — Вал — Глн — Лиз — Гли — Гли — Лиз — Гис — Лиз —
— Тре — Гли — Про — Асн — Лей — Гис — Гли — Лей — Фен — Гли —
— Арг — Лиз — Тре — Гли — Глн — Ала — Про — Гли — Фен — Тре —
— Тир — Тре — Асп — Ала — Асн — Лиз — Асн — Лиз — Гли — Иле —
— Тре — Три — Лиз — Глу — Глу — Тре — Лей — Мет — Глу — Тир —
— Лей — Глу — Асн — Про — Лиз — Лиз — Тир — Иле — Про — Глу —
— Тре — Лиз — Мет — Иле — Фен — Ала — Гли — Иле — Лиз — Лиз —
— Лиз — Тре — Глу — Арг — Глу — Асн — Лей — Иле — Ала — Тнр —
— Лей — Лиз — Лиз — Ала — Тре — Асн — Глу — СООН

(Гем — между Цис 14 и Цис 17)

Отлнчия от цитохрома *с* лошади

Свинья и корова (3 отличия)	47 Сер 60 Гли 89 Гли
Кенгуру (6 отличий)	33 Асн 35 Иле 58 Иле 60 Гли 62 Асп 89 Гли
Человек (11 отличий)	11 Иле 12 Мет 15 Сер 46 Тир 47 Сер 58 Иле 60 Гли 62 Асп 83 Вал 89 Гли 92 Ала
Курица (11 отличий)	3 Иле 15 Сер 44 Глу 47 Сер 60 Гли 62 Асп 89 Сер 92 Вал 100 Асп 103 Сер 104 Лиз
Тунец (19 отличнй)	4 Ала 9 Тре 22 Асн 28 Вал 33 Три 44 Глу 47 Сер 54 Сер 58 Вал 60 Аси 61 Асн 62 Асп 89 Гли 92 Глн 95 Вал 100 Сер 103 Сер; отсутствует остаток 104
Бабочка (24 отличия)	Дополнительная последовательиость — 4 до — 1 Гли Вал Про Ала 2 Асн 3 Ала 5 Аси 13 Арг 22 Ала 28 Вал 54 Ала 60 Гли 61 Асп 62 Асп 65 Фен 82 Вал 85 Лей 88 Ала 89 Асн 92 Ала 100 Глу 101 Сер 104 Лнз — СООН; отсутствует остаток 103
Дрожжи (46 отличий)	Дополнительиан последовательиость — 5 до — 1 Тре Глу Фен Лиз Ала 2 Сер 3 Ала 4 Лиз 7 Ала 8 Тре 9 Лей 11 Лиз 12 Тре 13 Арг 15 Глу 16 Лей 25 Про 28 Вал 35 Иле 39 Гис 40 Сер 44 Глн 46 Тир 47 Сер 53 Иле 54 Лиз 56 Асн 57 Вал 58 Лей 60 Асп 62 Асн 63 Асн 64 Мет 65 Сер 69 Тре 81 Ала 83 Гли 85 Лей; 88 Глу 89 Лиз 90 Аси 92 Аси 96 Тре 103 Цис — SH 104 Глу — СООН отсутствует остаток 102.

более устойчивы к малярии, так как плазмодий малярийного комара хуже размножается в их крови.

Полинг и его сотрудники [17] обнаружили различия подвижности S- и A-гемоглобинов при электрофорезе, что объясняется различием в аминокислотном составе и, тем самым, в числе заряженных групп. Полинг определил болезни гемоглобина как молекулярные. Действительно, Ингрэм [18] показал, что отличие аномальных гемоглобинов от нормального определяется замещением всего лишь одного остатка в белковой цепи, — ведь смысл текста существенно меняется при замене одной «буквы». В табл. 2.4 указаны некоторые патогенные замещения в гемоглобине человека [13, 19]. Сейчас известно около 100 мутантных гемоглобинов человека.

Таблица 2.4

Мутационные замещения в гемоглобине человека

α-цепь				β-цепь			
Тип гемоглобина	Номер остатка	Замещаемый остаток	Замещающий остаток	Тип гемоглобина	Номер остатка	Замещаемый остаток	Замещающий остаток
J Торонто	5	Ала	Асп	S	6	Глу	Вал
J Техсас	16	Лиз	Глу	C	6	Глу	Лиз
G Аудхалн	23	Глу	Вал	G Сан Хосе	7	Глу	Гли
G Гонолулу	30	Глу	Глн	E	26	Глу	Лиз
Норфолк	57	Гли	Асп	K Ибадаи	46	Гли	Глу
M Бостон	58	Гис	Тир	J Бангкок	56	Гли	Асп
G Филадельфия	68	Асн	Лиз	M Саскатун	63	Гис	Тир
M Шибата	87	Гис	Тир	Цюрих	63	Гис	Арг
J Кейптаун	92	Арг	Глу	M Милвоки	67	Вал	Глу
Чипсейк	92	Арг	Лей	Нью-Йорк	113	Вал	Глу
J Тонгарики	115	Ала	Асп	D Пенджаб	121	Глу	Глн
O Индонезия	116	Глу	Лиз	O Аравия	121	Глу	Лиз

Химия располагает методами синтеза пептидной связи, т. е. линейной сшивки аминокислот (см. [20]). Эти методы, не имеющие ничего общего со способом синтеза белка в живой клетке (см. ниже гл. 9), обычно применяются для получения полиаминокислот — гомополимеров аминокислот, сходных с белками. Однако если первичная структура белка известна, то осуществим его химический синтез *in vitro*. Так были синтезированы белковые гормоны кортикотропин и инсулин. Меррифилд автоматизировал метод синтеза и впервые получил настоящий искусственный белок, обладающий ферментативной функцией, — рибонуклеазу [21].

§ 2.6. АСИММЕТРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Молекулы, лишенные плоскости и центра симметрии, дисимметричны, *хиральны*. Термин «хиральность» (от древнегреческого χειρ — рука, ср. хирургия, хиромантия) означает различие между правой и левой сторонами молекулы. Соответственно хиральные вещества могут фигурировать в двух формах — правой и левой. Эти две конфигурации нельзя совместить друг с другом никаким поворотом молекулы как целого в пространстве или поворотом той или иной группы в молекуле вокруг единичной связи. Они относятся друг к другу, как зеркальные отражения, как правая и левая рука. На рис. 2.7 показаны две конфигурации, два зеркальных антипода вторичного бутилового спирта.

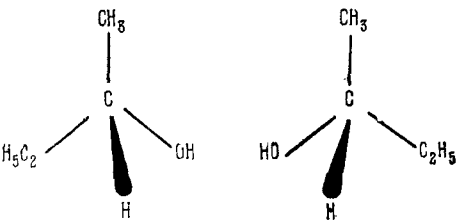


Рис. 2.7. Зеркальные антиподы вторичного бутанола.

Чаще всего приходится встречаться с хиральностью, определяемой так называемым *асимметрическим атомом углерода* (обычно отмечаемым звездочкой). В насыщенных (алифатических) органических соединениях четыре валентности атома углерода расположены под тетраэдрическими углами. Если хотя бы две из них связывают одинаковые группы, как, например, в молекуле $CR^{(1)}R^{(1)}R^{(2)}R^{(3)}$, то плоскость $CR^{(2)}R^{(3)}$ служит плоскостью симметрии молекулы и хиральность отсутствует. Если асимметрический атом углерода связан с четырьмя различными группами — $C^*R^{(1)}R^{(2)}R^{(3)}R^{(4)}$, такая молекула не имеет ни плоскости, ни центра симметрии. Такова молекула вторичного бутилового спирта (см. рис. 2.7).

Очевидно, что хиральность присуща подавляющему большинству сколько-нибудь сложных химических соединений. Вещество, получаемое в обычном химическом синтезе *in vitro*, представляет собой *рацемическую смесь* двух зеркальных антиподов. В соответствии со вторым началом термодинамики содержание правого и левого антиподов в рацемической смеси одинаково — по 50% (при этом максимальна энтропия смешения). При синтезе аминокислот все они, кроме глицина CH_2NH_2COOH, не имеющего асимметрического атома углерода, образуют рацемические смеси правых и левых антиподов.

В живой природе, однако, зафиксированы определенные конфигурации всех важнейших веществ, начиная с аминокислот. Аминокислотные остатки в белках всегда относятся к «левым»,

L-аминокислотам. Абсолютная конфигурация одной из них представлена на рис. 2.8.

Сами асимметричные молекулы, в отличие от их рацемических смесей, обладают оптической активностью и круговым дихроизмом. Они вращают плоскость поляризации света и неодинаково поглощают свет, поляризованный по правому и левому кругу (см. гл. 5). Зеркальные антиподы отличаются друг от друга не величиной угла поворота плоскости поляризации, а знаком этого угла; то же относится и к круговому дихроизму L-аминокислоты названы так не потому, что они вращают плоскость поляризации света влево, а D-аминокислоты — вправо. Исходным для левого ряда органических соединений служит левовращающий глицериновый альдегид $HOC—CH(OH)—CH_2OH$. Все L-соединения можно в принципе получить из него путем замещения соответствующих атомов и групп, присоединенных к асимметрическому атому углерода C*, без изменения общей конфигурации молекулы. При этом могут получиться как право-, так и левовращающие соединения.

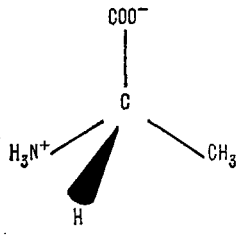


Рис. 2.8. Абсолютная конфигурация L-аланина.

Асимметрия свойственна и белкам, и углеводам, и нуклеиновым кислотам, и низкомолекулярным соединениям, фигурирующим в клетке. Соответственно в процессах метаболизма, происходящих без рацемизации, т. е. без превращений зеркальных антиподов друг в друга, клетка может усваивать лишь те из них, которые отвечают структуре ее биологических молекул. Организм может усваивать L-, но не D-аминокислоты. Попав в «антимир», в котором растения и животные содержат молекулы с противоположными конфигурациями, организм погиб бы от голода, несмотря на обилие пищи [22].

В книге Гаузе [23] приведено много примеров, свидетельствующих о биологических различиях правых и левых конфигураций молекул. Известны вещества, ядовитые в одной форме и безвредные в зеркальной форме. D-аспарагиновая кислота имеет сладкий вкус, L-кислота безвкусна. Еще Пастер установил, что некоторые бактерии питаются преимущественно одним антиподом данного вещества и т. д.

Получение чистых антиподов *in vitro* из рацемических смесей осуществляется с помощью асимметричных веществ биологического происхождения (обычно алкалоидов). Действуя на рацемическую смесь (D, L) соединением L′, получаем $(D, L) + L' \rightarrow DL' + LL'$. Соединения DL′ и LL′ уже не являются зеркальными антиподами (ими были бы вещества DL′ и LD′). Все

физико-химические свойства антиподов, за исключением оптической активности, тождественны. У D и L они совпадают, но различаются у DL′ и LL′. Поэтому вещества DL′ и LL′ можно разделить, например, кристаллизацией.

Для отделения правого антипода от левого необходимо асимметрическое воздействие — вещество (или существо), узнающее разницу между правым и левым. Зеркальные антиподы были открыты Пастером в 1848 г. Он изучал винную кислоту и установил, что у нее имеются правые и левые формы кристаллов.

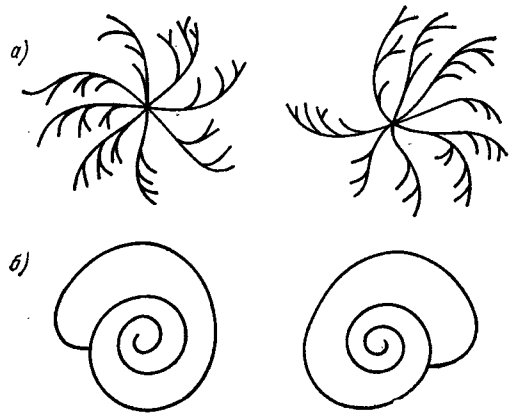


Рис. 2.9. Колонии бактерии *Bacillus mycoides* (*а*) и раковины моллюска *Fructicola lantzi* (*б*).

Сортируя кристаллы, Пастер получил чистые антиподы винной кислоты. Очевидно, что Пастер играл роль асимметрического фактора — будучи построен из хиральных веществ, человек знает разницу между правым и левым.

Асимметрия присуща не только биологическим молекулам, но и организмам в целом. На рис. 2.9, *а*, показан внешний вид колоний бактерии *Bacillus mycoides*, образующих обычно структуры, закрученные влево — против часовой стрелки. Правые штаммы весьма редки. На рис. 2.9, *б* изображены лево- и правозавитые раковины моллюска *Fructicola lantzi* из Средней Азии [24]. Опять-таки, одна форма распространена гораздо больше, чем другая.

Хиральностью могут обладать не только молекулы, но и кристаллы, построенные из симметричных молекул. Так, кварц SiO_2 кристаллизуется в правой и левой формах. Соответственно

эти кристаллы оптически активны; асимметрия утрачивается при плавлении кристалла — плавленный, стеклообразный кварц оптически не активен. В любом месторождении кварца число правых и левых кристаллов в среднем одинаково.

Выделение чистых антиподов можно осуществить методом кристаллизации. Поместив в рацемическую смесь правую или левую затравку, получим соответственно правые и левые кристаллы.

Асимметрия биологических молекул представляет значительный интерес для биологии и биофизики в трех аспектах. Во-первых, асимметрия существенным образом определяет специфичность биохимических реакций, в частности взаимодействий ферментов с различными метаболитами. Учет асимметрии необходим для понимания этих процессов (см. ниже гл. 6).

Во-вторых, наличие асимметрии открывает физике весьма ценные возможности при исследовании строения биологически функциональных веществ и их превращений методами спектрополяриметрии (см. ниже гл. 5). Физики и химики благодарны живой природе за то, что она наделила свои молекулы оптической активностью.

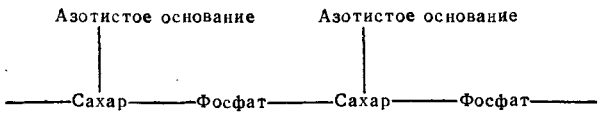
Наконец, асимметрия биосистем (вплоть до молекулярного уровня) существенна для биологии в самом широком смысле. Возникновение асимметрии и ее закрепление в биохимической и биологической эволюции во многом загадочны. Если считать, что асимметрия возникла в результате флуктуаций, то ее закрепление в ходе эволюции следует рассматривать в общем плане упорядоченности жизненных процессов. Асимметрия означает наличие определенного порядка — выделение антипода дает количество информации, составляющее 1 *бит* на молекулу.

§ 2.7. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

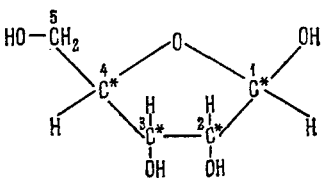
Второй важнейший тип биополимеров — нуклеиновые кислоты. Они служат обязательными участниками синтеза белков (см. ниже гл. 8 и 9). Нуклеиновые кислоты были открыты много позже, чем белки: Мишер выделил их впервые из спермы лосося в 1872 г.

Основная цепь нуклеиновой кислоты состоит из чередующихся звеньев фосфорной кислоты и сахара — *рибозы* в рибонуклеиновой кислоте (РНК) и *дезоксирибозы* в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). В этом смысле основные цепи РНК и ДНК лишены первичной структуры, они являются монотонным орнаментом, но не текстом. Однако к сахарам присоединены так называемые *азотистые основания*, которые уже не

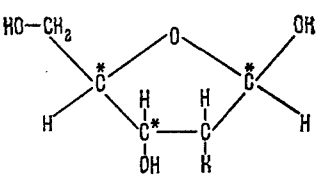
повторяют друг друга. Общая схема цепи имеет вид



Сахара́ — это углеводы, представляющие собой хиральные молекулы, принадлежащие к D-ряду. Приведем структурные формулы рибозы и дезоксирибозы

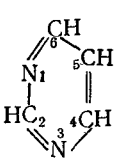


D-*рибоза*

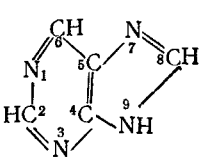


D-2-*дезоксирибоза*

Азотистые основания являются производными *пиримидина* и *пурина*, азотсодержащих гетероциклических соединений.



Пиримидин



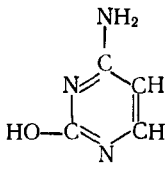
Пурин

Пиримидин и пурин обладают осно́вными свойствами — их атомы азота могут присоединять протоны, приобретая положительный заряд.

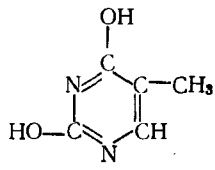
Подобно тому как в белках фигурируют 20 аминокислотных остатков, в ДНК и РНК фигурируют по 4 азотистых основания. Однако это правило менее строго — наряду с каноническими основаниями в ДНК и РНК встречаются (в меньших количествах)

минорные основания. Приведем соответствующие структурные формулы.

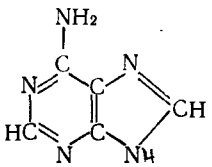
Каноничекие основания ДНК



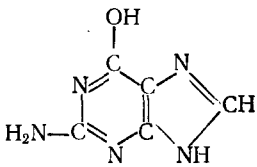
Цитозин



Тимин

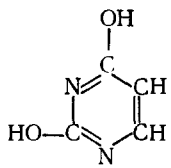


Аденин



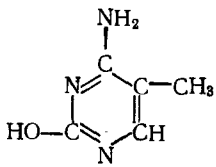
Гуанин

Цитозин (Ц) и тимин (Т) — пиримидины, аденин (А) и гуанин (Г) — пурины. В РНК фигурируют Ц, А и Г, но вместо тимина — урацил (У):

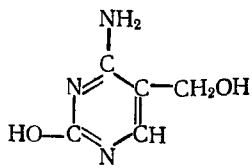


отличающийся от тимина отсутствием метильной группы.

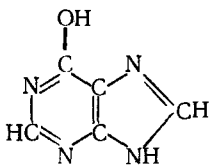
Минорные основания



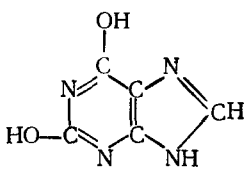
5-метилцитозин (5-МЦ)



5-оксиметилцитозин (5-ОМЦ)



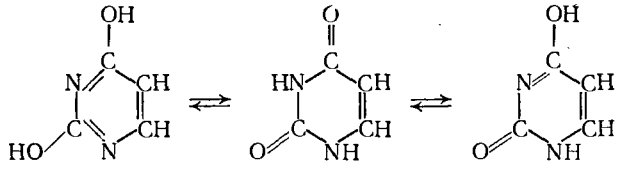
Гипоксантин (И)



Ксантин (Кс)

. Обозначение И для гипоксантина связано с тем, что соответствующий нуклеозид (см. далее) называется инозином.

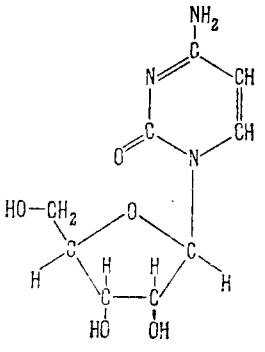
Всем приведенным азотистым основаниям свойственна *таутомерия* — они могут фигурировать в нескольких формах, таутомерах, возникающих в результате перехода атомов водорода от гидроксильной группы OH и иминной группы NH к атомам углерода и азота. Так, например, возможны следующие таутомерные переходы в У:



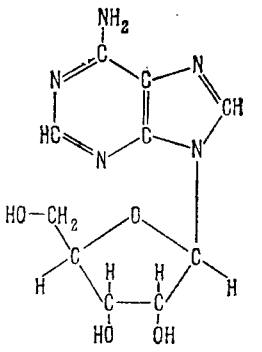
Здесь мы имеем дело с кето-енольной таутомерией (кетогруппа C=O, ен — обозначение двойной связи, ол — гидроксильной группы OH). Равновесие практически сдвинуто в сторону кетоформы.

Таутомеры находятся в динамическом равновесии, зависящем от температуры. Относительное содержание таутомера равновесной смеси определяется его свободной энергией в соответствии с распределением Больцмана. Таутомерия азотистых оснований, возможно, имеет биологическое значение.

Соединения азотистых оснований с рибозой и дезоксирибозой называются *нуклеозидами* — соответственно рибонуклеозидами и дезоксирибонуклеозидами. Азот в положении 3 пиримидина и азот в положении 9 пурина соединяются с углеродом в положении 1 сахара, образуя соответственно цитидин и аденозин



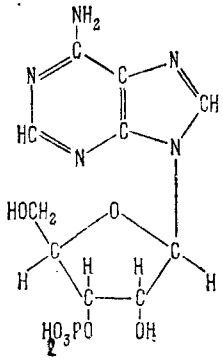
Цитидин



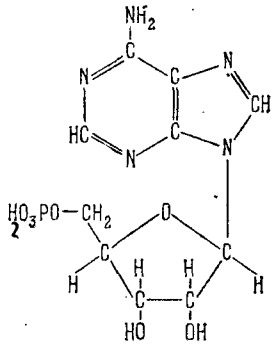
Аденозин

Аналогичные нуклеозиды Г, Т и У называются соответственно гуанозином, тимидином и уридином.

Фосфорные эфиры нуклеозидов называются *нуклеотидами* — рибонуклеотидами и дезоксирибонуклеотидами. *Этерификация* рибозы может происходить по трем гидроксилам — в 5′-, 3′- и 2′-положениях. С фосфорилированием по 2′-положению в нуклеиновых кислотах встречаться не приходится: в дезоксирибозе оно вообще невозможно. Приведем структурные формулы некоторых нуклеотидов.

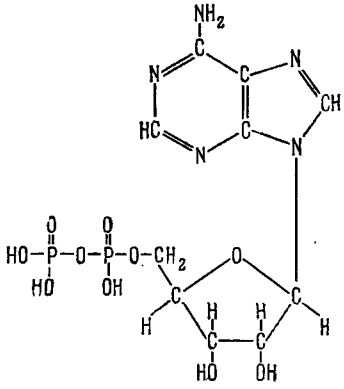


Аденозин-3′-фосфат

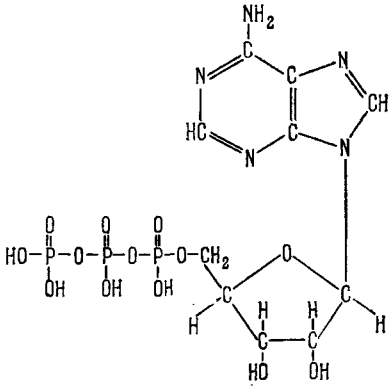


Аденозин-5′-фосфат (Аденозинмонофосфат, АМФ)

Нуклеозид-5′-фосфаты могут фосфорилироваться дальше, образуя ди- и трифосфаты:



Аденозиндифосфат (АДФ)



Аденозинтрифосфат (АТФ)

Эти мономерные соединения играют весьма важную роль в биологических процессах.

Образование нуклеиновой кислоты происходит в принципе путем поликонденсации нуклеозидтрифосфатов. При включении

в цепь каждого нуклеотида отщепляется одна молекула дифосфата — пирофосфорная кислота. Схематически этот процесс можно записать следующим образом:

$$АТФ + ЦТФ \longrightarrow АМФ - ЦТФ + H_4P_2O_7.$$

Строение цепей РНК и ДНК показано на рис. 2.10 и 2.11. Связь между звеньями цепи осуществляется фосфатной группой, расположенной между углеродами в 5′- и 3′-положениях.

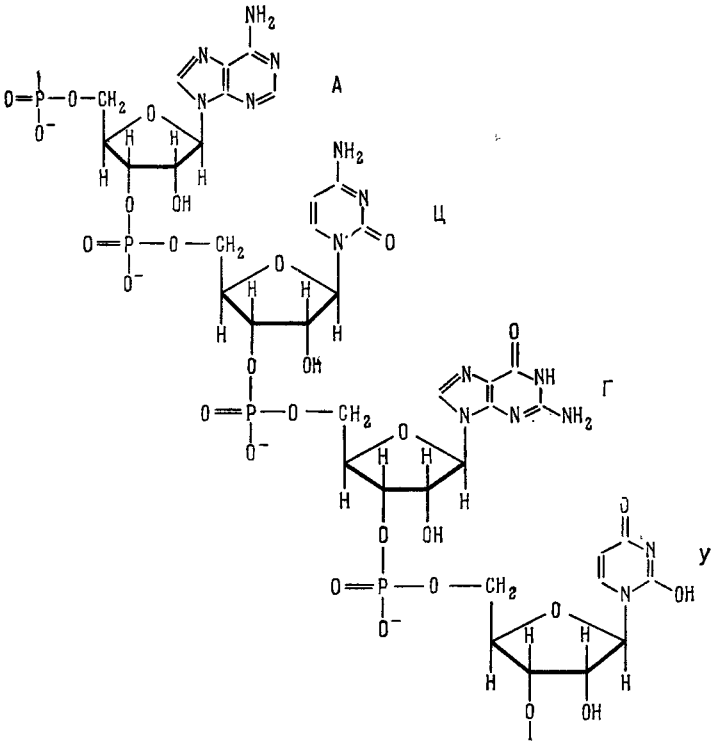


Рис. 2.10. Цепь РНК.

Нуклеиновые кислоты подобно белковым цепям представляют собой линейные, неразветвленные цепи. Они асимметричны и вращают плоскость поляризации света вправо вследствие асимметрии углеводных групп. Азотистые основания сами по себе симметричны, так как пурин и пиримидин — плоские молекулы.

Нуклеотидный состав нуклеиновой кислоты устанавливается путем гидролиза. Ферменты, расщепляющие РНК и ДНК —

рибонуклеаза (РНКаза) и дезоксирибонуклеаза (ДНКаза) соответственно. Гидролизат (смесь нуклеотидов) обычно исследуется методом хроматографии с применением спектров поглощения в ультрафиолетовой области.

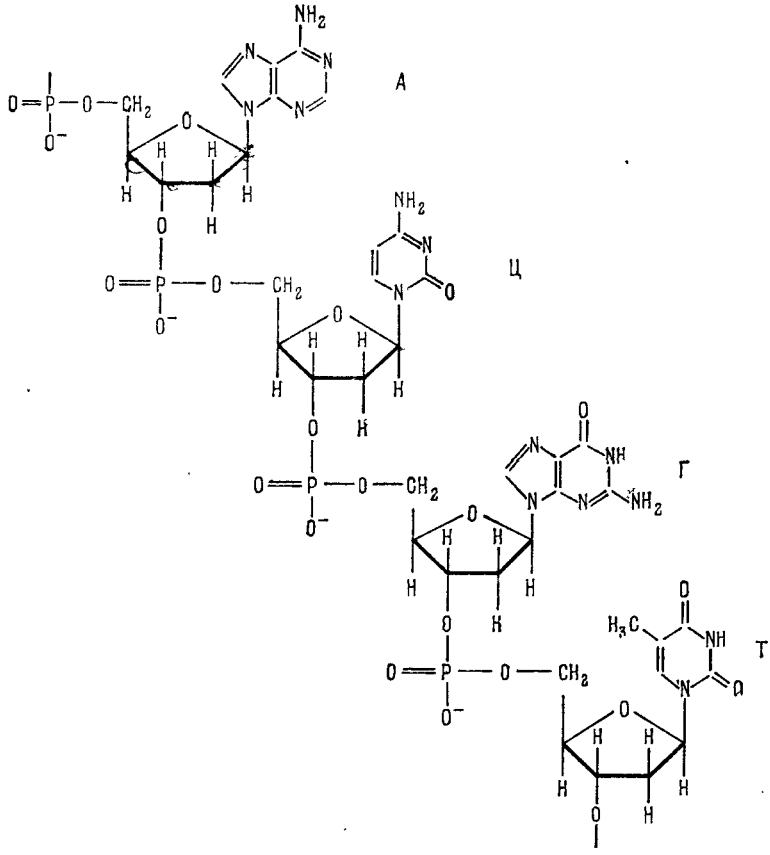


Рис. 2.11. Цепь ДНК.

Определение первичной структуры нуклеиновой кислоты представляет несравненно большие трудности, чем определение первичной структуры белка. Первичная структура нуклеиновой кислоты состоит в последовательности азотистых оснований. До сих пор не расшифрованы последовательности нуклеотидов в ДНК. Напротив, достигнуты крупные успехи в расшифровке первичной структуры сравнительно коротких цепей транспортных РНК (см. ниже гл. 9).

Современная химия располагает методами синтеза полинуклеотидных цепей (см. [25, 26]). Работа с синтетическими полинуклеотидами сыграла важную роль в молекулярной биологии (см. ниже гл. 8 и 9).

При изучении нуклеотидного состава нуклеиновых кислот Чаргафф установил важные правила: содержание аденина в ДНК всегда равно содержанию тимина, а содержание гуанина — содержанию цитозина. Следовательно,

$$\frac{А+Г}{Т+Ц} \approx 1.$$

Иными словами, количество пуриновых оснований в ДНК равно количеству пиримидиновых оснований. Вместе с тем

$$\frac{Г+Т}{А+Ц} \approx 1,$$

т. е. количество 6-NH_2-групп в основаниях ДНК равно количеству 6-C = O-групп. Табл. 2.5 показывает, с какой точностью соблюдаются эти правила*). Исключения наблюдаются лишь для некоторых фагов.

Таблица 2.5

Молярные пропорции (в %) нуклеотидов в ДНК разного происхождения

Источник ДНК	А	Г	Ц	Т	МЦ	$\frac{А+Г}{Т+Ц+МЦ}$	$\frac{Г+Т}{А+Ц+МЦ}$	$\frac{Г+Ц+МЦ}{А+Т}$
Бык, вилочковая железа	28,2	21,5	21,2	27,8	1,3	0,99	0,98	0,79
Бык, селезенка	27,9	22,7	20,8	27,3	1,3	1,02	1,00	0,81
Бык, сперма	28,7	22,2	20,7	27,2	1,3	1,03	0,98	0,79
Крыса, костный мозг	28,6	21,4	20,4	28,4	1,1	1,00	0,99	0,75
Сельдь, семенники	27,9	19,5	21,5	28,2	2,8	0,91	0,92	0,81
Paraceutrotus lividus	32,8	17,7	17,3	32,1	1,1	1,00	0,97	0,57
Пшеница, зерно	27,3	22,7	16,8	27,1	6,0	1,00	1,00	1,02
Дрожжи	31,3	18,7	17,1	32,9	—	1,00	0,95	0,55
Escherichia coli	26,0	24,9	25,2	23,9	—	1,03	0,95	1,00
Mb. tuberculosis	15,1	34,9	35,4	14,6	—	1,00	0,98	2,37
Rickettsia prowazeki	35,7	17,1	15,4	31,8	—	1,12	0,95	0,57

Однако отношение

$$\frac{Г+Ц}{А+Т} \approx \frac{Г}{А} \approx \frac{Ц}{Т},$$

*) Наличие 5-метилцитозина (МЦ) не меняет правил Чаргаффа.

которое можно назвать *фактором специфичности*, непостоянно. Белозерский и Спирин показали, что у микроорганизмов этот фактор варьирует в широких пределах — от 0,45 до 2,8 [27] (см. также [28]). У высших животных и растений фактор специфичности обычно несколько меньше единицы, Г + Ц составляют примерно 45% от общего содержания нуклеотидов.

Видовая специфичность нуклеотидного состава ДНК была детально изучена Белозерским и его школой. Специфичность выражается не только относительным содержанием Г + Ц, но и содержанием минорных оснований: 6-метиламинопурина (МАП) и 5-метилцитозина (МЦ). МЦ широко распространен у различных бактерий, в ДНК которых его содержание варьирует от 0,06 до 0,65%. В ДНК животных обычно содержится 1,3—2,0% МЦ, причем у беспозвоночных оно ниже. В ДНК высших растений содержание МЦ велико и достигает иногда 5—7% [29, 30]. Водоросли содержат типичный для микроорганизмов МАП (0,10—0,60%) и 1,0—3,5% МЦ.

Эти данные важны для классификации видов. Но, конечно, полный анализ видовой специфичности ДНК требует определения ее первичной структуры. Белозерский и его сотрудники установили ряд относящихся сюда фактов. Так, в цепи ДНК животных МЦ сосредоточен в основном в последовательностях пурин — МЦ — пурин; напротив, у бактерий таких последовательностей нет. У *E. coli* МАП фигурирует в триплетах пиримидин — МАП — пиримидин и пиримидин — МАП — пурин [29]. Коэффициент специфичности (т. е. доля Г + Ц в %) не показателен, он может совпадать у весьма далеких видов.

РНК не следует правилам Чаргаффа [27]. Отношение (Г + Ц)/(А + У) в РНК меняется в широких пределах, особенно у насекомых (от 0,7 до 1,4). Содержание Г + Ц выше у более древних отрядов насекомых, содержание А + У выше у более новых эволюционных форм. Такая же закономерность отмечена и у других групп животных. Так, у рыб (Г + Ц)/(А + У) меняется от 1,17 до 1,56 [29].

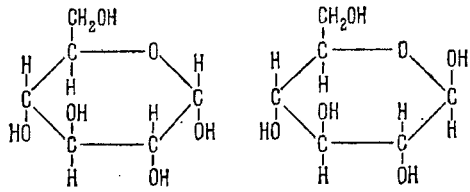
ДНК содержится в хромосомах и митохондриях клеток многоклеточных организмов и в одноклеточных, а также в бактериофагах. Молекулярные веса ДНК достигают миллиардов — это самые большие из известных сегодня молекул. РНК содержится главным образом в цитоплазме и в ядрах клеток, а также в растительных вирусах и в фагах. Существуют четыре типа РНК: высокомолекулярные РНК, рРНК (рибосомальные РНК) с молекулярным весом порядка $2 \cdot 10^6$; матричные мРНК с молекулярным весом от 30 000 до 60 000 и выше. Так как средний молекулярный вес рибонуклеотида равен 224, самые короткие цепи мРНК содержат более 150 нуклеотидов. Третий вид — транспортные тРНК с молекулярными весами порядка

20 000, содержащие около 80 нуклеотидов. И, наконец, вирусные РНК.

Более подробные сведения о химии нуклеиновых кислот и соответствующих мономеров см. в [25].

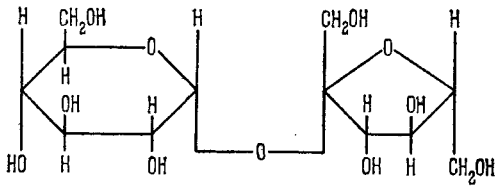
§ 2.8. УГЛЕВОДЫ И ЛИПИДЫ

Третий вид биополимеров — углеводы, *полисахариды*. Полисахаридные цепи построены из *моносахаридных* звеньев, имеющих в свободном мономерном состоянии брутто-формулу $C_6H_{12}O_6$. Важнейший для организмов животных и растений моносахарид — *глюкоза* — содержит, в отличие от рибозы, шестичленный цикл. Ее конфигурация асимметрична — это D-форма



α-D-глюкоза *β-D-глюкоза*

Каждый из пяти атомов углерода кольца является асимметрическим. Наряду с моносахаридами в клетках фигурируют *дисахариды* с общей формулой $C_{12}H_{22}O_{11}$. Приведем в качестве примера структурную формулу сахарозы (свекловичный и тростниковый сахар)



Сахароза

Сахароза состоит из двух моносахаридов — глюкозы и фруктозы. Моно- и дисахариды служат источником энергии в клетках (см. далее).

Полисахариды выполняют две основные функции. Крахмал, существующий в двух формах — амилозы и амилопектина, и гликоген являются источниками моно- и дисахаридов. Целлюлоза (в растениях), хитин (у членистоногих) служат веществами, образующими скелет, опорные, защитные структуры.

На рис. 2.12 изображена схема строения амилозы, состоящей из повторяющихся мальтозных (диглюкозных) единиц. Цепи амилопектина, в отличие от амилозы, разветвлены. Ту же роль, которую крахмал играет в растениях, в организмах животных выполняет гликоген, также построенный из глюкозных единиц, но имеющий сильно разветвленную структуру. Целлюлоза построена из повторяющихся единиц целлобиозы.

Полисахариды не несут информации, заложенной в первичной структуре. Их размеры и разветвленность варьируют в широких пределах — молекула не имеет определенной длины. Молекулярный вес амилозы из картофельного крахмала $\approx 35\,000$

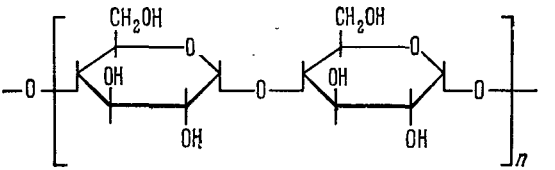


Рис. 2.12. Схема строения амилозы.

(200 остатков глюкозы), амилопектина из рисового крахмала $\sim 500\,000$ при 80—90 разветвлениях. Молекулярный вес гликогена из мышц 10^6, из печени — $5 \cdot 10^6$. Целлюлоза хлопка имеет молекулярный вес порядка 500 000.

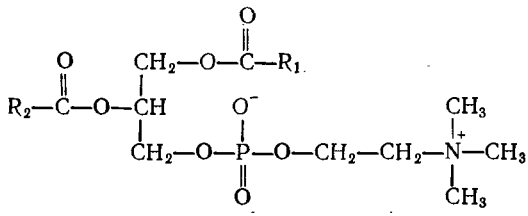
Полисахариды играют важную роль в наружных мембранах некоторых клеток, участвуют в образовании клеточных оболочек бактерий многих видов. В мембранах полисахариды находятся в комплексах с белками и липидами — жировыми веществами, неизменно присутствующими в наружных и внутренних мембранах. Мембраны образованы комплексами белков с липидами и в ряде случаев с полисахаридами.

Природные *жиры*, относящиеся к липидам, представляют собой *триглицериды жирных кислот*, т. е. их глицериновые эфиры, например триглицерид стеариновой кислоты $H_3C(CH_2)_{16}COOH$:

$$\begin{array}{l} CH_2\text{—}O\text{—}CO\text{—}(CH_2)_{16}CH_3 \\ | \\ CH\text{—}O\text{—}CO\text{—}(CH_2)_{16}CH_3 \\ | \\ CH_2\text{—}O\text{—}CO\text{—}(CH_2)_{16}CH_3 \end{array}$$

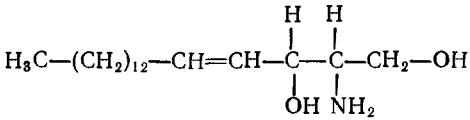
Как мы видим, эти соединения содержат длинные неполярные углеводородные остатки и сильно полярные небольшие группы O—CO—. Функциональные липиды клеток (клеточных мембран) представляют собой более сложные соединения, в состав которых могут входить и углеводные группы, и аминные,

и алкиламинные. Ряд важных соединений относится к фосфолипидам. Таковы, например, лецитины



(R_I, R_2 — углеводородные цепи).

Сфинголипиды содержат аминоспирт сфингозин



Его производным является сфингомиелин, также содержащий остаток фосфорной кислоты. Другое важное производное

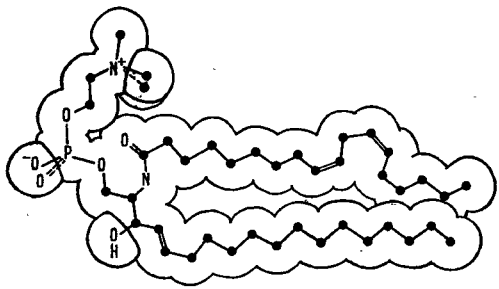
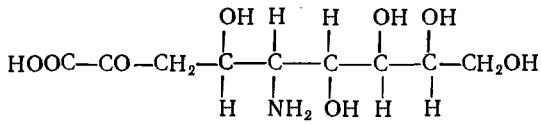


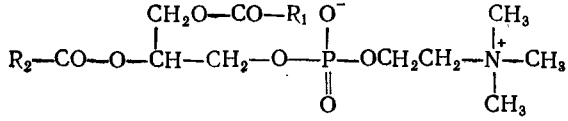
Рис. 2.13. Схема строения липида (сфингомиелина).

сфингозина, цереброзид не имеет фосфорнокислой группы, но содержит углеводное кольцо. Ганглиозиды — сложные сфинголипиды, в состав которых входят сфингозин, жирная кислота, один или несколько сахаров и нейраминовая кислота:



В ряд важных классов сложных фосфолипидов входит фосфатидиловая кислота. Сюда относятся фосфатидилхолины,

лецитины, фосфатидилэтаноламины и фосфатидилсерины. Структурная формула фосфатидилхолина имеет вид



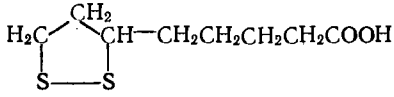
Во всех липидах, так же как и в жирах, фигурируют длинные неполярные углеводородные цепи и короткие сильно полярные группы. Типичная схема строения липида показана на рис. 2.13.

§ 2.9. КОФАКТОРЫ, ВИТАМИНЫ, ГОРМОНЫ

Белки выполняют свою важнейшую — ферментативную функцию большей частью в комплексах с низкомолекулярными кофакторами и с *простетическими группами*. Последние связаны с белком валентными связями. Кофакторы, *коферменты* слабее связаны с *апоферментом*, т. е. с белком, и способны переходить от одной молекулы белка к другой. Это, впрочем, не всегда так, и отличие кофермента от простетической группы не вполне определенно. Фермент в целом, т. е. комплекс белковой части молекулы, именуемой ферментом, с коферментом, называется *холоферментом*. Роль кофакторов в ряде случаев играют ионы металлов.

Функциональное взаимодействие биополимера белка с низкомолекулярными веществами — одна из химических основ жизненно важных процессов. Кофакторы весьма разнообразны, но и здесь мы встречаемся с несколькими главными химическими мотивами, родственными тем, которые «звучат» в белках и нуклеиновых кислотах.

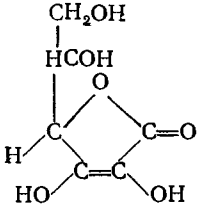
Относительно малое число изученных коферментов принадлежит к алифатическому ряду. Сюда относятся дифосфаты: D-глюкозо-1,6-дифосфат, D-маннозо-1,6-дифосфат. 1,6-дифосфат-ацил-D-глюкозамин и другие вещества, участвующие в реакциях переноса фосфатных групп. Среди важных насыщенных соединений отметим липоевую кислоту



и глутатион, представляющий собой трипептид γ-L-глутамил-2-цистеинилглицин

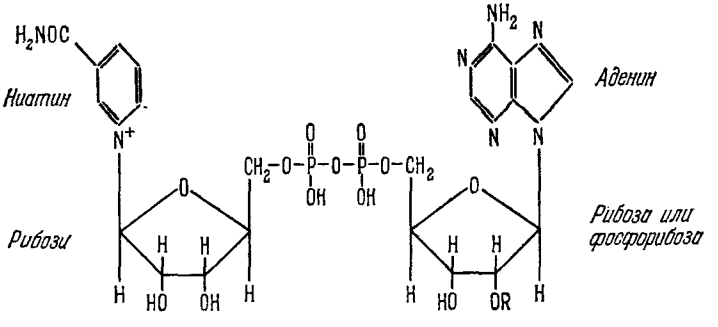
Липоевая кислота участвует в ферментативном карбоксилировании пировиноградной кислоты (см. ниже стр. 106). Глутатион служит коферментом в ряде реакций — в превращениях глиоксалей и α-оксикислоты, в *цис-транс*-изомеризации и т. д.

Необходимым участником ряда окислительно-восстановительных процессов является аскорбиновая кислота, или витамин С:



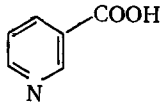
Витамины необходимы организму именно потому, что они служат коферментами или преобразуются в них. Они нужны в малых количествах, так как осуществляют каталитическую функцию.

Бóльшая часть важнейших коферментов — π-электронные сопряженные системы, содержащие гетероциклы или ароматические циклы. Как мы видели, к той же группе органических соединений относятся азотистые основания, нуклеозиды и нуклеотиды, из которых строятся цепи нуклеиновых кислот. Низкомолекулярные нуклеозиды и нуклеотиды и их производные в ряде случаев являются коферментами. Вероятно, важнейшим из них следует считать *аденозинтрифосфат* (АТФ). Сюда же относятся основные участники окислительно-восстановительных процессов — *никотинамидные коферменты* НАД и НАДФ и *флавиновые коферменты* ФАД и ФМН. Напишем структурную формулу первых двух соединений:

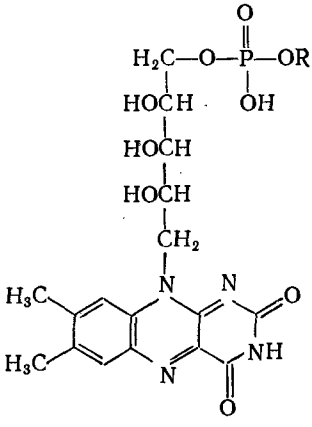


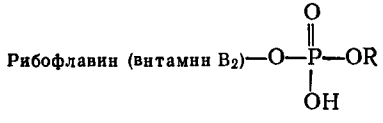
В НАД — никотинамидадениндинуклеотиде — радикалом R служит H, в НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфате —

PO_3H_2. Функциональная группа ниатин, входящая в состав НАД и НАДФ, — важный витамин, антипеллагрический фактор, представляющий собой амид никотиновой кислоты



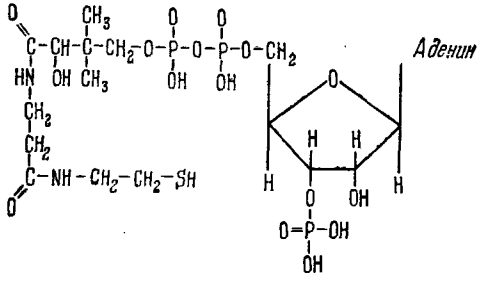
Структурные формулы флавинмононуклеотида ФМН и флавинадениндинуклеотида ФАД имеют вид



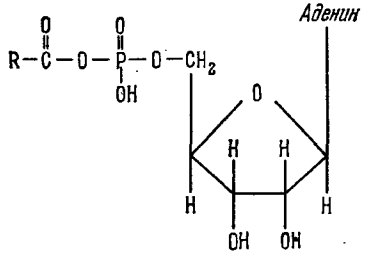


В ФМН группой R является водород, в ФАД — нуклеотид аденин. Флавиновые коферменты окрашены, они имеют желто-оранжевый цвет, так как рибофлавин, содержащий сопряженную трехкольцевую систему, поглощает свет в видимой области спектра.

Та же адениновая группа входит в состав *кофермента А* (см. стр. 105)



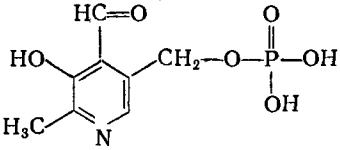
и ряда ациладенилатов



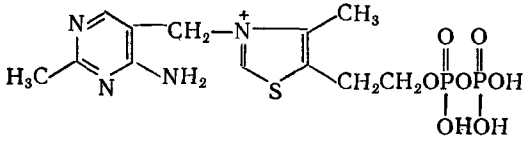
где R—C—O— — остаток одной из α-аминокислот, уксусной кислоты, β-аланина и т. д. Ациладенилаты участвуют в активировании и переносе ацильных остатков. Аденин входит в состав S-аденозилметионина и кобамидных коферментов, связанных с кобаламином или витамином B_{12} и содержащих атом кобальта в центре тетрапиррольного кольца.

Нуклеотиды фигурируют также в гуанозиндифосфатсахарах, в уридиндифосфатсахарах, аминосахарах, глюкуроновых кислотах, в цитидиндифосфатспиртах и аминоспиртах.

Другие гетероциклы являются составными частями нескольких важных коферментов. Пиридоксальфосфат (ПАЛФ)— производное пиридина — участвует в превращениях аминокислот, в реакциях трансаминирования

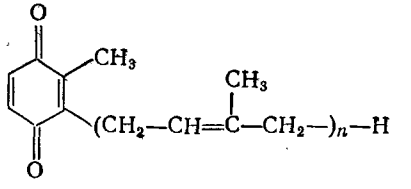


Формула тиаминпирофосфата (ТПФ) имеет вид



Тиамин (витамин B_1) необходим для жизни, его отсутствие вызывает тяжелый авитаминоз (болезнь бери-бери).

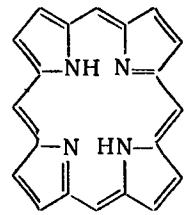
Наконец, в убихинонах (коферменты *Q*) фигурирует ароматическая, хинонная группа и углеводородные цепи различной длины



(n = от 1 до 10).

Убихиноны участвуют в окислительно-восстановительных превращениях.

Важнейшее значение для основных жизненных процессов, начиная с фотосинтеза, имеют π-электронные сопряженные системы порфириновых соединений — производные порфирина



Этот тетрапиррольный цикл фигурирует в уже упомянутых кобамидных ферментах и в кобаламине, в простетических группах ряда важнейших белков и в хлорофилле. Структура хлорофилла, ответственного за поглощение света — первичный процесс фотосинтеза, показана на рис. 2,14. Хлорофилл — координационное соединение магния, атом которого занимает центральное положение в плоском порфириновом цикле.

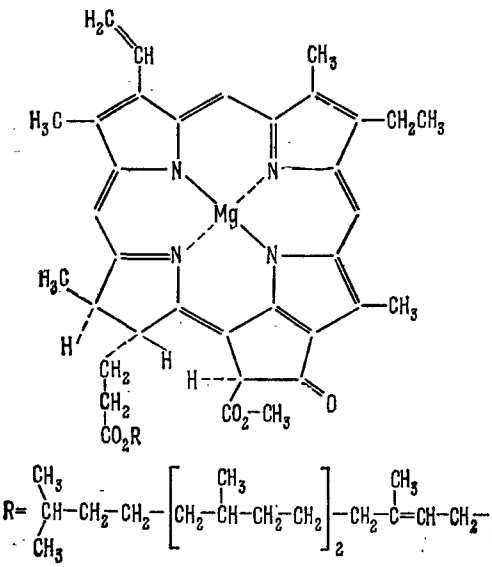


Рис. 2.14. Хлорофилл.

Порфириновые комплексы железа служат простетическими группами белков, являющихся необходимыми участниками процесса дыхания. Эти белки — *миоглобин*, в котором запасается молекулярный кислород (см. гл. 7), *гемоглобин* — переносчик молекулярного кислорода (см. гл. 7), *цитохромы* — ферменты, служащие переносчиками электронов в процессе окислительного фосфорилирования (см. § 2.10). Железопорфириновую группировку содержат также окислительно-восстановительные ферменты каталаза и пероксидазы.

В состав гемоглобина и миоглобина входит *гем* (протогем IX) — порфириновый комплекс двухвалентного железа, т. е.

ферропорфирин (рис. 2.15). В свободном состоянии гем быстро окисляется кислородом воздуха, превращаясь в гемин — комплекс трехвалентного железа, т. е. феррипорфирин. В щелочной среде феррипорфирин присоединяет к железу ион OH^- и образует гематин. Для всех этих соединений характерна способность взаимодействовать с рядом низкомолекулярных веществ (см. гл. 7). Группа гема содержится и в некоторых других важных белках, например в легоглобине — белке клубеньковых бактерий, участвующем в фиксации атмосферного азота, в эритрокруоринах — дыхательных белках беспозвоночных.

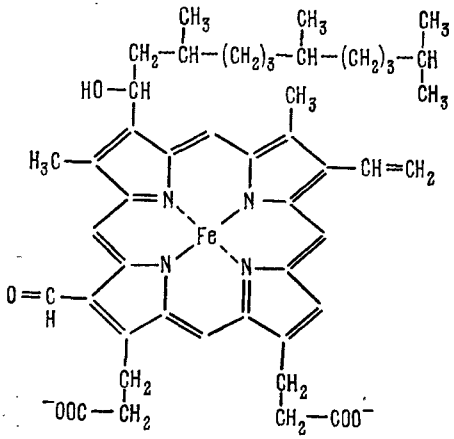


Рис. 2.15. Гем (протогем IX).

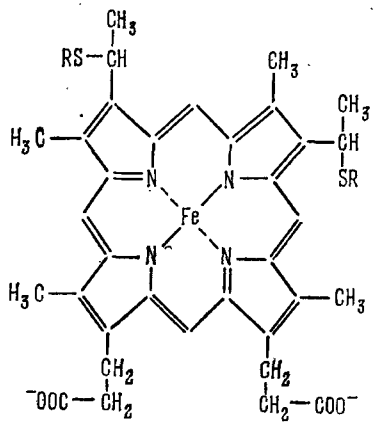


Рис. 2.16. Гем цитохрома *c* (железомезопорфирин).

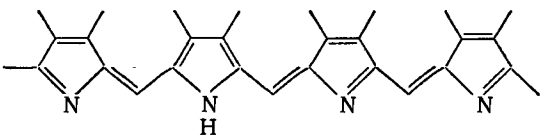
В железопорфириновых ферментах фигурируют гемы с другими боковыми группами. На рис. 2.16 изображен гем цитохрома *c* — железомезопорфирин. Классификация железопорфириновых соединений и их химические и физические свойства описаны в [31, 32].

Родственные порфиринам соединения функциональны во многих организмах. Так, в крови оболочников (асцидий) находится дипиррольный комплекс ванадия.

Порфирины в биологических системах всегда представляют собой комплексы с металлом. В связи с этим нужно подчеркнуть существенную роль ионов металлов в биологических процессах. Помимо ионов, содержащихся в организмах в больших количествах (Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}), важное значение имеют ионы металлов — кофакторы множества ферментов, прежде всего Zn^{++} и Cu^{++}. Для некоторых процессов необходим Mn^{++}, в фиксации азота участвует молибден. В кобамидных ферментах

присутствует Co^{++}. Ионы щелочных и щелочно-земельных металлов необходимы для поддержания определенной ионной силы растворов, для биологического функционирования белков и нуклеиновых кислот. С их ролью неразрывно связаны такие явления, как нервная проводимость и мышечное сокращение.

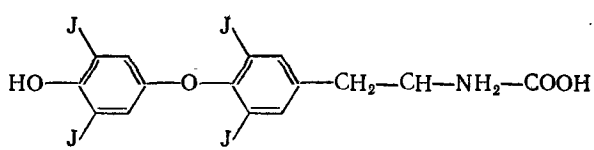
Возвращаясь к коферментам и простетическим группам, к нуклеотидам и порфиринам, мы должны отметить то, что их объединяет — биологическое значение сопряженных гетероциклических систем, содержащих преимущественно азот. В биологии мы встречаемся с производными пиридина, пиримидина и пурина, с пиррольными соединениями. К последним относятся, в частности, и желчные пигменты, основная структура которых подобна раскрытому порфириновому кольцу



Действительно, есть основания считать, что желчные пигменты образуются в результате деструкции гемоглобина. К азотсодержащим гетероциклам относятся и такие аминокислоты, как триптофан и гистидин (см. стр. 56). Многие природные соединения — алкалоиды и др. — также являются гетероциклами.

Сигнальные, регуляторные вещества в сложных организмах — *гормоны* — можно разделить на две основные группы соединений. К первой принадлежат *белковые*, полипептидные гормоны. Перечислим важнейшие из них.

Белок щитовидной железы — тиреоглобулин, содержащий иодированную аминокислоту тироксин



Инсулин (см. рис. 2.4, *Б*) — гормон, синтезируемый в островках Лангерганса поджелудочной железы и регулирующий уровень сахара в крови.

Окситоцин и вазопрессин — гормоны задней доли гипофиза. Первый из них вызывает сокращение матки, второй — повышает кровяное давление.

Меланоцитстимулирующий гормон (МСГ), вырабатываемый промежуточной долей гипофиза, вызывает увеличение пигментации, например, в коже лягушек. В сущности МСГ состоит

из двух полипептидов; у свиньи они имеют следующую структуру:

α-МСГ Ацетил — Сер — Тир — Сер — Мет — Глу — Гис — Фен — Арг — — Три — Глн — Лиз — Про — Вал.

β-МСГ Асп — Сер — Гли — Про — Тир — Лиз — Мет — Глу — Гис — — Фен — Арг — Три — Гли — Сер — Про — Про — Лиз — Асп.

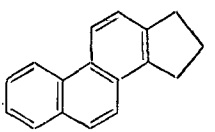
Адренокортикотропный гормон (АКТГ), или кортикотропин — гормон передней доли гипофиза, важный для борьбы с артритом. β-АКТГ свиньи имеет строение, показанное на рис. 2.4, *А*.

Другие гормоны передней доли гипофиза — тиреотропный гормон, пролактин, гормон роста (соматотропин), гонадотропин и т. д. — также являются белковыми. Поджелудочная железа вырабатывает белковый гормон глюкагон, стимулирующий превращение гликогена в глюкозу. Назовем еще брадикинин, стимулирующий сокращение гладких мышц, со структурой

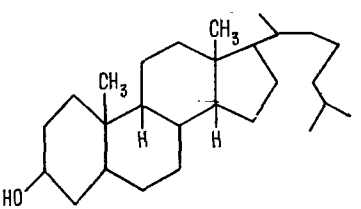
Арг — Про — Про — Гли — Фен — Сер — Про — Фен — Арг.

Этим перечень белковых гормонов далеко не исчерпывается.

Вторая группа гормонов — *стероидные* гормоны. *Стероиды* — соединения, содержащие углеродный скелет гидрированного циклопентанофенантрена



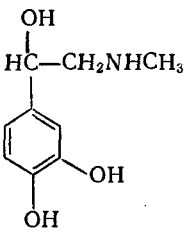
К стероидам наряду с гормонами принадлежат и такие существенные для физиологии вещества, как холестерин



и эргостерин, дающий при ультрафиолетовом облучении антирахитический фактор — витамин D_2.

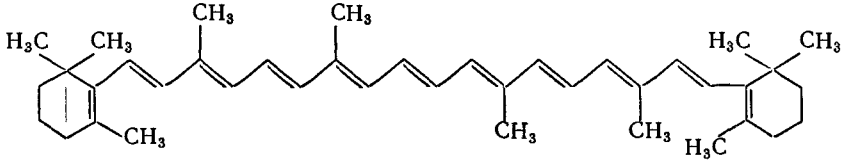
Важнейшие стероидные гормоны — половые гормоны — эстрон, прогестерон, тестостерон, андростерон и гормон коры надпочечников — кортизон. Укажем еще на гормон надпочечников, повышающий артериальное давление и стимулирующий

сердечную деятельность, — адреналин со сравнительно простой структурой

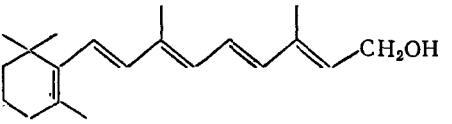


Гормональная активность определяется химической функциональностью немногочисленных атомных групп. Химические различия тестостерона и кортизона малы, но их физиологические функции совершенно различны. Структура и свойства гормонов отчетливо демонстрируют биологическое значение индивидуальных молекуляриых структур.

В заключение приведем структуру нециклической сопряженной цепи β-каротина, ответственного за красный цвет моркови:



В организме каротин в результате окисления превращается в витамин *A*, участвующий в первичном акте зрительного восприятия,



Естественно, что здесь нельзя изложить подробности, относящиеся к структуре и свойствам громадного числа природных и физиологически активных соединений. Биологическая роль многих из них весьма существенна. Витамины, гормоны, кофакторы можно объединить общим термином *биорегуляторы*. Эти вещества регулируют биохимические процессы в клетке и в организме. Подробные сведения о биорегуляторах приведены в современных курсах биохимии, например в [33].

§ 2.10. ВАЖНЕЙШИЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Основные биохимические процессы, определяющие функционирование клетки, организма как открытых систем, — это прежде всего биоэнергетические процессы. Свободная энергия, необходимая для работы клетки, т. е. для биосинтеза биополимеров

и функциональных малых молекул, для деления клетки, для механического движения клетки и ее органоидов, для активного транспорта и т. д. — химическая энергия. Ее источником служит в конечном счете солнечный свет. Энергия квантов света трансформируется в химическую в процессе фотосинтеза в зеленых растениях. Химическая энергия запасается в молекулах АТФ (см. стр. 95), являющихся универсальными аккумуляторами энергии для подавляющего большинства биологических процессов. Структурная формула АТФ приведена на стр. 86. Две из трех фосфатных связей — *макроэргические связи*; при их гидролитическом расщеплении выделяется свободная энергия порядка 10 *ккал/моль*. В процессе фотосинтеза АТФ образуется из АДФ и неорганического фосфата. Это превращение требует донора электронов, а также протонов, отдаваемых водой. Одновременно с «зарядкой аккумулятора», с образованием АТФ, происходит восстановление одного из переносчиков электронов НАДФ до НАДФ-Н. Химическая энергия, запасенная в АТФ, используется в растениях для синтеза углеводов из CO_2 и H_2O, для которого, кроме источника энергии, требуется еще и восстанавливающий агент НАДФ-Н. В присутствии АТФ и НАДФ-Н синтез углевода осуществим и в отсутствие света.

Суммарную реакцию фотосинтетического образования углевода можно записать в виде

$$n\mathrm{CO_2} + n\mathrm{H_2O} + \hbar\omega \longrightarrow (\mathrm{CH_2O})_n + n\mathrm{O_2} + n \cdot 112 \text{ ккал/моль}.$$

При образовании глюкозы $n = 6$. Процесс этот весьма эффективен — до 75% энергии света, попадающего на молекулу хлорофилла, превращается в химическую энергию.

Энергия световых квантов $\hbar\omega$ прежде всего превращается в энергию АТФ. Далее происходит вторичный процесс образования углевода, в молекуле которого также запасена химическая энергия. Эта энергия извлекается в процессе дыхания и вновь трансформируется в энергию АТФ.

Дыхание необходимо как *автотрофным* (главным образом фотосинтезирующим), так и *гетеротрофным* (т. е. питающимся автотрофами и друг другом) организмам. *Дыхание* в биохимическом смысле сводится к окислению углеводов. При окислении глюкозы выделяется большое количество энергии

$$\mathrm{C_6H_{12}O_6} + 6\mathrm{O_2} \longrightarrow 6\mathrm{CO_2} + 6\mathrm{H_2O} + 690 \text{ ккал/моль}.$$

Первая фаза окисления углевода называется *гликолизом*. В этой фазе глюкоза расщепляется в конце концов на две молекулы молочной кислоты (лактата). Установлено не менее 11 стадий

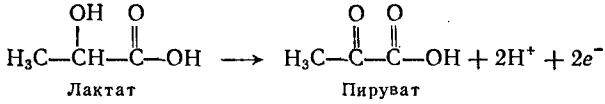
гликолиза, требующих не менее 11 специальных ферментов. Суммарно первую фазу этой реакции можно представить в виде

$$C_6H_{12}O_6 + 2Ф_н + 2АДФ \longrightarrow 2H_3C \cdot CH(OH) \cdot COOH + 2АТФ$$

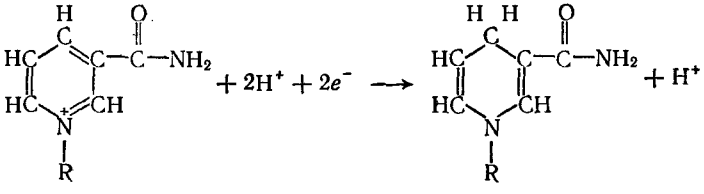
($Ф_н$ — неорганический фосфат). Значит, при образовании двух молекул лактата из молекулы глюкозы происходит *фосфорилирование* — из двух молекул АДФ и фосфата образуются две молекулы АТФ. При этом идет восстановление НАД до НАД-Н и обратный процесс окисления НАД-Н до НАД. Термодинамический баланс процесса сводится к выделению 56 *ккал/моль* и запасанию 20 *ккал* в двух молях АТФ.

После расщепления глюкозы до молочной кислоты бóльшая часть оставшейся в ней энергии извлекается во второй фазе процесса — в окислении лактата до CO_2 и H_2O кислородом воздуха. Первая фаза гликолиз — *анаэробное* (т. е. протекающее без участия кислорода) превращение глюкозы, вторая фаза — *аэробное* превращение, т. е. собственно окисление.

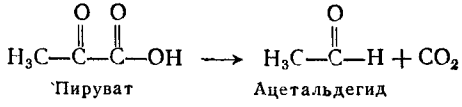
Молочная кислота окисляется до пировиноградной (пирувата):



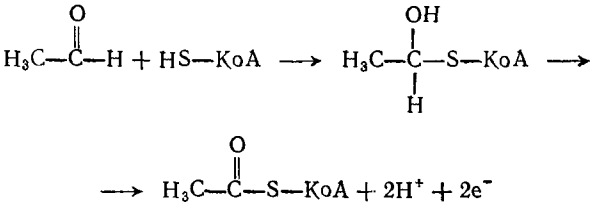
Этот процесс катализируется ферментом лактатдегидрогеназой (ЛДГ), работающим с участием кофермента НАД. Функциональная группа НАД — ниатин (см. стр. 96) — способна принимать два протона и два электрона от лактата. При этом НАД восстанавливается до НАД-Н и освобождается один протон:



Пируват далее подвергается декарбоксилированию, т. е. теряет молекулу CO_2:



Ацетальдегид взаимодействует со сложной молекулой кофермента А (стр. 96), обозначаемой КоА—SH,



Ацетилкофермент А

и в таком виде вступает в цикл превращений, называемый *циклом трикарбоновых кислот* или *циклом Кребса* по имени биохимика, расшифровавшего эту сложную последовательность превращений (рис. 2.17). Цикл состоит из цепи реакций, начинающейся с образования лимонной кислоты из уксусной и щавелевоуксусной (оксалоацетат) кислот. Путем ряда дегидрирований и декарбоксилирований цитрат теряет два атома углерода в виде CO_2 и вновь образует щавелевоуксусную кислоту. Начинается новый оборот цикла.

На стадии образования ацетил-КоА в процесс метаболизма, наряду с углеводами (гексозами), вступают продукты гидролитического расщепления белков и жиров — аминокислоты, жирные кислоты, глицерин. Это представлено схематически в табл. 2.6 [35].

Как же происходит выделение энергии в этих метаболических процессах? Электроны, удаляемые на разных стадиях цикла Кребса, а также на двух предшествующих ему стадиях (образование лактата и пирувата), передаются по дыхательной цепи переносчиков. В эту цепь входит сложный комплекс ферментов и коферментов, а именно НАД, фермент из группы флавопротеидов (ФП) и ряд железосодержащих ферментов — цитохромы *b*, *c*, *a*, a_3. Электроны, проходя по цепи, передают свою энергию молекулам АТФ — происходит *окислительное фосфорилирование*. Открытие этого важнейшего явления связано с именами Энгельгардта [36] и Белицера [37, 38]. В конечном счете электроны переносятся на кислород, восстанавливаемый до воды.

При фотосинтезе кислород образуется из воды. Превращения питательных веществ при дыхании сводятся к переносу электронов на кислород и к его восстановлению в воду. Таким образом, два эти процесса обратны друг другу.

Дыхание, фотосинтез являются точно согласованными многостадийными процессами, требующими участия ряда ферментов. В обоих случаях необходима определенная структурная организация ферментных систем — такие процессы строго локализова-

ии в специализированных органоидах клеток. Фотосинтез осуществляется в *хлоропластах*, дыхание — в *митохондриях*.

Окисление глюкозы происходит и помимо циклов Кребса (цикла трикарбоновых кислот) в так называемом *пентозном цикле*.

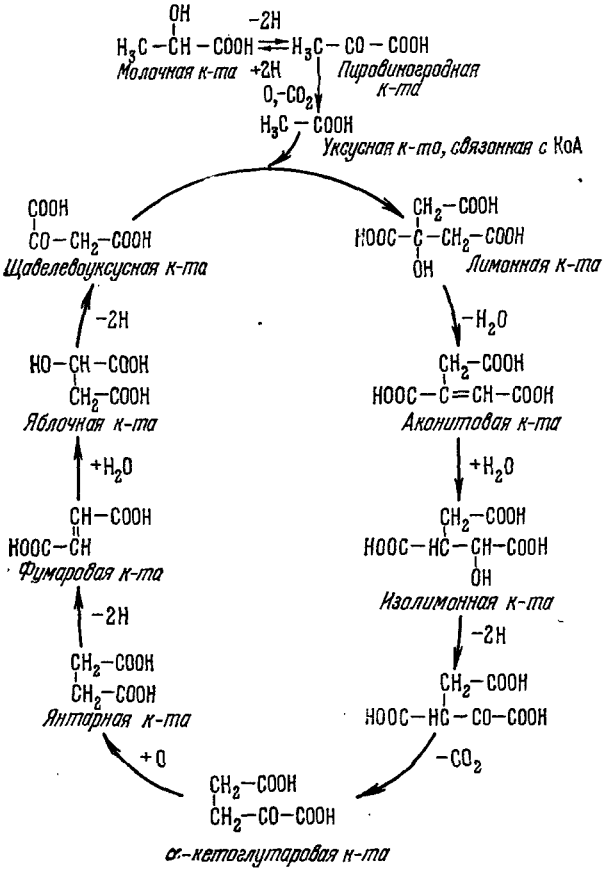


Рис. 2.17. Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса).

Этот процесс уже не сопровождается фосфорилированием АДФ, но также служит источником энергии.

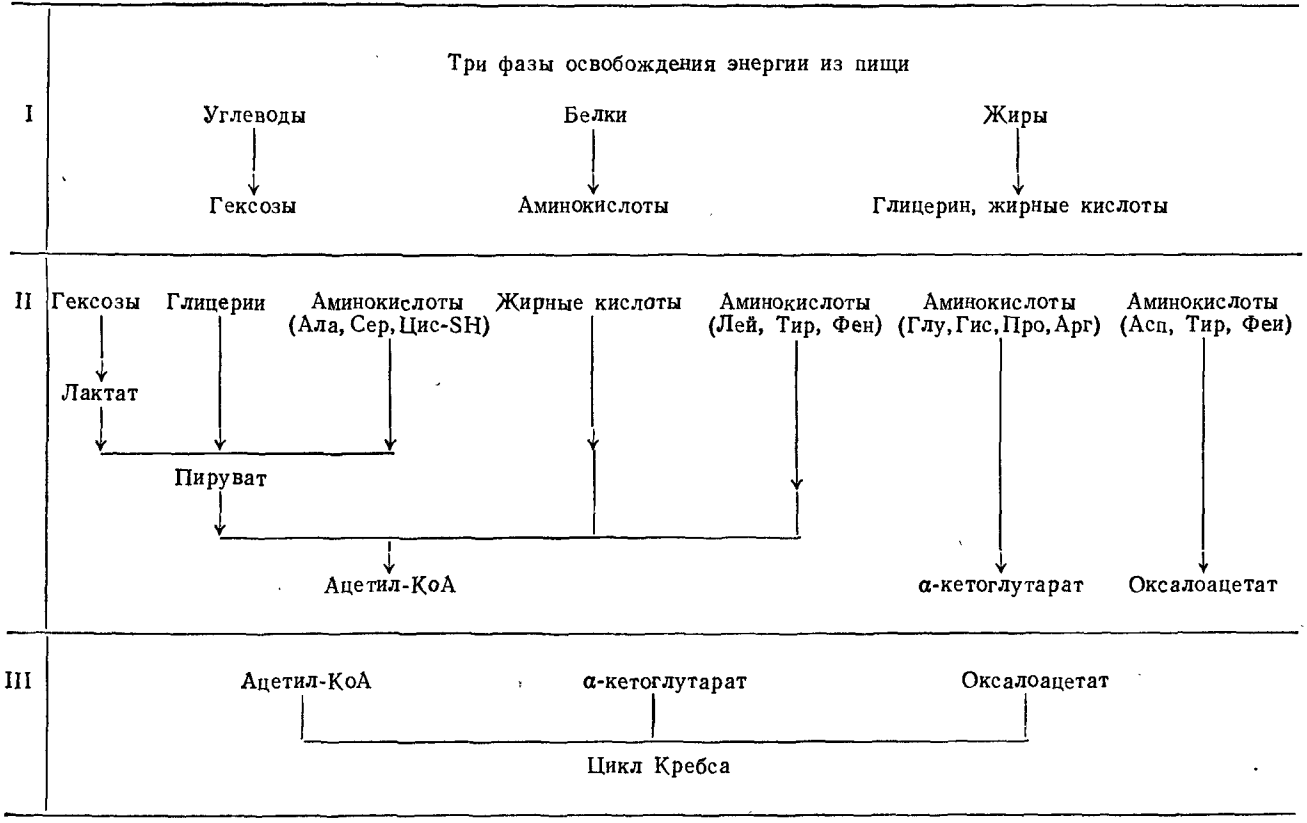
Глюкоза фосфорилируется АТФ:

$$\text{Глюкоза} + \text{АТФ} \longrightarrow \text{Глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ}$$

и глюкозо-6-фосфат вступает в цепь превращений с участием НАДФ. Суммарный процесс можно записать в виде

$$6\ \text{Глюкозо-6-фосфат} + 12\ \text{НАДФ} \longrightarrow$$
$$\longrightarrow 6\ CO_2 + 6H_2O + 12\ \text{НАДФ-Н} + 5\ \text{глюкозо-6-фосфат}.$$

Таблица 2.6


Три фазы освобождения энергии из пищи
I
Углеводы
Гексозы
Белки
Аминокислоты
Жиры
Глицерин, жирные кислоты
II
Гексозы
Лактат
Глицерин
Аминокислоты (Ала, Сер, Цис-SH)
Пируват
Жирные кислоты
Аминокислоты (Лей, Тир, Фен)
Ацетил-КоА
Аминокислоты (Глу, Гис, Про, Арг)
α-кетоглутарат
Аминокислоты (Асп, Тир, Феи)
Оксалоацетат
III
Ацетил-КоА
α-кетоглутарат
Оксалоацетат
Цикл Кребса

НАДФ-Н, равно как и НАД-Н, наряду с АТФ, — общие для всех клеток первичные аккумуляторы и переносчики химической энергии. Еще один вид такого переносчика, функционирующий в клетках растений и фотосинтезирующих бактерий — ферредоксин. Этот железосодержащий белок обладает высокой восстановительной способностью, т. е. имеет высокий отрицательный окислительно-восстановительный потенциал. Он также участвует в восстановлении НАДФ до НАДФ-Н.

Синтетические процессы в клетках — синтез белков, нуклеиновых кислот, пуринов, пиримидинов, липидов, сахаров и др. представляют собой, как правило, *эндергонические* процессы, т. е. процессы, требующие затраты свободной энергии. Биосинтез осуществляется в открытой термодинамической системе — клетке в результате сопряжения с *экзергоническими* процессами гидролиза АТФ и окисления НАД-Н, НАДФ-Н и ферредоксина, в ходе которых освобождается энергия. В конечном счете восстановленные коферменты также возникают за счет АТФ — наиболее универсального аккумулятора энергии (глюкоза фосфорилируется АТФ). Основные биосинтетические реакции идут с участием ферментов киназ или синтетаз.

Химическая энергия в клетке используется не только для химических реакций. Одновременно реализуется сложная совокупность физико-химических процессов, в которых химическая энергия трансформируется в механическую, осмотическую, электрическую работу и в световую энергию (биолюминесценция). Исследование физической сущности этих процессов превращения энергии — одна из главных задач биофизики. Подробные и во многом исчерпывающие сведения о биохимических реакциях, сопровождающихся запасением и расходованием химической энергии, приведены в [33, 39—44].

§ 2.11. КВАНТОВАЯ БИОХИМИЯ

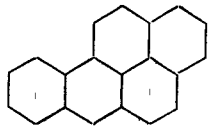
Химические и физические свойства атомов и молекул определяются строением их электронных оболочек, взаимодействующих с атомными ядрами. В основе химии и, тем самым, биохимии и биологии лежит квантовая механика. Общая теория строения и свойств молекул называется квантовой химией, соответственно область квантовомеханических исследований строения и свойств биологически функциональных молекул именуется квантовой биохимией.

Обладают ли такие молекулы и, прежде всего, биополимеры специальными электронными свойствами, отличающими их от любых других молекул и ответственными за их биологическое значение?

В современной биофизике имеется направление, представители которого ищут объяснение биологических явлений, реали-

зующихся на молекулярном уровне, в специфических электронных свойствах биополимеров. Сцент-Дьёрдьи [45], а вслед за ним многие другие исходят из наличия мнграции электронов в белках. Предполагается, что этим явлением определяются многие биологические процессы, в частности мышечное сокращение [46—48]. В ряде работ проводилось теоретическое рассмотрение гигантских молекул биополимеров как полупроводников [49], антиферромагнетиков [50] и даже сверхпроводников.

А. Пюльман и Б. Пюльман утверждают, что «большинство соединений, играющих доминирующую роль в биохимии и представляющих собой главные активные центры, ответственные за процессы жизнедеятельности, состоят из сопряженных структур, богатых π-электронами» [51]. Такие структуры, содержащие чередующиеся единичные и двойные связи, характеризуемые большой подвижностью π-электронов, могут обладать особыми свойствами. Те же авторы предприняли, например, попытки объяснить действие канцерогенных веществ, в частности бенз-3,4-пирена



специфическим распределением π-электронов в этих молекулах [51—53].

Насколько основательны подобные утверждения? Прежде всего, имеется ли в биополимерах обобществление электронов, создающее особые электронные свойства макромолекулы в целом?

При регулярном расположении атомов в цепочке или в кристалле электронные энергетические уровни образуют зоны, заполненные электронами в соответствии с принципом Паули. У проводников (металлов) свободная зона, *зона проводимости*, непосредственно примыкает к заполненной. У диэлектриков разность энергий заполненной и свободной зон весьма велика. Электронные полупроводники занимают промежуточное положение, у них расстояние между зонами имеет величину порядка тепловой энергии kT, и, следовательно, нагревание может сообщать полупроводнику электронную проводимость. Ее зависимость от температуры выражается формулой

$$\sigma = \sigma_0 \exp(-\Delta E/2kT), \qquad (2{,}35)$$

где ΔE — разность энергий зон. Следовательно, вопрос о полупроводимости белка сводится к величине ΔE.

Эванс и Гергели [54] провели расчеты энергетических зон белков (полипептидов) в регулярной β-форме (см. § 4.2), рассматривая такую систему как сопряженную посредством водородных

связей (см. далее § 4.4). Расчеты выполнялись методом молекулярных орбит — ЛКАО (линейные комбинации атомных орбит). Они получили значения ΔE, варьирующие от 3 до 4,8 *эв* (т. е. 7—11 *ккал/моль*) и во много раз превосходящие те, которые свойственны истинным полупроводникам. Более точные расчеты дали значения 5 *эв* и выше [51]. Таким образом, белки — диэлектрики, а не полупроводники. В полипептидных цепях нет сопряжения связей, нет делокализации электронов по всей цепи. π-электроны частично делокализованы лишь в пределах одной пептидной группы —NH—CO—. Каждая такая группа отделена от соседних изолирующими группами —CHR—. Свидетельством отсутствия сопряжения и соответственно полупроводимости у белков является отсутствие в их спектрах полос поглощения в видимой и близкой ультрафиолетовой областях.

Экспериментальные исследования обнаружили у ряда белков малую электропроводность, зависящую от температуры согласно формуле (2,35), причем $\Delta E \approx 2$—3 *эв* (см. [51, 55]). Эта электропроводность существенно зависит от степени гидратации белка. Можно думать, что она определяется примесями, в частности ионными, и не имеет биологического значения.

Сахаро-фосфатная цепь нуклеиновой кислоты также не является сопряженной, и нуклеиновые кислоты — диэлектрики. Ферромагнитные свойства, наблюдавшиеся методом электронного парамагнитного резонанса, оказались связанными с примесями железосодержащих соединений, от которых очень трудно избавиться.

Таким образом, цитированное утверждение Пюльманов не относится к белкам и нуклеиновым кислотам. Их биологическая функциональность, определяемая, конечно, химическим строением, не связана с обобществлением π-электронов. Действие белков (прежде всего ферментативное) основано на том, что при химическом воздействии на биополимер происходит его конформационная перестройка (см. далее). Актуальная задача квантовой биохимии состоит в изучении электронно-конформационных взаимодействий (ЭКВ) (см. [56, 57], и стр. 146, 408). Биорегуляторы же действительно представляют собой большей частью π-электронные системы. Их регуляторное воздействие на белки как раз и определяется ЭКВ [56, 58].

Делокализация электронов в биополимерах возникает при возбуждении, вызванном поглощением света или коротковолновой радиации. Миграция энергии и электронов проявляется в оптических и биологических свойствах биополимеров. Однако в отсутствие излучения, в темновой биологии эти эффекты не возникают [59, 60].

Современная квантовая биохимия пока ограничивается статическими задачами и почти не рассматривает наиболее инте-

ресные и важные (но и наиболее сложные) проблемы биохимической динамики, в частности ЭКВ. Методами квантовой химии проведены расчеты электронных структур важнейших классов биологических молекул. А. Пюльман и Б. Пюльман [51—53] применили наиболее простой и грубый метод квантовой химии — ЛКАО МО, позволяющий получать приближенные оценки энергии делокализации электронов, распределения зарядов на атомах, порядков связей (степеней участия π-электронов в связях),

Рис. 2.18. Электроиные характеристики, полученные методом ЛКАО МО и связанные с ними свойства.

индексов свободных валентностей (характеристик степени ненасыщенности атома). На рис. 2.18 схематически представлены электронные характеристики, получаемые методом ЛКАО МО, и связанные с ними свойства [52].

Метод ЛКАО МО дает полуколичественные оценки указанных величин, с помощью которых удается разобраться в обширной совокупности химических и оптических явлений (см. [61—64]). Более строгие методы квантовой химии (см. [65]) пока еще мало применялись в биологии.

Рассмотрим некоторые результаты, полученные в квантовомеханических расчетах биологических молекул.

На рис. 2.19 указаны электронные характеристики азотистых оснований нуклеиновых кислот [51]. Пунктиром отмечены водородные связи (см. ниже § 4.4). Рис. 2.20 иллюстрирует основные химические и физико-химические характеристики этих соединений, полученные в квантовомеханических расчетах [51]. Расчеты показывают, что наибольшая стабилизация посредством энергии

резонанса присуща аденину, за ним следует гуанин. Возможно, что это объясняет бо́льшую устойчивость к действию радиации у пуринов, чем у пиримидинов. Наиболее высокие заполненные молекулярные орбиты характерны опять-таки для пуринов, что объясняет их электроно-донорные свойства, способность образовывать комплексы с переносом заряда с рядом акцепторов. Наиболее осно́вным атомом азота в кольце является N_7 у гуанина,

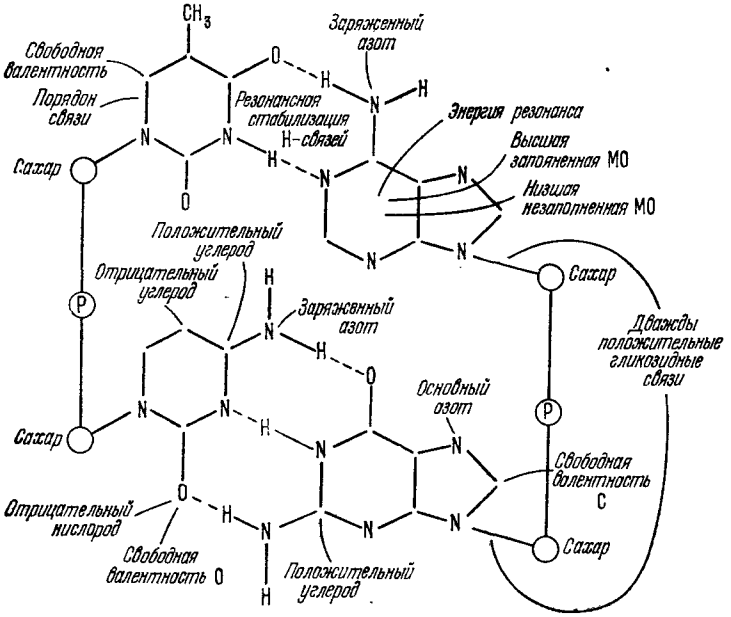


Рис. 2.19. Электронные характеристики азотистых оснований нуклеиновых кислот.

N_1 у аденина. Вне кольца наименее электроположительна группа NH_2 аденина, затем цитозина. Наиболее электроотрицателен атом кислорода в цитозине. Наиболее высок порядок связи C_5—C_6 тимина, затем C_5—C_6 цитозина.

Квантовая химия дала объяснение макроэргическим свойствам фосфатов, прежде всего АТФ. Выяснилось, что большая свободная энергия, освобождаемая при гидролизе первой и второй фосфатной связи, слагается из ряда вкладов. Во-первых, сумма энергий резонанса фрагментов гидролиза АТФ превышает энергию резонанса самого АТФ. Во-вторых, в АТФ велика энергия электростатического отталкивания — она больше, чем в продуктах его гидролиза. Это определяется своеобразным распреде-

лением зарядов в пирофосфатной цепи АТФ, показанном на рис. 2.21. У других макроэргических соединений, таких, как фосфоенолпируват, в общем балансе энергии существенна энергия кетоенольной таутомерии продуктов гидролиза. Наконец, у карбоксилфосфатов вклад в общую энергию дает и свободная энергия продуктов ионизации. Значения этих вкладов приведены в табл. 2.7 [52].

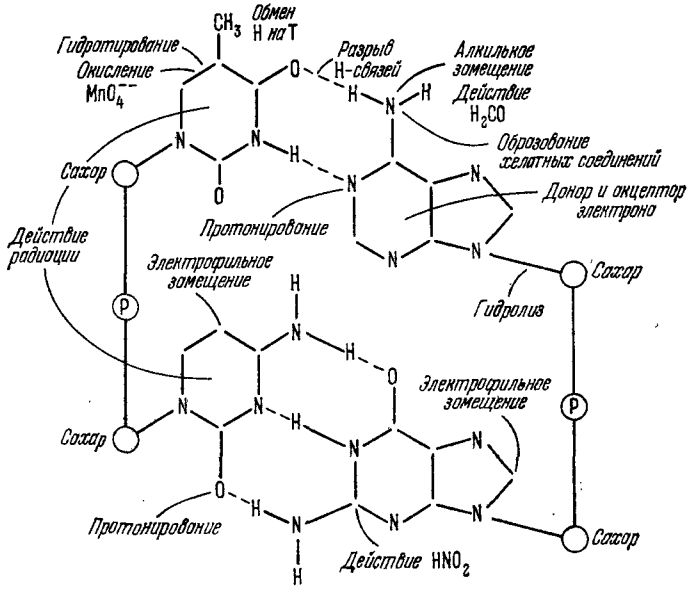


Рис. 2.20. Физико-химические свойства азотистых оснований нуклеиновых кислот.

Метод ЛКАО МО особенно удобен для расчета свойств π-электронных систем. В белках таковыми являются ароматические аминокислотные остатки Фен, Гис и Три. Их электронная структура была подробно исследована, причем были рассчитаны электроно-донорные и электроно-акцепторные свойства. Расчеты показали, что эти остатки служат скорее донорами, чем акцепторами электронов [51, 52]. Полученные результаты полезны для интерпретации ряда свойств белков, в частности их ферментативной активности.

Как уже было сказано, утверждение о специальной роли π-электронных систем в биологии справедливо для ряда низкомолекулярных соединений, функционирующих во взаимодействиях с белками. Таковы порфирины, хиноны, каротиноиды,

практически все коферменты, участвующие в реакциях с переносом электронов или водорода и с переносом других химических групп. Расчеты электронной структуры этих соединений [51, 52] дали результаты, весьма важные для понимания их функциональности.

Квантовая биохимия, понимаемая как квантовомеханическая теория поведения молекул в биохимических реакциях, является

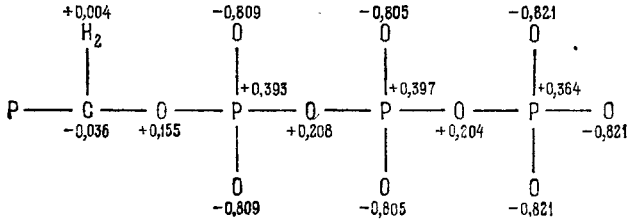


Рис. 2.21. Распределение зарядов в трифосфате.

неотъемлемой частью биохимии. Так, исследования канцерогенов, проведенные А. Пюльман и Б. Пюльманом [51, 52], раскрывают электронные свойства этих соединений. Остается открытым вопрос о возможности объяснения такого сложного явления, как канцерогенез, взаимодействием канцерогенов с нуклеиновыми кислотами. К несчастью, механизмы канцерогенеза еще загадочны и биологические знания здесь еще далеко не достаточны для четкой формулировки физической задачи.

Таблица 2.7

«Энергетнческнй запас» фосфатов (в *ккал/моль*)

Соединение	Экспериментальные значения	Основная энергия гидролизата	Разность энергий резонанса	Энергия электростатического отталкивания	Свободная энергия ионизации	Энергия кетоенольной таутомерии	Сумма
АТФ	7—8	3	2,6	2			7,6
АДФ	7—8	3	2,6	1,4			7
Карбоксилфосфаты	10—12	3	4,6	—0,7		3,2	10,1
Фосфоенолпируват	11,5—12,5	3	1	—0,5	9		12,5
Гаунидиифосфаты	9—10	3	1,2	—0,7		?	?

Квантовая механика дает истолкование структур биологически функциональных молекул и их изменений в химических реакциях, при конформационных перестройках в явлениях мутаге-

неза. Прямое исследование электронных процессов, их квантово-механическая теория необходимы для понимания фотобиологических процессов, в частности фотосинтеза. Идеи современной квантовой теории твердых тел оказываются здесь ведущими.

Весьма актуальны проблемы электронно-конформационных взаимодействий (ЭКВ), решаемые методами квантовой механики [56, 57]. ЭКВ лежат в основе действия ферментов (см. гл. 6). В связи с этим особый интерес представляют ферменты, содержащие в качестве кофакторов атомы переходных металлов. Их теоретическое исследование должно основываться на квантовой химии координационных соединений. Речь идет о *бионеорганической химии.*

Наконец, квантовая механика служит теоретической основой оптических и спектроскопических исследований, имеющих важнейшее значение в молекулярной биофизике (см. гл. 5).

Методы квантовой химии описаны в ряде монографий, в частности в [62—65].

Литература

1. Сборник «Основы молекулярной биологии, Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров», «Наука», 1966.
2. *Ф. Гауровиц*, Химия и функция белков, «Мир», 1965.
3. *Р. Робинсон, Р. Стокс*, Растворы электролитов, ИЛ, 1963.
4. *L. Pauling, R. Corey*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **37**, 235, 241, 282 (1951).
5. *М. С. Цвет*, Избранные работы, Изд-во АН СССР, 1946.
6. *Г. В. Самсонов*, Хроматография, Медгиз, 1955.
7. *Г. В. Самсонов*, Сорбция и хроматография антибиотиков, Изд-во АН СССР, 1960.
8. Сборник «Хроматография», ИЛ, 1949.
9. *G. Ackers*, Adv. Protein Chem., **24**, 343 (1970).
10. *Д. Бэйли*, Методы химии белков, «Мир», 1965.
11. *C. Hirs, W. Stein, S. Moore*, J. Biol. Chem. **211**, 941 (1954).
12. *F. Sanger*, Biochem. J. **44**, 126 (1949).
13. *M. Dayhoff, R. Eck*, Atlas of Protein Sequence and Structure 1967—1968. Nat. Biomed. Res. Foundation, Silver Spring, 1968.
14. *М. Ичас*, в сб. «Теория информации в биологии», ИЛ, 1960.
15. *E. Margoliash, A. Scheiter*, Adv. Protein Chem. **21**, 113 (1966).
16. *C. Nolan, E. Margoliash*, Ann. Rev. Biochem. **37**, 727 (1968).
17. *L. Pauling* a. o., Science **110**, 543 (1949).
18. *V. Ingram*, Nature **180**, 326 (1957); The Hemoglobins in Genetics and Evolution, Columbia Univ. Press, 1963.
19. *В. Ингрэм*, Биосинтез макромолекул, «Мир», 1966.
20. *И. Фрутон*, в сб. «Химия белка», т. 2, ИЛ, 1952.
21. *R. Merrifield*, Sci. American, March 56 (1968).
22. *М. Владимиров*, Химия и жизнь № 3, 50; № 4, 39 (1966).
23. *Г. Ф. Гаузе*, Асимметрия протоплазмы, изд. АН СССР, 1940.
24. *В. В. Алпатов*, Природа № 4, 49 (1947).
25. *Д. Дэвидсон*, Биохимия нуклеиновых кислот, «Мир», 1968.
26. *Г. Корана*, в сб. «Нуклеиновые кислоты», ИЛ, 1962.
27. *А. Н. Белозерский, А. С. Спирин*, в сб. «Нуклеиновые кислоты», ИЛ, 1962.

28. *Ki Jong Lee, K. Wahl, E. Barbu*, Ann. Inst. Pasteur **91**, 212 (1956).
29. *А. Н. Белозерский*, Нуклеиновые кислоты, Пленарная лекция на 2-м Всесоюзном биохим. съезде, изд. «ФАН», Ташкент, 1969.
30. *Б. Ф. Ванюшин, А. Н. Белозерский, Н. А. Кокурина*, Труды МОИП **24**, 7 (1966).
31. *Л. А. Блюменфельд, А. П. Пурмаль*, в сб. «Основы молекулярной биологии. Ферменты», «Наука», 1964.
32. *J. Falk*, Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, 1964.
33. *Г. Малер, Ю. Кордес*, Основы биологической химии, «Мир», 1970.
34. *А. Ленинджер*, в сб. «Живая клетка», ИЛ, 1962.
35. *Г. Кребс, Г. Корнберг*, Превращения энергии в живых системах, ИЛ, 1959.
36. *В. А. Энгельгардт*, Усп. совр. биол. **18**, 17 (1944); Изв. АН СССР, сер. биол., 182 (1945).
37. *В. А. Белицер*, Enzymologia **6**, 1 (1939).
38. *В. А. Белицер, Е. Т. Цыбакова*, Биохимия **4**, 516 (1939).
39. *Л. Ингрэм*, Механизмы биохимических реакций, «Мир», 1964.
40. *Д. Грин, Р. Гольдбергер*, Молекулярные аспекты жизни, «Мир», 1968.
41. *Д. Ригель*, Энергия, жизнь и организм, «Мир», 1967.
42. *Э. Косовер*, Молекулярная биохимия, «Мир», 1964.
43. *Э. Рэкер*, Биоэнергетические механизмы, «Мир», 1967.
44. *В. П. Скулачев*, Аккумуляция энергии в клетке, «Наука», 1969.
45. *A. Szent-Gyorgyi*, Science **93**, 609 (1941); Nature **148**, 157 (1941).
46. *А. Сцент-Дьёрдьи*, Введение в субмолекулярную биологию, «Наука», 1964.
47. *А. Сцент-Дьёрдьи*, Биоэнергетика, Физматгиз, 1960.
48. *А. Сцент-Дьёрдьи*, О мышечной деятельности, Медгиз, 1947.
49. *Л. Бриллюэн*, в сб. «Горизонты биохимии», «Мир», 1964.
50. *Ж. Дюшен*, в сб. «Горизоиты биохимии», «Мир», 1964.
51. *А. Пюльман, Б. Пюльман*, Квантовая биохимия, «Мир», 1965.
52. *Б. Пюльман*, Электронная биохимия, «Наука», 1966.
53. *А. Пюльман, Б. Пюльман*, в сб. «Горизонты биохимии», «Мир», 1964.
54. *M. Evans, J. Gergely*, Biochim. Biophys. Acta **3**, 188 (1949).
55. *Д. Эли*, в сб. «Горизоиты биохимии», «Мир», 1964.
56. *М. В. Волькенштейн*, Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 805 (1971).
57. M. B. Волькенштейн, J. Theor. Biol. **34**, 193 (1972).
58. *М. В. Волькенштейн*, Биофизика **15**, 215 (1970).
59. *Г. Лонгет-Хиггинс*, в сб. «Вопросы биофизики», «Наука», 1964.
60. *М. В. Волькенштейн*, Молекулы и жизнь, «Наука», 1965.
61. *И. Б. Голованов, А. К. Пискунов, Н. М. Сергеев*, Элементарное введение в квантовую биохимию, «Наука», 1969.
62. *Ч. Коулсон*, Валентность, «Мир», 1965.
63. *У. Козман*, Введение в квантовую химию, ИЛ, 1960.
64. *Д. Маррел, С. Кеттл, Д. Теддер*, Теория валентности, «Мир», 1968.
65. Современная квантовая химия, т. 1, 2, «Мир», 1968.
66. *Ю. А. Овчинников* и др., FEBS Letters **29**, 31 (1973).

ФИЗИКА МАКРОМОЛЕКУЛ

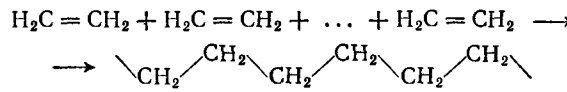
§ 3.1. ПОЛИМЕРНЫЕ ЦЕПИ

Специфические биологические и физические свойства белков и нуклеиновых кислот в значительной мере определяются их макромолекулярным строением. Длинные цепные молекулы во многом отличны от малых молекул. Тела, построенные из макромолекул, обладают особыми физическими свойствами.

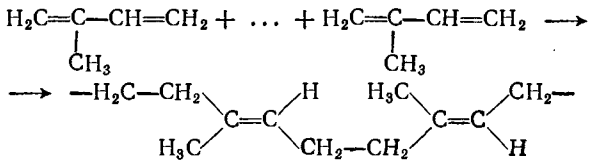
В последние десятилетия развита физика полимеров и физика макромолекул. Физика полимеров — область более широкая, так как она изучает не только изолированные макромолекулы, но и тела, построенные из них, — блочные полимеры. В настоящее время сформулированы теоретические основы физики полимеров. Направления ее дальнейшего развития — техника и биология. Техническая физика полимеров решает задачи, связанные с практическим применением физико-механических свойств полимерных материалов — каучуков, пластмасс, волокон. Макромолекулярная биофизика, также выросшая из физики полимеров, является основой молекулярной биофизики.

Общие закономерности, установленные для сравнительно простых макромолекул, получаемых синтетически, имеют фундаментальное значение и для гораздо более сложных биополимеров.

Синтетические макромолекулы получаются в лабораторных и промышленных условиях путем *полимеризации* или *поликонденсации* мономеров. В первом случае объединение мономеров в полимерную цепь происходит в результате прямого их соединения друг с другом вследствие раскрытия двойных связей. Так, из этилена получается полиэтилен

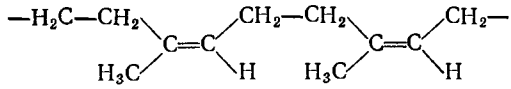


из изопрена — полиизопрен



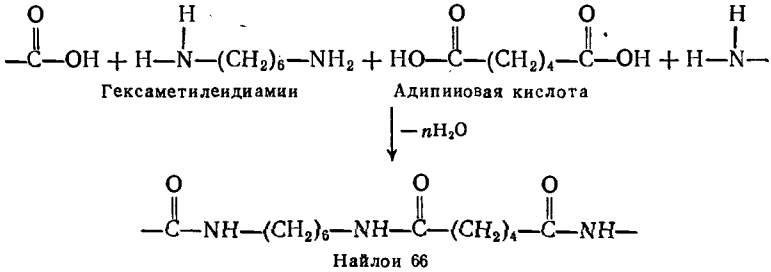
Транс-полиизопрен (гуттаперча)

или



Цис-полиизопрен (каучук)

При поликонденсации (стр. 60, 86) соединение мономеров в цепь сопровождается освобождением молекулы некоторого вещества (часто воды), по одной молекуле на звено. Такова, например, поликонденсация диамина с дикарбоновой кислотой



Гексаметилендиамин Адипиновая кислота

Найлон 66

Линейные синтетические полимеры растворимы в различных растворителях и образуют истинные, а не коллоидные растворы. Это было впервые показано Штаудингером [1]. Изучение растворов полимеров дает сведения о структуре макромолекул.

Синтетические макромолекулы моделируют основную цепь белка или нуклеиновой кислоты. Макромолекула гомополимера не несет информации, не содержит «текста». Ее свойства моделируют лишь те свойства биологических макромолекул, которые не зависят от особенностей первичной структуры. Вместе с тем полимерная цепь имеет специфические возможности передачи информации об электронных и конформационных перестройках (см. § 3.5.).

Синтетические макромолекулы отличаются от белков и нуклеиновых кислот не только отсутствием первичной структуры. Синтетические полимеры гетерогенны, они состоят из неоднородных макромолекул. Приведенные формулы полимерных цепей идеализированы в том смысле, что реальные цепи зачастую содержат и другие группы, например, некоторые из атомов H в полиэтилене могут быть замещены на метильную группу CH_3 и т. п. Цепи могут быть разветвлены случайным образом. Любой образец синтетического полимера содержит смесь макромолекул различной длины. Соответственно молекулярный вес полимера является средним значением по всем полимер-гомологам. Напротив, все молекулы данного белка одинаковы, они имеют вполне определенный молекулярный вес, состав и первичную структуру.

Полимерная цепь характеризуется прежде всего своей конфигурацией — фиксированным расположением химических связей, которое может быть изменено только в результате разрыва связей. Так, *цис-* и *транс*-полиизопрен (см. выше) различаются именно конфигурациями. Полимерные цепи типа —CHR—CH_2— (например, полистирол, в котором R — фенильная группа C_6H_5) могут существовать во множестве различных конфигураций. Каждая из групп может располагаться вправо или влево от основной цепи. Если число мономерных звеньев в цепи равно 1000, то число цепей с различными конфигурациями составит 2^{1000} и

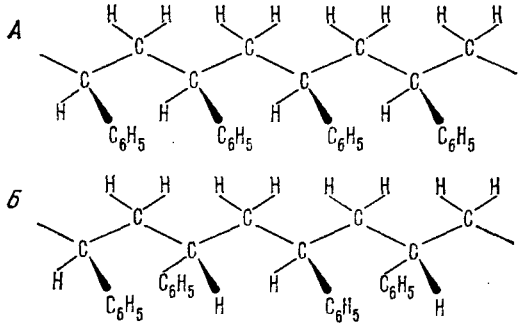


Рис. 3.1. Цепи изотактического (*А*) и синдиотактического (*Б*) полистирола.

будет, следовательно, значительно больше числа макромолекул в данном образце полимера. Иными словами, все макромолекулы в таком образце могут оказаться различными. Тем самым синтетические макромолекулярные вещества не подчиняются основному закону химии — закону постоянства состава и строения. Натта открыл способы получения стереорегулярных полимеров с более определенными конфигурациями мономерных звеньев. На рис. 3.1 показано строение цепей *изотактического* и *синдиотактического* полистирола. В первом случае все фенильные группы расположены по одну сторону основной цепи, во втором — поочередно справа и слева. Цепь с беспорядочным расположением групп R называется *атактической*.

Различие между оптическими антиподами для низко- и высокомолекулярных соединений является конфигурационным различием (см. стр. 79).

Специфика физических свойств макромолекул, отличие последних от малых молекул, определяется прежде всего большим числом однотипных звеньев, связанных в линейную цепь. Как правило, макромолекулы содержат единичные σ-связи C—C, C—N, C—O. В результате поворотов вокруг единичных связей

возникают различные конформации цепи (см. далее §§ 3.2—3.4). Важнейшее специфическое свойство полимерной цепи — ее конформационная лабильность, т. е. способность цепи фигурировать во множестве различных конформаций. Это свойство находит свое отражение в особенностях макроскопического поведения полимеров, например в высокоэластичности, присущей только полимерам (скажем, натуральному и синтетическому каучукам). Высокоэластичность — способность блочного полимера испытывать большие упругие деформации, достигающие сотен процентов, при малом модуле упругости. Каучук, подобно другим упругим телам, подчиняется при малых деформациях закону Гука

$$\sigma = \varepsilon \frac{L - L_0}{L_0}. \tag{3.1}$$

Здесь σ — напряжение, L и L_0 — длины растянутого и нерастянутого образцов соответственно, ε — модуль упругости. Для стали $\varepsilon \approx 20\,000$ *кг/мм*^{2}, для резин $\varepsilon \approx 0{,}02$—$0{,}8$ *кг/мм*^{2} (в зависимости от степени вулканизации каучука). Столь малым модулем упругости характеризуется идеальный газ. В самом деле, идеальный газ описывается уравнением состояния

$$pV = RT. \tag{3,2}$$

Сожмем газ при постоянной температуре, увеличив давление на dp. Объем уменьшится на dV. Из (3,2) следует

$$dp = -p\frac{dV}{V} = p\frac{L_0 - L}{L_0}, \tag{3,3}$$

где L_0 — начальное, L — конечное положение поршня. Это уравнение аналогично (3.1), роль модуля упругости ε играет давление p. Атмосферному давлению отвечает $\varepsilon = 1$ *кг/см*^{2} $=$ $= 0{,}01$ *кг/мм*^{2} — величина того же порядка, что и у каучука. Идеальный газ нагревается при адиабатическом сжатии. Аналогичным образом резина нагревается при адиабатическом растяжении. Это означает, что в обоих случаях при деформации происходит уменьшение энтропии. Работа при растяжении каучука силой f на dL равна

$$f\,dL = dF = dE - T\,dS, \tag{3,4}$$

где F — свободная энергия, E — внутренняя энергия. Каучук практически несжимаем. Упругая сила при изотермическом растяжении каучука равна

$$f = \left(\frac{\partial F}{\partial L}\right)_T = \left(\frac{\partial E}{\partial L}\right)_T - T\left(\frac{\partial S}{\partial L}\right)_T. \tag{3,5}$$

Опыт показывает, что для каучука сила f пропорциональна T,

причем прямая $f(T)$ проходит вблизи начала координат. Иными словами,

$$\left(\frac{\partial E}{\partial L}\right)_T \approx 0. \qquad (3.6)$$

Подобно тому как внутренняя энергия идеального газа не зависит от объема, внутренняя энергия каучука не зависит от длины. Возникновение упругой силы и в том, и в другом случае определяется изменением не внутренней энергии, а энтропии

$$f = -T\left(\frac{\partial S}{\partial L}\right)_T. \qquad (3,7)$$

В этом и состоит принципиальное отличие высокоэластичности полимера от упругости твердого тела (скажем, стальной пружины), определяемой изменением внутренней энергии.

Энтропийный характер упругости идеального газа означает, что при уменьшении объема газа возрастает число ударов молекул о стенки — упругая сила связана с тепловым движением молекул. Сжатие газа уменьшает его энтропию, так как газ переходит из более вероятного разреженного состояния в менее вероятное — сжатое. Очевидно, что сходный процесс происходит и в каучуке, т. е. каучук состоит из большого числа независимо перемещающихся элементов, и растяжение каучука означает переход от более вероятного их расположения к менее вероятному, т. е. уменьшение энтропии. Только в этом и заключается смысл аналогии между каучуком и идеальным газом.

Поведение полимера — каучука — в блоке объясняется свойствами макромолекулярных цепей, из которых он построен. Независимые движения элементов полимерной цепи определяются ее конформационной лабильностью. Иными словами, полимерная цепь обладает гибкостью. Гибкость полимерной цепи — ее важнейшее свойство в аспекте рассматриваемых здесь вопросов. При этом необходимо различать *термодинамическую* гибкость и *кинетическую* гибкость. Первая ответственна за равновесные свойства полимера, в частности за высокоэластичность каучука; она определяется числом конформаций цепи, обладающих одинаковыми или близкими энергиями. Кинетическая гибкость характеризует скорость конформационной перестройки цепи. Она определяется высотами энергетических барьеров, которые при этом необходимо преодолеть.

§ 3.2. ВНУТРЕННЕЕ ВРАЩЕНИЕ И ПОВОРОТНАЯ ИЗОМЕРИЯ

Классическая органическая химия предполагала, что вращение атомных групп вокруг единичных связей происходит совершенно свободно. Тем самым любые конформации, например этана, возникающие в результате внутренних поворотов, имеют

одинаковую свободную энергию; изменение угла поворота не требует затраты энергии. Некоторые из конформаций этана изображены на рис. 3.2.

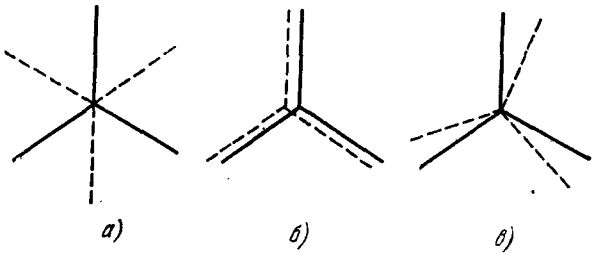


Рис. 3.2. Расположение CH-связей этана в *транс* (*а*), *цис* (*б*) и свернутой (*в*) конформациях.
Проекции на плоскость, перпендикулярную CC-связям.

Однако исследования термодинамических свойств этана и других соединений с единичными связями, а также структурные исследования, проведенные методами спектроскопии, ЯМР и т. д., показали, что внутреннее вращение всегда несвободно. Молекула этана имеет минимум энергии в скрещенной, или *транс*-конформации (рис. 3.2, *а*) и максимум — в затененной, или *цис*-конформации (рис. 3.2, *б*). Для поворота на 120°, т. е. для перехода из одной *транс*-конформации в другую, ей тождественную, нужно преодолеть энергетический барьер, равный 2900 *кал/моль*. Для этана, а также для других молекул с осевой симметрией C_3 зависимость потенциальной энергии внутреннего вращения U от угла поворота φ можно приближенно представить формулой

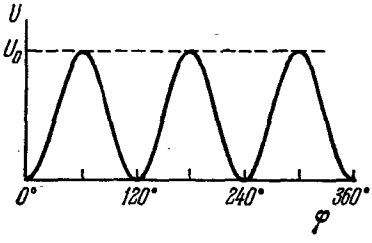


Рис. 3.3. График зависимости потенциальной энергии внутреннего вращения в этане от угла поворота.

$$U = {}^1/_2 U_0 (1 - \cos 3\varphi), \qquad (3.8)$$

где U_0 — высота потенциального барьера (рис. 3.3). Значение U_0 возрастает при замене атомов H в этане на более объемистые атомы и группы (CH_3, галогены) и уменьшается при удлинении оси вращения (ср. $H_3C—CH_3$, $H_3C—SiH_3$, $H_3Si—SiH_3$). Экспериментальные значения U_0 приведены в табл. 3.1 (см. также [2]).

Потенциальная энергия внутреннего вращения определяется взаимодействием валентно не связанных атомов и групп. Строгий квантовомеханический расчет U_0 затруднителен, так как эта величина значительно меньше полной энергии молекулы и она определяется как малая разность двух больших величин — полных энергий молекулы в затененной (*цис*) и скрещенной (*транс*) конформациях. В результате приближенных расчетов тормозящего потенциала установлена его сложная природа (см. [2—5]).

Таблица 3.1

Высоты потенциальных барьеров при внутреннем вращении в *ккал/моль*

Вещество	U_0	Вещество	U_0
H_3C-CH_3	2,9	H_3C-OCH_3	2,72
$H_3C-CH_2CH_3$	3,4	H_3C-SH	1,27
$H_3C-CH(CH_3)_2$	3,9	$H_3C-CH:CH_2$	1,98
$H_3C-C(CH_3)_3$	4,4	$H_3C-CH:O$	1,17
H_3C-CH_2F	3,31	H_3C-SiH_3	1,7
H_3C-CH_2Cl	3,69	$H_3Si-SiH_3$	1,0
H_3C-CH_2Br	3,57	$H_3C-C\vdots C-CF_3$	0
H_3C-OH	1,07		

Барьер возникает вследствие стерического, ван-дер-ваальсова отталкивания валентно не связанных атомов и квантовомеханического взаимодействия связей, примыкающих к оси вращения (*эффект ориентации связей*). И то, и другое делает более устойчивой *транс*-конформацию (*принцип скрещенных связей*). Ван-дер-ваальсово взаимодействие можно оценить, зная характерные кривые зависимости энергии межмолекулярного взаимодействия от межмолекулярного расстояния для модельных веществ. Напротив, эффект ориентации связей определить трудно. Грубую оценку можно получить, считая, что в этане из-за малого ван-дер-ваальсова радиуса атома водорода $U(\varphi)$ целиком определяется эффектом ориентации и что у производных этана и у него самого этот эффект одинаков. Тогда для производных этана получаем

$$U(\varphi) = {}^1/_2 U_{\text{ориент}} (1 - \cos 3\varphi) + \sum_{i,\,k} U(r_{ik}); \qquad (3,9)$$

$U(r_{ik})$ — «стерическая» потенциальная энергия взаимодействия валентно не связанных атомов i и k, находящихся на расстоянии r_{ik} друг от друга. Очевидно, что r_{ik} зависит от φ.

Если молекула содержит сильно полярные связи, то к правой части (3.9) нужно добавить члены, учитывающие

электростатическое взаимодействие электронных облаков связей, примыкающих к оси вращения. Это обстоятельство существенно для биополимеров.

Взаимодействие $U(r_{ik})$ атомов водорода и атомов углерода связей С—Н и С—С описывается эмпирически потенциалами, оцененными Хиллом [6], Бартеллом [7], Китайгородским [8, 9] и др. на основе данных о кристаллохимических и термодинамических свойствах простых углеводородов. Эти потенциалы имеют вид

$$U(r) = K\exp(-ar) - K'/r^6, \quad (3,10)$$

где a, K, K' — константы. Кривые $U(r)$ изображены на рис. 3.4.

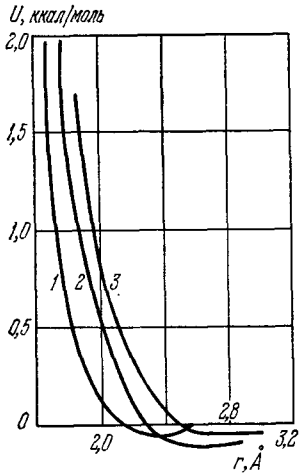


Рис. 3.4. Потенциалы взаимодействия несвязанных атомов водорода связей С—Н по Хиллу (*1*). Бартеллу (*2*) и Китайгородскому (*3*).

Китайгородский ввел универсальную функцию $U(r)$, так называемый атом — атом потенциал. В случае пары атомов он выражает взаимодействие «универсальных нейтральных атомов» и характеристических зарядов на ядрах, вообще говоря, отличных от атомного номера. Функция Китайгородского имеет вид

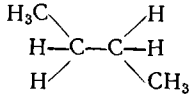
$$U = U_{2/3}\left(z^{-6} - \frac{6}{\alpha}\exp(\alpha - \alpha z)\right) \times \left(11{,}4 - \frac{6}{\alpha}e^{\alpha/3}\right), \quad (3,11)$$

где $z = r/r_0$, $\alpha = ar_0$, r_0 — сумма ван-дер-ваальсовых радиусов взаимодействующих атомов, $U_{2/3}$ — значение U при $r = {}^2/_3 r_0$. Для связей С—С, С—Н, Н—Н Китайгородский принимает $U_{2/3} = 3{,}5$ *ккал/моль* и $\alpha = 13$. При этих значениях

$$U = 3{,}5\,(8600e^{-13z} - 0{,}04z^{-6}).$$

Потенциал Китайгородского содержит, таким образом, лишь один параметр r_0. Приведенное выше выражение дает очень хорошие результаты при вычислении конформаций малых молекул и макромолекул, в частности биополимеров (см. [10]).

Если молекула, в отличие от этана, лишена аксиальной симметрии, кривая $U(\varphi)$ несимметрична и не может быть описана формулой типа (3.8). Так, для молекулы *н*-бутана



кривая зависимости внутренней энергии от угла поворота вокруг центральной связи С—С имеет вид, показанный на рис. 3.5. В этом случае имеются три минимума энергии: один, наиболее глубокий, отвечает *транс*-конформации, два других одинаковой глубины — конформациям, получаемым поворотом из *транс*-положения одной группы C_2H_5 относительно другой на 120 и —120°. Эти конформации называются свернутыми или *гош*-конформациями.

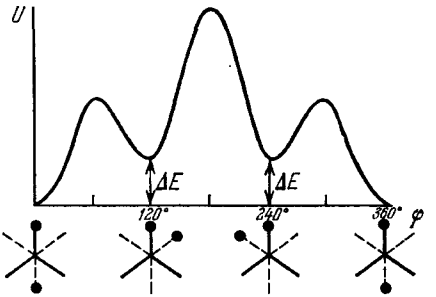


Рис. 3.5. График зависимости потенциальной энергии внутреннего вращения в *н*-бутане от угла поворота.

Очевидно, что молекулы, характеризуемые несколькими неэквивалентными минимумами энергии $U(\varphi)$, будут существовать именно в этих состояниях, переходя из одной конформации в другую со скоростью, определяемой высотой барьера, разделяющего минимумы. Относительное равновесное содержание молекул *н*-бутана в свернутых и *транс*-конформациях выражается величинами

$$N_t = N\frac{1}{1+2\exp(-\Delta E/RT)}, \quad N_d = N_l = N_1\frac{\exp(-\Delta E/RT)}{1+2\exp(-\Delta E/RT)}; \tag{3,12}$$

здесь N_t — число молекул в *транс*-конформации, N_d и N_l — число молекул в конформациях, свернутых вправо и влево на 120°. Очевидно, что $N_t + N_d + N_l = N$, где N — полное число молекул. Таким образом, вещество представляет собой динамическую смесь конформаций, которые в этих случаях принято называть поворотными изомерами или *ротамерами*, или конформерами. Состав термодинамически равновесной смеси определяется разностью внутренних энергий поворотных изомеров ΔE и температурой. При $T \to \infty$ $N_t = N_d = N_l = {}^1/_3N$. При понижении температуры вещество кристаллизуется в форме одного наиболее устойчивого ротамера, и формулы (3.12) становятся неприменимыми (см. стр. 132).

При высотах барьера порядка нескольких *ккал/моль* время поворотной изомеризации, т. е. время превращения одного ротамера в другой, имеет порядок величины 10^{-10} *сек*. К такой оценке приводит выражение для скорости поворотной изомеризации, полученное на основе теории абсолютных скоростей реакций [11] (см. гл. 6).

Следовательно, ротамеры не могут быть отделены друг от друга. Наличие ротамеров в равновесной смеси устанавливается

путем изучения ее химических и физических свойств. Пространственное строение ротамеров различно; соответственно различаются и их колебательные спектры. Спектр вещества представляет собой результат наложения спектров ротамеров. Действительно, за время жизни ротамера происходят сотни и тысячи колебаний (с частотами порядка 10^{12}—10^{13} *сек*$^{-1}$) [11]. Существование поворотной изомерии было впервые установлено Кольраушем с помощью спектров комбинационного рассеяния [2, 12].

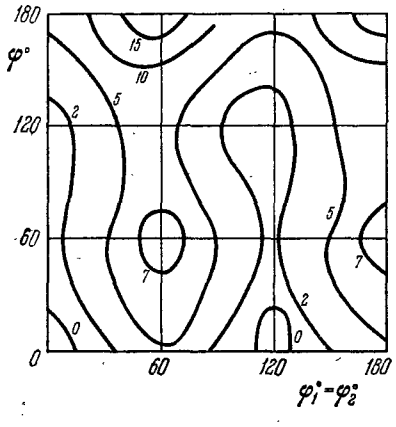


Рис. 3.6. Зависимость энергии внутреннего вращения *н*-бутана от углов поворота.

Числа у изоэнергетических кривых указывают энергию в *ккал/моль*.

Отношение интенсивностей спектральных линий, отвечающих различным ротамерам, зависит от их содержания в смеси. Оно меняется с температурой и, следовательно, разности энергий ротамеров ΔE можно определять по температурному ходу интенсивностей спектральных линий. Так, для *н*-бутана $\Delta E \approx 600$ *кал/моль*. Данные для ряда других молекул приведены в [2].

Информацию о ротамерии получают также с помощью радиочастотной спектроскопии, ЯМР, электронографии, измерения дипольных моментов молекул и т. д. (см. монографии [2, 3, 13]). Теоретический расчет величин ΔE, равно как и энергетических барьеров, разделяющих поворотные изомеры, можно провести с помощью потенциалов Китайгородского, Хилла и др. на полуэмпирической основе. Для молекул типа *н*-бутана и более сложных приходится учитывать повороты вокруг нескольких связей — энергия внутреннего вращения зависит соответственно от нескольких углов вращения и изображается уже не кривой, а поверхностью, вообще говоря, многомерной. Впервые расчет такой поверхности был проведен в работе [14] (см. также [3]) для *н*-бутана. Расчет основывался на формуле (3,9) и на величинах потенциалов С—С Китайгородского (см. стр. 124) и Н—Н Хилла. На рис. 3.6 приведена «геодезическая карта», изображающая зависимость энергии внутреннего вращения бутана от углов поворота φ ($—H_2C—CH_2—$) и $\varphi_1 = \varphi_2$ ($H_3C—CH_2—$). Минимумам энергии соответствуют углы φ, равные 0 и $\pm 120°$ при φ_1 и φ_2, близких к 0 и 120°. Переход от *транс*-ротамера к свернутому требует преодоления барьера порядка 3 *ккал/моль*, раз-

ность энергий ротамеров оценена в 900 *кал/моль*. В дальнейшем был проведен аналогичный анализ условий внутреннего вращения в соединениях, содержащих атомы кислорода [15] и двойные связи [16], а также многих других [17, 18].

Изучение поворотной изомерии — конформационных превращений молекул — приобрело сейчас очень большое значение в органической и биоорганической химии. Химические и физико-химические свойства молекул существенным образом зависят от их конформаций [19, 20]. Главные особенности физического поведения макромолекул определяются поворотной изомерией.

§ 3.3. ПОВОРОТНО-ИЗОМЕРНАЯ ТЕОРИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

В макромолекулярной цепи полиэтилена (см. стр. 117), состоящей из единичных связей С—С, внутренние повороты происходят в каждом звене цепи. Именно внутренним вращением и определяется гибкость цепи, ответственная за высокоэластичность полимера.

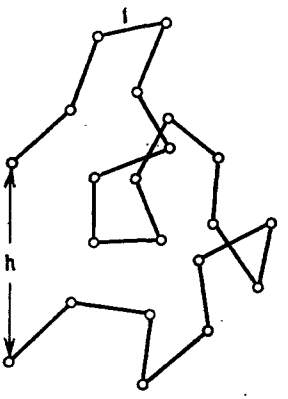


Рис. 3.7. Схема свободно сочлененной цепи.

Предположим, что цепь свободно сочленена, т. е. в ней нет фиксированных валентных углов и повороты происходят свободно. Тем самым набор конформаций, возникающих при поворотах вокруг данного атома цепи, непрерывен в интервале углов от 0 до 4π и энергия при поворотах не меняется. Цепь можно охарактеризовать вектором $\mathbf{h}$, проведенным от первого атома цепи к последнему (рис. 3.7). Очевидно, что среднее по всем конформациям значение вектора $\mathbf{h}$ равно нулю, так как при тепловом движении его направления равновероятны. Как при этом распределены вероятности осуществления тех или иных значений $h \equiv |\mathbf{h}|$, которые могут меняться от нуля до максимальной длины цепи, равной Zb (Z — число звеньев, b — длина звена)? Решение этой задачи аналогично решению задач теории диффузии — нахождению вероятности перемещения броуновской частицы на путь h в результате Z шагов, каждый из которых имеет длину b [21]. Распределение оказывается гауссовым — вероятность того, что расстояние между концами цепи лежит в интервале от h до $h + dh$, равна

$$W(h)\,dh = \left(\frac{3}{2\pi Z b^2}\right)^{3/2} 4\pi h^2 \exp\left(-\frac{3h^2}{2Zb^2}\right) dh. \qquad (3,13)$$

Соответственно

$$\bar{h} \approx \int_0^\infty hW(h)\,dh = 0$$

и

$$\overline{h^2} \approx \int_0^\infty h^2 W(h)\,dh = Zb^2, \qquad (3,14)$$

т. е. цепь сильно скручена. Формулы (3.13) и (3.14) справедливы при $Z \gg 1$.

Таким образом, тепловое движение свертывает макромолекулу в клубок. Это состояние наиболее вероятно, ибо полностью вытянутая конформация цепи может осуществиться одним способом, а свернутая — множеством способов. Клубкообразная форма макромолекул в растворе доказана прямыми опытами (см. далее).

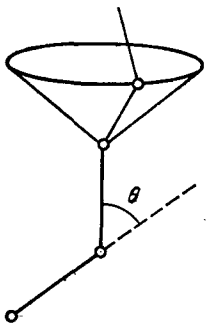


Рис. 3.8. Цепь с фиксированным и валентными углами.

Энтропийная природа высокоэластичности каучука непосредственно следует из сказанного. В нерастянутом состоянии цепи свернуты в статистические клубки, чему соответствует максимальная энтропия. При растяжении клубка энтропия уменьшается. Энтропия цепи равна

$$S = k \ln W(h) = C - 3kh^2/2Zb^2, \qquad (3,15)$$

где C — постоянная величина, не зависящая от h. Согласно (3.7) упругая сила при растяжении цепи равна

$$f = -T\left(\frac{\partial S}{\partial h}\right)_T = \frac{3kT}{Zb^2}\,h. \qquad (3,16)$$

Модуль упругости, подобно модулю упругости идеального газа, равиому $p = RT/V$, линейно зависит от температуры. На этом основана кинетическая теория каучука, впервые предложенная Куном.

В реальных макромолекулах валентные углы между связями фиксированы и повороты не свободны. Зададим положение двух первых звеньев полиэтиленовой цепи (рис. 3.8). Третье звено может занимать различные положения на поверхности конуса с раствором 2θ ($\pi - \theta$ — валентный угол между связями С—С, близкий к тетраэдрическому 109° 28′). Этим различным положениям, характеризуемым углом поворота φ вокруг второй связи С—С, отвечают разные энергии $U(\varphi)$. Положение четвертой связи по отношению к первым двум менее определенно, так как она ориентирована на конусе, описанном вокруг каждого из положений третьей связи и т. д. Достаточно удаленная связь распола-

гается по отношению к первой связи практически произвольным образом. Поэтому длинная цепь свертывается в клубок. Макромолекулу можно мысленно разбить на сегменты, положения которых уже не коррелированы друг с другом. Тогда формулы (3,13)—(3,16) сохраняются, но Z и b означают уже число и длину свободно сочлененных сегментов, а не реальных звеньев.

Можно, однако, выразить средний квадрат длины клубка $\overline{h^2}$ не через величины Z и b, а через реальные величины N — число звеньев, l — длину звена, θ — угол, дополнительный к валентному. Вектор $\mathbf{h}$ есть сумма векторов звеньев

$$\mathbf{h} = \sum_{i=1}^{N} \mathbf{l}_i. \tag{3,17}$$

Следовательно,

$$\overline{h^2} = \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=1}^{N} \overline{\mathbf{l}_i \mathbf{l}_j} = \sum_{i=1}^{N} \overline{l_i^2} + 2 \sum_{i=2}^{N} \sum_{j=1}^{i-1} \overline{\mathbf{l}_i \mathbf{l}_j}. \tag{3,18}$$

Формула (3,14) следует отсюда автоматически: при свободном сочленении $(\overline{\mathbf{l}_i \mathbf{l}_j}) = 0$ при $i \neq j$ и

$$\overline{h^2} = Nl^2. \tag{3,19}$$

В реальной цепи средние значения скалярных произведений $(\mathbf{l}_i \mathbf{l}_j)$ зависят от θ и φ. Для цепи с симметричными привесками типа полиэтилена (но не полистирола, см. рис. 3.1) строгий расчет (см. [2, 3, 5]) приводит к формуле, впервые полученной Ока [22],

$$\overline{h^2} = Nl^2 \frac{1 + \cos\theta}{1 - \cos\theta} \frac{1 + \eta}{1 - \eta}, \tag{3,20}$$

где η — средний косинус угла внутреннего вращения

$$\eta = \overline{\cos\varphi} = \int_0^{2\pi} \exp\left(-\frac{U(\varphi)}{kT}\right) \cos\varphi \, d\varphi \Big/ \int_0^{2\pi} \exp\left(-\frac{U(\varphi)}{kT}\right) d\varphi. \tag{3,21}$$

Формула (3,19) справедлива для длинных цепей с $N \gg 1$. Величина $\overline{h^2}$, вычисленная по (3,20), больше, чем у свободно сочлененной цепи (см. (3,19)), так как корреляция, определяемая отсутствием свободы вращения и валентными углами, удлиняет цепь. Очевидно, что величину $\overline{h^2}$ можно рассматривать как меру термодинамической гибкости цепи — чем меньше $\overline{h^2}$ при заданных N и l, тем больше гибкость. Для очень жесткой цепи, характеризуемой преимущественно *транс*-конфигурацией, угол φ близок к 0° и η близко к 1. Соответственно из формулы (3,20) следует

$$\overline{h^2} = Nl^2 \frac{1 + \cos\theta}{1 - \cos\theta} \frac{2}{1 - \eta}. \tag{3,22}$$

Для гибких цепей вычисление η по формуле (3,21) требует знания потенциальной энергии $U(\varphi)$.

Теория размеров, формы, а также дипольных моментов, анизотропных поляризуемостей и т. д. полимерных цепей должна исходить из физического механизма их гибкости. Так или иначе гибкость определяется поворотами вокруг единичных связей. Впервые учет несвободы движения звеньев проводился на основе

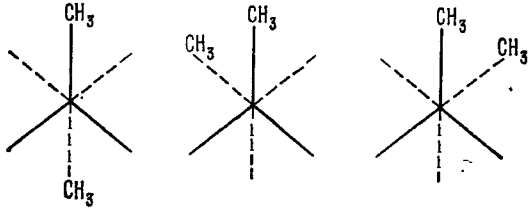


Рис. 3.9. Ротамеры *н*-бутана.

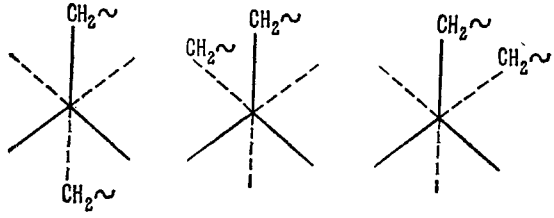


Рис. 3.10. Ротамеры полиэтилена.

представления о крутильных колебаниях около *транс*-конформаций звеньев цепи [23, 24]. В этом случае функция $U(\varphi)$ имеет вид

$$U(\varphi) = {}^1/_2 U_0 (1 - \cos\varphi) \approx {}^1/_4 U_0 \varphi^2 \qquad (3{,}23)$$

и расчет $\overline{h^2}$ приводит к формуле (3.22), так как $\cos\varphi$ близок к единице. Однако сравнение с опытом не подтвердило правильности этой формулы для реальных макромолекул.

Как мы видим, лишенные аксиальной симметрии малые молекулы образуют вследствие внутренних поворотов смеси поворотных изомеров. То же относится и к макромолекулам. На рис. 3.9 и 3.10 показаны ротамеры *н*-бутана и полиэтилена, получающиеся в результате поворота вокруг любой связи С—С в цепи. Различие сводится к тому, что во втором случае вместо CH_3-групп фигурируют группы CH_2, присоединенные к продолжающейся цепи, что изображено на рис. 3.10 знаком $\sim$.

Предложенная в 1951 г. *поворотно-изомерная* теория [25] рассматривает макромолекулу как равновесную смесь поворотных

изомеров, а внутреннее вращение в цепи — как поворотную изомеризацию, перескок из одной конформации в другую. Иными словами, непрерывная кривая $U(\varphi)$ заменяется разрывной функцией, содержащей ряд бесконечно узких щелей при фиксированных значениях φ.

Конечно, в действительности происходят флуктуации — крутильные колебания около значений φ, отвечающих поворотным изомерам. Однако их можно не учитывать, так как эти флуктуации, будучи случайными, в среднем компенсируют друг друга и не влияют на усредненные свойства макромолекулы.

В поворотно-изомерной теории интегрирование в (3,21) заменяется суммированием по ротамерам. Так, для полиэтилена

$$\eta = \frac{\cos\varphi_1 \exp(-E_1/kT) + \cos\varphi_2 \exp(-E_2/kT) + \cos\varphi_3 \exp(-E_3/kT)}{\exp(-E_1/kT) + \exp(-E_2/kT) + \exp(-E_3/kT)}. \tag{3,24}$$

Согласно (3,12) $E_2 - E_1 = E_3 - E_1 = \Delta E$, $\varphi_1 = 0°$, $\varphi_2 = 120°$, $\varphi_3 = -120°$. Тогда

$$\eta = \frac{1 - \exp(-\Delta E/kT)}{1 + 2\exp(-\Delta E/kT)}. \tag{3,24а}$$

При $\Delta E = 600$ *кал/моль*, $T = 0\,°C$ получим $\eta = 0{,}37$. Находим по формуле Ока (3,20) при $\cos\theta = -1/3$

$$\overline{h^2} = 1{,}1Nl^2. \tag{3,25}$$

Термодинамическая гибкость макромолекул, иными словами, степень скрученности статистического клубка, тем больше, чем меньше η, т. е. чем меньше ΔE. Если минимумы энергии расположены симметрично ($\varphi_1 = 0°$, $\varphi_2 = 120°$, $\varphi_3 = -120°$), то при $\Delta E = 0$ имеем $\eta = 0$, и макромолекула ведет себя как цепь со свободным внутренним вращением.

Очевидно, что поворотно-изомерная теория хорошо обоснована для тех случаев, когда минимумы энергии разделены энергетическими барьерами, существенно превышающими kT. Если это условие не соблюдается, поворотно-изомерная теория сохраняет значение приближенного математического метода, позволяющего заменять интегрирование суммированием.

Поворотная изомерия полимеров установлена рядом методов, прежде всего методом инфракрасной спектроскопии. Для важнейших полимеров энергетические барьеры значительно превышают kT. Поворотно-изомерная теория получила прямые экспериментальные подтверждения при изучении термомеханических свойств и растяжения полимеров (см. стр. 136). Эта теория легла в основу современной статистической физики макромолекул, последовательно изложенной в монографиях [2, 3, 5].

Расчет гибкости конкретных полимерных цепей должен основываться на их химическом строении. Так, конформации мономерных звеньев в полимерах типа $(—CH_2—CHR—)_n$ (например, полистирол, см. рис. 3.1) и $(—CH_2—CR_2—)_n$ определяются преимущественно взаимодействиями массивных боковых привесков R. Сведения об этих конформациях удается получить путем исследования кристаллических полимеров методом рентгеноструктурного анализа. Вследствие конфигурационной гетерогенности и дисперсии длин цепей обычные полимеры не кристаллизуются или кристаллизуются лишь частично. Однако стереорегулярные полимеры кристаллизуются хорошо, их можно получить даже в виде монокристаллов. Но в блоке и стереорегулярные полимеры кристаллизуются не полностью. Наряду с гетерогенностью, кристаллизации препятствуют кинетические факторы. Для того чтобы образовать кристалл, макромолекулы должны переориентироваться. Стастические флуктуирующие клубки закристаллизоваться не могут — цепи должны вытянуться. Даже если термодинамические условия благоприятствуют развертыванию клубков и ориентации цепей, эти процессы могут потребовать слишком длительного времени по сравнению с временем опыта. Необходимо преодолеть барьеры внутреннего вращения. Равновесные термодинамические свойства поворотно-изомерной макромолекулы определяются разностями энергий поворотных изомеров; напротив, кинетические свойства определяются высотами энергетических барьеров. Для кристаллизации существенна не только термодинамическая, но и кинетическая гибкость цепей. Прогрев полимера или его набухание в низкомолекулярном растворителе облегчают кристаллизацию.

Термодинамические условия кристаллизации и плавления полимеров непосредственно связаны с поворотной изомеризацией. Температура плавления выражается как отношение разности энтальпий к разности энтропий в твердом и жидком состояниях (см. стр. 38). Увеличение энтропии при плавлении полимера связано, в частности, с переходом от упорядоченной конформации цепи к смеси поворотных изомеров, к статистическому клубку. Энтропия смешения является существенным вкладом в ΔS [2, 3].

Кристаллическое строение характерно для волоконных полимеров. Макромолекулы в волокне уложены регулярно, их цепи параллельны оси волокна. Волоконные полимерные поликристаллы играют важную роль в быту и технике. Так построены синтетические волокна — полиамиды, полиэфиры и т. д. и природные — целлюлозное волокно, шерсть и шелк. В последних двух случаях мы встречаемся с фибриллярными белками (см. ниже гл. 4).

Рентгеноструктурные исследования стереорегулярных полимеров, проведенные Натта и Коррадини [26, 27], показали, что в

кристалле повторяющиеся структурные единицы цепи занимают геометрически эквивалентные положения относительно ее оси. Эти наблюдения легли в основу постулата эквивалентности геометрических положений структурных единиц (см. [3]). Постулат эквивалентности дает возможность установить симметрию цепи в кристалле и конформации мономерных звеньев, исходя из стереохимического строения цепи, из ее конфигурации. Вследствие

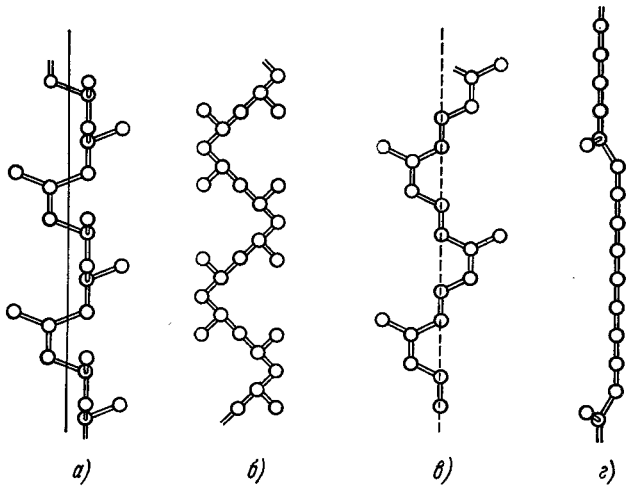


Рис. 3.11. Конформации кристаллических цепей.
а) Изотактический полипропилен; *б*) синдиотактический полипропилен; *в*) *цис*-1,4-полиизопрен; *г*) найлон 77.

регулярности цепи и эквивалентности звеньев молекулы полиамидов и полипептидов могут кристаллизоваться лишь в виде спиралей, так как строение их мономерных звеньев не симметрично. 1,4-полиизопрен должен кристаллизоваться либо в виде спирали, либо в виде структуры, имеющей плоскость зеркального скольжения. На рис. 3.11 показаны конформации кристаллических цепей некоторых полимеров. Спираль как целое может быть право- или левовинтовой независимо от того, обладают ли мономерные звенья хиральностью (см. стр. 79), и, значит, она оптически активна. Однако образец синтетического полимера, полученного из симметричных мономеров, оптически неактивен. Он содержит равное количество правых и левых спиралей — их рацемическую смесь.

Конформация стереорегулярной макромолекулы $(—CH_2—CRR'—)_n$ характеризуется двумя углами внутреннего вращения φ_1 и φ_2, соответствующими поворотам вокруг связей

—CH_2—CRR′— и —CRR′—CH_2—. Спираль может быть представлена в виде $(\varphi_1, \varphi_2)_n$, причем $\varphi_1 \neq \varphi_2$; равенство $\varphi_1 = \varphi_2$ возможно лишь при нулевых значениях этих углов, т. е. для плоской *транс*-цепи. Если $(\varphi_1, \varphi_2)_n$ представляет собой правую спираль, то левая спираль (оптический антипод) выражается как $(-\varphi_2, \varphi_1)_n$. Подробный анализ этих соотношений приведен в [3]. Изотактические (см. стр. 119) полимеры $(-CH_2-CHR-)_n$ в большинстве случаев кристаллизуются в виде спирали 3_1, что соответствует $\varphi_1 = 0°$, $\varphi_2 = 120°$, т. е. чередованию *транс*- и свернутых конфигураций ротамеров. Напротив, синдиотактические (см. стр. 119) полимеры кристаллизуются либо в виде плоских *транс*-цепей, либо в виде спирали с углами $\varphi_1 = \varphi_1' = 0°$, $\varphi_2 = \varphi_2' = -120°$ (полипропилен; в этих случаях конформация цепи характеризуется уже не двумя, а четырьмя углами поворота).

Плавление кристаллического спирального полимера есть поворотная изомеризация, переход спираль — клубок. Сходные процессы играют важную роль в молекулярной биофизике — в физике белков и нуклеиновых кислот (см. ниже гл. 4 и 8).

В работах [15, 16, 28, 29] были проведены расчеты энергии внутреннего вращения как функции углов φ_1 и φ_2 для ряда полимеров (ср. стр. 126). В настоящее время такого рода расчеты выполнены для множества важнейших синтетических полимеров (см. [3, 5]) и для биополимеров. Результаты, относящиеся к белковым цепям, рассмотрены в гл. 4.

Таким образом, представление о поворотной изомерии макромолекул обосновано результатами изучения кристаллических полимеров. В свою очередь эти результаты оказываются весьма важными для теоретического рассмотрения макромолекул в растворе.

Фиксация определенных поворотных изомеров для всех звеньев цепи в кристалле обеспечивает его *дальний порядок*: зная положения атомов в данном мономерном звене, мы знаем их для сколь угодно удаленных звеньев, так как расположение атомов строго периодично. Вместе с тем в кристалле имеется, конечно, и *ближний порядок* — определенное расположение соседних звеньев. При плавлении или растворении полимера дальний порядок исчезает, но есть весьма веские основания считать, что ближний порядок сохраняется. Это установлено для низкомолекулярных жидкостей, современная теория которых исходит из представлений об их квазикристаллическом строении, введенных Френкелем [24]. Сохранение ближнего порядка в макромолекулах следует из того, что кристаллические структуры полимеров соответствуют минимуму потенциальной энергии. Исходя из этих соображений, Птицын и Шаронов [30] предположили, что ближний одномерный порядок в свободной макромолекуле, образующей статистический клубок, аналогичен дальнему одномерному

порядку в кристалле. Высказанная ими идея получила полное подтверждение в расчетах конформаций — поверхностей $U(\varphi_1, \varphi_2)$ и т. п., а также в результатах спектроскопических и оптических исследований (см. [3]). Она легла в основу более точных расчетов физических свойств свободных макромолекул, исходящих из поворотно-изомерной теории.

Для цепей с симметричными привесками $(-CH_2-CR_2-)_n$ потенциальная энергия внутреннего вращения не зависит от того, происходят ли повороты вокруг единичных связей по часовой стрелке или против нее, т. е. $U(\varphi_1, \varphi_2) = U(-\varphi_1, -\varphi_2)$, где φ_1 — угол поворота вокруг связи $-CH_2-CR_2-$ и φ_2 — вокруг связи $-CR_2-CH_2-$. Так как эти две связи одинаковы, то $U(\varphi_1, \varphi_2) = U(\varphi_2, \varphi_1) = U(-\varphi_2, -\varphi_1)$. Если в кристалле реализуется единственный ротамер (φ_1, φ_2), то в растворе, наряду с ним, должны фигурировать ротамеры (φ_2, φ_1), $(-\varphi_1, -\varphi_2)$, $(-\varphi_2, -\varphi_1)$ с той же энергией. Значения φ_1, φ_2 известны из рентгеноструктурных исследований. Следовательно, известен весь набор ротамеров и можно произвести расчет $\eta = \overline{\cos\varphi}$. Для несимметричных изотактических полимеров кристаллическая конформация (φ_1, φ_2) дает для свободной макромолекулы (φ_1, φ_2) и $(-\varphi_2, -\varphi_1)$, для синдиотактических кристаллическая конформация $(\varphi_1, \varphi_1, \varphi_2, \varphi_2)$ дает (φ_1, φ_1) и (φ_2, φ_2). Таким образом, повороты в соседних звеньях цепи коррелированы друг с другом (имеется кооперативность, см. выше § 2.4) и средний квадрат длины цепи выражается формулой

$$\overline{h^2} = \exp(-\Delta U/kT)(\overline{h^2})_{\Delta U=0}, \qquad (3,26)$$

где (в простейшем случае двух эквивалентных ротамеров)

$$\Delta U = U[(\varphi, \varphi), (\varphi, \varphi)] - U[(\varphi, \varphi), (-\varphi, -\varphi)].$$

Круглые скобки относятся к двум соседним мономерам цепи. Для цепей, кристаллизующихся в спиральной конформации, последовательность одинаковых ротамеров энергетически более выгодна, чем последовательность разных ротамеров. Иными словами, $\Delta U < 0$. Корреляция удлиняет цепь, делает ее более жесткой.

Величины ΔU можно найти теоретически. Для полиэтилена устойчивы конформации (0°, 0°), т. е. *транс, транс* (*tt*); (0°, 120°) и (0°, —120°) (*ts*); (120°, 0°), (—120°, 0°) (*st*) и (120°, 120°), (—120°, —120°), т. е. (*ss*).

Конформации (120°, —120°) и (—120°, 120°), т. е. (s^+s^-) и (s^-s^+) энергетически невыгодны. В этом случае в конформациях (*ts*) и (*st*) фигурируют неэквивалентные ротамеры и расчет $\overline{h^2}$ с учетом корреляции несколько сложнее, чем по формуле (3,26). Значения ΔU для (*tt*) и (*st*) равны нулю,

для (*ts*) и (*ss*) 0,5 *ккал/моль*, для (s^+s^-) 2,3—2,7 *ккал/моль*. Получаем

$$\overline{h^2} = 3{,}2\overline{h_0^2} = 1{,}6Nl^2, \qquad (3{,}27)$$

где $\overline{h_0^2}$ — величина $\overline{h^2}$, вычисленная при $\Delta U = 0$. В отличие от (3,25), эта величина согласуется с опытом.

Для несимметричных цепей формула Ока (3,20) уже недействительна. Теория приводит к более сложным выражениям, содержащим наряду с $\overline{\cos\varphi}$ еще и $\overline{\sin\varphi}$. Если привески симметричны, то $\overline{\sin\varphi} = 0$.

Поворотно-изомерная теория дает количественное истолкование физических характеристик макромолекул в растворе — размеров и формы клубков, дипольных моментов и оптических свойств. Теория хорошо согласуется с опытом [2, 3, 5]. Она раскрывает физический механизм растяжения полимеров — высокоэластичность каучука. При растяжении цепи происходит изменение набора ее конформаций. Механизм такого изменения — поворотная изомеризация. Поясним сказанное с помощью одномерной модели макромолекулы. Представим каждое звено стрелкой длиной l, которая может смотреть или вправо, или влево. Одному поворотному изомеру (обозначим его t) отвечают две соседние стрелки, смотрящие в одну сторону, другому (обозначим его s) — две соседние стрелки, смотрящие в разные стороны. Общая длина цепи выражается алгебраической суммой длин всех стрелок. На рис. 3.12, *а* изображена цепь, состоящая из

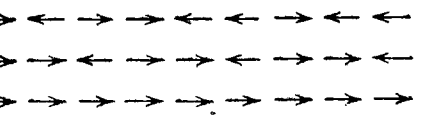


Рис. 3.12. Одномерная модель, иллюстрирующая растяжение цепи.

10 звеньев. Из них 5 смотрят вправо, 5 — влево; следовательно, общая длина цепи $h = 0$. В цепи пять t- и пять s-ротамеров (чтобы общее число ротамеров равнялось числу звеньев, т. е. 10, мы добавим еще «нулевое» звено, смотрящее вправо — оно показано пунктиром). Будем растягивать цепь силой, ориентирующей стрелки вправо. На рис. 3.12, *б* показано одно из вытянутых состояний цепи. Здесь длина цепи $h = (7—3)l = 4l$, а числа ротамеров остались прежними — их по пяти. Цепь удлинилась в результате перераспределения ротамеров без изменения их относительного содержания. Перераспределение описывается переходом $ttsststsst \rightarrow tttsstssts$. Оно не сопровождается изменением энергии, но энтропия меняется, убывая с увеличением упо-

рядоченности ротамеров. Однако путем простого перераспределения t- и s-ротамеров нельзя достичь полного растяжения цепи. Полностью растянутая цепь (рис. 3.12, *в*) состоит из десяти t-ротамеров. В этом случае превращение сопровождается не только изменением энтропии, но и изменением внутренней энергии, так как $10E_t \neq 5E_t + 5E_s$.

Таким образом, теория дает молекулярное истолкование растяжению полимера и предсказывает, что выражение для высокоэластической деформации (3,16) не может быть вполне строгим. Наряду с «энтропийной» упругостью должна быть и «энергетическая», поскольку разность энергий ротамеров ΔE отлична от нуля. Иными словами, должна быть отличной от нуля и величина

$$f' = \left(\frac{\partial E}{\partial h}\right)_T,$$

причем f' зависит от ΔE [2, 3, 31]. Это предсказание теории подтверждено опытом. Исследования термомеханических свойств каучукоподобных полимеров, проведенные Флори и его сотрудниками на основе поворотно-изомерной теории, не только показали наличие энергетической упругости, но и позволили найти значения ΔE из опыта, оказавшиеся в хорошем согласии с теоретическими [3, 32]. Вместе с тем прямое исследование растяжения полимеров методом инфракрасной спектроскопии показало, что при растяжении действительно изменяется относительное содержание ротамеров [2, 3, 33—35].

§ 3.4. МАКРОМОЛЕКУЛА — КООПЕРАТИВНАЯ СИСТЕМА

Звенья в цепи взаимосвязаны, и поэтому макромолекула представляет собой кооперативную систему. Состояние данного звена зависит от состояний соседних звеньев. Учет взаимосвязи приводит к тому, что в выражении для потенциальной энергии содержатся члены, зависящие от конформаций, по крайней мере двух соседних звеньев

$$U(\Omega_1, \Omega_2, \ldots, \Omega_N) = \sum_{k=1}^{N} U(\Omega_{k-1}, \Omega_k), \qquad (3,28)$$

где Ω_k — конформация k-го звена, представленная соответствующими углами поворотов.

Макромолекула — одномерная кооперативная система, в которой каждое звено имеет два соседних. Статистическое рассмотрение такой системы, вычисление для нее статистической суммы, несравненно проще, чем в случае двумерной и, тем более, трехмерной системы. Расчеты можно провести на основе одномерной модели Изинга (см. стр. 40). Статистическая сумма для

одномерной модели вычисляется с помощью матричного метода, предложенного Крамерсом и Ваннье [36] (см. также [2, 3, 37—41]), в аналитической форме.

Конформационная (ротамерная) статистическая сумма для макромолекулы в отсутствие внешних сил имеет вид

$$Z = \sum_{\Omega_1} \sum_{\Omega_2} \dots \sum_{\Omega_N} \exp\left(-\frac{U(\Omega_1, \Omega_2, \dots, \Omega_N)}{kT}\right). \qquad (3,29)$$

Суммирование производится по r ротамерам каждого звена. Если справедливо выражение (3.28), то

$$Z = \sum_{\Omega_1} \sum_{\Omega_2} \dots \sum_{\Omega_N} \prod_{k=1}^{N} g(\Omega_{k-1}, \Omega_k), \qquad (3,30)$$

где

$$g(\Omega_{k-1}, \Omega_k) = \exp\left(-\frac{U(\Omega_{k-1}, \Omega_k)}{kT}\right). \qquad (3,31)$$

Считая, что полимер состоит из повторяющихся однотипных единиц, можно рассматривать величины $g(\Omega_{k-1}, \Omega_k)$ как элементы некоторой матрицы

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} g(\Omega^{(1)}, \Omega^{(1)}) \dots g(\Omega^{(1)}, \Omega^{(r)}) \\ \dots\dots\dots\dots\dots\dots \\ \dots\dots\dots\dots\dots\dots \\ \dots\dots\dots\dots\dots\dots \\ g(\Omega^{(r)}, \Omega^{(1)}) \dots g(\Omega^{(r)}, \Omega^{(r)}) \end{pmatrix}. \qquad (3,32)$$

Введем обозначение

$$g\left(\Omega_{k-1}^{(\alpha)}, \Omega_k^{(\beta)}\right) = G_{\Omega_{k-1}^{(\alpha)}\Omega_k^{(\beta)}} = g_{\alpha\beta}.$$

Статистическую сумму (3,30) можно теперь переписать в виде

$$Z = \sum_{\Omega_1} \sum_{\Omega_2} \dots \sum_{\Omega_N} G_{\Omega_0\Omega_1} G_{\Omega_1\Omega_2} \dots G_{\Omega_{N-1}\Omega_N},$$

и по правилу перемножения матриц находим

$$Z = \sum_{\Omega_N} (\mathbf{G}^N)_{\Omega_0\Omega_N}. \qquad (3,33)$$

Вводя условие цикличности $\Omega_0 = \Omega_N$ (при $N \gg 1$ это условие не играет практически роли), получаем Z в виде следа (Sp), т. е. суммы диагональных членов матрицы $\mathbf{G}$, взятой в степени N

$$Z = \mathrm{Sp}(\mathbf{G}^N) = \lambda_1^N + \lambda_2^N + \dots + \lambda_r^N, \qquad (3,34)$$

где $\lambda_1, \lambda_2, \ldots, \lambda_r$ — собственные числа матрицы **G**. Все элементы матрицы положительны; следовательно, она имеет максимальное собственное число λ_1, большее всех остальных, вещественное, положительное и невырожденное (теорема Фробениуса, см. [42]). При $N \gg 1$

$$Z \approx \lambda_1^N. \tag{3,35}$$

Таким образом, вычисление ротамерной статистической суммы сводится к нахождению максимального корня матрицы λ_1. Зная Z, мы можем вычислить равновесные характеристики макромолекулы. В частности, этим методом получаются выражения для среднего квадрата длины цепи как в кристаллическом (спиральном) состоянии, так и в состоянии статистического клубка. В самом деле, уже фиксация валентного угла между соседними звеньями означает их корреляцию, т. е. кооперативность цепи. То же относится к корреляции поворотных изомеров. Формула Ока (3,20) и ей подобные для цепей с несимметричными привесками, а также формула (3,26) проще всего получаются матричным методом [3, 5].

Ограничимся здесь простейшим примером — расчетом растяжения одномерной кооперативной модели (см. рис. 3,12) внешней силой f. Пусть энергия t-ротамера, т. е. энергия двух соседних параллельных звеньев, равна $-\mathscr{E}$, энергия s-ротамера, т. е. двух соседних антипараллельных звеньев, равна $\mathscr{E}$. Следовательно, разность энергий двух ротамеров равна

$$\Delta E = 2\mathscr{E}. \tag{3,36}$$

Запишем это условие в форме

$$E_{ij} = \begin{cases} -\mathscr{E}\sigma_i\sigma_j, & \text{если } i = j+1, \\ 0, & \text{если } i \neq j+1. \end{cases} \tag{3,37}$$

Здесь $\sigma_i = 1$, если стрелка (т. е. звено) направлено вправо и $\sigma_i = -1$, если стрелка направлена влево; i и j — номера стрелок. Энергия E_{ij} равна нулю, если звенья расположены не рядом — корреляция распространяется только на соседние стрелки. Если на одномерную цепь действует внешняя сила, ориентирующая стрелки вправо, то каждое звено длиной l приобретает дополнительную энергию

$$E_f = -lf\cos\alpha = -lf\sigma_j, \tag{3,38}$$

где α — угол между **l** и **f**. Так как каждая стрелка может находиться лишь в двух положениях, то матрица **G** имеет второй порядок ($r = 2$). Согласно (3,31) находим

$$g(\sigma_j, \sigma_{j+1}) = \exp\left(\frac{\mathscr{E}}{kT}\sigma_j\sigma_{j+1} + \frac{lf}{kT}\sigma_j\right), \tag{3,39}$$

и матрица $\mathbf{G}$ получается при подстановке в $g(\sigma_j, \sigma_{j+1})$ значений σ_j и σ_{j+1}, равных $+1$ и -1:

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} g(1, 1) & g(1, -1) \\ g(-1, 1) & g(-1, -1) \end{pmatrix}. \tag{3,40}$$

Обозначив $a = \mathscr{E}/kT$, $b = lf/kT$, имеем

$$\mathbf{G} = \begin{pmatrix} \exp(a+b) & \exp(-a+b) \\ \exp(-a-b) & \exp(a-b) \end{pmatrix}. \tag{3,41}$$

Собственные числа находим из уравнения

$$\begin{vmatrix} \exp(a+b)-\lambda & \exp(-a+b) \\ \exp(-a-b) & \exp(a-b)-\lambda \end{vmatrix} = 0. \tag{3,42}$$

Они равны

$$\left.\begin{aligned} \lambda_1 &= e^a \operatorname{ch} b + (e^{2a} \operatorname{sh}^2 b + e^{-2a})^{1/2}, \\ \lambda_2 &= e^a \operatorname{ch} b - (e^{2a} \operatorname{sh}^2 b + e^{-2a})^{1/2}. \end{aligned}\right\} \tag{3,43}$$

Так как $\lambda_1 > \lambda_2$, то, согласно (3,35),

$$Z \approx \lambda_1^N = [e^a \operatorname{ch} b + (e^{2a} \operatorname{sh}^2 b + e^{-2a})^{1/2}]^N. \tag{3,44}$$

Мы получили простое аналитическое выражение для статистической суммы. Пользуясь им, вычислим среднюю длину цепи:

$$\bar{h} = kT \frac{\partial \ln Z}{\partial f} = NkT \frac{\partial \ln \lambda_1}{\partial f} = Nb \frac{\operatorname{sh} b}{(\operatorname{sh}^2 b + e^{-4a})^{1/2}}. \tag{3,45}$$

Мерой кооперативности здесь является величина $\mathscr{E}$, т. е. a, или разность энергий ротамеров ΔE. В отсутствие кооперативности, т. е. при $a = 0$,

$$\bar{h} = Nl \operatorname{th} b \equiv Nl \operatorname{th} \frac{fl}{kT} \tag{3,46}$$

(ср. с формулой (1,70)). При свободной ориентации стрелок длина цепи тем больше, чем больше сила и чем ниже температура. При малых силах, т. е. при $fl \ll kT$,

$$\bar{h} \approx Nl^2 f/kT, \tag{3,47}$$

или

$$f \approx \frac{kT}{Nl^2} \bar{h}, \tag{3,48}$$

т. е. длина цепи пропорциональна растягивающей силе (закон Гука), модуль упругости пропорционален абсолютной температуре в согласии с (3,16).

Если, напротив, $a \gg 1$, т. е. $\Delta E \gg kT$, то можно пренебречь в (3,45) величиной e^{-4a} и $\bar{h} = Nl$ независимо от действия силы.

Цепь жесткая, и потому она вытянута. Тот же результат получается при больших силах, т. е. при $fl \gg kT$. Здесь также $\mathrm{sh}^2 b \gg e^{-4a}$ — большая сила полностью растягивает цепь.

Средняя квадратичная длина ротамерной одномерной цепи, в отсутствие внешней силы, вычисляется непосредственно по формуле (3,18)

$$\overline{h^2} = Nl^2 + 2\sum_{i=2}^{N}\sum_{j=1}^{i-1}(\overline{\mathbf{l}_i\mathbf{l}_j}) = Nl^2\frac{1+\eta}{1-\eta} + 2l^2\frac{\eta(\eta^N-1)}{(1-\eta)^2}, \quad (3,49)$$

где η — средний косинус угла между соседними стрелками. В рассматриваемом случае (ср. (3,24))

$$\eta = \frac{\cos 0^\circ \exp(\mathscr{E}/kT) + \cos 180^\circ \exp(-\mathscr{E}/kT)}{\exp(\mathscr{E}/kT) + \exp(-\mathscr{E}/kT)} = \mathrm{th}(\mathscr{E}/kT)$$

и при $N \gg 1$

$$\overline{h^2} = Nl^2 \exp(2\mathscr{E}/kT) = Nl^2 \exp(\Delta E/kT). \quad (3,50)$$

Эта формула аналогична соотношению (3,26). Корреляция, определяемая энергетической выгодой параллельного расположения стрелок, удлиняет цепь.

Одномерная модель Изинга позволяет получить весьма поучительные результаты при рассмотрении макромолекул — систем с сильными взаимодействиями вдоль цепи. Для рассмотрения ферромагнетиков одномерная модель непригодна. В самом деле, заменяя длину стрелки $\mathbf{l}$ магнитным моментом $\boldsymbol{\mu}$ и внешнюю силу $\mathbf{f}$ напряженностью магнитного поля $\mathbf{H}$, мы получаем для намагничения формулу (3,45), не описывающую спонтанного намагничения и фазового перехода в точке Кюри (см. стр. 41). В теории ферромагнетизма необходима по крайней мере двумерная модель.

Изложенное показывает, что поворотная изомеризация полимера как при плавлении кристалла, так и при растяжении должна считаться кооперативным процессом. Это положение очень важно для понимания свойств биополимеров.

Статистика одномерных кооперативных систем имеет черты сходства с теорией цепей Маркова [21, 43, 44]. Цепями Маркова называются последовательности зависимых случайных событий. Вероятность данного события в цепи зависит от того, какие события ему предшествовали. В простой цепи Маркова вероятность наступления данного события зависит от осуществления одного предыдущего, в сложной — от осуществления нескольких предыдущих событий. Вероятности, таким образом, взаимосвязаны, и цепь Маркова есть система, кооперативная во времени. По-видимому, мы встречаемся с такой кооперативностью при рассмотрении финалистических эволюционирующих систем.

Математический аппарат теории цепей Маркова адекватен аппарату статистической теории кооперативной полимерной цепи. Полимерная цепь, в которой осуществляются сильные взаимодействия, определяющие ближний порядок, может моделироваться марковским процессом с памятью на конечное число шагов (см. [3], § 10). Однако физика здесь различна. Конформация макромолекулы непрерывно меняется благодаря тепловому движению. Конформация каждого звена зависит от конформаций как предшествующих, так и последующих звеньев. В этом смысле кооперативность в пространстве отлична от кооперативности во времени (см. [5], III, 8). Теория цепей Маркова непосредственно применима к исследованию состава и последовательности звеньев сополимеров, возникающих в результате полимеризации двух или нескольких мономеров, если вероятность присоединения мономера A или B к концу растущей цепи зависит только от того, какой мономер на этом конце находится. Такие сополимеры называются марковскими ([5]).

§ 3.5. ОСОБЕННОСТИ МАКРОМОЛЕКУЛЫ КАК СТАТИСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Отличие макромолекулярной цепи от цепи Маркова выражается и в нерассмотренном до сих пор запрете самопересечения цепи. При беспорядочном блуждании броуновской частицы такого запрета, естественно, нет — здесь мы имеем дело с последовательностью шагов («звеньев») во времени. Реальная макромолекула состоит из атомов, которые отталкиваются друг от друга на малых расстояниях. Выше были описаны ближние взаимодействия атомов, соседствующих друг с другом в цепи, — эти взаимодействия и приводят к ротамерии и корреляции ротамеров. Но в беспорядочно свернутой цепи реализуются и дальние взаимодействия — взаимное отталкивание атомов, удаленных друг от друга вдоль цепи, но оказавшихся близкими друг к другу в пространстве вследствие свертывания цепи в клубок. Отталкивание можно трактовать как наличие у атомов собственного объема и запрет взаимопроникновения атомов. Соответственно влияния взаимного отталкивания называются *объемными эффектами*.

Очевидно, что объемные эффекты должны возмущать распределение длин макромолекул, которое было найдено выше без учета этих эффектов. Если $\overline{h^2}$ истинное среднее значение h^2, то

$$\overline{h^2} = \alpha^2 (\overline{h^2})_0, \tag{3,51}$$

где $(\overline{h^2})_0$ — величина, вычисленная с учетом лишь ближних, но не дальних взаимодействий, α — фактор, характеризующий изме-

нение размера клубка вследствие дальних взаимодействий, т. е. объемных эффектов.

Объемные эффекты, характеризуемые величиной α, зависят не только от собственного объема атомов в цепи, но и от ее взаимодействия с растворителем. α зависит от растворителя, а также от температуры. Теоретическое вычисление α весьма сложно. Однако имеется возможность исключить возмущение распределения молекул по длинам экспериментально и определить таким образом невозмущенные размеры клубка.

В хороших растворителях исключенный объем возрастает, напротив, в плохих растворителях взаимное притяжение атомов цепи больше, чем их притяжение к молекулам растворителя, и объемные эффекты уменьшаются. При надлежащем выборе растворителя и температуры объем звена может в точности компенсироваться взаимным притяжением звеньев, эффект исключенного объема исчезает и $\alpha = 1$. Эти идеи были впервые развиты Флори [45—47]. Очевидно, что речь идет о явлении, аналогичном наблюдаемому в точке Бойля реального газа. При температуре Бойля отталкивание молекул компенсируется их взаимным притяжением. Флори ввел понятие θ-*точки* для растворов полимеров. Аналогично точке Бойля θ-точка есть температура, при которой обращается в нуль второй вириальный коэффициент осмотического давления (см. стр. 147), т. е. в θ-точке осмотическое давление раствора следует закону Вант-Гоффа.

Таким образом, теоретические расчеты характеристик макромолекул, не учитывающие дальних взаимодействий, следует сравнивать с экспериментальными результатами, найденными в θ-точке. Другая возможность состоит в пересчете результатов, полученных в хороших растворителях, на θ-точку. Такие пересчеты требуют теоретической оценки α. Для этого развита достаточно практичная теория (см. [2, 47, 48]). Объемные эффекты наиболее существенны в разбавленных растворах в хороших растворителях, которые используются чаще всего.

Ограниченность аналогии макромолекулярной цепи со стохастической марковской цепью во времени проявляется и в самих основах статистики макромолекул. Ее принципиальные особенности были рассмотрены Лифшицем [49]. Макромолекула характеризуется наличием *линейной памяти* — звенья связаны в единую цепь и расположены в ней последовательно. Поэтому звенья (частицы статистического ансамбля) принципиально различимы, каждое из них имеет свой номер в цепи и перестановка звеньев требует разрыва химических связей. Линейная память наличествует как в однородной, гомополимерной, цепи, так и в информационной цепи биополимера. Во втором случае память выражается наличием первичной структуры (см. стр. 73).

Фиксированная последовательность звеньев означает неполное равновесие цепи. Цепочечная структура обусловливает особенности флуктуационного поведения. Характерное время конформационной релаксации длинной и гибкой цепи пропорционально N^2 (N — число звеньев). Условие стабильности цепи имеет вид

$$N^2 \exp(-E_0/kT) \ll 1, \tag{3,52}$$

где E_0 — энергетические барьеры, мешающие разрыву валентных связей.

Обозначим через $\mathbf{x}_j$ координаты j-го звена цепи ($j = 1, 2, \ldots, N$). Благодаря взаимосвязи положения соседних звеньев коррелированы. Корреляцию можно выразить функциями $g_j = g(\mathbf{x}_j, \mathbf{x}_{j+1})$, и соответственно функция распределения звеньев в конфигурационном пространстве всех координат записывается следующим образом:

$$\rho(\mathbf{x}_1, \ldots, \mathbf{x}_N) = \prod_j g_j. \tag{3,53}$$

Введем координаты $\mathbf{y}_j = \mathbf{x}_{j+1} - \mathbf{x}_j$. Функции $g_j = g(\mathbf{y}_j)$ нормированы:

$$\int g_j \, dy_{j\xi} \, dy_{j\eta} \, dy_{j\zeta} = 1,$$

где $y_{j\xi}$ $y_{j\eta}$ $y_{j\zeta}$ — проекции вектора $\mathbf{y}_j$ на оси координат. Для простоты принято, что g_j зависят лишь от координат соседних звеньев, но не от их ориентации. Вероятность того, что j-е звено находится в точке $\mathbf{x}$, если нулевое закреплено в начале координат, для больших j равна

$$\rho_j(\mathbf{x}) \approx j^{-3/2} \exp(-x^2/4ja^2), \tag{3,54}$$

где

$$a^2 = {}^1/_6 \overline{y^2} = {}^1/_6 \int g(\mathbf{y}) y^2 \, dy_\xi \, dy_\eta dy_\zeta. \tag{3,55}$$

Таким образом, мы здесь имеем дело с гауссовым распределением (ср. стр. 127).

Как мы видели, при $N \gg 1$ свободная цепь сворачивается в статистический клубок вследствие флуктуаций изгиба. Линейные размеры клубка $h_N \sim a\sqrt{N}$, и его объем $V_N \sim a^3 N^{3/2}$. Следовательно, для средней плотности клубка имеем $N/V_N \sim a^{-3} N^{-1/2}$. Плотность звеньев в точке $\mathbf{x}$

$$n(\mathbf{x}) = \sum_{j=1}^{n} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_j), \tag{3,56}$$

где δ — функция Дирака, равная единице при $\mathbf{x} = \mathbf{x}_j$ и нулю при $\mathbf{x} \neq \mathbf{x}_j$. Среднее значение n вычисляется с помощью функции распределения (3,54). Имеем

$$\bar{n}(\mathbf{x})\, dx_\xi\, dx_\eta\, dx_\zeta = N\rho(\mathbf{r})\, dr_\xi\, dr_\eta\, dr_\zeta, \tag{3,57}$$

где

$$\mathbf{r} = \mathbf{x}/h_N, \quad h_N = a\sqrt{N}$$

и

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{8\pi^{3/2}} \int_0^1 \exp(-r^2/4s)\, \frac{ds}{s^{1/2}}. \tag{3,58}$$

В новом масштабе r плотность $\rho(\mathbf{r})$ существенно отлична от нуля на расстояниях $r \sim 1$, т. е. радиус системы $r_N \sim 1$. Рассмотрим теперь корреляцию флуктуаций. В отсутствие корреляций

$$\overline{n(\mathbf{x}_1)\, n(\mathbf{x}_2)} = \bar{n}(\mathbf{x}_1)\, \bar{n}(\mathbf{x}_2).$$

Следовательно, в качестве меры корреляции можно пользоваться величиной

$$w = \frac{\overline{n(\mathbf{x}_1)\, n(\mathbf{x}_2)} - \bar{n}(\mathbf{x}_1)\, \bar{n}(\mathbf{x}_2)}{\bar{n}(\mathbf{x}_1)\, \bar{n}(\mathbf{x}_2)} = \frac{\rho_{12}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)}{\rho_1(\mathbf{r}_1)\, \rho_2(\mathbf{r}_2)} - 1. \tag{3,59}$$

Для обычных равновесных систем, скажем, для газа, $w \propto N^{-1}$, т. е. для ансамбля, содержащего большое число частиц, корреляция мала. Напротив, для макромолекулы корреляция плотности существенно отлична от нуля на тех же расстояниях, где не равна нулю и сама плотность. Величина

$$\rho_{12}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \frac{1}{4\pi^{3/2}} \int_0^1 \int_0^1 \exp\left\{ -\frac{r_1^2}{4s_1} - \frac{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|^2}{4|\mathbf{s}_1 - \mathbf{s}_2|} \right\} \frac{ds_1\, ds_2}{s_1^{3/2} |\mathbf{s}_1 - \mathbf{s}_2|^{3/2}} \tag{3,60}$$

также убывает на расстояниях $r \sim 1$. Таким образом, радиус корреляции оказывается порядка радиуса системы, и мгновенная плотность не имеет определенного значения — она не является термодинамическим параметром, т. е. достоверной величиной при $N \to \infty$. Иными словами, макромолекулярный клубок непрерывно «пульсирует», его флуктуации в пространстве макроскопичны. Вместе с тем клубок — эргодическая система, его параметры, усредненные по экземплярам, совпадают с параметрами, усредненными по времени. Введенные здесь плотности $\rho(\mathbf{r})$ как раз и являются такими средними по времени.

Изложенные выше особенности существенны для понимания физических свойств глобулярных макромолекул, которые будут описаны в гл. 4.

Наличие линейной памяти и кооперативности в макромолекулярной цепи определяет ее особые свойства в информационном аспекте. Изменение конформации участка цепи влияет на его химическую реактивность и, наоборот, химические воздействия на участок цепи изменяют его конформационное состояние. События, происшедшие в каком-либо участке цепи, вызывают конформационные изменения во всей цепи. Макромолекулярная цепь способна служить каналом для передачи информации о химических событиях в некотором удаленном звене. В свою очередь конформационный сигнал, сообщенный началу цепи, может дойти до любого ее звена и вызвать изменение его химических свойств [50, 51]. Реализуются электронно-конформационные взаимодействия (ЭКВ, см. стр. 110). На языке неравновесной термодинамики сказанное означает сопряжение химических (электронных) процессов с конформационными перестройками, и мы можем написать в линейном приближении

$$\left.\begin{aligned} v_{\text{хим}} &= L_{11}A_{\text{хим}} + L_{12}A_{\text{конф}}, \\ v_{\text{конф}} &= L_{21}A_{\text{хим}} + L_{22}A_{\text{конф}}, \end{aligned}\right\} \qquad (3{,}61)$$

где v — скорость, A — значения сродства для химических и конформационных перестроек. Скорость химической реакции зависит от конформационного сродства и наоборот.

§ 3.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕСОВ МАКРОМОЛЕКУЛ

Исследование макромолекул как синтетических, так и биологических полимеров требует прежде всего определения молекулярных весов (м. в.). Эти определения производятся в растворах полимеров с помощью ряда методов. Методы, основанные на понижении точки замерзания и на повышении точки кипения раствора, — *криоскопия* и *эбуллиоскопия* — пригодны лишь для весьма разбавленных растворов полимера малого молекулярного веса (100—5000). Чувствительность таких методов падает с увеличением м. в., и ими практически не пользуются. Метод *изотермической перегонки*, основанный на понижеиии давления пара иад раствором по сравнению с чистым растворителем, достаточио точен в интервале м. в. 1000—20 000, но связан с большими экспериментальными трудностями [47, 52]. Теоретические основы этого метода в сущности те же, что и метода измерения осмотического давления, *осмометрии*, который весьма широко применяется в физике и физической химии полимеров [47, 52, 53].

Принципиальная схема осмометра показана на рис. 3.13. Мембрана M проницаема для молекул растворителя, но не для макромолекул. Условием равновесия раствора в камере II и чи-

стого растворителя в камере *I* служит равенство химических потенциалов растворителя в обеих камерах

$$\mu_1' = \mu_1'', \tag{3,62}$$

причем

$$\mu_1'' = \mu_1 + \int_{p_0}^{p_0+\Pi} \left(\frac{\partial \mu_1}{\partial p}\right)_T dp, \tag{3,63}$$

где μ_1 — химический потенциал растворителя в камере *II* при атмосферном давлении p_0, Π — осмотическое давление. Но $(\partial\mu_1/\partial p)_T = \bar{V}_1$ есть парциальный мольный объем растворителя — величина, практически не зависящая от давления. Следовательно,

$$\mu_1'' = \mu_1 + \bar{V}_1\Pi = \mu_1'. \tag{3,64}$$

В пределе, когда концентрация растворенного вещества c в камере *II* стремится к нулю, получаем

$$\Pi/c = RT/M. \tag{3,65}$$

Это — *закон Вант-Гоффа*. Концентрация c выражена в $г/см^3$, M для полидисперсных полимеров имеет смысл среднечисленного м. в.

$$M = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i}. \tag{3,66}$$

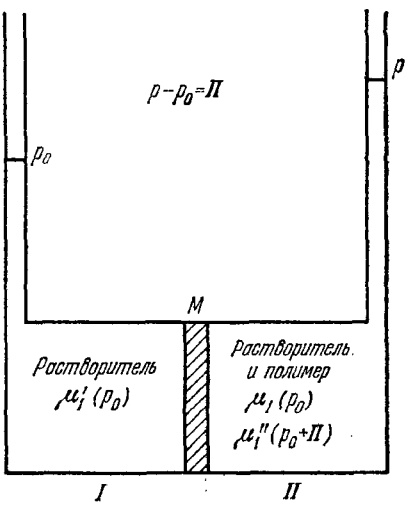


Рис. 3.13. Схема осмометра.

Закон Вант-Гоффа справедлив для идеальных растворов при любых концентрациях, а не только при $c \to 0$. Но растворы цепных макромолекул всегда не идеальны по принципиальным причинам (см. [2, 47, 48, 52, 53]). Поэтому выполняется соотношение

$$\Pi = \frac{RT}{M} c + Bc^2 + Cc^3 + \ldots; \tag{3,67}$$

B, C и т. д. — второй, третий и т. д. вириальные коэффициенты. Для разбавленных растворов $Cc^3 \ll Bc^2$. Строя график зависимости Π/c от c, мы получаем линию, отсекающую на оси ординат отрезок RT/M, и находим M. Наклон кривой при $c \to 0$ дает

значение B. На рис. 3.14 показаны такие графики для полиметилметакрилата в трех различных растворителях. Чувствительность осмометрического метода тоже падает с ростом M, но он практически применим примерно до м. в. 300 000.

Сравнительно простые измерения *вязкости* раствора также дают сведения о молекулярном весе макромолекул. Измеряется характеристическая вязкость, определяемая как

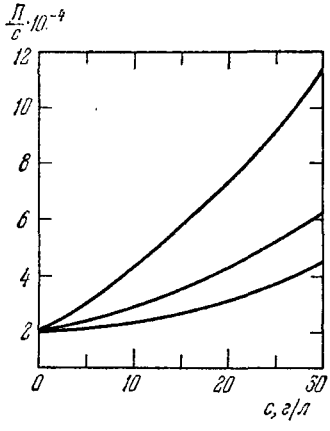


Рис. 3.14. Графики зависимости П/c от концентрации c для полиметилметакрилата в трех различных растворителях.

$$[\eta] = \lim_{c\to 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c} = \lim_{c\to 0} \frac{\eta_{sp}}{c}, \quad (3{,}68)$$

где η — вязкость раствора, η_0 — вязкость чистого растворителя, c — весовая концентрация полимера, η_{sp} — так называемая удельная вязкость раствора. Величина $[\eta]$ зависит от M.

Вязкость жидкости η характеризует внутреннее трение в ламинарном потоке, скорость диссипации энергии. Наличие растворенных макромолекул искажает поле потока и вызывает увеличение вязкости по сравнению с чистым растворителем. Это увеличение выражает потери энергии, связанные с вращением макромолекул в потоке. Вычисление потерь энергии достаточно сложно. Однако если принять, что поле потока не возмущено, но энергия диссипирует при движении частицы относительно окружающей жидкости, то расчет можно упростить. Эйнштейн [54] получил выражение для вязкости раствора, содержащего любое число частиц, настолько удаленных друг от друга, что возмущения потока, вызываемые отдельными частицами, не взаимодействуют друг с другом. Имеем

$$\eta = \eta_0(1 + \nu\varphi), \quad (3{,}69)$$

где ν — коэффициент, φ — отношение суммарного объема всех растворенных или суспендированных частиц к общему объему системы. Если V — объем растворенной макромолекулы и $N_1 = N_A c/M$ — число частиц в 1 $см^3$, то (N_A — число Авогадро)

$$\varphi = N_A c V/M,$$

и характеристическая вязкость $[\eta]$ (3,68) равна

$$[\eta] = \nu \frac{N_A V}{M}. \quad (3{,}70)$$

Для растворов твердых сферических частиц Эйнштейн получил $\nu = 2{,}5$. Симха [55] провел расчеты для растворов твердых эллипсоидов вращения и нашел, что ν всегда больше 2,5 и зависит от отношения полуосей. (Подробное изложение теории вязкости применительно к растворам макромолекул см. в [48, 53].)

В случае твердых сфер V пропорционально M, и, следовательно, $[\eta]$ от M не зависит. Это справедливо для любых твердых частиц, если их масса и размеры увеличиваются в некотором гомологическом ряду с сохранением подобия формы. Вместе с тем для растворов жестких палочкообразных частиц, у которых длинная ось растет с M, а поперечные размеры постоянны, ν зависит от M. Можно рассматривать такую частицу как вытянутый эллипсоид вращения с отношением полуосей b. Теория дает для $20 \leqslant b \leqslant 300$ значения $38{,}6 \leqslant \nu \leqslant 4278$ и

$$[\eta] = KM^{1{,}7},$$

где K — константа, характерная для данной системы полимер — растворитель.

Гибкие макромолекулы образуют в растворе клубки, частично или полностью проницаемые для растворителя. $[\eta]$ оказывается зависящей от молекулярного веса

$$[\eta] = KM^{a}, \tag{3,71}$$

причем $0{,}5 \leqslant a \leqslant 1{,}0$ в зависимости от гидродинамической проницаемости клубка, т. е. от того, в какой мере проходит через него растворитель. Для полностью проницаемого клубка $a = 1{,}0$. Напротив, для непроницаемого клубка $a = 0{,}5$. В последнем легко убедиться путем грубого расчета. Непроницаемый клубок можно рассматривать как сферу радиуса

$$r = \sqrt{\overline{h^2}/6} = \gamma M^{0{,}5},$$

где $\overline{h^2}$ — средний квадрат расстояния между концами цепи, т. е. величина, пропорциональная M (см. стр. 129). Согласно закону Эйнштейна (3,70) имеем

$$[\eta] = \nu \frac{N_A 4\pi r^3}{3M} = 2{,}5 \frac{N_A 4\pi \gamma^3 M^{3/2}}{3M} = KM^{0{,}5},$$

или

$$[\eta] = \Phi \frac{(\overline{h^2})^{3/2}}{M}. \tag{3,72}$$

Это *формула Флори — Фокса* [56], справедливая для любого полимера в θ-точке (см. стр. 143). Порядок величины константы Φ легко найти из приведенного расчета. Если концентрация выражена в граммах на децилитр, то $\Phi \sim 10^{21}$. Опыт дает для большинства изученных полимеров $\Phi = 2{,}2 \cdot 10^{21}$. Как показали

Птицын и Эйзнер [57], при температуре, отличной от θ-точки, в хорошем растворителе, в котором существенны объемные эффекты,

$$[\eta] = KM^{0,5+\varepsilon}, \qquad (3,73)$$

причем ε обычно варьирует от 0,2 до 0,3, но может достигать и 0,5. В θ-точке $\varepsilon = 0$.

Очевидно, что формула (3,71) универсальна — она применима как к жестким, так и к гибким частицам. Для жестких сфер $a = 0$, для длинных жестких стержней $a = 1{,}7$, для гибких макромолекул, как уже сказано, $0{,}5 \leqslant a \leqslant 1{,}0$.

Соотношение $[\eta] = KM^{1,7}$, полученное для жестких длинных частиц, оказалось справедливым для растворов вируса табачной мозаики, а также для сравнительно коротких полипептидных цепей.

Формулу (3.71) можно применить для определения м. в. полимера, если из независимых данных известны K и a.

Наилучшим абсолютным методом измерения м. в. и молекулярно-весовых распределений, особенно широко применяемым в биофизике, биохимии и молекулярной биологии, является *седиментационный*. Метод состоит в осаждении макромолекул под действием центробежной силы в ультрацентрифуге, вращающейся со скоростью порядка $10^4 — 10^5$ *об/мин*. Центробежное ускорение при этом во много раз превышает ускорение силы тяжести g. В современных ультрацентрифугах оно доходит до $350\,000\,g$ (число оборотов в минуту 70 000). Кювета с раствором полимера помещается в ротор центрифуги. Кювета представляет собой цилиндр с прозрачными окнами из кристаллического кварца. Через кювету проходит пучок света, и наблюдение за седиментацией производится оптическими методами. Впервые седиментация в ультрацентрифуге была применена к изучению полимеров Сведбергом в 1925 г. Подробное описание экспериментальных методов приведено в [48, 58].

Если скорость седиментации значительно превосходит скорость диффузии макромолекул, то они осаждаются. В первоначально гомогенном растворе образуются две области — чистый растворитель и раствор. Между ними находится переходная зона, в которой концентрация полимера меняется от нулевого до некоторого максимального значения. По мере седиментации эта зона и ее граница перемещаются. Измеряется скорость движения границы по направлению к дну кюветы, т. е. от оси вращения ротора.

На макромолекулу действует центробежная сила $V\rho_M\omega^2 x$, где V — объем макромолекулы, ρ_M — ее плотность, ω — угловая скорость ротора, x — расстояние до оси вращения. Но макромолекула находится в растворе. Следовательно, на нее действует ар-

химедова сила, и эффективная центробежная сила равна $V(\rho_M - \rho_0)\omega^2 x$, где ρ_0 — плотность растворителя. Эта сила уравновешивается силой трения при поступательном перемещении $\varkappa \dot{x}$ ($\varkappa$ — коэффициент трения). Тогда в расчете на 1 *моль* получим

$$N_A V \rho_M (1 - \bar{V}\rho_0)\omega^2 x = \varkappa \frac{dx}{dt},$$

где $\bar{V} = \rho_M^{-1}$ — удельный парциальный объем макромолекулы. Но

$$N_A V \rho_M = M,$$

и для разбавленных растворов $\varkappa$ выражается через коэффициент диффузии D (формула Эйнштейна) следующим образом:

$$\varkappa = \frac{RT}{D}. \qquad (3,74)$$

Итак, мы получили формулу, названную именем Сведберга:

$$M = \frac{RTs}{(1 - \bar{V}\rho_0) D}, \qquad (3,75)$$

где s — коэффициент седиментации

$$s = \frac{1}{\omega^2 x}\frac{dx}{dt} = \frac{1}{\omega^2}\frac{d \ln x}{dt}. \qquad (3,76)$$

Размерность s — *сек*, единица коэффициента седиментации — сведберг, $1\,S = 10^{-13}$ *сек*.

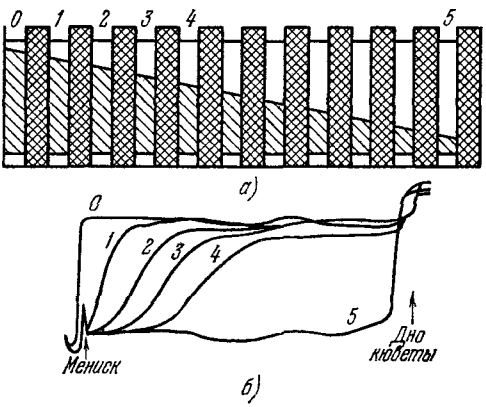


Рис. 3.15. Седиментационная диаграмма для β-лактоглобулина.

а) Фотографии седиментирующей границы в последовательные моменты; *б*) результаты фотометрирования.

На ультрацентрифуге измеряется коэффициент седиментации, определяющий скорость перемещения седиментационной границы. На рис. 3.15 показана седиментационная диаграмма для белка β-лактоглобулина. В ультрафиолетовом свете сфотографированы последовательные во времени положения седиментирующей границы. Измерив s, коэффициент диффузии D, а также ρ_M и ρ_0, можно определить M. Величина s зависит от концентрации раствора вследствие гидродинамического взаимодействия макромолекул. Значение s, экстраполированное к нулевой концентрации,

$$s_0 = \lim_{c \to 0} s, \qquad (3,77)$$

называется *константой седиментации*. Значения M и s_0 зачастую симбатны, хотя и не пропорциональны. В табл. 3.2 приведены некоторые значения M и s_0 для белков.

Таблица 3.2

Значения M и s_0 (в сведбергах) для некоторых белков

Название белка	M	s_0	Название белка	M	s_0
Рибонуклеаза	13 700	1,64	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	122 000	7,0
Лизоцим	14 100	1,9			
Миоглобин	17 600	2,04	γ-глобулин человека	185 000	7,4
Цитохром *c*	22 400	2,5	Фибриноген человека	450 000	9,0
Трипсин	23 800	2,5	Каталаза	240 000	11,0
Пепсин	35 000	3,3	Фикоэритрин	290 000	12,0
Сывороточный альбумин человека	65 000	4,3	Уреаза	630 000	18,6
			Актомиозин кролика	$5 \cdot 10^6$	35,0
Гемоглобин	68 000	4,5	Гемоцианин	$9 \cdot 10^6$	103,0

При меньших числах оборотов ультрацентрифуги может установиться равновесие вследствие равенства встречных седиментационного и диффузионного потоков. Если коэффициент диффузии D достаточно велик, то равновесие устанавливается достаточно быстро и наблюдается равновесное распределение вещества.

Если c — концентрация растворенного вещества на расстоянии x от оси вращения, зависящая от времени, то число молекул, седиментирующих за время dt через единицу поверхности, перпендикулярной x, равно

$$c\frac{dx}{dt}\,dt,$$

где dx/dt — скорость седиментации на расстоянии x. За то же время dt количество диффундирующего через то же сечение растворенного вещества равно

$$D\frac{dc}{dx}\,dt.$$

В равновесии

$$c\frac{dx}{dt} = D\frac{dc}{dx}. \tag{3,78}$$

Но, согласно (3,75) и (3,76),

$$\frac{dx}{dt} = s\omega^2 x = \frac{M(1-\overline{V}\rho_0)}{RT}\,D\omega^2 x,$$

и мы получаем для молекулярного веса второе уравнение Сведберга, уже не содержащее коэффициента диффузии,

$$M = \frac{RT}{(1 - \bar{V}\rho_0)\,\omega^2 x} \frac{d \ln c}{dx}. \tag{3,79}$$

Интегрируя это уравнение в интервале между двумя точками, находящимися на расстояниях x_1 и x_2 от оси вращения, имеем

$$M = \frac{2RT}{(1 - \bar{V}\rho_0)\,\omega^2} \frac{\ln (c_2/c_1)}{x_2^2 - x_1^2}. \tag{3,80}$$

Для определения M обычно применяется метод Арчибальда [48, 58, 59], требующий гораздо меньшего времени, чем описанные выше методы, и малых количеств вещества. Исследуется не само равновесие, но приближение к нему. Поток вещества через мениск и дно кюветы равен нулю независимо от достижения равновесия. Следовательно,

$$\frac{1}{x_m}\frac{1}{c_m}\left(\frac{dc}{dx}\right)_m = \frac{1}{x_b}\frac{1}{c_b}\left(\frac{dc}{dx}\right)_b = \frac{s\omega^2}{D}.$$

Индекс m относится к мениску, b — к дну кюветы. Находим отсюда

$$\left.\begin{aligned} M &= \frac{RT}{(1 - \bar{V}\rho_0)\,\omega^2} \frac{(dc/dx)_m}{x_m c_m}, \\ M &= \frac{RT}{(1 - \bar{V}\rho_0)\,\omega^2} \frac{(dc/dx)_b}{x_b c_b}. \end{aligned}\right\} \tag{3,81}$$

Для гомогенного полимера эти две величины M совпадают друг с другом.

В 1957 г. был предложен новый метод седиментационного анализа, нашедший широкое применение в молекулярной биологии и биофизике, в частности при исследовании нуклеиновых кислот (см. ниже гл. 8) — *метод седиментации в градиенте плотности* [60].

В концентрированном растворе низкомолекулярного вещества, в частности в солевом растворе, при длительном ультрацентрифугировании устанавливается градиент концентрации, или, что то же самое, градиент плотности $d\rho_0/dx$. Если поместить в такой раствор, служащий здесь растворителем, макромолекулы, то в силу пропорциональности s и $(1 - \bar{V}\rho_0)$, где ρ_0 — по-прежнему плотность растворителя, они будут располагаться в той части кюветы, в которой $s = 0$, т. е. $\bar{V}\rho_0 = 1$, или $\rho_0 = \rho_M$. Иными словами, макромолекулы локализуются в той области кюветы, где плотность концентрированного солевого раствора совпадает с плотностью макромолекул и, значит, плотность ρ_M можно измерить непосредственно. Гетерогенная смесь макромолекул

разделяется, и при использовании этого метода наблюдается целый спектр плотностей. Полоса в таком спектре несколько размазана вследствие диффузии. Распределение концентраций в полосе, т. е. в зоне локализации макромолекул, становится гауссовым:

$$c = c_0 \exp(-x^2/2\sigma^2), \tag{3,82}$$

где c_0 — концентрация, отвечающая центру полосы. Дисперсия гауссова распределения σ характеризует ширину полосы. Расчет показывает, что

$$\sigma^2 = RT\rho_0 \Big/ \left(M \frac{d\rho}{dx} \omega^2 x\right), \tag{3,83}$$

где ρ_0 — плотность в центре полосы. Из определения зависимости $\ln c$ от x^2 находим σ^2 и, следовательно, молекулярный вес M (подробное описание метода см. в [48, 58, 61]).

Мы видим, что диффузия служит одним из определяющих факторов в седиментационных процессах. В методе, основанном на измерении скорости седиментации, необходимы прямые определения коэффициента диффузии D. Диффузия создает возможность определения M в методе седиментации в градиенте плотности. Вместе с тем изучение диффузии дает информацию о подвижности макромолекул и, тем самым, об их геометрических и гидродинамических свойствах.

Диффузия возникает вследствие градиента концентрации. Диффузионный поток в направлении x равен (первое уравнение Фика)

$$J = -D \frac{dc}{dx}. \tag{3,84}$$

Но в нестационарных условиях концентрация изменяется вследствие диффузии, т. е. меняется и поток. Имеем

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{\partial J}{\partial x}.$$

Отсюда получаем второе уравнение Фика

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x}\left(D \frac{\partial c}{\partial x}\right) \tag{3,85}$$

и, если D не зависит от x,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \tag{3,86}$$

Экспериментальная задача состоит в измерении D. Для этого оптическими методами определяется градиент концентрации. В специальной кювете осторожно наслаивают друг на друга раствор и чистый растворитель и исследуют преломление или интерференцию света. Принципы действия и устройство современных диффузометров описаны в [48].

Формула Эйнштейна (3,74) справедлива для идеального раствора. Растворы полимеров далеко не идеальны. Уравнение Эйнштейна следует из закона Вант-Гоффа для осмотического давления (3,65). Из реального соотношения (3,67) получается

$$D = \frac{1}{f}\left(kT + 2BMc + 3CMc^2 + \ldots\right) \qquad (3,87)$$

и, значит, D зависит от концентрации.

Коэффициент трения $\varkappa$ зависит от формы макромолекулы и ее проницаемости для растворителя. Для твердых сфер справедлив закон Стокса (r — радиус сферы)

$$\varkappa_{сф} = 6\pi\eta_0 r. \qquad (3,88)$$

В случае твердых эллипсоидов вращения коэффициенты трения при движении частицы в направлении, параллельном ($\varkappa_\parallel$) и перпендикулярном ($\varkappa_\perp$) оси эллипсоида, различны. Обе величины $\varkappa_\parallel$ и $\varkappa_\perp$ зависят от отношения осей b. Так, для весьма вытянутого эллипсоида ($b > 10$)

$$\varkappa_\parallel = \frac{4\pi\eta_0 L}{2\ln 2b - 1}, \quad \varkappa_\perp = \frac{8\pi\eta_0 L}{2\ln 2b + 1},$$

где L — длина главной оси эллипсоида. Практически наблюдаемое среднее значение дается выражением

$$1/\varkappa = {}^1/_3\,(1/\varkappa_\parallel + 2/\varkappa_\perp),$$

и при $b > 10$

$$\varkappa = \frac{3\pi\eta_0 L}{\ln 2b}. \qquad (3,89)$$

Коэффициент трения для эллипсоида больше, чем для сферы того же объема.

Формулу (3.88) можно переписать в виде

$$\varkappa_{сф} = 6\pi\eta_0\,(3V/4\pi)^{1/3},$$

где V — объем сферы. Для эллипсоида

$$\varkappa = 6\pi\eta_0\,(3V/4\pi)^{1/3}\varkappa/\varkappa_{сф}. \qquad (3,90)$$

Отношения $\varkappa/\varkappa_{сф}$ для частиц равного объема известны (см. [43]). Они зависят только от b. Следовательно, зная V, т. е. M и плотность, можно определить b по измерениям $\varkappa$, т. е. D. Так как макромолекулы белков в нативном состоянии являются твердыми частицами (см. ниже гл. 4), изучение диффузии служит прямым методом определения их формы.

Теория поступательного трения гибких цепных макромолекул, естественно, более сложна. Она строится на тех же основаниях, что и теория вязкости, — в обоих случаях речь идет о гидродинамике. Измерения диффузии позволяют найти статистические линейные размеры макромолекул [48].

§ 3.7. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Богатую информацию о макромолекулах — об их молекулярном весе, размерах и форме — дает исследование *рассеяния света*. Рассеяние света — важнейшее явление молекулярной оптики, изучение которого позволяет получать ценные и разнообразные сведения о строении и свойствах молекул, жидкостей и твердых тел [62, 63].

Совершенно однородная среда не должна рассеивать света — вторичные световые волны, излучаемые электронами молекул, возбужденными падающей волной, когерентны и гасят друг друга по всем направлениям, кроме разрешенных законами геометрической оптики. Однако в любой среде всегда имеются флуктуации — отклонения от равномерного распределения положений и ориентаций молекул. Свет рассеивается на флуктуациях плотности и флуктуациях ориентаций в газах и жидкостях, на флуктуациях концентраций в растворе.

Под действием электрического поля световой волны $\mathbf{E}_0$ в объеме вещества $\tilde{V}$, малом по сравнению с λ^3, где λ — длина световой волны, индуцируется диполь, излучающий вторичные волны. Электрическое поле вторичной волны в точке, находящейся на расстоянии r от диполя, выражается формулой

$$E_\vartheta = \frac{4\pi^2}{\lambda^2 r} p \sin\vartheta, \tag{3,91}$$

где $p = |\mathbf{p}|$ — величина индуцированного дипольного момента, ϑ — угол между векторами $\mathbf{r}$ и $\mathbf{p}$ (т. е. $\mathbf{E}_0$). Дипольный момент объема $\tilde{V}$ равен

$$\mathbf{p} = \frac{\varepsilon - 1}{4\pi} \tilde{V} \mathbf{E}_0, \tag{3,92}$$

где $\varepsilon = n^2$ — квадрат показателя преломления вещества. При наличии флуктуаций

$$\varepsilon = \bar{\varepsilon} + \Delta\varepsilon \tag{3,93}$$

и

$$\mathbf{p} = \mathbf{p} + \Delta\mathbf{p} = \frac{\bar{\varepsilon} - 1}{4\pi} \tilde{V} \mathbf{E}_0 + \frac{\Delta\varepsilon}{4\pi} \tilde{V} \mathbf{E}_0. \tag{3,94}$$

Так как рассеяние определяется только флуктуациями, величина напряженности электрического поля световой волны, рассеянной объемом $\tilde{V}$, равна

$$E_\vartheta^s = \frac{4\pi^2}{\lambda^2 r} \frac{\Delta\varepsilon}{4\pi} E_0 \tilde{V} \sin\vartheta \tag{3,95}$$

и для измеряемой интенсивности рассеянного излучения получим

$$J_\vartheta = \overline{(E_\vartheta^s)^2} = \frac{\pi^2}{\lambda^4 r^2}\,\overline{(\Delta\varepsilon)^2}\,\tilde{V}^2 J_0 \sin^2\vartheta, \qquad (3{,}96)$$

где J_0 — интенсивность падающего света. Флуктуация ε, т. е. показателя преломления n, выражается через флуктуацию плотности ρ или числа частиц N в объеме $\tilde{V}$:

$$\Delta\varepsilon = \frac{\partial\varepsilon}{\partial\rho}\Delta\rho = \frac{\partial\varepsilon}{\partial\rho}\bar{\rho}\frac{\Delta N}{\bar{N}}, \qquad (3{,}97)$$

так как $\Delta\rho = \bar{\rho}\,\Delta N/\bar{N}$.

Весь рассеивающий объем V состоит из большого числа микроскопических объемов $\tilde{V}$ и суммарное поле рассеянного света слагается из полей, создаваемых этими объемами $\tilde{V}$. Суммарная интенсивность представится средним значением квадрата суммарной напряженности. Средний квадрат флуктуации ΔN равен [62]

$$\overline{(\Delta N)^2} = \bar{N}.$$

После несложных преобразований получаем суммарную интенсивность

$$J_\vartheta^{(s)} = \frac{\pi^2}{\lambda^4 r^2}\sin^2\vartheta\left(\frac{\partial\varepsilon}{\partial\rho}\bar{\rho}\right)^2\frac{V}{N_1}J_0, \qquad (3{,}98)$$

где N_1 — число частиц в единице объема.

Для газа $\varepsilon - 1 = n^2 - 1 = \text{const}\cdot\bar{\rho}$, следовательно,

$$\frac{\partial\varepsilon}{\partial\rho} = \frac{\varepsilon - 1}{\bar{\rho}} = \frac{n^2 - 1}{\bar{\rho}} \approx \frac{2(n-1)}{\bar{\rho}}. \qquad (3{,}99)$$

Для естественного падающего света получаем

$$J_\theta = \frac{2\pi^2}{\lambda^4 r^2}(1 + \cos^2\theta)(n-1)^2\frac{V}{N_1}J_0, \qquad (3{,}100)$$

где θ — угол между направлениями падающего и рассеянного света. Это — формула Рэлея. Полную интенсивность света, рассеянного по всем направлениям объемом газа V, найдем, проинтегрировав выражение (3,100) по поверхности сферы радиуса r:

$$J^{(s)} = \frac{32\pi^3}{3\lambda^4}(n-1)^2\frac{V}{N_1}J_0. \qquad (3{,}101)$$

Вследствие рассеяния свет, проходящий через слой вещества толщиною l, ослабляется по закону

$$J = J_0\exp(-\chi l), \qquad (3{,}102)$$

где χ — *коэффициент мутности*, равный отношению интенсивности света, рассеянного единицей объема, к интенсивности падающего света

$$\chi = \frac{32\pi^3}{3\lambda^4} \frac{(n-1)^2}{N_1}. \qquad (3,103)$$

Рассеяние света удобно характеризовать приведенной интенсивностью, или отношением Рэлея R_θ:

$$R_\theta = \frac{J_\theta r^2}{J_0 V} = \frac{2\pi^2 (n-1)^2}{\lambda^4 N_1} (1 + \cos^2\theta); \qquad (3,104)$$

тогда для χ получим

$$\chi = \frac{16\pi}{3} \frac{R_\theta}{(1+\cos^2\theta)}. \qquad (3,105)$$

Перейдем от газа к раствору. Формула, эквивалентная (3,104), имеет вид (см. [48, 62])

$$R_\theta = \frac{2\pi^2 n_0^2 (n-n_0)^2}{\lambda^4 N_1} (1 + \cos^2\theta), \qquad (3,106)$$

где n, n_0 — показатели преломления раствора и чистого растворителя соответственно. Выразим n и N_1 через весовую концентрацию c. Имеем

$$N_1 = \frac{cN_A}{M}, \quad \frac{n-n_0}{c} = \frac{dn}{dc}$$

и

$$R_\theta = \frac{2\pi^2 n_0^2 cM}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 (1 + \cos^2\theta) = {}^1/_2\, HcM\,(1 + \cos^2\theta), \qquad (3,107)$$

где

$$H = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2, \qquad (3,108)$$

и для коэффициента мутности находим

$$\chi = \frac{8\pi}{3} HcM. \qquad (3,109)$$

Таким образом, зная n, n_0 и c и измерив коэффициент мутности, т. е. потерю света на рассеяние, можно определить м. в. M растворенного вещества.

Однако аналогия с газом, на которой основывается переход от (3,104) к (3,106), справедлива лишь для разбавленного идеального раствора, в котором флуктуации в малых объемах V независимы друг от друга. В реальных растворах макромолекул набухание клубков приводит к взаимодействию между центрами рассеяния, зависящему от концентрации. В этом случае уже

нельзя положить $\overline{(\Delta N)^2} = \bar{N}$ (см. стр. 157) и для расчета R_θ или χ нужно воспользоваться теорией Эйнштейна, объясняющей рассеяние света жидкостью [62, 64]. Вместо (3,106) теория дает для неидеального раствора

$$R_\theta = \frac{2\pi^2 n_0^2 c\,(1+\cos^2\theta)}{\lambda^4 N_A \frac{d}{dc}(\Pi/RT)}\left(\frac{dn}{dc}\right)^2 = Hc\,\frac{1+\cos^2\theta}{2\frac{d}{dc}(\Pi/RT)}, \qquad (3,110)$$

где Π — осмотическое давление. Согласно (3,67)

$$R_\theta = {}^1/_2 Hc\,(1+\cos^2\theta)\,\frac{1}{1/M + (2B/RT)\,c + \ldots} \qquad (3,111)$$

и

$$\chi = \frac{8\pi}{3} Hc\,\frac{1}{1/M + (2B/RT)\,c + \ldots},$$

или

$$\frac{8\pi}{3}\frac{Hc}{\chi} = \frac{1}{M} + \frac{2B}{RT}c + \ldots \qquad (3,112)$$

Определение M требует измерений χ и H для ряда концентраций c. Экстраполяция к $c \to 0$ кривой зависимости Hc/χ от концентрации дает средневесовое значение м. в. для полидисперсного полимера

$$M_w = \frac{\sum_i c_i M_i}{\sum_i c_i} = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} \qquad (3,113)$$

(ср. с (3,66)).

Такой метод определения молекулярного веса, разработанный Дебаем [65], тем точнее, чем больше м. в. В этом смысле метод светорассеяния имеет преимущества перед осмометрическим (см. § 3.6). Описание ряда нефелометров — приборов для измерения мутности среды χ, приведено в [48].

Изложенная теория относится к частицам, размеры которых много меньше длины волны λ. Если это условие не выполняется, то необходимо учесть разность фаз вторичных световых волн, испускаемых разными точками частицы. Волны, рассеиваемые частицей, интерферируют, вследствие чего суммарная интенсивность рассеянного света уменьшается. Изменяется угловое распределение рассеяния — в формулах для интенсивности появляется добавочный множитель, сложная функция $P(\theta)$, асимметричная относительно θ. Интенсивность света, рассеянного вперед, больше, чем рассеянного назад, — наблюдается *эффект*

Ми. Его легко истолковать. На рис. 3.16 изображена рассеивающая частица. На эквивалентные рассеивающие элементы A и B падают параллельные лучи S_1A и S_2B. Пути, проходимые лучами до точки P_1, находящейся за частицей, S_1AP_1 и S_2BP_1 неодинаковы. $S_1A < S_2B$, но $AP_1 > BP_1$, и поэтому полная разность хода невелика. Напротив, в точке P_2, расположенной перед частицей, $S_2B > S_1A$ и $BP_2 > AP_2$. Следовательно, разность хода здесь больше и интерференционное гашение рассеянного света сильнее. Теория эффекта Ми основывается на рассмотрении дифракционных явлений [62, 66]. Теория дает для сферических частиц радиуса r формулу, выведенную еще Рэлеем,

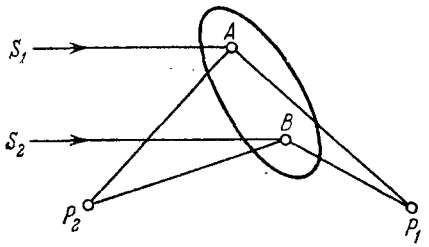


Рис. 3.16. К объяснению эффекта Ми.

$$P(\theta) = \left[\frac{3}{z^3}(\sin z - z\cos z)\right]^2, \tag{3,114}$$

где $z = (4\pi r/\lambda)\sin {}^1/_2\theta$. Этим выражением можно пользоваться при оптическом исследовании глобулярных белков.

Для палочкообразных жестких частиц длины L, много большей их поперечника,

$$P(\theta) = \frac{1}{y}\,\mathrm{si}\,(2y) - (\sin y/y)^2, \tag{3,115}$$

где

$$y = \frac{2\pi L}{\lambda}\sin {}^1/_2\,\theta, \quad \mathrm{si}\,(2y) = \int_0^{2y} \frac{\sin t}{t}\,dt.$$

Наконец, функция $P(\theta)$ для статистического гауссова клубка, впервые полученная Дебаем [60], имеет вид

$$\left.\begin{aligned} P(\theta) &= \frac{2}{x^2}(e^{-x} + x - 1), \\ x &= \frac{8\pi^2}{3}\frac{\overline{h^2}}{\lambda^2}\sin^2 {}^1/_2\theta. \end{aligned}\right\} \tag{3,116}$$

Все эти формулы являются частными случаями общего выражения

$$P(\theta) = \frac{J_\theta}{J_0} = \frac{1}{N^2}\sum_{p=1}^{N}\sum_{q=1}^{N}\frac{\sin \mu r_{pq}}{\mu r_{pq}}, \tag{3,117}$$

где

$$\mu = \frac{4\pi}{\lambda}\sin {}^1/_2\theta, \tag{3,118}$$

r_{pq} — расстояние между p-м и q-м излучателями в частице, N — общее их число. Двойное суммирование производится по всем излучателям. Для твердых частиц суммирование заменяется интегрированием. Для гибкой цепи выражение, стоящее под знаком двойной суммы, должно быть усреднено по всем конформациям, и в результате получается (3,116).

Так как во всех случаях функция $P(\theta)$ содержит геометрические параметры (r, L, h^2), ее определение, т. е. изучение асимметрии рассеяния, позволяет найти размеры и форму макромолекулы. Как показал Дебай, при разложении функции $P(\theta)$ в ряд по μ вблизи $\mu = 0$

$$P(\theta) = 1 - a_1\mu^2 + a_2\mu^4 - \ldots \qquad (3,119)$$

коэффициент a_1 характеризует средние размеры частицы при любой ее форме. Расчет показывает, что

$$a_1 = {}^1/_3\overline{r^2}, \qquad (3,120)$$

где $\overline{r^2}$ — средний квадрат радиуса частицы. Для гауссова клубка

$$\overline{r^2} = {}^1/_6\overline{h^2}. \qquad (3,121)$$

Исходя из этого вида угловой функции $P(\theta)$, Зимм предложил так называемый метод двойной экстраполяции [67], позволяющий определять из данных по светорассеянию и молекулярный вес, и размеры частиц. Производится измерение интенсивности рассеянного света для ряда концентраций c и углов рассеяния θ. Строится график зависимости величины cH/R_θ от аргумента $\sin^2 {}^1/_2\theta + kc$, где k — постоянная, подобранная так, чтобы $kc_{\max}$ имело порядок нескольких единиц. На графике получаются два семейства параллельных прямых (или кривых, если в (3,119) нельзя пренебречь членами, следующими за $a_1\mu^2$). Прямые одного семейства изображают зависимость Hc/R_θ от c при различных значениях $\sin^2 {}^1/_2\theta$, прямые другого семейства — зависимость Hc/R_θ от $\sin^2 {}^1/_2\theta$ при различных значениях c. В самом деле, аналогично (3,107) для больших молекул

$$R_\theta = HcM\frac{1+\cos^2\theta}{2}P(\theta) \qquad (3,122)$$

и

$$M = \left(\frac{cH(1+\cos^2\theta)}{2R_\theta}\right)^{-1}_{\substack{c=0\\ \theta=0}}, \qquad (3,123)$$

т. е. M определяется по точке пересечения прямых (кривых) $c = 0$ и $\theta = 0$, лежащей на оси ординат. Размеры частицы дает начальный наклон графика зависимости $(Hc/R_\theta)_{c=0}$ от величины

$\sin^2 1/2\theta + kc$. На рис. 3.17 показан график Зимма для растворов фракции поли-2,5-дихлорстирола в диоксане ($M = 16\,7 \cdot 10^6$).

Подробное описание экспериментальных методов и дальнейшие подробности теории приведены в [48, 53, 68, 87].

Ценную информацию о структуре макромолекул дает исследование диффузного рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами в разбавленных растворах полимеров [58, 69—71] (см. стр. 281).

Обратимся теперь к *динамооптическому эффекту*, или *эффекту Максвелла*. Этот эффект сводится к двойному лучепреломлению в потоке жидкости. Двойное лучепреломление возникает,

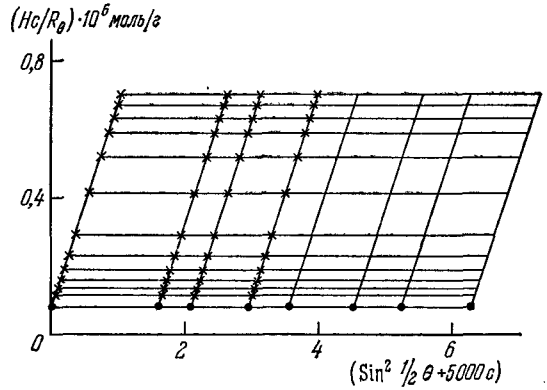


Рис. 3.17. График Зимма.

если в потоке имеется градиент скорости, т. е. при механической деформации жидкой среды. При ламинарном течении жидкости с постоянной скоростью деформации нет, жидкость перемещается как целое.

При изучении явления обычно применяется динамооптиметр — установка, состоящая из двух коаксиальных цилиндров, причем внутренний цилиндр (ротор) вращается, увлекая за собой жидкость, находящуюся между двумя цилиндрами. В жидкости устанавливается радиальный градиент скорости — слой, примыкающий к стенке ротора, движется быстрее всего, слой, примыкающий к стенке неподвижного цилиндра, неподвижен. Рассмотрим прежде всего, как ориентируются в поле градиента скорости жесткие частицы. Теория явления подробно изложена в [48, 62] (см. также [24]).

Допустим, что частица представляет собой стержень длины L. Ламинарный поток жидкости направлен вдоль оси x, скорость потока u имеет постоянный градиент вдоль оси y, т. е. $g = du/dy$. Ограничимся двумерной задачей (рис. 3.18). Если начало си-

стемы координат (x, y) совпадает с центром стержня, который сам поступательно движется в потоке, то скорость потока относительно центра стержня равна

$$u = u_x = gy. \qquad (3,124)$$

Относительная скорость потока вблизи любой точки A стержня, находящейся на расстоянии l от его центра, составляет (см. рис. 3.18) $u_A = gl \sin \varphi$. Компонента этой скорости вдоль длинной оси частицы равна $u_1 = u_A \cos \varphi = {}^1/_2 gl \sin 2\varphi$, а компонента, перпендикулярная к стержню, равна $u_2 = u_A \sin \varphi = gl \sin^2 \varphi$. Тангенциальные составляющие u_1 стремятся растянуть или сжать частицу в зависимости от знака φ. Нормальные составляющие u_2 поворачивают частицу, так как силы вязкости создают вращающий момент, приводящий частицу во вращательное движение с угловой скоростью ω. Значение ω найдем, пренебрегая инерцией, из условия совпадения линейной скорости концов стержня с нормальной составляющей скорости жидкости

$${}^1/_2 L\dot{\varphi} = {}^1/_2 Lg \sin^2 \varphi,$$

где L — длина стержня. Следовательно,

$$\omega = \dot{\varphi} = g \sin^2 \varphi. \qquad (3,125)$$

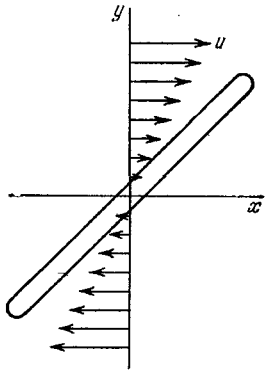


Рис. 3.18. К объяснению эффекта Максвелла.

Так как $\dot{\varphi}$ зависит от φ, то вращение происходит неравномерно. Через достаточно продолжительное время стержень установится вдоль оси потока x. Но на частицу действует еще и броуновское тепловое движение. В рассмотренном двумерном случае стационарное распределение частиц по углам φ характеризуется функцией $f(\varphi)$ ($f(\varphi)\,d\varphi$ — относительное число частиц, ориентированных в интервале углов от φ до $\varphi + d\varphi$). Условие стационарности распределения имеет вид

$$f\dot{\varphi} + D_r \frac{\partial f}{\partial \varphi} = \text{const}, \qquad (3,126)$$

где D_r — коэффициент вращательной диффузии. Если диффузия имеет преимущественное значение, то f мало отличается от $f_0 = (2\pi)^{-1}$, т. е. от равновероятного распределения по направлениям. Ищем решение (3,126) в виде

$$f = f_0 + f_1,$$

где $f_1 \ll f_0$. Имеем

$$f_0\dot{\varphi} + D_r \frac{\partial f_1}{\partial \varphi} = C - f_1\dot{\varphi} \approx C,$$

и, согласно (3,125),

$$f_0 g \sin^2 \varphi + D_r \frac{\partial f_1}{\partial \varphi} = C.$$

Интегрируя, находим

$$f_1 = \left(\frac{C}{D_r} - \frac{f_0 g}{2D_r}\right)\varphi + \frac{f_0 g}{4D_r} \sin 2\varphi.$$

Так как возмущение функции распределения f_1 не должно меняться при замене φ на $\varphi + 2\pi$, первый член этого выражения равен нулю, и мы получаем $C = {}^1/_2 f g$. Таким образом,

$$f = f_0\left(1 + \frac{g}{4D_r} \sin 2\varphi\right). \qquad (3,127)$$

Максимум функции f соответствует $\varphi = 45°$. Из феноменологического рассмотрения деформации жидкости также следует, что главное направление тензора деформации составляет угол 45° с направлением градиента скорости.

Решение задачи в общем трехмерном случае без ограничения малостью g по сравнению с D_r, естественно, более сложно (см. [62]). Расчет показывает, что при $D_r \gg g$ частица располагается в плоскости xy, в которой лежат направления потока и градиента, и ориентируется по-прежнему под углом 45° к направлению потока. Напротив, при $D_r \ll g$ частица ориентируется вдоль потока.

Если частицы малы, то D_r в реальных случаях всегда значительно больше g. Для макромолекул это условие может не соблюдаться, и угол ориентации оказывается зависящим от размеров и формы частицы. Очевидно, что описанные явления происходят только в жидкости, содержащей несферические частицы.

Жидкость, содержащая анизотропные ориентированные частицы, обладает двойным лучепреломлением — она подобна двухосному кристаллу. Двойное лучепреломление измеряется в направлении z, параллельном оси динамооптиметра. Конечная причина двойного лучепреломления — анизотропия поляризуемости частицы. Для твердых эллипсоидов вращения с отношением большой и малой осей, равным b, теория дает для двойного лучепреломления

$$\frac{\Delta n}{n} = g 2\pi N_1 V \frac{a_1 - a_2}{n^2} \frac{\kappa}{15 D_r}\left\{1 - \frac{\sigma^2}{72}\left(1 + \frac{6\kappa^2}{35}\right) + \ldots\right\}. \qquad (3,128)$$

где N_1 — число частиц в единице объема, V — объем частицы, $a_1 - a_2$ — разность продольной и поперечной поляризуемости, т. е. анизотропия поляризуемости, и

$$\kappa = \frac{b^2 - 1}{b^2 + 1}, \quad \sigma = g/D_r.$$

Мы видим, что Δn обращается в нуль при $\kappa = 0$ (т. е. при $b = 1$, сфера) и при $a_1 = a_2$ (изотропия поляризуемости). Таким образом, двойное лучепреломление в потоке выражается произведением двух факторов — оптического и механического. Второй фактор существенно зависит от градиента скорости g. Первый определяется анизотропией поляризуемости $a_1 - a_2$. В интересующем нас случае $a_1 - a_2$ — эффективная анизотропия, состоящая из двух вкладов — внутренней анизотропии Δa_i и анизотропии формы Δa_f

$$(a_1 - a_2) V = \Delta a = \Delta a_i + \Delta a_f. \qquad (3,129)$$

Внутренняя анизотропия непосредственно зависит от строения электронной оболочки макромолекулы. Анизотропную поляризуемость молекулы можно вычислить, если известны анизотропные поляризуемости образующих молекулу химических связей и их расположение. Тензор поляризуемости молекулы выражается суммой тензоров поляризуемости связей. Такой метод расчета называется валентно-оптической схемой [62, 72]. Тензоры поляризуемости определены для всех важнейших связей из данных по молекулярной рефракции, поляризации рассеянного света и эффекта Керра [2, 62, 72]. В случае гибкой макромолекулы вычисленную величину Δa_i следует усреднить по всем конформациям [2, 3, 5].

Анизотропия формы отлична от нуля, если частица как целое, не обладающая сферической симметрией, имеет показатель преломления $\tilde{n}$, отличный от показателя преломления растворителя n_0. Как показал еще Максвелл, для эллипсоида вращения величина Δa_f равна

$$\Delta a_f = \frac{\tilde{n}^2 - n_0^2}{4\pi + AL_1} V - \frac{\tilde{n}^2 - n_0^2}{4\pi + AL_2} V,$$

где для вытянутого эллипсоида ($b > 1$)

$$L_1 = \frac{4\pi}{3}(1 - 2e), \quad L_2 = L_3 = \frac{4\pi}{3}(1 + e), \quad A = \frac{\tilde{n}^2 - n_0^2}{n_0^2},$$

$$e = \frac{1}{4(b^2 - 1)}\left(2b^2 + 4 - \frac{3b}{\sqrt{b^2 - 1}} \ln \frac{b + \sqrt{b^2 - 1}}{b - \sqrt{b^2 - 1}}\right).$$

Если частица, кроме того, имеет внутреннюю анизотропию, то ее показатели преломления вдоль и поперек главной оси эллипсоида n_1 и n_2 отличны друг от друга. Следовательно,

$$\Delta a = \Delta a_i + \Delta a_f = \frac{4\pi(n_1^2 - n_2^2) + A_1 A_2 n_0^2 (L_2 - L_1)}{(4\pi + A_1 L_1)(4\pi + A_2 L_2)} V, \qquad (3,130)$$

где $A_{1,2} = (n_{1,2}^2 - n_0^2)/n_0^2$.

Зная Δa_i из расчета по валентно-оптической схеме, т. е. зная разность n_1 и n_2, можно найти форму макромолекулы (т. е. величину b), измеряя двойное лучепреломление в потоке. Подобрав n_0 равным n_1 или n_2, можно избавиться от эффекта формы. Его значение находится из опытов с растворами в растворителях с различными n_0.

При малых градиентах скорости $\sigma \ll 1$ и формула (3,128) упрощается

$$\frac{\Delta n}{n} = \frac{2\pi N_1}{n^2} \frac{g\kappa}{15D_r} (a_1 - a_2) V. \qquad (3,131)$$

Характеристическое двойное лучепреломление (постоянная Максвелла) определяется величиной

$$[n] = \left(\frac{\Delta n}{g\eta_0 c}\right)_{\substack{c\to 0 \\ g\to 0}} = \frac{2\pi N_A \kappa}{15 n_0 M \eta_0 D_r} (a_1 - a_2) V. \qquad (3,132)$$

Поделив $[n]$ на характеристическую вязкость $[\eta]$ (см. 3,70), получим

$$\frac{[n]}{[\eta]} = \frac{2\pi\kappa}{15 n_0 \eta_0 \nu D_r} (a_1 - a_2).$$

Коэффициент пропорциональности при $(a_1 - a_2)$ слабо зависит от природы частиц.

Измеряя двойное лучепреломление в потоке, можно найти не только Δn (т. е. $[n]$), но и угол между длинной осью частицы и направлением потока: от этого угла зависит ориентация главных оптических осей двулучепреломляющей системы. Его величина $\tilde{\chi}$ определяется коэффициентами вращательной диффузии

$$\left[\frac{\tilde{\chi}}{g}\right] = \lim_{g\to 0} \frac{d\tilde{\chi}}{dg} = \frac{1}{12D_r}, \qquad (3,133)$$

т. е. характеризует кинетику ориентации частицы.

Гибкие макромолекулы не только ориентируются, но и деформируются в потоке. Тангенциальные составляющие градиента скорости растягивают клубок, что в свою очередь вызывает появление добавочного двойного лучепреломления, т. е. *фотоэластический эффект*, теория которого изложена в [43]. Фотоэластический эффект удается отделить от ориентационного и, тем самым, изучение двойного лучепреломления в потоке дает ценную информацию о кинетической гибкости макромолекулы. (Дальнейшие подробности об эффекте Максвелла и описание экспериментальных методов и результатов см. в [48].)

Эффект Керра, т. е. двойное лучепреломление, возникающее в электрическом поле, также позволяет получить сведения о внутренней анизотропии макромолекулы и об анизотропии ее формы. Однако биополимеры — полиэлектролиты, т. е. макро-

молекулы, несущие электрические заряды (см. ниже). В электрическом поле они поэтому перемещаются — происходит электрофорез (см. стр. 66). Стационарные измерения невозможны, и приходится пользоваться импульсным методом, т. е. проводить измерения синхронно с кратковременным включением поля. Интерпретация полученных при этом данных весьма затруднительна, так как они определяются релаксационными, кинетическими явлениями. Поэтому применительно к биополимерам эффект Керра мало перспективен. Двойное лучепреломление в потоке дает более надежные результаты.

§ 3.8. ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТЫ

Многие макромолекулы, в том числе белки и нуклеиновые кислоты, в водных растворах являются макроионами, т. е. они несут на себе множество зарядов. Биополимеры представляют собой *полиамфолиты*, т. е. они содержат и катионные, и анионные группы. Свойства макромолекулы полиэлектролита в растворе зависят от ее строения, а также от pH и ионной силы раствора (см. стр. 65).

Существуют как твердые макроионы (глобулярные белки и др.), так и гибкие полиэлектролитные цепи. Очевидно, что поведение таких макромолекул в существенной степени определяется взаимодействием содержащихся в них зарядов. Величины этих зарядов в свою очередь зависят от степени диссоциации ионогенных групп и от окружающей их ионной атмосферы.

Конформация гибкой полиэлектролитной цепи, впервые рассмотренная в [73], определяется условием минимума для суммы конформационной и электростатической свободной энергии. Наличие одноименных зарядов в цепи означает их взаимное отталкивание, которое приводит к развертыванию клубка, к увеличению его размеров. Электростатическая свободная энергия гибкой макромолекулы вычисляется с учетом ионной атмосферы (см. стр. 63). Такой расчет был проведен Харрисом и Райсом [74] (см. также [75]).

Рассмотрим некоторую пространственную конфигурацию полиона с данным расположением неподвижных зарядов q. Электростатическая энергия взаимодействия зарядов выражается формулой (см. выше § 2.3)

$$U_{эл} = \frac{q^2}{2\varepsilon} \sum_{k=1}^{p} \sum_{l=1}^{p} \sigma_k \sigma_l \frac{\exp(-\varkappa r_{kl})}{r_{kl}}, \qquad (3{,}134)$$

где суммирование производится по всем p ионогенным участкам, ε — диэлектрическая проницаемость среды, $\varkappa$ — параметр Дебая — Хюккеля (см. (2,9)), r_{kl} — расстояние между k-й и l-й

группами, σ_k и σ_l равны нулю для незаряженных и единице для заряженных участков. Воспользовавшись моделью цепи, построенной из свободно-сочлененных сегментов, можно представить $U_{эл}$ в виде суммы двух членов — энергий взаимодействия в пределах одного и того же сегмента $U_{эл\,1}$ и энергии взаимодействия зарядов, расположенных в соседних сегментах $U_{эл\,2}$ (энергией взаимодействия более удаленных сегментов можно пренебречь, так как $U_{эл}$ быстро убывает с ростом r_{kl}).

Расчет дает для сегментов одинаковой длины

$$U_{эл\,1} = \frac{zq^2}{\varepsilon b} \sum_{j=1}^{n-1} \frac{n(n-j)}{j} \exp\left(-j\frac{\varkappa b}{n}\right), \qquad (3,135)$$

где z — число сегментов в цепи, b — длина сегмента, n — число зарядов на сегменте, и

$$U_{эл\,2} = \frac{n^2q^2}{\varepsilon b} \sum_{s=1}^{z-1} \frac{\exp(-\varkappa b \cos {}^1/_2\gamma_s)}{\cos {}^1/_2\gamma_s} \qquad (3,136)$$

(здесь r_{kl} заменено на $b\cos {}^1/_2\gamma_s$). Углы γ_s характеризуют конформацию. Энергия $U_{эл}$ минимальна, если цепь полиэлектролита полностью вытянута. Параметр $\varkappa$ растет с ионной силой раствора, и поэтому при ее увеличении $U_{эл}$ уменьшается. Следовательно, увеличение ионной силы уменьшает набухание клубка, растяжение макромолекулы.

В табл. 3.3 приведены значения электростатической энергии гипотетического полиэлектролита с $z = 1000$ при различных радиусах инерции и ионных силах [53].

Таблица 3.3

Электростатическая свободная энергия при разных радиусах инерции

Ионная сила, *моль/л*	$U_{эл}$ (*кал/моль*) при значениях R			
	100 Å	150 Å	300 Å	1000 Å
0,001	$1{,}12 \cdot 10^7$	$5{,}6 \cdot 10^6$	$1{,}25 \cdot 10^6$	$5{,}0 \cdot 10^4$
0,01	$3{,}43 \cdot 10^6$	$1{,}23 \cdot 10^6$	$1{,}80 \cdot 10^5$	5600
0,05	$9{,}4 \cdot 10^5$	$3{,}0 \cdot 10^5$	$4{,}05 \cdot 10^4$	1150

Эти значения вычислены с помощью упрощенной модели, в которой предполагается равномерное распределение неподвижных зарядов внутри сферы радиуса R [76].

Теория Дебая — Хюккеля, исходящая из линеаризованного уравнения Пуассона — Больцмана для плотности зарядов (см. стр. 63), строго говоря, неприменима к полиэлектролитам. Дело в том, что при не очень малых степенях ионизации электростатическое поле вокруг молекулы полиэлектролита велико, его энергия в несколько раз больше тепловой. Поэтому необходимо решать задачу с нелинеаризованным уравнением Пуассона — Больцмана.

Флори построил теорию размеров цепей полиэлектролитов, сходную с предложенной им теорией объемных эффектов (см. стр. 143). Очевидно, что электростатическое отталкивание также приводит к набуханию клубка, зависящему от ионной силы [77]. Флори предполагал, что клубок вместе с иммобилизованным им растворителем в целом электрически нейтрален. Расчет показывает, что электростатические взаимодействия не могут превратить клубкообразную макромолекулу в вытянутую — происходит лишь набухание клубка. Это согласуется с экспериментальными данными — с зависимостью характеристической вязкости $[\eta]$ от M. Птицын развил более строгую статистическую теорию заряженных макромолекул [78]. Исходное предположение этой теории состоит в том, что из-за большего экранирующего действия противоионов заряженные группы макромолекулы, расположенные далеко друг от друга по цепи, взаимодействуют лишь при их случайном сближении в результате флуктуационного изгибания цепи. Из теории Птицына следует, что конформационные свойства заряженных макромолекул промежуточны между свойствами ненабухших статистических клубков и жестких стержней. Для полиэлектролитов $\overline{h^2} \infty M^{4/3}$ и $[\eta] \infty M$, для ненабухших клубков $\overline{h^2} \infty M$ и $[\eta] \infty M^{1/2}$, а для стержней $\overline{h^2} \infty M^2$ и $[\eta] \infty M^2/\ln M$. Эти результаты расчета согласуются с опытом (в частности, для денатурированной ДНК).

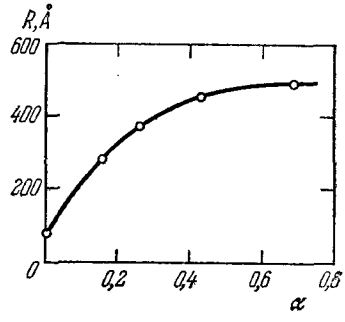
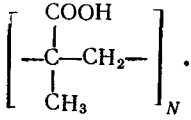


Рис. 3.19. Зависимость радиуса инерции макромолекул полиметакриловой кислоты от степени диссоциации карбоксильных групп.

Из теории Птицына следует линейная зависимость квадрата коэффициента линейного набухания от $I^{-2/5}$ (I — ионная сила), что также подтверждено опытом.

Как уже сказано, наибольшая степень развертывания макромолекулярной цепи полиэлектролитов достигается при очень низкой ионной силе. На рис. 3.19 показано влияние заряда на

радиус инерции макромолекул полиметакриловой кислоты



Эти данные получены методом рассеяния света для растворов, не содержащих солей [79]. Степень диссоциации поликислоты регулируется добавлением основания. При этом, конечно, ионная сила не остается постоянной.

Набухание клубка увеличивается с разбавлением раствора, так как уменьшение концентрации полиэлектролита при постоянной степени диссоциации означает уменьшение ионной силы. Соответственно наблюдаются аномалии на графиках концентрационной зависимости удельной вязкости η_{sp}/c (см. стр. 148) от обратной приведенной интенсивности (см. стр. 158). Удельная вязкость нелинейно возрастает с разбавлением вместо того, чтобы убывать. На кривых η_{sp}/c могут наблюдаться максимумы. Интерпретация таких данных не проста. Для получения ясной информации о структуре и свойствах макромолекул полиэлектролитов в растворах пользуются *изоионным разбавлением*: раствор полиэлектролита разбавляется раствором соли с той же ионной силой, что и у наиболее концентрированного раствора полиэлектролита, с тем, чтобы сохранять постоянной общую концентрацию противоионов. В этих условиях удается получать линейные зависимости η_{sp}/c от c (см. [53]).

Макромолекула полиэлектролита связывает противоионы. Поэтому полиион при взаимодействии с другими полиионами ведет себя как нейтральная система, что находит свое отражение в значениях второго вириального коэффициента, определяемого методом осмометрии (см. стр. 147) или светорассеяния (см. стр. 158) [80]. Противоионы могут специфически связываться ионизованными группами полиэлектролита — такое связывание зависит от химической природы макроиона и малого иона. Следует отличать это связывание, сводящееся к образованию солевых связей в фиксированных точках макромолекулы, от неспецифического связывания — образования ионной атмосферы. В солевой связи противоион находится на значительно меньшем расстоянии от полиона, чем то, на которое могут приближаться подвижные противоионы. Специфическое связывание противоионов определяет ионообменные свойства полиэлектролитов. Эти свойства имеют важные практические применения. Сшитые поперечными связями нерастворимые полиэлектролиты, набухающие в воде и других жидкостях, применяются в качестве ионообменных смол или ионитов [81]. Иониты оказываются способными сорбировать определенные ионы из растворов, что находит

применение при очистке и фракционировании различных электролитов, при очистке неэлектролитов от ионных примесей.

В полиамфолитах возможно образование солевых связей между катионными и анионными группами, служащими противоионами по отношению друг к другу.

В белках фигурируют кислотные (Глу, Асп, Тир) и основные (Арг, Гис, Лиз) аминокислотные остатки (см. стр. 56). В нуклеиновых кислотах присутствуют кислотные фосфатные группы и основные группы $N<$, NH, NH_2 азотистых оснований. Поэтому исследования строения и свойств молекул биополимеров обязательно должны учитывать их полиамфолитную природу и, следовательно, pH и ионную силу среды. Структура нативных и денатурированных молекул белков и нуклеиновых кислот в значительной мере зависит от электростатических, ионных взаимодействий. Теми же факторами, наряду с другими, определяются взаимодействия биополимеров с малыми молекулами и ионами, имеющие столь важное значение для биологической функциональности. Специфическое связывание ионов, ионный обмен ответственны за поведение таких надмолекулярных систем, как биологические мембраны. Прохождение малых ионов сквозь мембрану происходит специфическим способом посредством их сорбции и десорбции. Взаимодействие белковых полиионов с ионами K^+, Na^+, Ca^{++}, Mg^{++} определяет важнейшие биологические явления, например распространение нервного возбуждения и мышечное сокращение.

Эти явления тесно связаны с механохимическими процессами. Слабо сшитые полиэлектролитные гели способны трансформировать химическую энергию в механическую работу. Представим себе полиа́нионный гель, изготовленный, например, из полиметакриловой кислоты и набухший в воде при нейтральном pH. Добавление щелочи к такому гелю увеличит степень ионизации кислотных групп, их взаимное электростатическое отталкивание и, следовательно, степень набухания. Добавление кислоты вызовет сокращение геля. Изменение объема геля можно использовать для совершения работы. Если изготовить из слабо сшитого полиэлектролита волокно, то оно будет удлиняться или укорачиваться при добавлении щелочи или кислоты и производить соответствующую работу, опуская или подымая груз. Напротив, механическое растяжение такого волокна приводит к изменению ионного состава омывающей жидкости. Аналогичные процессы происходят в результате изменения ионной силы — введения в набухший полиэлектролит нейтральной соли. Качальский и Оплатка построили непрерывно работающую машину, в которой полиэлектролитное волокно (коллаген) попеременно погружается

в раствор соли и в чистую воду (рис. 3.20) [51]. Работа машины прекращается, когда в результате переноса малых ионов волокном в воду химические потенциалы обоих резервуаров выравниваются. Такая машина может быть пущена в обратную сторону за счет внешнего источника энергии, так же как тепловая машина может быть обращена в холодильник. При этом машина служит для извлечения соли из раствора, скажем, для опреснения морской воды.

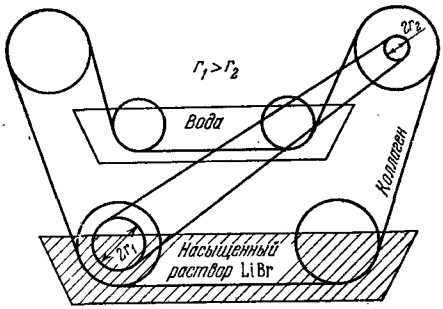


Рис. 3.20. Механохимическая машина Качальского и Оплатки.

Набухание и сжатие полиэлектролита, по-видимому, весьма существенно в мембранных явлениях, но в большинстве случаев механические процессы в биологии имеют иной характер.

Более подробно свойства полиэлектролитов описаны в монографиях [48, 53, 82].

Полиэлектролитными свойствами белков определяется возможность их разделения и исследования методом *электрофореза*. Если раствор, содержащий заряженные частицы, находится в электрическом поле, то частицы перемещаются по направлению к соответствующим электродам. Электрофоретическая подвижность белка зависит от его суммарного заряда при данных значениях pH, ионной силы и т. д. Следовательно, она дает важную характеристику макромолекулы. Разработан ряд электрофоретических методов для анализа белков и их смесей. В методе движущейся границы, или фронтального электрофореза, определяется скорость перемещения в электрическом поле резкой границы между раствором исследуемого вещества и растворителем. Для препаративного разделения смесей более удобен метод зонального электрофореза, в котором раствор исследуемого вещества помещают вначале в виде узкого слоя между двумя слоями растворителя. За достаточно большой промежуток времени вещества с различной подвижностью расходятся на значительное расстояние, их зоны перестают перекрываться и продукты разделения могут быть

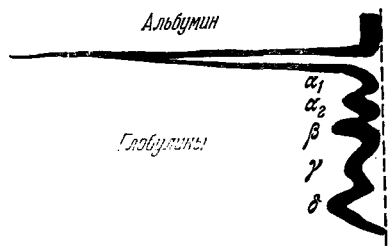


Рис. 3.21. Электрофореграмма белков сыворотки крови человека.

извлечены из раствора. Очевидно, что разделению препятствует конвенкционное перемещение зон. Конвекцию сводят к минимуму, вводя поддерживающую пористую среду — гели, бумагу и т. д. По-видимому, наилучшим способом стабилизации системы является применение градиента плотности (ср. стр. 153). Электрофорез в этом случае проводится в вертикальной трубке, в которой содержится буферный раствор с плотностью, возрастающей с глубиной, т. е. с градиентом плотности.

Как и при диффузии и седиментации, регистрация электрофоретической картины производится с помощью оптических методов. Получаемая электрофореграмма содержит ряд пиков, отвечающих различным компонентам смеси. На рис. 3.21 показана электрофореграмма белков сыворотки крови человека [77].

Описание методов электрофореза, их теории и результатов их применения к белкам содержится в ряде книг и статей (см., в частности, [83—86]).

Литература

1. *Г. Штаудингер*, Высокомолекулярные органические соединения, ОНТИ, 1935.
2. *М. В. Волькенштейн*, Конфигурационная статистика полимерных цепей, изд-во АН СССР, 1959.
3. *Т. М. Бирштейн, О. Б. Птицын*, Конформации макромолекул, «Наука», 1964.
4. *L. Pedersen, K. Morokuma*, J. Chem. Phys. **46**, 3941 (1967).
5. *П. Флори*, Статистическая механика цепных молекул, «Мир», 1971.
6. *T. Hill*, J. Chem. Phys. **16**, 399, 938 (1948).
7. *L. Bartell*, J. Chem. Phys. **32**, 827 (1960).
8. *А. И. Китайгородский*, ДАН СССР **124**, 1267 (1959); **137**, 116 (1961); Tetrahedron **9**, 183 (1960); Acta Crystall. **18**, 585 (1965); Молекулярные кристаллы, «Наука», 1971.
9. *А. И. Китайгородский, К. В. Мирская*. Кристаллография **6**, 507 (1961).
10. *G. Ramachandran, V. Sasisekharan*, Adv. Protein Chem. **23**, 283 (1968).
11. *М. В. Волькенштейн*, Изв. АН СССР, сер. физ. **14**, 466 (1950).
12. *К. В. Ф. Кольрауш*, Спектры комбинационного рассеяния, ИЛ, 1952.
13. *С. Мидзусима*, Строение молекул и внутреннее вращение, ИЛ, 1958.
14. *Н. П. Борисова, М. В. Волькенштейн*, Ж. структ. хим. **2**, 469 (1961).
15. *Н. П. Борисова, Т. М. Бирштейн*, Высокомол. соед. **5**, 279 (1963).
16. *Н. П. Борисова*, Высокомол. соед. в сб. «Карбоцепные соединения», 1963, стр. 74.
17. *В. Г. Дашевский*, Конформации органических молекул, «Химия», 1974.
18. *Е. М. Попов* и др., Мол. биол. **2**, 612 (1968).
19. *Э. Илиел*, Стереохимия соединений углерода, «Мир», 1965.
20. *Э. Илиел, Н. Аллинжер, С. Энжиал, Г. Моррисон*, Конформационный анализ, «Мир», 1969.
21. *С. Чандрасекар*, Стохастические проблемы в физике и астрономии, ИЛ, 1947.
22. *S. Oka*, Proc. Phys. Math. Soc. Japan **24**, 657 (1942).
23. *С. Е. Бреслер, Я. И. Френкель*, ЖЭТФ **9**, 1094 (1939).
24. *Я. И. Френкель*, Кинетическая теория жидкостей. Собрание избранных трудов, т. 3, Изд-во АН СССР, 1959.
25. *М. В. Волькенштейн*, ДАН СССР **78**, 879 (1951); Ж. физ. хим. **26**, 1072 (1952).

26. *G. Natta, P. Corradini*, J. Polymer Sci. **39**, 29 (1959); Nuovo Cimento **15**, Suppl. 1, 9 (1960).
27. *G. Natta, P. Corradini, P. Gauis*, Makromol. Chem. **39**, 238 (1960); J. Polymer Sci. **58**, 1191 (1962).
28. *Н. П. Борисова, Т. М. Бирштейн*, Высокомол. соед. **6**, 1234 (1964).
29. *Н. П. Борисова*, Высокомол. соед. **6**, 135 (1964).
30. *О. Б. Птицын, Ю. А. Шаронов*, ЖТФ **27**, 2762 (1957).
31. *М. В. Волькенштейн, О. Б. Птицын*, ЖТФ **25**, 649, 662 (1955).
32. *A. Cifferri, C. Hoeve, P. Flory*, J. Amer. Chem. Soc. **83**, 1015 (1961).
33. *В. Н. Никитин, М. В. Волькенштейн, Б. З. Волчек*, ЖТФ **25**, 2486 (1955).
34. *В. Н. Никитин, Б. З. Волчек, М. В. Волькенштейн*, Труды 10-го Совещания по спектроскопии, изд. Льв. ГУ **1**, 411 (1957).
35. *Б. З. Волчек, В. Н. Никитин*, ЖТФ **28**, 1953 (1958).
36. *H. Kramers, G. Wannier*, Phys. Rev. **60**, 252 (1941).
37. *E. Montroll*, J. Chem. Phys. **9**, 708 (1941); **10**, 61 (1942); Ann. Math. Statistics **18**, 18 (1947).
38. *G. Newell, E. Montroll*, Rev. Mod. Phys. **25**, 353 (1953).
39. *Ю. Б. Румер*, УФН **53**, 245 (1954).
40. *Х. Хилл*, Статистическая механика, ИЛ, 1960.
41. *К. Хуанг*, Статистическая механика, «Мир», 1966.
42. *Ф. Р. Гантмахер*, Теория матриц, Гостехиздат, 1953.
43. *А. А. Марков*, Избранные труды, Изд-во АН СССР, 1951.
44. *Б. В. Гнеденко*, Курс теории вероятностей, «Наука», 1969.
45. *P. Flory*, J. Chem. Phys. **17**, 303 (1949).
46. *T. Fox, P. Flory*, J. Phys. Chem. **53**, 197 (1949); J. Amer. Chem. Soc. **73**, 1904, 1909, 1915 (1951).
47. *P. Flory*, Principles of Polymer Chemistry, Cornell Univ. Press, 1953.
48. *В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель*, Структура макромолекул в растворах, «Наука», 1964.
49. *И. М. Лифшиц*, ЖЭТФ **55**, 2408 (1968).
50. *М. В. Волькенштейн*, Изв. АН СССР, сер. биол., № 1, 3 (1958).
51. *A. Katchalsky*, in «Biology and Physical Sciences». Columbia Univ. Press, 1969.
52. *С. Е. Бреслер, Б. Л. Ерусалимский*, Физика и химия макромолекул, «Наука», 1963.
53. *Ч. Тенфорд*, Физическая химия полимеров, «Химия», 1965.
54. *A. Einstein*, Ann. Phys. **19**, 289 (1906); **34**, 591 (1911).
55. *R. Simha*, J. Phys. Chem. **44**, 25 (1940).
56. *P. Flory, T. Fox*, J. Phys. Colloid. Chem. **53**, 197 (1949).
57. *О. Б. Птицын, Ю. Е. Эйзнер*, Высокомол. соед. **1**, 1200 (1959).
58. Сборник «Основы молекулярной биологии. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот», «Наука», 1967.
59. *W. Archibald*, J. Phys. Colloid. Chem. **51**, 1204 (1947).
60. *N. Meselson, F. Stahl, J. Vinograd*, Proc. Nat. Acad. Sci, US **43**, 581 (1957).
61. *J. Vinograd, J. Hearst*, in «Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe», Springer Verlag, 1962.
62. *М. В. Волькенштейн*, Молекулярная оптика, Гостехиздат, 1951.
63. *И. Л. Фабелинский*, Молекулярное рассеяние света, «Наука», 1965.
64. *A. Einstein*, Ann. Phys. **33**, 1275 1910).
65. *P. Debye*, J. Phys. Colloid. Chem. **51**, 18 (1947).
66. *М. Борн*, Оптика, ГНТИУ, 1937.
67. *B. Zimm*, J. Chem. Phys. **16**, 1093, 1099 (1948).
68. *K. Stacey*, Light-Scattering in Physical Chemistry, Acad. Press, 1956.
69. *E Geiduschek, A. Holtzer*, Adv. Biol. Med. Phys. **6**, 431 (1958).
70. *А. И. Китайгородский*, Рентгеноструктурный анализ мелкокристаллических и аморфных тел, Гостехиздат, 1952.

71. *A. Guinier, G. Fournet*, Small Angle X-ray Scattering, Wiley, 1955.
72. *М. В Волькенштейн*, Строение и физические свойства молекул, Изд-во АН СССР, 1955.
73. *W Kuhn, O. Künzle, A. Katchalshy*, Helvetica Chim. Asta **31**, 1994 (1948).
74. *F. Harris, S. Rice*, J Phys. Chem. **58**, 725, 733 (1954); J. Chem. Phys. **24**, 326 (1956); **25**, 955 (1956).
75. *С. Райс*, в сб. «Современные проблемы биофизики», т. 1, ИЛ, 1961, стр. 89.
76. *J. Hermans, J. Overbeek*, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **67**, 761 (1948).
77 *P. Flory*, J. Chem. Phys. **21** 162 (1953).
78. *О Б. Птицын*, Высокомол. соед. **3**, 1084, 1252, 1401 (1961).
79 *A. Oth P. Doty*, J. Phys. Chem. **56**, 43 (1952).
80. *N Schneider, P. Doty*, J Phys. Chem. **58**, 762 (1954).
81. *Ф. Гельферих*, Иониты, ИЛ, 1962.
82. *S. Rice, M. Nagasawa*, Polyelectrolyte Solutions, N. Y., 1961.
83. *Г. В. Троицкий* Электрофорез белков, изд. ХГУ, 1962.
84. *Е М. Соминский*, в сб. «Молекулярная биология. Физико-химические методы анализа и фракционирования биополимеров», «Наука», 1966.
85. *Б. Мэгдоф*, в сб. «Аналитические методы белковой химии», ИЛ, 1963.
86. *Х. Вундерли* в сб. «Аналитические методы белковой химии», ИЛ, 1963.
87. *В. Е. Эскин*, Рассеяние света растворами полимеров, «Наука», 1973.

ФИЗИКА БЕЛКА

§ 4.1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Вся система биохимических процессов в клетке и в организме действует при обязательном участии белков. Белки-ферменты катализируют все химические процессы в клетке. Важнейшая функция белков — каталитическая, ферментативная. Ферменты являются необходимыми участниками биосинтеза белков, запрограммированного на генетическом уровне. Ферменты участвуют во всех этапах биосинтеза белка. Вместе с тем белки служат регуляторами генетической функции нуклеиновых кислот. Все метаболические процессы в клетке — ее питание и дыхание — катализируются ферментами, которые выполняют как каталитическую, так и регуляторную функции; регуляторные ферменты, называемые аллостерическими (см. гл. 7), обеспечивают обратные связи в метаболических цепях.

Механохимическая функция сократительных белков, неразрывно связанная с ферментативной, ответственна за клеточные и внутриклеточные движения, т. е. за перемещение клетки, за движение протоплазмы, за перемещение веществ в делящейся клетке при митозе. Сократительные белки — это ферменты, в результате каталитической деятельности которых химическая энергия превращается в механическую работу.

Существование клетки как целостной системы, существование функциональных клеточных органоидов требует *компартментализации*, пространственного разграничения этих систем мембранами, характеризуемыми регулируемой проницаемостью. Белки-ферменты, входящие в состав мембран в комплексах с липидами, обеспечивают активный транспорт метаболитов в клетку и из нее, идущий в направлении, противоположном градиенту концентрации. Эта функция белков тесно связана с механохимической. Кроме того, белки катализируют метаболические биоэнергетические процессы, протекающие в мембранах. Так, ферменты митохондрий, локализованные в мембранах, ответственны за биохимические процессы, связанные с дыханием, за механические движения митохондрий, за активный транспорт.

Переходя от клетки к многоклеточному организму, мы встречаемся с новыми, специализированными функциями белков. Белки служат для запасания (миоглобин) и переноса кислорода

(гемоглобин, гемоцианин). Эта функция родственна ферментативной, но отлична от нее, так как молекулярный кислород не испытывает химических превращений в соответствующих процессах. Низкомолекулярные белки, или, точнее, полипептиды (инсулин, окситоцин, вазопрессин и др.), выполняют регуляторные функции в качестве гормонов.

Специализированные белки высших организмов — гамма-глобулины защищают организм от чужеродных биополимеров, выполняя иммунологическую функцию.

Наконец, специальные белки, входящие в состав кожи, волос и перьев, соединительной ткани и т. д., выполняют динамическую опорную функцию, обеспечивая нежесткую, но надежную взаимосвязь органов, их механическую целостность и защиту.

Белки являются непременными участниками запасания, посылки, передачи, перекодирования и рецепции химических сигналов. В ряде случаев такими сигналами, рецепторами и преобразователями сигналов служат сами белковые молекулы или содержащие белки надмолекулярные системы.

Реакция организма на любые внешние воздействия сводится к перекодированию внешних сигналов на химический язык, что осуществляется белками.

Основная физическая задача, возникающая при изучении белков, состоит в установлении связи между их строением и свойствами. Это — классическая задача молекулярной физики. Решение ее начинается с установления структуры белка — пространственного расположения атомов и состояния их электронных оболочек в белковой молекуле.

Легко написать эти слова, но трудно решить указанную задачу. Молекулы белков — самые сложные среди известных современной науке. Их структура определяется не только химическими связями, но и целой совокупностью разнообразных взаимодействий между аминокислотными остатками. Белки функционируют в водном окружении, и оно существенным образом влияет на строение и свойства белковых молекул.

Макромолекула белка сходна с твердым телом в том отношении, что значительная часть атомов имеет в ней фиксированные положения. Макромолекула белка в этом смысле является апериодическим кристаллом. Подходы к рассмотрению такой структуры, основанные на положениях физики твердого тела, естественны и разумны. Вместе с тем макромолекула белка — динамическая система, характеризуемая большей или меньшей конформационной лабильностью. Это — своего рода машина, поведение которой зависит от положения и свойств каждого индивидуального аминокислотного остатка. Исследование динамических свойств белка требует теоретических и экспериментальных методов физики макромолекул.

Как уже указывалось (см. стр. 144), наличие линейной памяти в полимерной цепи приводит к ее особым физическим свойствам [1] Поведение молекулы белка определяется свойствами цепи как целого, электронно-конформационными взаимодействиями (см стр. 146) и конкретными особенностями первичной структуры — информационными характеристиками, кодируемыми на генетическом уровне. Важная физическая задача состоит в установлении связи между пространственным строением молекулы белка и первичной структурой цепи или цепей, ее образующих.

Конечная цель биофизических исследований заключается в физическом истолковании биологических функций белка, прежде всего его ферментативной функции.

Вопрос о способе возникновения первичной структуры белковой цепи в процессе матричного синтеза, идущего с необходимым участием других информационных макромолекул (молекул нуклеиновых кислот), представляет собой сложную физическую проблему. В связи с этим возникает физическая проблема генетического кода. Представление о генетическом коде исходит из предположения о существовании специфического молекулярного механизма превращения генетической информации в структурную функциональность белковых молекул. Это предположение имеет физический характер.

Наряду с ферментативным катализом, биофизика исследует и другие динамические свойства белковых молекул, ответственные за механохимические процессы, за иммунологическую защиту, за запасание и перенос кислорода и т. д. Соответственно следует говорить о физике сократительных белков как основе механохимии, о физике иммунитета и даже о физике отдельных белков — миоглобина и гемоглобина, например.

Таким образом, задачи физики белка сводятся к следующим:

1) Теоретическое и экспериментальное исследование структуры белковых молекул (а также надмолекулярных систем, которые они образуют совместно с другими биологически-функциональными веществами).

2) Установление связи первичной структуры белковых цепей и пространственного строения молекул белков.

3) Исследование физических механизмов биосинтеза белка.

4) Исследование физических механизмов, лежащих в основе биологических функций белков.

§ 4.2. КОНФОРМАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

Для понимания структуры белка необходимо рассмотреть конформационное строение полипептидной цепи.

Как уже сказано, пептидная единица цепи, группа —CO—NH— имеет плоское строение (см. стр. 69). Структур-

ные параметры такой единицы, установленные в результате рентгенографического исследования как пептидов, так и ряда родственных соединений, приведены в табл. 4.1 [2—4].

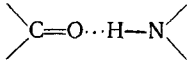
Таблица 4.1

Структурные параметры пептидных единиц: длина связей (в Å) и углы между ними

$C^{\alpha}-C$	1,53	$<C^{\alpha}CN$	114°
$C-N$	1,32	$<OCN$	125°
$N-C^{\alpha}$	1,47	$<C^{\alpha}CO$	121°
$C=O$	1,24	$<CNC^{\alpha}$	123°
$N-H$	1,00	$<CNH$	123°
$C^{\alpha}-C^{\beta}$	1,54	$<HNC^{\alpha}$	114°
$C^{\alpha}-H$	1,07	$<XC^{\alpha}Y$	109,5°

Здесь C^{α} — углеродный атом аминокислотного остатка, входящий в цепь, C^{β} — первый углеродный атом заместителя R, который можно представить в виде — $C^{\beta}H_2$ — R′, X и Y — атомы, с которыми связан C^{α} как в основной цепи, так и в привеске. Полностью вытянутая цепь (без деформации валентных углов и изменений длин связей) имеет *транс*-конформацию, характеризуемую нулевыми значениями угла ϕ поворота вокруг связи $N-C^{\alpha}$ и угла ψ поворота вокруг связи $C^{\alpha}-C$. Угол поворота вокруг пептидной связи C—N, соединяющей соседние пептидные единицы, обозначается ω. В вытянутой *транс*-конформации он также равен нулю.

Однако такая конформация не является наиболее стабильной. Между атомами кислорода карбонильных групп C=O и атомами водорода иминных групп N—H образуются водородные связи (см. ниже § 4.3) с энергией около 5 *ккал/моль*:



Нахождение наиболее устойчивой конформации полипептидной цепи требует минимизации ее полной энергии, включая энергию внутримолекулярных водородных связей.

Не проводя количественной минимизации энергии, Полинг и Кори определили наиболее устойчивые конформации полипептидной цепи, основываясь на данных рентгеноструктурных исследований пептидных группировок и на теоретическом рассмотрении плотной упаковки цепей с максимальным числом водородных связей [5, 6]. Таких конформаций три.

Наибольшее значение имеет конформация *α-спирали*, показанная на рис. 4.1. Эта спираль характеризуется поворотом

вокруг оси на 100° и перемещением вдоль оси на 1,5 Å на каждую пептидную единицу. Соответственно на один полный виток спирали приходится 3,6 пептидной единицы и смещение вдоль оси на 5,4 Å. Водородные связи соединяют карбонильную группу данной единицы с иминной группой, принадлежащей четвертой предшествующей единице. Все группы C = O и N — H, за исключением конечных, соединены водородными связями. Структура весьма компактна и, в принципе, может быть построена из любых аминокислотных остатков, за исключением пролила, не содержащего группы N—H и поэтому не образующего водородной связи.

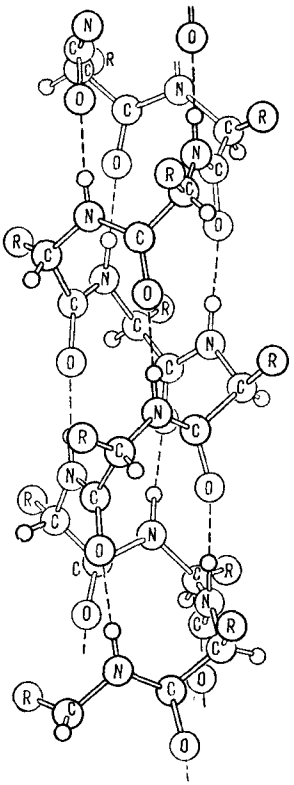


Рис. 4.1. Схематическое изображение α-спирали.

α-спираль может быть закручена вправо и влево. В первом случае $\phi = 132°$, $\psi = 123°$, во втором случае $\phi = 228°$, $\psi = 237°$ (углы отсчитываются от плоского *транс*-положения цепи). Пептидные группы —CO—NH— сохраняют в α-спирали свою плоскую структуру. Именно это обстоятельство и является одним из определяющих α-спиральную конформацию.

Другие конформации с максимальным насыщением водородных связей — *параллельная* и *антипараллельная* β-*формы* — показаны на рис. 4.2 и 4.3. Это упорядоченные конформации уже не отдельной цепи, но совокупности цепей, образующей слоистую структуру (pleated sheet). Цепи в β-форме не имеют плоского, *транс*-строения (рис. 4.4). В параллельной конформации $\phi = 61°$, $\psi = 239°$, в антипараллельной $\phi = 380°$, $\psi = 325°$.

β-форма может реализоваться и в отдельной полипептидной цепи в результате ее систематических изгибов. Схематическое изображение такой *кросс* β-*формы* показано на рис. 4.5. Очевидно, что в местах изгибов углы внутреннего вращения имеют значения, отличные от углов, свойственных упорядоченным участкам.

Существенная особенность полипептидной цепи состоит в стабилизации выделенной конформации в растворе водородными связями. Как уже сказано, отбор одного ротамера обычной мак-

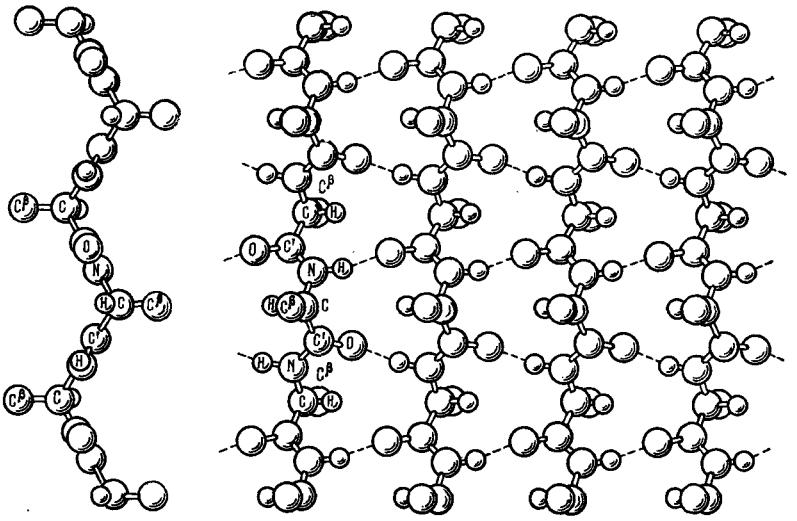


Рис. 4.2. Схематическое изображение параллельной β-формы.
Слева — схема отдельной цепи.

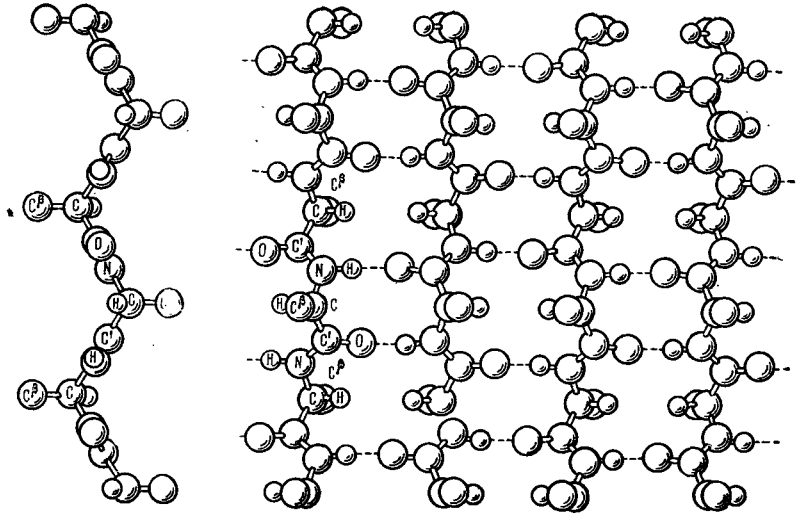
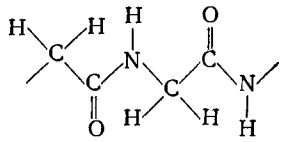


Рис. 4.3. Схематическое изображение антипараллельной β-формы.
Слева — схема отдельной цепи.

ромолекулы происходит в кристаллическом полимере, содержащем множество макромолекул (см. стр. 125). В этом смысле α-спираль и кросс β-форма подобны кристаллам — соответственно одномерному и двумерному.

α- и β-формы — важнейшие, но не единственные конформации полипептидных цепей. Полиаминокислота полиглицин



образует либо β-форму, либо форму II, в которой все полипептидные цепи параллельны друг другу и каждая из них обладает

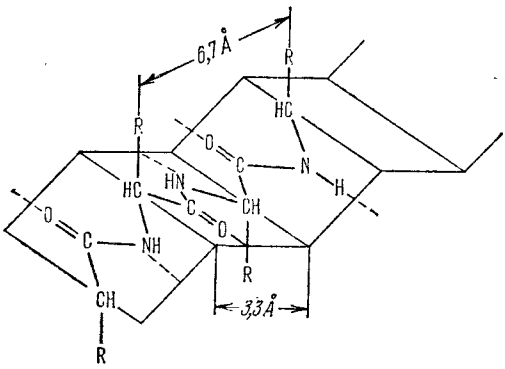


Рис. 4.4. Общая структура полипептидной цепи в β-форме.

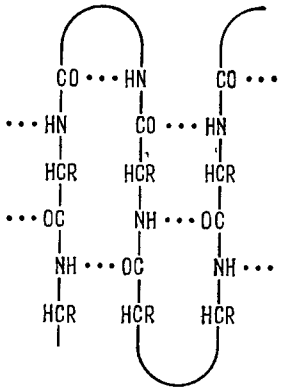


Рис. 4.5. Схематическое изображение кросс β-формы.

винтовой осью третьего порядка. Переход от одной пептидной единицы к соседней осуществляется продольными перемещением на 3,1 Å и поворотом вокруг оси спирали на 120°. Цепи уложены в гексагональную структуру, каждая цепь соединена с шестью соседними водородными связями. Эти особенности структуры были установлены Криком и Ричем методом рентгенографии [7]. Строение кристаллического полиглицина II показано на рис. 4.6 [7, 8]. Такой структуре отвечают углы $\phi = 100°$ и $\psi = 330°$. Особое строение полиглицина определяется тем, что глицил, в отличие от всех остальных аминокислотных остатков, не содержит объемистых радикалов R.

С другими специфическими конформациями полипептидных цепей приходится встречаться при исследовании фибриллярных (волокнистых) белков (см. ниже § 4.11).

Конформацию белковой цепи как целого или некоторого ее участка принято называть *вторичной структурой.*

Рассмотрим зависимости энергии полипептидной цепи от углов внутреннего вращения ϕ и ψ, образующие так называемые *стерические карты* [2, 4, 9].

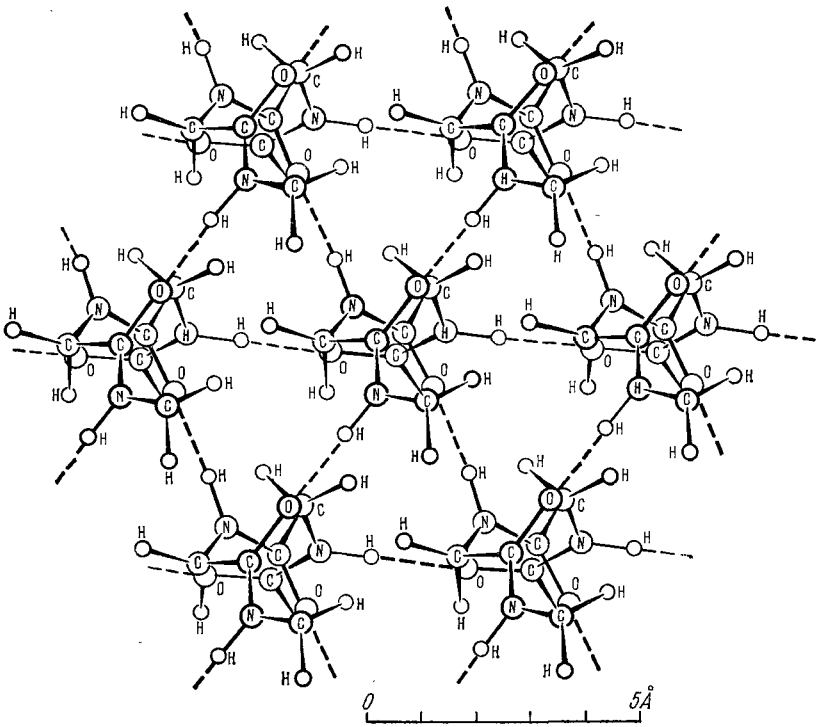


Рис. 4.6. Кристаллическая структура полиглицина II.

Конформационная энергия цепи определяется взаимодействием химически несвязанных атомов. Особенность полипептидной цепи, обусловливаемая плоским строением пептидной группы, состоит в том, что углы поворота ϕ_i, ψ_i данного i-го звена практически не зависят от значений углов ϕ_{i-1}, ψ_{i-1} соседнего звена (пептидной группы) [2, 10]. Если углы ϕ_i, ψ_i варьируют в области значений, не запрещенных стерическим перекрыванием атомов пептидных групп, соединенных связями i-го и $(i+1)$-го звена, и если одновременно варьируют углы ϕ_{i+1}, ψ_{i+1}, то не существует такой комбинации этих четырех углов, при которой возможно стерическое взаимодействие i-го звена с $(i+2)$-м. В этом смысле полипептидная цепь имеет ограниченную

кооперативность и ближние взаимодействия в ней ограничены ближайшими соседями, что позволяет рассматривать порознь конформационные энергии для отдельных аминокислотных остатков [2]. Очевидно, что стерическая карта для данного остатка существенно зависит от природы входящего в него радикала R. Таким образом, можно считать, что взаимодействия в данной паре пептидных групп характерны для аминокислотного остатка, соединяющего эти группы. Соответствующие расчеты были впервые проведены Рамачандраном с сотрудниками [11]; в этой работе исследовался дипептид глицил-L-аланин. Иными словами, индийские ученые получили конформационную (стерическую) карту для аланина. Расчет проводился на основе простейшего предположения об атомах как о твердых сферах, характеризуемых ван-дер-ваальсовыми радиусами, которые находили из данных по межатомным расстояниям в молекулярных кристаллах В табл. 4.2 приведены нормальные расстояния между контактирующими атомами, чаще всего наблюдаемые в кристаллах, и минимальные расстояния, наблюдаемые лишь в немногих случаях.

Таблица 4.2 [2]

Контактные расстояния между атомами в полипептидах

Пара атомов	Обычное расстояние, Å	Минимальное расстояние, Å	Пара атомов	Обычное расстояние, Å	Минимальное расстояние, Å
C...C	3,2	3,0	O...N	2,7	2,6
C...O	2,8	2,7	O...H	2,4	2,2
C...N	2,9	2,8	N...N	2,7	2,6
C...H	2,4	2,2	N...H	2,4	2,2
O...O	2,8	2,7	H...H	2,0	1,9

Рассматривая потенциал твердых сфер, можно, очевидно, получить только разрешенные и запрещенные области значений ϕ и ψ. На рис. 4.7 показаны результаты расчетов, проведенных в работе [11]. Сплошными линиями обведены области, разрешенные при обычных межатомных расстояниях, пунктирными — при минимальных расстояниях, приведенных во втором столбце табл. 4.2. На карте показаны конформации правой и левой α-спиралей (α_D и α_L), параллельной и антипараллельной β-форм (β_p и β_a) полиглицина II и коллагена (К). Аналогичные карты были получены для ряда других аминокислотных остатков [4, 12, 13]. Естественно, что с увеличением размера радикала R область разрешенных значений углов ϕ, ψ уменьшается.

Расчеты конформационных энергий проводятся с использованием более точных выражений для потенциалов. Потенциал слагается из эффекта скрещенных связей и эффекта ориентации (см. стр. 123). В общем виде он может быть записан в виде

$$U(\phi, \psi) = {}^1/_2 U_\phi^0 (1 - 3\cos\phi) + {}^1/_2 U_\psi^0 (1 - 3\cos\psi) + \sum_{i,k} U(r_{ik}) + U_C. \quad (4,1)$$

Потенциал $U(r_{ik})$ записывается либо в форме (3,10) (см. стр. 124), либо по Леннард-Джонсу

$$U(r_{ik}) = \frac{d_{ik}}{r_{ik}^{12}} - \frac{e_{ik}}{r_{ik}^{6}}, \quad (4,2)$$

где d_{ik} и e_{ik} — соответствующие константы для пары атомов i, k. U_C характеризует кулоновское, электростатическое взаимодействие между соседними парами пептидных групп, определяемое

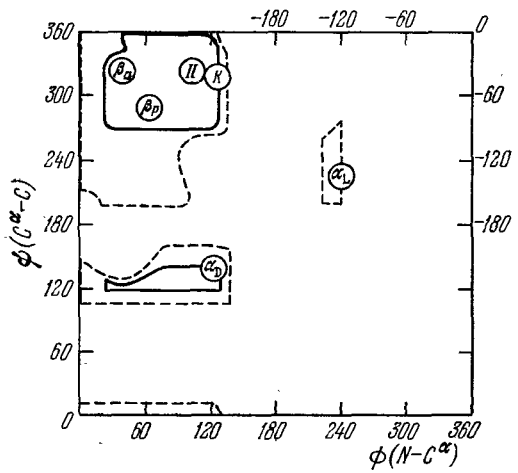


Рис. 4.7. Стерическая карта для L-аланина (объяснение в тексте).

их большими дипольными моментами, достигающими 3,7 дебая (см. стр. 190).

Барьеры внутреннего вращения U_ϕ^0 и U_ψ^0 находят из данных, полученных при исследовании модельных низкомолекулярных соединений. По-видимому, $0{,}48 < U_\psi^0 < 1{,}3$ *ккал/моль* (0,48 — значение барьера для CH_3—CO—OH, 1,3 — для CH_3—CO—Cl). По оценке Скотта и Шераги [14] U_ψ^0 даже меньше 0,2 *ккал/моль*, а по данным Брандта и Флори [10] — меньше 1,5 *ккал/моль*. Так или иначе барьеры U_ϕ^0 и U_ψ^0 малы, заметно меньше, чем для углеводородов (стр. 123).

Притяжение несвязанных атомов, дающее отрицательный вклад в энергию $U(r_{ik})$, определяется ван-дер-ваальсовыми дисперсионными силами (см. § 4.3). Коэффициенты e_{ik} в (4,2) и соответствующие им коэффициенты K' в уравнении (3,10) (см. стр. 124) определяются поляризуемостями атомов и числами их внешних электронов [4]. В табл. 4.3 приведены константы, входящие в выражение для $U(r_{ik})$ (см. (4,2)).

Таблица 4.3 [4]

Константы потенциала Леннард-Джонса

Атомы	e_{ik}, ккал/моль·Å	r_{ik} (минимум), Å	$10^{-3}\, d_{ik}$, ккал/моль·Å^{12}
H...H	47	2,40	4,5
C...C	370	3,40	286
N...N	363	3,10	161
O...O	367	3,04	145
C...O	367	3,22	205
C...N	366	3,25	216
C...H	128	2,90	38
N...O	365	3,07	153
H...O	124	2,72	25
H...N	125	2,75	27

Расчет энергии электростатического взаимодействия U_C затруднен тем, что неизвестно значение диэлектрической проницаемости ε, фигурирующей в законе Кулона

$$U_C = \sum_{i,\,k} \frac{q_i q_k}{\varepsilon r_{ik}}, \qquad (4,3)$$

где q_i, q_k — заряды на i-х и k-х атомах. Если между взаимодействующими атомами нет других атомов цепи или молекул растворителя, то ε определяется поляризуемостями взаимодействующих атомов и реактивным полем окружающей среды. На таких расстояниях $\varepsilon \approx 3{,}5$ [10]. Расчеты U_C были проведены с использованием парциальных зарядов атомов, подобранных таким образом, чтобы дать правильные значения дипольных моментов связей и пептидной группы в целом [15]. Поланд и Шерага прибегли для этой же цели к значениям σ- и π-электронных зарядов атомов, вычисленным методом молекулярных орбит (см. стр. 110) [16].

Для атомов O и N, соединенных водородной связью, можно воспользоваться полуэмпирической функцией $U_{в.с} = U_{ik} + U_C$, которая определяется значениями энергии водородной связи и равновесными расстояниями O···H—N [4, 15, 16].

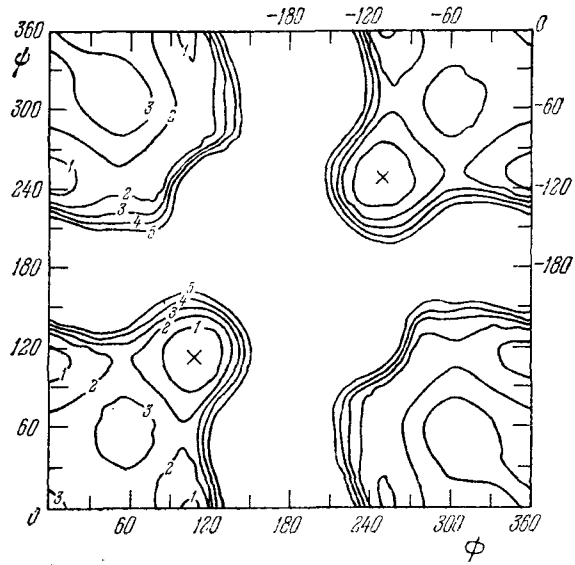


Рис. 4.8. Стерическая карта для глицила, полученная без учета U_C.

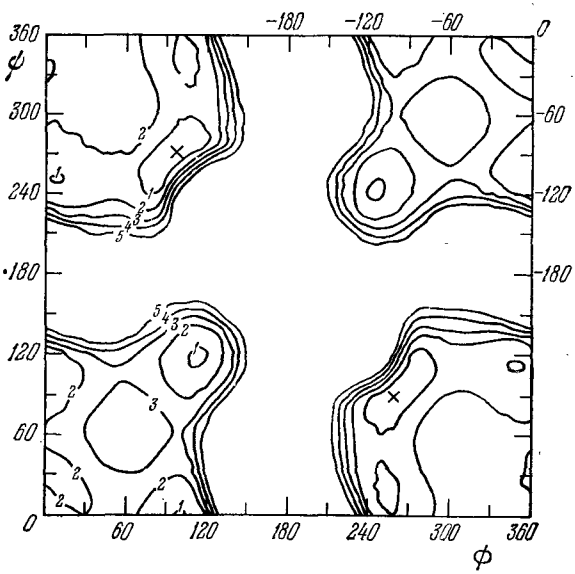


Рис. 4.9. Стерическая карта для глицила, полученная с учетом U_C.

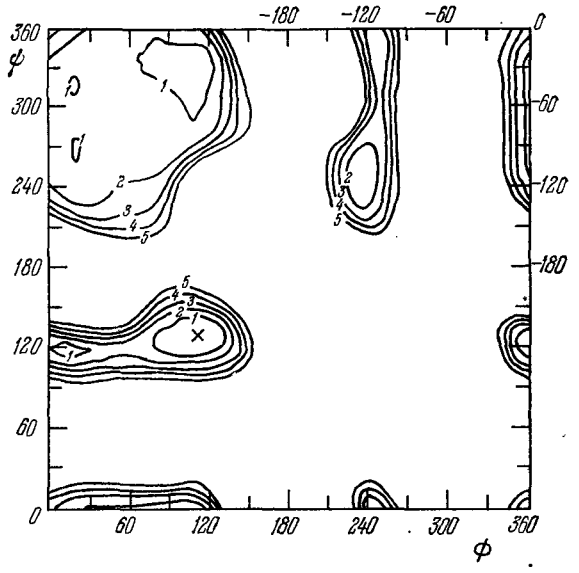


Рис. 4.10. Стерическая карта для аланина, полученная без учета U_C.

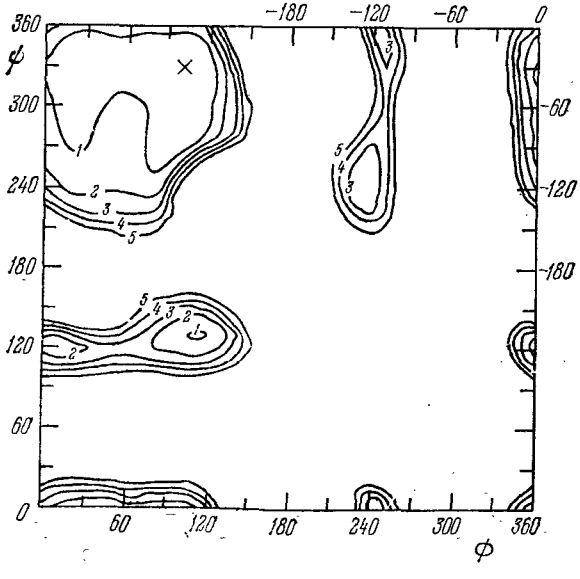


Рис. 4.11. Стерическая карта для аланила, полученная с учетом U_C.

Выражение (4,1) не учитывает искажений длин связей и валентных углов, определяемых силовыми постоянными, находимыми из частот колебательных спектров. Искажения эти, по-видимому, малы; их расчет пока еще не проводился.

Выражение (4,1) относится к изолированной полипептидной цепи. В водном растворе она окружена сольватной оболочкой и, рассматривая взаимодействие несвязанных атомов, следует учитывать изменение свободной энергии молекул воды, удаляемых из этой оболочки при возникновении контакта между атомами. Такое изменение значительно в случае полярных, и в особенности, заряженных атомов и групп [4, 17]. В сущности при нахождении стабильных конформаций следует минимизировать сумму внутримолекулярной потенциальной энергии и свободной энергии растворителя [18].

Расчеты для ряда полипептидных цепей и для таких полипептидов, как грамицидин-*S*, окситоцин, вазопрессин и др., проводились на ЭВМ Шерагой с сотрудниками и Флори с сотрудниками.

На рис. 4.8—4.11 показаны стерические карты, полученные Флори с сотрудниками [2, 19] без учета и с учетом U_C для глицила и аланила (цифры у кривых указывают значения соответствующих энергий в *ккал/моль*). Проведены «геодезические» линии, отвечающие энергиям от 1 до 5 *ккал/моль*. Линии, соответствующие бóльшим энергиям, не показаны. Крестиками отмечены самые низкие значения энергии. Учет электростатического вклада несколько изменяет расположение этих минимумов, но в целом сказывается на виде карты не очень сильно. Поучительно сравнение карт на рис. 4.10 и 4.11 с картой разрешенных областей значений ϕ и ψ для аланила (см. рис. 4.7).

Более строгие расчеты индийских авторов, использующие потенциалы, в принципе не отличающиеся от атом — атом потенциалов Китайгородского (см. стр. 124), привели к результатам, близким к приведенным [20].

§ 4.3. ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВЫ СИЛЫ

Функционирование вещества в обычной химии определяется прежде всего сильными взаимодействиями — химическими валентными связями. Напротив, взаимодействия, ответственные за передачу и рецепцию химических сигналов в биологических системах, — преимущественно слабые, невалентные взаимодействия. Это связано с рядом факторов. Клетка, организм существуют в мягких условиях физиологической температуры и нормального давления. Биохимические процессы реализуют тонкую перестройку химических связей, зачастую не сопровождаемую значительными изменениями свободной энергии, но суммарный

вклад слабых взаимодействий в эти изменения может быть соизмерим с «химическим».

Биологическая система находится в конденсированном состоянии, само существование которого определяется слабыми, а не химическими силами; грубо говоря, клетка есть молекулярный, а не ионный или атомный апериодический кристалл. Более того, можно сказать, что звенья биополимера также находятся в конденсированном состоянии в его макромолекуле или в надмолекулярной структуре. Будучи соединены друг с другом химическими связями, звенья биополимерной цепи образуют вторичную структуру, стабилизуемую слабыми невалентными взаимодействиями. Функциональная структура биополимера, а также биологически активного низкомолекулярного соединения есть конформационная структура, обусловленная слабыми взаимодействиями.

Нехимические силы ответственны за существование конденсированного жидкого или твердого состояния, ими определяются свойства поверхностей раздела фаз (поверхностное натяжение), явление адсорбции и т. д. Грубой мерой этих слабых взаимодействий является теплота испарения жидкости, во много раз превосходящая теплоту плавления кристалла.

Неспецифические силы взаимодействия между атомами и молекулами, ван-дер-ваальсовы силы, имеют электрическую природу. Они обусловливаются взаимодействиями электронных оболочек атомов и молекул. Две основные физические величины характеризуют эти электронные оболочки — вектор дипольного момента и тензор поляризуемости. Строго говоря, наряду с дипольным моментом следует учитывать и высшие мультипольные моменты — квадрупольный, октупольный и т. д. Однако их роль за редкими исключениями мала.

Дипольный момент молекулы или атомной группы выражает асимметрию распределения электрических зарядов в электрически нейтральной системе. Дипольный момент малой молекулы соответствует по порядку величины произведению заряда электрона ($4{,}8 \cdot 10^{-10}$ в системе СГСЭ) на длину химической связи ($\sim 10^{-8}$ *см*); получаем порядок 10^{-18} в системе СГСЭ; такая единица называется *дебай*, и обозначается D.

Поляризуемость характеризует способность электронной оболочки деформироваться, смещаться под действием внешнего электрического поля — статического поля или переменного поля световой волны. Под действием поля с напряженностью $\mathbf{E}$ в электронной системе индуцируется электрический дипольный момент $\mathbf{p} = a\mathbf{E}$. Коэффициент a, имеющий размерность объема, именуется *поляризуемостью*. Порядок величины поляризуемости атомов и малых молекул тот же, что и их объемов, т. е. равен 10^{-24} *см*^{3}.

Обычное ван-дер-ваальсово взаимодействие дипольных молекул, определяющее их взаимное притяжение, слагается из трех эффектов: *ориентационного* (впервые рассмотренного Кезомом), *индукционного* (рассмотренного Дебаем) и *дисперсионного* (рассмотренного Лондоном). Если молекулы лишены собственного дипольного момента, то между ними действуют лишь дисперсионные силы.

Энергия ориентационного взаимодействия двух диполей обратно пропорциональна кубу расстояния r между ними:

$$U_{\text{ориент}} = \frac{1}{r^3}\left\{ \mathbf{p}_1\mathbf{p}_2 - \frac{3(\mathbf{p}_1\mathbf{r})(\mathbf{p}_2\mathbf{r})}{r^2} \right\}. \qquad (4,4)$$

Если два диполя установлены «в хвост» друг другу, т. е. все три вектора $\mathbf{p}_1$, $\mathbf{p}_2$ и $\mathbf{r}$ коллинеарны, то

$$U_{\text{ориент}} = -2p_1p_2/r^3. \qquad (4,5)$$

Если дипольные молекулы находятся в состоянии теплового движения в газе или в жидкости, то выражение (4,4) следует усреднить по всем взаимным ориентациям диполей с учетом больцманова фактора:

$$\bar{U}_{\text{ориент}}(r,\ T) = \frac{\int\int U(r,\ \Omega_1,\ \Omega_2)\exp\left(-U(r,\ \Omega_1,\ \Omega_2)/kT\right) d\Omega_1\, d\Omega_2}{\int\int \exp\left(-U(r,\ \Omega_1,\ \Omega_2)/kT\right) d\Omega_1\, d\Omega_2}, \qquad (4,6)$$

где Ω_1 и Ω_2 характеризуют направления первого и второго диполей. При $U_{\text{ориент}} \ll kT$ усреднение дает

$$\bar{U}_{\text{ориент}} = -2p_1^2p_2^2/3kTr^6, \qquad (4,7)$$

т. е. энергия ориентационного взаимодействия обратно пропорциональна шестой степени расстояния между молекулами.

Индукционный эффект состоит во взаимодействии диполя одной молекулы с диполем, индуцированным полем диполя первой молекулы в соседней молекуле. Эти диполи параллельны. Поле диполя p в молекуле, отстоящей от него на расстоянии r, равно $E = 2p/r^3$ (если p и r параллельны), и для энергии индукционного взаимодействия находим

$$U_{\text{индукц}} = -\tfrac{1}{2}aE^2 = -2ap^2/r^6. \qquad (4,8)$$

Подобно $U_{\text{ориент}}$, энергия индукционного взаимодействия также обратно пропорциональна шестой степени межмолекулярного расстояния, но от температуры она не зависит.

Формулы (4,4)—(4,8) справедливы лишь для точечных диполей, т. е при условии малости размеров диполей по сравнению с расстоянием между ними. Приближенно это условие можно записать в виде

$$p \ll re, \qquad (4,9)$$

где e — заряд электрона. Если $p = 1D$, то p/e составляет 0,2 Å, т. е. величину, существенно меньшую межатомных расстояний порядка ангстрем. Однако такая запись действительно имеет приближенный характер — в ряде случаев заряды, образующие диполь, локализованы на атомах, достаточно удаленных друг от друга, хотя сама величина p и мала. Если условие точечности диполей не выполняется, то необходимо проводить расчет взаимодействия монополей — точечных зарядов.

Изложенная классическая теория достаточна для оценки соответствующих энергий. Строгая квантовомеханическая теория требует применения теории возмущений в первом и во втором приближениях. Ориентации, а также электронное и ядерное движения характеризуются квантовыми числами. Так, усреднение по всем ориентациям диполей в квантовой механике выражается усреднением по магнитным квантовым состояниям. Общий характер зависимости от r и p сохраняется, совпадает и порядок величины эффекта, но полной аналогии между классической и квантовой теорией нет. В квантовой механике появляются специфические резонансные силы, определяемые снятием вырождения волновых функций, т. е. гибридизацией.

Строгие квантовомеханические расчеты ориентационных и индукционных сил оказываются необходимыми при исследовании тонких эффектов в полярных газах, например уширения линий микроволнового спектра при повышении давления, явлений переноса и т. д.

В отличие от электростатических ориентационных и индукционных сил, дисперсионные силы вообще не имеют классического аналога. Это наиболее важный и универсальный вид невалентных взаимодействий атомов и молекул.

Гельман [21] и Фейнман [22], доказали важную теорему, согласно которой силы, действующие на ядра атомов и молекул, определенные по поверхностям потенциальной энергии, вычисленным квантовомеханически, совпадают с силами, полученными в рамках классической электростатики по данным о распределении электронной плотности. Иными словами, если такое распределение найдено из решения уравнения Шредингера, то силы, действующие на ядра, находятся с помощью классической формулы

$$\mathbf{F}_{ab} = \int\int \frac{\rho_a(\mathbf{r}_i)\,\rho_b(\mathbf{r}_k)}{r_{ik}^3}\,\mathbf{r}_{ik}\,d\mathbf{r}_i\,d\mathbf{r}_k, \qquad (4,10)$$

где a и b — индексы, отмечающие две молекулы, ρ_a, ρ_b — электронные плотности. В сущности, теория дисперсионных сил, впервые данная Лондоном, основывается на этой теореме.

Элементарный квантовомеханический расчет энергии дисперсионного взаимодействия, приводимый во многих учебниках и

монографиях (см., например, [23]), исходит из представления об электронах как о гармонических осцилляторах. Между двумя осцилляторами имеется электростатическое диполь-дипольное взаимодействие, вследствие чего вместо первоначального колебания с частотой ω_0 возникают два нормальных колебания с частотами, которые отличаются от ω_0 тем больше, чем сильнее взаимодействие. Соответственно изменяется и нулевая энергия колебаний (квантовый эффект!). Вместо

$$E_0^0 = 6\hbar\omega_0/2 \tag{4,11}$$

(множитель 6 получается потому, что каждый электрон-осциллятор предполагается имеющим три степени свободы) вследствие мгновенного электрического взаимодействия нулевая энергия оказывается равной

$$E_0 = {}^1/_2\hbar\omega_0\left[2\left\{(1+e^2/kr^3)^{1/2}+(1-e^2/kr^3)^{1/2}\right\}+\right.$$
$$\left.+(1+2e^2/kr^3)^{1/2}+(1-2e^2/kr^3)^{1/2}\right], \tag{4,12}$$

где e — заряд электрона, k — коэффициент упругости осциллятора, r — расстояние между осцилляторами. При $e^2/kr^3 \ll 1$

$$E_0 \approx 3\hbar\omega_0 - {}^3/_4\hbar\omega_0\,\frac{e^4}{k^2r^6} \tag{4,13}$$

и, следовательно, энергия взаимодействия равна

$$U_{\text{дисп}} = -\,{}^3/_4\hbar\omega_0\,\frac{e^4}{k^2r^6}\,. \tag{4,14}$$

Поместим электрон-осциллятор в электрическое поле напряженностью $\mathbf{E}$. Сила, действующая на электрон $e\mathbf{E}$, уравновешивается упругой силой $k\mathbf{r}$. Следовательно, для индуцированного дипольного момента имеем

$$\mathbf{p} = e\mathbf{r} = \frac{e^2}{k}\,\mathbf{E} = a\mathbf{E}, \tag{4,15}$$

где a — поляризуемость осциллятора, равная

$$a = e^2/k = e^2/m\omega_0^2 \tag{4,16}$$

(m — масса осциллирующего электрона).

Подставляя a в выражение для $U_{\text{дисп}}$, получаем

$$U_{\text{дисп}} \doteq -\,{}^3/_4\hbar\omega_0 a^2/r^6. \tag{4,17}$$

Энергия дисперсионного взаимодействия также обратно пропорциональна шестой степени расстояния между взаимодействующими системами.

Дисперсионные силы — силы взаимодействия «мгновенных» диполей, возникающих вследствие квантовомеханического

движения электронов в системах, не имеющих постоянных дипольных моментов. Более строгий расчет дисперсионного взаимодействия, проводимый методом теории возмущений или вариационным методом [21, 23—25], дает

$$U_{\text{дисп}} = -{}^3/_2 \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \frac{a_1 a_2}{r^6}, \qquad (4,18)$$

где a_1, a_2 — поляризуемости первой и второй молекул, I_1 и I_2 — их *потенциалы ионизации*, т. е. энергии, необходимые для отрыва электрона. Если обе молекулы тождественны, то

$$U_{\text{дисп}} = -{}^3/_4 I a^2 / r^6. \qquad (4,19)$$

В модельной теории вместо I фигурирует квант колебательной энергии электрона-осциллятора $\hbar\omega_0$. Приведем также приближенное выражение для $U_{\text{дисп}}$, выведенное Слейтером и Киркву-дом [26]:

$$U_{\text{дисп}} = -\frac{3}{2r^6} \frac{e}{m^{1/2}} \hbar \frac{a_1 a_2}{(a_1/n_1)^{1/2} + (a_2/n_2)^{1/2}}, \qquad (4,20)$$

где n_1, n_2 — эффективные числа внешних электронов взаимодействующих систем.

Приведенные выше выражения справедливы на расстояниях, много меньших скорости света, деленной на частоту ω_0. Этому условию вполне удовлетворяют обычные межмолекулярные расстояния в конденсированных системах. На бо́льших расстояниях (порядка сотен А) следует учитывать эффекты запаздывания, связанные с конечной скоростью распространения электромагнитного поля, которые уменьшают $U_{\text{дисп}}$ [23].

Суммарное ван-дер-ваальсово взаимодействие двух одинаковых молекул газа с постоянными дипольными моментами p и поляризуемостями a (в расчете на пару молекул) представится суммой выражений (4,7), (4,8) и (4,19)

$$U = U_{\text{ориент}} + U_{\text{индукц}} + U_{\text{дисп}} = -\frac{1}{r^6}\left(\frac{2p^4}{3kT} + 2ap^2 + {}^3/_4 I a^2\right). \qquad (4,21)$$

Именно эта сумма фигурирует в потенциалах (3,10) и (4,2). Наибольший вклад в U вносят дисперсионные силы, за исключением тех случаев, когда дипольный момент очень велик. В табл. 4.4 приведены параметры, определяющие энергию ван-дер-ваальсовых взаимодействий для простейших молекул, и соответствующие величины коэффициентов e_{ik} в выражении (4,2).

Результаты расчета суммарной энергии хорошо согласуются с экспериментальными значениями для теплот испарения. Энергия ван-дер-ваальсова взаимодействия при упаковке молекул в жидкости или в твердом теле есть величина, равная нескольким *ккал/моль*.

Во всем предыдущем изложении поляризуемость рассматривалась как скаляр. В действительности же поляризуемость несферической электронной системы — молекулы или атомной группы — тензорная величина, имеющая различные значения по разным направлениям в молекуле. Это необходимо учитывать при рассмотрении взаимодействия на малых расстояниях, в частности при плотной упаковке молекул в кристаллах и жидкостях. Сама упаковка молекул в молекулярных кристаллах обусловлена анизотропными дисперсионными силами [27]. Так, плоские π-электронные системы — ароматические соединения, азотистые основания (см. стр. 83) и т. д. — сильнее всего взаимодействуют при параллельном расположении. Эти взаимодействия по существу и определяют вторичную структуру нуклеиновых кислот (см. гл. 8).

Таблица 4.4

Параметры, определяющие энергию ван-дер-ваальсова взаимодействия в простых молекулах

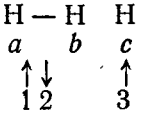
Атомы и молекулы	$a \cdot 10^{24}$, $см^3$	$p \cdot 10^{18}$, СГСЭ	I, $эв$	$e_{lk} \cdot 10^{12}$, $эрг$		
				$U_{ориент}$	$U_{индукц}$	$U_{дисп}$
He	0,205	0	24,5	0	0	1,49
Ne	0,39	0	25,7	0	0	7,97
Ar	1,63	0	17,5	0	0	69,5
Kr	2,46	0	14,7	0	0	129
Xe	4,0	0	12,2	0	0	273
H_2	0,81	0	14,5	0	0	11,4
CO	1,99	0,1	14,3	0,003	0,057	67,5
HCl	2,63	1,03	13,4	18,6	5,4	111
HBr	3,58	0,78	12,1	6,2	4,05	185
HJ	5,4	0,38	10,5	0,35	1,68	370
NH_3	2,24	1,5	11,7	84	10	70
H_2O	1,48	1,84	18	190	10	47

Изложенная теория ван-дер-ваальсовых сил — теория в дипольном приближении. При учете квадруполей, октуполей и т. д. (и в классических выражениях, и в выражении для потенциала, с помощью которого вычисляются дисперсионные силы) вклады в энергию притяжения убывают с расстоянием быстрее, чем r^6, — как r^8, r^{10} и т. д.

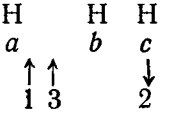
Если молекула находится в возбужденном состоянии, то при ее взаимодействии с такой же, но невозбужденной молекулой может возникнуть резонансная передача энергии возбуждения. В результате появляются резонансные силы взаимодействия, убывающие с расстоянием как r^3. Эти взаимодействия

существенно влияют на оптические свойства молекул, в частности молекул биополимеров (см. гл. 5).

Мы рассмотрели ван-дер-ваальсово, нехимическое взаимодействие электронных систем. Отталкивание, т. е. положительный член в выражении для потенциала межмолекулярных сил (например, член, пропорциональный r^{-12} в (4, 2)), проявляется лишь на малых расстояниях. Происхождение этого отталкивания, наглядно интерпретируемого как невозможность пространственного совмещения двух электронных систем, раскрывается квантовой механикой. Отталкивание систем с насыщенными валентностями характеризует насыщаемость химических связей. Рассмотрим взаимодействие молекулы H_2 с атомом H. Спины электронов в H_2 антипараллельны. Имеем



При обмене местами спина 3 со спином 2 получаем



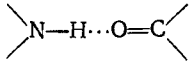
Но состояние с параллельными спинами отвечает отталкиванию — обмен спинами ведет к повышению энергии. Обмен $1 \rightleftarrows 3$ не уничтожает молекулы H_2 как устойчивой системы, но также приводит к повышению энергии, так как спины 1 и 3 параллельны и их координатная волновая функция антисимметрична, т. е. соответствует состоянию отталкивания. В обоих случаях обмена молекула H_2 отталкивает атом H. Силы отталкивания — обменные силы. Их теоретический расчет возможен в простейших случаях [23], но для практических целей всегда можно пользоваться эмпирическими потенциалами (даже моделью твердых сфер с ван-дер-ваальсовыми радиусами).

§ 4.4. ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ И СТРУКТУРА ВОДЫ

Наряду с ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями водородные связи являются важнейшими для биологии и биофизики нехимическими взаимодействиями. Мы уже видели, что водородные связи стабилизуют вторичную структуру полипептидных цепей. То же относится к конформационному строению нуклеиновых кислот и углеводов.

Биополимеры функционируют в водном окружении. Вода — особая жидкость, обладающая рядом аномалий. Они также обусловлены водородными связями.

Понятие «водородная связь» было впервые введено в 1920 г. Латимером и Родебушем [28] для объяснения свойств ассоциированных веществ (наиболее важное из них — вода). Атом водорода, содержащийся в группах O—H, N—H, H—F, H—Cl и иногда в S—H и C—H, образует специфическую связь с атомами O, N, F, Cl той же или другой молекулы



(4,22)

Наличие такой связи отражается на физических и физико-химических свойствах вещества. Так, межмолекулярные водородные связи определяют ассоциацию соответствующих жидкостей.

Таблица 4.5

Свойства изоэлектронных жидкостей

Вещество	$T_{пл}$, °K	$T_{кип}$, °K	Теплота испарения, *ккал/моль*	Молярный объем, *см³/моль*
Фтористый водород HF	181	292	7,20	20,2
Вода H_2O	273	373	9,72	18,0
Аммиак NH_3	195	240	5,57	20,8
Метан CH_4	89	112	2,21	34,0

Ассоциированные вещества характеризуются большими теплотами испарения, высокими температурами плавления и кипения и большими различиями между ними. Сравним четыре вещества, состоящие из изоэлектронных молекул (табл. 4.5). Метан — неассоциированная жидкость без водородных связей. Остальные вещества ассоциированы. Сравним свойства двух изомерных веществ: этанола и диметилэфира. В этанол входит группа OH, образующая водородную связь. В диметилэфире водородные связи отсутствуют (табл. 4.6).

Таблица 4.6

Свойства этанола и диметилэфира

Вещество	$T_{пл}$, °K	$T_{кип}$, °K	Теплота испарения, *ккал/моль*
Этанол C_2H_5OH	161	351	10,19
Диметилэфир $(CH_3)_2O$	135	249	4,45

Водородные связи определяют большие значения диэлектрических проницаемостей и отклонения величин дипольных моментов молекул от векторной суммы дипольных моментов связей.

Диэлектрические проницаемости типичных ассоциированных жидкостей при 20 °С равны соответственно: вода — 80, HCN — 95, формамид — 84, метанол — 33, аммиак — 15,5.

Структурные исследования кристаллов, содержащих водородные связи, показывают, что при связывании атомом водорода двух электроотрицательных атомов А и В расстояние между ними R_{AB} обычно меньше суммы ван-дер-ваальсовых радиусов. Соответствующие данные приведены в табл. 4.7 [29]. Суммы ван-дер-ваальсовых радиусов относятся только к атомам А и В, скажем к атомам О в связи О—Н···О. Цифры в последнем столбце таблицы определены Пиментелом и Мак-Клелланом из спектроскопических данных [29].

Таблица 4.7

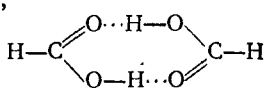
Межатомные расстояния в кристаллах

Водородные связи А—Н···Б	Вещества А—Н	Сумма ван-дер-ваальсовых радиусов А и Б, Å	R_{AB}, Å	Оценка сжатия, вызванного водородной связью, Å
О—Н···О	Неорганические кислоты	2,80	2,55	0,65
	Карбоновые кислоты		2,63	0,57
	Фенолы		2,67	0,53
	Спирты		2,74	0,46
	Лед		2,76	0,40
О—Н···N		2,90 (3,05) [1]	2,80	0,5
N—Н···О	Соли аммония	2,90 (3,05)	2,88	0,5
	Амиды		2,93	0,4
	Амины		3,04	0,3
N—Н···N		3,00 (3,30)	3,10	0,4
О—Н···Cl		3,20	3,08	—
N—Н···F		2,85 (3,00)	2,78	—
N—Н···Cl		3,30 (3,45)	3,21	—
F—Н···F		2,70	2,44	—

[1]) В скобках указаны максимальные значения.

Водородная связь ярко проявляется в спектрах — колебательных (инфракрасных и комбинационных), электронных и в спектрах ядерного магнитного резонанса. Характеристические частоты колебаний групп, содержащих водород, например О—Н-группы, существенно понижаются, если этот водород образует водородную связь. Так, в мономерной муравьиной кис-

лоте эта частота равна 3682 $см^{-1}$, а в димере, стабилизованном водородными связями,



она составляет только 3080 $см^{-1}$. Такие димеры карбоновых кислот устойчивы и в парáх. Меняются и другие частоты мономера. Инфракрасные полосы поглощения О—Н-групп сильно расширяются при образовании водородной связи, и их интенсивности увеличиваются иногда на целый порядок. Причины этих явлений исследовались в ряде теоретических работ (см. [30—32]). Проявления водородной связи в спектрах подробно рассмотрены в монографии [29]. Водородная связь существенно влияет на некоторые электронные переходы, например в случае пиридина, взаимодействующего с водой [33]. Она сдвигает в коротковолновую сторону так называемые $n\pi^*$-переходы, что дает возможность отличить их от $\pi\pi^*$-переходов.

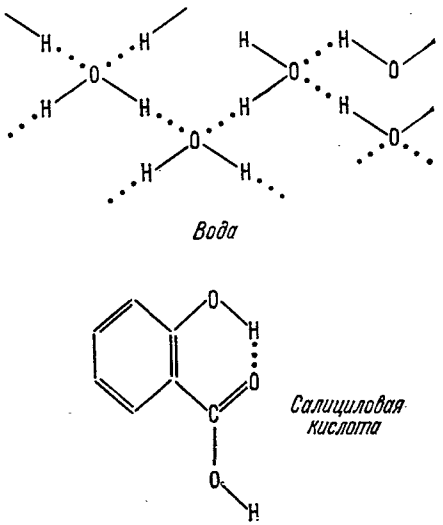


Рис. 4.12. Межмолекулярные водородные связи (в воде) и внутримолекулярная водороднаи связь (салициловая кислота).

В спектрах протонного магнитного резонанса (ПМР) отчетливо наблюдаются специфические химические сдвиги, вызванные водородной связью. Спектроскопия ПМР наряду с инфракрасной, представляет наилучший метод изучения водородной связи (см. [29] и § 5.10).

Все сказанное относится как к межмолекулярным, так и к внутримолекулярным водородным связям. На рис. 4.12 показаны связи и того и другого типа — в воде и в салициловой кислоте.

Энергия водородных связей определяется из данных о термодинамических свойствах соответствующих веществ, из спектроскопических данных и т. д. [29]. Термодинамические функции выражаются через константу равновесия

$$K = \frac{\text{Активность соединения}}{\text{Активность реагентов}} = \frac{[\text{A—H}\cdots\text{B}]}{[\text{AH}]\,[\text{B}]} \qquad (4,23)$$

следующим образом:

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K, \qquad (4,24)$$

$$\Delta H = RT^2\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p. \qquad (4,25)$$

Характерные значения ΔH, т. е. энергии водородной связи, приведены в табл. 4.8.

Таблица 4.8

Значения ΔH для водородных связей различных типов

Тип связи и вещество	ΔH, *ккал/моль*
1. O—H···O	
Вода H_2O	Газ 4,4—5,0; жидкость 2,8
Метанол CH_3OH	Газ 3,2—7,3; жидкость 4,7
Этанол C_2H_5OH	Газ и жидкость 4,0
2. N—H···N	
Аммиак NH_3	Газ 3,7—4,4
Метил- и этиламин CH_3NH_2, $C_2H_5NH_2$	Газ 3,1—3,6
3. F—H···F	
Фтористый водород HF	Газ 6,7—7,0
4. C—H···N	
Синильная кислота HCN	Газ 3,3; жидкость 4,6

Дополним эту таблицу приближенными оценками [34]. Имеем: (в *ккал/моль*) 7 для F—H···F, 3—6 для O—H···O, 3—5 для N—H···N, 5 для N—H···F, 4,7 для O—H···N, 2,6 для C—H···O, 2,3 для N—H···O. Величина ΔS для O—H···O составляет 14—18 *кал/моль·град.*

Водородная связь образуется при углероде лишь в немногих случаях (цианистый водород HCN, хлороформ $CHCl_3$ с пиридином и триэтиламином и др.).

Природа водородной связи специфична. Атом H не обобществляется полностью атомами A и B. Рентгенография не позволяет непосредственно определить положение атома водорода (см. стр. 272), но его можно установить методом нейтронографии. Такое исследование льда было проведено в работе [35]. Выяснилось, что обозначение O—H···O реально обосновано — химическая связь O—H существенно короче и, значит, прочнее водородной связи H···O. При повышении температуры связи O—H и H···O могут меняться местами. Из квантовомеханического расчета, а также из общих соображений следует, что кривая зависимости энергии от положения атома H в димере муравьиной кислоты имеет два симметричных минимума, разделенных активационным барьером. Таким образом, при повыше-

нии температуры атом водорода способен мигрировать от одного атома кислорода к другому.

Водородная связь всегда образуется между двумя электроотрицательными атомами. Сначала казалось, что она имеет чисто электростатическую природу [36, 37]. Действительно, теоретические расчеты электростатического взаимодействия привели к значениям энергии водородной связи, близким к опытным данным. Однако такое представление нельзя согласовать со спектроскопическими данными — с интенсивностями инфракрасных полос, а также с данными по дипольным моментам и спектрам протонного магнитного резонанса [33].

Квантовомеханический расчет показывает, что наряду с электростатическим вкладом следует учитывать вклад в энергию водородной связи, определяемый делокализацией электронов. Волновую функцию системы O—H···O, рассматриваемую как четырехэлектронную (два электрона связи O—H и два — неподеленной пары на втором атоме кислорода), можно представить в виде линейной комбинации волновых функций, отвечающих следующим пяти валентным структурам [34]:

1. $\backslash O{-}H\ \ O/$ ковалентная.

2. $\backslash O^- H^+ O/$ ионная.

3. $-O^+ H^- O$ ионная.

4. $\backslash O^- H{-}\overset{+}{O}/$ перенос заряда, длинная связь $H{-}O^+$.

5. $\backslash O\ H^-\ \overset{+}{O}/$ перенос заряда, O—O связь,

т. е.

$$\Psi = c_1\psi_1 + c_2\psi_2 + c_3\psi_3 + c_4\psi_4 + c_5\psi_5. \qquad (4{,}26)$$

Электростатическому взаимодействию отвечают структуры 1, 2, 3. Энергия делокализации, т. е. понижение энергии по сравнению со структурой 1, вызванное гибридизацией с четырьмя другими структурами, была оценена в 8 *ккал/моль* [38, 39].

И электростатическое взаимодействие, и делокализация зарядов уменьшают длину водородной связи. Этому уменьшению препятствует отталкивание, энергия которого, оцененная полуэмпирически, составляет примерно 8,4 *ккал/моль*. Наконец, дисперсионное взаимодействие вносит вклад в энергию связи около 3 *ккал/моль* [34, 40]. Таким образом, общая энергия водород-

ной связи равна сумме электростатической (6 *ккал/моль*), делокализационной (8 *ккал/моль*), дисперсионной (3 *ккал/моль*) энергий минус энергия отталкивания (8,4 *ккал/моль*). Это дает для O—H···O величину 8,6 *ккал/моль* вместо экспериментального значения (лед) 6,1 *ккал/моль*.

Соколов [32] развил квантовомеханическую теорию водородной связи, исходящую из представлений о существовании донорно-акцепторной связи, обусловленной обобществлением неподеленной пары электронов. В системе A—H···B связь A^-—H занимает «промежуточное» положение между ионной A^-H^+ и ковалентной. Отвлекаясь от электростатического взаимодействия, отметим, что здесь возникают два новых фактора. Во-первых, вследствие уменьшения электронной плотности вблизи атома H уменьшается и отталкивание, присущее системе гомеополярная связь A—H и атом B. Во-вторых, появляется дополнительное притяжение между H и B, вызываемое перераспределением электронной плотности атома B в поле атома H, сходное с донорно-акцепторными взаимодействиями. На основе этих представлений получено количественное истолкование спектроскопических проявлений водородной связи. В цитируемой работе было показано, что первой стадией процессов межмолекулярного или внутримолекулярного перехода протона, в частности таутомерных превращений (см. стр. 85), всегда является образование водородной связи. Водородные связи формируют структуру воды и определяют ее свойства.

Рассмотрим прежде всего структуру льда — обычной его модификации, именуемой «лед 1» (в отличие от других полиморфных форм, коих не менее 8, — они существуют при повышенном давлении [41]). Лед 1 гексагонален, каждый атом кислорода в решетке расположен в центре тетраэдра, в вершинах которого находятся соседние атомы O. Расстояния O—O равны 2,76 Å (ср. стр. 198). Каждая молекула H_2O связана с четырьмя соседними водородными связями. В элементарную ячейку входят четыре молекулы. Решетка льда рыхлая, с множеством пустот, так как ее координационное число (т. е. число ближайших соседей) мало — оно равно четырем. Поэтому лед легче своего расплава. Это свойство льда не уникально, им обладают также кристаллы алмаза, кремния и германия, имеющие сходное строение.

Решетка льда — молекулярная решетка. Анализируя ее структуру, Полинг [42] пришел к выводу о неполной упорядоченности кристалла даже при 0 °K. Равновероятны все расположения молекул H_2O в решетке, удовлетворяющие следующим условиям: 1) молекулы H_2O сохраняют свою целостность, 2) каждая молекула H_2O ориентирована так, что две ее O—H-связи направлены к двум из четырех ближайших атомов кислорода, 3) ориентации соседних молекул H_2O таковы, что только один

атом H располагается на прямой, соединяющей соседние атомы кислорода. Очевидно, что каждый атом H может иметь два положения — около «своего» атома O и около ближайшего соседнего атома кислорода. Эти предположения полностью подтвердились исследованием льда методом нейтронографии (см. § 5.1)

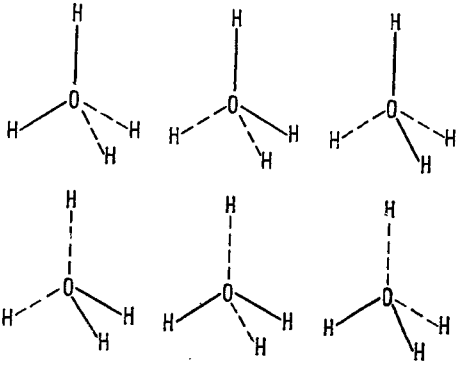


Рис. 4.13. Размещения атомов H.

[43]. В одном моле льда содержится $2N_A$ атомов водорода. Всего они имеют 2^{2N_A} расположений. Из 2^4 способов размещения четырех атомов H около данного атома O, молекуле H_2O (а не H_3O^+ и т. д.) соответствуют шесть способов (рис. 4.13). Общее число конфигураций кристалла равно

$$W = 2^{2N_A} (6/16)^{N_A} = (3/2)^{N_A}. \qquad (4,27)$$

Следовательно, для остаточной энтропии имеем

$$S_0 = k \ln W = R \ln 3/2 = 0{,}805 \text{ э. е.} \qquad (4,28)$$

Этот расчет привел к прекрасному совпадению с опытом, который дает $S_0 = 0{,}82 \pm 0{,}15$ *э. е.* При более строгих расчетах получаются результаты, мало отличающиеся от данных Полинга [44, 45].

Льдоподобная структура сохраняется и в жидкой воде, но со значительными нарушениями [36]. Рассмотрим, вслед за Эйзенбергом и Кауцманном [41], состояние твердой и жидкой воды. В кристалле молекулы испытывают колебания, повороты и сравнительно редкие трансляционные перемещения (диффузия). На мгновенном снимке с временем экспозиции τ, много меньшим периода колебаний τ_V (во льде $\tau_V \sim 2 \cdot 10^{-13}$ *сек*), получится картина, показанная на рис. 4.14, *а* (мгновенная, или М-структура). За время, много большее τ_V, но значительно меньшее времени, характерного для вращательной диффузии $\tau_D \sim 10^{-5}$ *сек*,

колебания усредняются, и мы увидим на снимке (см. рис. 4.14, *б*) регулярно расположенные, но случайным образом ориентированные молекулы (колебательно усредненная, К-структура).

Наконец, при $\tau \gg \tau_D$ мы увидим вполне упорядоченную диффузионно усредненную, D-структуру (см. рис. 4.14, *в*).

В жидкости М- и К-структуры подобны кристаллическим М- и К-структурам, но D-структура полностью размыта перемещением молекул. Более информативную картину можно было бы получить, поместив фотокамеру на данную молекулу воды и регистрируя окружающие молекулы во время пространственного

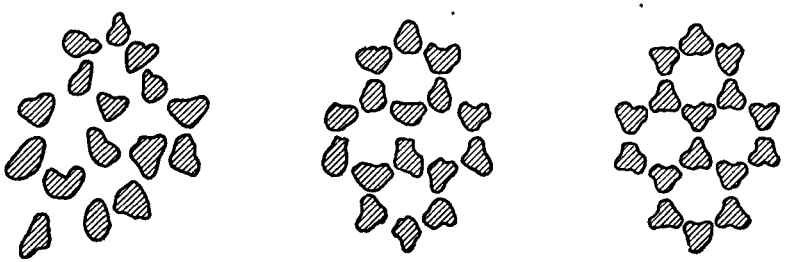


Рис. 4.14. Мгновенная (*а*), колебательно усредненная (*б*) и диффузионно усредненная (*в*) структуры воды.

перемещения данной молекулы. Можно назвать D-структурой жидкости картину, полученную в этом мысленном опыте, — она будет в какой-то степени упорядоченной. Такая D-структура есть усреднение К-структур.

Очевидно, что, применяя различные методы исследования с разными временами опыта τ, мы будем получать информацию о различных типах структуры — о М-, К- или D-структуре (рис. 4.15). Термодинамические свойства характеризуют, естественно, D-структуру жидкости.

Сказанное выше применимо к любым флуктуирующим конденсированным системам, в том числе и к макромолекулам белков.

Рентгенографическое исследование жидкой воды дает функцию радиального распределения (см. § 5.1), т. е. относительное содержание молекул, находящихся на тех или иных расстояниях друг от друга. При температурах от 4 до 120 °С главный максимум этой функции постепенно смещается от 2,82 Å до 2,94 Å [46]. Координационное число во всем этом температурном интервале приблизительно равно 4,4 (укажем для сравнения, что в жидком Ne и Ar координационные числа равны 8,6 и 10,5 соответственно). Таким образом, вода квазикристаллична, каждая молекула имеет в среднем четыре соседа.

D-структура воды есть пространственное среднее ее K-структур, для которых были предложены различные модели. Немети и Шерага [47] интерпретировали радиальную функцию, считая, что вода является смесью мономерных молекул и водородно-связанных роев (кластеров). Рои непрерывно распадаются и создаются вновь, так что в среднем каждая молекула находится

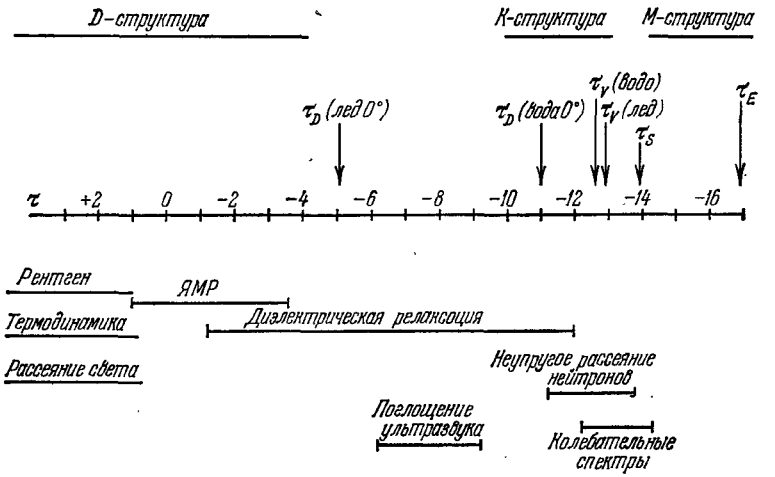


Рис. 4.15. Временные интервалы (в *сек*), соответствующие различным методам исследования структуры льда и жидкой воды.
τ_D — время смещения молекулы, τ_V — время ее колебания, τ_S — период валентного колебания O—H, τ_E — время электронного движения. Логарифмический масштаб.

все время в одном и том же окружении. Самойлов [48] предположил, что мономеры H_2O располагаются в пустотах квазикристаллической решетки, образованной водородными связями (см. также [46]). Попл [49] предложил модель с «изогнутыми» водородными связями. Эта идея была использована и в модели Бернала [50], согласно которой связанные молекулы с координационным числом 4 образуют в воде (в отличие от льда) нерегулярную сетку, состоящую из колец. Многие кольца содержат пять молекул H_2O (угол H—O—H в H_2O близок к 108° — углу в правильном пятиугольнике), другие — четыре, шесть, семь и большее число молекул. Все эти модели в большей или меньшей степени согласуются с наблюдаемой радиальной функцией распределения (см. [41]). Выбор одной из предложенных моделей пока затруднителен.

Оценки энергий водородной связи в жидкой воде, полученные из термодинамических и спектроскопических данных, варьируют

в широких пределах — от 1,3 до 4,5 *ккал/моль* [41]. Вероятно, наиболее правдоподобны значения 2,5—2,8 *ккал/моль* [51].

Все описанные модели позволяют интерпретировать специфические свойства воды и, прежде всего, зависимость удельного объема от температуры примерно сходным образом. Минимум удельного объема при 4 °С объясняется конкуренцией двух процессов. Первый — ослабление или разрушение упорядоченной льдоподобной структуры с малым координационным числом 4, сопровождающееся уменьшением объема. Это — продолжение плавления. Второй процесс — термическое расширение жидкости вследствие возрастания амплитуд ангармонических межмолекулярных колебаний. В модели смеси мономеров и роев предполагается, что последние имеют больший объем, чем во льде. В модели Самойлова уменьшение объема связано с заполнением полостей решетки мономерными молекулами. В модели Попла изгибание водородных связей приводит к сближению соседних молекул, т. е. к уменьшению объема.

Немети и Шерага [47, 52] предположили, что каждая молекула H_2O находится на одном из пяти уровней энергии, зависящем от того, сколько водородных связей она образует — 0, 1, 2, 3 или 4. Они вычислили статистическую сумму такой системы, выразив доли молекул, образующих 4, 3, 2 водородные связи в роях, через среднее число молекул в рое и через долю молекул с одной связью. Роям приписывается молярный объем и коэффициент расширения льда. Эти величины для несвязанных молекул определяются из экспериментальных значений молекулярного объема жидкости при 0, 4 и 25 °С. Оказалось, что вычисленный молекулярный объем действительно имеет минимум при 4 °С; хорошее совпадение с опытом получено и для D_2O. Однако такие модели смеси четко различающихся видов воды не согласуются с рядом спектроскопических фактов. В частности, эти факты противоречат возможности приписать роям льдоподобную структуру [41]. По-видимому, существует широкое, практически непрерывное распределение структур воды. Соответствующая количественная теория еще не построена.

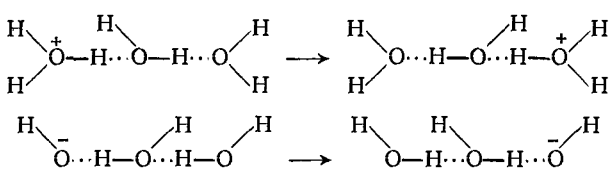
Сырников воспользовался методом теории графов для вычисления статистической суммы для жидкой воды [172]. Этот топологический метод позволяет учесть состояния как свободных молекул, так и соединенных водородными связями. Метод оказывается применимым к исследованию влияния растворенных веществ. Полные количественные расчеты требуют знания вероятностей образования водородных связей, которые пока неизвестны. Тем не менее метод Сырникова представляется многообещающим.

В работе [173] проведено теоретическое модельное исследование структур, образуемых твердыми молекулами с заданным

потенциалом, описывающим образование водородных связей. Получена модель, удовлетворительно воспроизводящая ряд свойств жидкости и примечательная своим отличием от льдоподобной структуры.

В работе [174] термодинамические свойства воды вычислялись с помощью метода Монте-Карло на основе атом-атом потенциалов Китайгородского. Для водородной связи применялся потенциал Морзе, энергия водородной связи принималась равной 5,5 *ккал/моль*. Расчеты термодинамических функций, проведенные для температур 300, 320 и 350° К, дали разумное согласие вычисленных и измеренных значений внутренней энергии, теплоемкости и свободной энергии. Метод дает возможность найти расположение и ориентацию молекул H_2O в жидкости.

Остановимся в заключение на электрических свойствах воды. Большая величина ее диэлектрической проницаемости объясняется не только полярностью отдельных молекул, но и корреляциями их взаимной ориентации [53], т. е. наличием водородных связей. Малая электропроводность воды, по-видимому, определяется присутствием ничтожного числа ($2 \cdot 10^{-9}$) сильно гидратированных ионов H^+ и OH^- ($H_9O_4^+$ и др.). Исследование подвижности ионов H^+ и OH^- показало, что для них она существенно больше, чем для других одновалентных ионов в воде. Для H^+ $u_+ = 3{,}62 \cdot 10^{-3}$, для OH^- $u_- = 1{,}98 \cdot 10^{-3}$ $см^2 \cdot в^{-1} \cdot сек^{-1}$, тогда как для Na^+ $u_+ = 0{,}53 \cdot 10^{-3}$ и для Cl^- $u_- = 0{,}79 \cdot 10^{-3}$ $см^2 \cdot в^{-1} \cdot сек^{-1}$. Это можно объяснить способностью водородных связей облегчать быстрый перенос протонов по цепи молекул воды



Подвижность ионов H^+ и OH^- во льде больше, так как в нем водородные связи более упорядочены [41, 44, 54].

§ 4.5. ПЕРЕХОДЫ СПИРАЛЬ — КЛУБОК

Регулярные конформации полипептидных цепей, стабилизованные водородными связями (прежде всего, α- и β-формы), устойчивы лишь в определенных условиях. Изменение температуры, растворителя, pH среды приводит к переходам порядок — беспорядок, к превращению регулярной конформации цепи в статистический клубок. Эти процессы удобнее всего изучать в модельных системах — синтетических полиаминокислотах.

Многие полиаминокислоты, в частности полиглутаминовая кислота (ПГК) и ее производное — поли-γ-бензилглутамат (ПБГ)

$$-[CO-CH(CH_2-CH_2-CO-O-CH_2-C_6H_5)-NH]_n-$$

фигурируют в растворах в форме α-спиралей, что доказывается всей совокупностью их гидродинамических и оптических свойств. Дотн установил, что *переходы спираль — клубок* весьма резки [55, 56]. На рис. 4.16 показана зависимость степени ионизации, характеристической вязкости [η] и удельной вращающей способности [α] ПГК от pH среды. В области вблизи pH 6 происходит резкое падение вязкости и удельного вращения. В отличие от ПГК, ПБГ растворяется в органических растворителях. В дихлорэтане, хлороформе, формамиде ПБГ существует в виде жестких палочек — α-спиралей. Это доказано методами светорассеяния и вискозиметрии, а также непосредственно методом электронной микроскопии. Напротив, в растворителях, дающих с ПБГ водородные связи (например, в трихлоруксусной и трифторуксусной кислотах), макромолекулы ПБГ находятся в состоянии статистического клубка. Такие растворы характеризуются малой вязкостью и малым двойным лучепреломлением в потоке. При постепенном изменении состава растворителя (бинарной смеси) в некоторой узкой области наступает резкий переход спираль — клубок (рис. 4.17). Резкость перехода свидетельствует о его кооперативном характере. В этом смысле переход спираль — клубок подобен плавлению кристалла, в данном случае одномерного. Причина кооперативности непосредственно очевидна из рассмотрения структуры α-спираль. Конформации пептидных единиц цепи взаимозависимы, так как водородная связь между группой C=O i-й единицы и группой N—H $(i-4)$-й единицы накладывает жесткие ограничения на конформации $(i-1)$-, $(i-2)$- и $(i-3)$-й единиц. Для освобождения данной пептидной единицы, означающего выигрыш энтропии, необходимо одновременно разорвать не менее трех водородных связей кряду, что требует соответствующей затраты

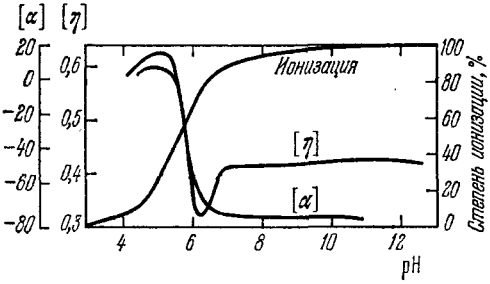


Рис. 4.16. Графики зависимости степени ионизации, [η] и [α] от pH среды при переходе спираль — клубок в ПГК.

энергии. Поэтому пептидные единицы могут освобождаться только кооперативно.

Теория перехода спираль — клубок строится на основе модели Изинга (см. стр. 40, 137). Задача, очевидно, состоит в нахождении статистической суммы для α-спирали. Эта задача решалась в ряде работ [57—61]. Наиболее простое и ясное построение теории содержится в работе Зимма и Брегга [57] (см. также [62, 63]).

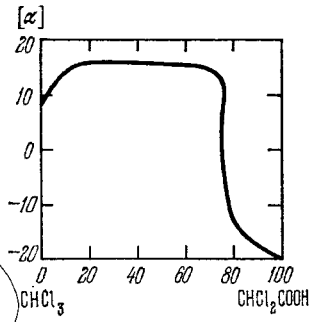


Рис. 4.17. Оптическая активность ПБГ как функция состава растворителя.

Каждое пептидное звено может находиться в свободном и закрепленном водородной связью состоянии. Припишем первому (свободному) состоянию i-го звена символ $\mu_i = 0$, второму (связанному) — символ $\mu_i = 1$. Свободная энергия цепи зависит от значений μ_i, причем непосредственно взаимозависимы конформации четырех последовательных звеньев. Поэтому свободная энергия цепи равна

$$F(\mu_1, \mu_2, \ldots, \mu_N) = \sum_{i=1}^{N} \tilde{F}(\mu_{i-3}, \mu_{i-2}, \mu_{i-1}, \mu_i). \qquad (4,29)$$

Как и ранее (см. стр. 138), считаем цепь весьма длинной, $N \gg 1$, и пренебрегаем концевыми эффектами. Очевидно, что свободная энергия свободного звена не зависит от состояний предшествующих звеньев, т. е.

$$F_{\text{своб}} \equiv \tilde{F}(\mu_{i-3}, \mu_{i-2}, \mu_{i-1}, 0). \qquad (4,30)$$

Свободная энергия связанного звена зависит от состояний предшествующих звеньев. Свободная энергия связанного звена, следующего за связанным, равна

$$F_{\text{связ}} \equiv \tilde{F}(\mu_{i-3}, \mu_{i-2}, 1, 1). \qquad (4,31)$$

$F_{\text{связ}}$ не зависит от состояний $(i-3)$-го и $(i-2)$-го звеньев, так как ограничения, накладываемые связанным $(i-1)$-м звеном на эти звенья, учтены тем, что $\mu_{i-1} = 1$.

Таким образом, изменение свободной энергии цепи при увеличении числа связанных звеньев на единицу за счет соседнего несвязанного равно

$$\Delta F = F_{\text{связ}} - F_{\text{своб}} = \tilde{F}(\mu_{i-3}, \mu_{i-2}, 1, 1) - \tilde{F}(\mu_{i-3}, \mu_{i-2}, 1, 0). \qquad (4,32)$$

Если связанное звено появляется после трех свободных, то для этого нужна дополнительная энергия сверх ΔF. Связывание

звена означает инициирование спирали, и оно одновременно накладывает ограничения на четыре звена. Имеем

$$\tilde{F}(0, 0, 0, 1) = F_{\text{связ}} + F_{\text{иниц}}. \qquad (4,33)$$

$F_{\text{иниц}}$ определяется уменьшением энтропии связываемых пептидных групп. Если принять, что при вращении свободного звена около каждой связи возможно возникновение трех поворотных изомеров, то

$$F_{\text{иниц}} = 4RT \ln 3 \approx 2{,}5 \text{ ккал/моль},$$

т. е. получается величина, значительно превосходящая RT.

Очевидно, что свободная энергия, требуемая для освобождения одного или двух звеньев, заключенных между связанными звеньями, должна быть весьма велика, так как на самом деле освобождения в этом случае не происходит, звенья остаются в спирали. Энергия, затрачиваемая на разрыв водородных связей, не компенсируется повышением энтропии, и поэтому можно положить

$$\tilde{F}(\mu_{i-3}, 1, 0, 1) \to \infty, \quad \tilde{F}(1, 0, 0, 1) \to \infty. \qquad (4,34)$$

Располагая этими значениями $\tilde{F}$, можно написать выражение для статистической суммы Z. Вклад данного состояния цепи в Z содержит следующие множители:

1) Множитель 1 для каждой единицы в свободном состоянии ($\mu_i = 0$). Иными словами, ее свободная энергия принята за нуль

$$\exp(-F_{\text{своб}}/kT) = 1.$$

2) Множитель

$$s = \exp(-\Delta F/kT) \qquad (4,35)$$

для звена в связанном состоянии ($\mu_i = 1$). Величина s имеет смысл константы равновесия для реакции образования водородной связи в звене, следующем за связанным.

3) Множитель

$$\sigma = \exp(-F_{\text{нниц}}/kT) \qquad (4,36)$$

для каждого связанного звена, следующего за тремя и более свободными. Величина σ есть константа равновесия для реакции образования одного разрыва в последовательности водородных связей. Если $F_{\text{иниц}} \approx 2{,}5$ *ккал/моль*, то $\sigma \sim 10^{-2}$. Очевидно, что именно σ играет роль параметра кооперативности.

4) В соответствии с (4,34) множитель 0 для каждого связанного звена, следующего за несвязанным, если число последних меньше трех.

Итак,

$$Z=\sum_{\{\mu_i\}}\exp\left(-\frac{F\{\mu_i\}}{kT}\right)=$$

$$=\sum_{\{\mu_i\}}\prod_{i=1}^{N}s^{\mu_i}\sigma^{\mu_i(1-\mu_{i-1})}\left[1-\delta_{\mu_i,\,1}\delta_{\mu_{i-1},\,0}\left(1-\delta_{\mu_{i-2},\,0}\delta_{\mu_{i-3},\,0}\right)\right], \quad (4,37)$$

где δ — символ Кронекера. Суммирование производится по всем наборам $\{\mu_i\}$.

Как мы видели (см. стр. 138), Z, выраженное в виде суммы произведений, можно представить как след некоторой матрицы, взятой в степени N. В рассматриваемом случае матрица имеет ранг 3, так как нужно учесть состояние трех последовательных звеньев, каждое из которых может быть в двух разных состояниях (μ_i равно 0 или 1). Зимм и Брегг провели полный анализ этой задачи и показали, что практически те же результаты можно получить, сильно ее упростив. Если ограничиться рассмотрением состояний всего лишь двух последовательных звеньев, то ранг матрицы уменьшится до двух. Между тем связь состояний i-го, $(i-2)$-го и $(i-3)$-го звеньев дается лишь условиями (4,34). Если отвлечься от этих условий, то

$$F(\mu_1, \mu_2, \ldots, \mu_N)=\sum_{i=1}^{N}\tilde{F}(\mu_{i-1}, \mu_i) \quad (4,38)$$

и

$$F_{\text{своб}}=\tilde{F}(\mu_{i-1}, 0), \quad (4,39)$$

$$F_{\text{связ}}=\tilde{F}(1, 1), \quad (4,40)$$

$$F_{\text{связ}}+F_{\text{иннц}}=\tilde{F}(0, 1). \quad (4,41)$$

Считая свободную энергию несвязанного звена нулевой, получаем статистическую сумму, учитывая, что каждое связанное звено вносит в нее множитель s, свободное — множитель единицу, а первое из связанных звеньев, следующее за одним или бо́льшим числом свободных, — множитель σ. Имеем

$$Z=\sum_{\{\mu_i\}}\prod_{i=1}^{N}s^{\mu_i}\sigma^{\mu_i(1-\mu_{i-1})}=\mathrm{Sp}(\mathbf{P}^N). \quad (4,42)$$

Матрица $\mathbf{P}$ имеет вид

$$\mathbf{P}=\begin{array}{c|cc} \mu_{i-1}\backslash\mu_i & 0 & 1 \\ \hline 0 & 1 & \sigma s \\ 1 & 1 & s \end{array}. \quad (4,43)$$

Ее характеристическое уравнение

$$(\lambda - 1)(\lambda - s) = \sigma s, \tag{4,44}$$

где λ — собственное значение (корень) матрицы.

Рассмотрим два крайних случая: полной кооперативности и полного ее отсутствия. Кооперативность максимальна, когда $F_{\text{иниц}} \to \infty$, т. е. при $\sigma = 0$. В этом случае имеем два корня $\lambda = 1$ и $\lambda = s$. Статистическая сумма равна

$$Z = 1 + s^N \tag{4,45}$$

и при $N \gg 1$

$$Z = \begin{cases} s^N, & s > 1, \\ 1, & s < 1. \end{cases} \tag{4,46}$$

Значение Z резко меняется при $s = 1$ — происходит кооперативный переход спираль — клубок. Доля связанных пептидных групп равна

$$\theta = \frac{1}{N}\frac{\partial \ln Z}{\partial \ln s} = \frac{s^N}{1 + s^N} \tag{4,47}$$

и при $N \gg 1$

$$\theta \approx \begin{cases} 1, & s > 1, \\ 0, & s < 1. \end{cases} \tag{4,48}$$

Кооперативный переход происходит по принципу «все или ничего» в точке $s = 1$. Если σ мало, но отлично от нуля, то решение (4,44) также дает переход, но уже не в одной точке, а в некотором интервале значений s, который тем уже, чем меньше σ. Тем самым, имеется некоторая область сосуществования спиральных и неупорядоченных участков цепи — принцип «все или ничего» здесь не работает.

Если кооперативности нет, $F_{\text{иниц}} = 0$ и $\sigma = 1$. Корни уравнения (4,44) при этом равны $1 + s$ и 0. Статистическая сумма равна

$$Z = (1 + s)^N, \tag{4,49}$$

т. е. представляет собой просто произведение статистических сумм отдельных единиц; иными словами, разрыв и образование водородных связей в каждой единице происходят независимо. Доля связанных пептидных групп равна

$$\theta = \frac{1}{N}\frac{\partial \ln Z}{\partial \ln s} = \frac{s}{1 + s}. \tag{4,50}$$

Зависимость θ от s в этом случае плавная — никакого резкого перехода нет. На рис. 4.18 показаны кривые $\theta(s)$ для $\sigma = 10^{-4}$, $\sigma = 10^{-2}$ и $\sigma = 1$. Очевидно, что зависимость θ от s означает, согласно (4,35), зависимость θ от температуры. Температуру пе-

рехода спираль — клубок можно назвать температурой плавления спирали. Плавлению спирали соответствует $s = 1$, т. е.

$$\Delta H - T_{\text{пл}} \Delta S = 0. \tag{4,51}$$

Здесь ΔH — разность энтальпий клубка и спирали, т. е. теплота перехода. Расчет показывает, что интервал температур перехода при конечном, но малом значении σ дается условием [62]

$$\frac{\Delta T}{T_{\text{пл}}} = 2\sqrt{\sigma}\,\frac{kT_{\text{пл}}}{|\Delta H|}. \tag{4,52}$$

Выражение (4.50), отвечающее некооперативному переходу, т. е. независимому изменению состояния отдельных пептидных единиц, при полной кооперативности заменяется выражением (4,47), описывающим кооперативное превращение всех N единиц. В промежуточных случаях, когда $0 < \sigma < 1$, приближенно имеем

$$\theta = \frac{s^n}{1 + s^n}, \tag{4,53}$$

где $1 < n < N$. Введем обозначение $s^n = \tilde{s}$. Величина $\tilde{s}$ имеет смысл константы равновесия для мономолекулярной реакции, в которой участвует n единиц, т. е.

$$\tilde{s} = \exp\left[-\frac{\Delta H_{\text{эфф}} - T\,\Delta S_{\text{эфф}}}{kT}\right], \tag{4,54}$$

где $\Delta H_{\text{эфф}}$ и $\Delta S_{\text{эфф}}$ — эффективные значения изменений энтальпии и энтропии, зависящие от n. Расчет показывает, что в области перехода $\Delta H_{\text{эфф}}$ не зависит от температуры и, следовательно, $\tilde{s}$ есть экспоненциальная функция от $1/kT$. Поскольку $\tilde{s} = s^n$, можно положить

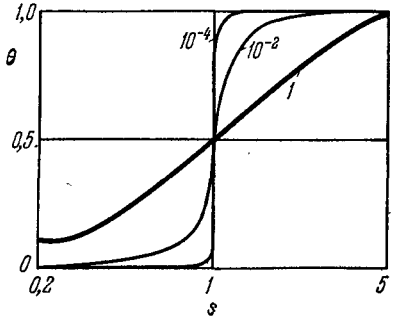


Рис. 4.18. Теоретические кривые $\theta(s)$ при разных значениях σ. *Числа у кривых указывают величины σ.*

$$\Delta H_{\text{эфф}} = n\,\Delta h, \tag{4,55}$$

где Δh — изменение энтальпии при освобождении одного звена. Очевидно также, что n связано с параметром кооперативности σ: если $\sigma = 1$, то $n = 1$, если $\sigma = 0$, то $n = N$. Найдем эту связь.

Общее решение характеристического уравнения (4,44) имеет вид

$$\lambda_{1,2} = {}^1/_2\,(1 + s) \pm [{}^1/_4\,(1 - s)^2 + s\sigma]^{1/2}. \tag{4,56}$$

При $N \gg 1$ статистическая сумма выражается только через бо́льший корень λ_1 (со знаком $+$)

$$Z \approx \lambda_1^N. \tag{4,57}$$

Доля связанных единиц равна

$$\theta = \frac{1}{N}\frac{\partial \ln Z}{\partial \ln s} \approx \frac{\partial \ln \lambda_1}{\partial \ln s} = \frac{\lambda_1 - 1}{2\lambda_1 - 1 - s}, \qquad (4,58)$$

приравняв это выражение $\theta = \tilde{s}/(1+\tilde{s})$, получим

$$\tilde{s} = \frac{\lambda_1 - 1}{\lambda_1 - s}. \qquad (4,59)$$

Разность энтальпий в силу (4,54) равна

$$\Delta H_{\text{эфф}} = -\frac{d \ln \tilde{s}}{d(1/kT)} = -\frac{d \ln s}{d(1/kT)}\frac{d \ln \tilde{s}}{d \ln s} = \Delta h \frac{d \ln \tilde{s}}{d \ln s}. \qquad (4,60)$$

Расчет дает

$$\frac{d \ln \tilde{s}}{d \ln s} = \frac{s}{(\lambda_1 - 1)(\lambda_1 - s)} \frac{2(\lambda_1 - 1)(\lambda_1 - s) + \sigma(1 - s)}{2\lambda_1 - 1 - s} \qquad (4,61)$$

и в области перехода, в которой $s \approx 1$,

$$\frac{d \ln \tilde{s}}{d \ln s} \approx \frac{2s}{2\lambda_1 - 1 - s} \approx \frac{1}{\sqrt{\sigma}}. \qquad (4,62)$$

Следовательно,

$$\Delta H_{\text{эфф}} \approx \Delta h/\sqrt{\sigma}, \qquad (4,63)$$

и число единиц, совместно совершающих переход, обратно пропорционально корню квадратному из параметра кооперативности

$$n \approx 1/\sqrt{\sigma}. \qquad (4,64)$$

Величину $\Delta H_{\text{эфф}}$ можно найти по наклону кривой зависимости θ от $1/kT$ в области перехода. В самом деле, так как в этой области $\tilde{s} \approx 1$, то

$$\frac{d\theta}{d(1/kT)} = -\frac{d\theta}{d \ln \tilde{s}} \Delta H_{\text{эфф}} = -\frac{\tilde{s}}{(1+\tilde{s})^2} \Delta H_{\text{эфф}} \approx -{}^1/_4 \Delta H_{\text{эфф}} = -\frac{\Delta h}{4\sqrt{\sigma}}. \qquad (4,65)$$

Оптические методы исследования (см. гл. 5) позволяют непосредственно определять θ как функцию температуры и, тем самым, $\Delta h/\sqrt{\sigma}$. Для нахождения величин Δh и σ порознь необходимы другие данные. Их можно получить путем изучения зависимости $T_{\text{пл}}$ от степени полимеризации N. В работах [64, 65] была развита теория переходов в полипептидных цепях с конечными значениями N. При уменьшении N точка перехода смещается в сторону бо́льших значений s, т. е. в сторону образования клубка. Одновременно расширяется интервал значений s (или T), отвечающих переходу. Конкретные зависимости θ от s при разных N дают искомые параметры Δh, σ, ΔS.

В работе [66] были получены кривые плавления для поли-γ-бензил-L-глутамата при $N = 1500$, 46 и 26. Были найдены значения $\Delta h = 890 \pm 130$ *кал/моль* и $\sigma = 2 \cdot 10^{-4}$.

В табл. 4.9 приведены характеристики переходов для трех синтетических полипептидов.

Таблица 4.9

Характеристики переходов спираль — клубок в полипептидах [62]

	Поли- γ-бензил-L-глутамат	Поли-L-глутаминовая кислота, ионизованная на 67%	Поли-L-лизин, ионизованный на 20%
Растворитель	$CHCl_2COOH$ + + 1,2-$C_2H_4Cl_2$ (4:1)	0,2*M* NaCl в H_2O + + диоксан (2:1), 25 °C	H_2O, 22 °C
N	1600	260	1500
$\Delta h/\sqrt{\sigma}$, *ккал/моль*	$+70 \pm 14$	$-50 \pm 0{,}5$	$-5{,}3 \pm 0{,}5$
Δh, *кал/моль*	$+1000 \pm 200$	-70 ± 7	-75 ± 7
ΔS, *кал/моль·град*	$+3{,}2 \pm 0{,}6$	$-0{,}23 \pm 0{,}02$	$-0{,}25 \pm 0{,}02$
σ	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$

Мы видим, что величина Δh может быть как положительной, так и отрицательной. В первом случае спиральное состояние менее выгодно, чем клубкообразное: переход спираль — клубок происходит не при повышении, а при понижении температуры. Одновременное положительное значение ΔS, т. е. увеличение энтропии в спирали по сравнению с клубком, можно объяснить только уменьшением энтропии растворителя. Отрицательные значения Δh и ΔS в двух других случаях отвечают переходу спираль — клубок при повышении температуры и уменьшенной энтропии спирали по сравнению с клубком. Именно в этих случаях уместно говорить о плавлении спирали.

Теория перехода спираль — клубок, вызванного изменением растворителя или pH среды, а не повышением температуры, строится на тех же основах (см. [62]). Во втором случае необходимо учесть, что каждое пептидное звено может находиться уже не в двух, а в трех состояниях: без водородной связи, с внутримолекулярными водородными связями и с межмолекулярными водородными связями с молекулами растворителя. Межмолекулярное связывание мы вправе считать некооперативным, и тогда каждое несвязанное звено внутри молекулы вносит в Z множитель, равный не единице, а $1 + \exp(\Delta\mu/kT)$, где $\Delta\mu$ — разность химических потенциалов звена в состоянии с межмолекулярной водородной связью и в свободном состоянии, т. е. изменение свободной энергии звена при образовании водородной

связи [58, 61]. Соответственно условие перехода зависит от $\Delta\mu$. Резкость перехода по-прежнему зависит от σ. При увеличении концентрации специфически связываемых молекул растворителя $T_{пл}$ понижается. Если в отсутствие межмолекулярного взаимодействия температура плавления равна $T^0_{пл}$, то в присутствии активного растворителя [62]

$$T_{пл} = \frac{T^0_{пл}}{1 + \left(kT^0_{пл}/|\Delta H|\right) \ln\left(1 + \exp\left(\Delta\mu/kT\right)\right)}. \qquad (4,66)$$

При $\Delta\mu \to -\infty$, т. е. когда состояние с межмолекулярной водородной связью практически не осуществляется, $T_{пл} = T^0_{пл}$. Чем больше $\Delta\mu$, тем меньше $T_{пл}$.

Полипептиды, построенные из ионизуемых аминокислотных остатков (например, полиглутаминовая кислота, полилизин), совершают переходы спираль — клубок при изменении pH. Переход можно обнаружить и изучить как упомянутыми выше методами оптики и гидродинамики, так и методом потенциометрического титрования, дающего степень ионизации (см. рис. 4.16). Теория перехода спираль — клубок в полипептидах с ионизуемыми группами развита в работах [61, 67]. Последняя работа по-прежнему основана на методе Изинга.

В цепи с ионизуемыми звеньями каждое звено следует характеризовать не только параметром $\mu_i = 0, 1$ соответственно для свободного и связанного звена, но и вторым параметром $\eta_i = 0, 1$ соответственно для незаряженной и заряженной ионизуемой группы. Статистическая сумма для цепи имеет вид

$$Z = \sum_{\{\mu_i\}} \exp\left(-F\{\mu_i\}/kT\right) \sum_{\{\eta_i\}} \prod_{i=1}^{N} a^{\eta_i} \exp\left(-F^{(e)}_{\{\mu_i\}}(\{\eta_i\})/kT\right), \qquad (4,67)$$

где $F\{\mu_i\}$ — свободная энергия незаряженной цепи при данном наборе значений μ_i, $F^{(e)}_{\{\mu_i\}}(\{\eta_i\})$ — электрический вклад в свободную энергию, a — отношение активностей заряженного и незаряженного звеньев, связанное с pH среды уравнением

$$\lg a = \pm(\mathrm{pH} - \mathrm{pK}) \qquad (4,68)$$

(ср. стр. 62). Знак плюс относится к кислотной, знак минус к основной группе. В сущности $F^{(e)}_{\{\mu_i\}}(\{\eta_i\})$ — свободная энергия электростатического взаимодействия заряженных групп при заданных наборах μ_i и η_i. Таким образом, в выражении для Z учтено взаимное отталкивание заряженных групп, естественно, зависящее от конформаций звеньев, т. е. от набора $\{\mu_i\}$. Расчет показывает, что в спиральной конформации цепи отталкивание сильнее, чем в клубкообразной. Следовательно, зарядка цепи

способствует переходу спираль — клубок. Нахождение статистической суммы по методу Изинга позволяет количественно определить понижение $T_{пл}$ при увеличении степени ионизации цепи α, а также найти кривую титрования полипептида (рис. 4.19), на которой отчетливо обнаруживается излом, соответствующий переходу спираль — клубок.

Если полипептидная цепь не гомогенна, но содержит и кислотные и основные группы, то деспирализация цепи может происходить и при кислотных и при щелочных pH. Рассмотрим простейшую модель сополимера, в котором на каждые три неионизуемые единицы приходится одна ионизуемая, причем кислотные и основные аминокислотные остатки (a и k) закономерно чередуются. Такой сополимер, очевидно, лучше моделирует белок, чем однородная полиаминокислота. Расчет статистической суммы для этой модели дает кривую зависимости степени спиральности θ от pH куполообразной формы [68]. При полной кооперативности, т. е. при $\sigma = 0$ купол превращается в прямоугольник, причем ось симметрии пересекает абсциссу в точке $pH = {}^1/_2\ (pK_a + pK_k)$. Ширина прямоугольника или соответственно колокола сильно зависит от s и, тем самым, от температуры.

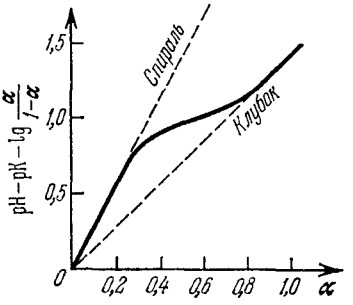


Рис. 4.19. Кривая титрования полипептида.

Форма кривой θ(pH) различна для разных последовательностей кислотных и основных звеньев. В работе [68] рассмотрены различные модели цепей. Так, если полипептидная цепь содержит достаточно крупные блоки, состоящие из однотипных остатков, то кривая может быть не выпуклой, а вогнутой. Возможно и появление на такой кривой двух максимумов, расположенных вблизи pK соответствующих групп.

Теория, развитая в [68], объясняет зависимость степени спиральности мышечных белков от pH среды, изученную Лави [69]. Удалось установить корреляцию между формой кривых и относительным содержанием анионных и катионных остатков в тропомиозине и других мышечных белках.

Экспериментальное изучение зависимости удельного вращения (а отсюда и степени спиральности) поли-L-лизина, поли-L-глутаминовой кислоты и их сополимера от pH дало результаты, показанные на рис. 4.20 [70, 71]. Теоретические расчеты согласуются с этими данными [68]. Была рассчитана электростатическая энергия сополимера, причем было показано, что ее зависимость от pH определяется различием в электростатических

взаимодействиях зарядов на мономерах, возникающим из-за разницы в длине привесков.

Можно ли считать переходы спираль — клубок фазовыми переходами первого рода, подобными плавлению? Существует ли равновесие между двумя фазами в этих случаях?

Ландау и Лифшиц [72] доказали невозможность такого равновесия в одномерной системе. Свободная энергия двухфазной одномерной системы равна

$$F = N\theta F_1 + N(1-\theta)F_2 + mkT\ln\frac{m}{eN} + m\psi, \qquad (4,69)$$

где θ — доля первой фазы, F_1 и F_2 — свободные энергии звеньев в первой и во второй фазах. Логарифмический член выражает энтропию смешения m точек соприкосновения между фазами со звеньями цепи, ψ — энергия поверхностного натяжения в этих точках. Имеем

$$\frac{\partial F}{\partial m} = kT\ln\frac{m}{N} + \psi. \qquad (4,70)$$

Так как $m < N$, то F уменьшается с ростом m, стремясь к минимуму при $\partial F/\partial m = 0$, т. е.

$$m = N\exp(-\psi/kT). \qquad (4,71)$$

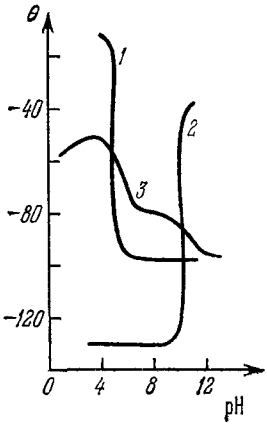


Рис. 4.20. Зависимость удельного вращения от pH.

1 — поли-L-глутаминовая кислота, *2* — поли-L-лизин, *3* — их сополимер.

Обе фазы будут перемешиваться, пока не разделятся на малые конечные отрезки, удовлетворяющие условию (4,71). Значит, фазового равновесия в одномерной системе нет, невозможны и фазовые переходы.

Переход спираль — клубок сходен с плавлением, но это не истинный фазовый переход. Вычисление средней доли пар звеньев, находящихся на стыке связанных и свободных участков, дает

$$\frac{m}{N} = \sqrt{\sigma} = \exp(-F_{\text{иниц}}/2kT). \qquad (4,72)$$

Сравнение последних двух соотношений показывает, что $^1/_2F_{\text{иниц}}$ играет роль энергии поверхностного натяжения. При конечном значении $F_{\text{иниц}}$, т. е. при $\sigma < 1$, переход не абсолютно резок. Фазовый переход получается только при $\sigma = 0$, т. е. при $F_{\text{иниц}} \to \infty$, что невозможно.

Переход β-форма — клубок имеет иной характер, так как β-форма двумерна. Теория таких переходов развита Бирштейн и др. [73] применительно к кросс β-форме полипептидной цепи.

Такая структура свойственна поли-S-карбобензоксиметил-L-цистеину [74]. В работе [73] вычислена статистическая сумма для плоской системы, состоящей из структурированных и неструктурированных участков. К первым относятся жесткие участки с ненасыщенными водородными связями («стержни») и участки, входящие в β-форму. Рассматривается ансамбль цепей различной длины с разными числами звеньев N. Статистическая сумма для такого обобщенного ансамбля имеет вид

$$Z(\mu) = \sum_{N=1}^{\infty} Z(N) \exp(-\mu N/kT), \qquad (4,73)$$

где μ — химический потенциал звена. Для достаточно больших N

$$Z(N) = \exp(-F/kT) \equiv \exp(\mu_0 N/kT), \qquad (4,74)$$

Переход β-форма — клубок происходит при некотором критическом значении μ. Теория дает границы раздела между двумя фазами: клубка с примесью β-формы и регулярной β-формы, т. е. фазовую диаграмму. В зависимости от величины энергии контакта двух единиц, т. е. энергии водородной связи, происходит переход первого или второго рода. Более реалистичен первый случай.

Теория позволяет получить аналитические выражения для долей мономеров в структурированной и неструктурированной формах в зависимости от параметров системы и температуры [73]. Основной физический вывод из анализа переходов β-форма — клубок состоит в том, что в случае жестких цепей малого притяжения достаточно для скачкообразного изменения характеристик системы (переход первого рода). Это согласуется с теорией кристаллизации жестких полимерных цепей Флори [75]. Недавно было показано также, что для жестких цепей образование компактных структур на кубической решетке происходит по принципу «все или ничего» [76].

Таким образом, слабые взаимодействия в моделирующих белок полипептидных системах приводят к их резко выраженному кооперативному поведению, к наличию переходов, подобных фазовым. Дальнейшие подробности, относящиеся к теории и экспериментальным исследованиям этих переходов, см. в монографиях [62, 63].

§ 4.6. БЕЛКОВАЯ ГЛОБУЛА И ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Вторичные структуры — α-спирали и β-формы реализуются в чистом виде у полиаминокислот, не являющихся информационными макромолекулами. Соответственно эти структуры имеют монотонное периодическое строение.

α-спирали и β-формы представляют собой элементы пространственной структуры белковой молекулы, которые могут присутствовать в части белковой цепи. Биологически функциональна пространственная структура белка, в большинстве случаев глобулярная. Еще недавно было принято называть такую структуру *третичной*. Таким образом, строилась иерархия структур — первичная, вторичная, третичная и, наконец, *четвертичная* — агрегация некоторого числа глобул в молекулярную или надмолекулярную систему (в качестве примеров укажем на гемоглобин, молекула которого содержит четыре глобулы, и белок вируса табачной мозаики, состоящий из 2000 идентичных глобулярных частиц).

В действительности же не имеет смысла разделять вторичную и третичную структуру белка — мы имеем дело с единственной пространственной структурой, содержащей те или иные регулярные участки и неупорядоченные звенья. Сказанное не отвергает иерархического принципа в биологии. Иерархия структур возникает в любых системах, строящихся из большого числа однотипных элементов при наличии взаимодействий между ними. Проблема биологической иерархии была рассмотрена Берналом [77].

Можно сформулировать два исходных принципа биологической иерархии. Во-первых, в клетке синтезируется множество тождественных макромолекул. Во-вторых, вероятность образования структур высшей сложности из ее элементов возрастает, а число возможных путей формирования такой структуры убывает, если изучаемые структуры можно представить в виде конечного ряда субструктур, последовательно включенных одни в другие. Иерархия свойственна, например, Космосу — звезды образуют галактики, галактики входят в метагалактику и т. д. В биофизике мы имеем дело с атомами, входящими в пептид, с пептидами, образующими белковую цепь, с белковыми глобулами, образующими четвертичные структуры, и т. д.

Характер структур на каждом уровне организации определяется геометрическими свойствами структур предыдущего уровня и силами, действующими между их элементами. Возникновение высшей структуры происходит «автоматически» в результате *самосборки*, принципы которой еще далеко не ясны. Решение проблемы самосборки означало бы, например, возможность предсказания макроскопической структуры мышцы по данным о химическом строении ее белков. Объяснение строения кристаллов, состоящих из малых молекул, на основе знания структуры этих молекул является решением проблемы самосборки в гораздо более простом случае (ср. [27]).

Нельзя, однако, считать третичную структуру белковой глобулы состоящей из вторичных структур — само формирование

упорядоченных участков белковой цепи связано с формированием пространственной структуры в целом.

В отличие от статистического клубка, белковая глобула является не рыхлым флуктуирующим образованием, но компактной, плотно упакованной регулярной системой — апериодическим кристаллом. Плотная глобулярная структура белковой молекулы непосредственно доказывается малой вязкостью белков в растворе. Характеристическая вязкость $[\eta]$ (см. стр. 148) составляет для белков величину порядка сотых дециметра на 1 *г* (см., например, [78]). Определенный отсюда удельный объем много меньше, чем у обычных полимеров, образующих в растворе рыхлые клубки, и близок к удельному объему сухого белка. Это подтверждается всей совокупностью результатов исследования белков методами седиментации, диффузии, светорассеяния, рентгенографии, рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами, электронной микроскопии и т. д.

Вследствие полифункциональности аминокислотных остатков в образовании глобулы участвуют разнообразные силы. Несомненно, что особенности белковой глобулы лишь частично отражаются моделью гомогенной цепи ввиду определяющего значения разнородности звеньев и взаимодействий.

Единственные сильные взаимодействия в белковой глобуле — это химические дисульфидные связи между остатками Цис (см. стр. 58). Наличие нескольких дисульфидных «сшивок» между звеньями одной цепи или нескольких цепей (например, инсулин, см. стр. 74) накладывает заметные ограничения на возможные конформации цепи. Однако нельзя было бы говорить о глобуле, если бы взаимодействия сводились к дисульфидным мостикам. В этом случае полипептидная цепь была бы подобна цепи каучука в резине, вулканизированной серой. Каучук в резине сохраняет свойства статистического клубка, несмотря на наличие дии полисульфидных мостиков.

Глобула формируется слабыми взаимодействиями — силами Ван-дер-Ваальса (см. § 4.3), водородными связями (см. § 4.4), электростатическим притяжением противоположно заряженных ионогенных групп (солевые связи). Особое значение имеют *гидрофобные взаимодействия*, рассматриваемые далее подробно. Сложная игра всех этих сил приводит к образованию плотной глобулы с устойчивой регулярной структурой в водном растворе при физиологических значениях pH и ионной силы. Для образования глобулы существенны как энергетические, так и энтропийные факторы. Если участки полипептидной цепи обладают достаточной жесткостью (например, α-спиральные участки), то образование элементов компактной структуры возможно и в отсутствие энергетических взаимодействий. Эта ситуация была рассмотрена Флори [75] применительно к взаимодействию цепей

в концентрированных растворах полимеров и к кристаллизации полимеров.

В концентрированном растворе полимерные цепи не могут существовать в различных конформациях независимо друг от друга. Возможны лишь такие конформации, в которых каждое из звеньев цепи занимает положение в пространстве, не занятое другими ее звеньями или звеньями соседних макромолекул.

Если z — число возможных конформаций каждого звена, то общее число конформаций отдельной цепи, содержащей N звеньев, равно z^N. Для n цепей, независимых друг от друга, число конформаций равно z^{Nn}. В растворе с объемной долей полимера v число конформаций каждой макромолекулы уменьшается в e^{-vN} раз [75], и общее число конформаций равно

$$\mathcal{Z} = (ze^{-v})^{Nn}. \qquad (4,75)$$

В неразбавленном полимере $v = 1$. Если гибкость цепи, характеризуемая z, мала, так что $z \to e$, то $\mathcal{Z} \to 1$. Неупорядоченному состоянию отвечает $\mathcal{Z} > 1$. Значение $\mathcal{Z} = 1$ означает упорядоченность, т. е. кристаллизацию при $v = 1$ или образование жидкокристаллической фазы при $v < 1$. Очевидно, что мы рассмотрели здесь чисто энтропийный фактор — упорядочение цепей может происходить и в отсутствие каких-либо сил (кроме сил, препятствующих внутреннему вращению), если сами цепи достаточно жестки.

Важная задача физики белков состоит в нахождении структуры глобулы, образуемой цепью или цепями известной первичной структуры в водном окружении (см. § 4.9).

Рассмотрение глобулы в вакууме лишено физического смысла. Белки функционируют в воде, и она активно действует на растворенные молекулы. Строение макромолекулы белка в водном растворе специфично и должно отличаться от ее строения в ином окружении. Решение указанной выше задачи должно одновременно учитывать и свойства белка, и свойства среды.

Прежде всего, вода влияет на водородные связи в глобуле. Для стабилизации элементов вторичной структуры и пространственной структуры в целом необходимо, чтобы образование внутримолекулярных водородных связей давало бы больший выигрыш свободной энергии, чем образование водородных связей с молекулами воды. Эти эффекты, однако, не столь значительны. Клотц и Франклин [79, 80] установили, что образование водородносвязанных димеров метилацетамида $H_3C—NH—COCH_3$ энергетически выгодно в органических растворителях, но не в воде. Теплота образования димера в CCl_4 равна 4,0 *ккал/моль*, в $CHCl_3$ она равна 1,6 *ккал/моль*, а в воде близка к нулю. Птицын и Скворцов оценили энергию образования водородных связей в полиглутаминовой кислоте и в полилизине, проводя тео-

ретический анализ перехода спираль — клубок в водном растворе [81]. И в этих случаях эффективная энергия связи мала — она составляет примерно 0,2 *ккал/моль*. Можно думать, что роль воды в стабилизации глобулы в основном иная.

Предположение об определяющем значении гидрофобных взаимодействий для глобуляризации белка было высказано еще в 1944 г. [82, 83]. Идея состояла в том, что углеводородные неполярные радикалы аминокислотных остатков преимущественно контактируют друг с другом, а не с водой; напротив, полярные радикалы взаимодействуют с водой. В результате гибкая макромолекула белка в воде сворачивается в глобулу. Неполярные, гидрофобные, радикалы располагаются внутри глобулы, а полярные, гидрофильные, радикалы — на ее поверхности, соприкасающейся с водой.

Эта идея основана прежде всего на данных о низкой растворимости неполярных веществ, например углеводородов в воде. Вместе с тем, как следует из ряда фактов, молекулы, содержащие и полярные, и неполярные группы, находясь в водном окружении, располагаются таким образом, что полярные группы контактируют с водой, а неполярные удаляются из водного окружения. Классические опыты Лэнгмюра, изучавшего мономолекулярные слои жирных кислот на поверхности воды, показали, что полярные карбоксильные группы молекул слоя погружены в воду, а неполярные углеводородные радикалы обращены наружу [84]. Та же ситуация определяет структуру мицелл в водных коллоидных растворах мыл: гидрофобные группы располагаются внутри мицеллы, гидрофильные — на ее поверхности.

Глобулярные белки денатурируются (см. § 4.8) под действием слабополярных органических растворителей, образующих водородные связи с бóльшим трудом, чем вода. Действие таких растворителей определяется контактами с гидрофобными группами; эти контакты нарушают гидрофобные взаимодействия. Денатурирующее действие спиртов на белки возрастает с увеличением размеров алифатического радикала [85, 86]. Сильное денатурирующее действие мочевины также объясняется ее способностью ослаблять гидрофобные взаимодействия. Концепция гидрофобных взаимодействий как важнейшего фактора, определяющего пространственную структуру белка, была подробно обоснована Кауцманном [87].

Физическая природа гидрофобных взаимодействий своеобразна. Плохая растворимость углеводородов в воде связана не с повышением энергии системы, а с уменьшением ее энтропии. Соответственно растворимость углеводорода в воде уменьшается при нагревании. Опыт показывает, что энергия (энтальпия) при растворении алифатических углеводородов понижается, растворение экзотермично. Однако это понижение энергии перекры-

вается возрастанием свободной энергии за счет понижения энтропии. В табл. 4.10 [87] приведены значения ΔS_u, ΔH и ΔF при переносе углеводородов из неполярного растворителя в воду.

Таблица 4.10

Изменения термодинамических характеристик углеводородов при переносе их из неполярного растворителя в воду

Исходная система	T, °K	ΔS_u, э. е.	ΔH, кал/моль	ΔF, кал/моль
Метан CH_4 в бензоле	298	—18	—2800	2600
Метан в эфире	298	—19	—2400	3300
Метан в CCl_4	298	—18	—2500	2900
Этан C_2H_6 в бензоле	298	—20	—2200	3800
Этан в CCl_4	298	—18	—1700	3700
Этилен C_2H_4 в бензоле	298	—15	—1610	2920
Ацетилен C_2H_2 в бензоле	298	—27	—190	1870
Жидкий пропан C_3H_8	298	—23	—1800	5050
Жидкий *н*-бутан C_4H_{10}	298	—23	—1000	5850
Жидкий бензол C_6H_6	291	—14	0	4070
Жидкий толуол C_7H_8	291	—16	0	4650
Жидкий этилбензол C_8H_{10}	291	—19	0	5500
Жидкий *м*- или *п*-ксилол	291	—20	0	5800

ΔS_u равно полному изменению энтропии при разбавлении жидкого углеводорода до молярной концентрации x

$$\Delta S_u = \Delta S + R \ln x, \qquad (4,76)$$

где $R \ln x$ — энтропия смешения. Соответственно

$$\Delta F = -RT(\ln K + \ln x), \qquad (4,77)$$

где K — константа равновесия раствора. Значения ΔH и ΔS_u находят из температурной зависимости K. Образование мицелл молекулами мыл в воде также сопровождается значительным понижением энтропии [88].

Батлер показал, что эти эффекты характеризуют изменение состояния воды, а не углеводорода [89]: их можно трактовать как внедрение неполярных молекул в структурированные (льдоподобные) области воды и в более плотные неструктурированные области. В первом случае молекулы размещаются в пустотах рыхлой структуры, образуя своего рода клатраты, причем дополнительные контакты приводят к уменьшению энергии. Во втором случае увеличение числа контактов углеводород — вода приводит к уменьшению числа контактов вода — вода, которым отвечает более низкая энергия. В результате энергия увеличивается. Следовательно, углеводороды лучше растворяются в структурированных областях и равновесие должно сдвигаться

в сторону увеличения структурированности, что означает понижение энтропии [87, 90]. Эти рассуждения имеют качественный характер, и из них, очевидно, не следует, что понижение энтропии должно превалировать над понижением энергии. Нужно подчеркнуть, что концепция гидрофобных взаимодействий противоречит гипотезе об окружении молекулы белка упорядоченными слоями «структурированной» воды, стабилизирующими нативную, глобулярную конформацию. Эта гипотеза (см. [91—94]) сомнительна — образование таких упорядоченных слоев приводило бы не к уменьшению, а к увеличению свободной энергии.

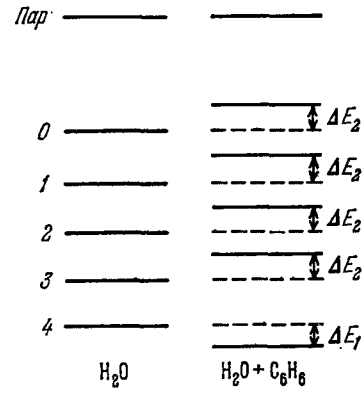


Рис. 4.21. Схема уровней энергии для воды и водного раствора углеводорода.

Имеется ряд попыток построения количественной теории гидрофобных взаимодействий, основанных на моделях структуры воды. Как уже указывалось (см. стр. 206), Шерага и сотрудники предложили модель, учитывающую ряд возможных состояний молекул H_2O, а именно, состояний без водородных связей, с одной, двумя, тремя и четырьмя водородными связями. Последнее состояние отвечает льдоподобной структуре. Координационные числа для таких структур меняются в обратной последовательности — наибольшее соответствует несвязанному состоянию, в котором молекулы могут быть плотно упакованы, наименьшее, равное 4, — льдоподобной структуре (ср. стр. 202) [47, 52, 95—100]. Введение гидрофобной молекулы или группы увеличивает координационное число для льдоподобной структуры и, следовательно, понижает энергию молекул с четырьмя водородными связями на некоторую величину ΔE_1. Напротив, энергии остальных четырех состояний повышаются предположительно на одну и ту же величину ΔE_2 (рис. 4.21). Немети и Шерага оценивают два параметра ΔE_1 и ΔE_2 из опытных данных и находят для алифатических углеводородов $\Delta E_1 = -0{,}03$, $\Delta E_2 = 0{,}31$ *ккал/моль*, для ароматических $\Delta E_1 = -0{,}16$, $\Delta E_2 = 0{,}18$ *ккал/моль*. Получив соответствующее выражение для статистической суммы, можно рассчитать величины ΔF, ΔH, ΔS и Δc_p, отвечающие контактам в любых парах неполярных боковых групп белковой молекулы. Найденные значения, естественно, варьируют для разных групп. При 25 °C ΔF варьирует от $-0{,}2$ до $-1{,}5$ *ккал/моль*, ΔH — от 0,3 до 1,8 *ккал/моль*, ΔS — от 1,7 до 11 *ккал/моль·град* и Δc_p — от -10 до -50 *кал/град*. Как подчеркивает Птицын

[101], если учесть, что гидрофобные аминокислотные остатки составляют от $^1/_3$ до $^1/_2$ всех остатков в большинстве белков [102] и в гидрофобных взаимодействиях могут участвовать и неполярные части полярных боковых цепей, то выигрыш свободной энергии при образовании гидрофобного ядра может быть вполне достаточен для стабилизации глобулярной структуры.

Приведенные численные оценки согласуются с описанными качественными представлениями. Однако, как уже указывалось (см. стр. 206), эта модельная теория не подтверждается спектроскопическими данными.

Метод, предложенный в работе [174] (см. стр. 207), был эффективно применен Дашевским и соавторами к расчету термодинамических функций систем вода плюс метан и вода плюс твердые сферы [175—177]. В этих работах развита статистическая механика гидрофобных взаимодействий. Впервые определены кривые зависимости свободной энергии гидрофобного взаимодействия от расстояния между частицами. Дальнейшее развитие таких работ может оказаться существенным для физики белков.

Очевидно, что бессмысленно говорить о «гидрофобных силах». Специфических сил здесь нет, мы имеем дело, с одной стороны, с обычными ван-дер-ваальсовыми силами и водородными связями, с другой — со структурой воды как целого.

В следующем параграфе будет рассмотрено влияние водного окружения, т. е. прежде всего гидрофобных взаимодействий, на различные силы, действующие в глобуле, на ее тонкую структуру. Остановимся предварительно на грубой оценке влияния гидрофобных взаимодействий на форму глобулы. Такая оценка была дана Фишером [103], разбившим все аминокислотные остатки на две группы — полярные, или гидрофильные (Арг, Асп, Гис, Глу, Лиз, Сер, Тир, Тре), и неполярные, или гидрофобные (остальные 12).

Положим для простоты, что все аминокислотные остатки имеют примерно одинаковые объемы. Гидрофобные взаимодействия заставляют расположиться внутри глобулы гидрофобные остатки; гидрофильные остатки располагаются на ее поверхности. Приближенную форму глобулы можно найти путем элементарного расчета. Считаем, что внешний слой глобулы, состоящий из гидрофильных остатков, мономолекулярен и имеет постоянную толщину d. Если глобула сферична, то объем этого слоя равен

$$V_e = \frac{4\pi}{3}[r^3 - (r-d)^3], \qquad (4,78)$$

где r — радиус глобулы. Внутренний объем глобулы, т. е. объем гидрофобных остатков,

$$V_i = \frac{4\pi}{3}(r-d)^3. \qquad (4,79)$$

Отношение числа гидрофильных остатков к числу гидрофобных $b = V_e/V_i$. Для сферической глобулы

$$b = b_s = \frac{r^3}{(r-d)^3} - 1. \tag{4,80}$$

Получаем

$$V_e = V_t \frac{b}{b+1}, \tag{4,81}$$

где $V_t = V_e + V_i$ — полный объем глобулы. Вместе с тем $V_e \approx Ad$, где A — поверхность гидрофобного ядра глобулы. Фишер считает $d \approx 4$ Å. Следовательно,

$$b = \frac{A}{{}^1/_4 V - A} \tag{4,82}$$

(здесь A измеряется в Å, V — в Å^3). Чем меньше V_t, чем меньше

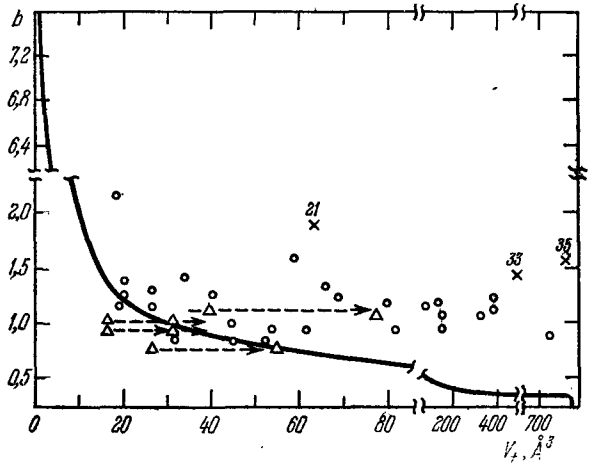


Рис. 4.22. Значения b, вычисленные из данных о составе 35 белков, как функция V_t (*21* — тропиомнозин, *33* — фибриноген, *35* — миозин).

м. в. белка, тем больше должна быть его относительная гидрофильность (полярность). Возможны ситуации, в которых гидрофобные остатки остаются незакрытыми гидрофильными остатками. Для сферы с радиусом $r \to d$ $b_s \to \infty$.

На рис. 4.22 приведены для сравнения теоретическая кривая (4,82), вычисленная для сферы (сплошная линия), и экспериментальные значения V_t и b для ряда белков. Экспериментальные точки располагаются вблизи теоретической кривой, однако, как правило, выше нее. Глобула может быть сферической лишь при $b = b_s$. Обычно $b > b_s$, и глобула принимает форму эллипсоида, уже не отвечающую условию минимума поверхности при

данном объеме. При $b > b_s$ число гидрофильных остатков больше минимального, необходимого для защиты гидрофобного ядра от водного окружения. Если $b \gg b_s$, то возникает не глобулярная, а фибриллярная структура (крестики на рис. 4.22).

Напротив, при $b < b_s$ гидрофильные остатки не закрывают гидрофобные. На поверхности глобулы располагаются теперь и гидрофобные остатки, не защищенные от растворителя. Гидрофобные взаимодействия этих остатков могут привести к слипанию глобул. Такая агрегация означает возникновение четвертичной структуры (треугольники на рис. 4.22). В результате агрегаций они смещаются вправо, что показано пунктирными стрелками.

Позднее Фишер рассмотрел условия гидратирования молекулы белка [104]. Он предположил, что поверхность белка покрыта мономолекулярным слоем воды, в котором молекулы H_2O распределены равномерно. Молекула воды занимает объем 33,3 Å^3, соответствующий поверхности белка площадью 10,3 Å^2. Следовательно, масса (в $г$) воды, приходящаяся на 1 Å^2 поверхности белка, равна

$$g = \frac{18\ г \cdot моль^{-1}}{10{,}3\ Å^2 \cdot 6{,}02 \cdot 10^{23}\ моль^{-1}} = 2{,}9 \cdot 10^{-24}\ г/Å^2.$$

Гидратируемая поверхность белка равна A. Так как $V_e \approx Ad$, то $A = V_e/d = {}^1/_4 V_e$ Å^2. Следовательно, для массы воды, приходящейся на 1 $г$ белка, находим

$$gA = {}^1/_4 gV_e = 0{,}725 \cdot 10^{-24} V_e = 0{,}725 \cdot 10^{-24} V_t \frac{b}{b+1}. \quad (4{,}83)$$

Вычисления, проведенные для 34 белков, показали, что величина gA меняется от 0,22 до 0,33 для белков с м. в. от 12 500 до 320 000. В среднем $gA = 0{,}28$. При сделанных предположениях это означает, что поверхность макромолекулы белка растет пропорционально ее объему — отношение A к V_t есть величина примерно постоянная, не зависящая от b (в рассмотренных 34 белках b меняется от 0,7 до 1,7). Сравнение этих данных с предыдущими расчетами показывает, что с ростом V_t (т. е. м. в.) b/b_s возрастает по закону, близкому к линейному. Чем больше объем макромолекулы белка, тем сильнее она отличается от сферы. Следует иметь в виду, что объем V_t, входящий в (4,83), вычислен из м. в. белка в грубом предположении о примерном равенстве удельных объемов (на единицу молекулярного веса) у всех аминокислотных остатков. При этом и получается линейная зависимость gA от $b/(b+1)$.

В действительности же эта закономерность далеко не всегда выполняется. Известны и очень крупные белки сферической формы.

Результаты работ Фишера свидетельствуют в пользу представлений об определяющей роли гидрофобных взаимодействий. В этих работах предпринята попытка обойти трудности строгого рассмотрения молекулы белка как ансамбля, состоящего из 20 разнородных типов единиц. Вместо 20 типов рассматриваются лишь два. Действительность, конечно, гораздо сложнее. Такое упрощение пригодно лишь для грубых оценок; оно игнорирует не только многообразие полярных и неполярных остатков, но и наличие заданной их последовательности вдоль цепи. Очевидно, что неполярные гидрофобные остатки могут фигурировать и на поверхности глобулы, если в цепи они соседствуют с гидрофильными остатками. С другой стороны, можно думать, что ядро глобулы должно быть преимущественно гидрофобным, так как это стабилизирует структуру. В § 4.7 будет показано, что последнее предположение подтверждается прямым опытом.

Таблица 4.11

Гидрофобность аминокислотных остатков

Остаток	ΔF, *кал/моль*	Гидрофобный вклад	Полярный вклад	Вклад ароматической группы
1. Три	3000	5850	—600	—3200
2. Иле	2970	2600		
3. Тир	2870	4500	—600	—1600
4. Фен	2650	4500		—1600
5. Про	2600	1950		
6. Лей	2420	2600		
7. Вал	1690	1950		
8. Лиз	1500	2600	—600	
9. Гис	1400 (оценка)	2600	—1200	
10. Мет	1300	1950		
11. Ала	730	650		
12. Арг	730	1950	—1800	
13. Цис	650			
14. Глу	550	1300	—1200	
15. Асп	540	650	—1200	
16. Тре	440	1300	—600	
17. Сер	40	650	—600	
18. Гли	0			
19. Асн	—10	650	—1200	
20. Глн	—100	1300	—1200	

Разделение аминокислотных остатков на гидрофобные и гидрофильные до некоторой степени условно. В сущности, следует говорить о *степени гидрофобности* остатка и ввести ее количественную меру. В качестве нее Тенфорд предложил величину изменения свободной энергии ΔF, приходящуюся на боковую группу свободной аминокислоты, при переносе аминокислоты из C_2H_5OH в воду [105]. В табл. 4.11 приведены значения ΔF, экс-

периментально определенные Тенфордом, и оценки различных вкладов в эти величины, полученные Даниллом [106] (см. также [107]). ΔF 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, Асн и Глн), 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 вырождением. 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 α-спиральной, в кросс β- и в неупорядоченной формах (см. гл. 5).

3. Данные, полученные путем изучения дейтерообмена, 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 α-спиральных участков равно 8. Около

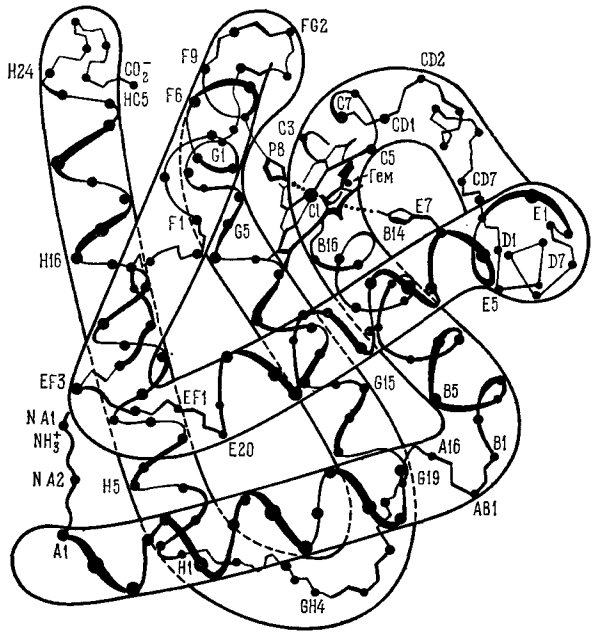


Рис. 4.23. Структура миоглобина.

75% остатков из общего числа 153 принадлежит этим участкам, обозначаемым буквами от A до H (считая от N-конца цепи); внутри каждого α-спирального участка остатки нумеруются от 1 до *n*. Межспиральные, неупорядоченные, участки обозначаются AB, CD и т. д., концевые участки — NA и HC [109]. Молекула гемоглобина имеет *четвертичную* структуру: она состоит из четырех глобул — двух, обозначаемых α, и двух, обозначаемых β. 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 α-цепей) и 78 (в каждой из двух β-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, ионизуемые при нейтральном pH, 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 внутреннних 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 A, B, E, G и H α-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 α-спирализация (равно как и образование β-форм) определяется, вместе с тем, и гидрофобными взаимодействиями. Иными словами, вторичная структура стабилизуется 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 $(-(CH_2)_4-NH-COO-CH_2-C_6H_5)_n$ и поли-γ-бензил-L-глутамата $(-(CH_2)_2-COO-CH_2-C_6H_5)_n$ [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 ослабляются 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 полипептидиой 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 внутрипептидные взаимодействия, так и взаимодействия с растворителем. Интегрирование проводится по всем конформациям системы. Потенциальную энергию внутрипептидных 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 $\varepsilon \approx 3{,}0$ [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].

Таблица 4.13

Свободная энергия процесса удаления молекулы растворителя

Атом или группа атомов	Число сольватации (число молекул H_2O)	Свободная энергия удаления одной молекулы растворителя, *ккал/моль*	Атом или группа атомов	Число сольватации (число молекул H_2O)	Свободная энергия удаления одной молекулы растворителя, *ккал/моль*
H	2	0,31	N^+ (гуаиидии)	6	1,20
O (карбоиил)	4	0,94	CH (алиф.)	2	—0,13
O (гидроксил)	6	0,85	CH_2 (алиф.)	3	—0,13
O^- (карбоксил)	5	4,80	CH_3 (алиф.)	8	—0,13
N (амид)	2	0,63	C (аром.)	2	0,11
NH_3^+ (амин)	5	15,40	CH (аром.)	3	0,11
N^+ (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

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

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],

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

Как уже сказано (см. стр. 230), можно рассматривать три класса остатков — гидрофобные (г), гидрофильные (п) и нейтральные (н). Имеем $n = n^{\text{г}} + n^{\text{п}} + n^{\text{н}}$ и $n^{\text{г}} = n^{\text{г}}_{\text{вн}} + n^{\text{г}}_{\text{сн}}$ 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

$$\Omega(n) = \frac{(n^{\text{г}}_{\text{вн}} + n^{\text{г}}_{\text{сн}})!}{n^{\text{г}}_{\text{вн}}!\, n^{\text{г}}_{\text{си}}!} \frac{(n^{\text{п}}_{\text{вн}} + n^{\text{п}}_{\text{сн}})!}{n^{\text{п}}_{\text{вн}} n^{\text{п}}_{\text{сн}}!} \frac{(n^{\text{н}}_{\text{вн}} + n^{\text{н}}_{\text{сн}})!}{n^{\text{н}}_{\text{ви}}!\, n^{\text{н}}_{\text{сн}}!}. \tag{4,86}$$

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 Å^3; $d \approx 4$ Å. Получаем [107]

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

здесь $\Delta F^{\text{г}}$, $\Delta F^{\text{п}}$, $\Delta F^{\text{н}}$ — изменения свободной энергии при переносе остатка снаружи внутрь. Брандтс принимает $\Delta F^{\text{г}} = 25{,}746\,T - 0{,}20265\,T^2 + 0{,}00077576\,T^3$ (данные для Вал), $\Delta F^{\text{п}} = \infty$, $\Delta F^{\text{н}} = 0$. 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

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

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

$$Z_N = \sum_M \exp(-E_M/kT) = \sum_{\alpha_i} \exp\left(-\frac{E_{\alpha_1}+E_{\alpha_N}}{2kT}\right)\prod_i G_{\alpha_i,\alpha_{i-1}} =$$

$$= \sum_{\alpha,\beta=1}^{r} \exp\left(-\frac{E_\alpha + E_\beta}{2kT}\right)(\mathbf{G}^{N-1})_{\alpha\beta}. \quad (4,89)$$

$\mathbf{G}$ — 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

$$Z_N = \lambda_m^N, \tag{4,91}$$

где λ_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

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

где $E(x)$ — энергия звена в отсутствие внешнего поля, C — нормирующий множитель, $\mathbf{x}' = \mathbf{x} + l\xi$, 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

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

Введем обозначение

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

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

$$\int g(y)\, \psi(x + y)\, d^3y = \psi(x) + \nabla\psi \int g(y)\, y\, d^3y +$$
$$+ {}^1/_2 \nabla_i \nabla_j \psi \int y_i y_j g(y)\, d^3y + \dots \tag{4,95}$$

После усреднения находим

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

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 $N \gg 1$

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

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

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

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

Ищем его решение в виде

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

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

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

Выражение (4,99) перепишем в виде

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

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

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

Поэтому

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

и свободная энергия равна

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

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 ψ заметно отличается от нуля. Тогда

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

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

Допустим, что потенциальная яма имеет вид

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

Тогда при $|x| < R$

$$\nabla^2\psi + \varkappa^2\psi = 0. \tag{4,107}$$

При $U_0 \gg kT$ получаем собственные функции

$$\psi = \frac{\sin \varkappa R}{\varkappa R}, \quad \text{где} \quad \varkappa R = m\pi, \quad m = 1, 2, \ldots, \tag{4,108}$$

и собственные значения

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

Для основного уровня $m = 1$ и

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

т. е. свободная энергия равна

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

Найдем уравнение состояния глобулы. Давление равно

$$p = -\frac{\partial F}{\partial V} = -\frac{\partial F}{4\pi R^2 \partial R} = {}^2/_3\pi^2 NkT(a/R)^2 \frac{1}{V}, \tag{4,112}$$

т. е.

$$pV = {}^2/_3\pi^2 (a/R)^2 NkT. \tag{4,113}$$

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

$$\nabla^2\psi + (1/a^2)(\lambda - \varphi_0 - {}^1/_2\beta^2 x^2)\psi = 0, \tag{4,114}$$

с собственными значениями

$$E_m \equiv \frac{\lambda_m - \varphi_0}{a^2} = \omega(m + {}^1/_2), \quad m = 0, 1, 2, \ldots, \tag{4,115}$$

где

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

Для основного уровня $m = 0$ и

$$\lambda_0 = \varphi_0 + {}^1/_2 a\beta. \tag{4,116}$$

Можно переписать $\varphi_0 + {}^1/_2\beta^2 x^2$ в виде

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

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

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

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 апериодическому 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 $N\mathscr{E}$ Конформационная энтропия S, являющаяся функцией от E, выражается через логарифм числа конформаций, отвечающих энергии E. При небольших $E - E_0$ имеем

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

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

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

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

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

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 pH, 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 апериодическим кристаллом. Переход глобула — клубок отличен от переходов α-спираль — клубок и β-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 химотрипсиногена, полученные

Брандтсом и др. [125, 126]. Переход выражается в изменении коэффициента экстинкции ε при 2930 Å. Процесс обратим, и кривые являются равновесными. Такой переход типичен для глобулярных белков. Интервал температур, при которых он происходит, составляет около 10 °С. Сходство с переходом спираль — клубок, однако, обманчиво Внимательный анализ зависимости степени денатурации от температуры показывает, что конечную ширину интервала, в котором происходит переход, нельзя объяснить наличием частично денатурированных молекул, находящихся в равновесии с нативными и с полностью

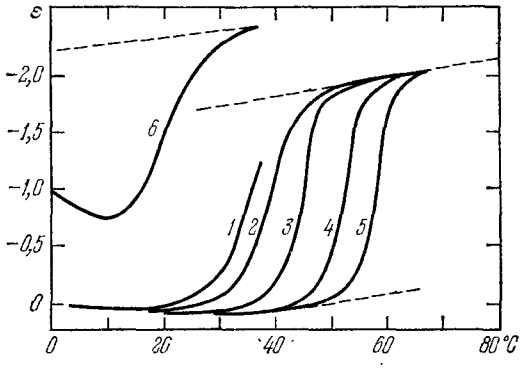


Рис. 4.24. Зависимость коэффициента экстинкции при 2930 Å раствора химотрипсиногена от температуры.

Цифры у кривых указывают значения pH. Нижняя пунктирная кривая соответствует нативной форме, верхние — денатурированной.

денатурированными. Переход происходит одноступенчато и в этом смысле подобен фазовому переходу первого рода [127].

Калориметрические исследования дают прямую информацию о термодинамических характеристиках денатурационных переходов. Привалов показал, что поглощение тепла при нагревании некоторых глобулярных белков (альбумины, миоглобин, химотрипсиноген, рибонуклеаза) идет в две стадии. Первая стадия — предденатурационная, характеризуемая некоторым увеличением теплоемкости без скачкообразного изменения энтальпии, и вторая — собственно денатурация, фазовый переход [128]. Энтальпия денатурации сильно зависит от pH среды, о чем свидетельствует, например, табл. 4.14.

Пространственное строение исследованных белков известно, и можно подсчитать энтальпию денатурации, приходящуюся на моль водородных связей. Для всех трех белков эта величина составляет 1,4—1,5 *ккал/моль* связей. Отсюда Привалов делает вывод об определяющем значении водородных связей в процессе

денатурации. Такой вывод нельзя считать окончательным — он опирается на ограниченный материал и не согласуется с общими представлениями о структуре глобулы.

Таблица 4.14

Температуры и энтальпии денатурации в *ккал/моль* белка при разных значениях pH

Химотрипсиноген			Рибонуклеаза			Миоглобин		
pH	$T_{пл}$, °C	ΔH	pH	$T_{пл}$, °C	ΔH	pH	$T_{пл}$, °C	ΔH
2,3	43	78	2,4	34	52	12,2	50	73
2,6	49	102	3,3	47	66	12,0	54	80
2,8	51	110	3,7	50	73	11,5	63	100
3,4	58	130	4,4	54	77	11,3	67	117
4,0	61	140	6,0	59	89	11,0	72	134
5,0	62	148				10,7	78	170

Многостадийная денатурация наблюдается в ряде случаев (например, денатурация парамиозина гуанидинхлоридом [129]). Идентификация промежуточных состояний и истолкование многостадийного процесса встречаются с большими трудностями.

Характерные значения термодинамических параметров денатурации приведены в табл. 4.15 [130].

Таблица 4.15

Типичные значения термодинамических параметров денатурации [1])

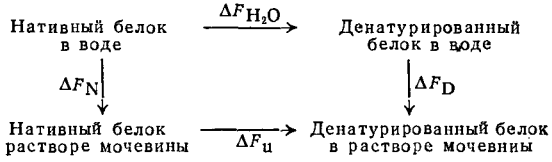
Белок	Денатурирующий агент	ΔF, ккал × × моль$^{-1}$	ΔH, ккал × × моль$^{-1}$	ΔS, кал × моль$^{-1}$ × × град$^{-1}$	Δc_p, кал × моль$^{-1}$ × × град$^{-1}$	T^*, °C
Рибонуклеаза pH 2,5	Нагревание	0,9	57	185	2000	−9
Химотрипсиногеи pH 3,0, 0,01 *M* Cl	Нагревание	7,3	39	105	2600	10
Миоглобин pH 9,0	Нагревание	13,6	42	95	1400	<0
β-лактоглобулин pH 3,0, 25 °C	5*M* мочевина	0,6	−21	−72	2150	35

[1]) T^* — температура максимальной стабильности, при которой константа равновесия K_D процесса нативный белок $\rightleftarrows$ денатурированный белок минимальна. Если $T<T^*$, эта константа возрастает с уменьшением T, если $T>T^*$, она возрастает с увеличением T. Методы определения K_D описаны Тенфордом [130].

Остановимся, в частности, на методе определения разности свободных энергий денатурированного и нативного белка ΔF по денатурации в растворе мочевины, предложенном Тенфордом [131]. Имеем для этого процесса

$$-\Delta F_{\text{u}} = RT \ln K_{\text{u}} = RT \ln \frac{[\text{D}]}{[\text{N}]}, \qquad (4,120)$$

где [D] и [N] — концентрации денатурированного и нативного белка. Нас интересуют значения $\Delta F_{\text{H}_2\text{O}}$ для водного раствора. Воспользуемся схемой



Тогда

$$\delta \Delta F = \Delta F_{\text{u}} - \Delta F_{\text{H}_2\text{O}} = \Delta F_{\text{D}} - \Delta F_{\text{N}}. \qquad (4,121)$$

Величину $\delta\Delta F$ можно представить в виде

$$\delta \Delta F = \sum_i \alpha_i n_i \Delta F_i, \qquad (4,122)$$

где n_i — число групп типа i в белке, ΔF_i — их вклад в свободную энергию перехода, α_i — численный параметр, зависящий от степени доступности растворителю групп данного типа в нативной конформации. Согласно Тенфорду, согласие с опытом получается, если принять для полярных групп $\alpha_i = 0{,}25$, для гидрофобных $\alpha_i = 0{,}75$ и для пептидных $\alpha_i = 0{,}50$. Величины ΔF_i находят из данных о растворимости аминокислот в воде и в растворе мочевины данной концентрации.

Пусть c_{u}^* — концентрация мочевины, при которой [D] = [N], т. е. точка полуденатурации. Тогда, согласно (4,120), $\Delta F_{\text{u}} = 0$ и искомая величина равна

$$\Delta F_{\text{H}_2\text{O}} = -(\delta \Delta F)_{c_{\text{u}}^*} = -\sum_i \alpha_i n_i (\Delta F_i)_{c_{\text{u}}^*}. \qquad (4,123)$$

Это — удобный и простой способ определения конформационной стабильности белка.

Изучение кинетики денатурации (в частности, с помощью релаксационных методов, см. § 7.7) позволяет определить активационные параметры переходов. Значения $H^{\ddagger}$ обычно порядка 40—80 *ккал/моль*, $S^{\ddagger}$ 40—200 *э. е.*, $F^{\ddagger}$ 20—25 *ккал/моль* [132].

Свободная энергия денатурации ΔF должна быть суммой многих вкладов. Согласно [133]

$$\Delta F = \Delta F_\alpha + \Delta F_H + \Delta F_{np} + \Delta F_e + \Delta F_u + \Delta F_x + \ldots, \quad (4,124)$$

где ΔF_α определяется раскручиванием α-спиралей, ΔF_H — разрывами водородных связей между белковыми цепями соседних макромолекул, ΔF_{np} — изменением гидрофобных взаимодействий, ΔF_e — изменением электростатических взаимодействий, ΔF_u — набуханием образовавшегося клубка, ΔF_x — разрывом поперечных связей между спиралями, существующими в кристаллической фазе. ΔF_α и ΔF_x не зависят от pH, остальные члены, связанные с присутствием ионизуемых групп, от pH зависят. Имеем

$$\Delta F_\alpha = (N-4)\,\Delta H_0 - (N-1)\,T\,\Delta S_0, \quad (4,125)$$

где N — число звеньев в α-спирали, ΔH_0 и ΔS_0 — изменения энтальпии и энтропии на звено бесконечно длинной цепи при переходе спираль — клубок. Цепь, состоящая из N звеньев, имеет в α-спиральной форме $N-4$ водородных связей, ограничивающих подвижность $N-1$ звеньев. Из (4,125) следует, что α-спираль устойчива, т. е. $\Delta F_\alpha > 0$, лишь если N достаточно велико.

$$\Delta F_H = -kT \sum_{i,j} \ln (1 - x_{ij}), \quad (4,126)$$

где x_{ij} — доля молекул с водородной связью между группами i и j, равная

$$x_{ij} = \frac{K_{ij}}{1 + K_{ij} + K_i/[H^+] + [H^+]/K_j}; \quad (4,127)$$

здесь K_{ij} — константа равновесия для образования связи между i и j, K_i и K_j — константы ионизации для донорных и акцепторных групп, не имеющих водородных связей.

$$\Delta F_u = -2pkT \ln (1 + Kc) \quad (4,128)$$

(K — константа равновесия для взаимодействия NH- или CO-групп белка с малыми молекулами в растворе). Так, мочевина $(NH_2)_2CO$ образует водородные связи с белком и способствует денатурации. В этом случае c — молярная концентрация мочевины, а p — число остатков «кристаллической» цепи, которые после разрушения спирали могут взаимодействовать с мочевиной. Конечно, молекулы воды также взаимодействуют с белком, но это взаимодействие уже учтено в ΔF_α, ΔF_H и ΔF_{np}. При малых c

$$\Delta F_u = -2pkTKc. \quad (4,129)$$

Член ΔF_x имеет чисто энтропийную природу. Он равен

$$\Delta F_x = -T\,\Delta S_x = {}^3/_2 kT\nu (\ln n + 3), \quad (4,130)$$

где ν — число спиралей, соединенных поперечными связями, а n — число звеньев между поперечными связями.

Определение ΔF_{np} и ΔF_e представляет большие трудности. Есть основания считать эти члены относительно малыми (речь ведь идет не о ΔH и ΔS, а о ΔF).

По оценке Шеллмана [134], $\Delta H_0 = 1{,}5$ *ккал/моль*, $\Delta S_0 = 4{,}2$ *э. е.* Величина ΔH_0 значительно меньше обычных энергий водородных связей; она равна разности энергий групп, соединенных внутримолекулярными и межмолекулярными водородными связями. Оценка Привалова близка к приведенной [128].

При больших N

$$\Delta F_\alpha \approx N(\Delta H_0 - T\Delta S_0), \tag{4,131}$$

и при $T = 300\,^\circ\text{K}$ $\Delta F_\alpha \approx N(1500—1260) = 240\,N$ *кал/моль*, что меньше RT. В присутствии мочевины ΔF_u отрицательно, т. е. стабильность нативного белка уменьшается. Напротив, изменение гидрофобных взаимодействий (ΔF_{np}) ее увеличивает. Если белок не имеет побочных водородных или гидрофобных связей, то температура перехода находится из условия

$$\Delta F = (N-4)\Delta H_0 - (N-1)T_{\text{пер}}\Delta S_0 - T_{\text{пер}}\Delta S_x = 0 \tag{4,132}$$

и

$$T_{\text{пер}} = \frac{(N-4)\Delta H_0}{(N-1)\Delta S_0 + \Delta S_x}. \tag{4,133}$$

Величина ΔS_x также пропорциональна N — чем длиннее цепь, тем больше поперечных связей она может образовать. Значит, $\nu \infty N$. Если $N \gg 1$, то $T_{\text{пер}}$ не зависит от N. Если известны ΔH_0 и ΔS_0, то можно по $T_{\text{пер}}$ определить ΔS_x. ΔF_{np} оценивается в 0,5 *ккал/моль*. Значения ΔF_{H} и ΔF_{e} того же порядка.

Доля денатурированного материала равна

$$x = \frac{\exp(-\Delta F/kT)}{1 + \exp(-\Delta F/kT)}. \tag{4,134}$$

В точке перехода $\Delta F = 0$ и $x = 0{,}5$. В работе [102] проведено детальное рассмотрение водородных и гидрофобных связей в системе белок — вода. Количественные оценки ΔH, ΔS и ΔF согласуются с приведенными.

Острота термического денатурационного перехода характеризуется производной

$$\left(\frac{dx}{dT}\right)_{T_{\text{пер}}} = \frac{\Delta H}{4RT_{\text{пер}}^2}, \tag{4,135}$$

где

$$\Delta H = (N-4)\Delta H_0 + \Delta H_{\text{H}}, \tag{4,136}$$

$$\Delta H_{\text{H}} = \sum x_{ij}\left[-\Delta H_{ij} + \frac{(K_1/[\text{H}^+])\Delta H_1 - ([\text{H}^+]/K_2)\Delta H_2}{1 + K_1/[\text{H}^+] + [\text{H}^+]/K_2}\right]. \tag{4,137}$$

Входящие сюда величины x_{ij} определены уравнением (4,127), ΔH_{ij} — теплота образования водородной связи между группами i и j, ΔH_1, ΔH_2 — теплоты ионизации, соответствующие константам равновесия K_1 и K_2. $T_{\text{пер}}$ не зависит от степени кооперации спиральных участков. Напротив, острота перехода зависит от нее. Если переход выполняется одновременно r участками, то

$$\left(\frac{dx}{dT}\right)_{T_{\text{пер}}} = \frac{r\,\Delta H}{4RT_{\text{пер}}^2}. \qquad (4,138)$$

Изложенные теоретические соображения в общем согласуются с опытом (см., например, [133]). Многочисленные экспериментальные данные, относящиеся к денатурации, приведены в монографии Жоли [132], а также в обзорах Тенфорда [130] и Брандтса [107], в которых содержится и теоретический анализ.

Из изложенного следует, что денатурацию можно рассматривать как процесс кооперативного перехода между двумя состояниями — нативным и денатурированным. Брандтс обосновал эту концепцию [107]. Оба наблюдаемых макроскопических состояния являются результатом усреднения по совокупностям микроскопических состояний. Теория перехода между двумя состояниями исходит из того, что любое микроскопическое состояние относится к нативному или к денатурированному макроскопическому состоянию или фигурирует в распределениях и для того, и для другого состояния. С помощью статистической суммы (4,85), где q дается (4,87), Брандтс вычислил изменение числа звеньев n, соединенных водородными связями, с температурой для «белка» с $N = 200$ (40% гидрофобных, 20% гидрофильных и 40% нейтральных остатков). Функция распределения микросостояний, характеризуемых числом водородных связей, оказывается отчетливо бимодальной. При изменении температуры от 20 до 50 °С резко уменьшаются вероятности состояний с $n \approx 200$ и одновременно резко увеличиваются вероятности состояний с $n \approx 0$.

Изучение денатурационных переходов дает информацию, с одной стороны, о степени стабильности нативного белка (изменение свободной энергии), с другой — о кооперативности взаимодействий в белке (острота перехода). Эти характеристики не обязательно коррелируют друг с другом.

Исследование денатурации, естественно, не раскрывает устройства «машины» — белковой глобулы. Денатурация означает разрушение этой машины. Тем не менее при таком разрушении мы получаем некоторые сведения об устойчивости внутренних связей, об электронно-конформационных взаимодействиях (ЭКВ) в белке (см. § 6.7).

Равновесная трактовка денатурационных явлений, строго говоря, применима лишь к обратимой денатурации. Наблюдаемая денатурация в большинстве случаев частично или полностью

необратима. Однако описан и ряд явлений обратимой денатурации. Если денатурация проводится в мягких условиях (например, в результате медленного и не очень значительного повышения температуры), то для ряда белков удается наблюдать *ренатурацию*, т. е. восстановление их нативных свойств и структуры при столь же мягком изменении денатурирующих факторов в обратную сторону.

Естественно, что полной обратимости денатурации следует ожидать для белков, не содержащих групп, вступающих в денатурированном состоянии в необратимые реакции (например, окисление S — H-групп) [101]). Так, доказана обратимость денатурации рибонуклеазы [135], такаамилазы А [136] и α-амилазы [136]. В работах Анфинсена и др. [137—140] показано, что можно добиться ренатурации белков и с разорванными дисульфидными связями. Из этих данных следует, что денатурацию действительно можно трактовать как термодинамический конформационный переход и что нативная структура белка отвечает если не глобальному, то относительному минимуму свободной энергии.

§ 4.9. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ЦЕПИ И ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ГЛОБУЛЫ

Проблема связи между первичной структурой полипептидной цепи и пространственным строением глобулы — одна из важнейших в физике белка. Биологически функциональна нативная пространственная структура макромолекулы, а генетнчески кодируется первичная структура. Если бы эта связь была неоднозначной, то пришлось бы пересмотреть основные положения молекулярной биологии. Приведенные выше факты, относящиеся к ренатурации белков, дают экспериментальное обоснование наличию такой связи, следующему из общетеоретических соображений (ср. § 9.7).

В ряде работ был проведен сравнительный анализ пространственной структуры белков, установленной рентгенографически, и их первичной структуры с целью определения аминокислотных остатков, преимущественно входящих в α-спиральные участки глобулы и не входящих в спирали, нарушающих спирализацию. Гуццо [141] провел разделение аминокислот на «спиральные» и «неспиральные», исходя из данных для гемоглобина и миоглобина (см. также [142]). Протеро [143] расширил эту классификацию, пользуясь данными для большего числа белков, и сформулировал критерий для длины сегментов, в которых должны фигурировать определенные классы аминокислот, обеспечивающих спиральность самих сегментов. Шиффер и Эдмунсон [144] предложили модель, описывающую спиралеобразование при

различных относительных положениях аминокислотных остатков. Они предположили, что периодические скопления гидрофобных и гидрофильных участков, наблюдаемые в гемоглобине, миоглобине ([111], см. стр. 233) и в лизоциме [145], обеспечивают стабилизацию спиральных областей глобулы. Перити, Квальяротти и Ликуори [146] развили статистический метод предсказания вторичной структуры. Они определили частоты, с которыми появляются пары остатков, отстоящих друг от друга на 0, 1, . . . , 5 остатков, в спиральных и неспиральных участках гемоглобина и миоглобина, и смогли предсказать спиральные участки в лизоциме.

В работах Птицына [147, 148] на основании статистического анализа аминокислотного состава и последовательности участков полипептидной цепи с различной вторичной структурой были предложены классификация аминокислот и метод предсказания вторичной структуры глобулярных белков по их первичной структуре. Оказалось возможным приписать каждой аминокислоте некоторую индивидуальную способность встраиваться в спиральные участки («спиральный потенциал»), в первом приближении не зависящую от ее соседей в цепи.

Это положение было обосновано в работе Котельчука и Шераги [149] на основе данных о конформационных энергиях. Они показали, что существенно взаимодействие с амидной группой бокового привеска аминокислоты на ее С-стороне. Это взаимодействие чаще всего не зависит от природы боковых привесков соседних аминокислот. В работе [149] сопоставлялись конформационные энергии каждого остатка в трех конформациях с наименьшей энергией (правая и левая спирали, антипараллельная β-форма), и было установлено, что остатки, у которых минимуму энергии отвечают правые спирали, являются «спиральными», а в остальных случаях спирализация не происходит. Пейн и Робсон [150] вычислили «спиральные потенциалы» аминокислот в предположении о существенной роли локальных взаимодействий боковых привесков с основной цепью.

Птицын и Финкельштейн [148] наряду со «спиральным потенциалом» оценивают «β-структурный потенциал» аминокислоты. Положительный «спиральный потенциал» можно приписать Ала, Лей, Мет, отрицательный — Асп, Цис, Сер, Тир, Тре и Гли, нулевой — остальным остаткам. Такое поведение аминокислот нетрудно объяснить [146, 147]. Аминокислотам с массивными углеводородными боковыми привесками (Иле, Лей, Фен) можно приписать большой положительный «β-структурный потенциал», аминокислотам с заряженными боковыми группами (Асп, Глу, Арг, Гис, Лиз), а также Про — большой отрицательный «β-потенциал». Остальным гидрофобным остаткам приписывается малый положительный «β-потенциал», полярным и Гли — малый

отрицательный «β-потенциал». На основании данных, относящихся к миоглобину, лизоциму, папаину и α-химотрипсину, была предсказана структура α- и β-цепей гемоглобина, рибонуклеазы А, субтилизина *BPN'* и фрагмента карбоксипептидазы. Согласие с опытом было получено для 74% аминокислот.

В работе Лима [151] реализован более содержательный подход к проблеме. Как уже сказано, раздельное рассмотрение вторичной и третичной структуры белка не имеет самостоятельного смысла — вторичная структура является элементом пространственной структуры глобулы, ею определяемым (см. стр. 220). Лим исходит из того, что глобула состоит из гидрофобного ядра и полярной оболочки. Целиком гидрофильные участки не могут образовать более одного витка спирали, так как спирализация препятствует взаимодействию с водой. Спирализуются лишь те гидрофильные участки, которые примыкают к спирали, «скрепленной» с ядром. Образование длинных спиралей возможно лишь из участков, содержащих гидрофобные боковые группы, которые входят в ядро. Целиком гидрофобные участки спиральны, если они находятся внутри глобулы. Смешанные участки спиральны, если гидрофильные остатки расположены на поверхности глобулы, а гидрофобные — внутри нее. Об этом свидетельствуют, в частности, результаты изучения гемоглобина (см. стр. 232). Для спиралей характерны «скобы», состоящие из гидрофобных остатков и находящиеся в положениях i, $i + 4$.

Оказывается целесообразным провести детальную классификацию остатков применительно к указанным их свойствам. Лим подразделяет остатки на малые (Гли, Ала), средние гидрофобные (Цис, Вал, Мет, Лей, Иле, Про), большие гидрофобные (Фен, Тир, Три), малые гидрофильные (Асп, Асн, Глу, Глн, Сер, Тре), большие гидрофильные (Лиз, Арг, Гис).

Сформулирован ряд правил (имеющих в конечном счете эмпирическое происхождение), определяющих участие или неучастие этих классов остатков в спиралях, и установлено разумное согласие со структурными данными для 12 белков. Существенное отличие работы [151] от других исследований состоит в рассмотрении дальних, а не локальных взаимодействий. Они оказываются определяющими.

Робсон и Пейн [152] попытались применить к рассмотрению этой проблемы теорию информации. Последовательность остатков в цепи и последовательность их конформаций в глобуле считаются двумя сообщениями, связанными трансляционным кодом. С помощью ЭВМ определялась «спиралеобразующая информация» для 11 белков. Пользуясь только информационными величинами для отдельных остатков, авторы предсказали спиральные участки. Некоторые несоответствия были устранены

внесением поправок, учитывающих количество информации в парах остатков.

Согласно [152] «спиралеобразующая информация», заключенная в отдельном остатке, выражается различием его энергий в спиральной и неспиральной структуре, зависящим от взаимодействия боковой группы с основной цепью.

Этот подход нельзя считать перспективным, так как он имеет формальный характер и, в сущности, не учитывает физику глобулы.

В работе Есиповой и Туманяна [153] исследована уже не спирализация, но непосредственная связь между первичной и пространственной структурами белка.

В качестве характеристики третичной структуры в работе [153] рассматриваются места поворотов (узловые точки) основной цепи. Иными словами, цепь аппроксимируют линией, находят участки максимальной кривизны этой линии и выясняют причины локальных изгибов цепи. Изгиб цепи определяется аминокислотами, входящими в поворот. Поворот цепи означает резкую смену значений двугранных углов ϕ и ψ (см. стр. 179). Для большинства аминокислот энергетически выгодны углы ϕ и ψ, отвечающие правой α-спирали. Но Сер, Асн, Три, Тир и Лиз характеризуются минимумами энергии в конформациях левой α-спирали и β-формы.

Наибольшей гибкостью обладает Гли. Этот остаток можно считать своего рода универсальным шарниром в молекуле белка. Можно думать также, что перегибы должны преимущественно происходить на негидрофобных остатках, в частности на Сер.

В работе [153] проведен анализ структуры лизоцима, химотрипсина, миоглобина, эластазы, рибонуклеазы, папаина и карбоксипептидазы. Указанные положения в целом подтвердились. Так, в лизоциме определено 17 поворотов цепи, причем в них входят практически все остатки Гли. Установлено, что наличие Гли является достаточным, но не необходимым условием резкого поворота. В семи поворотах из 16 в участках максимальной кривизны находятся Сер, Асп, Арг, Три. Эти же остатки соседствуют с «поворотными» остатками Гли. Аналогичные закономерности установлены для химотрипсина, эластазы, рибонуклеазы, папаина. Из 19 остатков Гли α-химотрипсина 17 располагаются в поворотных участках, в эластазе из 25 Гли 23 находятся в поворотах. Наряду с названными остатками в поворотах участвуют еще Тре, Асн, Лиз, Глн. Включение наряду с Гли одного из этих остатков, по-видимому, существенно для анализа поворотов. Для поворотов весьма важно также наличие водородных связей между боковым радикалом и основной цепью (Сер).

В целом надежные статистические оценки показывают, что в поворотах участвуют Гли, Сер, Асн, Арг. Менее точно установлено участие Тир, Тре и Асп. «Избегают» поворотов Лей, Вал, Ала и Иле. С меньшей достоверностью это относится к Фен, Про и Гис.

В белках с малой долей α-спиралей Гли, не находящийся в узловой точке, обычно соседствует с Вал и Иле. Напротив, в миоглобине Гли обычно соседствует с Глу и Ала, стабилизующими α-спираль. Тем самым, наличие такого Гли не может препятствовать появлению спирали и образованию поворотов. С другой стороны, Гли в миоглобине и сходных белках обеспечивает контакты между α-спиральными сегментами, так как в местах нахождения Гли в спирали появляются выемки, удобные для упаковки. Поэтому третичная структура стабилизует α-спирали, содержащие Гли.

Таким образом, третичную структуру белка можно моделировать совокупностью приблизительно прямолинейных сегментов, соединенных поворотными шарнирными участками. Так называемые «неупорядоченные» сегменты задают важнейшие элементы пространственной структуры.

Укажем другие работы [179, 180], посвященные той же проблеме. Птицын впервые подошел к проблеме связи между первичной и пространственной структурами белковой глобулы, исходя из физической гипотезы о формировании глобулы во времени [181]. Предполагается, что самоорганизация глобулы есть результат некоего направленного процесса. Опыты по ренатурации показывают, что программа безошибочной самоорганизации закодирована в самой первичной структуре. Самоорганизация происходит стадийно так, что на каждой следующей стадии формируется все более сложная и все менее флуктуирующая структура. На данной стадии образуется флуктуирующий зародыш следующей стадии. Таким образом, нативная структура белковой молекулы строится из отдельных структурированных участков цепи, как из блоков, образование которых предшествует во времени формированию самой структуры. Организация, достигнутая на предшествующей стадии, не изменяется, но лишь стабилизуется на следующей стадии.

Согласно Птицыну, на первой стадии в развернутой белковой цепи образуются флуктуирующие зародыши спиральных участков, участков с вытянутой структурой, а также изгибов и петель цепи, стабилизованные только локальными взаимодействиями. На второй стадии одна или несколько пар зародышей объединяются, образуя комплексы из двух соседних α-спиралей или β-структурные «шпильки», которые могут служить центрами кристаллизации третичной структуры белка. На третьей стадии происходит рост центров кристаллизации за счет присоединения

к ним соседних участков цепи и дальнейшая стабилизация структуры. На четвертой стадии образуется единая компактная структура глобулы путем роста одного центра кристаллизации или объединения нескольких центров. Наконец, путем локальной подстройки образуется нативная структура глобулы.

Количественная разработка этой привлекательной гипотезы позволила подойти к анализу путей самоорганизации белков, в частности миоглобина [182]. Теория предсказывает положение зародышей пяти длинных и двух коротких спиральных участков в цепи. Проведены грубые расчеты конформационных энергий системы на стадиях образования центров кристаллизации. Последовательный анализ позволил найти пространственную структуру миоглобина, хорошо согласующуюся с опытом.

Дальнейшее развитие теории требует уточнения количественных оценок и рассмотрения кинетики самоорганизации. Экспериментальный подход к проблеме состоит в изучении кинетики ренатурации белков при постоянных внешних условиях. Сведения о термодинамически устойчивых стадиях ренатурации при изменяющихся внешних условиях можно получить с помощью ядерного магнитного резонанса (см. § 5.10).

§ 4.10. ФИБРИЛЛЯРНЫЕ БЕЛКИ

Все рассказанное в этой главе относилось к глобулярным белкам со свойственным им многообразием структур и функций. Гораздо менее разнообразные фибриллярные белки характеризуются специфическими особенностями строения и выполняют специальные функции. Это — структурные и сократительные белки. Первые играют роль опорных и защитных компонент, входя в состав сухожилий, хрящей, костей, связок и т. д. (коллагены), а также эпидермиса, волос, шерсти, рогов и т. д. (кератины). Вторые входят в состав рабочих веществ механохимических систем, в частности мышц (миозин).

В отличие от большинства глобулярных белков, фибриллярные, волокнообразующие, белки функционируют не в растворе, т. е. не в цитоплазме клеток, но образуют надмолекулярные тканевые системы. Выполнение структурной функции требует особой точности построения, регулярности структуры на всех уровнях, начиная с первичной.

Кожа животного содержит коллаген (в дерме) и кератин (в эпидермисе). При экстрагировании соединительной ткани холодными растворами солей, разбавленными уксусной кислотой (pH 3,9), а также растворами щелочей часть коллагена переходит в раствор. Эти растворяющиеся молекулы при любом способе экстракции практически идентичны. Часть коллагена, растворимую в кислоте, принято называть проколлагеном.

Коллагеновые волокна (фибриллы) образуются при агрегации цепей проколлагена. В процессе роста костей, остеогенеза, эти фибриллы играют роль центров кристаллизации, на которых растут игольчатые кристаллы оксиапатита $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

Коллагеновые волокна нерастворимы в воде, но при длительном нагревании с водой коллаген превращается в растворимую желатину — в результате гидролиза части пептидных связей и, следовательно, деструкции длинных белковых цепей.

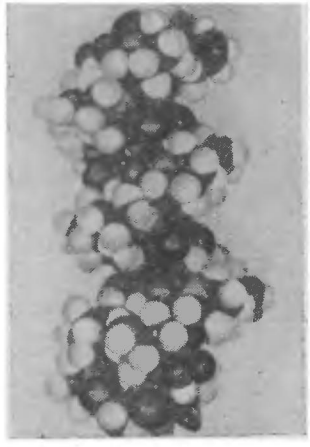


Рис. 4.25. Модель структуры коллагена.

Основная проблема физики коллагена и других фибриллярных белков состоит в следующем: каким образом особенности первичной структуры определяют специфические свойства фибрилл?

Аминокислотный состав коллагена весьма своеобразен. 33% всех аминокислотных остатков составляет Гли, 12% Про и 10% неканонический остаток оксипролил (Опро). Этот остаток, а также оксилизил (Олиз), содержащийся в количестве от 0,3 до 1,2%, встречаются главным образом в коллагене. Коллаген содержит также до 10% Ала и значительно меньшие количества других аминокислот, причем содержание Тир, Гис, Цис и Мет, Вал, Фен особенно мало — менее чем по 1%. Таким образом, до $^2/_3$ остатков составляют Гли, Про, Опро и Ала. Тем самым, запас информации в коллагене более беден, чем в глобулярных белках, молекулы коллагена, в сущности, не являются информационными.

Последовательность остатков в коллагене можно представить в виде $(\text{Гли}-x-x)_n$, где x — любой остаток. Чаще всего встречаются последовательности Гли — Про — Опро, Гли — Про — Ала, Гли — Ала — Опро [154].

Строение коллагена было выяснено в рентгенографических исследованиях Рамачандрана с сотрудниками [155, 156] и Рича и Крика [7, 8, 157]. Коллаген сходен с синтетическими полиглицином и полипролином. Структура полиглицина показана на стр. 183.

Молекула коллагена состоит из трех цепей типа полиглициновых, скрученных совместно в спираль (рис. 4.25). При этом остатки Гли располагаются вблизи центральной оси тройной спирали, а остальные $^2/_3$ остатков выступают наружу и способны присоединять соседние цепи. Молекулярный вес такой тройной

спирали (проколлаген) примерно равен 360 000, каждая из трех цепей содержит около 1000 аминокислотных остатков. Длина молекулы 290 *нм*, диаметр 1,5 *нм*.

Структура синтетического полипептида (Гли—Про—Опро)$_n$ с молекулярным весом в несколько тысяч весьма сходна со

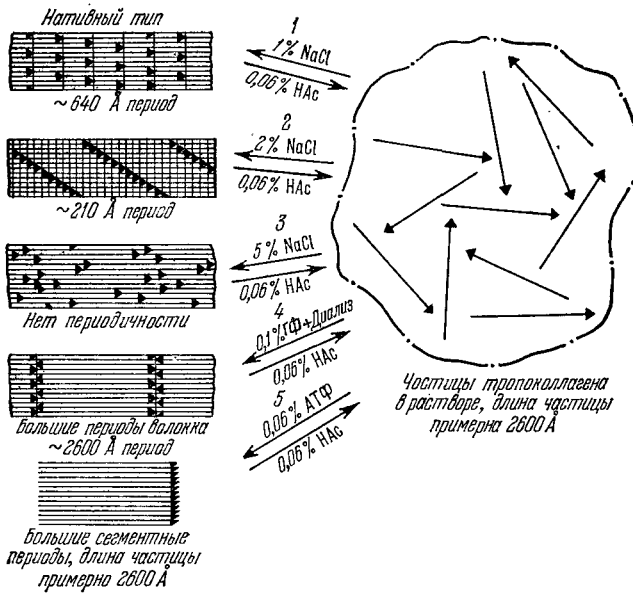


Рис. 4.26. Агрегация молекул проколлагена (по Шмитту).

1 — агрегация 1%-ным NaCl, *2* — то же 2%-ным NaCl, *3* — то же 5%-ным NaCl, *4* — 0,1%-ным гуанидинфосфатом + диализ, *5* — то же 0,06%-ным АТФ. Дезагрегация во всех случаях уксусной кислотой.

структурой коллагена. Это было установлено методами рентгенографии, инфракрасной спектроскопии и спектрополяриметрии [158, 159].

Схема агрегации молекул проколлагена в надмолекулярные фибриллы показана на рис. 4.26. На электронных микрофотографиях нативных коллагеновых волокон видна поперечная исчерченность, соответствующая этой схеме. Период исчерченности 640 Å.

Миллер и Рэй предложили другую модель коллагеновых фибрилл, согласно которой молекулы тропоколлагена группируются в жгуты, свитые из пяти нитей [160]. Эта модель также согласуется с рентгенографическими данными. Вопрос, тем самым, требует дальнейшего исследования.

Теоретический расчет структуры коллагена, исходящий из минимизации конформационной энергии, был проведен Туманяном [161]. В работе учтена стабилизующая роль молекулы воды (см. [162]). При осторожном нагревании коллагена с водой при 62—63 °С волокна испытывают необратимое сокращение примерно в три раза. По-видимому, этот переход, являющийся конформационным превращением, обусловлен кооперативным разрушением водородных и гидрофобных связей. Проколлаген испытывает тепловой переход и в растворе. Привалов и Тиктопуло исследовали этот переход методом калориметрии [163].

В табл. 4.16 приведены параметры денатурации тропоколлагена при pH 3,5 в зависимости от содержания иминокислотных остатков (Про, Опро).

Таблица 4.16

Термодинамические характеристики денатурации тропоколлагена

Источник тропоколлагена	Число иминокислотных остатков на 1000	$T_{пер}$, °С	Теплота $Q_{пер}$, *кал/г*	ΔH, *кал/моль*	ΔS, *э. е.*
Крыса	226	40,8	16,8	1530	4,9
Щука	199	30,6	13,6	1240	4,1
Мерлан	—	21,5	9,7	880	3,0
Треска	155	20,0	8,2	750	2,6

Сильное возрастание Q, ΔH и ΔS с увеличением содержания иминокислотных остатков нельзя объяснить, предположив, что нативная структура тропоколлагена стабилизуется только внутримолекулярными водородными связями, так как иминокислотные остатки их не образуют. Предположение об определяющей роли гидрофобных взаимодействий тоже не спасает ситуацию — их исчезновение есть экзо-, а не эндотермический процесс. Электростатические взаимодействия не могут играть заметной роли, так как ΔH практически не зависит от pH. Авторы в соответствии с [162] предполагают, что тропоколлаген стабилизуется примыкающей к нему водной структурой. Действительно, известно, что удаление воды приводит к разрушению структуры коллагена, а ее добавление эту структуру восстанавливает [162]. Физические методы свидетельствуют о наличии упорядоченной водной структуры, связанной с коллагеном, что, в частности, было показано методом ядерного магнитного резонанса [164]. Структура коллагена, в которой добавочная водородная связь на каждый триплет образована молекулой воды, была недавно изучена [165].

Зависимость теплового эффекта денатурации от содержания иминокислотных остатков свидетельствует о лиией ной гетерогеиности тропоколлагена, о том, что молекула содержит участки с различиой степеиью упорядоченности. Это следует и из анализа кривой плавления. В работе [163] показано также, что сложный ход поглощения тепла, наблюдаемый в солевом растворе тропоколлагена, связан с некоторым предденатурационным конформационным переходом в условиях, близких к физиологическим (см. также [166]).

Много данных, отиосящихся к структуре и свойствам коллагена, содержится в обзоре [167]. Методы рентгеноструктурного аиализа фибриллярных систем описаны ниже (см. § 5.2).

Указаниая проблема ие может считаться решенной, — иесмотря на очень большое число работ, посвященных коллагену, мы еще не располагаем достаточно полной теорией его строения и свойств. Создание такой теории весьма актуально по двум причинам. Во-первых, коллаген — один из важнейших белков в организмах животных. Во-вторых, относительная (по сравнению с глобулярными белками) простота его состава и строения делает коллаген очень ценной моделью для изучения структуры и свойств белков в целом.

Обратимся теперь к другому важному фибриллярному белку — к кератину.

Макроскопические свойства кератинсодержащих биологических структур — волос, шерсти, перьев, рогов, ногтей, копыт — указывают на его высокую стабильность и нерастворимость. Исследование кератина показывает, что эти особенности определяются прежде всего большим числом поперечных дисульфидных связей между пептидными цепями. Кератин волос человека и кератин шерсти содержит 11—12% цистина, т. е. 3% серы.

Длина волокон кератина существенно зависит от содержания в них воды (именно на этом основан волосяной гигрометр). Эти волокна эластичны и поддаются растяжению. Астбюри провел классические исследования структуры кератина шерсти методом рентгенографии [168]. Его структура сильно меияется при растяжении. Для кератина нерастянутого волокна шерсти характерна периодичность 5,1 Å (α-кератии), при растяжении возиикает β-кератин, периодичность структуры уменьшается до 3,3 Å и появляются поперечные периоды, равные 4,65 и 9,7 Å. Астбюри считал, что для α-кератина характерны регулярные изгибы полипептидных цепей, которые выпрямляются при растяжении. Действительно, в дальнейшем было показано, что β-кератии имеет каноническую β-форму (см. [169]). α-кератин содержит много α-спирального вещества.

Кератин — сложиый белок. При разрыве дисульфидиых связей в результате его окисления или восстановления получается

растворимое вещество, из которого можно выделить две фракции — бедную и богатую серой. Фракция, бедная серой, состоит из фибриллярных молекул, способных образовывать волокна, а фракция, богатая серой, состоит из глобулярных молекул. Есть основания думать, что эти глобулярные молекулы служат сшивками в кератиновых волокнах, фибриллы которых построены из белка, содержащего мало серы. В результате рентгеновских и электронно-микроскопических исследований установлено, что основная единица волокна есть цилиндрическая микрофибрилла диаметром примерно в 75 Å, построенная из белков с малым содержанием серы. Регулярно уложенные участки этих белков являются α-спиралями, совместно скрученными попарно. На рис. 4.27 показана гипотетическая модель молекулярной организации α-кератина. Белок гетерогенен и состоит из двух главных компонент в отношении 2 : 1. Отдельные молекулы могут располагаться либо последовательно (рис. 4.27, *б*, *в*), либо параллельно друг другу (рис. 4.27, *г*). Спиральные участки молекул скручены либо попарно, либо в тройную сверхспираль. Опыт дает большие периоды вдоль волокна, равные 200 Å, что согласуется с моделями 4,27, *в* и *г*, но не с 4.27, *б*.

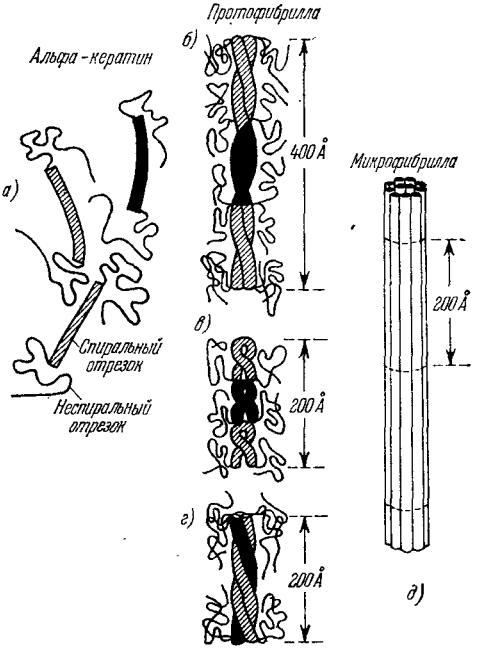


Рис. 4.27. Гипотетическая схема молекулярной организации α-кератина.

а) Отдельные молекулы двух основных компонент (они зачерчены и заштрихованы; последние — белки с низким содержанием серы); *б*), *в*), *г*) протофибриллы; *д*) микрофибрилла.

Микрофибрилла в целом состоит из 11 таких протофибрилл — двойных или тройных спиралей, причем две из них расположены в центре микрофибриллы, а девять — на ее периферии (рис. 4.27, *д*). Это отношение 9 : 2 очень характерно для ряда биологических надмолекулярных структур, построенных из фибриллярных биополимеров. Микрофибрилла имеет однородное строение. Длины спиральных участков, образующих протофибриллы, не меняются заметно от вида к виду, но состав

неспиральных участков сильно варьирует. Принципиальные различия в кератинах млекопитающих определяются способом упаковки микрофибрилл и количеством и составом богатой серой глобулярной компоненты, т. е. матрикса, скрепляющего микрофибриллы друг с другом. При набухании в воде свойства этого матрикса заметно изменяются.

β-кератин изучен значительно хуже. Его не удается разделить на две указанные фракции. Примерно половина β-кератина имеет β-структуру, вторая половина не упорядочена. Микрофибриллы диаметром около 35 Å построены из двух переплетенных молекулярных нитей. Каждая нить содержит по четыре молекулы на период длиною в 95 Å. Дальнейшие подробности о структуре кератинов см. в [16, 170, 171].

Кератины представляют специальный интерес для биофизики, так как они являются хорошей моделью сложной надмолекулярной ориентированной структуры. Проблема связи этой структуры и ее свойств с первичной структурой соответствующих белков еще далека от своего решения.

Следует упомянуть еще об одном фибриллярном белке — о фиброине шелка. Фиброин имеет сравнительно простой аминокислотный состав и в этом отношении сходен скорее с коллагеном, чем с кератином. Он содержит 42,8% Гли, 33,5% Ала, 16,3% Сер и 11,9% Тир. Остальные аминокислоты присутствуют в малых количествах или отсутствуют (Цис, Мет). Рентгенограммы фиброина сходны с рентгенограммами β-кератина, основная конформация фиброина — β-форма.

Структура фиброина сходна со структурой полипептида $(\text{Гли}-\text{Ала})_n$ (шелк *Bombyx mori*) и полиаланина (шелк *Lyssax*). Характерные для фиброина шелка последовательности Гли — Ала — Сер — Тир, большие участки состоят из сочленений Гли — Ала.

Таким образом, специализированные структурные функции фибриллярных белков определяются их специфическим ориентированным строением. Биологическая роль таких белков не только защитная, как в случае кератина и фиброина. Выше уже указывалось, что коллаген необходим для остеогенеза, а миозин обладает ферментативной активностью — он катализирует гидролиз АТФ.

Литература

1. *И. М. Лифшиц*, ЖЭТФ **55**, 2408 (1968).
2. *П. Флори*, Статистическая механика цепных молекул, «Мир», 1971.
3. *V. Sasisekharan*, in «Collagen», ed. N. Ramanathan, Intersci. Publ., 1962.
4. *H. Scheraga*, Adv. Phys. Org. Chem. **6**, 103 (1968).
5. *L. Pauling, R. Corey, H. Branson*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **37**, 205 (1951).
6. *L. Pauling, R. Corey*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **37**, 241, 729 (1951).

7. *F. Crick, A. Rich. Nature* **176,** 780 (1955).
8. *А. Рич*, в сб. «Современные проблемы биофизики», т. 1, ИЛ, 1961.
9. Conformations of Biopolymers, vol. I., ed. G. Ramachandran, Acad. Press, 1967.
10. *D. Brant, P. Flory*, J. Amer. Chem. Soc. **87,** 663, 2791 (1965).
11. *G. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan*, J. Mol. Biol. **7,** 95 (1963).
12. *C. Ramakrishnan, G. Ramachandran*, Biophys. J. **5**, 909 (1965).
13. *S. Leach, G. Nemethy, H. Scheraga*, Biopolymers **3,** 591 (1965).
14. *R. Scott, H. Scheraga*, J. Chem. Phys. **45,** 2091 (1966).
15. *T. Ooi, R. Scott, G. Vanderkooi, H. Scheraga*, J. Chem. Phys. **46,** 4410 (1967).
16. *D. Poland, H. Scheraga*, Biochemistry **6,** 3791 (1967).
17. *K. Gibson, H. Scheraga*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **58,** 420 (1967).
18. *S. Lifson, I. Oppenheimer*, J. Chem. Phys. **33,** 109 (1960).
19. *D. Brant, W. Miller, P. Flory*, J. Mol. Biol. **23,** 47 (1967).
20. *G. Ramachandran, V. Sasisekharan*, Adv. Protein Chem. **23,** 283 (1968).
21. *Г. Г. Гельман*, Квантовая химия, ГТТИ, М. — Л., 1937.
22. *R. Feynman*, Phys. Rev. **56,** 340 (1939).
23. *Д. Гиршфельдер, Ч. Кертисс, Р. Берд*, Молекулярная теория газов и жидкостей, ИЛ, 1961.
24. *F. London*, Trans. Faraday Soc. **33,** 8 (1937).
25. *H. Margenau*, Rev. Mod. Phys. **11,** 1 (1939).
26. *J. Slater, J. Kirkwood*, Phys. Rev. **37,** 682 (1931).
27. *А. И. Китайгородский*, Органическая кристаллохимия, Изд-во АН СССР, 1955.
28. *W. Latimer, W. Rodebush*, J. Amer. Chem. Soc. **42,** 1419 (1920).
29. *Д. Пиментел, О. Мак-Клеллан*, Водородная связь, «Мир», 1964.
30. *Б. И. Степанов*, Ж. физ. хим. **19,** 507 (1945); **20,** 407 (1946).
31. *М. В. Волькенштейн, М. А. Ельяшевич, Б. И. Степанов*, Ж. физ. хим. **24,** 1158 (1950).
32. *Н. Д. Соколов*, УФН **57,** 205 (1955).
33. *G. Bradley, M. Kasha*, J. Amer. Chem. Soc. **77,** 4462 (1955).
34. *C. Coulson*, Research **10,** 149 (1957).
35. *E. Wollen, W. Davidson, C. Shull*, Phys. Rev. **75,** 1348 (1949).
36. *J. Bernal, R. Fowler*, J. Chem. Phys. **1,** 515 (1933).
37. *M. Magat*, Ann. de Phys. **6,** 108 (1936).
38. *C. Coulson, U. Danielsson*, Ark. Fys. **8,** 239, 245 (1954).
39. *H. Tsubomura*, Bull. Chem. Soc. Japan **27,** 445 (1954).
40. *E. Verwey*, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **60,** 887 (1941).
41. *D. Eisenberg, W. Kautzmann*, The Structure and Properties of Water, Clarendon Press, 1969.
42. *L. Pauling*, J. Amer. Chem. Soc. **57,** 2680 (1935).
43. *S. Peterson, H. Levy*, Acta Crystall. **10,** 70 (1957).
44. *Л. Онзагер, М. Дюпюи*, в сб. «Термодинамика необратимых процессов», ИЛ, 1962.
45. *J. Nagle*, J. Math. Phys. **7,** 1484 (1966).
46. *A. Narten, M. Danford, H. Levy*, Disc. Faraday Soc. **43,** 97 (1967).
47. *G. Nemethy, H. Scheraga*, J. Chem. Phys. **36,** 3382, 3401 (1962).
48. *О. Я. Самойлов*, Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов. Изд-во АН СССР, 1957.
49. *J. Pople*, Proc. Roy. Soc. **A205,** 163 (1951).
50. *J. Bernal*, Proc. Roy. Soc. **A280,** 299 (1964).
51. *G. Walrafen*, J. Chem. Phys. **44,** 1546 (1966); **48,** 244 (1968).
52. *G. Nemethy, H. Scheraga*, J. Chem. Phys. **41,** 680 (1964).
53. *G. Oster, J. Kirkwood*, J. Chem. Phys. **11,** 175 (1943).
54. *M. Eigen*, Angew. Chem. (Internat. edn) **3, 1 (1964).**

55. *П. Доти* в сб. «Современные проблемы биофизики», т. 1, ИЛ, 1961.
56. *P. Doty*, Coll. Czechoslov. Comm., Special issue **22**, 5 (1957).
57. *B. Zimm, J. Bragg*, J. Chem. Phys. **28**, 1246 (1958).
58. *J. Gibbs, E. Di Marzio*, J. Chem. Phys. **28**, 1 (1958); **30**, 271 (1959).
59. *S. Rice, A. Wada, E. Geiduschek*, Disc. Faraday Soc. **25**, 130 (1958).
60. *T. Hill*, J. Chem. Phys. **30**, 383 (1959).
61. *L. Peller*, J. Phys. Chem. **63**, 1194 (1959).
62. *Т. М. Бирштейн, О. Б. Птицын*, Конформации макромолекул, «Наука», 1964.
63. *D. Poland, H. Scheraga*, Theory of Helix-Coil Transition in Biopolymers, Acad. Press, 1970.
64. *B. Zimm, J. Bragg*, J. Chem. Phys. **31**, 526 (1959).
65. *S. Lifson, A. Roig*, J. Chem. Phys. **34**, 1963 (1961).
66. *B. Zimm, P. Doty, K. Iso*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **45**, 1601 (1966).
67. *B. Zimm, S. Rice*, Mol. Phys. **3**, 391 (1960).
68. *М. В. Волькенштейн, С. Н. Фишман*, Биофизика **11**, 956 (1966); **12**, 14 (1967).
69. *S. Lowey*, J. Biol. Chem. **240**, 2421 (1965).
70. *P. Doty, K. Imahori, E. Klemperer*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **44**, 424 (1958).
71. *E. Blout, M. Idelson*, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 4909 (1958).
72. *Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц*, Статистическая физика, «Наука», 1964.
73. *Т. М. Бирштейн, А. М. Ельяшевич, А. М. Скворцов*, Мол. биол. **5**, 78 (1971).
74. *Е. В. Ануфриева* и др., Биофизика **10**, 918 (1965); J. Polymer Sci. **16**, 3533 (1968).
75. *P. Flory*, Proc. Roy. Soc. **A234**, 60 (1956).
76. *А. М. Ельяшевич, А. М. Скворцов*, Мол. биол. **5**, 204 (1971).
77. *Д. Бернал*, Труды симпозиума «Возникновение жизни на Земле», Изд-во АН СССР, 1961.
78. *J. Yang*, Adv. Protein Chem. **16**, 323 (1961).
79. *J. Klotz*, Brookhaven Symposia Theor. Biol. **13**, 25 (1960).
80. *J. Klotz, J. Franklin*, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 3461 (1962).
81. *О. Б. Птицын, А. М. Скворцов*, Биофизика **10**, 909 (1965).
82. *С. Е. Бреслер, Д. Л. Талмуд*, ДАН СССР **43**, 326, 367 (1944).
83. *С. Е. Бреслер*, Биохимия **14**, 180 (1949).
84. *П. А. Ребиндер*, Поверхностно-активные вещества, Изд-во АН СССР, 1961.
85. *В. А. Белицер, Е. Л. Ходорова*, Укр. биохим. ж. **21**, 34 (1949).
86. *A. Kurono, K. Hamaguchi*, J. Biochem. **56**, 432 (1962).
87. *W. Kauzmann*, in «The Mechanism of Enzyme Action», John Hopkins Univ. Press, 1954; Adv. Protein Chem. **14**, 1 (1959).
88. *E. Goddard, C. Hoeve, G. Benson*, J. Phys. Chem. **61**, 593 (1957).
89. *J. Butler*, Trans. Faraday Soc. **33**, 235 (1937).
90. *H. Frank, M. Evans*, J. Chem. Phys. **13**, 507 (1945).
91. *F. Johnson, H. Eyring, M. Polissar*, The Kinetic Basis of Molecular Biology, Wiley, 1954.
92. *B. Jacobson, W. Anderson, J. Arnold*, Nature **173**, 772 (1954).
93. *А. Сцент-Дьёрдьи*, Биоэнергетика, Физматгиз, 1960.
94. *M. Klotz*, Science **128**, 815 (1958).
95. *H. Scheraga*, J. Phys. Chem. **65**, 1071 (1961); Ber. Bunsengesellschaft Phys. Chem. **68**, 838 (1964).
96. *G. Nemethy, H. Scheraga*, J. Phys. Chem. **66**, 1773 (1962).
97. *H. Scheraga, G. Nemethy, I. Steinberg*, J. Biol. Chem. **237**, 2506 (1962).
98. *I. Steinberg, H. Scheraga*, J. Biol. Chem. **238**, 172 (1963).
99. *D. Poland, H. Scheraga*, Biopolymers **3**, 283, 305 (1965).
100. *M. Bixon, H. Scheraga, S. Lifson*, Biopolymers **1**, 419 (1963).

101. *О. Б. Птицын*, Усп. совр. биол. **63**, 3 (1967).
102. *G. Nemethy, I. Steinberg, H. Scheraga*, Biopolymers **1**, 43 (1963).
103. *H. Fisher*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **51**, 1285 (1964).
104. *H. Fisher*, Biochim. Biophys. Acta **109**, 544 (1965).
105. *G. Tanford*, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 4240 (1962); **86**, 2050 (1964).
106. *P. Dunnill*, Biophys. J. **8**, 865 (1968).
107. *Д. Брандтс*, в сб. «Структура и стабильность биологических макромолекул», «Мир», 1973.
108. *R. Dickerson*, in «The Proteins», vol. 2, ed. H. Neurath, Acad. Press, 1964.
109. *J. Kendrew* a. o., Nature **190**, 663 (1961).
110. *M. Perutz*, J. Mol. Biol. **13**, 646 (1965).
111. *M. Perutz, J. Kendrew, H. Watson*, J. Mol. Biol. **13**, 669 (1965).
112. *H. Muirhead, J. Cox, L. Mazzarella, M. Perutz*, J. Mol. Biol. **18**, 117 (1967).
113. *W. Bolton, J. Cox, M. Perutz*, J. Mol. Biol. **33**, 283 (1968).
114. *J. Kendrew*, Brookhaven Symposia Theor. Biol. **15**, 216 (1962); Ber. Bunsengesellschsaft Phys. Chem. **68**, 721 (1964).
115. *G. Fasman*, in «Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins», ed. M. Stahmann, Univ. Wisconsin Press, 1962.
116. *G. Fasman, E. Bodenheimer, C. Lidblow*, Biochemistry **3**, 155, 1665 (1964).
117. *H. Sage, G. Fasman*, Biochemistry **5**, 286 (1966).
118. *R. Kulkarni, E. Blout*, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 3971 (1962).
119. *N. Lotan, A. Yaron, A. Berger*, Biopolymers **4**, 365 (1966).
120. *W. Gratzer, P. Doty*, J. Amer. Chem. Soc. **85**, 1193 (1963).
121. *K. Gibson, H. Scheraga*, Physiol. Chem. a. Phys. **1**, 109 (1969).
122. *J. Schellman, C. Schellman*, in «The Proteins», vol. 2, ed. H. Neurath, Acad. Press, 1964.
123. *K. Gibson, H. Scheraga*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **58**, 420, 1317 (1967).
124. *N. Go, M. Go, H. Scheraga*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **59**, 1030 (1968).
125. *J. Brandts*, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 4291 (1964); **87**, 2759 (1965).
126. *J. Brandts, L. Hunt*, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 4826 (1967).
127. *J. Schellman*, C. R. Traveaux Lab. Carlsberg, Ser. Chim. **29**, 223, 230 (1955); J. Phys. Chem. **62**, 1485 (1958).
128. *П. Л. Привалов*, Биофизика **8**, 3 (1965); **15**, 206 (1970).
129. *L. Riddiford*, J. Biol. Chem. **241**, 2792 (1966).
130. *G. Tanford*, Adv. Protein Chem. **23**, 122 (1968); **24**, 1 (1970).
131. *G. Tanford*, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 2050 (1964).
132. *М. Жоли*, Физическая химия денатурации белков, «Мир», 1968.
133. *H. Scheraga*, in «Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins», ed. M. Stahmann, Univ. Wisconsin Press, 1962.
134. *J. Schellman*, C. R. Traveaux Lab. Carlsberg, Ser. Chim. **30**, 450 (1958).
135. *T. Takagi, T. Isemura*, J. Biochem. **52**, 314 (1962).
136. *A. Imanishi, K. Kekiuchi, T. Isemura*, J. Biochem. **54**, 89 (1963).
137. *Х. Анфинсен*, Труды 5-го Международного биохим. конгресса, симпозиум IV, Изд-во АН СССР, 1961.
138. *E. Haber, C. Anfinsen*, J. Biol. Chem. **236**, 422 (1961).
139. *C. Epstein, C. Anfinsen*, J. Biol. Chem. **237**, 2175 (1962).
140. *K. Imai, T. Takagi, T. Isemura*, J. Biochem. **53**, 1 (1963).
141. *A. Guzzo*, Biophys. J. **5**, 809 (1965).
142. *М. В. Волькенштейн*, Физика ферментов, «Наука», 1967.
143. *J. Prothero*, Biophys. J. **3**, 367 (1966).
144. *M. Schiffer, A. Edmunson*, Biophys. J. **7**, 121 (1967).
145. *D. Phillips*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **57**, 484 (1967).
146. *P. Periti, G. Quagliarotti, A. Liquori*, J. Mol. Biol. **24**, 313 (1967).
147. *О. Б. Птицын*, Мол. биол. **3**, 627 (1969); J. Mol. Biol. **42**, 501 (1969); Усп. совр. биол. **69**, 26 (1970).

148. *О. Б. Птицын, А. В. Финкельштейн*, ДАН СССР **195** (1970); Биофизика **15**, 757 (1970).
149. *D. Kotelchuk, H. Scheraga*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **61**, 1163 (1968); **62**, 14 (1969); **63**, 615 (1969); **65**, 810 (1970).
150. *R. Pain, B. Robson*, Nature **227**, 62 (1970).
151. *B. Лим*, ДАН СССР **203**, 480 (1972); Биофизика **19**, 366 (1974).
152. *B. Robson, R. Pain*, J. Mol. Biol. **58**, 237 (1971).
153. *Н. Г. Есипова, В. Г. Туманян*, Мол. биол. **6**, 840 (1972).
154. *W. Grassman* a. o., Z. Physiol. Chem. **323**, 48 (1961).
155. *G. Ramachandran, G. Kartha*, Proc. Indian Acad. Sci. **42**, 215 (1955); Nature **174**, 269 (1954); **176**, 593 (1955); **177**, 710 (1956).
156. *G. Ramachandran, V. Sasisekharan*, Biochim. Biophys. Acta **109**, 314 (1965).
157. *A. Rich. F. Crick*, J. Mol. Biol. **3**, 483 (1961).
158. *М. И. Миллионова, Н. С. Андреева*, Биофизика **3**, 259 (1958); **4**, 374 (1959).
159. *Н. С. Андреева* и др., Биофизика **6**, 244 (1961).
160. *A. Miller, J. Wray*, Nature **230**, 437 (1971).
161. *В. Г. Туманян*, Мол. биол. **5**, 499 (1971).
162. *Н. Г. Есипова, Ю. Н. Чиргадзе*, в сб. «Состояние и роль воды в биологических системах», «Наука», 1967.
163. *П. Л. Привалов, Е. И. Тиктопуло*, Biopolymers **9**, 127 (1970).
164. *H. Berendsen, C. Michelsen*, Federation Proc. **25**, 998 (1966); Ann. N. Y. Acad. Sci. **125**, 365 (1965).
165. *G. Ramachandran, R. Chandrasekharan*, Biopolymers **6**, 1649 (1968).
166. *R. Rigby*, in «Symposium on Fibrous Proteins», Butterworths, 1967.
167. *W. Harrington, P. von Hippel*, Adv. Protein Chem. **16**, 1 (1961).
168. *W. Astbury*, Abv. Enzymol. **3**, 63 (1943).
169. *R. Fraser*, Sci. American **221**, № 2, 87 (1969).
170. *H. Lundgren, W. Ward*, in «Ultrastructure of Protein Fibers», ed. R. Borasky, Acad. Press, 1963.
171. *W. Crewther, R. Fraser, F. Lennox, H. Lindley*, Adv. Protein Chem. **20**, 191 (1965).
172. *Ю. П. Сырников*, Ж. структ. хим. **7**, 15, 665 (1966); Материалы конференции по тепловому движению в жидкостях, Самарканд, 1969; в сб. «Структура и роль воды в живом организме», т. 3, изд. ЛГУ, 1970.
173. *A. Rahman, F. Stillinger*, J. Chem, Phys. **55**, 3336 (1971).
174. *Г. Н. Саркисов, В. Г. Дашевский*, Ж. структ. хим. **13**, 199 (1972).
175. *Г. Н. Саркисов, М. И. Дахис, Г. Г. Маленков, В. Г. Дашевский*, ДАН СССР **205**, 638 (1972).
176. *Г. Н. Саркисов, Г. Г. Маленков, В. Г. Дашевский*, Ж. структ. хим. **14**, 3 (1973).
177. *В. Г. Дашевский*, Конформации органических молекул, «Химия», 1974.
178. *И. М. Лифшиц, А. Ю. Гросберг*, ЖЭТФ **65**, 2403 (1973).
179. *Д. А. Денисов, Л. Н. Дроздов-Тихомиров, Д. А. Григорьева*, J. Theor. Biol. **41**, 431 (1973).
180. *С. Г. Галактионов*, Исследование пространственной молекулярной структуры белков и пептидов, Докторская диссертация, Минск, 1973.
181. *О. Б. Птицын*, ДАН СССР **210**, 1213 (1973); Вестник АН СССР № 5, 57 (1973).
182. *О. Б. Птицын, А. А. Рашин*, A model of self-organization of a myoglobin molecule, Preprint, Acad. Sci. USSR, Institute of Protein Research, Poustchino-on-Oka, 1973.

РЕНТГЕНОГРАФИЯ, ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

§ 5.1. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ

Современное естествознание пользуется двумя главными методами для изучения строения вещества. Эти методы — химия и оптика в широком смысле слова, т. е. изучение взаимодействия вещества со светом во всем допустимом диапазоне длин электромагнитных волн — от рентгеновских до радиоволн. Химия расшифровывает первичную структуру белковых цепей, а также структуру функциональных центров белковых глобул, в частности активных центров ферментов (см. гл. 6). Однако химия (биохимия) как таковая не может установить пространственное строение молекулы белка или нуклеиновой кислоты.

Рентгенография дает прямую информацию о строении вещества, о расположении атомов в молекулах. Рентгеновские лучи, т. е. электромагнитные волны с длиной порядка 1 Å, рассеиваются на электронных оболочках атомов. Интерференция волн, рассеянных веществом, приводит к возникновению дифракционной картины. При рассеянии на кристалле можно рассматривать дифракцию как «отражение» рентгеновских лучей плоскостями кристаллической решетки. Дифракция наблюдается, если рассеянные волны находятся в фазе, т. е. разность хода равна целому числу n волн. Если расстояние между плоскостями равно d, то условие дифракции (отражения) дается известной формулой Брэгга — Вульфа

$$n\lambda = 2d \sin \theta, \qquad (5,1)$$

где θ — угол между направлением падающего луча и кристаллической плоскостью.

Дифракция рентгеновских лучей на кристаллах происходит потому, что периоды решетки, межатомные расстояния d в решетке (1—4 Å) имеют тот же порядок величины, что и длины волн λ (чаще всего пользуются K_α-излучением Cu с $\lambda = 1{,}54$ Å).

Допустим, что рассеивающая система состоит из двух центров (атомов), находящихся на расстоянии r друг от друга (рис. 5.1). Плоская волна, падающая на центры, возбуждает их электроны, и сами центры становятся источниками вторичных

сферических волн (ср. стр. 156). Электрическое поле падающей волны есть

$$\mathbf{E} = \mathbf{A} \exp[i(\mathbf{kr} + \varphi)], \tag{5,2}$$

где $\mathbf{A}$ — амплитуда волны, φ — начальная фаза, $\mathbf{k}$ — волновой вектор, имеющий направление распространения волны, направление луча, численно равный $|\mathbf{k}| = 2\pi/\lambda$. Найдем разность хода волн, рассеянных двумя центрами, показанными на рис. 5.1. Поместив начало координат в один из них, получаем

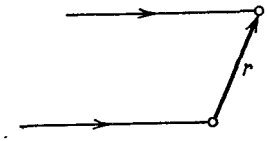


Рис. 5.1. Схема двухцентровой рассеивающей системы.

$$\mathbf{kr} - \mathbf{k}_0\mathbf{r} = \mathbf{sr}. \tag{5,3}$$

Длина волны λ не меняется; вектор $\mathbf{s} = \mathbf{k} - \mathbf{k}_0$ отличен от нуля, так как различны направления векторов $\mathbf{k}$ и $\mathbf{k}_0$. Если A — амплитуда падающей волны, то рассеивающий центр в точке $\mathbf{r}$ дает волну

$$E' = Af \exp[i(\mathbf{sr})], \tag{5,4}$$

где f — рассеивающая сила центра, зависящая от его электронной плотности. Вектор $\mathbf{s}$ перпендикулярен отражающей плоскости. Нетрудно показать, что

$$s = 4\pi \sin\theta/\lambda. \tag{5,5}$$

Дифракция на системе из N рассеивающих центров характеризуется суммой выражений (5,4). Величина

$$F(\mathbf{s}) = \sum_{j=1}^{N} f_j \exp[i(\mathbf{sr}_j)] \tag{5,6}$$

называется *структурной амплитудой рассеяния*. Если рассеивающие центры распределены непрерывно, сумма (5, 6) заменяется интегралом типа интеграла Фурье

$$F(\mathbf{s}) = \int \rho(\mathbf{r}) \exp[i(\mathbf{sr})]\, d\tilde{V}_r, \tag{5,7}$$

где $\rho(\mathbf{r})$ — средняя по времени электронная плотность системы, $d\tilde{V}_r$ — элемент рассеивающего объема.

Если системой является изолированный сферически симметричный атом, то последний интеграл приобретает вид

$$f(s) = \int_0^\infty 4\pi r^2 \rho(r) \frac{\sin(sr)}{sr}\, dr. \tag{5,8}$$

Это выражение для рассеивающей силы атома непосредственно зависит от распределения электронной плотности $\rho(r)$. Величина $f(s)$ называется *атомным* или *структурным фактором*. Ее значения для любых атомов при различных s табулированы. При $s \to 0$, т. е. при нулевом угле рассеяния,

$$f(0) = \int_0^\infty 4\pi r^2 \rho(r)\, dr = N \qquad (5,9)$$

(N — число электронов в атоме). Рассеяние рентгеновских лучей тем сильнее, чем больше атомный номер, для водорода оно наименьшее.

Наиболее богатая дифракционная картина и соответственно наиболее детальная информация о межатомных расстояниях получается при исследовании кристаллов. В кристалле атомы расположены периодично; электронная плотность $\rho(x, y, z)$ является периодической функцией координат x, y, z. Интеграл Фурье, аналогичный (5,7), имеет в этом случае вид

$$F_{hkl} = \frac{1}{abc} \int_0^a \int_0^b \int_0^c \rho(x, y, z) \exp[2\pi i (hx/a + ky/b + lz/c)]\, dx\, dy\, dz =$$

$$= \frac{1}{V_0} \int \rho(\mathbf{r}) \exp[2\pi i (\mathbf{Hr})]\, d\tilde{V}_r, \qquad (5,10)$$

где a, b, c — периоды кристаллической решетки, т. е. длины ребер элементарной ячейки, V_0 — объем ячейки. Вектор $\mathbf{H} = \mathbf{s}/2\pi$ имеет компоненты h/a, k/b, l/c (h, k, l — целые числа). При рассеянии периодической структурой амплитуда рассеяния отлична от нуля лишь при этих значениях компонент вектора $\mathbf{H}$. Для составляющей вектора разности хода $\mathbf{s}$ в направлении x имеем, согласно (5,5), $2\pi h/a = 4\pi \sin\theta/\lambda$, т. е. мы вновь получаем условие (5,1) в форме

$$h\lambda = 2a \sin\theta.$$

В общем случае, если вектор $\mathbf{r}$ равен одному из трех осевых векторов $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$, $\mathbf{c}$, мы получим три условия Лауэ

$$\mathbf{H}_{hkl}\mathbf{a}/h = 1, \quad \mathbf{H}_{hkl}\mathbf{b}/k = 1, \quad \mathbf{H}_{hkl}\mathbf{c}/l = 1. \qquad (5,11)$$

Векторы $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$, $\mathbf{c}$ характеризуют структуру кристаллической решетки. Целые числа h, k, l (*миллеровские индексы*) определяют все возможные кристаллические плоскости, от которых «отражаются» рентгеновские лучи. Соответствующие межплоскостные расстояния d_{hkl} различны для разных индексов. На рис. 5.2 показаны сечения различных систем отражающих плоскостей в ортогональной кристаллической решетке.

Компоненты векторов $\mathbf{H}_{hkl}$ имеют размерность [длина]$^{-1}$; эти векторы заданы в обратном пространстве. Распределение точек, в которых амплитуда рассеяния отлична от нуля и равна F_{hkl}, периодично в этом пространстве и образует в нем *обратную*

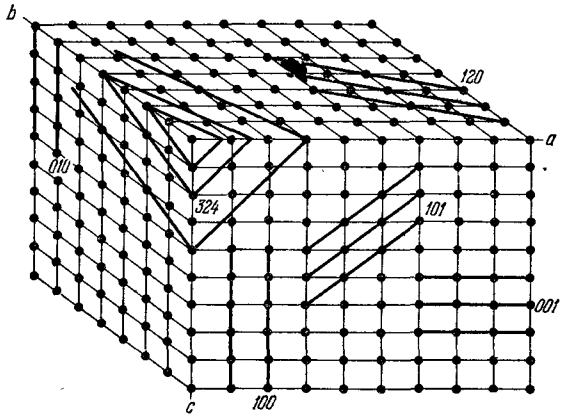


Рис. 5.2. Сечения отражающих плоскостей в ортогональной кристаллической решетке.

решетку, которой удобно пользоваться в расчетах. Каждый узел обратной решетки *hkl* характеризуется своим вектором

$$\mathbf{H}_{hkl} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*. \qquad (5,12)$$

Векторы $\mathbf{a}^*$, $\mathbf{b}^*$, $\mathbf{c}^*$ удовлетворяют условиям

$$\mathbf{a}^*\mathbf{b} = \mathbf{a}^*\mathbf{c} = \mathbf{b}^*\mathbf{a} = \mathbf{b}^*\mathbf{c} = \mathbf{c}^*\mathbf{a} = \mathbf{c}^*\mathbf{b} = 0 \qquad (5,13)$$

и

$$\mathbf{a}^*\mathbf{a} = \mathbf{b}^*\mathbf{b} = \mathbf{c}^*\mathbf{c} = 1. \qquad (5,14)$$

Условия Лауэ (5,11) непосредственно следуют из (5,12)—(5,14). Если решетка ортогональна, то $a^* = 1/a$, $b^* = 1/b$, $c^* = 1/c$. Из приведенных соотношений следует, что

$$|\mathbf{H}_{hkl}| = 1/d_{hkl},$$

а направление вектора $\mathbf{H}_{hkl}$ перпендикулярно к плоскостям кристаллической решетки с миллеровскими индексами h, k, l. Для геометрической интерпретации условий отражения (5,11) нужно построить обратную решетку и описать в ней сферу радиуса $1/\lambda$ так, чтобы эта сфера (называемая *сферой отражения* или *сферой Эвальда*) пересекла начало координат $h, k, l = 0, 0, 0$, а радиус, проведенный из центра сферы в начало координат, совпал с на-

правлением падающего луча $\mathbf{k}_0$ (рис. 5.3). Если на поверхности сферы окажется один из узлов обратной решетки h, k, l, то вектор, соединяющий этот узел с узлом 0, 0, 0, и будет вектором $\mathbf{H}_{hkl}$. В соответствии с (5,3) вектор, проведенный из центра сферы Эвальда в узел h, k, l, и окажется волновым вектором «отраженного» луча $\mathbf{k}$. Координаты узла h, k, l указывают индексы отражающей плоскости. Следовательно, только узлы, находящиеся на поверхности сферы, отвечают условиям дифракции.

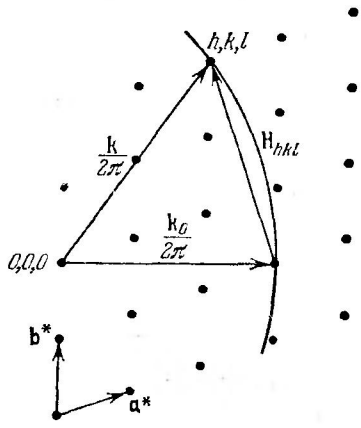


Рис. 5.3. Сфера Эвальда.

Узлы обратной решетки обычных низкомолекулярных кристаллов расположены редко, так как малы периоды решетки a, b c и соответственно велики периоды a^*, b^*, c^*. Поэтому для увеличения числа пересечений сферы Эвальда с узлами приходится пользоваться различными длинами волн λ, вращать или колебать кристалл (метод вращающегося или колеблющегося кристалла). Напротив, периоды в монокристаллах белков велики, и поэтому вероятность пересечения сферы Эвальда и узлов обратной решетки значительна. Неподвижный монокристалл белка в монохроматическом рентгеновском излучении дает множество дифракционных максимумов. На рис. 5.4 показана рентгенограмма кристаллического миоглобина кашалота. Рентгенограмма получается на фотопленке, но ионизационые методы регистрации обладают значительно большей точностью и чувствительностью.

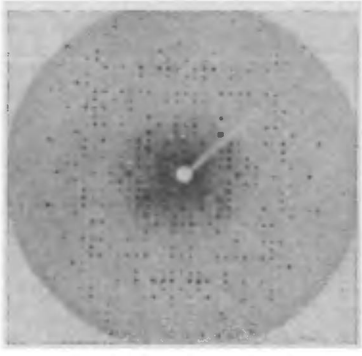


Рис. 5.4. Рентгенограмма миоглобина кашалота.

По существу, рентгенограмма представляет собой изображение обратной решетки кристалла. Отраженные лучи направлены вдоль образующих конуса с вершиной в центре сферы Эвальда и пересекаются с фотопленкой по кривым второго порядка (рис. 5.5). Для получения неискаженных изображений развиты методы, в которых благодаря синхронному движению кристалла и пленки плоскость последней

остается все время параллельной соответствующей плоскости обратной решетки.

В результате анализа рентгенограммы устанавливается распределение электронной плотности в кристалле. Перепишем

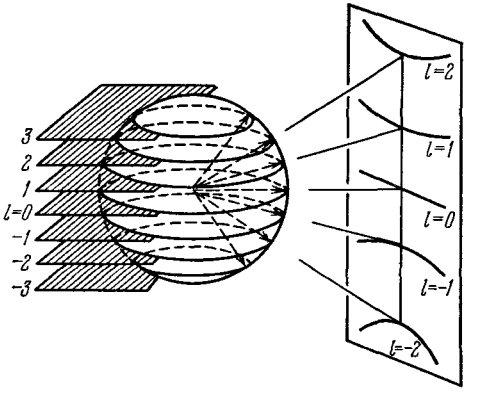


Рис. 5.5. Слоевые плоскости в обратном пространстве, сечение ими сферы Эвальда и слоевые линии на рентгенограмме.

интеграл (5,7), выражающий структурную амплитуду, в виде

$$F(s_x, s_y, s_z) = \int_{-\infty}^{+\infty}\int\int \rho(x, y, z)\exp[i(s_x x + s_y y + s_z z)]\,dx\,dy\,dz. \quad (5,15)$$

Зная функцию $F(s_x, s_y, s_z)$, можно найти $\rho(x, y, z)$ с помощью обратного преобразования Фурье

$$\rho(x, y, z) = \int_{-\infty}^{+\infty}\int\int F(s_x, s_y, s_z)\exp[-i(s_x x + s_y y + s_z z)]\,ds_x\,ds_y\,ds_z, \quad (5,16)$$

или

$$\rho(\mathbf{r}) = \int F(\mathbf{s})\exp[-i(\mathbf{sr})]\,d\tilde{V}_{\mathbf{s}}. \quad (5,17)$$

Если ρ — периодическая функция, т. е. мы имеем дело с кристаллом, то аналогичным образом преобразуется интеграл (5,10) или соответствующая сумма

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V}\sum_h\sum_k\sum_l F_{hkl}\exp[-2\pi i(hx/a + ky/b + lz/c)]. \quad (5,18)$$

Опыт дает значения модулей структурных амплитуд F, но не их фазы. В действительности $F(\mathbf{s})$ — величина комплексная и

$$F = |F|\exp(i\varphi).$$

Не зная фаз, мы не можем установить структуру объекта. Как пишет Перутц [1], «рентгенограмма кристалла оказывается иероглифом без ключа для его расшифровки». Метод определения фаз, развитый Перутцом применительно к белкам, состоит в том, что к молекулам, образующим кристалл, присоединяют тяжелые атомы, например атомы ртути. Тяжелый атом, т. е. атом, имеющий большую силу рассеяния, вызывает заметные изменения интенсивности дифракционных пятен. По разности амплитуд в отсутствие и в присутствии тяжелого атома можно определить фазу — тяжелый атом берется за исходную точку. Применение производных белка, содержащих несколько тяжелых атомов, позволяет решить проблему фаз однозначно. Необходимым условием при этом является полное сохранение структуры белкового кристалла при введении тяжелых атомов. Иными словами, здесь мы имеем дело с методом изоморфного замещения — ртутные производные белка дают кристаллы, изоморфные кристаллу незамещенного белка (см. [2]).

Из опыта мы получаем интенсивность рассеянного излучения

$$J(\mathbf{s}) = F(s)\,F^*(s),$$

и потому функцией, непосредственно связывающей дифракционную картину со структурой кристалла, является не (5,18), а

$$Q(\mathbf{r}) = \frac{1}{V}\sum_h\sum_k\sum_l |F_{hkl}|^2 \cos 2\pi(hx/a + ky/b + lz/c). \quad (5,19)$$

Эта функция, называемая *функцией Паттерсона*, является фурье-образом интенсивности рассеяния. Вектор, соединяющий два любых атома в выражении для $\rho(\mathbf{r})$ (5,18), изображается в функции $Q(\mathbf{r})$ вектором той же ориентации, отложенным из начала координат. Функция Паттерсона центросимметрична, т. е. каждому вектору $\mathbf{r}_{ij}$ в ней соответствует еще один вектор $\mathbf{r}_{ji}$ равной величины, но противоположного направления. Функция Паттерсона имеет максимумы при условиях $x = x_i - x_j$, $y = y_i - y_j$, $z = z_i - z_j$, где x_i, y_i, z_i и x_j, y_j, z_j — координаты каких-либо двух атомов в элементарной ячейке. Величины максимумов пропорциональны произведению атомных номеров N_iN_j и, если расстояния r_{ij} повторяются в структуре, — числу этих повторений. Если атом i — тяжелый, то для него N_i велико и велики соответствующие максимумы. Поэтому функция Паттерсона особенно удобна для установления координат тяжелых атомов в кристалле.

Рентгеноструктурный анализ сводится к нахождению распределения электронной плотности ρ по измеренным интенсивностям дифракционных максимумов с помощью рядов Фурье. Функция плотности $\rho(x, y, z)$ изображается в виде «геодезических» карт,

на которых линии соединяют точки с одинаковыми значениями ρ. Карты являются проекциями трехмерного распределения плотности на плоскость. Максимумы плотности отвечают положениям атомов. Карты — это своего рода «срезы» молекулы. Ввиду малости структурного фактора атомы водорода непосредственно «не видны» на карте электронной плотности. Их положение можно установить по искривлениям изолиний или с помощью специального разностного фурье-синтеза.

До сороковых годов рентгенография сравнительно простых соединений подтверждала их структуру, установленную химическими методами, и давала количественные сведения о межатомных расстояниях. В 1944 г. Ходжкин впервые расшифровала структуру пенициллина, которую химикам не удавалось определить. Молекула пенициллина содержит 23 атома кроме атомов водорода. Далее Ходжкин установила структуру витамина B_{12}. Здесь были определены координаты уже 93 атомов. В дальнейшем рентгенографию начали применять в исследованиях наиболее сложных молекул — молекул белков. Основоположником этого важнейшего направления молекулярной биофизики был Бернал, и крупнейшие достижения в изучении белков принадлежат кембриджской научной школе. Они связаны с именами Брэгга, Кендрью и Перутца. В 1957 г. Кендрью установил пространственное строение первого белка — миоглобина (см. стр. 231). В молекуле миоглобина более 2500 атомов.

Кристаллы белка содержат большое количество воды, и их исследуют в маточном растворе. Бернал и Ходжкин впервые воспользовались этим методом и получили десятки тысяч четких рефлексов на рентгенограммах. Число рефлексов может доходить до сотен тысяч. Расшифровка столь сложных рентгенограмм — очень трудная и длительная работа, которую можно провести, лишь пользуясь ЭВМ. Для точного определения фазы, соответствующей каждому рефлексу, необходимо измерить несколько раз его интенсивность при дифракции как от чистого белка, так и от его производных, содержащих тяжелые атомы. В расчетах фигурируют десятки миллионов чисел.

Пространственное распределение плотности можно сделать видимым, например, наложением друг на друга контурных карт, начерченных на стопке листов прозрачного пластика. Соответствующая картина для миоглобина показана на рис. 5.6. Окончательным результатом исследования является пространственная модель молекулы белка, в которой определены положения всех его атомов. Такие модели приведены на стр. 231.

Принципиальный вопрос рентгенографии белков состоит в следующем: в какой мере структура белковой молекулы в кристалле совпадает с ее структурой в водном растворе, в котором белок функционален? Очевидно, что отрицательный ответ на

этот вопрос обесценил бы результаты рентгеноструктурного анализа и лишил бы их биологического значения.

Если бы белковая глобула представляла собой не апериодический кристалл, а сильно флуктуирующее образование, то можно было бы думать, что кристаллизация означает отбор одной или нескольких конформаций из большого их числа в растворе. Но глобула имеет фиксированное строение. Кристаллические белки, как уже сказано, содержат большое количество воды, и их изучают в маточном растворе. Результаты рентгенографического исследования кристалла белка и данные оптических измерений того же белка в растворе согласуются друг

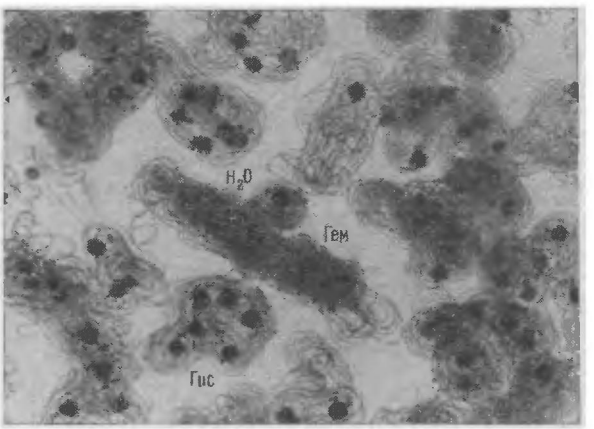


Рис. 5.6. Пространственное распределение электронной плотности в миоглобине.

с другом. В частности, совпадают степени спиральности, определенные обоими методами (см. далее стр. 319). Более того, установлено, что биологическая функциональность (ферментативная активность) белка сохраняется в кристалле, так как он сильно гидратирован. Пока что нет оснований сомневаться в положительном ответе на поставленный вопрос. Напротив, белки, подвергнутые лиофильной сушке, по-видимому, изменяют структуру — рентгенограммы высушенных кристаллов белка очень бедны рефлексами.

Здесь кратко изложены лишь физические принципы рентгенографии глобулярных белков — подробное изложение теории и методов приводится в ряде монографий и статей [3, 12, 270].

В настоящее время методом рентгеноструктурного анализа изучено несколько десятков глобулярных белков. Исследован

ряд ферментов, в частности определено строение комплексов, образуемых ферментами с ингибиторами и аналогами субстратов (см. гл. 6).

Рентгеноструктурный анализ, будучи прямым методом исследования, дает особенно обширную и ценную информацию о строении белков, позволяющую прийти к выводам, имеющим общее значение для биофизики (см. гл. 6 и [12]).

В табл. 5.1 приведен список белков, исследованных рентгеноструктурными методами. Он составлен в начале 1971 г. и, конечно, неполон (см. [270]). Ряд других белков и полипептидов был исследован пока с меньшим разрешением (γ- и δ-химотрипсин, карбоангидраза *C*, эластаза, конканавалин, пепсин, трипсин, глюкагон, окситоцин и т. д.). Изучались также красивые и сложные надмолекулярные структуры, образуемые каталазой [30].

Таблица 5.1

Белки, изученные методом рентгеноструктурного анализа

Белок	Происхождение	М. в.	Максимальное разрешение, Å	Источник данных
Миоглобин	Кашалот	17 800	1,4	[13]
Оксигемоглобин	Лошадь	67 000	2,8	[14]
Дезоксигемоглобин	Лошадь	67 000	2,8	[15]
Эритрокруорин			2,8	[16]
Цитохром *c*	Лошадь	12 400	2,7	[17]
Лизоцим	Куриное яйцо	14 400	2,0	[18]
Рибонуклеаза *A*			2,0	[19]
Рибонуклеаза		14 000	2,0	[20]
Карбоксипептидаза *A*	Бык	34 300	2,0	[21]
Хнмотрипсиноген		25 000	2,5	[22]
α-химотрипсин		23 000	2,0	[23]
Папаин		22 000	2,8	[24]
Нуклеаза	Золотистый стафилококк	16 000	2,0	[25]
Рубредоксин		6 000	2,5	[26]
Лактатдегидрогеназа		140 000	2,8	[27]
Инсулин	Свинья	5 733	2,9	[28]
Субтилизин			2,5	[29]

Несомненно, в ближайшее время число детально изученных белковых молекул возрастет.

Прежде чем перейти к рентгенографии фибриллярных биополимерных структур, остановимся на двух других родственных рентгенографии методах. Это — электронография и нейтронография. Согласно соотношению Де-Бройля $\lambda = h/mv$ (λ — длина

волны, h — постоянная Планка, m — масса частицы, v — ее скорость) рассеяние любых частиц на атомах может приводить к дифракционным явлениям, если частицы движутся с соответствующей скоростью. Применяются электроны с $\lambda \approx 0{,}05$ Å и нейтроны с $\lambda \approx 1 - 1{,}5$ Å (т. е. с такими же длинами волн, как и у рентгеновских лучей). Теория дифракции на кристаллах в этих случаях не отличается от изложенной, но имеются существенные методические отличия.

Малость длины дебройлевской волны для электрона означает большой радиус сферы Эвальда (см. стр. 268), ее вырождение в плоскость. Это сильно упрощает истолкование электронограмм, так как они оказываются прямыми изображениями плоского сечения обратной решетки кристалла. Атомные факторы для рассеяния электронов также пропорциональны атомному номеру, но по своей абсолютной величине они во много раз больше, чем для рентгеновских лучей. Иными словами, электроны взаимодействуют с веществом значительно сильнее, чем рентгеновские кванты. Поэтому они сильно поглощаются веществом, и для исследования его структуры необходимо пользоваться очень тонкими пленками толщиной порядка 10^{-5}—10^{-6} *см*, тогда как размеры кристаллов, изучаемых в рентгенографии, порядка 10^{-1} *см*. Исследование необходимо проводить в высоком вакууме. Это делает невозможным применение электронографии для изучения глобулярных белков в их нативном состоянии — вакуум высушит белок. Тем не менее электронография позволяет получить ценные результаты при исследовании фибриллярных белковых структур, синтетических полимеров и других аморфных тел. Существенное преимущество электронографии состоит в том, что она позволяет локализовать атомы водорода (подробное изложение см. в монографиях [31, 32]).

Для нейтронографических исследований необходимы атомные реакторы, дающие мощные пучки нейтронов, которые подвергаются монохроматизации отражением от кристаллической пластинки (например, CaF_2). Дифрагирующие нейтроны регистрируются счетчиками. Нейтроны рассеиваются не электронной оболочкой атома, но его ядром, и атомный фактор определяется конкретной протонно-нейтронной структурой ядра, а не атомным номером. Поэтому атомные факторы изотопов существенно различаются. Атомный фактор для водорода (протона) далеко не минимален, для ряда тяжелых элементов он меньше. Поэтому нейтронография позволяет надежно локализовать атомы водорода; с ее помощью была установлена структура льда (см. стр. 203). Можно высказать уверенность в том, что нейтронография в будущем сыграет важную роль в изучении биополимеров, где она до сих пор почти не применялась (дальнейшие подробности см. в [33]).

§ 5.2. РЕНТГЕНОГРАФИЯ ФИБРИЛЛЯРНЫХ СТРУКТУР

В ряде случаев биополимеры образуют структуры, упорядоченные, т. е. периодические, в одном измерении. Сюда относятся фибриллярные белки (например, коллаген, см. стр. 255), ДНК. Рентгенограммы таких структур характеризуются специфическими особенностями.

Если периодичность биополимера определяется вектором **c**, то анало-

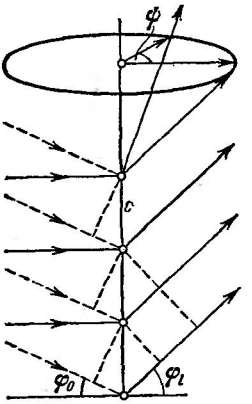


Рис. 5.7. К образованию рентгенограммы от фибриллярной структуры.

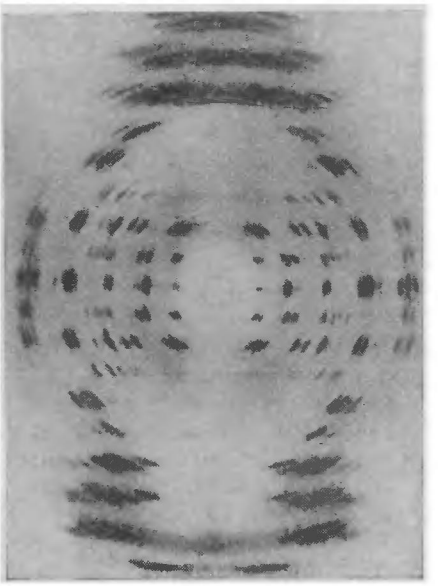


Рис. 5.8. Рентгенограмма текстуры натриевой соли ДНК в кристаллической форме *A*.

гично (5,15) структурная амплитуда $F(s)$ записывается в виде

$$F(s) = F(X, Y, l/c), \qquad (5,20)$$

где X, Y — координаты в обратном пространстве, l — единственный миллеровский индекс. Иными словами, структурная амплитуда отлична от нуля только на «слоевых» плоскостях обратного пространства, для которых $Z = l/c$. Мы имеем дело с одномерной решеткой и получаем

$$F(s) = F(X, Y, l/c) = \sum_j f_j \exp[i(x_j X + y_j Y + z_j l/c)]. \qquad (5,21)$$

Построение с помощью сферы Эвальда, приведенное на рис. 5.7, показывает, что на рентгенограмме получаются слое-

вые линии. Их положения удовлетворяют условию Брэгга — Вульфа для одномерной структуры

$$l\lambda = c(\sin\varphi_l - \sin\varphi_0). \qquad (5{,}22)$$

На рис. 5.8 приведена рентгенограмма натриевой соли ДНК в так называемой A-форме (см. стр. 489). Слоевые линии отчетливо видны на снимке. Конечно, это рентгенограмма не отдельной молекулы Na-ДНК, но осевой текстуры соли. *Осевой текстурой* называется одномерно упорядоченная система, в которой одни оси молекул приблизительно параллельны одному выделенному направлению, а другие оси ориентированы произвольно. Текстура характеризуется наличием одной оси симметрии бесконечного порядка.

Одномерные периодические системы представляют частный случай упорядоченных трехмерных систем — кристаллов. Установление распределения электронной плотности по распределению интенсивностей в дифракционной картине по-прежнему производится путем синтеза Фурье. Подробное изложение теории содержится в монографии Вайнштейна [9]. Здесь мы ограничиваемся лишь краткими сведениями.

Для одномерных систем удобно при расчетах пользоваться не декартовыми, а цилиндрическими координатами — радиусом r, полярным углом ψ и высотой z:

$$x = r\cos\psi, \quad y = r\sin\psi, \quad z = z,$$

и в обратном пространстве

$$X = R\cos\Psi, \quad Y = R\sin\Psi, \quad Z = Z.$$

Интеграл Фурье (5,10) приобретает в этих координатах вид

$$F(R, \Psi, Z) = \int_0^{\infty}\int_0^{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty} \rho(r, \psi, z)\exp\{2\pi i[Rr\cos(\psi - \Psi) + zZ]\}\, r\,dr\,d\psi\,dz \qquad (5{,}23)$$

и его фурье-образ — вид

$$\rho(r, \psi, z) = \int_0^{\infty}\int_0^{2\pi}\int_{-\infty}^{+\infty} F(R, \Psi, Z)\exp\{-2\pi i[Rr\cos(\psi - \Psi) + zZ]\}\, R\,dR\,d\Psi\,dZ. \qquad (5{,}24)$$

Для одномерных периодических структур (цепочечных молекул) зависимость ρ от r и ψ можно выделить. Двумерное распределение плотности в плоскости, перпендикулярной Z, вычисляется, как показывает теория, с помощью функций Бесселя.

Важнейшие модельные задачи (сплошной цилиндр, полые цилиндры со стенками конечной и бесконечно малой толщины, столбчатые структуры) подробно исследованы в [9].

При наличии периодичности вдоль оси z интеграл (5,23) приобретает вид

$$F_l(R, \Psi, l/c) = \\ = \int_0^{\infty}\int_0^{2\pi}\int_0^{c} \rho(r, \psi, z) \exp\{2\pi i [Rr\cos(\psi - \Psi) + zl/c]\}\, r\, dr\, d\psi\, dz. \quad (5,25)$$

Здесь ρ — распределение плотности в элементарной повторяющейся группе. Интегрирование по z производится от 0 до c, т. е. в пределах одного периода. F_l отлично от нуля лишь на слоевых линиях, отвечающих условию $Z = l/c$.

В физике биополимеров особую роль играют спиральные структуры. Уравнение непрерывной спиральной линии радиуса r_0 с шагом спирали C имеет в цилиндрических координатах вид

$$r = r_0, \quad \psi = 2\pi z/C. \quad (5,26)$$

В простейшей модели можно принять плотность вдоль спирали равной единице, т. е. положить

$$\rho(r, \psi, z) = \delta(r - r_0)\,\delta(\psi - 2\pi z/C)$$

(δ — символ δ-функции). Тогда интеграл (5,25) принимает вид

$$F_l(R, \Psi, l/C) = \\ = \int_0^{\infty}\int_0^{2\pi}\int_0^{C} \exp\{2\pi i [Rr_0\cos(2\pi z/C - \psi) + lz/C]\}\, r\, dr\, d\psi\, dz. \quad (5,27)$$

Вычисление дает

$$F_{l=n}(R, \Psi, l/C) = 2\pi r_0 I_n(2\pi R r_0)\exp[in(\Psi + {}^1/_2\pi)], \quad (5,28)$$

где I_n — функция Бесселя n-го порядка. Модуль этого выражения имеет цилиндрическую симметрию. Функция распределения интенсивности $|F|^2$ на слоевой линии номера $|l| = n$ пропорциональна квадрату функции Бесселя n-го порядка. Радиус R_1 первого максимума I_n возрастает с увеличением n, и поэтому распределение интенсивности имеет крестообразную форму (см. рис. 5.8). Происхождение такого косого креста легко понять, рассмотрев, как расположены густо заселенные ряды атомов в спирали. Наибольшие значения интенсивностей рассеянного излучения ориентированы в обратном пространстве вдоль перпендикуляров к этим рядам (рис. 5.9). Наличие косого креста на рентгенограмме непосредственно свидетельствует о спиральном строении исследуемого биополимера. Именно такого рода

снимки и привели к открытию двуспирального строения ДНК, сыгравшему столь важную роль в развитии современной биологии и биофизики [34, 271].

Не следует думать, что простое обозрение рентгенограммы приводит к решению задачи. Исследуемый объект представляет собой агрегат цепных молекул, обладающий в целом несравненно меньшей упорядоченностью, чем трехмерный кристалл.

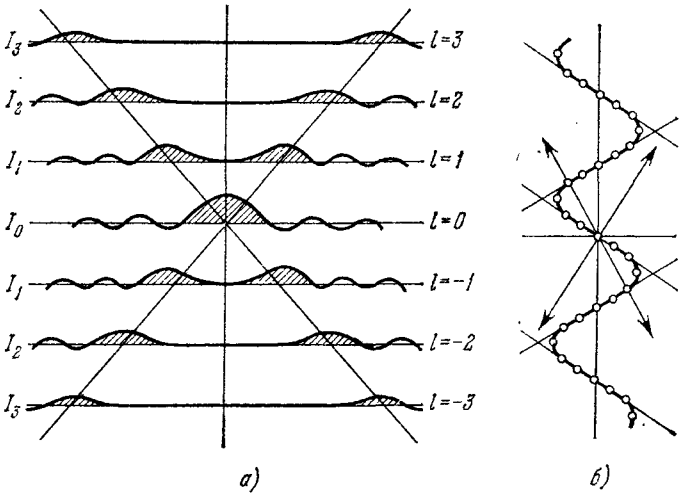


Рис. 5.9. Графики бесселевых функций I_l.

а) Весселевы функции I_l, определяющие значения интенсивности по слоевым линиям при разных $|l|$; *б*) схема, иллюстрирующая соответствие крестообразного расположения главных максимумов интенсивности по слоевым линиям и креста нормалей к плотным рядам атомов.

Соответственно дифракционная картина оказывается бедной рефлексами. Разработан ряд приемов для расшифровки такой картины. Применяется метод «проб и ошибок»: на основании структурно-физических представлений и анализа атомных моделей вводится пробная модель системы, для которой и вычисляется распределение интенсивностей. Его совпадение с наблюдаемым доказывает истинность модели. Если совпадение хорошее, можно вычислить фазы и провести синтез Фурье электронной плотности изучаемого объекта. Для фибриллярных структур оказывается удобным пользоваться цилиндрическими симметричными функциями Паттерсона (см. [9]).

В агрегатах цепных молекул фигурируют самые разные степени упорядоченности, начиная с истинного кристалла, обладающего аксиальной текстурой, и кончая аморфным полимером, в котором цепные молекулы разупорядочены. Строгая теория

позволяет судить на основании дифракционной картины о тех или иных нарушениях порядка, вызываемых сдвигами, изгибами и отклонениями от параллельной упаковки макромолекулярных цепей. Полимерные структуры в ряде случаев образуют *паракристаллы* — системы, лишенные истинного трехмерного порядка, но состоящие из цепных молекул, сдвинутых и повернутых параллельно друг другу. В свою очередь паракристалл может быть идеальным и неидеальным. В последнем случае координационное число сохраняется, но имеются нарушения указанной параллельной упаковки цепей. Для ряда фибриллярных белков (α- и β-кератин, коллаген), целлюлозы и некоторых других волокнистых веществ характерны нарушения упорядоченности с сохранением примерной параллельности ориентаций осей молекул. Особенно детально изучалась целлюлоза. Работы, в которых на основании качественных соображений, не связанных с точными расчетами, предполагалось ее аморфное строение, оказались ошибочными. Китайгородский и Цванкин провели строгое исследование рентгенограмм целлюлозы и показали, что этот природный полимер имеет чаще всего паракристаллическое строение, причем размеры упорядоченных областей в нем ограничены (порядка 100 Å) [35]. Некоторые производные целлюлозы образуют истинные монокристаллы.

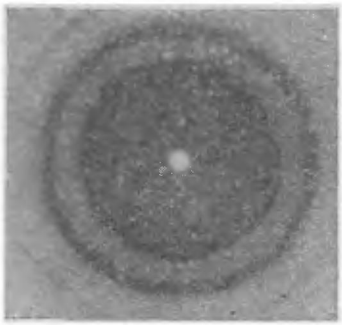


Рис. 5.10. Дебаеграмма кальцинированного коллагена.

Многообразие молекулярных и надмолекулярных биополимерных структур весьма значительно. Их изучение очень существенно для биофизики.

Синтетические аморфные полимеры (прежде всего каучуки) дают дифракционные картины в виде совокупности концентрических колец (диаграммы Дебая — Шерера, рис. 5.10). Для такой картины, несравненно более бедной, чем лауэграмма кристалла, характерно наличие размытого кольца — аморфного гало, диаметр которого определяется преимущественными расстояниями между рассеивающими центрами объекта. При растяжении аморфного полимера возникает текстура и вместо равномерных по интенсивности колец наблюдаются более или менее протяженные дуги вблизи меридиана или экватора кольца. Сходные картины дают такие фибриллярные белки, как кератин, миозин, фибриноген и другие белки, изученные Астбюри [36] (см. стр. 258).

Дальнейшие перспективы рентгеноструктурного анализа биологически функциональных веществ связаны с двумя направлениями исследований. Это, во-первых, усовершенствование методов прямого определения фаз по сильным рефлексам. При этом удается обходиться без изоморфного замещения. Во-вторых, возможности изоморфного замещения далеко не исчерпаны, и этот метод подлежит дальнейшей разработке. В частности, представляется перспективным применение не полностью изоморфных производных.

Наряду с изучением биологических макромолекул для развития биофизики необходимы структурные исследования надмолекулярных биологических систем в нативном состоянии, например мембран, мышечных волокон и т. д. Перспективы этих исследований определяются развитием скоростной рентгенографии, т. е. созданием мощных источников рентгеновского излучения с мало расходящимися пучками лучей. По-видимому, здесь может оказаться эффективным синхротронное, магнитнотормозное излучение, возникающее при центростремительном ускорении электронов в магнитном поле. В отличие от обычного рентгеновского излучения, синхротронное излучение характеризуется большой мощностью, малой расходимостью пучка, но высокой степенью поляризации (см. [37]).

§ 5.3. РАССЕЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ МАКРОМОЛЕКУЛАМИ В РАСТВОРЕ

Дискретное рассеяние рентгеновских лучей под малыми углами есть частный случай дифракции на кристаллах — малый угол, под которым наблюдаются интерференции, соответствует периодам решетки, значительно бо́льшим длины волны.

Диффузное рассеяние под малыми углами позволяет изучать макромолекулы в растворе. При этом наблюдается суммарное рассеяние на беспорядочно расположенных отдельных макромолекулах, т. е. происходит усреднение интенсивности рассеянного излучения по их всевозможным ориентациям. Фазы рассеяния при таком усреднении смешиваются, и поэтому можно построить лишь функцию, аналогичную функции Паттерсона. Эта функция, однако, позволяет охарактеризовать форму и размеры рассеивающего объекта. Ситуация здесь подобна той, с которой мы имеем дело при изучении рассеяния света растворами макромолекул (см. стр. 159 и далее). Получение такой ограниченной информации много проще, чем при рентгеноструктурном анализе кристаллов.

Непосредственно определяется лишь радиус инерции распределения электронной плотности молекулы и (при измерении интенсивности в абсолютной шкале) молекулярный вес. Радиус

инерции еще не характеризует формы молекулы, которая устанавливается путем расчета моделей и сравнения теоретических кривых с экспериментальными. Основы теории метода изложены в [38, 39].

Пусть рассеяние происходит на частице, состоящей из центров (атомов) с рассеивающей способностью i-го центра f_i. Тогда для интенсивности рассеянного излучения, представляющей квадрат амплитуды, имеем

$$J(\mathbf{h}) = A_e^2(\mathbf{h}) \sum_k \sum_i f_i f_k \cos(\mathbf{h}\mathbf{r}_{ki}), \tag{5,29}$$

где $\mathbf{h} = \frac{2\pi}{\lambda}(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)$ — вектор, пропорциональный разности единичных векторов рассеянной и падающей волн,

$$J_e(\mathbf{h}) = A_e^2(\mathbf{h}) = 7{,}9 \cdot 10^{-26} J_0 \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2r^2} \tag{5,30}$$

— интенсивность излучения, рассеянного одним электроном; здесь J_0 — интенсивность падающего пучка, а r — расстояние между частицей и приемником, θ — угол рассеяния. В случае частиц, ориентированных в объеме хаотически, принимая во внимание, что $\overline{\cos(\mathbf{h}\mathbf{r})} = \sin(\mathbf{h}\mathbf{r})/\mathbf{h}\mathbf{r}$, придем к формуле Дебая (см. стр. 160)

$$J(\mathbf{h}) = J_e(\mathbf{h}) \left(\sum_k f_k \frac{\sin(\mathbf{h}\mathbf{r}_k)}{\mathbf{h}\mathbf{r}_k} \right)^2. \tag{5,31}$$

Для малых углов второй множитель в правой части можно разложить в ряд по степеням h

$$F^2(h) = \sum_k \sum_l \left(1 - \frac{h^2}{3!} r_{kl}^2 + \frac{h^4}{5!} r_{kl}^4 + \ldots \right). \tag{5,32}$$

Так как $\sum_k f_k = \sum_l f_l = N$ (напомним, что N — число электронов в частице), то первый член разложения (5,31) есть N^2 и, выбрав за начало отсчета электронный центр инерции, получим с точностью до членов 4-го порядка малости выражение для средней интенсивности

$$\overline{F^2(h)} = N^2 \exp(-{}^1/_3 N^2 R_0^2), \tag{5,33}$$

где

$$R_0 = \frac{\sum f_k r_k^2}{\sum f_k} \tag{5,34}$$

— электронный радиус инерции.

Чтобы получить рассеяние n частицами, надо просто умножить интенсивность на n. Однако при нулевом угле рассеяния

все центры рассеивают в фазе и интенсивность пропорциональна n^2. С увеличением величины hR_0 начинают вносить свой вклад члены более высокого порядка, дающие информацию о форме макромолекулы. Однако выводы о форме нельзя делать только на основе анализа индикатрис рассеяния, необходимо привлекать и определенные предположения о форме молекул. Так, если заранее принять, что молекулу можно аппроксимировать эллипсоидом или цилиндром, то сравнение экспериментальной кривой с семейством теоретических кривых, рассчитанных для этих тел при разном соотношении осей, позволяет определить асимметрию молекул.

Для сильно вытянутых фигур анализ затруднен, так как теоретические кривые при большой асимметрии, очевидно, практически сливаются друг с другом. Зато в этом случае можно провести анализ применительно к поперечному сечению, что особенно результативно, если заранее известно, что макромолекула имеет цилиндрическую форму (молекула ДНК в растворе). При умножении интенсивности рассеянного излучения на соответствующий угол рассеяния получается функция $hJ(h)$, характеризующая сечение молекулы, и по ней определяется (совершенно так же, как и при нахождении радиуса инерции R_0) радиус инерции поперечного сечения [40]. Определить векторы, соответствующие поперечным размерам молекул, позволяет и умножение интенсивности на h^2, т. е. построение фурье-свертки. Этот метод был с успехом применен Федоровым и Птицыным для интерпретации индикатрис рассеяния [41].

При выборе модели основываются на данных других методов, результатах физико-химических исследований. Проводится такое комбинирование разных методов обработки кривой рассеяния под малыми углами, чтобы найденные различными способами расчета параметры находились в согласии друг с другом. Получению единой картины способствует метод Ритланда [42], основанный на том, что для частиц с разными молекулярными весами, но постоянной плотностью величина $R_0/\sqrt[3]{M}$ есть функция только отношения осей. Построив номограмму, выражающую зависимость $R_0/\sqrt[3]{M}$ от отношения осей, можно по известному радиусу инерции и молекулярному весу определить отношение осей. Совпадение результатов расчета и опыта свидетельствует о правильности выбранной модели.

Применение метода диффузного рассеяния под малыми углами особенно удобно для белков с не слишком большим молекулярным весом. Так была изучена морфология многих белков, в частности пепсина [43], трипсина [44], аспартатаминотрансферазы [45]. Были определены размеры и форма транспортной РНК [46]. Метод рассеяния под малыми углами позволяет

решать различные задачи молекулярной биофизики. В качестве примера приведем исследование растворимого комплекса антиген — антитело [47].

Упомянем еще о методах, позволяющих непосредственно по кривой рассеяния под малыми углами оценивать объем [48] и отношение поверхности к объему [38].

Оказалось, что рассеяние рентгеновских лучей под сравнительно большими углами дает информацию о конформационном ближнем порядке в синтетических полимерах и в глобулярных белках [49, 50]. Было установлено, в частности, что параметр $(4\pi/\lambda)\sin\theta$ для максимумов интенсивности имеет разные значения для α-спиралей и β-форм белков. Неупорядоченные участки максимумов не дают вовсе, и, следовательно, этот метод позволяет изучать денатурацию.

§ 5.4. ЭЛЕКТРОННЫЕ СПЕКТРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

Все аминокислотные остатки и пептидные (амидные) группы —CO—NH— поглощают свет в ультрафиолетовой области спектра. Ароматические остатки Три, Фен, Тир имеют характерные полосы поглощения в области 2800 Å.

Для спектроскопии синтетических полипептидов и белков особый интерес представляет более далекая ультрафиолетовая область (2400—1850 Å), в которой располагаются полосы поглощения пептидной связи. Мономер белковой цепи подобен молекуле амида R_1—CO—NH—R_2. В результате изучения электронных спектров простых амидов (формамид, метилацетамид, миристамид) установлена схема электронных переходов в амидной группе (рис. 5.11) [51—54]. Эта схема основана на теоретических расчетах, выполненных как простым методом Хюккеля [55], так и с учетом самосогласованного поля [56—58]. На рис. 5.12 показаны волновые функции амидной группы, соответствующие ее наиболее подвижным электронам. На рис. 5.11 уровень π_2 отвечает связывающей, уровень π^* — несвязывающей орбите CO, уровень π_1 — несвязывающей орбите азота, уровень n — состоянию неподеленной пары электронов кислорода. Переход $n\sigma^*$ — ридберговский атомный переход в кислороде.

В соответствии с законом Бугера — Ламберта — Бэра, интенсивность света, прошедшего через слой поглощающего вещества толщиной l, равна

$$J = J_0 \exp(-\varepsilon c l), \qquad (5{,}35)$$

где J_0 — интенсивность падающего света, c — концентрация поглощающего вещества (*моль/л*), ε — молекулярный коэффициент поглощения. Поглощение в данной полосе, отвечающей

переходу $0 \to j$, выражается так называемой *силой осциллятора* f_{0j}, определяемой интенсивностью полосы поглощения

$$f_{0j} = 4{,}32 \cdot 10^{-9} \int \varepsilon_{0j}\, d\nu'; \qquad (5{,}36)$$

здесь ν' — волновое число, выраженное в $см^{-1}$, а интегрирование проводится по всей полосе поглощения. Теория дает

$$f_{0j} = \frac{2m}{3\hbar e^2}\, \omega_{0j} p_{0j}^2, \qquad (5{,}37)$$

где e и m — заряд и масса электрона, ω_{0j} — круговая частота, соответствующая переходу, а p_{0j} — матричный элемент электрического дипольного момента, отвечающий переходу $0 \to j$:

$$\mathbf{p}_{0j} = (0|\,\mathbf{p}\,|j) \equiv \int \psi_0 \mathbf{p} \psi_j^*\, d\tau. \qquad (5{,}38)$$

Величина p_{0j}^2 называется *дипольной силой* перехода.

Переход $n\pi^*$ в амидной группе имеет малую дипольную силу, так как электронные облака n- и π^*-состояний почти перпендикулярны друг другу и слабо перекрываются (см. рис. 5.12).

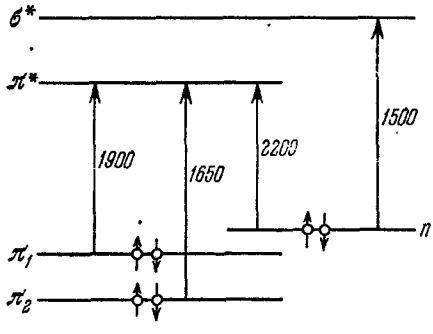


Рис. 5.11. Электронные переходы в амидной группе.

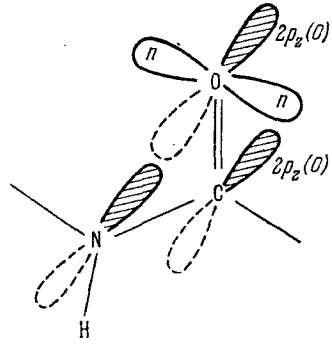


Рис. 5.12. Волновые функции амидной группы.

Теоретические расчеты дают следующие длины волн, соответствующих переходам: $n\pi^*$ 2340, $\pi_1\pi^*$ 1605, $\pi_2\pi^*$ 1347 Å. В спектре миристамида наблюдаются полосы 2200, 1850, 1600 Å [54], в спектре формамида 1717, 1345 Å [53].

Дипольный момент перехода $\pi_1\pi^*$ лежит в плоскости HNCO под углом 9° к линии, соединяющей атомы O и N, а перехода $n\pi$ перпендикулярен к этой плоскости [51, 59].

Спектры амидных групп в полипептидной цепи изменяются вследствие электронного взаимодействия этих групп друг с другом. В частности, энергетические уровни для концевых групп цепи отличаются от уровней для внутренних групп [51].

Наибольший интерес для биофизики представляют эффекты, возникающие вследствие *экситонного резонансного взаимодействия*, а именно, *давыдовское расщепление* и *гипохромизм*.

Строя теорию спектров молекулярных кристаллов, Давыдов показал, что в регулярной совокупности хромофорных групп между их возбужденными энергетическими уровнями может происходить резонансная передача энергии возбуждения. Следовательно, в регулярной системе возможно распространение волны возбуждения — *экситона*. В результате взаимодействия энергетических уровней они расщепляются, образуя широкую

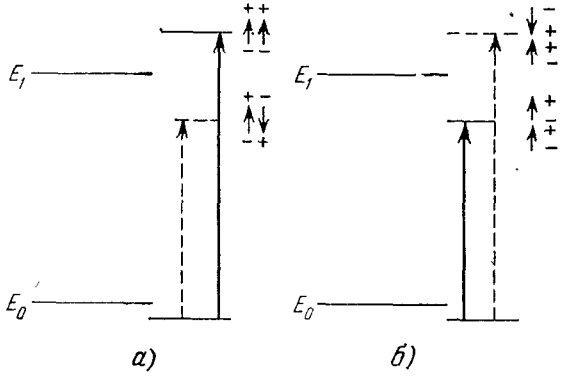


Рис. 5.13. Уровни энергии для системы параллельных (*а*) и коллинеарных (*б*) дипольных моментов перехода.

зону. Правила отбора разрешают переходы при поглощении и испускании света не на любые уровни зоны, а на строго определенные, причем поляризация полос поглощения определяется симметрией регулярной системы как целого [60, 61].

Резонансное взаимодействие возможно уже в димере, и в нем оно приводит к расщеплению исходного уровня на два. На рис. 5.13 показана схема такого расщепления для случаев параллельного и коллинеарного расположения дипольных моментов перехода. Сплошные стрелки указывают разрешенные переходы, пунктирные — запрещенные.

Моффитт провел теоретический расчет экситонного расщепления для перехода $\pi_1\pi^*$ (1900 Å) в амидной группе α-спирали [62]. Согласно теории Давыдова эта полоса расщепляется на две компоненты, из которых одна поляризована вдоль оси спирали, а вторая — перпендикулярно к ней. Частота первой полосы на 2700 $см^{-1}$ меньше, чем второй, что согласуется с опытом.

Следует учесть, кроме того, что пептидные связи в белках находятся в окружении атомных групп, несущих заряды и обладающих постоянными дипольными моментами и поляризуемо-

стями, т. е. в некоторой конденсированной среде. Взаимодействия хромофоров со средой также меняют частоты переходов. Непорент и Бахшиев провели детальное теоретическое и экспериментальное исследование влияния межмолекулярных взаимодействий на электронные спектры сложных молекул (см., например, [63, 64]). Возрастание дипольного момента и поляризуемости молекул среды уменьшает частоты переходов. Изменение среды, вызывающее денатурацию белка, приводит к переносу пептидных групп из окружения с большей в окружение с меньшей поляризуемостью, что должно увеличивать частоту перехода. Такого рода эффекты действительно наблюдаются [65].

Особенно интересны и показательны изменения интенсивности полос, вызываемые экситонными эффектами. Резонансное взаимодействие приводит к перераспределению интенсивностей спектральных полос. В случае двух коллинеарных дипольных моментов перехода полоса с меньшей частотой (большей длиной волны) увеличивает свою интенсивность за счет интенсивности коротковолновой полосы. Возникает *гиперхромизм* длинноволновой полосы. Напротив, в случае параллельных дипольных моментов понижается интенсивность длинноволновой полосы и увеличивается интенсивность коротковолновой. Возникает *гипохромизм* длинноволновой полосы. Именно этот эффект наблюдается в спектрах α-спиральных полипептидов и белков, а также нативных нуклеиновых кислот. Если дипольные моменты перпендикулярны друг другу, то перераспределения интенсивности нет.

Теория гипохромизма основывается на учете электростатического диполь-дипольного и поляризационного взаимодействий дипольных моментов перехода в упорядоченной системе биополимера. Можно улучшить расчеты, рассматривая вместо дипольных взаимодействий взаимодействия зарядов (монополей). Расчет дает [59] следующую величину отношения сил осцилляторов в жесткой (нативной) и разупорядоченной (денатурированной) системах:

$$\frac{f_{0a}}{f_{0a}^{(0)}} = 1 - \frac{3\lambda_a^2 e^2}{2\pi^2 mc^2} \sum_{i=1}^{N} \sum_{j \neq i} \sum_{b \neq a} \frac{f_{0b}^{(0)} \lambda_b^2 G_{ij} \mathbf{e}_i \mathbf{e}_j}{\lambda_a^2 - \lambda_b^2}, \qquad (5{,}39)$$

где f_{0a} — сила осциллятора для группы в жесткой конформации, $f_{0a}^{(0)}$, $f_{0b}^{(0)}$ — то же для изолированных групп, $\mathbf{e}_i$, $\mathbf{e}_j$ — единичные векторы, характеризующие ориентацию взаимодействующих групп, общее число которых равно N. Величина G_{ij} выражает взаимодействие монополей

$$G_{il} = \sum_s \sum_t \frac{\rho_{is}\rho_{jt}}{R_{isjt}}, \qquad (5{,}40)$$

где ρ_{is}, ρ_{jt} — матричные элементы монополей для i-й и j-й групп.

Обзор различных форм теории гипохромизма можно найти в [66] (см. также [67, 71]). Классические или полуклассические модели (ср. стр. 299) дают результаты, эквивалентные полученным при помощи квантовомеханических экситонных моделей. В классической модели рассматриваются колебания осцилляторов, связанных диполь-дипольным взаимодействием, в экситонной теории применяется теория возмущений, не зависящих от времени. Можно воспользоваться для расчета гипохромизма и квантовой теорией возмущений, зависящих от времени.

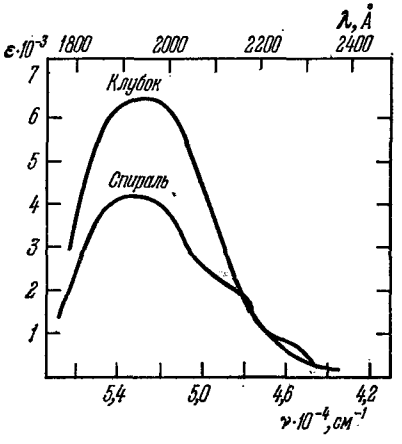


Рис. 5.14. Спектр поглощения ПГК.

На рис. 5.14 показаны экспериментальные результаты, полученные для полиглутаминовой кислоты (ПГК) [59]. При pH 4,9 полимер имеет вид α-спирали, при pH 8 — клубка. Хорошо наблюдаются две полосы, возникшие в результате давыдовского расщепления, и сильный гипохромизм. Отношение $f_{0a}/f_{0a}^{(0)}$ равно 0,7, что хорошо согласуется с теорией (см. [67]).

Зависимость гипохромного эффекта от длины цепи была изучена в [72], зависимость от ионной силы — в [73]. В табл. 5.2 приведены данные, характеризующие гипохромизм полиаминокислот [51].

Очевидно, что исчезновение гипохромизма при переходе спираль — клубок, при денатурации, может дать количественную меру α-спиральности белка. Ввиду трудностей, с которыми сопряжены спектрофотометрические измерения в дальней ультрафиолетовой области вблизи 2000 Å, этот метод в применении к белкам малоупотребителен. Напротив, он весьма прост и эффективен в случае нуклеиновых кислот при определениях степени спаривания цепей. Длинноволновые электронные полосы поглощения нуклеиновых кислот лежат вблизи 2600 Å. Эти полосы, обусловливаемые ππ*-переходами, характеризуются дипольными моментами, лежащими в плоскостях азотистых оснований. В табл. 5.3 приведены характеристики полос поглощения в спектрах азотистых оснований [71].

Параллельные переходы в области 2600 Å — это ππ*-переходы с молярными коэффициентами поглощения 8000—10 000. В области 1900 Å лежат также параллельные ππ*-переходы с более интенсивными полосами (коэффициенты поглощения

Таблица 5.2

Молярное поглощение полипептидов в α-спиральной и неупорядоченной формах [1])

	Коэффициенты молярного поглощения, $моль^{-1} \cdot см^{-1}$				Сила осциллятора
	в максимуме полосы	при 1900 Å	при 1970 Å	при 2050 Å	
Клубок					
Поли-L-глутаминовая кислота					
без соли	7100	7000	6500	3500	0,115
при ионной силе 0,0004		(7200)	(6600)	(4850)	
при ионной силе 2,0		(6050)	(5350)	(3700)	
Поли-L-лизин	7100 (6600)	6900 (6500)		3300	0,106
Среднее		6950		3400	0,110
α-спираль					
Поли-L-глутаминовая кислота	4200	4200	3300	2150	0,0778
Поли-L-лизин	4400	4400	3500	2300	0,0720
Среднее		4300	3400	2200	0,0749

[1]) Числа без скобок заимствованы из работы [74], числа в скобках — из работы [73].

Таблица 5.3

Характеристики полос поглощения в спектрах азотистых оснований

	Максимумы, Å	Полуширина, Å	Дипольный момент перехода дебаи	Направление момента [1])
Аденин	2600	260	3,90	—2°
	2400	200	1,68	—156°
Цитозин	2713	305	3,04	82°
	2400	280	2,63	180°
Гуанин	2775	235	2,46	—83°
	2510	290	3,87	165°
Урацил	2625	315	3,29	173°
	2400	190	1,16	160°

[1]) Угол отсчитывается против часовой стрелки от линии, соединяющей атомы 3 и 6 в пуринах, или от линии, соединяющей атомы 1 и 4 в пиримидинах (см. стр. 83).

20 000—25 000). Длинноволновые переходы вблизи 2800 Å — перпендикулярные $n\pi^*$-переходы с малыми коэффициентами поглощения (<5000).

Плоскости азотистых оснований параллельны друг другу в двойной спирали ДНК (см. стр. 489) и почти параллельны (угол 7°) в двуспиральных участках РНК (см. стр. 500). Гипохромизм полосы 2600 Å ДНК достигает 40%.

Квантовомеханические расчеты положений первых π-электронных уровней пар азотистых оснований в ДНК проведены в ряде работ, в частности в [75, 76].

§ 5.5. ТЕОРИЯ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Спектрополяриметрия — один из важнейших и наиболее доступных методов изучения биополимеров. Поэтому расскажем о ней подробно.

Оптическая активность — способность асимметричной среды поворачивать плоскость поляризации проходящего света — впервые была обнаружена Араго в 1811 г. Как показал Френель (1820 г.), оптическая активность означает наличие кругового двулучепреломления, т. е. она определяется различием в скоростях распространения в среде света, поляризованного по кругу вправо и влево. В правой волне вектор напряженности электрического поля **E** в луче, идущем в глаз наблюдателя, вращается по часовой стрелке, в левой — в противоположную сторону. Соответственно для правой (D) и левой (L) волн, распространяющихся вдоль оси z,

$$E_y = iE_x \text{ (D)}, \quad E_y = -iE_x \text{ (L)}, \tag{5,41}$$

т. е. в правой волне фаза E_y отличается от фазы E_x на $^1/_2\pi$ ($i \equiv \exp {}^1/_2\pi$), в левой — на $-^1/_2\pi$. В среде электрическое поле световой волны характеризуется вектором электрической индукции

$$\mathbf{D} = n^2\mathbf{E}, \tag{5,42}$$

где n — показатель преломления. Опишем правую и левую волны выражениями $D_D = D_x - iD_y$, $D_L = D_x + iD_y$. Если $D_D = 0$, то условие существования L-волны имеет вид $D_y = -iD_x$, если $D_L = 0$, то для D-волны получим $D_y = iD_x$. Пусть при входе в вещество волна с амплитудой 1 линейно поляризована вдоль оси x ($D_x = 1$, $D_y = 0$, $D_D = D_L = 1$). Скорости распространения правой и левой волн в веществе различны, т. е. $n_D \equiv n_+$ отличен от $n_L \equiv n_-$. Тогда при выходе из слоя вещества толщиной l имеем

$$D_D = D_+ = \exp\left(-\frac{2\pi i}{\lambda} n_+ l\right), \quad D_L = D_- = \exp\left(-\frac{2\pi i}{\lambda} n_- l\right), \tag{5,43}$$

где λ — длина волны. Введем обозначения $n = {}^1/_2(n_+ + n_-)$, $\Delta n = n_- - n_+$. Тогда

$$D_x = {}^1/_2 \exp\left(-\frac{2\pi i}{\lambda} nl\right)\left(\exp\left[\frac{2\pi i}{\lambda}(n - n_+)\, l\right] + \right.$$
$$\left. + \exp\left[\frac{2\pi i}{\lambda}(n - n_-)\, l\right]\right) = \exp\left(-\frac{2\pi i}{\lambda} nl\right)\cos\frac{\pi\,\Delta n}{\lambda} l, \quad (5{,}44)$$

$$D_y = \frac{1}{2i}\exp\left(-\frac{2\pi i}{\lambda} nl\right)\left(\exp\left[\frac{2\pi i}{\lambda}(n - n_+)\, l\right] - \right.$$
$$\left. - \exp\left[\frac{2\pi i}{\lambda}(n - n_-)\, l\right]\right) = \exp\left(-\frac{2\pi i}{\lambda} nl\right)\sin\frac{\pi\,\Delta n}{\lambda} l, \quad (5{,}45)$$

откуда

$$D_y/D_x = \operatorname{tg}\varphi = \operatorname{tg}\frac{\pi\,\Delta n}{\lambda} l, \quad (5{,}46)$$

т. е. плоскость поляризации повернулась на угол

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda}(n_L - n_D)\, l. \quad (5{,}47)$$

Линейно поляризованную волну всегда можно разложить на две волны, поляризованные по кругу вправо и влево. Если в среде одна из этих волн обгоняет другую, то плоскость поляризации падающей волны, или вектор $\mathbf{D}$, равный векторной сумме $\mathbf{D}_+$ и $\mathbf{D}_-$, поворачивается на угол φ.

Удельным вращением раствора, содержащего c *г/см*^{3} оптически активного вещества, называется величина

$$[\alpha] = \varphi/lc. \quad (5{,}48)$$

Если l измеряется в *дм*, а φ в радианах, т. е. $\varphi = 180\chi/\pi$, то

$$[\alpha] = \frac{180}{\pi}\frac{10}{c}\frac{\chi}{l}\ \textit{рад}\cdot\textit{дм}^{-1}\cdot\textit{г}^{-1}\cdot\textit{см}^3. \quad (5{,}49)$$

Для чистого вещества вместо c надо подставить плотность.

Молекулярным вращением называется величина

$$[M] = \frac{M}{100}[\alpha] = \chi\frac{18}{\pi}\frac{M}{c}, \quad (5{,}50)$$

где M — молекулярный вес оптически активного вещества.

В области собственного поглощения света веществом показатель его преломления — комплексная величина

$$\tilde{n} = n - i\varkappa; \quad (5{,}51)$$

здесь $\varkappa$ — показатель поглощения вещества (ср. (5,35)). Интенсивность света, прошедшего слой вещества толщиной l, равна

$$J = J_0\exp\left[-\frac{4\pi\varkappa}{\lambda} l\right], \quad (5{,}52)$$

где J_0 — интенсивность падающего света. Круговое двулучепреломление обязательно связано с круговым дихроизмом КД, т. е. с различием в поглощении для света, поляризованного по кругу вправо и влево ($\varkappa_L \neq \varkappa_D$). Угол поворота плоскости поляризации — также комплексная величина

$$\tilde{\varphi} = \frac{\pi}{\lambda}(\tilde{n}_L - \tilde{n}_D)\,l = \frac{\pi}{\lambda}(n_L - n_D)\,l - i\frac{\pi}{\lambda}(\varkappa_L - \varkappa_D)\,l. \quad (5{,}53)$$

Вследствие различия в поглощении правой и левой волн оптически активное вещество в области собственного поглощения не только поворачивает плоскость поляризации света, но и превращает линейно поляризованное излучение в эллиптически поляризованное. Мерой эллиптичности служит величина

$$\theta = \frac{\pi}{\lambda}(\varkappa_L - \varkappa_D). \quad (5{,}54)$$

Молекулярная эллиптичность определяется как

$$[\theta] = \theta\frac{18}{\pi}\frac{M}{c} = 2{,}303\,\frac{4500}{\pi}(\varepsilon_L - \varepsilon_D) \equiv 3300\,(\varepsilon_L - \varepsilon_D), \quad (5{,}55)$$

где ε_L, ε_D — молекулярные коэффициенты поглощения, определяемые условием, эквивалентным (5,52):

$$J = J_0 \cdot 10^{-\varepsilon_{L,D} cl} \quad (5{,}56)$$

(c — концентрация в *моль·л*$^{-1}$).

Теория должна объяснить происхождение разностей $n_L - n_D$ и $\varkappa_L - \varkappa_D$ (т. е. $\varepsilon_L - \varepsilon_D$) и установить связь между этими величинами и строением вещества. В обычной оптике — теории преломления и дисперсии света — размеры молекул считаются бесконечно малыми по сравнению с длиной волны света λ. Иными словами, не учитываются различия в фазах световой волны в различных точках молекулы. Величины порядка r/λ, где r — длина порядка размера молекулы, считаются пренебрежимо малыми. Для малых молекул и видимого света $r/\lambda \sim 10^{-3}$; для истолкования оптической активности необходим учет разности фаз световой волны в разных точках молекулы [77—79]. Исключительно высокая чувствительность оптической активности к изменениям молекулярной структуры этим и объясняется — спектрополяриметрия есть по существу молекулярная интерферометрия.

Классическая теория явления, основанная на модели электрона — гармонического осциллятора и развитая Борном и Озееном (1915 г.), показывает, что для появления оптической активности необходимо соблюдение трех условий. Во-первых, как уже сказано, расстояния между различными электронами молекулы, взаимодействующими со световой волной, не должны

быть исчезающе малыми по сравнению с λ. Во-вторых, между этими электронами должно существовать взаимодействие. И в-третьих, молекула должна обладать хиральностью (см. стр. 79), т. е. не иметь ни плоскости, ни центра симметрии. Соответственно простейшая классическая модель оптически активной молекулы, предложенная Куном, состоит из двух взаимодействующих электронов, движущихся на некотором расстоянии друг от друга вдоль непараллельных направлений, скажем, вдоль направлений x и y, фиксированных в молекуле (рис. 5.15). Подробное изложение классической теории приведено в монографиях [78, 79].

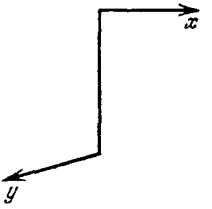


Рис. 5.15. Модель оптически активной молекулы, предложенная Куном.

Строгая квантовомеханическая теория оптической активности была построена Розенфельдом [80]. Ее изложение, основанное на квантовомеханической теории возмущений, содержится в [78, 79, 81—85]. Здесь мы ограничимся лишь основными положениями.

Будем считать молекулу электронной системой, характеризуемой невозмущенными волновыми функциями, а электромагнитное поле — возмущением. Рассмотрение переменного электромагнитного поля световой волны требует применения теории возмущений, зависящих от времени. Теория выражает молекулярные константы — поляризуемость и магнитную восприимчивость — через матричные элементы электрического и магнитного дипольных моментов, т. е. моменты перехода. В обычной немагнитной среде материальные уравнения электромагнитного поля имеют вид

$$\mathbf{D} = \varepsilon\mathbf{E}, \quad \mathbf{B} = \mu\mathbf{H} \approx \mathbf{H}, \tag{5,57}$$

где $\mathbf{H}$ и $\mathbf{B}$ — напряженность и индукция магнитного поля, $\varepsilon = n^2$ и μ — диэлектрическая и магнитная проницаемости. Как показывает теория, в оптически активной изотропной среде

$$\mathbf{D} = \varepsilon\mathbf{E} - g\dot{\mathbf{H}}, \quad \mathbf{B} = \mathbf{H} + g\dot{\mathbf{E}}, \tag{5,58}$$

причем (c — скорость света)

$$n_D = \varepsilon^{1/2} - 2\pi gc/\lambda, \quad n_L = \varepsilon^{1/2} + 2\pi gc/\lambda, \tag{5,59}$$

т. е. поворот плоскости поляризации выражается через константу g (*гирацию*) следующим образом:

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda}(n_L - n_D)\, l = \frac{4\pi^2 c}{\lambda^2} gl. \tag{5,60}$$

Вместе с тем

$$\mathbf{D} = \mathbf{E} + 4\pi\mathbf{P}, \quad \mathbf{B} = \mathbf{H} + 4\pi\mathbf{M}, \tag{5,61}$$

где $\mathbf{P}$ — вектор электрической поляризации, $\mathbf{M}$ — вектор намагничения, т. е. векторы суммарных электрических и магнитных дипольных моментов единицы объема ($\mathbf{P} = N_1\mathbf{p}$, $\mathbf{M} = N_1\mathbf{m}$). В свою очередь

$$\mathbf{p} \approx a\mathbf{E}' - \frac{\beta}{c}\dot{\mathbf{H}}, \quad \mathbf{m} \approx \frac{\beta}{c}\dot{\mathbf{E}}, \tag{5,62}$$

где

$$\mathbf{E}' = \mathbf{E} + {}^4/_3\pi\mathbf{P} \tag{5,63}$$

— напряженность эффективного электрического поля, действующего на молекулу в среде, a — поляризуемость молекулы, β — молекулярный параметр оптической активности. Сравнение формул (5,58), (5,62) и (5,63) дает уравнение Лорентц — Лоренца

$$\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} = {}^4/_3\pi N_1 a \tag{5,64}$$

и

$$g = {}^4/_3\pi N_1 \frac{\beta}{c}\frac{n^2 + 2}{3}. \tag{5,65}$$

Следовательно,

$$\varphi = \frac{16\pi^3 N_1 \beta}{\lambda^2}\frac{n^2 + 2}{3} l. \tag{5,66}$$

Квантовомеханические выражения для a и β в случае молекулы в ее основном электронном состоянии с квантовым числом 0 имеют вид

$$a = \frac{2}{3h}\sum_j \frac{\nu_j |(0|\mathbf{p}|j)|^2}{\nu_j^2 - \nu^2}, \tag{5,67}$$

$$\beta = \frac{c}{3\pi h}\sum_j \frac{\mathrm{Im}\{(0|\mathbf{p}|j)(j|\mathbf{m}|0)\}}{\nu_j^2 - \nu^2}. \tag{5,68}$$

Здесь h — постоянная Планка, $(0|\mathbf{p}|j)$ и $(j|\mathbf{m}|0)$ — матричные элементы электрического и магнитного моментов для перехода между состояниями 0 и j:

$$(0|\mathbf{p}|j) \equiv \int \psi_0 \mathbf{p} \psi_j^* d\tau, \quad (j|\mathbf{m}|0) \equiv \int \psi_j \mathbf{m} \psi_0^* d\tau,$$

ν_j — частота, соответствующая переходу, ν — частота падающего света. Суммирование ведется по всем состояниям j. Символ Im показывает, что в β входят лишь мнимые части комплексных произведений $(0|\mathbf{p}|j)(j|\mathbf{m}|0)$.

Величина $D_j \equiv |(0|\mathbf{p}|j)|^2$, именуемая дипольной силой, непосредственно связана с интенсивностью поглощения (см. стр. 285). Величина

$$R_j = \mathrm{Im}\{(0|\mathbf{p}|j)(j|\mathbf{m}|0)\} \tag{5,69}$$

называется *вращательной силой*.

Сумма дипольных сил по всем переходам $0 \to j$ есть константа, пропорциональная числу электронов в молекуле. Напротив, сумма вращательных сил равна нулю

$$\sum_j R_j = \sum_j \mathrm{Im}\,\{(0\,|\,\mathbf{p}\,|\,j)\,(j\,|\,\mathbf{m}\,|\,0)\} =$$
$$= \mathrm{Im}\,\{(0\,|\,\mathbf{pm}\,|\,0) - (0\,|\,\mathbf{p}\,|\,0)\,(0\,|\,\mathbf{m}\,|\,0)\} = 0, \qquad (5{,}70)$$

так как диагональные матричные элементы $(0|\mathbf{pm}|0)$, $(0|\mathbf{p}|0)$ и $(0|\mathbf{m}|0)$ вещественны, т. е. их мнимые части равны нулю. Вращательная сила R_j обращается в нуль при наличии у молекулы плоскости или центра симметрии. В этих случаях все состояния молекулы делятся на четные и нечетные в зависимости от того, сохраняет ли волновая функция знак или меняет его при отражении соответственно в центре или в плоскости. Операторы моментов $\mathbf{p}$ и $\mathbf{m}$ в декартовых координатах имеют вид

$$\mathbf{p} = e\,(\mathbf{i}x + \mathbf{j}y + \mathbf{k}z),$$
$$\mathbf{m} = \frac{eh}{4\pi mci}\left\{\mathbf{i}\left(y\,\frac{\partial}{\partial z} - z\frac{\partial}{\partial y}\right) + \mathbf{j}\left(z\frac{\partial}{\partial x} - x\,\frac{\partial}{\partial z}\right) + \right.$$
$$\left. + \mathbf{k}\left(x\,\frac{\partial}{\partial y} - y\,\frac{\partial}{\partial x}\right)\right\}, \qquad (5{,}71)$$

где e и m — заряд и масса электрона, $\mathbf{i}$, $\mathbf{j}$, $\mathbf{k}$ — единичные векторы декартовой системы координат. Допустим, что молекула имеет центр симметрии. При отражении в центре $\mathbf{p}$ меняет знак, а $\mathbf{m}$ его сохраняет: Поэтому $(0|\mathbf{p}|j)$ не равно нулю только при переходах от нечетных к четным состояниям и наоборот. Напротив, $(j|\mathbf{m}|0)$ отлично от нуля лишь для переходов между состояниями одинаковой четности. Следовательно, скалярное произведение этих матричных элементов равно нулю для любых переходов. Аналогичным образом доказывается равенство нулю R_j для молекул с плоскостью симметрии. Электрический и магнитный сомножители не могут в отсутствие хиральности одновременно отличаться от нуля [81]. При переходе от правого антипода хиральной молекулы к левому знак R_j, знак вращения, меняется. По порядку величины R_j равно произведению электрического и магнитного моментов электронной структуры молекулы. $(0|\mathbf{p}|j)$ составляет по порядку величины 1 дебай $=$ $= 10^{-18}$ СГС; магнитный момент электрона $0{,}93 \cdot 10^{-20}$ *эрг·гс*$^{-1}$. Следовательно, порядок величины R_j 10^{-38} СГС. Удобно пользоваться значением приведенной вращательной силы, выраженным числами порядка единицы

$$[R] = \frac{100}{\mu_B p_D} R,$$

где μ_B — магнетон Бора, $p_D = 1$ дебай.

Формула Розенфельда (5,68) выведена для области, далекой от области собственного поглощения, и описывает нормальную дисперсию оптической активности. В области собственного поглощения необходимо учесть затухание, и мы получаем

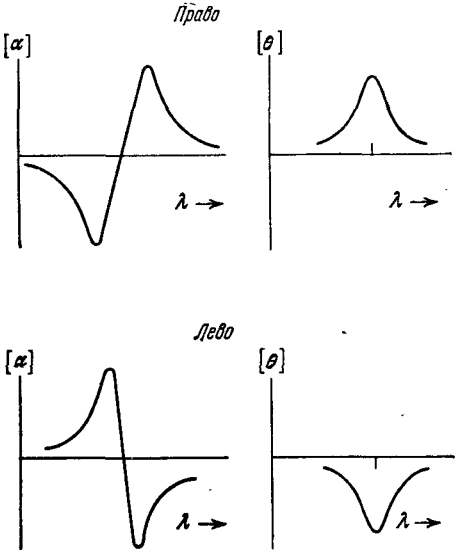


Рис. 5.16. Графики АДОВ и КД.
Вверху—кривые для правовращающего вещества, внизу—для левовращающего.

комплексное выражение для β вблизи полосы поглощения ν_j (см., например, [83, 85, 86])

$$\beta_j = \frac{c}{3\pi h}\frac{R_j}{\nu_j^2 - \nu^2 + i\nu\Gamma_j} \equiv \frac{c}{3\pi h}\frac{R_j(\nu_j^2 - \nu^2)}{(\nu_j^2 - \nu^2)^2 + \nu^2\Gamma_j^2} - \frac{ic}{3\pi h}\frac{R_j\nu\Gamma_j}{(\nu_j^2 - \nu^2)^2 + \nu^2\Gamma_j^2}, \tag{5,72}$$

причем Γ_j характеризует полуширину полосы поглощения в шкале частот. Первый член в (5,72) описывает вращение плоскости поляризации, второй — круговой дихроизм (ср. стр. 292). Аналогичным образом для поляризуемости вблизи полосы поглощения ν_j получаем

$$a_j = \frac{2}{3h}\frac{\nu_j(\nu_j^2 - \nu^2)D_j}{(\nu_j^2 - \nu^2)^2 + \nu^2\Gamma_j^2} - i\frac{2}{3h}\frac{\nu_j\nu D_j}{(\nu_j^2 - \nu^2)^2 + \nu^2\Gamma_j^2}, \tag{5,73}$$

где первый член описывает дисперсию показателя преломления, второй — поглощение света.

Вблизи полосы поглощения наблюдается *аномальная дисперсия оптического вращения* (АДОВ) и одновременно *круговой дихроизм* (КД). Модельные кривые для право- и левовращающего вещества показаны на рис. 5.16. Соответствующие кривые для поляризуемости и поглощения выглядят аналогично кривым АДОВ и КД для правовращающего вещества. АДОВ принято называть *эффектом Коттона.*

Очевидно, что дипольную силу D_j можно экспериментально определить из данных о поглощении, вращательную силу — из данных о КД и АДОВ. Теория дает

$$D_j = \frac{3hc}{8\pi^3 N_1} \int_0^\infty \frac{k_j(\nu)}{\nu}\, d\nu, \qquad (5{,}74)$$

$$R_j = \frac{3hc}{8\pi^3 N_1} \int_0^\infty \frac{\theta_j(\nu)}{\nu}\, d\nu, \qquad (5{,}75)$$

где k_j — коэффициент поглощения в полосе $0 \to j$:

$$k_j = \frac{1}{l} \ln \frac{J_0}{J_j},$$

а θ_j — эллиптичность (см. стр. 292).

Параллелизм между явлениями дисперсии и поглощения и АДОВ и КД можно представить в виде таблицы (табл. 5.4) [86].

Таблица 5.4

Основные характеристики оптических явлений

Поглощение и дисперсия света	КД и АДОВ
1. Полоса поглощения, связанная с переходом $0 \to j$, характеризуется тремя параметрами:	1. Полоса кругового дихроизма, связанная с переходом $0 \to j$, характеризуется тремя параметрами:
а) длиной волны (частотой) максимума поглощения λ_j (ν_j);	а) длиной иолны (частотой) максимальной эллиптичности λ_j (ν_j);
б) полушириной полосы Γ_j;	б) полушириной полосы Γ_j;
в) мерой интенсивности, дипольной силой D_j (интеграл (5,74)).	в) мерой интенсявности, вращательной силой R_j (интеграл (5,75)).
2. D_j выражается как $\lvert(0 \lvert \mathbf{p} \rvert j)\rvert^2$.	2. R_j выражается формулой (5,69).
3. Вещественная и мнимая части показателя преломления (преломление и поглощение) связаны соотношениями Кронига — Крамерса	3. Вещественная и мнимая части оптической активности (круговое двулучепреломление и круговой дихроизм) связаны соотношениями Кронига — Крамерса

Упомянутые в таблице *соотношения Кронига — Крамерса* имеют фундаментальное значение для оптики и физики в целом [85—89].

Допустим, что линейная система подвергается некоему воздействию, зависящему от времени $A(t)$, которое можно представить интегралом Фурье [85]

$$A(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} A_0(\nu) \exp(2\pi i \nu t)\, d\nu. \tag{5,76}$$

Реакция системы выражается функцией $B(t)$, содержащей комплексную функцию $\chi(\nu)$,

$$B(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \chi(\nu)\, A_0(\nu) \exp(2\pi i \nu t)\, d\nu = \int_{-\infty}^{+\infty} [\chi_1(\nu) - i\chi_2(\nu)]\, A_0(\nu) \exp(2\pi i \nu t)\, d\nu. \tag{5,77}$$

Примем $A(t) = B(t) = 0$ при $t < 0$ (закон причинности). Так как система линейна, то в пределе при $\nu \to \infty$ имеем $\chi_1(\nu) \to \chi_\infty$, $\chi_2(\nu) \to 0$, причем χ_1 — четная, а χ_2 — нечетная функция ν. Тогда мы можем написать

$$\chi_1(\nu) - \chi_\infty = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\nu' \chi_2(\nu')}{\nu'^2 - \nu^2}\, d\nu', \tag{5,78}$$

$$\chi_2(\nu) = -\frac{2\nu}{\pi} \int_0^\infty \frac{\chi_1(\nu') - \chi_\infty}{\nu'^2 - \nu^2}\, d\nu'. \tag{5,79}$$

Это — соотношения Кронига — Крамерса, устанавливающие связь между χ_1 и χ_2. Так, если речь идет об электрическом контуре, то A — напряжение, B — сила тока, χ_1 — сопротивление, χ_2 — реактанс. В нашем случае в соотношениях (5,62) $\mathbf{E}'$, $\mathbf{H}$ — периодические «причины», $\mathbf{p}$ и $\mathbf{m}$ — периодические «следствия». Если переписать выражения (5,73) и (5,72) в форме

$$a = a_1 - i a_2, \quad \beta = \beta_1 - i\beta_2, \tag{5,80}$$

то

$$\left.\begin{aligned} a_1(\nu) &= \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\nu' a_2(\nu')}{\nu'^2 - \nu^2}\, d\nu', \quad a_2(\nu) = -\frac{2\nu}{\pi} \int_0^\infty \frac{a_1(\nu')}{\nu'^2 - \nu^2}\, d\nu', \\ \beta_1(\nu) &= \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\nu' \beta_2(\nu')}{\nu'^2 - \nu^2}\, d\nu', \quad \beta_2(\nu) = -\frac{2\nu}{\pi} \int_0^\infty \frac{\beta_1(\nu')}{\nu'^2 - \nu^2}\, d\nu'. \end{aligned}\right\} \tag{5,81}$$

Вычисление вращения из эллиптичности и наоборот (и аналогичные вычисления для преломления и поглощения) производится по формулам

$$\varphi(\nu)=\frac{2\nu^2}{\pi}\int_0^\infty \frac{\theta(\nu')}{\nu'(\nu'^2-\nu^2)}\,d\nu', \tag{5,82}$$

$$\theta(\nu)=-\frac{2\nu^3}{\pi}\int_0^\infty \frac{\varphi(\nu')}{\nu'^2(\nu'^2-\nu^2)}\,d\nu'. \tag{5,83}$$

Таким образом, вращательную силу R_j можно определить как из КД, так и из АДОВ (см. также [79, 90]).

Нормальная дисперсия вращения (или показателя преломления) в области, далекой от поглощения, определяется наличием КД (поглощения) в полосах поглощения. В формуле для нормальной дисперсии (5,68) (соответственно (5,67)) фигурируют вращательные силы (дипольные силы), характеризующие КД (поглощение).

Формула Розенфельда не дает возможности непосредственно вычислить оптическую активность, исходя из строения молекулы, так как для этого нужно знать весь набор энергетических уровней молекулы и соответствующие волновые функции. Необходимо пользоваться приближенными методами расчета β.

Молекулу можно мысленно разбить на атомные группы, между которыми нет обмена электронами, скажем, для белка — на отдельные пептидные группы и аминокислотные радикалы. Тогда β представится в виде суммы [91]

$$\beta=\beta_1+\beta_2+\beta_3+\beta_4, \tag{5,84}$$

где β_1 — вклады отдельных групп, равные нулю, если группы не хиральны (например, группа CH_3). β_2 — «одноэлектронные» члены, появляющиеся вследствие «смешивания» электрических и магнитных дипольных переходов в одной группе, находящейся в асимметричном поле остальных групп. Член β_3 возникает в результате «смешивания» магнитного дипольного перехода в одной группе с электрическим дипольным переходом в другой. Наконец, β_4 определяется одновременным электрическим дипольным возбуждением различных групп. Наиболее существенны вклады β_2 и β_4.

Выражение для β_4 было впервые получено в квантовомеханическом расчете Кирквуда [92]. В дальнейшем было показано, что его можно найти и чисто классическим путем [78, 93]. Рассмотрим электрическое диполь-дипольное взаимодействие анизотропно поляризующихся групп в молекуле. Теория дает

$$\beta_4=\tfrac{1}{6}\sum_{k\neq l}(\alpha_{k1}-\alpha_{k2})(\alpha_{l1}-\alpha_{l2})(\mathbf{r}_{kl}[\mathbf{k}\,\mathbf{l}])(\mathbf{k}T_{kl}\mathbf{l}). \tag{5,85}$$

Здесь k, l — номера групп, которые по предположению обладают аксиальной симметрией, $\mathbf{k}$ и $\mathbf{l}$ — единичные векторы, направленные вдоль осей k-й и l-й групп, α_{k1} — поляризуемость k-й группы вдоль ее оси, α_{k2} — поляризуемость этой группы в направлении, перпендикулярном оси, $\mathbf{r}_{kl}$ — расстояние между k-й и l-й группами. Последний сомножитель описывает диполь-дипольное взаимодействие (см. стр. 191)

$$(\mathbf{k}T_{kl}\mathbf{l}) = \frac{1}{r_{kl}^3}\left\{(\mathbf{k}\mathbf{l}) - \frac{3(\mathbf{k}\mathbf{r}_{kl})(\mathbf{l}\,\mathbf{r}_{kl})}{r_{kl}^2}\right\}. \qquad (5,86)$$

Легко видеть, что при наличии центра или плоскости симметрии выражение (5,85) обращается в нуль. Вклад β_4 в оптическую активность определяется поляризуемостями атомных групп и непосредственно зависит от их геометрического расположения, т. е. от конфигурации и конформации молекулы. Уже отсюда следует большая чувствительность оптической активности к конформационным изменениям.

Смысл формулы (5,85) и ее вывод можно пояснить классическим расчетом, основанным на простой модели [94]. Пусть молекула представляет собой димер, подобный двухосцилляторной модели Куна (см. стр. 293), т. е. состоит из двух одинаковых частиц (k-й и l-й), отстоящих друг от друга на расстояние r и поляризующихся только вдоль своих осей. Частицы-палочки лежат в плоскостях, параллельных xy, и угол между ними составляет 2γ.

Между дипольными моментами $\mathbf{p}_k$ и $\mathbf{p}_l$, индуцированными в частицах, имеется электрическое взаимодействие с энергией

$$V_{kl} = (\mathbf{p}_k T_{kl} \mathbf{p}_l). \qquad (5,87)$$

Эффективное поле, действующее на k-ю частицу, равно

$$\mathbf{E}'_k = \mathbf{E} - T_{kl}\mathbf{p}_l, \qquad (5,88)$$

на l-ю частицу —

$$\mathbf{E}'_l = \mathbf{E} - T_{kl}\mathbf{p}, \qquad (5,89)$$

где $\mathbf{p}_k = \alpha_k \mathbf{E}'_k$, $\mathbf{p}_l = \alpha_l \mathbf{E}'_l$, α_k, α_l — поляризуемости частиц. Для нашей модели $(\mathbf{r}_{kl}[\mathbf{k}\,\mathbf{l}]) = r\sin 2\gamma$, $(\mathbf{k}T_{kl}\mathbf{l}) = \cos 2\gamma/r^3 = T$ и, согласно (5,85),

$$\beta_4 = {}^1/_6 \alpha_k \alpha_l r \sin 2\gamma \cos 2\gamma / r^3. \qquad (5,90)$$

Получим теперь это выражение непосредственно. Электрическое поле волны, направленное вдоль оси x, заставляет электроны обеих частиц колебаться в фазе. В каждой частице индуцируется дипольный момент

$$p_x = \alpha(E\cos\gamma - Tp_x). \qquad (5,91)$$

Поляризуемость осциллирующего электрона находим из уравнения его движения

$$\ddot{x} + \omega_0^2 x = \frac{e}{m} E = \frac{e}{m} E_0 \exp(i\omega t), \tag{5,92}$$

откуда

$$x = \frac{e}{m} \frac{E}{\omega_0^2 - \omega^2}, \quad p_x = ex = \frac{e^2}{m} \frac{E}{\omega_0^2 - \omega^2} = \alpha E$$

и

$$\alpha = \frac{e^2}{m} \frac{1}{\omega_0^2 - \omega^2}. \tag{5,93}$$

Подставляя в (5,91) значения T и α, находим

$$p_x = \frac{e^2}{m} \frac{\cos\gamma}{\omega_0^2 + (e^2/m)(\cos 2\gamma/r^3) - \omega^2} E = \alpha_x E \cos\gamma. \tag{5,94}$$

Результирующий дипольный момент обеих частиц равен

$$P_x = 2p_x \cos\gamma. \tag{5,95}$$

Сравнение α_x с α показывает, что диполь-дипольное взаимодействие изменяет частоту перехода

$$\omega_x^2 = \omega_0^2 + \frac{e^2}{m} \frac{\cos^2\gamma}{r^3}. \tag{5,96}$$

Поле, направленное вдоль оси y, вызывает колебания частиц с противоположными фазами. Имеем

$$p_y = \alpha(E \sin\gamma + Tp_y), \tag{5,97}$$

$$p_y = \frac{e^2}{m} \frac{\sin\gamma}{\omega_0^2 - (e^2/m)(\cos 2\gamma/r^3) - \omega^2} E = \alpha_y E \sin\gamma, \tag{5,98}$$

$$P_y = 2p_y \sin\gamma, \tag{5,99}$$

$$\omega_y^2 = \omega_0^2 - \frac{e^2}{m} \frac{\cos 2\gamma}{r^3}. \tag{5,100}$$

Электрическое поляризационное взаимодействие частиц приводит к расщеплению частоты их колебаний, равному

$$\omega_x - \omega_y \approx \frac{\omega_x^2 - \omega_y^2}{2\omega_0} = \frac{e^2 \cos 2\gamma}{m\omega_0 r^3}. \tag{5,101}$$

Вместо одного колебания с частотой ω_0 возникли колебания с частотами ω_x и ω_y, поляризованные во взаимно перпендикулярных направлениях. Суммарная сила осциллятора по-прежнему равна 2, так как $\cos^2\gamma + \sin^2\gamma = 1$.

Наша модель хиральна и приобретает под действием поля магнитный момент

$$\mathbf{m} = \frac{1}{2c}[\mathbf{r}\dot{\mathbf{P}}] = \frac{1}{c}\boldsymbol{\beta}\dot{\mathbf{E}}. \qquad (5,102)$$

Для составляющей магнитного момента, определяемой колебанием с частотой ω_x (она направлена вдоль оси y), имеем

$$m_{(x)} = -\frac{1}{2c} r \sin\gamma \dot{p}_x = -\frac{\alpha_x}{4c} r \sin 2\gamma \dot{E} = \frac{1}{c}\beta_x \dot{E} \qquad (5,103)$$

и с частотой ω_y —

$$m_{(y)} = \frac{1}{2c} r \cos\gamma \dot{p}_y = \frac{\alpha_y}{4c} r \sin 2\gamma \dot{E} = \frac{1}{c}\beta_y \dot{E}. \qquad (5,104)$$

Следовательно,

$$\beta_x = -\frac{\alpha_x}{4} r \sin 2\gamma, \quad \beta_y = \frac{\alpha_y}{4} r \sin 2\gamma, \quad \beta_z = 0. \qquad (5,105)$$

Интересующая нас величина β_4 есть среднее значение β_x, β_y, β_z. Имеем

$$\beta_4 = {}^1/_3(\beta_x + \beta_y) = {}^1/_{12} r \sin 2\gamma (\alpha_y - \alpha_x) = \\ = {}^1/_{12} r \sin 2\gamma \frac{e^2}{m}\left(\frac{1}{\omega_y^2 - \omega^2} - \frac{1}{\omega_x^2 - \omega^2}\right). \qquad (5,106)$$

Вращательные силы для колебаний с частотами ω_x и ω_y равны по абсолютной величине, но имеют разные знаки — их сумма в согласии с (5,70) равна нулю. Преобразуя (5,106), получаем

$$\beta_4 = {}^1/_{12} r \sin 2\gamma \frac{e^2}{m}(\omega_x^2 - \omega_y^2)\frac{1}{(\omega_y^2 - \omega^2)(\omega_x^2 - \omega^2)} = \\ = {}^1/_6 r \sin 2\gamma \frac{\cos 2\gamma}{r^3}\frac{e^4}{m^2}\frac{1}{(\omega_y^2 - \omega^2)(\omega_x^2 - \omega^2)} \approx {}^1/_6 \alpha^2 r \sin 2\gamma \frac{\cos 2\gamma}{r^3}, \qquad (5,107)$$

т. е. снова приходим к формуле (5,90).

Таким образом, поляризационный вклад β_4 в оптическую активность выражается произведением поляризуемостей. Частоты ω_x и ω_y в дисперсионной формуле отвечают электрическим дипольным переходам, ответственным за поляризуемость. Следовательно, это переходы с большими дипольными силами, соответствующие интенсивным полосам поглощения. Но вращательная сила определяется произведением $(0|\mathbf{p}|j)(j|\mathbf{m}|0)$. При больших значениях $(0|\mathbf{p}|j)$ и, значит, D_j величины $(j|\mathbf{m}|0)$ обычно малы, и наоборот. В оптической активности могут быть существенны слабые полосы с малыми $(0|\mathbf{p}|j)$, но с большими $(j|\mathbf{m}|0)$. Такие полосы не вносят заметного вклада в поляризуемость. β_4 не учитывает вклады слабых полос.

При расчете β_4 сделаны допущения, которые не всегда справедливы. Выражение для диполь-дипольного взаимодействия (5,86) предполагает, что расстояние между диполями сильно превышает их размеры (см. стр. 191). Это может и не выполняться в пределах молекулы. Вместе с тем поляризационная теория применима к исследованию влияния межмолекулярного взаимодействия на оптическую активность [95].

Обратимся к вкладу β_2. Он вычисляется с помощью так называемой *одноэлектронной модели*, предложенной в работе Кондона, Алтара и Эйринга [96] (см. также [83, 84, 97]). Эта теория исходит из квантовомеханической формулы Розенфельда, но ограничивается рассмотрением электронов хромофорных групп молекул, ответственных за длинноволновые полосы поглощения. Хромофорная группа (например, C = O, пептидная связь —NH—CO— и т. д.) сама по себе симметрична и оптической активности не имеет. Но, находясь в асимметричном поле соседних атомов, она дает вклад в β_2. Задача решается методом теории возмущений. Возмущающий потенциал атомов можно построить из потенциалов центральных дипольных и ионных сил. Необходимо знать невозмущенные волновые функции хромофора. Одноэлектронная модель действительно позволяет хорошо описать дисперсию оптической активности и, в особенности, АДОВ (эффект Коттона) и КД в полосе поглощения хромофора. На основе модели удается с достаточной для практических целей точностью вычислять вращательные силы для электронных переходов в хромофорных группах.

Изменение конформации молекулы изменяет указанный возмущающий потенциал. Поэтому одноэлектронная теория эффективно применяется в конформационном анализе. В ряде работ Джерасси и других авторов данные по АДОВ и КД для кетонов, терпенов, стероидов и т. д. были интерпретированы на основе одноэлектронной теории. В результате были определены конформации множества соединений и установлены важные общие правила, связывающие оптическую активность со структурами молекул (см. [98—100]).

Детальный анализ соотношения всех четырех вкладов в β проведен в работах [101, 102].

Современное интенсивное развитие спектрополяриметрии непосредственно связано с исследованиями природных соединений, к которым обратилась органическая химия и молекулярная биология. Развитие спектрополяриметрии вызвано тем, что для характеристики вещества стали применять дисперсию оптической активности (и в особенности АДОВ и КД), а не ограничиваться, как это делалось раньше, значением удельного вращения для одного значения λ. Отметим, что первые систематические исследования дисперсии оптической активности провел

Чугаев, установивший важные закономерности (см., например, [103]). Позднее это направление развивал Кун [104] (см. также [79]).

К современной аппаратуре для измерения вращения и КД — к спектрополяриметрам и дихрографам — предъявляются высокие требования. Необходима большая чувствительность прибора (измерение вращения с точностью до 10^{-4} *град*) и возможность работы в широком интервале длин волн. Так, для белков необходимо вести измерения в области 1800—2300 Å. Эти требования выполнены в лучших приборах, описание которых содержится в [100].

§ 5.6. ТЕОРИЯ ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОПОЛИМЕРОВ

Применительно к полимерам рационально выражать оптическую активность и КД в величинах, отнесенных на один мономер, и вместо молекулярного вращения $[M]$ пользоваться средним вращением мономера, определяемым как

$$[m]=\frac{M_0}{100}[\alpha], \tag{5,108}$$

где M_0 — средний молекулярный вес мономера. Грубый учет влияния растворителя состоит во введении поправки Лорентца, и тогда вместо $[m]$ применяется приведенное среднее вращение мономера

$$[m']=\frac{3}{n^2+2}[m]=\frac{3}{n^2+2}\frac{M_0}{100}[\alpha], \tag{5,109}$$

где n — показатель преломления среды. Для воды при 20 °C $3/(n^2+2)$ меняется от 0,7945 при 6000 Å до 0,7306 при 1850 Å.

Двойная хиральность α-спиралей белков и полипептидов, создаваемая асимметрией L-аминокислотных остатков и асимметрией самой спирали, определяет ДОВ и КД таких молекул. При конформационных изменениях белков происходят резкие изменения ДОВ и КД — эти характеристики обладают высокой конформационной чувствительностью.

Вдали от области собственного поглощения для любой молекулярной системы можно выразить приведенное вращение мономера в виде суммы одночленных формул Друде (ср. (5,68))

$$[m']=\sum_i \frac{a_i\lambda_i^2}{\lambda^2-\lambda_i^2}. \tag{5,110}$$

Разложим это выражение в ряд по степеням $1/(\lambda^2-\lambda_0^2)$, где λ_0 подлежит определению [105]:

$$[m']=\sum_i\left\{\frac{a_i\lambda_i^2}{\lambda^2-\lambda_0^2}+\frac{a_i\lambda_i^2(\lambda_i^2-\lambda_0^2)}{(\lambda^2-\lambda_0^2)^2}+\frac{a_i\lambda_i^2(\lambda_i^2-\lambda_0^2)^2}{(\lambda^2-\lambda_0^2)^3}+\ldots\right\}. \tag{5,111}$$

Ряд быстро сходится, если $\lambda_i \ll \lambda$. Перепишем последнее соотношение в виде

$$[m'] = \frac{a_0\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} + \frac{c_0\lambda_0^6}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^3} + \ldots, \qquad (5{,}112)$$

где

$$a_0\lambda_0^2 = \sum_i a_i\lambda_i^2, \quad b_0\lambda_0^4 = \sum_i a_i\lambda_i^2(\lambda_i^2 - \lambda_0^2), \quad c_0\lambda_0^6 = \sum_i a_i\lambda_i^2(\lambda_i^2 - \lambda_0^2)^2.$$

Если $b_0 = c_0 = \ldots = 0$, то уравнение (5,110) сводится к одночленной формуле Друде

$$[m'] = \frac{a_0\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \equiv \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_0^2}. \qquad (5{,}113)$$

Если $b_0 \neq 0$, но $c_0 = \ldots = 0$, то

$$[m'] = \frac{a_0\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}. \qquad (5{,}114)$$

ДОВ для полиаминокислот в состоянии клубка хорошо описывается формулой (5,113) с $\lambda_0 = 2680$ Å. Для α-спирали Моффит вывел теоретическую формулу, совпадающую с (5,114) [106] и хорошо согласующуюся с опытом. Перепишем ее в виде

$$[m'](\lambda^2/\lambda_0^2 - 1) = a_0 + b_0/(\lambda^2/\lambda_0^2 - 1). \qquad (5{,}115)$$

Функция $[m'](\lambda^2/\lambda_0^2 - 1)$ должна линейно зависеть от $(\lambda^2/\lambda_0^2 - 1)^{-1}$, если выбран правильный параметр λ_0. Совпадение с опытом получается при $\lambda_0 = 2120$ Å и $b_0 = -630$, $a_0 = 630$—650. Уравнение (5,114) можно считать эмпирическим. Моффит исходил из теории экситонного спектра регулярного полипептида (см. стр. 286). Как указывалось выше, Моффит получил расщепление амидных полос α-спирали на компоненты с поляризацией, параллельной и перпендикулярной оси. Для одной такой пары получаем двучленное уравнение Друде

$$[m'] = \frac{a_1\lambda_1^2}{\lambda^2 - \lambda_1^2} + \frac{a_2\lambda_2^2}{\lambda^2 - \lambda_2^2}, \qquad (5{,}116)$$

которое совпадает по форме с (5,114), если параметры a_1 и a_2 имеют противоположные знаки и

$$\lambda_0^2 = \frac{\lambda_1^2 |a_1\lambda_1^2|^{1/2} + \lambda_2^2 |a_2\lambda_2^2|^{1/2}}{|a_1\lambda_1^2|^{1/2} + |a_2\lambda_2^2|^{1/2}}.$$

Таким образом, вообще говоря, $\lambda_0 \neq {}^1/_2(\lambda_1 + \lambda_2)$. Однако если $|a_1\lambda_1^2| \approx |a_2\lambda_2^2|$, то $\lambda_0 \approx {}^1/_2(\lambda_1 + \lambda_2)$, а если $|a_1| = |a_2|$, то $\lambda_0^2 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 - \lambda_1\lambda_2$. В обоих этих случаях можно положить $\lambda_{1,2} = \lambda_0(1 \mp \Delta/2)$ [107] и $\lambda_0 \approx {}^1/_2(\lambda_1 + \lambda_2)$, если $\Delta \ll 1$.

Рассмотрим теоретический расчет более подробно. Если в регулярном гомополимере (N-мере) нет взаимодействия между мономерами, то волновая функция, описывающая его основное электронное состояние, имеет вид

$$\psi_0 = \prod_{i=1}^{N} \varphi_{i0}, \tag{5,117}$$

где φ_{i0} — волновая функция i-го мономера в основном состоянии. При возбуждении i-го мономера, т. е. при его переходе на уровень a, получаем

$$\psi_{ia} = \frac{\psi_0}{\varphi_{i0}} \varphi_{ia}. \tag{5,118}$$

Волновые функции ψ_{ia} совместно вырождены. Функции возбужденного состояния полимера представляются линейной комбинацией ψ_{ia}

$$\psi_{ak} = \sum_{i=1}^{N} c_{iak}\psi_{ia} \quad (k = 1, 2, \ldots, N). \tag{5,119}$$

Возбужденный уровень a в результате резонансного взаимодействия расщепляется на N уровней. Образуется зона. Энергия уровней зоны $\mathscr{E}_{ak}$ и коэффициенты c_{iak} находят из системы N уравнений

$$\sum_{i=a}^{N} c_{iak}V_{i0a,\,j0a} - \mathscr{E}_{ak}c_{jak} = 0 \quad (j, k = 1, 2, \ldots, N), \tag{5,120}$$

где матричный элемент

$$V_{i0a,\,j0a} = (\varphi_{ia}^*\varphi_{i0} \,|\, V_{ij} \,|\, \varphi_{ja}\varphi_{j0}^*) \tag{5,121}$$

характеризует обмен возбуждением между i-м и j-м мономерами. V_{ij} — потенциальная энергия диполь-дипольного взаимодействия возбужденных мономеров. Энергии уровней зоны равны

$$\mathscr{E}_{ak} = \mathscr{E}_a + \mathscr{E}'_{ak} + G, \tag{5,122}$$

где $\mathscr{E}_a$ — энергия перехода $0 \to a$ в мономере, $\mathscr{E}'_{ak}$ — энергия k-го подуровня зоны, а величина

$$G = \sum_{i \neq j} \{(|\varphi_{ia}|^2 |V_{ij}| |\varphi_{j0}|^2) - (|\varphi_{i0}|^2 |V_{ij}| |\varphi_{j0}|^2)\} \tag{5,123}$$

выражает разность энергий взаимодействия возбужденного и невозбужденного i-го мономера с остальными.

Дипольная сила перехода равна

$$D_{ak} = \frac{1}{N}\left|\left(\psi_0\left|\sum_{i=1}^{N}\mathbf{p}_i\right|\psi_{ak}\right)\right|^2 \qquad (5,124)$$

и вращательная сила

$$R_{ak} = \frac{1}{N}\operatorname{Im}\left\{\left(\psi_{ak}\left|\sum_{i=1}^{N}\mathbf{m}_i\right|\psi_0\right)\left(\psi_0\left|\sum_{i=1}^{N}\mathbf{p}_i\right|\psi_{ak}\right)\right\}. \qquad (5,125)$$

Описанная экситонная теория эквивалентна поляризационному приближению (см. стр. 299), распространенному на вырожденные состояния.

Наличие дальнего порядка в линейной цепи позволяет упростить систему уравнений (5,120) путем учета трансляционной симметрии и наложения циклических граничных условий. Именно так и поступал Моффит. Однако потом было показано, что при расчете вращательной (но не дипольной) силы нельзя пользоваться циклическими граничными условиями [108]. Строгое решение имеет вид

$$[M_a] = \frac{b_a\omega_a^2\omega^2}{(\omega_a^2-\omega^2)^2} = \frac{b_a\lambda_a^2\lambda^2}{(\lambda^2-\lambda_a^2)^2}, \qquad (5,126)$$

где

$$b_a = b_a^{(1)} + b_a^{(2)},$$

$$b_a^{(1)} = -\frac{192N_1}{\hbar^2c^2}\left|\mathbf{p}_{0a}\right|^2\rho e_{at}e_{av}\sum_{j\neq i}\sum_{i}V_{i0a,\,j0a}\sin^2\left(\frac{\pi(j-i)}{Q}\right),$$

$$b_a^{(2)} = \frac{48N_1}{\hbar^2c^2}\left|\mathbf{p}_{0a}\right|^2 z\left(e_{at}^2+e_{ar}^2\right)\sum_{j\neq i}\sum_{i}V_{i0a,\,j0a}(j-i)\sin\left(\frac{2\pi(j-i)}{Q}\right),$$

ρ — диаметр α-спирали, z — ее шаг, e_{av}, e_{at}, e_{ar} — косинусы углов, образованных дипольным моментом перехода $\mathbf{p}_{0a}$ соответственно с осью спирали, с касательной к спирали и с ее радиусом, Q — число мономеров на виток.

Формуле (5,126) отвечают симметричная кривая АДОВ и асимметричная КД (рис. 5.17).

Применение циклических граничных условий приводило к потере члена $b_a^{(2)}$.

Развивая эти идеи, Тиноко и его соавторы провели более точные расчеты вращательных сил и КД для α-спиралей [109—111].

Рассмотрено не только резонансное взаимодействие одинаковых электронных уровней в разных мономерах, но и неэкситонное взаимодействие разных уровней. Как уже сказано, экситонное взаимодействие учитывается волновыми функциями нулевого приближения теории возмущений; для оценки неэкситонного вклада необходимо применить волновые функции первого приближения [108].

Расчет вращательных сил R_{ak} зависит от того, является ли рассматриваемый переход $0 \to a$ «сильным» оптическим переходом с большим $\mathbf{p}_{0a}$ или «слабым» переходом с малым $\mathbf{p}_{0a}$, но с большим $\mathbf{m}_{0a}$. Для «сильных» переходов можно выделить экситонный вклад R^e_{ak}, обусловленный взаимодействием уровней a в разных мономерах:

$$R^e_{ak} = \frac{\omega_a}{2c} \sum_{j \neq l} \sum_{l} c_{lak} c_{jak} (\mathbf{r}_l - \mathbf{r}_j) [\mathbf{m}_{l0a} \mathbf{m}_{j0a}]; \tag{5,127}$$

здесь $\mathbf{r}_l - \mathbf{r}_j$ — расстояние между l-м и j-м звеньями, $k = 1, 2, \ldots, N$ — номер уровня, возникшего в результате экситонного расщепления. Частоты переходов ω_a и коэффициенты c_{lak} находят из собственных значений и собственных векторов матрицы N-го порядка, элементы которой определяются энергией взаимодействия уровней, отвечающих сильным переходам у разных мономеров. Сумма экситонных вращательных сил по всем значениям k от 1 до N равна нулю — эти вклады «консервативны».

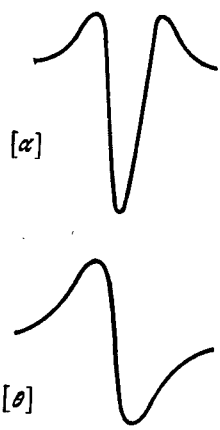


Рис. 5.17. Графики АДОВ и КД, вычисленные для α-спирали.

Неэкситонное взаимодействие уровня a с другими уровнями b, на которые разрешены переходы $0 \to b$, дает вклады типа

$$R^b_{ak} = -\frac{1}{c\hbar} \sum_{l} \sum_{j} \sum_{l \neq j} c_{lak} c_{jak} \frac{\omega_a \omega_b V_{j0a,\, l0b} (\mathbf{r}_l - \mathbf{r}_l) [\mathbf{m}_{l0b} \mathbf{m}_{l0a}]}{\omega_b^2 - \omega_a^2}. \tag{5,128}$$

Переходы, соответствующие полосам в далекой ультрафиолетовой области спектра, могут существенно влиять на вращательную силу перехода $0 \to a$. Оценку соответствующих вкладов R^{ν}_{ak} можно провести с помощью поляризационной теории. Неэкситонные вклады условию консервативности не удовлетворяют [112, 113]. На рис. 5.18 показаны типичные кривые АДОВ и КД для экситонного и неэкситонного взаимодействия, для консервативного и неконсервативного вкладов [113].

Вклады во вращение «слабых» переходов можно вычислить, отвлекаясь от расщепления, т. е. суммируя по k; тогда получаем

$$R_{ba}^{(1)} = -\frac{1}{\hbar}\sum_{j\neq l}\sum_{l}\frac{\mathrm{Im}\,(V_{lab,\,j00}\mathbf{m}_{la0}\mathbf{p}_{l0b})}{\omega_b-\omega_a}, \qquad (5{,}129)$$

$$R_{ba}^{(2)} = -2\sum_{j\neq l}\sum_{l}\frac{\omega_b\,\mathrm{Im}\,(V_{l0a,\,j0b}\mathbf{m}_{la0}\mathbf{p}_{j0b})}{\omega_b^2-\omega_a^2}; \qquad (5{,}130)$$

$R_{ba}^{(1)}$ — основной член в одноэлектронной теории оптической активности (см. стр. 301).

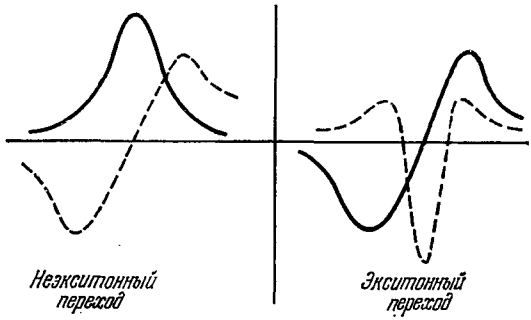


Рис. 5.18. Кривые АДОВ (сплошные линии) и КД (пунктир) для экситонного и неэкситонного вкладов во вращение.

Экситонная теория применялась для расчетов АДОВ и КД α-спирали [111] и β-формы [114] полипептидов для поли-L-пролина [115] (см. также [116, 117]).

В работе [118] были проведены детальные расчеты вкладов в КД и АДОВ для α-спирали, вносимых $\pi\pi^*$-переходами в пептидных группах. Учитывались как экситонные, так и неэкситонные взаимодействия. В табл. 5.5 приведены полученные результаты. В этой таблице $\Delta\lambda$ — разность между длиной волны экситонных составляющих, отвечающих $\pi\pi^*$-переходу, и длиной волны $\lambda_{\pi\pi^*}^{a}$ в данной группе в отсутствие взаимодействия. Суммы R равны нулю. Хорошее согласие с опытным значением КД для $\pi\pi^*$-перехода (1900 Å) получается при полуширине полосы Γ (см. стр. 296), равной 3500 $см^{-1}$ ($\approx$130 Å). Эти результаты согласуются с найденными в работе [114], хотя в ней учитывалось только взаимодействие 10 ближайших соседей, а в [118] — все взаимодействия в цепи. В последнем столбце таблицы приведены неэкситонные вклады, обусловленные взаимодействием $\pi\pi^*$-перехода с другими переходами в пептидной группе и с анизотропно поляризуемыми группами в α-спирали. Мы видим, что неэкситонные вклады в этом случае сравнительно малы.

Таблица 5.5

Вычисленные для α-спирали значения вращательных сил R (10^{-40} эрг·см^3), обусловленных экситонным взаимодействием для ππ*-переходов, и неэкситонными взаимодействиями

Число звеньев в цепи	Расщепление Δλ, Å	Экситонный вклад	Неэкситонный вклад
20	−52	−221	3,8
	−5	321	−8,6
	+72	−100	−17,1
40	−45	−393	
	−16	496	
	+77	−103	

На рис. 5.19 показаны вычисленная и экспериментальная кривые КД для α-спирали в области 1900—2300 Å. В области 1900—2100 Å согласие между ними вполне удовлетворительно. Два наблюдаемых максимума КД (положительный с λ 1900 Å и отрицательный с λ 2080 Å) обусловлены расщеплением экситонного вклада во вращение, определяемое ππ*-переходом. Наблюдаемый отрицательный максимум КД при 2200 Å обусловлен «слабым» nπ*-переходом. Расчет дает для него $R_{n\pi^*} = -3 \cdot 10^{-40}$ СГС [111, 114], а опыт $R_{n\pi^*} = -15 \cdot 10^{-40}$ СГС. Расхождение связано с неточностью волновых функций, использованных в [111, 114].

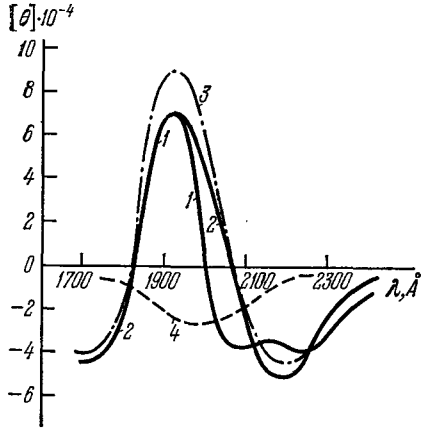


Рис. 5.19. Вычисленный (*1*) и экспериментальный (*2*) графики КД для α-спирали.

Кривая *1* есть сумма экситонного (*3*) и неэкситонного (*4*) вкладов.

Вдали от области поглощения ДОВ для α-спирали достаточно точно выражается формулой Моффита с $b_0 = -630$. Для статистического клубка b_0 мало и ДОВ описывается простой формулой Друде.

Другая регулярная форма полипептидной цепи — β-форма в принципе описывается также формулой Моффита, но с малым значением b_0. Главное отличие β-формы от клубка состоит в увеличенном правом вращении плоскости поляризации [119—127].

Теоретический расчет ДОВ параллельной и антипараллельной β-форм проведен в [128], расчет КД — в [118]. Расчет дает для b_0 значение —30, хорошо согласующееся с опытом. Подробный анализ КД в случае $\pi\pi^*$-перехода дает результаты, приведенные в табл. 5.6.

Таблица 5.6

Вращательные силы (в 10^{-40} *эрг·см*^{3})

	Δλ, Å	Экситонный вклад	Неэкситонный вклад	Сумма
Параллельная	—20	+4,4	+17,0	+21,4
β-форма	+95	—4,4	+1,9	—2,5
Сумма		0	+18,9	+18,9
Антипараллельная	—135	—1,6	+9,6	+8,0
β-форма	+15	+1,6	+14,0	+15,6
Сумма		0	+23,6	+23,6

У β-формы доминирует неэкситонный вклад. В экспериментальных кривых КД антипараллельной β-формы поли-L-лизина и фиброина шелка [125] наблюдаются положительные максимумы КД в области $\pi\pi^*$-перехода 1900—2000 Å с R, равным $15 - 25 \cdot 10^{-40}$ СГС и более слабые отрицательные максимумы с $R = -6 \cdot 10^{-40}$ СГС в области 2150—2200 Å. Последние определяются $n\pi^*$-переходом [129].

Общая теория оптической активности клубкообразных макромолекул, основанная на статистическом усреднении по конформациям тензора, определяющего оптическую активность, развита в работе [130]. Теория КД для клубкообразных полипептидов показывает возможность применения экситонной теории к таким системам, причем можно ограничиться рассмотрением сравнительно малого ансамбля коротких неупорядоченных цепей. Существенны как экситонный, так и неэкситонные вклады [131].

Для понимания оптической активности нуклеиновых кислот необходимо рассмотреть явления *индуцированной оптической активности* (ИОА). Симметричные, т. е. лишенные хиральности, молекулы красителей, будучи присоединены к α-спиральным полипептидам, обнаруживают АДОВ и КД в областях собственного поглощения. Этот эффект исчезает при денатурации комплекса α-спирали с красителем [132, 133]. Рассматривалось несколько способов присоединения красителя (симметричного хромофора) к α-спирали: 1) взаимодействие неагрегированного красителя с пептидным остатком вблизи асимметричного центра, 2) образование суперспирали на α-спирали путем присоединения

молекул красителя, 3) агрегация молекул красителя с образованием спирального полимера, индуцируемого в одной точке α-спиралью [132, 133]. Опыты, поставленные при весьма малых концентрациях красителя акридинового оранжевого (по сравнению с концентрацией белка), однозначно подтвердили первую модель [134]. О том же свидетельствует ИОА простетических групп и коферментов. АДОВ и КД в области поглощения пиридоксальфосфата — кофермента аспартатаминотрансферазы послужили ценным источником информации о структуре активного центра этого фермента (см. стр. 378) [135]. На рис. 5.20 показаны кривые АДОВ дезоксигемоглобина, оксигемоглобина и карбоксигемоглобина в областях поглощения простетической

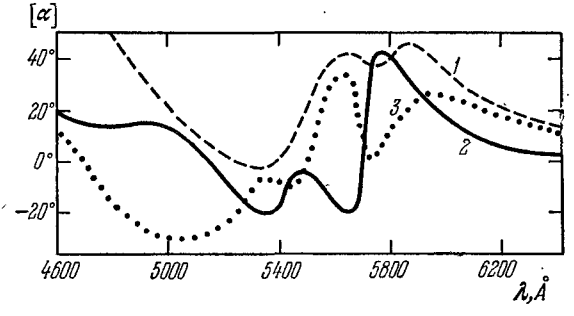


Рис. 5.20. Графики АДОВ дезоксигемоглобина (*1*), оксигемоглобина (*2*) и карбоксигемоглобина (*3*).

группы гема [136]. Под влиянием структурной асимметрии биополимера возникает асимметрия электронной оболочки хромофора. К аналогичным результатам приводят исследования АДОВ для комплексов ДНК с акридиновыми красителями [137]. В этом случае удалось наблюдать в комплексах асимметричные димеры красителей, для которых АДОВ симметрична.

Квантовохимический расчет, в котором молекула красителя моделируется потенциальным ящиком, подвергаемым асимметричному возмущению, подтверждает сказанное [138].

В сущности, ИОА рассматривается в одноэлектронной модели (см. стр. 301). Недавно теория ИОА была углублена и усовершенствована [139]. Показано, что в строгой теории ИОА необходимы решение электронно-колебательной задачи в адиабатическом приближении, учет изменения равновесного расположения атомных ядер вследствие асимметричного возмущения. Вращательная сила выражается формулой типа

$$R_{v_1, \ldots, v_s} = \left[A + \sum_q B_a Q_a^{(0)} + \sum_q C_a y_a (1 - v_a / y_a^2)\right] W_{v_1, \ldots, v_s}, \quad (5{,}131)$$

где $Q_a^{(0)}$ — нулевая амплитуда a-го нормального колебания, v_a — колебательное квантовое число, $y_a = \Delta Q_a / Q_a^{(0)}$ — относительное изменение амплитуды, W — величина, пропорциональная интенсивности поглощения. Суммирование проводится по всем нормальным колебаниям. В одноэлектронной модели рассматривалась двухатомная хромофорная группа (см. стр. 301), и новые поправочные члены обращались в нуль. Теория показывает, что спектр КД в случае ИОА может существенно отличаться от полосы поглощения, если $v_a \neq 0$. Это действительно наблюдается.

В связи со сказанным необходимо подчеркнуть, что учет колебательной структуры электронных полос поглощения в теории оптической активности представляет весьма важную, но еще не решенную задачу (ср. [85]).

Оптическая активность нуклеозидов, нуклеотидов, ДНК и РНК характеризуется прежде всего эффектами Коттона, т. е. АДОВ и КД в областях поглощения вблизи 2600 Å — в полосах поглощения азотистых оснований. Плоские азотистые основания неактивны, АДОВ и КД возникают вследствие присоединения оснований к асимметричным сахарам. Следовательно, эти эффекты определяются ИОА. Действительно, замена β-рибозы или β-дезоксирибозы на соответствующие α-соединения меняет знак эффекта [140].

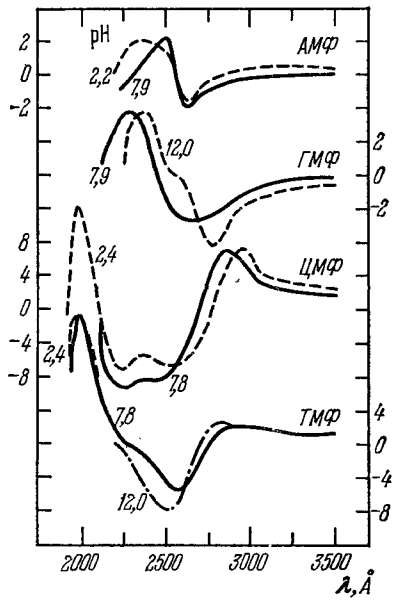


Рис. 5.21. Графики АДОВ для четырех L-дезоксимононуклеотидов.

Числа у кривых указывают значения pH.

Графики АДОВ для четырех 5′-дезоксимононуклеотидов показаны на рис. 5.21 [141]. Эффект чувствителен к pH среды.

Джонсон и Тиноко развили упрощенную теорию КД для полинуклеотидов и, следовательно, для ДНК и РНК [142]. По-прежнему учитываются как экситонные (консервативные), так и неэкситонные (неконсервативные) вклады. Предполагается, что для каждого мономера КД можно описать соотношением $vf(\nu - \nu_k)$, где функция f задает форму полосы, ν_k — частота в максимуме k-го мономера, и круговой дихроизм полимера

определяется как

$$\varepsilon_L - \varepsilon_D = \nu \sum_{k=1}^{N} R_k f(\nu - \nu_k). \qquad (5,132)$$

Величину $(\varepsilon_L - \varepsilon_D)/\nu$ разлагают в ряд Тейлора вблизи средней частоты $\bar{\nu}$ в исследуемой области спектра

$$\frac{\varepsilon_L - \varepsilon_D}{\nu} = \sum_{k=1}^{N} R_k f(\nu - \bar{\nu}) - \sum_{k=1}^{N} R_k \frac{\partial f(\nu - \bar{\nu})}{\partial \nu}(\nu_k - \bar{\nu}) + \ldots \qquad (5,133)$$

Такое представление позволяет избежать необходимости нахождения собственных значений. При вычислении вращательных

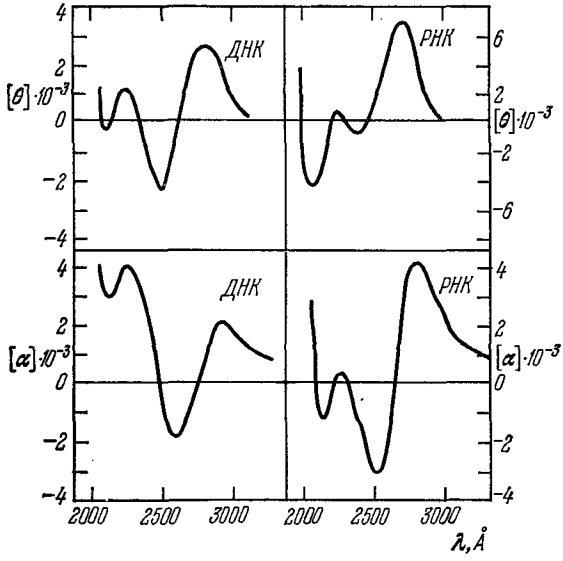


Рис. 5.22. Графики КД и АДОВ для ДНК и РНК.

сил применяется потенциал взаимодействия монополей

$$V_{i0a,\,j0b} = \sum_{s,\,t} \frac{\rho_s^{i0a}\rho_t^{j0b}}{r_{st}},$$

где ρ_s^{i0a} — заряд монополя s-й группы в i-м мономере при переходе $0 \to a$, r_{st} — расстояние между этой группой и t-й группой j-го мономера.

Теория дает

$$\varepsilon_L - \varepsilon_D = \frac{\pi\nu}{c} f(\nu - \bar{\nu}) \sum_{i,j}{}' \sum_a \nu_{i0a} \left\{ \sum_{s,t} \frac{\rho_s^{i0a}}{r_{st}^3} \mathbf{r}_{st} \right\} \alpha_t^j \mathbf{p}_{i0a} \mathbf{R}_{ij} +$$

$$+ \frac{\pi\nu}{2c} \frac{\partial f(\nu - \bar{\nu})}{\partial \nu} \sum_{i,j}{}' \sum_{a,b} \nu_{i0a} \left\{ \sum_{s,t} \frac{\rho_s^{i0a} \rho_t^{j0b}}{r_{st}} \right\} \mathbf{R}_{ij} [\mathbf{p}_{i0a} \mathbf{p}_{j0b}], \quad (5{,}134)$$

где α_t^j — поляризуемость t-й группы s-го полимера.

Таким образом, для расчета нужно знать лишь свойства мономеров и их взаимную ориентацию. Функция $f(\nu - \bar{\nu})$ берется как среднее по полосам всех четырех оснований. Удовлетворительное согласие теории с опытом свидетельствует о том, что КД для полинуклеотидов определяется в основном $\pi\pi^*$-, а не $n\pi^*$-переходами. На рис. 5.22 показаны кривые КД и АДОВ для ДНК и РНК [143]. Относительная малость этих эффектов объясняется взаимной компенсацией вращательных сил, отвечающих ряду полос.

§ 5.7. СПЕКТРОПОЛЯРИМЕТРИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Итак, для различных конформаций полипептидов графики АДОВ и КД различны (рис. 5.23). В табл. 5.7 [144] приведены характерные значения минимумов и максимумов на кривых АДОВ.

Таблица 5.7

Характерные величины АДОВ для разных конформаций L-полипептидов

Конформация	Минимум, Å	Точка пересечения кривой АДОВ с осью абсцисс ([M]=0), Å	Максимум, Å
α-спираль	2320—2330 1820—1840	2240 1900	1980—1990
β-форма	2290—2300 1900	2200 1960	2050
Неупорядоченная	2380 (малый) 2040—2050	— 1980	2280 (малый) 1890
Поли-L-пролин II	2100	2030	1940

Таким образом, измерение АДОВ дает сведения о конформации системы. Очевидно, что КД дает более четкую информацию, так как он определяется лишь вращательной силой, соответствующей данной полосе. Чистая α-спираль характеризуется эллиптичностями $[\theta] = 3300(\varepsilon_L - \varepsilon_D)$, равными для 2060 Å —36 000, для 2220 Å —38 000 и для 1900 Å +71 000 [145]. Эти

три значения эллиптичности типичны для α-формы. Хорошей мерой степени α-спиральности является [θ] для 2220 Å, обозначаемая $[\theta]_{2220}$, — остаточная эллиптичность для белка в неупорядо-

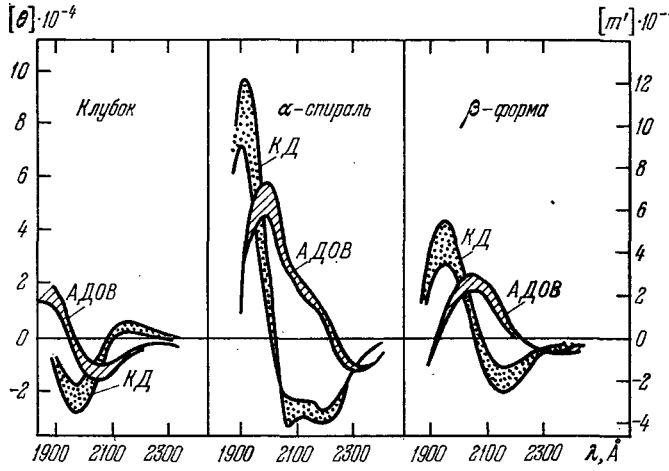


Рис. 5.23. Графики АДОВ и КД для L-полипептидов в различных конформациях.

ченном состоянии. В работе [145] приведен ряд таких данных (табл. 5.8) (см. также [146]).

Таблица 5.8

КД для белков в различных условиях

Белок	Растворитель	$[\theta]_{2220}\cdot 10^4$	Доля α-спиралей x
Лизоцим	pH 7,0, фосфатный буфер	—1,30	(1,30—0,29)/3,8 = 0,27
	8*M* мочевина	—1,26	(1,26—0,29)/3,8 = 0,26
	5*M* гуанидин HCl	—0,29	0
	2-хлорэтанол	—3,0	(3,0—0,29)/3,8 = 0,7
Инсулин	pH 7,0, фосфатный буфер	—1,46	(1,46—0,64)/3,8 = 0,21
	8*M* мочевина	—0,64	0
Гемоглобин	pH 7,0, фосфатный буфер	—3,1	(3,1—0,34)/3,8 = 0,72
	8*M* мочевина	—0,34	0

Изучение КД позволяет определить содержание не только α-спиралей, но и β-форм и неупорядоченных звеньев в белке.

Для этой цели развит эмпирический метод [147]. Строятся графики КД для трех белков (рибонуклеаза, лизоцим и миоглобин), для которых доли α- и β- и неупорядоченной форм x, y, z известны из рентгеновских данных. Составляют систему уравнений для трех белков

$$[\theta]_1 = x_1[\theta]_\alpha + y_1[\theta]_\beta + (1 - x_1 - y_1)[\theta]_r,$$
$$[\theta]_2 = x_2[\theta]_\alpha + y_2[\theta]_\beta + (1 - x_2 - y_2)[\theta]_r,$$
$$[\theta]_3 = x_3[\theta]_\alpha + y_3[\theta]_\beta + (1 - x_3 - y_3)[\theta]_r.$$

Из экспериментальных значений $[\theta]_1$, $[\theta]_2$, $[\theta]_3$ для любых λ и заданных значений x и y находим параметры $[\theta]_\alpha$, $[\theta]_\beta$, $[\theta]_r$ для любых λ. С помощью этого метода интерпретации КД были найдены значения x и y для карбоксипептидазы A и α-химотрипсина, хорошо согласующиеся с результатами, полученными методом рентгенографии.

Более доступны конформационные определения по кривым ДОВ вне области собственного поглощения. Пользуясь уравнением Моффита, можно оценить долю α-формы x_α как отношение измеренного значения b_0 к величине b_0 α-спирали

$$x_\alpha = b_0/b_0^\alpha = -b_0/630.$$

Вместе с тем константу a_0 для частично спирализованного белка можно представить в виде

$$a_0 = a_0^{\text{ак}} + x_\alpha a_0^\alpha,$$

где $a_0^{\text{ак}}$ определяется вращением, обусловленным самими аминокислотными остатками. Иными словами, для частично спирализованного белка

$$[M] = a_0^{\text{ак}} \frac{\lambda_1^2}{\lambda^2 - \lambda_1^2} + x_\alpha \left(a_0^\alpha \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0^\alpha \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \right). \quad (5{,}135)$$

Разлагая первый член в ряд по $(\lambda^2 - \lambda_0^2)^{-1}$, получаем

$$[M] = a_0^{\text{ак}} \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0^{\text{ак}} \frac{\lambda_0^4}{(\lambda_0^2 - \lambda_0^2)^2} + x_\alpha \left(a_0^\alpha \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0^\alpha \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \right). \quad (5{,}136)$$

Соответственно

$$x_\alpha = \frac{b_0 - b_0^{\text{ак}}}{b_0^\alpha - b_0^{\text{ак}}} = -\frac{b_0 - b_0^{\text{ак}}}{630}.$$

Обычно $b_0^{\text{ак}}$ мало и лежит в пределах ± 50. В работе [148] было применено иное выражение, не имеющее, однако, принципиальных отличий от приведенного.

Величине a_0^{α} можно с достаточными основаниями приписать значение 630—650 *град·см²·моль⁻¹*. Величина $a_0^{\text{ак}}$ находится из данных о ДОВ для денатурированного белка.

При построении зависимости $[M]\,(\lambda^2/\lambda_0^2 - 1)$ от $(\lambda^2/\lambda_0^2 - 1)^{-1}$ получается прямая линия с наклоном $x_\alpha b_0^{\alpha}$; отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен $a_0^{\text{ак}} + x_\alpha a_0^{\alpha}$. Таким образом, x_α можно определить двумя независимыми способами. Следует отметить, что присутствие ароматических аминокислотных остатков сильно влияет на значения констант Моффитта.

Другой эмпирический способ определения x_α основан на применении одночленной формулы Друде

$$[M] = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$$

(K — константа) в предположении о линейной зависимости λ_0 от x_α. Для $x_\alpha = 0{,}4$ $\lambda_0 = 2680$ Å, для $x_\alpha = 0{,}0$ (клубок) $\lambda_0 = 2120$ Å.

Блоут и Шехтер предложили применять для определения x_α двучленную формулу Друде [130, 149, 150]. Вместо эффективного значения λ_0 в этой формуле фигурируют экспериментально наблюдаемые максимумы поглощения $\lambda_1 = 1930$ Å и $\lambda_2 = 2250$ Å. Имеем

$$[M] = \frac{a_{1930}\lambda_1^2}{\lambda^2 - \lambda_1^2} + \frac{a_{2250}\lambda_2^2}{\lambda^2 - \lambda_2^2}, \qquad (5{,}137)$$

причем $a_{1930} > 0$, $a_{2250} < 0$. Эти константы оказываются связанными линейным соотношением. В водных растворах полиаминокислот (диэлектрическая проницаемость $\varepsilon > 30$)

$$a_{2250} = -0{,}55a_{1930} - 430, \qquad (5{,}138)$$

в органических растворителях ($\varepsilon < 30$)

$$a_{2250} = -0{,}55a_{1930} - 280. \qquad (5{,}139)$$

Однако последнее соотношение менее надежно [144]. На основе данных для поли-L-глутаминовой кислоты в воде при pH 4 (спираль) и pH 7 (клубок) Шехтер и Блоут определяют x_α как

$$x_\alpha = \frac{a_{1930} + 750}{3650} \qquad (5{,}140)$$

или

$$x_\alpha = -\frac{a_{2250} + 60}{1990}. \qquad (5{,}140\text{а})$$

Предполагается, что оба эти значения совпадают и, следовательно, экспериментальные значения a_{1930} и a_{2250} должны удовле-

творять линейной зависимости (5,138), если белок содержит только α-спиральную и неупорядоченную конформации. Отклонение от прямой свидетельствует о наличии других структур, например β-формы. В действительности метод (равно как и метод определения a_0 при помощи уравнения Моффитта) слишком груб для получения таких выводов (дальнейшие подробности см. в [133, 144]).

В табл. 5.9 сопоставлены значения x_α для ряда белков, определенные различными методами. Эти данные находятся, в общем, в разумном согласии с результатами рентгеноструктурного анализа для белков, отмеченных звездочками.

Таблица 5.9

Степень α-спиральности белков в водном растворе

Белок	b_0	a_0	a_{1930}	a_{2250}
Тропомиозин	0,90	0,90	0,85	0,85
Гемоглобин *	0,70—0,80	—	—	—
Миоглобин *	0,70—0,80	—	—	—
Альбумин плазмы	0,45	0,60	0,55	0,55
Инсулин	0,40	0,60	—	—
Фибриноген	0,35	—	0,35	0,30
Овальбумин	0,30	0,50	—	—
Лизоцим *	0,30	0,40	—	—
Гистон	0,20	0,30	—	—
Рибонуклеаза *	0,15	0,15	—	—
Химотрипсиноген	0,10	0,10	—	—
β-лактоглобулин	0,0—0,1	0,70	0,30	0,20

Таким образом, исследование ДОВ, АДОВ и КД эффективно при определении α-спиральности белков и полипептидов. С другой стороны, весьма перспективно изучение ИОА комплексов белков с красителями и ионами металлов, ИОА коферментов и простетических групп. Такие исследования дают сведения о конформациях и в сочетании с химией позволяют расшифровать события, протекающие в активном центре ферментов (см. гл. 6 и [135]). Изучению структуры белков методом КД посвящен обзор [272].

Недавно начались работы по изучению оптической активности полипептидов в близкой инфракрасной области спектра (в водных растворах до 1,2 *мкм* и в органических растворителях 2,2 *мкм*) [151]. Так как оптическая активность определяется отношением размеров молекулы к длине волны (см. стр. 292), в ИК-области оптическая активность есть малый эффект. Малы и вращательные силы, отвечающие не электронным, а

колебательным переходам. Тем не менее полученные результаты представляются обнадеживающими; возможно, что новый метод позволит определять содержание β-форм в белках.

АДОВ и КД различны для ДНК и РНК (см. стр. 314) и позволяют изучать конформации последних. Теоретическая интерпретация КД для ДНК и РНК в водном растворе согласуется с коиформациями, установленными рентгенографически (см. [273]).

Изучение олигонуклеотидов, выявившее, в частности, различия АДОВ и КД для 16 динуклеотидов [152, 153], дает основания надеяться на получение сведений о первичной структуре фрагментов нуклеиновых кислот. По-видимому, оптическую активность одноцепочечных полимеров можно представить в виде суммы вкладов димеров [154].

Спектрополяриметрия позволила получить интересные сведения о состоянии нуклеиновых кислот в рибосомах [155, 157], вирусах [157], нуклеогистонах [158] и т. д.

Наряду с естественной оптической активностью вращение плоскости поляризации и КД в магнитном поле оказываются очень ценными методами исследования биополимеров, прежде всего гемсодержащих белков. Эти явления описаны в §§ 7.3, 7.4.

§ 5.8. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Сложные молекулы характеризуются большим числом колебательных степеней свободы, сильным взаимодействием колебаний и поэтому непрерывным перемещением колебательной энергии от одной степени свободы к другой. Соответственно колебательные уровни энергии сложных молекул образуют, как правило, сплошную совокупность. Электронное и колебательные движения взаимодействуют друг с другом. Разделение этих видов движения, с хорошей степенью приближения реализуемое в случае простых молекул, оказывается, в сущности, невозможным для сложных молекул. Это связано с большим запасом колебательной энергии, приближающимся к величине, достаточной для возбуждения электронной оболочки (см. также стр. 400) [159, 160].

Таким образом, спектры флуоресценции, равно как и спектры поглощения сложных молекул, размыты и лишены тонких деталей (это не относится к линейчатым спектрам Шпольского, наблюдаемым в особых условиях [161]). Информативными оказываются не столько длины волн максимумов полос, сколько интенсивность, поляризация и длительность свечения.

Интенсивность флуоресценции характеризуется величиной квантового выхода γ. Допустим, что в момент $t=0$ имеется $n(0)$ возбужденных молекул. Если вероятность перехода за 1 *сек* из

возбужденного состояния в невозбужденное с излучением кванта света есть f, а вероятность безызлучательного перехода g, то

$$dn = -fn\,dt - gn\,dt \tag{5,141}$$

и

$$n(t) = n(0)\exp[-(f+g)t]. \tag{5,142}$$

Средняя длительность возбужденного состояния

$$\tau = \int_{t=0}^{\infty} t\,dn \Big/ \int_{t=0}^{\infty} dn = \frac{1}{f+g}. \tag{5,143}$$

Интенсивность флуоресценции убывает экспоненциально. В большинстве случаев τ равно по порядку величины 10^{-8}—10^{-9} *сек*, но может быть и гораздо выше.

Квантовый выход выражается отношением числа переходов с излучением к общему числу переходов

$$\gamma = f/(f+g). \tag{5,144}$$

В растворе вследствие взаимодействия с молекулами растворителя устанавливается равновесное распределение молекул по их запасам колебательной энергии. Это распределение не зависит от избытка колебательной энергии, полученной при возбуждении, и, следовательно, от длины волны $\lambda_{возб}$ возбуждающего света. Следовательно, τ и γ также не зависят от $\lambda_{возб}$ (закон Вавилова).

Флуоресцентное излучение сложных молекул (в частности, красителей) поляризовано даже при естественном возбуждающем свете. Теория поляризованной люминесценции детально разработана Вавиловым [162] (см. также [163]). Возбуждающий свет поглощается молекулами, определенным образом ориентированными по отношению к электрическому вектору **E** световой волны. После поглощения энергия излучается в результате другого электронного перехода, которому отвечает, вообще говоря, иная поляризация в молекуле, т. е. иное направление дипольного момента перехода. Люминесценция поляризована, если время жизни возбужденного состояния, т. е. время передачи энергии от поглощающего к излучающему диполю, мало по сравнению с временем переориентации молекулы.

Степень поляризации выражается величиной

$$P = \frac{J_z - J_x}{J_z + J_x}, \tag{5,145}$$

где J_z и J_x — интенсивность излучения с составляющими электрического вектора вдоль осей z и x при направлении падающего света вдоль оси y. Простой расчет показывает, что предельное значение P при естественном падающем свете для

неподвижных молекул равно $^1/_3$. Вращательное движение люминесцирующих молекул или групп деполяризует свечение. Теория приводит к формуле Левшина — Перрена [162, 163] (для естественного падающего света)

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} + {}^1/_3\right)\frac{kT}{V\eta}\tau; \qquad (5,146)$$

здесь P — наблюдаемая степень поляризации, P_0 — ее предельное значение в отсутствие деполяризации, т. е. при $T \to 0$ или при вязкости среды $\eta \to \infty$, V — молекулярный объем, τ — время жизни возбужденного состояния.

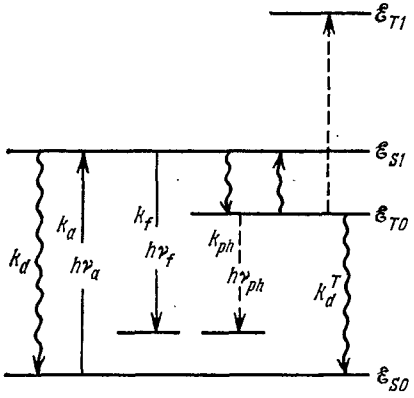


Рис. 5.24. Схема энергетических переходов при люминесценции.

$\mathscr{E}_{S0}$, $\mathscr{E}_{S1}$ — синглетные уровни, $\mathscr{E}_{T0}$, $\mathscr{E}_{T1}$ — триплетные уровни, $h\nu$ — кванты, k — константы скорости соответствующих переходов. Волнистыми стрелками показаны безызлучательные переходы.

Таким образом, степень поляризации убывает с увеличением подвижности излучающей молекулы и может служить мерой подвижности.

Безызлучательные переходы, делающие квантовый выход γ меньшим единицы, сводятся к интерконверсии и деградации световой энергии [164]. Молекула, возбужденная фотоном $h\nu_a$ до некоторого синглетного уровня $\mathscr{E}_{S1}$, может с вероятностью f истратить эту энергию в результате флуоресценции, т. е. излучения фотона $h\nu_f$; в ней может произойти внутренняя конверсия энергии в колебания с сопутствующей деградацией в тепло; она может перейти без излучения на метастабильный, триплетный уровень $\mathscr{E}_{T0}$, растрачивая часть энергии возбуждения и колебаний. В дальнейшем энергия $\mathscr{E}_{T0}$ может выделиться в виде фотона фосфоресценции $h\nu_{ph}$ или превратиться в колебательную с деградацией ее в тепло. Все эти процессы представлены схематически на рис. 5.24.

Другой существенной причиной уменьшения квантового выхода является тушение люминесценции. Оно может вызываться посторонними веществами, в частности кислородом. Для биофизики особый интерес представляют процессы, которые проявляются, в частности, в концентрационном тушении и в концентрационной деполяризации люминесценции.

При увеличении концентрации флуоресцирующих молекул до 10^{-4} *моль/л* начинается резкое падение квантового выхода и сте-

пени поляризации свечения. И то и другое объясняется миграцией энергии возбуждения от молекулы к молекуле. Речь идет не об излучении с последующей реабсорбцией света, но о прямой передаче энергии возбуждения вследствие резонансного взаимодействия молекул. Условием такого взаимодействия является сильное перекрывание полос поглощения и испускания молекул. Взаимодействие, естественно, убывает с увеличением расстояния между молекулами. Феноменологическое рассмотрение этих явлений было проведено Вавиловым [165], строгая квантовомеханическая теория резонанса развита Ферстером [166, 167] (см. также [168]).

Резонансное взаимодействие, определяющее миграцию энергии, подобно экситонному взаимодействию в молекулярных кристаллах, исследованному Давыдовым (см. стр. 286). Различие этих двух явлений имеет количественный характер. Миграция энергии происходит при большой энергии взаимодействия, сильно превышающей ширину электронно-колебательной зоны. В этом случае сильного взаимодействия передача энергии происходит весьма быстро, и можно не учитывать влияния колебаний. Соответственно, в отличие от экситонных спектров молекулярных кристаллов, возникающих при слабом взаимодействии (энергия взаимодействия значительно меньше ширины зоны, но много больше ширины отдельного колебательного подуровня), в спектрах резонансно взаимодействующих молекул не наблюдается колебательная структура.

Миграция энергии вызывает деполяризацию люминесценции. Молекула, поглощающая квант, ориентирована в пространстве определенным образом. Если бы излучение происходило в той же молекуле, то оно характеризовалось бы некоторым значением P. Однако за время, протекающее между поглощением и излучением, возможны многократные акты передачи энергии на другие молекулы с несколько отличными ориентациями. По прошествии определенного времени все возбужденные молекулы теряют первоначальную ориентацию, которая была в момент поглощения, и излучение оказывается полностью деполяризованным.

Нужно подчеркнуть, что миграция энергии возможна как между тождественными, так и между разными молекулами при условии перекрывания полосы поглощения молекул одного сорта и полосы флуоресценции молекул другого сорта.

Представления о миграции энергии, возникшие в результате изучения люминесцентных явлений, легли в основу попыток объяснения ряда биологических процессов. Как уже указывалось, многие биологические процессы протекают по принципу «все или ничего» с большой скоростью (см. стр. 44). Истинное объяснение этих явлений, по-видимому, должно исходить прежде

всего из представлений об их кооперативности. Применительно ко многим задачам такое объяснение получено. Однако соображения о миграции энергии в биополимере или в окружающей его «структурированной воде» также фигурируют в литературе, список которой начинается известной книгой Сцент-Дьёрдьи [169]. Такого рода «миграционные» представления в большинстве случаев не оправданы, но они могут оказаться существенными при исследовании электронно-конформационных взаимодействий (см. стр. 408). С другой стороны, миграция энергии, по-видимому, играет существенную роль в процессах фотосинтеза.

Изучение особенностей люминесценции, связанных с миграцией энергии, важно для биофизики. Передача энергии с одного люминесцирующего участка биополимера на другой позволяет получить информацию об их относительном расположении.

Люминесценции биополимеров посвящен ряд монографий (см., например, [170—172]).

Циклические π-электронные системы часто являются люминофорными. Ароматические аминокислотные остатки в белках Фен, Тир и Три оказываются в этом смысле неравноценными. Соответствующие аминокислоты характеризуются спектральными свойствами, приведенными в табл. 5.10.

Таблица 5.10

Спектральные характеристики ароматических аминокислот

Аминокислота	$\lambda_{макс}$, Å (поглощение)	Молекулярный коэффициент поглощения	$\lambda_{макс}$, Å (флуоресценция)	Квантовый выход γ
Фенилаланин	2570	200	2820	0,04
Тирозин	2570	1300	3030—3040	0,21
Триптофан	2800	5600	3530	0,205

Флуоресценция Фен практически не видна. Свечение Тир и Три существенно зависит от pH и полярности среды, от протонизации соседних групп. В нативных белках γ для Тир значительно меньше приведенного; напротив, γ для Три может оказаться увеличенным до 0,32. Денатурация мочевиной выравнивает эти значения: квантовый выход первого остатка увеличивается, второго — уменьшается. Таким образом, для Тир и Три квантовые выходы конформационно чувствительны. Это объясняется зависимостью тушения люминесценции Тир и Три от окружения, в частности от того, гидрофобно оно или гидрофильно. Люминесценция остатков, переходящих при конформационных изменениях из внутренности глобулы на ее поверхность, легче тушится и посторонними тушителями. Исследование

собственной люминесценции белков (ароматические остатки) позволило получить важные сведения о конформационных свойствах белков, об их взаимодействиях с малыми молекулами и ионами [173—180, 274, 275]. Ароматические остатки служат, таким образом, чувствительными метками.

Как уже сказано, поляризация люминесценции зависит от подвижности люминофора. Определяя P, можно найти релаксационные характеристики макромолекулы. Теория поляризованной люминесценции полимеров развита в работах [181, 182]. Среднее квадратичное время вращательной релаксации в макромолекуле τ_r можно определить по зависимости степени поляризации люминесценции для раствора полимера от вязкости растворителя

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} + {}^1/_3\right)\frac{3\tau}{\tau_r} . \qquad (5,147)$$

(ср. (5,146)), τ — длительность свечения. Для простейшего случая жестких частиц $\tau_r \sim \eta/T$. Этот метод был, в частности, применен к изучению подвижности и конформационных превращений ряда синтетических полимеров (полиметакриловой и полиакриловой кислот, полиметилметакрилата и др.) с люминесцентными метками как в боковых привесках, так и в основной цепи [183—185]. Были определены энергии активации конформационных переходов и установлено сильное влияние гидрофобных взаимодействий на внутримолекулярную подвижность.

Метод поляризованной люминесценции эффективно применяется к изучению комплексов макромолекул нуклеиновых кислот с малыми молекулами, в частности с молекулами акридиновых красителей. Исследования таких комплексов дают важную информацию о конформационной структуре нуклеиновых кислот (см. [276] и гл. 8).

Конформационные превращения и их динамика проявляются и в других характеристиках люминесценции. Так, сродство α-химотрипсина в различных конформациях к люминесцирующему веществу (профлавину) сказывается на интенсивности свечения [186]. Положения максимумов в спектрах люминесценции полярных молекул в конденсированных полярных средах зависят от релаксационных свойств микроокружения. Теория дает выражение, связывающее положение «центра тяжести» полосы флуоресценции ν_c с величинами τ и τ_r [187]:

$$\nu_c = \nu_\infty + (\nu_0 - \nu_\infty)\frac{\tau_r}{\tau_r + \tau} , \qquad (5,148)$$

где ν_∞ — значение ν_c при $\tau_r \ll \tau$, ν_0 — при $\tau_r \gg \tau$. Данные о ν_c были использованы при изучении релаксационных свойств ряда полимеров с люминесцентными метками [188].

§ 5.9. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

Частоты, интенсивности и поляризации линий и полос в колебательных спектрах дают информацию о строении молекул. Колебательные спектры регистрируются либо как инфракрасные (ИК) спектры поглощения, либо как спектры комбинационного рассеяния (КР). Применительно к макромолекулярным веществам ИК-спектроскопия имеет ряд преимуществ перед спектроскопией КР. Лишь в последнее время благодаря возможностям лазерной техники удалось получить четкие и выразительные комбинационные спектры полимеров и биополимеров (см. стр. 334).

Теория колебательных спектров малых многоатомных молекул хорошо разработана [189—194]. Она основана на возможности раздельного рассмотрения медленных процессов колебаний ядер и быстрых электронных переходов, доказываемой теоремой Борна и Оппенгеймера [195]. Расчет частот гармонических колебаний ядер проводится путем решения классической задачи с непосредственным учетом симметрии молекулы. Электрооптические параметры, определяющие интенсивности и поляризации в колебательных спектрах, находят при помощи теории, впервые предложенной более 30 лет назад [196] и подробно изложенной в [189, 190]. Эта теория исходит из так называемой валентно-оптической схемы, согласно которой каждой химической связи можно приписать свои собственные дипольный момент и поляризуемость (см. также [79, 197]). Дипольный момент молекулы является векторной суммой дипольных моментов связей, поляризуемость молекулы — тензорной суммой поляризуемостей связей. Интенсивность данной полосы в ИК-спектре определяется изменением дипольного момента молекулы при данном нормальном колебании, в спектре КР — изменением поляризуемости.

Молекула, состоящая из N атомов, имеет $3N - 6$ нормальных колебаний ($3N - 5$ в линейном случае). Так как атомы в молекуле связаны друг с другом, все они участвуют в каждом из этих колебаний. Возможны ситуации, в которых доля участия в данном колебании одного или нескольких атомов значительно больше, чем остальных. Такое колебание характеристично для данной атомной группы, его частота (а также интенсивность спектральной полосы) мало зависит от остальных атомов в молекуле. Наличие характеристической спектральной полосы или линии свидетельствует о присутствии соответствующей группы.

В ИК-спектрах белков и полипептидов наблюдаются полосы амидной группы (пептидной связи —CO—NH—). Для их изучения применяются спектры модельных низкомолекулярных соединений — амидов. Экспериментальное исследование метил-

ацетамида $H_3C—CO—NH—CH_3$ и родственных веществ и теоретические расчеты позволили получить характеристики амидной группы (табл. 5.11) [198—201].

Таблица 5.11

Характеристики колебаний амидных групп [1])

Полосы	Частота, $см^{-1}$	Характер колебания	Доля участия групп
Амид *A*	3300	N—H (ν)	
Амид *B*	3100		
Амид I	1597—1672	C=O (ν)	C=O (ν) 80%, C—N (ν) 10%, —NH (δ) 10%
Амид II	1480—1575	—NH (δ) в плоскости, C—N (ν)	—NH (δ) 60%, C—N (ν) 40%
Амид III	1229—1301	C—N (ν), —NH (δ) в плоскости	C=O (ν) 10%, C—N (ν) 30%, N—H (ν) 30%, O=C—N (δ) 10%
Амид IV	625—767	O=C—N (δ) в плоскости	O=C—N (δ) 40%, остальные — 60%
Амид V	640—800	—NH (δ) неплоское колебание	
Амид VI	537—606	—CO (δ) неплоское колебание	
Амид VII	200	Крутильное колебание вокруг C—N-связи	

[1]) (ν) — валентное колебание, т. е. растяжение связи, (δ) — деформационное колебание, при котором меняется валентный угол.

Полосы амид *A* и амид *B* возникают в результате расщепления валентного колебания связи N—H, частота которого совпадает с удвоенной частотой колебания полосы амид II, — явление так называемого *резонанса Ферми* (см., например, [182]). Формы перечисленных колебаний показаны на рис. 5.25.

Полосы *A*, *B*, I, II весьма чувствительны к водородным связям, наличие которых вызывает значительные понижения частот и расширение полос.

При рассмотрении спектров полимеров необходимо учесть взаимодействие колебаний в отдельных мономерных звеньях. Упорядоченный полимер подобен в этом смысле молекулярному кристаллу. В спектре наблюдаются лишь те колебания, которые происходят в фазе во всех элементарных ячейках. Общая теория, исходящая из этих представлений («приближение фактор-группы»), была предложена в работах [202, 203] (см. также [204—207]). Полимерная цепь, рассматриваемая как одномерная пространственная группа, характеризуется числом нормальных колебаний, равным $3pg - 4$, где p — число атомов в химической

повторяющейся группе, g — число таких групп в одномерной кристаллографической единичной ячейке. Так, для *транс*-цепочки полиглицина I (β-форма) —CH_2—CO—NH—CH_2—CO—NH— химическая группа содержит пять частиц (если считать CH_2 одной частицей), в кристаллическую ячейку входят две такие группы, следовательно, $3pg$ —4 = 3·5·2 — 4=26. Наблюдаются следующие колебания: $9A_1$, $9B_1$, $4A_2$, $4B_2$ (A_1, B_1 — симметричные

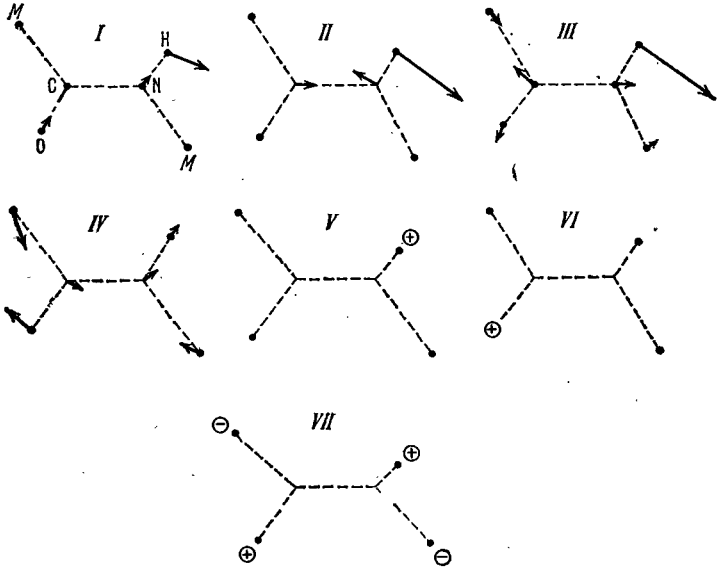


Рис. 5.25. Формы нормальных колебаний амидной группы в N-метилацетамиде (M — метильная группа).

и несимметричные плоские колебания, A_2, B_2 — неплоские). Все они активны в ИК-спектре, за исключением A_2 (см. [209, 210]).

При расчете частот колебаний и, тем самым, интерпретации колебательных спектров полипептидов и белков исходят из рассмотрения слабо связанных осцилляторов в рамках теории возмущений [198, 201, 211]. Частота колебаний выражается формулой

$$\nu(\delta, \delta') = \nu_0 + \sum_s D_s \cos(s\delta) + \sum_{s'} D_{s'} \cos(s'\delta'), \qquad (5,149)$$

где ν_0 — частота невозмущенного колебания изолированной группы, δ — разность фаз между колебательными движениями аналогичных групп в цепи, D_s определяется членами взаимодействия данной группы с s-й группой цепи в выражениях для потенциальной и кинетической энергий, $D_{s'}$ и δ' относятся к меж-

цепным колебаниям и имеют смысл, аналогичный D_s и δ. Суммирование практически можно проводить только по соседним группам (см. [212, 213]).

Рассмотрим результаты таких расчетов для α-спирали, параллельной и антипараллельной β-форм. Для неупорядоченной цепи взаимодействия в среднем компенсируют друг друга и $\nu = \nu_0$. Для бесконечно длинной α-спирали ИК-поглощение возникает при колебаниях с разностью фаз δ, равной либо нулю

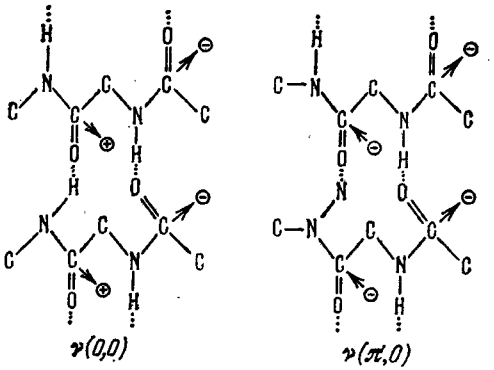


Рис. 5.26. Формы колебаний параллельной β-формы.

(«параллельная полоса», см. далее), либо θ («перпендикулярная полоса»), где θ — угол поворота вокруг оси спирали при переходе от одной пептидной группы к следующей, т. е. $\theta = 2\pi/3{,}6$. Получаем, учитывая три ближайших группы,

$$\left.\begin{aligned} \nu(0) &= \nu_0 + D_1 + D_2 + D_3 \quad (\parallel), \\ \nu(\theta) &= \nu_0 + D_1\cos\theta + D_2\cos 2\theta + D_3\cos 3\theta \quad (\perp). \end{aligned}\right\} \quad (5{,}150)$$

Таким образом, каждое колебание звена α-спирали приводит к появлению двух частот.

В параллельной β-форме $\delta = 0, \pi$ для колебаний в фазе и в противофазе. Здесь необходимо учитывать как внутри-, так и межцепные взаимодействия. Получаем два активных колебания с частотами

$$\left.\begin{aligned} \nu(0,\ 0)_\text{п} &= \nu_0 + D_1 + D_1' \quad (\parallel), \\ \nu(\pi,\ 0)_\text{п} &= \nu_0 - D_1 + D_1' \quad (\perp). \end{aligned}\right\} \quad (5{,}151)$$

Формы этих колебаний изображены на рис. 5.26.

Аналогичным образом для антипараллельной β-формы получаем четыре колебания с частотами

$$\left.\begin{aligned}
&\nu(0,\ 0)_a \text{ — неактивное колебание,}\\
&\nu(0,\ \pi)_a = \nu_0 + D_1 - D_1' \quad (\parallel),\\
&\nu(\pi,\ 0)_a = \nu_0 - D_1 + D_1' \quad (\perp, \text{ в плоскости}),\\
&\nu(\pi,\ \pi)_a = \nu_0 - D_1 - D_1' \quad (\perp, \text{ неплоское колебание}).
\end{aligned}\right\} \qquad (5,152)$$

Формы этих колебаний показаны на рис. 5.27. Первое колебание

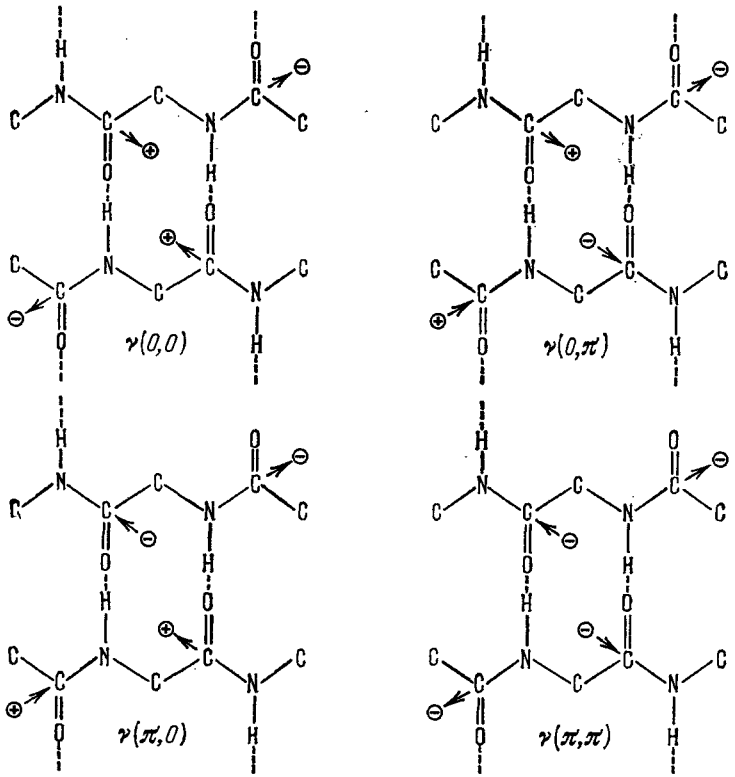


Рис. 5.27. Формы колебаний антипараллельной β-формы.

неактивно, так как оно центросимметрично и не сопровождается изменением дипольного момента.

В табл. 5.12 приведены рассчитанные Криммом характеристики соответствующих полос амид I и амид II.

Таким образом, значения наблюдаемых частот в ИК-спектре позволяют до некоторой степени судить о конформации цепи.

Таблица 5.12

Характеристики полос амид I и амид II

Конформация	Обозначения колебаний	Частота полос, $см^{-1}$	
		амид I	амид II
Неупорядоченная	ν_0	1658	1520
Найлон 66	ν_N	1640	1540
Антипараллельная β-форма	$\nu_{\parallel}(0, \pi)_a$	1685 (сл) [1])	1530 (с)
	$\nu_{\perp}(\pi, 0)_a$	1632 (с)	1510 (сл)
	$\nu_{\perp}(\pi, \pi)_a$	1668 (о. сл)	1550 (сл)
Параллельная β-форма	$\nu_{\parallel}(0, 0)_п$	1648 (сл)	1530 (с)
	$\nu_{\perp}(\pi, 0)_п$	1632 (о. сл)	1530 (сл)
α-спираль	$\nu_{\parallel}(0)_\alpha$	1650 (с)	1516 (сл)
	$\nu_{\perp}(\theta)_\alpha$	1646 (сл)	1546 (с)

[1]) с — сильная, сл — слабая, о. сл — очень слабая полосы в ИК-спектре.

Приводим данные, полученные для водных растворов белков (табл. 5.13) [214].

Таблица 5.13

Характеристики полос амид I и амид II в водных растворах белков

Велок	Частота, $см^{-1}$		Доминирующая конформация
	амид I	амид II	
Миоглобин	1652	1545	α-спираль
β-лактоглобулин	1632	1530	Антипараллельная β-форма
β-лактоглобулин денатурированный	1656 (1570 при больших pH)		Неупорядоченная
α-казеин денатурированный	1656		»

Параллельные (∥) и перпендикулярные (⊥) полосы отвечают колебаниям дипольного момента, параллельным и перпендикулярным оси полимерной цепи (рис. 5.28). Очевидно, что спектры растворов или неориентированных пленок не дают информации о поляризации колебаний. Напротив, при исследовании белков и полипептидов в анизотропных средах (в ориентированных

пленках и волокнах) с помощью поляризованного ИК-излучения поляризация колебаний находится непосредственно. Измеряется инфракрасный дихроизм, характеризуемый дихроичным отношением, т. е. отношением коэффициентов поглощения, измеренных в инфракрасной области для излучения с направлением электрического вектора, перпендикулярным и параллельным некоторому выделенному направлению. Количество поглощенной световой энергии пропорционально квадрату скалярного произведения вектора колеблющегося дипольного момента **p** и напряженности электрического поля световой волны **E** ($A \infty |pE|^2 \cos^2\alpha$), и, следовательно, дихроичное отношение равно

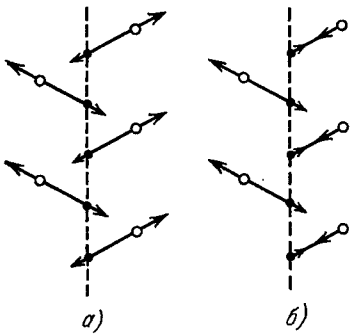


Рис. 5.28. Колебания дипольного момента в фазе, поляризованные вдоль оси цепи (*а*), и его колебания в противофазе, поляризованные перпендикулярно цепи (*б*).

$$R = \frac{k_y}{k_x} = \frac{n_y}{n_x} \operatorname{ctg}^2 \phi, \qquad (5{,}153)$$

где n_y и n_x — показатели преломления среды для волны, колеблющейся вдоль оси y и оси x, ϕ — угол между осью y и вектором дипольного момента. При $\phi = 45°$ имеем $k_y = k_x$, $R = 1$, и поляризации нет; при $k_x = 0$ $\phi = 0°$ и $R \to \infty$, т. е. наблюдается полная поляризация (рис. 5.29). Измерение дихроизма позволяет определить направления колебаний и, тем самым, получить сведения о конформациях (вторичной структуре) белковых цепей. Теория колебательных спектров полимерных цепей конечной длины развита в [208].

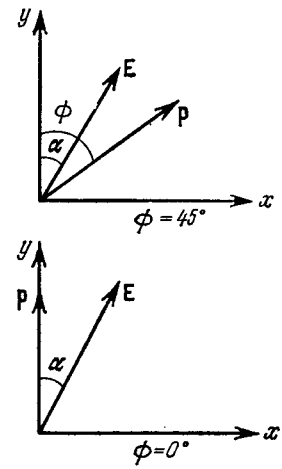


Рис. 5.29. Расположение векторов **E** и **p**.

В работе [278] проведен теоретический анализ взаимодействий амидных колебаний для кристалла ацетанилида и упорядоченных конформаций полипептидов: антипараллельной β-формы и α-спирали. Рассмотрены два типа резонансных взаимодействий — кинематическое и динамическое. Наблюдаемое в ИК-спектрах резонансное расщепление имеет динамический характер, оно определяется диполь-дипольным взаимодействием моментов перехода. Таким образом, теория, предложенная в [278], есть теория экситонного расщепления. Исполь-

зуя известные из поляризационных измерений направления дипольных моментов перехода и их величины, найденные из измерений абсолютных интенсивностей полос поглощения, авторы цитируемой работы получили теоретические значения расщепления, хорошо согласующиеся с опытом.

Чиргадзе разработал метод количественного анализа вторичной структуры глобулярных белков в водных растворах, основанный на измерениях интенсивности полосы амид I [279—281]. Белок исследуется в растворе в тяжелой воде в спектральной области 1500—1800 $см^{-1}$. Характерные значения параметров поглощения для дейтерированной пептидной группы приведены в табл. 5.14.

Таблица 5.14

Спектральные параметры полосы амид I для дейтероформы пептидной группы

Колебание	$\nu_{макс}$, $см^{-1}$	Полуширина $\Delta\nu_{1/2}$, $см^{-1}$	Молярный коэффициент поглощения в максимуме $\varepsilon_{макс}$, $л \cdot моль^{-1} \cdot см^{-1}$	Интегральная интенсивность, $л \cdot моль^{-1} \cdot см^{-2}$
Антипараллельная β-форма				
Амид I $\nu(\pi, 0)$	1620	19	1000	5,7±0,3
$\nu(0, \pi)$	1690	9	220	0,7±0,2
α-спираль				
Амид I $\nu(0)$, $\nu(2\pi/3{,}6)$	1636	37	460	4,6±0,2
Неупорядоченная конформация				
Амид I ν_1	1650	45	350	4,2±0,1
ν_2	1676	24	50	0,3±0,1

Метод Чиргадзе с успехом испытан на нескольких белках, структура которых была установлена рентгенографически. Метод позволяет следить за малыми конформационными изменениями белка.

Помимо определения вторичной структуры, ИК-спектры полезны при изучении ионизации аминокислотных остатков, кинетики дейтерообмена и т. д. (дальнейшие подробности об ИК-спектрах белков см. в [198, 201, 215, 277]).

ИК-спектроскопия нуклеиновых кислот менее информативна по причине большой сложности их химической структуры, недостаточной характеристичности ряда полос и т. д. Ограничимся сведениями о некоторых типичных колебаниях нуклеиновых кислот (табл. 5.15) [201].

Таблица 5.15

ИК-спектры нуклеиновых кислот

Частоты, $см^{-1}$	Обозначения колебаний [1]	Отнесение колебаний
2800—3500	ν(OH)	H_2O, сахар
	ν(NH)	Азотистые основания
	ν(CH)	Сахар и основания
1500—1800	ν(C=O)	Основания, смешанные колебании
	ν(C=N)	
	ν(C=C)	
	δ(NH)	
	δ(HOH)	H_2O
~ 1200	$\nu(PO_2^-)$	Антисимметричное, валентное
1000—1100	$\nu(PO_2^-)$	Симметричное, валентное
	ν(CO)	Сахар
700—1000	ν(PO)	Фосфат
	ν(CO)	Сахар
	τ(NH)	Основания, неплоское, деформационное колебание
300—600		Скелетные деформации

[1] ν — валентные, δ и τ — деформационные колебания.

Развитие лазерной техники открыло возможность получать четкие колебательные спектры комбинационного рассеяния биополимеров. В работах [216] приведены прекрасные спектры КР лизоцима и химотрипсина. Значительный интерес привлекли измерения низкочастотных полос в спектрах КР (с частотами до 50 $см^{-1}$). Эти полосы чувствительны к конформационным изменениям и, возможно, характеризуют конформационные колебания (см., например, [282]).

§ 5.10. СПЕКТРЫ ЯДЕРНОГО И ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Спектры парамагнитного резонанса эффективно применяются в исследованиях биополимеров и, в частности, ферментов. Рассмотрим сущность явления парамагнитного резонанса — ядерного (ЯМР) и электронного (ЭПР).

Внесем частицу с магнитным моментом μ в постоянное магнитное поле напряженностью $\mathbf{H}_0$. Магнитный момент будет прецессировать вокруг направления поля с частотой Лармора, равной

$$\omega_H = \frac{\mu}{p} H_0 = \gamma H_0, \qquad (5,154)$$

где p — механический момент количества движения частицы (например, спин электрона). Подвергнем прецессирующую частицу действию слабого переменного поля $\mathbf{H}_1$, направленного перпендикулярно $\mathbf{H}_0$ (считаем, что $\mathbf{H}_0$ ориентировано вдоль оси z). Линейно поляризованное поле $\mathbf{H}_1$ можно разложить на две компоненты, поляризованные по кругу вправо и влево (см. стр. 290). Одна из этих компонент совпадает с направлением прецессии. Если частота колебаний переменного поля совпадает с частотой прецессии ω_H, то воздействие такого поля на магнитный момент чрезвычайно велико — происходит резонанс. Энергия прецессирующего магнита равна $-\mu H_0$. При увеличении угла между μ и $\mathbf{H}_0$, вызываемом действием поля $\mathbf{H}_1$, энергия возрастает. Эффект особенно велик при $\omega = \omega_H = \gamma H_0$.

Это явление было открыто Завойским [217].

Таково элементарное классическое его описание. Квантовая механика показывает, что уровни энергии частицы, обладающей магнитным моментом, расщепляются в магнитном поле в соответствии с правилом пространственного квантования.

Начнем с ЯМР. Атомные ядра, у которых нечетно хотя бы одно из двух чисел — масса или порядковый номер, — обладают отличным от нуля моментом количества движения, т. е. ядерным спином. Ядерный спин равен нулю у C^{12}, O^{16} и т. д. и не равен нулю у H, D, C^{13}, F^{19} и т. д. Тем самым, эти ядра имеют и магнитный момент.

Если J — ядерное спиновое число, то момент количества движения численно равен $[J(J+1)]^{1/2}h/2\pi$, а магнитный момент $[J(J+1)]^{1/2}\gamma h/2\pi$, где $\gamma = g\mu_0$ — гиромагнитное отношение, g — фактор расщепления, а μ_0 — ядерный магнетон. В магнитном поле H_0 вследствие зеемановского расщепления возникает $2J+1$ уровней с энергиями

$$\mathscr{E} = -\gamma \frac{h}{2\pi} H_0 m \quad (m = J, J-1, \ldots, -J) \qquad (5,155)$$

и с расстоянием между уровнями, т. е. с разностью их энергий, равной $\gamma \frac{h}{2\pi} H_0$. Для протона $J = 1/2$ и в поле H_0 имеются два уровня, соответствующие параллельному и антипараллельному направлениям спина (рис. 5.30). Если поле H_1 колеблется с частотой ω, то резонанс происходит при поглощении кванта

с энергией $h\nu \equiv \hbar\omega$, равной разности энергий соседних уровней

$$\frac{h}{2\pi}\omega = \gamma\frac{h}{2\pi}H_0 = 2\mu H_0. \qquad (5,156)$$

Здесь $\mu = g\mu_0 J$. Условие (5,156) экивалентно (5,154).

При $J > 1/2$ и большем числе уровней условие резонанса имеет тот же смысл, так как разрешены переходы лишь между соседними уровнями.

Для величины ядерного магнетона имеем

$$\mu_0 = \frac{eh}{4\pi M_p c} = 5{,}0493 \cdot 10^{-24}\ эрг/гс, \qquad (5,157)$$

где e — заряд протона, M_p — его масса, c — скорость света. Фактор g безразмерен. Для протона $g = 5{,}58$. Если напряженность поля H_0 равна 10 000 *гс*, то резонансная частота для протонов составляет 42,6 *Мгц*, что соответствует диапазону метровых радиоволн.

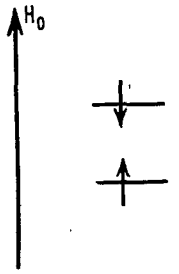


Рис. 5.30. Расщепление уровней спина протона в магнитном поле.

При данной температуре T число протонов на нижнем уровне несколько больше, чем на верхнем. Отношение населенностей верхнего и нижнего уровней в равновесии выражается фактором Больцмана

$$\exp(-h\nu_0/kT) = \exp(-2\mu H_0/kT) \approx 1 - 2\mu H_0/kT; \qquad (5,158)$$

последнее приближенное равенство справедливо, так как $2\mu H_0 \ll kT$ при комнатной температуре и обычно применяемых H_0. Действительно, при $H_0 = 10^4$ *гс* фактор Больцмана равен $1-14\cdot10^{-6}$. При включении радиочастотного поля происходят переходы с нижнего уровня на верхний (поглощение) и обратно (спонтанное испускание) (см. рис. 5.30). Если вероятности обоих процессов одинаковы, то должно возникнуть быстрое насыщение уровней (выравнивание населенностей обоих уровней) и поглощение прекратится. Это, однако, не наблюдается в реальном веществе. Очевидно, что в системе спинов должен происходить процесс, позволяющий спинам отдавать свою энергию без излучения. Это — релаксационный процесс, непрерывно возвращающий систему спинов в равновесное состояние, которому отвечает распределение Больцмана. Он происходит вследствие взаимодействия ядерных спинов с *решеткой*, т. е. с окружающими данное ядро другими ядрами в веществе, находящимися в состоянии теплового движения.

При выключении поля H_1 выделяющаяся энергия превращается в тепловую энергию решетки, происходит *спин-решеточная релаксация*. Изменение населенности уровней во времени

после выключения поля H_1 описывается уравнением

$$\Delta n(t) = \Delta n(0) \exp(-t/T_1), \tag{5,159}$$

где $\Delta n(t)$ — избыток протонов в момент времени t на верхнем уровне по сравнению с равновесной населенностью, $\Delta n(0)$ — то же в момент $t = 0$, T_1 — время *спин-решеточной релаксации*, зависящее от концентрации магнитных ядер в веществе, от подвижности молекул и от температуры. В кристаллах T_1 порядка минут, в газах и жидкостях порядка секунд и меньше. Присутствие парамагнитных примесей может сократить T_1 до 10^{-4} *сек.*

Ширина спектральной линии ЯМР, согласно принципу неопределенности квантовой механики, определяется временем жизни ядра на данном энергетическом уровне. Для неопределенности резонансной части имеем

$$\Delta\nu \approx \frac{\Delta\mathscr{E}}{h} \approx \frac{1}{2\pi\tau}. \tag{5,160}$$

Спин-решеточная релаксация вносит вклад в ширину линии порядка T_1^{-1}.

Наряду со спин-решеточной релаксацией имеется второй процесс — процесс прямого взаимодействия неподвижных магнитных ядер друг с другом (*спин-спиновое взаимодействие*). На каждый спин действует, кроме поля H_0, локальное поле, создаваемое соседними ядрами и равное

$$H_l = \frac{\mu}{r^3}(3\cos^2\vartheta - 1), \tag{5,161}$$

где r — расстояние от ядра до данной точки, ϑ — угол между векторами $\boldsymbol{\mu}$ и $\mathbf{r}$. Условие резонанса поэтому имеет вид

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi}(H_0 + H_l), \tag{5,162}$$

отличный от условия (5,156), справедливого для изолированного спина. Порядок величины H_l — несколько гаусс. Спин-спиновое взаимодействие также вносит вклад в ширину линии порядка $H_l\gamma/2\pi$. Однако спин-спиновое взаимодействие вызывает уширение линии не только вследствие неоднородности поля. Оно создает возможность обмена энергией между протонами в те моменты, когда совпадают фазы их прецессии, и, тем самым, уменьшает время их жизни в данном состоянии. Рационально ввести второе характеристическое время T_2 — время *спин-спиновой релаксации*, которому соответствуют оба вклада в ширину линии, обусловленные спин-спиновым взаимодействием. Для твердых тел $T_1 \gg T_2$ и ширина линии определяется только T_2, т. е.

$$\Delta\nu \sim 1/T_2.$$

В невязких жидкостях T_2 того же порядка, что и T_1, и $\Delta\nu$ составляет доли герца:

$$\Delta\nu \sim 1/T_1 + 1/T_2 + \Delta'\nu,$$

где $\Delta'\nu$ — аппаратурный эффект, определяемый неоднородностью поля H_0.

Спектры ЯМР жидкостей и растворов содержат ряд сравнительно узких линий, отвечающих структурно неэквивалентным протонам. Если протоны эквивалентны (например, для протона в H_2O), то наблюдается одна линия. Напротив, протонам групп CH_3, CH_2 и OH в молекуле C_2H_5OH отвечают разные частоты. Это происходит потому, что на ядерный спин действует электронное окружение ядра. Электроны прецессируют в направлении, противоположном направлению прецессии ядер, и создают вторичное магнитное поле H', пропорциональное H_0. Вблизи ядра оно равно

$$H' = -\sigma H_0, \tag{5,163}$$

и на ядро действует эффективное поле

$$H_{эфф} = H_0 + H' = H_0(1 - \sigma). \tag{5,164}$$

Константа σ называется *постоянной экранирования*. Величины H', т. е. σ, неодинаковы вдоль различных направлений в молекуле, т. е. анизотропны. В жидкостях молекулы быстро изменяют свою ориентацию, и поэтому в них мы имеем дело с усредненным значением σ.

Положение спектральной линии ЯМР относительно некоторой эталонной линии называется *химическим сдвигом*. В качестве эталона для протонного резонанса в органических соединениях обычно применяется тетраметилсилан (ТМС) $(CH_3)_4Si$. Химический сдвиг выражается безразмерной величиной — отношением сдвига частоты (поля) к эталонному значению, умноженным на 10^6:

$$\delta = \frac{\Delta\nu}{\nu_0} \cdot 10^6 = \frac{\Delta H}{H_0} \cdot 10^6. \tag{5,165}$$

Для протонов ТМС $\delta = 0$, и сдвигам линий ПМР (протонного резонанса), расположенным при меньших $H_{эфф}$, приписывается положительный знак. Величины δ варьируют от $+18$ до -5; каждая атомная группа характеризуются своим определенным значением δ.

При изучении ПМР биополимеров пользуются водорастворимым эталоном ДДС (2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфоновая кислота). Тогда химические сдвиги алифатических протонов варьируют от $-0{,}5$ до $-2{,}0$, ароматических — от $-6{,}0$ до $-8{,}5$.

На рис. 5.31 показан спектр ПМР 1,1,2-трихлорэтана, записанный при недостаточно высоком разрешении. Наблюдаются два пика, отвечающие протонам групп CH_2Cl и $CHCl_2$ со своими сдвигами. Отношение интенсивностей составляет 2 : 1. При высоком разрешении первая линия расщепляется на две, а вторая — на три компоненты (рис. 5.32), т. е. наблюдается *сверхтонкая* (мультиплетная) *структура*. Она возникает вследствие магнитного взаимодействия между ядрами, передаваемого через электроны связи, т. е. непрямого спин-спинового взаимодействия. Расстояния между компонентами не зависят от H_0. Протон группы $CHCl_2$ может находиться в двух состояниях — со спином $+1/2$ и $-1/2$. Поэтому на протон этой группы действует либо одно, либо другое локальное поле, и ее линия ПМР испытывает дублетное спин-спиновое расщепление. В метиленовой

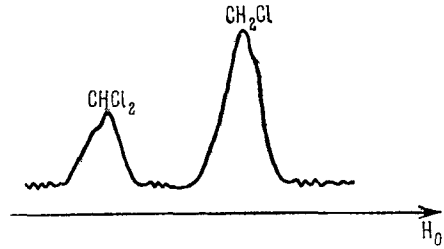


Рис. 5.31. Спектр ПМР 1, 1, 2-трихлорэтана при малом разрешении.

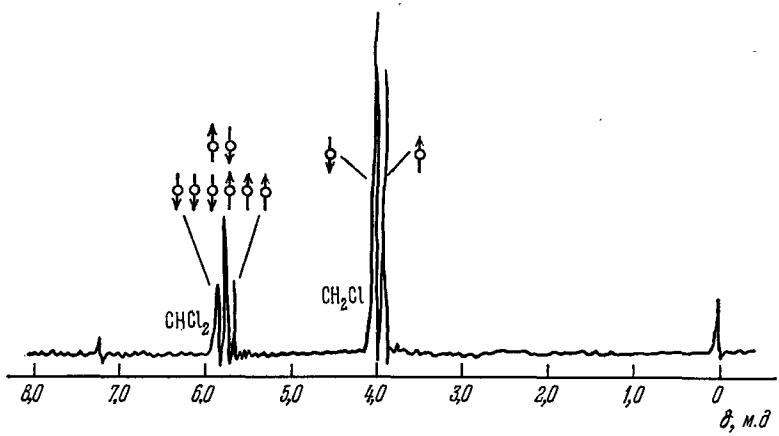


Рис. 5.32. Спектр ПМР 1, 1, 2-трихлорэтана при высоком разрешении.

группе возможны три неэквивалентных состояния пары протонов: $+1/2$, $+1/2$; $+1/2$, $-1/2$ или $-1/2$, $+1/2$; $-1/2$, $-1/2$. Соответственно линия ПМР группы $CHCl_2$ испытывает триплетное расщепление.

Изучение химических сдвигов и сверхтонкой структуры позволяет получить количественные сведения о взаимном

расположении ядер и об их взаимодействиях. С другой стороны, исследование спектров ЯМР малого разрешения дает информацию о динамических релаксационных свойствах молекул, т. е. о подвижности атомных групп в молекуле и самой молекулы как целого.

Теория ЯМР, экспериментальные методы (которых мы здесь не касались) и разнообразные приложения ЯМР в химии и физике описаны в ряде монографий [218—226].

Спектр ПМР белка состоит из множества перекрывающихся линий. Их удается разделить, пользуясь приборами высокого разрешения (сверхпроводниковые магниты, частоты до 300 *Мгц*) и селективным дейтерированием белка [227].

Жардецкий и другие исследователи эффективно применили эти методы к решению ряда задач (см. [228—230]). Изучение химических сдвигов позволило установить детали взаимодействия фармакологических веществ (сульфамидов и антибиотиков) с белками [231]. В химических сдвигах протонных резонансов полиаминокислот отчетливо проявляются переходы спираль — клубок [232]. ЯМР дает информацию о взаимодействиях гаптен — антитело [233].

Важные результаты были получены при исследовании ферментов, в частности рибонуклеазы (Р), нуклеазы стафилококков (Н), лизоцима (Л). На рис. 5.33 показаны резонансы протонов нуклеазы стафилококков в спектральной области, отвечающей ароматическим аминокислотам, при четырех значениях pH [234]. Разрешаются пять пиков, смещаемых изменением pH. Два из них H2*a* и H2*b* относятся к одному и тому же остатку Гис, что доказывается рядом фактов. Относительные интенсивности этих пиков и расстояние между ними меняются с pH, что можно объяснить медленным конформационным изменением, затрагивающим окружение Гис H2. Изменение локально, так как другие пики не меняются. Расстояние между H2*a* и H2*b* определяет нижний предел времени жизни τ остатка Гис в каждой конформации: $\tau \gg 1/2\pi\,\Delta\nu \approx 40$ *мсек*.

Расширение пиков и особенности их изменений при pH 6,3—7,5 объясняются увеличением скорости взаимного превращения двух конформаций. Их константа равновесия K определяется как отношение площадей пиков H2*b* и H2*a*. При pH 4.7, 5,0 и 7,5 величины K равны соответственно 0,5, 0,7 и 3—5 [234].

Таким образом, ЯМР позволяет изучать конформационные превращения. Исследование лизоцима выявило интересные особенности его денатурации [235]. При изучении рибонуклеазы определены резонансы четырех раздельных остатков Гис, которые удается точно локализовать [236]. Изучено воздействие на эти остатки ингибиторов фермента и на основе полученных данных построена модель комплекса фермент — ингибитор [237].

Изучение гемоглобина, миоглобина и их комплексов с различными лигандами дало важные подтверждения рентгенографических данных. Тем самым четко показано тождество структур этих белков в кристалле и растворе, установлено отсутствие

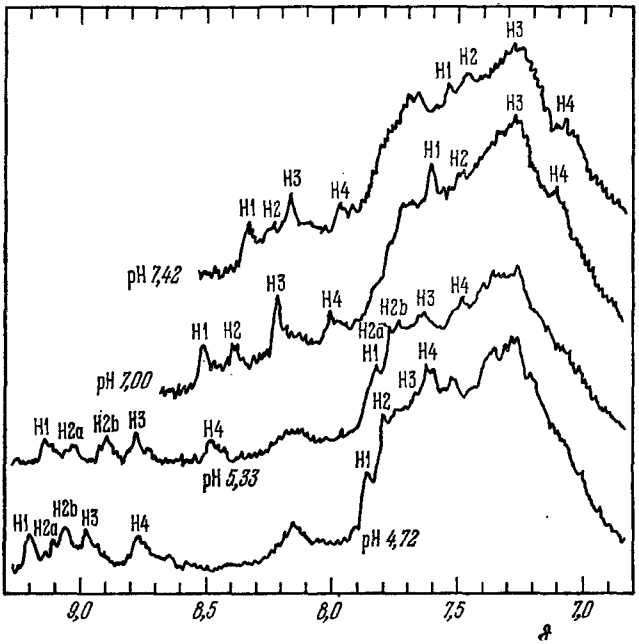


Рис. 5.33. Спектры ЯМР нуклеазы стафилококка при различных pH в спектральной области, отвечающей ароматическим аминокислотам.

прямого взаимодействия гем-групп в гемоглобине (см. стр. 425), изучены тонкие взаимодействия между аминокислотными остатками (см. [230]).

Эти немногие примеры далеко не исчерпывают уже проведенные исследования биополимеров и доказывают очень большие возможности ЯМР-спектроскопии (см. также [238]).

Обратимся теперь к ЭПР. Электрон имеет спин $s = 1/2$, его энергетический уровень в поле H_0 расщепляется на два с расстоянием между ними, отвечающим условию резонанса

$$h\nu = g\mu_B H_0, \qquad (5{,}166)$$

где μ_B — магнетон Бора, превышающий ядерный магнетон в 1836 раз

$$\mu_B = \frac{eh}{4\pi m_e c} = 0{,}93 \cdot 10^{-20} \text{ эрг/гс}, \qquad (5{,}167)$$

m_e — масса электрона. Фактор g для полностью свободного спина равен 2,0023. Подставляя эти значения, находим, что в поле $H_0 = 10^4$ *гс* резонансная частота $\nu_{эл} = 2{,}8 \cdot 10^{10}$ *сек*$^{-1}$ ($\nu_{протон} = 4{,}26 \cdot 10^7$ *сек*$^{-1}$).

В подавляющем большинстве органических соединений спиновые моменты электронов скомпенсированы, их суммарный спин равен нулю и ЭПР не наблюдается. Напротив, ЭПР хорошо наблюдается у свободных радикалов и у молекул с нечетным числом электронов. Спектры ЭПР служат основным источником сведений о строении свободных радикалов и парамагнитных ионов, а также об их взаимодействиях с окружающими частицами.

Если в данном соединении имеется лишь один неспаренный электрон, то

$$h\nu = g\mu_B(H_0 + H_l). \qquad (5{,}168)$$

Локальное поле H_l создается магнитными моментами атомных ядер, находящихся вблизи этого электрона, в частности N^{14}. Для ядра N^{14} $J = 1$ и, следовательно, проекции ядерного спина на направление поля H_0 отвечают значениям $m = 1, 0, -1$. Локальное поле, действующее на электрон, имеет три значения и пик ЭПР расщепляется в триплет. Обычно для наблюдения спектров применяется клистрон как источник микроволнового излучения (поля H_l) с частотами, близкими к 9000 *Мгц*. При этом резонанс наблюдается в области 3200 *гс*. Локальные поля, вызывающие описанное сверхтонкое расщепление, равны по порядку величины десяткам гаусс.

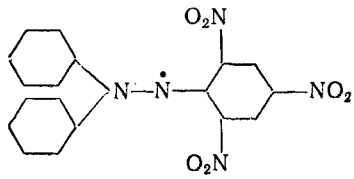
Описанное взаимодействие электронного спина с постоянным и локальным полем можно представить гамильтонианом

$$\mathcal{H} = \mu_B \tilde{S}\hat{g}\mathbf{H}_0 + h\tilde{S}\hat{T}\tilde{J} - g_N\mu_0\tilde{J}\mathbf{H}_0. \qquad (5{,}169)$$

Здесь $\tilde{S}$ и $\tilde{J}$ — операторы дипольного и ядерного спиновых моментов, $\hat{g}$ — тензор фактора расщепления для электрона (g-фактор анизотропен), $\hat{T}$ — тензор дипольного взаимодействия электронного и ядерного спинов, g_N — g-фактор ядра N^{14}. Первый член (5,169) представляет взаимодействие электронного спинового момента с внешним полем, второй — «сверхтонкое» взаимодействие электрона и ядра, третий — взаимодействие ядра азота с внешним полем. Наблюдаемые спектральные линии соответствуют разрешенным переходам между собственными состояниями этого гамильтониана.

В общем случае при ядерном спине 1 в спектре ЭПР должно наблюдаться $2J + 1$ эквидистантных линий сверхтонкой структуры. Рассмотрим, например, устойчивый свободный радикал —

дифенилпикрилгидразил



Его спектр ЭПР содержит пять линий с отношением интенсивностей 1 : 2 : 3 : 2 : 1. Это легко объяснить, если считать, что неспаренный электрон «размазан» между двумя атомами азота. Суммарный спин двух ядер равен 2, проекции на направление поля: +2, +1, 0, —1, —2. Крайние значения могут быть получены только одним способом ($2 = 1 + 1$, $-2 = -1 - 1$), значения +1 и —1 — двумя ($1 = 1 + 0 = 0 + 1$, $-1 = -1 + 0 = 0 - 1$), нулевое — тремя ($0 = 0 + 0 = +1 - 1 = -1 + 1$).

Все сказанное относится к сверхтонкой структуре спектра. Тонкая структура возникает в кристаллах вследствие анизотропии g-фактора. При суммарном электронном спине, большем $^1/_2$, зеемановские уровни перестают быть эквидистантными, спектр меняется из-за спин-орбитального взаимодействия. Вместо одной линии наблюдается группа линий, положения и интенсивность которых зависят от ориентации поля $\mathbf{H}_0$ относительно кристаллических осей. В жидкостях и растворах тонкая структура не разрешается, имеется лишь некоторое уширение линии.

Ширина линий в спектре ЭПР определяется, как и в ЯМР, спин-спиновой и спин-решеточной релаксацией. Время спин-спиновой релаксации T_2 характеризует скорость установления равновесия между магнитными моментами всех парамагнитных частиц (между спинами электронов), время спин-решеточной релаксации T_1 — скорость восстановления равновесия между системой спинов и тепловыми колебаниями решетки. T_2 практически не зависит от температуры и определяется концентрацией спинов, T_1 быстро возрастает с понижением температуры. Очевидно, что и T_1 и T_2 определяются подвижностью частиц с ненулевыми спинами и окружающих молекул.

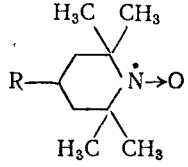
Подробное изложение теории ЭПР и экспериментальных методов содержится в ряде монографий (см., например, [239—242]).

Электронный парамагнитный резонанс давно применяется к решению биологических и биофизических проблем. Свободные радикалы образуются в ряде ферментативных окислительно-восстановительных реакций, а также при воздействии радиации. Свободные радикалы возникают из коферментов (например,

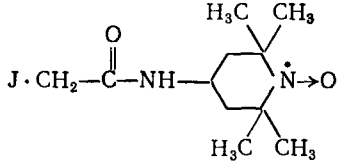
семихиноны из флавинов и флавиопротеидов) и субстратов, в частности, при окислении аскорбиновой кислоты, гидрохинона и др. пероксидазой. При коротковолновом облучении органических соединений и биологических систем также образуются свободные радикалы, регистрируемые методом ЭПР. Тем самым, этот метод весьма полезен в радиобиологии и при исследовании фотобиологических процессов. Сведения о свободных радикалах, возникающих в биологических системах и в модельных биохимических реакциях, приведены в [243—245] (см. также [242]).

В последние годы были развиты исследования ЭПР биополимеров, основанные на методе спиновой метки.

К молекуле белка присоединяют устойчивый свободный радикал, содержащий неспаренный электрон. Широко применяются иминоксильные радикалы с общей формулой [246]



Впервые спин-меченые белки были получены в 1965 г. [247]. Иминоксильные радикалы можно связать (в зависимости от группы R) с различными группами белков, в частности, с SH-группами. В работах [248, 249] метку



присоединяли к Цис β93 гемоглобина (Hb), алкилируя SH-группу. Гемоглобин кристаллизовали и изучали зависимость спектров ЭПР от ориентации кристалла в магнитном поле. На рис. 5.34 показаны спектры ЭПР $Hb(CO)_4$ и метгемоглобина (Мет Hb) при pH 7,0. Сигналы *1* и *2* отвечают разным ориентациям кристалла, их интенсивности зависят от ионного состава кристаллизующегося раствора. Совпадение сигналов *1* и *2* для Hb (CO_4) и Мет Hb доказывает, что конформации этих белков вблизи Цис β93 почти одинаковы.

Подвижность метки отчетливо проявляется в спектрах ЭПР. Молекулярное движение делает гамильтониан (5,169) зависящим от времени

$$\mathscr{H}(t) \equiv \langle \mathscr{H}(t) \rangle + \{\mathscr{H}(t) - \langle \mathscr{H}(t) \rangle\}; \qquad (5,170)$$

здесь $\langle \mathcal{H}(t) \rangle$ — среднее значение гамильтониана, $\{\ \}$ — его флуктуация. Если основные особенности спектра определяются $\langle \mathcal{H} \rangle$, то это означает большую скорость движения. Так, иминоксильный радикал, дающий три резкие линии со сверхтонким расщеплением, равным $^1/_3\ (T_{xx} + T_{yy} + T_{zz})$, испытывает быстрое крутильное движение с обратным временем корреляции τ^{-1}, большим по сравнению с наибольшим анизотропным членом в $\mathcal{H}$, пропорциональным $|T_{zz} - T_{xx}|$. Влияние флуктуаций на линии

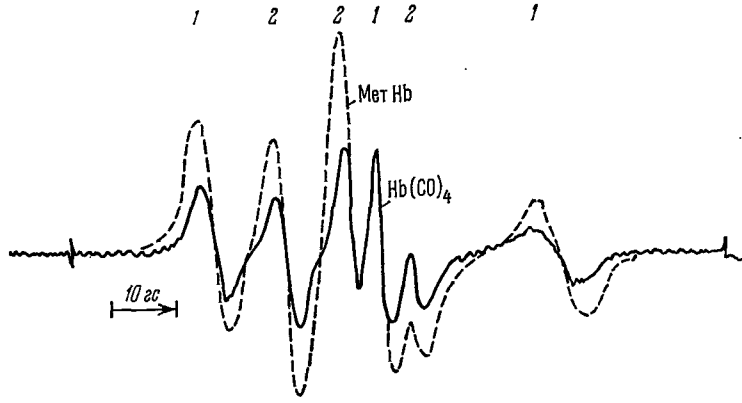


Рис. 5.34. Спектры ЭПР $Hb(CO)_4$ (сплошные линии) и метгемоглобина (пунктир).

ЭПР рассмотрено в [250—252]. Изучение зависимости $\mathcal{H}$ от t позволяет исследовать конформационные изменения в макромолекулах. Подробно изучался Hb в растворе [253, 254]. Установлено, что метка «чувствует» две конформации белка при его оксигенации. Варьируя метки, удалось показать наличие локальной области в молекуле Hb, имеющей структуру, которая зависит от состояния оксигенации более чем одного гема. Следовательно, обнаружены взаимодействия субъединиц Hb (см. § 7.1).

Лихтенштейн и сотрудники применяли метки различной длины и гибкости к исследованию структуры и конформационной подвижности ряда белков — лизоцима, миоглобина, миозина, альбуминов и т. д. [255—258]. В работе [259] были установлены изменения в спектрах ЭПР аспартатаминотрансферазы, меченной иминоксильными радикалами, при образовании комплексов фермента с субстратом и родственными соединениями. Эти изменения указывают на возрастание подвижности радикала в комплексе — время корреляции в исходном белке составляет $(8{,}0 \pm 0{,}4) \cdot 10^{-10}$ *сек*, в комплексе белка с лигандом — $(5{,}1 \pm 0{,}4) \cdot 10^{-10}$ *сек*.

Для теоретического рассмотрения движений метки, связанной с белком гибкой «ножкой», развита модель «ротатора на ротаторе» [260], позволяющая рассчитать время корреляции как функцию внутренних вращений. Применение двойной метки позволяет определять расстояния между взаимодействующими радикалами и, тем самым, геометрию конформационных изменений (см. [255, 261, 262]).

Метод спиновых меток оказался весьма эффективным для изучения структуры биологических мембран и конформационных явлений в мембранах [263, 264]. Весьма перспективно изучение ядерной релаксации в биополимерах, содержащих парамагнитную метку. Время релаксации зависит от взаимодействия спинов ядра и электрона и, следовательно, от расстояния между ними (T пропорционально r^6). Тем самым, можно получить информацию о геометрии молекулы и о ее движениях [265]. В работах [266] изучались спектры ЭПР и ЯМР алкогольдегидрогеназы, меченной аналогом никотинамидадениндинуклеотида. Оказалось, что метка конкурирует с НАД-Н в месте связывания ферментом, сильно иммобилизуется белком, резко изменяет время релаксации протонов воды, причем величина T сильно зависит от концентрации спирта. Установлено место связывания спирта этим ферментом и оценены кинетические и геометрические характеристики системы.

Еще не использованы такие возможности методов ЭПР, как изучение различий в релаксации в разных областях спектра [263]. Двойной электронный резонанс может оказаться полезным для определения расстояний между метками [267] (дальнейшие подробности см. в [255, 268, 269, 283, 284]).

Изучение структуры, конформационных изменений, внутренней динамики сложных биополимерных молекул естественно требует применения методов зондирования с помощью чувствительных меток. В этом смысле спиновые метки подобны люминесцентным.

Литература

1. *М. Перутц*, в сб. «Молекулы и клетки», «Мир», 1966.
2. *C. Blake*, Adv. Protein Chem. 23, 59 (1968).
3. *М. Бургер*, Рентгеновская кристаллография, ИЛ, 1948.
4. *А. Гинье*, Рентгенография кристаллов, Физматгиз, 1961.
5. *А. И. Китайгородский*, Рентгеноструктурный анализ, Гостехиздат, 1950.
6. *А. И. Китайгородский*, Рентгеноструктурный анализ мелкокристаллических и аморфных тел, Гостехиздат, 1952.
7. *А. И. Китайгородский*, Теория структурного анализа, Изд-во АН СССР, 1957.
8. *М. Бургер*, Структура кристаллов и векторное пространство, ИЛ, 1961.
9. *Б. К. Вайнштейн*, Дифракция рентгеновских лучей на цепных молекулах, Изд-во АН СССР, 1963.

10. *Б. К. Вайнштейн*, УФН **88**, 527 (1966).
11. *Н. С. Андреева*, в сб. «Основы молекулярной биологии, Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот», «Наука», 1967.
12. *Н. С. Андреева*, ЖВХО им. Менделеева **16**, 369 (1971).
13. *Д. Кендрью*, Биофизика **8**, 273 (1963).
14. *M. Perutz* a. o., Nature **219**, 29 (1968).
15. *W. Bolton, M. Perutz*, Nature **228**, 551 (1970)
16. *R. Huber, O. Epp, H. Formanek*, Naturwissenschaften **56**, 362 (1969).
17. *R. Dickerson* a. o., J. Biol. Chem. **246**, 1515 (1971).
18. *C. Blake* a. o., Nature **206**, 757 (1965).
19. *G. Kartha, J. Bello, D. Harker*, Nature **213**, 862 (1967).
20. *H. Wykoff* a. o., J. Biol. Chem. **245**, 305 (1970).
21. *W. Lypscomb* a. o., Phil. Trans. Roy. Soc. **B257**, 177 (1970).
22. *S. Freer* a. o., Biochemistry **9**, 1997 (1970).
23. *T. Steitz, R. Henderson, D. Blow*, J. Mol. Biol. **96**, 337 (1969).
24. *J. Drenth* a. o., Nature **218**, 929 (1968).
25. *A. Arnon* a. o., Proc. Nat. Acad. Sci. US **64**, 420 (1969).
26. *J. Heriott, L. Sicker, L. Jensen, M. Lovenberg*, J. Mol. Biol. **50**, 391 (1970).
27. *M. Adams* a. o., Nature **227**, 1098 (1970).
28. *M. Adams* a. o., Nature **224**, 491 (1968).
29. *C. Schubert, H. Wright, R. Alden, J. Kraut*, Nature **221**, 235 (1969).
30. *Б. К. Вайнштейн*, УФН **109**, 545 (1973).
31. *З. Г. Пинскер*, Дифракция электронов, Изд-во АН СССР, 1947.
32. *Б. К. Вайнштейн*, Структурная электронография, Изд-во АН СССР, 1956.
33. *Д. Бекно*, Дифракция нейтронов, ИЛ, 1957.
34. *Д. Уотсон*, Двойная спираль, «Мир», 1969.
35. *А. И. Китайгородский, Д. Я. Цванкин*, Высокомол. соед. **1**, 269, 279 (1958); Кристаллография **4**, 625 (1959).
36. *W. Astbury*, Proc. Roy. Soc. **B134**, 303 (1947); **B141**, 1 (1953).
37. *С. П. Капица*, Природа, № 10, 22 (1971).
38. *O. Kratky*, Progr. in Biophys. a. Mol. Biol. **13**, 194 (1965).
39. «Small-Angle X-Ray Scattering», ed. H. Brumberger, Gorder a. Breach, 1967.
40. *O. Kratky, B. Paletta, G. Porod, K. Strohmaier*, Z. Naturforsch. **126**, 287 (1957).
41. *О. Б. Птицын, Б. А. Федоров*, ДАН СССР **153**, 882 (1963).
42. *H. Ritland, P. Keasberg, W. Beeman*, J. Chem. Phys. **18**, 1237 (1950).
43. *А. А. Вазина, Г. М. Франк, Б. К. Лемажихин*, J. Mol. Biol. **14**, 373 (1965).
44. *Р. Л. Каюшина, Н. И. Сойфенов, И. П. Куранова, Н. В. Конарева*, Биофизика **12**, 611 (1967).
45. *Н. Г. Есипова, А. Т. Дембо, В. Г. Туманян, О. Л. Поляновский*, Мол. биол. **2**, 527 (1968).
46. *В. Г. Туманян, Н. Г. Есипова, Л. Л. Киселев*, ДАН СССР **168**, 211 (1966).
47. *P. Laggner, O. Kratky, W. Palm, A. Holaček*, FEBS Letters **15**, 220 (1971).
48. *G. Porod*, Kolloid Z. **124**, 83; **125**, 51 (1951).
49. *W. Wunderlich, R. Kirste*, Ber. Bunsengesellschaft, Phys. Chem. **68**, 645 (1964).
50. *А. И. Григорьев, Л. А. Волкова, О. Б. Птицын*, Высокомол. соед. **Б11**, 232 (1969); **A12**, 1363 (1970); FEBS Letters **14**, 189; **15**, 217 (1971).
51. *W. Gratzer*, in «Poly-α-Amino Acids», ed. G. Fasman, M. Dekker Inc. 1967.
52. *J. Ham, J. Platt*, J. Chem. Phys. **20**, 335 (1952).
53. *H. Hunt, W. Simpson*, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 4540 (1953).
54. *D. Peterson, W. Simpson*, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 2375 (1957).
55. *J. Ladik*, Nature **202**, 1208 (1964).
56. *M. Suard, G. Berthier, B. Pullman*, Biochim. Biophys. Acta **52**, 254 (1961).
57. *M. Suard*, J. Chim. Phys. **62**, 79 (1965).

58. *S. Yomosa*, Biopolymers, Symposia **1**, 1 (1964).
59. *I. Tinoco, A. Halpern, W. Simpson*, in «Polyamino Acids, Polypertides and Proteins», ed. M. Stahmann, Univ. Wisconsin Press, 1962,
60. *А. С. Давыдов*, Теория поглощения света в молекулярных кристаллах, Изд-во АН УССР, 1951; Теория молекулярных экситонов, «Наука», 1968.
61. *В. М. Агранович*, Теория экситонов, «Наука», 1968.
62. *W. Moffitt*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **42**, 736 (1956).
63. *Б. С. Непорент, Н. Г. Бахшиев*, Оптика и спектроскопия **5**, 64 (1958); 8, 777 (1960).
64. *Н. Г. Бахшиев*, Оптика и спектроскопия **10**, 717 (1961); **19**, 535 (1964).
65. *S. Yanari, F. Bovey*, J. Biol. Chem.**235**, 2818 (1960).
66. *M. Weissbluth*, Quart. Rev. Biophys. **4**, 1 (1971).
67. *H. De Voe*, Biopolymers, Symposia **1**, 251 (1964).
68. *R. Bullough*, J. Chem. Phys. **43**, 1927 (1965); **48**, 3712 (1968).
69. *H. De Voe, I. Tinoco*, J. Mol. Biol. 4, 518 (1962).
70. *R. Nesbet*, Mol. Phys. **7**, 211 (1964); Biopolymers, Symposia **1**, 129 (1964).
71. *W. Johnson, I. Tinoco*, Biopolymers **7**, 727 (1969).
72. *M. Goodman, I. Listowsky, Y. Masuda, F. Boardman*, Biopolymers **1**, 33 (1963).
73. *R. McDiarmid, P. Doty*, J. Phys. Chem. **70**, 2620 (1966).
74. *K. Rosenheck, P. Doty*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **47**, 1785 (1961).
75. *В. И. Данилов, Н. В. Желтовский, В. В. Оглоблин, В. И. Печеная*, J. Theor. Biol. **30**, 559 (1971).
76. *В. И. Данилов, Н. В. Желтовский*, Theor. Chim. Acta **19**, 384 (1970).
77. *М. Борн*, Оптика, ГНТИУ, 1937.
78. *М. В. Волькенштейн*, Молекулярная оптика, Гостехиздат, 1951.
79. *D. Caldwell, H. Eyring*, The Theory of Optical Activity, Wiley-Intersci. Publ., 1971.
80. *L. Rosenfeld*, Z. Phys. **52**, 161 (1928).
81. *Г. Эйринг, Д. Уолтер, Д. Кимбалл*, Квантовая химия, ИЛ, 1948.
82. *У. Козман*, Введение в квантовую химию, ИЛ, 1960.
83. *Е. Кондон*, УФН **19**, 380 (1938).
84. *М. В. Волькенштейн*, Усп. хим. **9**, 1090, 1252 (1940).
85. *A. Moscowitz*, Adv. Chem. Phys. **4**, 67 (1962).
86. *А. Московиц*, в сб. «Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии», «Мир», 1970.
87. *R. L. Kronig*, J. Opt. Soc. Amer. **12**, 547 (1926).
88. *H. Kramers*, Atti Congr. Intern. Fisici Como. **2**, 545 (1927).
89. *J. Macdonald, M. Brachman*, Rev. Mod. Phys. **28**, 393 (1956).
90. *A. Moscowitz*, Rev. Mod. Phys. **32**, 440 (1960).
91. *D. Caldwell, H. Eyring*, Ann. Rev. Phys. Chem. **15**, 281 (1964).
92. *J. Kirkwood*, J. Chem. Phys. **5**, 479 (1937).
93. *М. В. Волькенштейн*, ДАН СССР **71**, 447, 643 (1950).
94. *A. McLachlan, M. Ball*, Mol. Phys. **8**, 581 (1965).
95. *В. М. Асланян, М. В. Волькенштейн*, Оптика и спектроскопия **7**, 208 (1959).
96. *E. Condon, W. Altar, H. Eyring*, J. Chem. Phys. **5**, 753 (1937).
97. *W. Kauzmann, J. Walter, H. Eyring*, Chem. Rev. **26**, 339 (1940).
98. *К. Джерасси*, Дисперсия оптического вращения, ИЛ, 1962.
99. *Л. Веллюз, М. Легран, М. Грожан*, Оптический круговой дихроизм, «Мир», 1967.
100. Сборник «Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии», «Мир», 1970.
101. *М. П. Кручек*, в сб. «Оптика и спектроскопия», т. 2, Изд-во АН СССР, 1963; Оптика и спектроскопия **17**, 545, 794 (1964).

102. *М. В. Волькенштейн, К. Константинавичус*, Оптика и спектроскопия **23**, 77 (1967).
103. *М. В. Волькенштейн, А. М. Эфрос*, Усп. хим. **19**, 602 (1950).
104. *W. Kuhn, H. Freudenberg*, Hand- u. Jahrbuch Chem. Phys. Bd. **8**, Teil 3, 1930.
105. *J. Yang*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **53**, 438 (1965).
106. *W. Moffitt*, J. Chem. Phys. **25**, 467 (1956); Proc. Nat. Acad. Sci. US **42**, 736 (1956).
107. *W. Moffitt, J. Yang*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **92**, 596 (1956).
108. *W. Moffitt, D. Fitts, J. Kirkwood*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **43**, 723 (1957).
109. *I. Tinoco*, Adv. Chem. Phys. **4**, 113 (1962).
110. *I. Tinoco, R. Woody, D. Bradley*, J. Chem. Phys. **38**, 1317 (1963).
111. *J. Schellmann, P. Oriel*, J. Chem. Phys. **37**, 2114 (1962).
112. *I. Tinoco*, J. Chem. Phys. **65**, 91 (1968).
113. *W. Gratzer, D. Cowburn*, Nature **222**, 426 (1969).
114. *R. Woody, I. Tinoco*, J. Chem. Phys. **46**, 4927 (1967).
115. *E. Pysh*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **56**, 825 (1966); J. Mol. Biol. **23**, 587 (1967).
116. *N. Go*, Proc. Phys. Soc. Japan **21**, 1579 (1966).
117. *R. Harris*, J. Chem. Phys. **43**, 959 (1965).
118. *В. А. Зубков, М. В. Волькенштейн*, Мол. биол. **4**, 598 (1970).
119. *Е. В. Ануфриева* и др., Биофизика **10**, 918 (1965).
120. *G. Fasman, E. Blout*, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 2262 (1960).
121. *J. Bradbury, A. Elliott, W. Hanby*, J. Mol. Biol. **5**, 487 (1962).
122. *S. Ikeda, H. Maeda, T. Isemura*. J. Mol. Biol. **10**, 223 (1964).
123. *K. Imahori. I. Yahari*, Biopolymers, Simposia **1**, 421 (1964).
124. *P. Sarkar, P. Doty*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **55**, 981 (1966).
125. *E. Iizuka, J. Yang*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **55**, 1175 (1966).
126. *R. Townend* a. o., Biochem. Biophys. Res. Comm. **23**, 163 (1966).
127. *B. Davidson, N. Tooney, G. Fasman*, Biochem. Biophys. Res. Comm. **23**, 156 (1966).
128. *М. В. Волькенштейн, В. А. Зубков*, Ж. структ. хим. **8**, 284 (1967).
129. *В. А. Зубков, М. В. Волькенштейн*, ДАН СССР **175**, 942 (1967).
130. *Т. М. Бирштейн, В. А. Зубков, М. В. Волькенштейн*, J. Polymer Sci. Pt. A-2 **8**, 177 (1970).
131. *В. А. Зубков, Т. М. Бирштейн, И. С. Милевская, М. В. Волькенштейн*, Мол. биол. **4**, 715 (1970).
132. *E. Blout, L. Stryer*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **45**, 159 (1959); J. Amer. Chem. Soc. **83**, 1411 (1961).
133. *Е. Блоут, Д. Карвер, Е. Шехтер*, в сб. «Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии», «Мир», 1970, гл. 14.
134. *И. А. Болотина, М. В. Волькенштейн*, в сб. «Молекулярная биофизика», «Наука», 1965.
135. *Ю. М. Торчинский*, в сб. «Успехи биологической химии», т. 8, «Наука», 1967.
136. *T. Li, B. Johnson*, Biochemistry **8**, 3638 (1969).
137. *В. И. Пермогоров, Ю. С. Лазуркин, С. Э. Шмурак*, ДАН СССР **155**, 1440 (1964).
138. *К. Константинавичус, М. В. Волькенштейн*, Оптика и спектроскопия **23**, 80 (1967).
139. *М. Д. Франк-Каменецкий, А. В. Лукашин*, Оптика и спектроскопия **30**, 1092 (1971).
140. *J. Yang, T. Samejima*, Progr. Nucleic Acids Res. a. Mol. Biol. **9**, 224 (1969).
141. *J. Yang, T. Samejima, P. Sarkar*, Biopolymers **4**, 623 (1966).
142. *B. Johnson, I. Tinoco*, Biopolymers **7**, 727 (1969).
143. *P. Sarkar, B. Wells, J. Yang*, J. Mol. Biol. **25**, 563 (1967).

144. *J. Yang*, in «Poly-α-amino acids», ed. G. Fasman, M. Dekker Inc., 1967.
145. *H. Hashizume, M. Shiraki, K. Imahori*, J. Biochem. Japan **62**, 543 (1967).
146. *S. Beychok*, in «Poly-α-amino acids», ed. G. Fasman, M. Dekker Inc., 1967.
147. *V. Saxena, D. Wetlaufer*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **68**, 969 (1971).
148. *P. Urnes, P. Doty*, Adv. Protein Chem. **16**, 401 (1961).
149. *E. Shechter, E. Blout*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **51**, 695, 794 (1964).
150. *E. Shechter, J. Carver, E. Blout*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **51**, 1029 (1964).
151. *С. Ю. Веньяминов, Ю. Н. Чиргадзе*, Оптика и спектроскопия **23**, 813 (1967); ДАН СССР **195**, 722 (1970).
152. *M. Warshaw, I. Tinoco*, J. Mol. Biol. **20**, 29 (1966).
153. *Г. Б. Завильгельский*, Мол. биол. **1**, 703 (1967).
154. *C. Cantor, I. Tinoco*, Biopolymers **5**, 84 (1967).
155. *R. Cotton, P. McPhie, W. Gratzer*, Nature **216**, 864 (1967).
156. *C. Bush, H. Scheraga*, Biochemistry **6**, 3036 (1967).
157. *P. Oriel, J. Koening*, Arch. Biochem. **127**, 274 (1968).
158. *P. Oriel*, Arch. Biochem. **115**, 577 (1966).
159. *Б. С. Непорент*, ДАН СССР **119**, 682 (1958).
160. *Б. И. Степанов*, Люминесценция сложных молекул, Изд-во АН БССР, 1955.
161. *Э. В. Шпольский*, УФН **71**, 215 (1960); **80**, 255 (1963).
162. *С. И. Вавилов*, Собрание сочинений, т. I, Изд-во АН СССР, 1952.
163. *П. П. Феофилов*, Поляризованная люминесценция атомов, молекул и кристаллов, Физматгиз, 1959.
164. *А. Н. Теренин*, Фотоника молекул красителей и родственных соединений, «Наука», 1967.
165. *С. И. Вавилов*, Микроструктура света, Изд-во АН СССР, 1950.
166. *T. Förster*, in «Comparative Effects of Radiation», ed. L. Burton, J. Kirby-Smith, J. Magee, 1960.
167. *T. Förster*, Trans. Faraday Soc. **27**, 7 (1959); Radiation Res. Suppl. **2**, 326 (1960).
168. *E. McRae, W. Siebrand*, J. Chem. Phys. **41**, 905 (1964).
169. *А. Сцент-Дьёрдьи*, Биоэнергетика, Физматгиз, 1960.
170. *С. В. Конев*, Электронно-возбужденные состояния биополимеров, «Наука и техника», Минск, 1965.
171. *Г. М. Баренбойм, А. Н. Доманский, К. К. Туроверов*, Люминесценция биополимеров и клеток, «Наука», 1960.
172. *Ю. А. Владимиров*, Фотохимия и люминесценция белков, «Наука», 1965.
173. *G. Weber*, Biochem. J. **75**, 335, 345 (1960); **79**, 29 (1961).
174. *Э. А. Бурштейн*, Биофизика **9**, 184 (1964); **13**, 433, 718 (1968).
175. *Ю. А. Владимиров, Ли-Чинь-го*, Биофизика **7**, 270 (1962).
176. *Н. С. Веденкина, Э. А. Бурштейн*, Биофизика **15**, 965 (1970); Мол. биол. **4**, 743 (1970).
177. *Е. П. Бусел, Э. А. Бурштейн*, Биофизика **15**, 993 (1970).
178. *Е. П. Бусел, Т. Л. Бушуева, Э. А. Бурштейн*, Оптика и спектроскопия **29**, 501 (1970).
179. *R. Chen, H. Edelhoch, R. Steiher*, in «Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry», ed. Leach, 1969.
180. *И. Я. Осташевский*, Биофизика **16**, 609 (1971); Мол. биол. **6**, 3 (1972).
181. *G. Weber*, Biochem. J. **53**, 145 (1952).
182 *P. Wahl, G. Weber*, J. Mol. Biol. **30**, 371 (1967).
183. *Е. В. Ануфриева, М. В. Волькенштейн, М. Г. Краковяк, Т. В. Шевелева*, ДАН СССР **182**, 361 (1968); **186**, 854 (1969).
184. *Е. В. Ануфриева* и др., Изв. АН СССР, сер. физ. **34**, 518 (1970).
185. *Е. В. Ануфриева* и др., ДАН СССР **194**, 1108 (1970).
186. *В. А. Самокиш, Е. В. Ануфриева, М. В. Волькенштейн*, Мол. биол. **2**, 374 (1968).

187. *Н. Г. Бахшиев, Ю. Т. Мазуренко, И. В. Питерская*, Изв. АН СССР, сер. физ. **32**, 1360 (1969).
188. *Е. В. Ануфриева, М. В. Волькенштейн, В. А. Самокиш*, ДАН СССР **195**, 1215 (1970).
189. *М. В. Волькенштейн, М. А. Ельяшевич, Б. И. Степанов*, Колебания молекул, т. 1, 2, Гостехиздат, 1949.
190. *М. В. Волькенштейн, Л. А. Грибов, М. А. Ельяшевич, Б. И. Степанов*, Колебания молекул, «Наука», 1974.
191. *Г. Герцберг*, Колебательные и вращательные спектры многоатомных молекул, ИЛ, 1949.
192. *Е. Вильсон, Д. Дешиус, П. Кросс*, Теория колебательных спектров молекул, ИЛ, 1960.
193. *Л. М. Свердлов, М. А. Ковнер, Е. П. Крайнов*, Колебательные спектры многоатомных молекул, «Наука», 1970.
194. *М. М. Сущинский*, Спектры комбинационного рассеяния молекул и кристаллов, «Наука», 1969.
195. *M. Born, R. Oplenheimer*, Ann. Phys. **84**, 457 (1927).
196. *М. В. Волькенштейн*, ДАН СССР **30**, 784 (1941); ЖЭТФ **11**, 642 (1941).
197. *М. В. Волькенштейн*, УФН **29**, 54 (1946).
198. *T. Mijazawa*, in «Polyamino acids, polypeptides and proteins», ed. M. Stahmann, Univ. Wisconsin Press, 1962.
199. *T. Mijazawa, T. Shimanouchi, S. Mizushima*, J. Chem. Phys. **24**, 408 (1956), **29**, 611 (1958).
200. *T. Schimanouchi, I. Makagawa, J. Hiraishi, M. Ishii*, J. Mol. Spectr. **19**, 78 (1966).
201. *Г. Сузи*, в сб. «Структура и стабильность биологических макромолекул», «Мир», 1973.
202. *C. Liang, S. Krimm, G. Sutherland*, J. Chem. Phys. **25**, 543, 549 (1956).
203. *C. Liang, S. Krimm*, J. Chem. Phys. **25**, 563 (1956).
204. *Ю. Я. Готлиб*, Оптика и спектроскопия **7**, 294 (1959); **9**, 319 (1960); Высокомол. соед. **1**, 474 (1959).
205. *Ю. Я. Готлиб, Л. В. Кудинская*, Оптика и спектроскопия **10**, 335 (1961); **13**, 59 (1962).
206. *В. Г. Бойцов, Ю. Я. Готлиб*, Оптика и спектроскопия, в сб. «Молекулярная спектроскопия», т. 2, 1963, стр. 128, 135.
207. *Л. А. Грибов, Т. С. Абилова*, Оптика и спектроскопия **23**, 374, 535 (1967); **26**, 915 (1969).
208. *О. Б. Зубкова, Л. А. Грибов, А. Н. Шабадаш*, Ж. прикл. спектроскопии **16**, 2, 306 (1972).
209. *K. Fukushima, Y. Ideguchi, T. Mijazawa*, Bull. Chem. Soc. Japan **36**, 1301 (1963).
210. *S. Suzuki, Y. Iwashita, T. Shimanouchi, M. Tsuboi*, Biopolymers **4**, 337 (1966).
211. *T. Mijazawa*, J. Chem. Phys. **32**, 1647 (1960).
212. *T. Mijazawa, E. Blout*, J. Amer. Chem. Soc. **83**, 712 (1961).
213. *S. Krimm*, J. Mol. Biol. **4**, 528 (1962).
214. *H. Susi, S. Timasheff, L. Stevens*, J. Biol. Chem. **242**, 5460 (1967).
215. *Ю. Н. Чиргадзе*, Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков, «Наука», 1965.
216. *R. Lord, N. Yu*, J. Mol. Biol. **50**, 509; **51**, 203 (1970).
217. *Е. К. Завойский*, J. Phys. USSR **9**, 245, 447 (1945); **10**, 170, 197 (1946).
218. *Э. Эндрю*, Ядерный магнитный резонанс, ИЛ, 1962.
219. *Д. Попл, В. Шнейдер, Г. Бернстайн*, Спектры ЯМР высокого разрешения, ИЛ, 1962.
220. *Д. Робертс*, Ядерный магнитный резонанс, ИЛ, 1962.
221 *Д. Робертс*, Введение в анализ спектров ЯМР высокого разрешения, ИЛ, 1963.

222. *Н. Бхакка, Д. Уильямс*, Применение ЯМР в органической химии, «Мир», 1966.
223. *А. Лёше*, Ядерная индукция, ИЛ, 1963.
224. *И. Я. Слоним, А. Н. Любимов*, Ядерный магнитный резонанс в полимерах, «Химия», 1966.
225. *Д. Эксли, Д. Финей, Л. Сатклиф*, Спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения, «Мир», 1968.
226. *А. И. Кольцов, Б. А. Ершов*, Ядерный магнитный резонанс в органической химии, изд. ЛГУ, 1968.
227. *J. Markley, I. Putter, O. Jardetzky*, Science **151**, 1249 (1968).
228. *G. Roberts, O. Jardetzky*, Adv. Protein Chem. **24**, 448 (1970).
229. *C. McDonald, W. Phillips*, in «Biological Macromolecules», vol. 3, ed. G. Fasman, S. Timasheff, M. Dekker, Inc., 1970.
230. *K. Wüthrich, R. Shulman*, Physics Today **23**, № 4, 43 (1970).
231. *O. Jardetzky*, Naturwissenschaften, Heft 7, 149 (1967).
232. *J. Markley, D. Meadows, O. Jardetzky*, J. Mol. Biol. **27**, 25 (1967).
233. *A. Burgen, O. Jardetzky, J. Metcalfe, N. Wade-Jardetzky*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **58**, 447 (1967).
234. *J. Markley, M. Williams, O. Jardetzky*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **65**, 645 (1970).
235. *J. Cohen, O. Jardetzky*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **60**, 92 (1968).
236. *D. Meadows, G. Roberts, O. Jardetzky*, J. Mol. Biol. **45**, 491 (1969).
237. *G. Roberts, E. Dennis, D. Meadows, J. Cohen, O. Jardetzky*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **62**, 1151 (1969).
238. *В. Ф. Быстров, В. Г. Сахаровский*, ЖВХО им. Менделеева **16**, № 4, 380 (1971).
239. *С. А. Альтшулер, Б. М. Козырев*, Электронный парамагнитный резонанс, Физматгиз, 1961.
240. *Д. Ингрэм*, Электронный парамагнитный резонанс в свободных радикалах, ИЛ, 1961.
241. *Д. Пейк*, Парамагнитный резонанс, «Мир», 1965.
242. *Д. Ингрэм*, Электронный парамагнитный резонанс в биологии, «Мир», 1972.
243. Сборник «Свободные радикалы в биологических системах», ИЛ, 1963.
244. *B. Commoner*, Light and Life, John Hopkins Press, 1961.
245. *Л. П. Каюшин, К. М. Львов, М. К. Пулатова*, Исследования парамагнитных центров облученных белков, «Наука», 1970.
246. *Э. Г. Розанцев*, Свободные аминоксильные радикалы, «Химия», 1970.
247. *T. Stone, P. Buchman, P. Nordio, H. McConnell*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **54**, 1010 (1965).
248. *H. McConnell, C. Hamilton*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **60**, 776 (1968).
249. *H. McConnell, W. Deal, R. Ogata*, Biochemistry 8, 2580 (1969).
250. *H. McConnell*, J. Chem. Phys. **25**, 709 (1956).
251. *D. Kivelson*, J. Chem. Phys. **33**, 1094 (1960).
252. *A. Hudson, G. Luckhurst*, Chem. Rev. **69**, 191 (1969).
253. *S. Ogawa, H. McConnell*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **58**, 19 (1967).
254. *S. Ogawa, H. McConnell, A. Horwitz*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **61**, 401 (1968); Nature **220**, 787 (1968).
255. *Г. И. Лихтенштейн*, Метод спиновых меток в молекулярной биологии, «Наука», 1974.
256. *Г. И. Лихтенштейн, Т. В. Трошкина, Ю. Д. Ахмедов, В. Ф. Шувалов*, Мол. биол. **3**, 413 (1969).
257. *Г. И. Лихтенштейн, Ю. Б. Гребенщиков, П. Х. Бободжанов, Ю. В. Коханов*, Мол. биол. **4**, 682 (1970).
258. *Ю. В. Коханов, Ю. Д. Ахмедов, Г. И. Лихтенштейн, Л. В. Иванов*, ДАН СССР **205**, 372 (1972).

259. *В. П. Тимофеев, О. Л. Поляновский, М. В. Волькенштейн, Г. И. Лихтенштейн,* Biochim. Biophys. Acta **120**, 357 (1970).
260. *D. Wallach.* J. Chem. Phys. **41**, 5223 (1968).
261. *Г. И. Лихтенштейн,* Мол. биол. **2**, 234 (1968).
262. *Г. И. Лихтенштейн, А. П. Пивоваров, П. Х. Бободжанов, Э. Г. Розанцев, Н. Б. Смолина,* Биофизика **13**, 396 (1968).
263. *H. McConnell, B. McFarland,* Quart. Rev. Biophys. **3**, 91 (1970).
264. *W. Hubbell, H. MtConnell,* Proc. Nat. Acad. Sci. US **61**, 12 (1968); **63**, 16 (1969).
265. *A. Mildvan, M. Cohn,* Adv. Enzymol. **33**, 1 (1970).
266. *N. Mildvan, H. Weiner,* Biochemistry 8, 552 (1969); J. Biol. Chem. **244**, 2465 (1969).
267. *J. Hyde, J. Chien, J. Freed,* J. Chem. Phys. **48**, 4211 (1968).
268. *M. Cohn,* Quart. Rev. Biophys. **3**, 61 (1970).
269. *В. А. Яковлев,* ЖВХО им. Менделеева **16**, № 4, 391 (1971).
270. *Н. Г. Есипова,* Рентгеноструктурный анализ белков, в сб. «Молекулярная биология», т. 2 (Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР), 1973.
271. *В. Г. Туманян,* Рентгеноструктурный анализ нуклеиновых кислот, в сб. «Молекулярная биология», т. 2 (Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР), 1973.
272. *И. А. Болотина,* Изучение структуры белков методом кругового дихроизма, в сб. «Молекулярная биология», т. 1 (Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР), 1972.
273. *В. И. Иванов,* Круговой дихроизм и структура комплементарных нуклеиновых кислот, в сб. «Молекулярная биология», т. 1 (Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР), 1972.
274. *Е. П. Бусел,* Люминесцентные свойства основных хромофоров белка, в сб. «Молекулярная биология», т. 3 (Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР), 1973.
275. *Э. А. Бурштейн,* Люминесценция белка. Природа и применение, в сб. «Молекулярная биология», т. 3 (Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР), 1973.
276. *О. Ф. Борисова, А. Н. Суровая,* Применение флуоресцирующих красителей для изучения структуры нуклеиновых кислот, в сб. «Молекулярная биология», т. 1 (Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР), 1972.
277. *Ю. Н. Чиргадзе,* Инфракрасная спектроскопия полипептидов и белков, в сб. «Молекулярная биология», т. 1 (Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР), 1972.
278. *Ю. Н. Чиргадзе, Н. А. Невская,* ДАН СССР **208**, 447 (1973).
279. *Ю. Н. Чиргадзе,* Биофизика **14**, 792 (1969); Ж. прикл. спектроскопии **11**, 923 (1969).
280. *Ю. Н. Чиргадзе, А. М. Овсепян,* Мол. биол. **6**, 721 (1972); Biopolymers **11**, 2179 (1972); **12**, 637 (1973).
281. *Ю. Н. Чиргадзе, С. Ю. Веньяминов,* Biopolymers **12**, 1337 (1973).
282. *W. Peticolas* a. o., Proc. Nat. Acad. Sci. US **69**, 1467 (1972).
283. *Г. И. Лихтенштейн, В. К. Кольтовер,* Метод спиновых меток в молекулярной биологии, в сб. «Молекулярная биология», т. 3 (Итоги науки и техники, ВИНИТИ АН СССР), 1973.

ФИЗИКА ФЕРМЕНТОВ

§ 6.1. ХИМИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА И КАТАЛИЗ

Ферменты — белковые катализаторы биохимических реакций. Фермент существенно влияет на скорость реакции, но в реакции не расходуется.

Скорости химических реакций обычно сильно зависят от температуры. Эмпирически эта зависимость выражается формулой Аррениуса для константы скорости реакции

$$k = A\exp(-E^*/RT), \tag{6,1}$$

где E^* — энергия активации, A — предэкспоненциальный множитель. Из (6,1) следует, что

$$\ln k = \ln A - E^*/RT, \tag{6,2}$$

т. е. зависимость $\ln k$ от $1/T$ линейна, и по наклону прямой можно найти E^*. Более точное уравнение (см. [1]) имеет вид

$$\ln k = \ln A + \left(\frac{C}{R}\right)\ln T - E^*/RT. \tag{6,3}$$

Для обратимой реакции $A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} B$ константа равновесия равна

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[B]_e}{[A]_e}; \tag{6,4}$$

индекс «е» указывает равновесную концентрацию. Как показывает термодинамика,

$$RT\ln K = -\Delta F = -\Delta H + T\Delta S, \tag{6,5}$$

где ΔF, ΔH, ΔS — изменения стандартных свободной энергии, энтальпии и энтропии в реакции. В ограниченном интервале температур

$$\left.\begin{aligned}\Delta H_T &= \Delta H_{T_0} + \Delta c_p (T - T_0),\\ \Delta S_T &= \Delta S_{T_0} + \Delta c_p (\ln T - \ln T_0),\end{aligned}\right\} \tag{6,6}$$

где Δc_p — средняя разность теплоемкостей (при постоянном давлении) реагентов и продуктов реакции. Следовательно,

$$\ln K = \frac{\Delta S_{T_0} - \Delta c_p}{R} + \frac{\Delta c_p}{R}\ln\frac{T}{T_0} - \frac{\Delta H_{T_0} - T_0\Delta c_p}{RT}. \tag{6,7}$$

Сравнивая (6,7) и (6,3), находим

$$\ln A_1 - \ln A_{-1} = (\Delta S_{T_0} - \Delta c_p)/R, \quad C_1 - C_{-1} = \Delta c_p,$$
$$E_1^* - E_{-1}^* = \Delta H_{T_0} - T_0 \Delta c_p. \qquad (6,8)$$

Разность энергий активации прямой и обратной реакций связана с теплотой реакции ΔH, а отношение предэкспоненциальных множителей — с изменением энтропии реакции ΔS. Если $\Delta c_p = 0$, то справедливо уравнение Аррениуса (6,1). Из изложенного следует, что его можно переписать в виде

$$k = b \exp(-F^*/RT) = b \exp(S^*/R) \exp(-H^*/RT), \qquad (6,9)$$

где F^*, H^*, S^* — соответственно свободная энергия, энтальпия и энтропия активации. Если отождествить H^* с E^*, то предэкспоненциальный множитель равен

$$A = b \exp(S^*/R). \qquad (6,10)$$

В действительности же

$$E^* = H^* + RT^2 \frac{\partial \ln b}{\partial T}, \qquad (6,11)$$

и указанное отождествление справедливо, лишь если b не зависит от T.

Физический смысл экспоненциальной формулы (6.9) раскрывается в теории абсолютных скоростей реакций (*теория переходного состояния*, или *активированного комплекса*), предложенной Эйрингом [2].

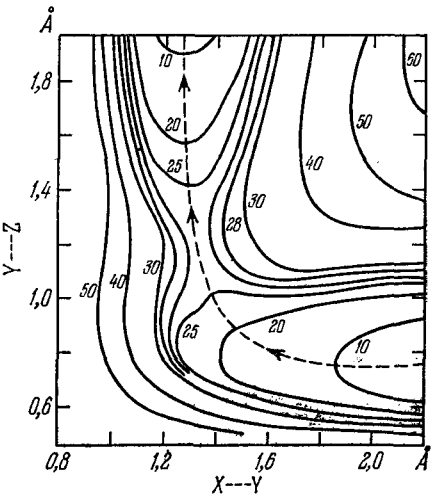


Рис. 6.1. Энергетическая поверхность для реакции трех атомов.
Числа у кривых указывают энергии в условных единицах.

Предполагается, что течение реакции не нарушает больцмановского распределения молекул по состояниям с различными энергиями. Очевидно, что зависимость потенциальной энергии реагирующих атомных систем от взаимного расположения атомов представляется некоторой многомерной поверхностью. На рис. 6.1 изображена такая поверхность для реакции трех атомов

$$X + Y - Z \longrightarrow X - Y + Z,$$

т. е. построена карта энергий, как функции двух расстояний $r_1(X \ldots Y)$ и $r_2(Y \ldots Z)$. Прохождение реакции требует преодоления энергетического барьера. На рис. 6.1 состояние системы изменяется наивыгоднейшим образом вдоль пунктирной кривой.

Для вычисления скорости реакции нужно подсчитать число систем, проходящих через седловидную точку на потенциальной поверхности (на рисунке соответствующая ей энергия в условных единицах равна 26). Состояние системы, попавшей в эту точку, называется переходным состоянием или активированным комплексом. Для простейшей реакции $H + H_2 \rightarrow H_2 + H$ оно отвечает симметричной линейной системе трех атомов водорода H...H...H.

В соответствии с принципами статистической механики определяется число систем, находящихся в некотором интервале δ реакционной координаты на вершине барьера, лежащего на пути реакции (рис. 6.2). Скорость реакции выражается числом систем, проходящих через барьер в единицу времени. Средняя скорость движения системы в прямом направлении равна (m — масса системы)

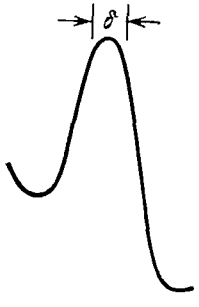


Рис. 6.2. Активационный барьер.

$$\bar{v} = \frac{\int_0^\infty \exp(-mv^2/2kT)\, v\, dv}{\int_0^\infty \exp(-mv^2/2kT)\, dv} = (kT/2\pi m)^{1/2} \qquad (6,12)$$

и среднее время прохождения через барьер

$$\tau = \delta/\bar{v} = \delta\,(2\pi m/kT)^{1/2}. \qquad (6,13)$$

Скорость реакции равна числу систем c' в единице объема, находящихся в пределах отрезка δ на вершине барьера, деленному на τ:

$$\nu = \frac{c'}{\tau} = \frac{c'}{\delta}\left(\frac{kT}{2\pi m}\right)^{1/2}. \qquad (6,14)$$

Вместе с тем

$$\nu = k c_A c_B \ldots, \qquad (6,15)$$

где k — константа скорости, c_A, c_B ... — концентрации реагентов. Из двух последних соотношений получаем

$$k = \frac{c'}{c_A c_B \ldots}\left(\frac{kT}{2\pi m}\right)^{1/2}\frac{1}{\delta} = K'\left(\frac{kT}{2\pi m}\right)^{1/2}\frac{1}{\delta}; \qquad (6,16)$$

здесь K' — константа равновесия для перехода реагентов A, B, ... в активированное состояние. Константа равновесия выражается через статистические суммы (см., например, [3]) следующим образом:

$$K' = \frac{Z_{а.к}}{Z_A Z_B \ldots}, \qquad (6,17)$$

где $Z_{а.к}$, Z_A, Z_B, ... — статистические суммы для активированного комплекса и реагентов A, B, ... соответственно. В случае поступательного движения частицы статистическая сумма равна

$$Z_{пост} = \frac{V}{N_A}\left(\frac{2\pi mkT}{h^2}\right)^{3/2}. \qquad (6,18)$$

Здесь h — постоянная Планка, m — масса частицы V/N_A — занимаемый ею объем. Примем его равным δ^3. $Z_{пост}$ — статистическая сумма, приходящаяся на три степени свободы поступательного движения. Но система имеет лишь одну такую степень свободы — вдоль направления реакции, и мы получим

$$Z_{а.к} = Z'_{а.к}\,\delta\left(\frac{2\pi mkT}{h^2}\right)^{1/2}, \qquad (6,19)$$

где $Z'_{а.к}$ — статистическая сумма для активированного комплекса по всем степеням свободы, кроме степени свободы поступательного движения вдоль направления реакции. Из (6,17) и (6,19) следует, что

$$k = \frac{kT}{h}\,\frac{Z'_{а.к}}{Z_A Z_B \ldots}. \qquad (6,20)$$

Статистическая сумма связана со свободной энергией соотношением $Z = \exp(-F/RT)$ и, следовательно,

$$k = \frac{kT}{h}\,\frac{\exp(-F'/RT)}{\exp(-F_A/RT)\exp(-F_B/RT)\ldots} =$$
$$= \frac{kT}{h}\exp\left(-\frac{F' - F_A - F_B - \ldots}{RT}\right) = \frac{kT}{h}\exp(-F^*/RT); \qquad (6,21)$$

здесь F^* — избыток свободной энергии активированного комплекса по сравнению с суммарной свободной энергией реагентов, т. е. свободная энергия активации.

При выводе выражения (6,21) предполагается, что, достигнув активационного барьера, система обязательно претерпевает рассматриваемое химическое превращение. Этого может и не быть, и поэтому вводится добавочный множитель — *трансмиссионный коэффициент* $\varkappa \leqslant 1$. Окончательное выражение для константы скорости гомогенной газовой реакции имеет вид

$$k = \varkappa\,\frac{kT}{h}\exp(S^*/R)\exp(-H^*/RT), \qquad (6,22)$$

эквивалентный соотношению (6,3).

Предэкспоненциальный частотный множитель в (6,22) $\varkappa\, kT/h$ при $\varkappa = 1$ и обычных температурах имеет порядок величины 10^{13}—10^{14} *сек*$^{-1}$. Значение $\varkappa$, равное 1, отвечает адиабатическому течению реакции в смысле Эренфеста. Адиабатическим

называется процесс, в котором параметры механической системы изменяются настолько медленно, что квантовые числа, характеризующие ее движение, остаются неизменными. В случае химической реакции речь идет о движении атомных ядер, происходящем значительно медленнее движения электронов. При каждой конфигурации ядер электроны движутся так, как если бы ядра оставались неподвижными. Если процесс неадиабатический, то $\varkappa \ll 1$ и может принимать значения порядка 10^{-5}. Теория таких реакций была развита в работах Ландау [4, 5] и Зинера [6]. Наблюдаемые значения $\varkappa$ для газовых реакций в большинстве случаев близки к 1, т. е. эти реакции идут адиабатически.

Теоретический расчет k, т. е. $Z'_{\text{а. к}}$, $Z_{\text{А}}$, $Z_{\text{В}}$, ... в принципе возможен посредством методов квантовой химии. Однако такие расчеты пока удалось осуществить лишь для немногих простейших случаев.

Необходимо подчеркнуть, что нельзя толковать множитель kT/h как время существования активированного комплекса. Такая трактовка приводит к противоречию — за 10^{-13}—10^{-14} *сек* не может установиться статистическое равновесие, постулируемое в теории. В действительности время существования системы в состоянии, отвечающем значениям реакционной координаты от x до $x + \delta$, зависит от выбора отрезка δ и пропорционально его длине. В этом смысле время существования активированного комплекса должно трактоваться так же, как время существования состояний, рассматриваемых в теории Максвелла — Больцмана. Из малости kT/h нельзя делать вывод о невозможности установления равновесия между активированными комплексами и реагентами [7]. Очевидно также, что термин «активированный комплекс» относится к определенному состоянию атомной системы, испытывающей превращение, и не означает существования метастабильного комплекса, который можно изучать физическими и химическими методами.

Значение изложенной теории состоит в физическом рассмотрении кинетических процессов, позволяющем обосновать формулы типа формулы Аррениуса и грубо оценить фигурирующие в ней величины. Теория непосредственно применима как к газовым химическим реакциям, так и к классическим кинетическим проблемам (вязкость, диффузия). Она позволяет также рассматривать гетерогенные процессы, например адсорбцию и реакции на поверхностях раздела фаз (см. [2, 8]).

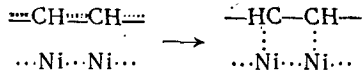
Влияние катализатора на скорость реакции означает изменение энергии активации. Катализатор (положительный) понижает активационный барьер.

Следует различать гетерогенный и гомогенный катализ. В первом случае катализатор образует отдельную фазу и реакция протекает на поверхности раздела фаз, т. е. на поверхности

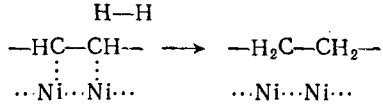
катализатора. Гомогенный катализ реализуется в тех случаях, когда катализатор и реагенты находятся в одной фазе, например в растворе. Тогда в катализе участвует некоторое промежуточное соединение.

Процесс гетерогенного катализа состоит в адсорбции реагирующих молекул поверхностью катализатора, реакции между ними и десорбции, т. е. отделении от поверхности продуктов реакции. Адсорбция приводит реагирующие молекулы в состояние тесного соприкосновения, изменяет структуру их электронных оболочек и может понизить энергию активации. Как показал Баландин в своей мультиплетной теории катализа [9], важнейшую роль в процессе играет геометрическое структурное соответствие между поверхностями катализатора и сорбируемой молекулы. Металлический катализатор обладает кристаллической структурой. Если симметрия его кристаллической решетки и межатомные расстояния соответствуют геометрии молекул реагентов, то последние могут эффективно сорбироваться и приходить в необходимое для реакции состояние в результате взаимодействия с атомами металла. Так, реакция гидрирования бензола $C_6H_6 + 3H_2 \rightarrow C_6H_{12}$ катализируется платиной, никелем и некоторыми другими металлами, но не железом, серебром и т. д. Молекула бензола — правильный шестиугольник с длинами связей C—C, равными 1,4 Å. Атомы на поверхности кристаллического никеля и других эффективных катализаторов также располагаются в виде шестиугольников, примерно на тех же расстояниях, что и в бензоле [10]. Напротив, атомы некатализирующих эту реакцию металлов либо размещаются по-иному, либо обладают неподходящими размерами.

В бензоле, находящемся в состоянии структурного соответствия с металлом, химические связи испытывают превращение



изображающее разрыв π-электронной связи в бензоле и образование за счет π-электронов связей с атомами металла. В этом состоянии бензол легко реагирует с водородом



После прохождения реакции на поверхности продукты реакции десорбируются и тот же участок поверхности катализатора вновь способен к действию.

Ферменты выполняют свою каталитическую функцию либо в виде молекул в растворе, либо в надмолекулярных структурах

клеток. Сорбция реагентов (именуемых в данном случае *субстратами* фермента) и реакция происходят на некоторой поверхности белковой молекулы. В этом смысле ферментативный катализ сходен с гетерогенным, и действительно, надмолекулярные ферментные системы образуют фазу, отличную от окружающего их раствора. Однако активная поверхность белковой глобулы, молекулы фермента, интравертирована — как показывает рентгеноструктурный анализ, молекулы субстрата входят в некоторую полость в теле глобулы (см. стр. 377, 378). Имеется строгая стехиометрия взаимодействия — как правило, одна белковая глобула взаимодействует с одной молекулой субстрата или другого лиганда. При взаимодействии образуется промежуточное соединение — *фермент-субстратный комплекс* (ФСК), строение и свойства которого могут быть изучены физическими методами. Таким образом, ферментативный катализ в растворе есть гомогенный катализ, осуществляемый большими глобулярными молекулами, имеющими специфические свойства.

Фермент можно трактовать как «черный ящик», преобразующий входной сигнал — молекулу субстрата, в выходной сигнал — молекулу продукта. Имеются два пути для исследования устройства и механизма работы «черного ящика»: изучение молекулярной структуры фермента и ФСК физическими и химическими методами и изучение кинетики ферментативных реакций.

§ 6.2. КИНЕТИКА ПРОСТЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Рассмотрим простейшую ферментативную реакцию с участием одного субстрата и одного продукта реакции, т. е. превращение субстрата в продукт, причем постулируется образование одного или нескольких фермент-субстратных комплексов по схеме *)

$$F_0 + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} F_1 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} F_2 \ldots \underset{k_{-l}}{\overset{k_l}{\rightleftarrows}} F_l \underset{k_{-(l+1)}}{\overset{k_{l+1}}{\rightleftarrows}} F_{l+1} \ldots \underset{k_{-n}}{\overset{k_n}{\rightleftarrows}} F_n \underset{k_{-(n+1)}}{\overset{k_{n+1}}{\rightleftarrows}} F_0 + P,$$

где S — субстрат, P — продукт, F_0 — свободный фермент, F_i $(i = 1, 2, \ldots, n)$ — фермент-субстратный комплексы. Кинети-

*) Здесь и далее (когда это не приводит к недоразумениям) сами реагенты и их концентрации обозначаются одинаково.

ческие уравнения для такой системы имеют вид

$$\left.\begin{aligned}
\dot{S} &= k_{-1}F_1 - k_1 S F_0,\\
\dot{F}_0 &= k_{-1}F_1 - (k_1 S + k_{-(n+1)}P)\,F_0 + k_{n+1}F_n,\\
\dot{F}_1 &= k_1 S F_0 + k_{-2}F_2 - (k_{-1} + k_2)\,F_1,\\
&\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\\
\dot{F}_i &= k_i F_{i-1} + k_{-(i+1)}F_{i+1} - (k_{-i} + k_{i+1})\,F_i,\\
&\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\\
\dot{F}_n &= k_n F_{n-1} + k_{-(n+1)}\,PF_0 - (k_{-n} + k_{n+1})\,F_n,\\
\dot{P} &= k_{n+1}F_n - k_{-(n+1)}\,PF_0.
\end{aligned}\right\} \qquad (6{,}23)$$

Здесь S, P, F_i — концентрации соответствующих веществ. Для замкнутой системы

$$\dot{E} = \sum_{i=0}^{n} \dot{F}_i = 0, \qquad (6{,}24)$$

так как общее количество фермента E остается неизменным, т. е.

$$E = \sum_{i=0}^{n} F_i = \text{const}. \qquad (6{,}25)$$

В замкнутой системе сохраняется также сумма масс субстрата и продукта

$$S + \sum_{i=1}^{n} F_i + P = \text{const}. \qquad (6{,}26)$$

Из (6,26) и (6,24) следует, что

$$\dot{P} = \dot{F}_0 - \dot{S}. \qquad (6{,}27)$$

В общем случае решение (6,23), т. е. нахождение концентраций S, P, F_i как функций времени затруднительно. Однако в системе может реализоваться стационарное состояние, в котором

$$F_i = \text{const}, \quad i = 0,\ 1,\ 2,\ \ldots,\ n, \qquad (6{,}28)$$

и, следовательно,

$$\dot{F}_i = 0, \quad i = 0,\ 1,\ 2,\ \ldots,\ n. \qquad (6{,}29)$$

Вопрос о реализации такого состояния требует анализа. Уолтер трактует стационарное состояние как одновременное достижение экстремума функциями $F_i(t)$ $(i = 1, 2, \ldots, n)$ и показывает, что при $n > 1$ это никогда строго не выполняется. Условие выполнения уравнения $\dot{F}_1 = 0$ для $n = 1$ сводится к $k_1 > k_{-2}$ [11]. Однако суть дела заключается не в этом. Практически приближенная стационарность возникает при любых значениях n, если

соблюдается лишь одно условие, а именно избыток концентрации субстрата над концентрацией фермента ($S \gg E$). Покажем, что это действительно так. Рассмотрим простейший случай $n=1$ и без ограничения общности положим $k_{-2}=0$; тогда

$$F_0 + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} F_1 \xrightarrow{k_2} F_0 + P.$$

Соответствующие кинетические уравнения запишутся следующим образом:

$$\dot{S} = -k_1 F_0 S + k_{-1} F_1 \quad \dot{F}_1 = k_1 F_0 S - (k_{-1} + k_2) F_1. \tag{6,30}$$

Исключим F_0 с помощью условия (6,25), т. е. воспользуемся соотношением $F_0 = E - F_1$. Имеем

$$\dot{F}_1 = k_1 E S - (k_{-1} + k_2 + k_1 S) F_1, \quad \dot{S} = -\dot{F}_1 - k_2 F_1. \tag{6,31}$$

Проинтегрируем первое уравнение (6,31), считая S практически постоянным, т. е. рассматривая S как медленно изменяющийся параметр. В момент $t=0$ добавления фермента к субстрату $F_1(0)=0$ (весь фермент находился в состоянии F_0). Получаем

$$F_1 = \frac{k_1 E S}{k_{-1} + k_2 + k_1 S} (1 - \exp(-t/\tau)), \tag{6,32}$$

где

$$\tau^{-1} = k_{-1} + k_2 + k_1 S.$$

F_1 релаксирует к стационарному значению, отвечающему $\dot{F}_1 = 0$, с временно́й постоянной τ тем быстрее, чем больше S:

$$\dot{F}_1 = k_1 E S \exp(-t/\tau) \to 0; \tag{6,33}$$

подставляя значения F_1 из (6,32) и $\dot{F}_1$ из (6,33) во второе уравнение (6,31), находим

$$\dot{S} = -k_1 E S \exp(-t/\tau) - \frac{k_1 k_2 E S}{k_{-1} + k_2 + k_1 S} (1 - \exp(-t/\tau)), \tag{6,34}$$

т. е. при $t \to \infty$ $\dot{S}$ стремится к значению

$$\dot{S}_{\text{стац}} = -\frac{k_1 k_2 E S}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}. \tag{6,35}$$

Покажем, что при $S \gg E$ относительная скорость изменения S действительно мала. $\dot{S}$ монотонно зависит от времени, и максимальное его значение отвечает начальному моменту $t=0$, причем

$$\dot{S}(0) = -k_1 E S.$$

Максимальной мерой изменения S поэтому является

$$\Delta S = \dot{S}(0)\,\tau = -\frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}\,.$$

Легко видеть, что при $E \ll S$

$$|\Delta S| \ll S.$$

Вместе с тем

$$\Delta F_1 = \dot{F}_1(0)\,\tau = \frac{k_1 ES}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}$$

и $\Delta F_1/E \gg |\Delta S/S|$.

Условие стационарности состоит лишь в $S \gg E$ и не зависит от соотношений между константами скоростей.

Можно показать, что при $S \gg E$ и любом числе промежуточных комплексов приближенная стационарность по-прежнему сохраняется. Все значения F_i, отвечающие решениям системы неоднородных линейных дифференциальных уравнений, экспоненциально стремятся к стационарным. Приближенная стационарность реализуется вследствие наличия двух шкал времени, отвечающих быстро (F_i) и медленно (S) меняющимся переменным. Малый параметр, характеризующий отношение этих двух школ, есть ES^{-1} (ср. [12, 13]).

Согласно (6,35) стационарная скорость реакции для случая $n = 1$ равна

$$v \equiv \dot{P} = -\dot{S} = \frac{k_1 k_2 SE}{k_{-1} + k_2 + k_1 S}\,. \qquad (6{,}36)$$

Такое же выражение получается непосредственно, если написать $v = k_2 F_1$ и найти F_1 из уравнения (6,31), приравняв $\dot{F}_1$ нулю. Если нельзя пренебречь обратной реакцией, то

$$v = \frac{k_1 k_2 SE - k_{-1} k_{-2} PE}{k_{-1} + k_2 + k_1 S + k_{-2} P}\,. \qquad (6{,}37)$$

Для ряда реакций k_{-2} мало. В этом случае справедливо уравнение (6,36), которое можно переписать в виде

$$v = \frac{k_2 SE}{K_M + S}\,, \qquad (6{,}38)$$

где

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\,. \qquad (6{,}39)$$

Уравнение (6,38) называется *уравнением Михаэлиса — Ментен*, а константа K_M — *константой Михаэлиса*. Зависимость $v(S)$, описываемая (6,38), подобна изотерме Лэнгмюра (рис. 6.3).

Кривая не имеет особенностей, и скорость реакции асимптотически стремится к наибольшему значению при $S \to \infty$

$$v_m = k_2 E. \tag{6,40}$$

Следовательно,

$$v = \frac{v_m S}{K_M + S}. \tag{6,41}$$

При $v = 0{,}5\, v_m$ имеем $S = K_M$, т. е. константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой стационарная скорость реакции равна половине максимальной (дальнейшие подробности см. в [14—16]).

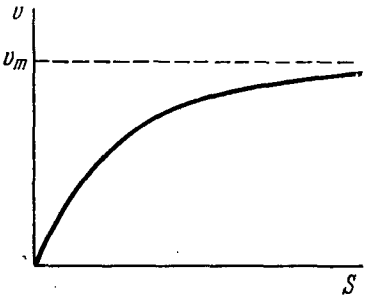


Рис. 6.3. Кривая Михаэлиса — Ментен.

Уравнение (6,41) удобно преобразовать по Лайнуиверу и Бэрку [17]

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_m}\frac{1}{S} + \frac{1}{v_m}. \tag{6,42}$$

Строя график зависимости $1/v$ от $1/S$, находим по точке пересечения получающейся прямой с осью ординат $1/v_m$ и по ее наклону K_M.

Константу Михаэлиса можно представить следующим образом:

$$K_M = k_2/k_1 + K_S,$$

где $K_S = k_{-1}/k_1$. По-видимому, в ряде случаев отличие K_S от K_M невелико, т. е. k_2/k_1 — малая величина. В табл. 6.1 приведены

Таблица 6.1

Значения K_M и K_S для реакций гидролиза

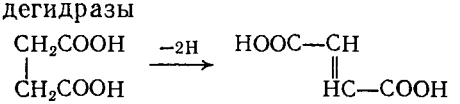
Фермент	Субстрат	K_M, *моль*	K_S, *моль*
Трипсин	Бензоил-2-аргинин	$1{,}0 \cdot 10^{-5}$	$0{,}6 \cdot 10^{-5}$
Химотрипсин	Этиловый эфир ацетил-2-фенилаланина	$1{,}0 \cdot 10^{-4}$	$0{,}9 \cdot 10^{-4}$
Фицин	Этиловый эфир бензоил-2-аргинина	$1{,}5 \cdot 10^{-2}$	$1{,}2 \cdot 10^{-2}$

значения K_M и K_S, рассчитанные Яковлевым [14] по данным Гутфрейнда.

Уравнение (6,41) можно переписать в виде

$$v_m/v - 1 = K_S/S + v_m/k_1 E S.$$

При данном значении S зависимость $v_m/v - 1$ от v_m изображается прямой линией, отсекающей на оси ординат отрезок K_S/S, а на оси абсцисс отрезок $-k_1EK_S$. Тангенс угла наклона прямой равен $1/k_1ES$. Так как $v_m = k_2E$, то из прямых, полученных при разных значениях S и E, можно найти все три константы скорости k_1, k_{-1}, k_2. Так, при дегидрировании янтарной кислоты до фумаровой с помощью дегидразы



находим $k_1E = 1{,}15 \cdot 10^{-2}$ *сек*$^{-1}$, $k_{-1}E = 3{,}6 \cdot 10^{-7}$ *моль·сек*$^{-1}$, $k_2E = 5{,}15 \cdot 10^{-6}$ *моль·сек*$^{-1}$, $K_S = 3{,}13 \times 10^{-5}$ *моль* [18].

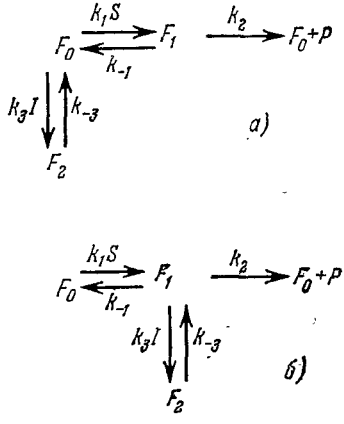


Рис. 6.4. Схемы процессов с конкурентным (*а*) и неконкурентным (*б*) ингибированием.

Рассмотрим теперь односубстратную реакцию при наличии модификатора — вещества, взаимодействующего с компонентами реакции и вызывающего заметное изменение скорости выделения продукта. Если модификатор уменьшает скорость, то он называется *ингибитором*. Обозначим его концентрацию I. Рассмотрим схемы двух простых процессов (рис. 6.4). В схеме *а*) свободный фермент наряду с реакционноспособным комплексом F_1 образует, присоединяя ингибитор, нереактивный комплекс F_2. *Ингибитор конкурирует* с субстратом за сорбирующий участок (активный центр) фермента. В схеме *б*) нереактивный комплекс F_2 получается в результате взаимодействия уже образовавшегося фермент-субстратного комплекса с ингибитором. Это — *неконкурентное ингибирование.*

Уравнения стационарной кинетики в первом случае записываются следующим образом:

$$\left.\begin{aligned} \dot{F}_0 &= -(k_1S + k_3I)F_0 + (k_{-1} + k_2)F_1 + k_{-3}F_2 = 0, \\ \dot{F}_1 &= k_1SF_0 - (k_{-1} + k_2)F_1 = 0, \\ \dot{F}_2 &= k_3IF_0 - k_{-3}F_2 = 0, \\ E &= F_0 + F_1 + F_2, \\ v &= k_2F_1. \end{aligned}\right\} \qquad (6{,}43)$$

Их решение имеет вид

$$F_1 = \frac{k_1S}{k_{-1} + k_2}F_0, \quad F_2 = \frac{k_3I}{k_{-3}}F_0, \quad E = \left(1 + \frac{k_1S}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_3I}{k_{-3}}\right)F_0$$

и, следовательно,

$$v = \frac{k_2 k_1 S}{k_{-1} + k_2} F_0 = \frac{k_2 k_1 SE}{(k_{-1} + k_2)(1 + k_1 S/(k_{-1} + k_2) + k_3 I/k_{-3})} = \\ = \frac{k_2 SE}{K_M + S + K_M K_I I} = \frac{v_m S}{K_M + S + K_M K_I I}, \quad (6,44)$$

где $K_I = k_3/k_{-3}$. Максимальная скорость при конкурентном ингибировании не меняется, но начальная скорость (при малых S) уменьшается. Во втором случае уравнения кинетики реакций имеют вид

$$\left.\begin{aligned} \dot{F}_0 &= -k_1 S F_0 + (k_{-1} + k_2) F_1 = 0, \\ \dot{F}_1 &= k_1 S F_0 - (k_1 + k_2 + k_3 I) F_1 + k_{-3} F_2 = 0, \\ \dot{F}_2 &= k_3 I F_1 - k_{-3} F_2 = 0, \\ E &= F_0 + F_1 + F_2, \\ v &= k_2 F_1, \end{aligned}\right\} \quad (6,45)$$

а их решение — вид

$$v = \frac{k_2 SE}{K_M + S + K_I SI}. \quad (6,46)$$

При неконкурентном ингибировании оказывается уменьшенной и максимальная скорость

$$v_m = \frac{k_2 E}{1 + K_I I}. \quad (6,47)$$

Мы рассмотрели лишь два крайних случая ингибирования. Зачастую приходится иметь дело с более сложными типами торможения (или, напротив, активации, когда модификатор ускоряет реакцию), например, со смешанным конкурентным и неконкурентным ингибированием и т. д. Эти процессы даже при стационарных условиях требуют решения более сложных уравнений. Математические методы стационарной кинетики сложных ферментативных реакций описаны в § 7.6.

В нестационарных условиях решение даже простых кинетических задач затруднительно. Оно осуществимо в численной, но не в аналитической форме с помощью ЭВМ. Однако расчеты, относящиеся к ранним стадиям ферментативных реакций, к предстационарному режиму, более просты [11]. В этих случаях можно считать, что практически весь субстрат и весь фермент находятся в свободном состоянии. Перепишем второе уравнение (6,30) в виде

$$F_0 = \frac{\dot{F}_1}{k_1 S} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S} F_1;$$

вместе с тем

$$F_1 = \dot{P}/k_2.$$

Продифференцировав последнее соотношение по времени, находим $\dot{F}_1 = \ddot{P}/k_2$. Исключая теперь F_0 с помощью $E = F_0 + F_1$, получаем

$$\ddot{P} + k_1 (K_M + S)\dot{P} = k_1 k_2 ES. \qquad (6,48)$$

В начальный момент $k_1 k_2 ES_0 = \ddot{P}(0)$. В самом деле, $\ddot{P}(0) = k_2 \dot{F}_1(0)$, $F_1(0) \approx 0$, $E \approx F_0(0)$. Следовательно,

$$\dot{F}_1(0) \approx k_1 S_0 F_0(0) \approx k_1 S_0 E \quad \text{и} \quad \ddot{P}(0) \approx k_1 k_2 E S_0.$$

Двойное интегрирование по времени при $S = S_0$ дает

$$P(t) = \frac{k_2 E S_0}{K_M + S_0}\left[t + \frac{\exp[-k_1 (K_M + S_0) t] - 1}{k_1 (K_M + S_0)}\right]. \qquad (6,49)$$

С ростом t функция $P(t)$ асимптотически приближается к прямой

$$P(t) = \frac{k_2 E S_0}{K_M + S_0}\left[t - \frac{1}{k_1 (K_M + S)}\right],$$

которая отсекает на оси t отрезок

$$\tau_1 = 1/k_1 (K_M + S_0)$$

и имеет тангенс угла наклона $k_2 E S_0/(K_M + S)$.

Изучая предстационарную кинетику, можно, очевидно, определить константы k_1 и k_2, если из стационарных измерений известна постоянная K_M. Тем самым, находятся все три константы скорости [11, 19].

§ 6.3. ТЕРМОДИНАМИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

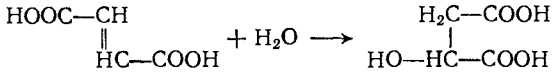
Термодинамические характеристики ферментативных реакций находят с помощью формулы (6,22). Константы скорости, определенные из кинетических экспериментов, интерпретируют, предполагая, что рассматриваемый процесс адиабатичен. Свободную энергию, энтальпию и энтропию активации находят из температурной зависимости k. Согласно (6,22)

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{H^*}{RT^2} = \frac{H^* + RT}{RT^2}, \qquad (6,50)$$

что совпадает с уравнением Аррениуса, если $E^* = H^* + RT$. Вместе с тем

$$F^* = H^* - TS^* = -RT \ln k + RT \ln (kT/h).$$

Исследование зависимости $\ln k$ от T позволяет определить F^*, S^* и H^*. На рис. 6.5 и 6.6 показаны найденные таким образом кривые свободной энергии и энтальпии для реакции превращения фумарата в малат, катализируемой фумаразой [20]



Большое различие между двумя кривыми свидетельствует о важной роли энтропийного фактора. Он настолько существен

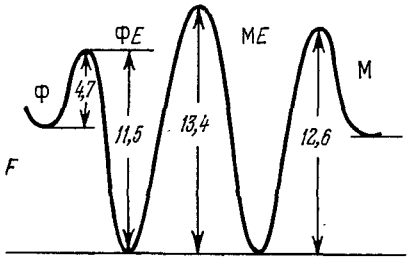


Рис. 6.5. Кривая свободной энергии для реакции фумарат ⇄ малат.
Ф — фумарат, М — малат, *ФЕ*, *МЕ* — их комплексы с ферментом. Числа у кривых указывают энергии в *ккал/моль*.

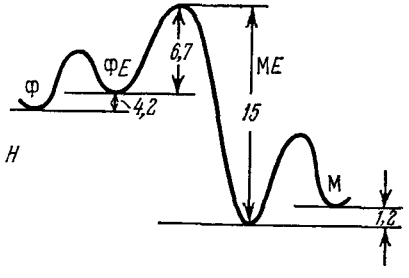


Рис. 6.6. Кривая энтальпии для реакции фумарат ⇄ малат.

в ферментативных реакциях, что путь реакции может пройти не через седловую точку с относительно наименьшей потенциальной энергией, а через точку, отвечающую большей энергии, но и большей энтропии [21].

В табл. 6.2 приведены значения активационных параметров нескольких ферментативных реакций, описываемых в стационарных условиях формулой типа (6,36), и величины разностей ΔF, ΔH, ΔS, отвечающие «константе равновесия» k_2/k_1 [21]. Свободные энергии и энтальпии даны в *ккал/моль*, энтропии — в *кал/моль·град*. Напомним, что при 300 °К 33,3 энтропийных единицы дают вклад в свободную энергию, равный 10 *ккал/моль*. Как мы видим из табл. 6.2, энтропийные факторы действительно весьма существенны (см. также [22]).

Блюменфельд проанализировал вопрос о достоверности термодинамических данных, получаемых из кинетических измерений [23, 134].

Температурная зависимость констант скоростей для ферментативных реакций характеризуется рядом особенностей. Во многих случаях наблюдаются оптимальные значения констант при некоторых температурах, значительно меньших температуры

Таблица 6.2

Термодинамические параметры простых ферментативных реакций [1])

Фермент	Субстрат	F_1^*	H_1^*	S_1^*	F_2^*	H_2^*	S_2^*	ΔF	ΔH	ΔS
Химотрипсин	Метилгидроциннамат	17,8	10,9	—23,2	19,7	16,2	—11,8	1,9	—5,3	—11,4
	Метил-D-β-фениллактат	16,6	2,5	—47,2	18,7	14,5	—14,2	—2,2	—12,0	—33,0
	Метил-L-β-фениллактат	14,7	3,2	—38,5	17,5	10,5	—23,4	—2,8	—7,3	—15,1
	Бензоил-L-тирозин этиловый эфир	10,7	0,2	—38,5	15,0	8,6	—21,4	—3,3	—8,4	—17,1
	Беизонл-L-тирозинамнд	16,9	3,1	—43,0	17,9	14,0	—13,0	9,9	—9,9	—30,0
Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин	2,5	(14—19)	(34—52)	8	(14—19)	(16—34)	—5,5	0	18,5
	Диметиламиноэтилацетат	5,5	(6,7—8)	(4—8)	9,9	(6,7—8)	—(16,5—10,5)	—4,4	0	14,6
	Аминоэтилацетат	9,7	9,5	—0,6	12,2	9,5	—9	—2,5	0	8,4
Карбоксипептидаза	Карбобензокси-L-триптофан	16	21	17	19,3	16	—11	—3,4	5	—28
	Карбобензоксиглицил-L-фенилаланин	11,8	8,5	—11	14,4	8,8	—18	—2,5	—0,4	—7
	Карбобензоксиглицил-L-триптофан	11,9	9,9	—8,5	15,3	9,3	—20	—3,4	0	—11,5
Пепсин	Карбобензокси-L-глутамил-L-тирозин этиловый эфир	18,3	22,5	14,1	22,1	20,1	—6,5	—4,7	1,4	20,6
	Карбобензоксн-L-глутамил-L-тирозин	18,8	19,6	2,6	23,1	16,6	—21,8	—4,3	3,0	24,4
Уреаза	Мочевина	8,2	6,2	—6,8	11,3	9,1	—7,2	—3,2	—2,9	0,9
АТФаза	АТФ	7,3	20,4	44,0	14,4	12,4	—8,0	—7,5	8	52

[1]) Нижние индексы 1 и 2 указывают первый и второй барьеры процесса.

денатурации. Природа этого максимума не ясна. Кинетические измерения можно вести лишь в узком температурном интервале. Активационные параметры сильно зависят от ионного состава раствора, они резко меняются при замене субстрата другим сходным с ним соединением и даже при замене фермента тем же ферментом, но полученным из другого источника. При этом сами константы k могут меняться мало, но меняются и энергия активации, и предэкспоненциальный множитель. Наконец, наблюдается линейная зависимость между значениями H^* и S^*:

$$H^* = \alpha' + T_к S^*. \qquad (6,51)$$

Этот эффект обсуждается далее.

Допустим, что истинный активационный барьер для данной стадии ферментативного процесса слабо зависит от температуры, поскольку организованная глобула фермента ведет себя как кооперативная система. Иными словами, сама структура глобулы зависит от температуры. Допустим также, что при этом истинное значение S^* не зависит от температуры. В узком интервале температур зависимость $H^*(T)$ можно считать линейной, т. е.

$$H^* = H_0^* - bT, \quad b > 0.$$

Тогда уравнение Аррениуса (см. (6,1)) принимает вид

$$k = A \exp(b/R) \exp(-H_0^*/RT),$$

и опыт дает не истинное значение H^*, но H_0^*, и не истинное значение S^*, но $S_0^* = S^* + b$. Можно записать

$$H_0^* = H^* + T(S_0^* - S^*) = F^* + TS_0^*.$$

Величина H_0^* получается путем экстраполяции слабой температурной зависимости H^* к $T \to 0$ °K. Если, например, между 20 и 30 °C истинное значение H^* возрастает мало, то измеряемая величина H_0^* может возрастать очень сильно. Мы видим, что если истинные активационные параметры испытывают малые изменения и измерения проводятся в узком температурном интервале, то кажущиеся значения H_0^* и S_0^* связаны друг с другом линейно, причем α' в уравнении (6,51) есть свободная энергия активации, а $T_к$ — температура опыта.

Эти особенности в температурных зависимостях k свидетельствуют о структурных перестройках глобулы. Мы видим, что измеряемые активационные параметры имеют смысл лишь некоторых эффективных величин. Для установления истинных значений этих параметров необходимы детальные исследования конструкции фермента и механизма его действия. Кинетические измерения здесь недостаточны.

Рядом авторов был обнаружен и изучен так называемый *компенсационный эффект* [24—26]. Изменения энтальпии в процес-

сах, протекающих в водных растворах, зачастую пропорциональны изменениям энтропии. То же относится к энтальпии и энтропии активации. Соблюдается условие, подобное (6,51):

$$\Delta H = \alpha + T_к \Delta S. \tag{6,52}$$

Речь идет о процессах с участием малых молекул. К ним относятся ионизация слабых электролитов, сольватация ионов и неэлектролитов, реакции гидролиза и окислительно-восстановительные реакции, тушение флуоресценции индола и т. д. Во всех случаях $T_к$, называемая температурой компенсации, варьирует от 250 до 315 °К. Изменение свободной энергии равно

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S = \alpha + (T_к - T)\Delta S, \tag{6,53}$$

и свободная энергия активации

$$F^* = H^* - TS^* = \alpha' + (T'_к - T)S^*. \tag{6,54}$$

Величины α, α', а также $T_к - T$ и $T'_к - T$ сравнительно малы. Эффект компенсации заключается в том, что существенные изменения энтальпии и энтропии компенсируют друг друга и изменение свободной энергии относительно мало.

Изменения H и S при растворении неполярных веществ в воде можно представить соотношениями

$$\left.\begin{aligned} \Delta H(T, x_2) &\approx \Delta H(T_0, 0) + \int_0^{x_2} \frac{\partial \Delta H(T_0, x_2)}{(\partial x_2)_{T_0}} dx_2 + \int_{T_0}^{T} \Delta c_p(T, x_2)\, dT, \\ \Delta S(T, x_2) &= \Delta S(T_0, 0) + \int_0^{x_2} \frac{\partial \Delta S(T_0, x_2)}{(\partial x_2)_T} dx_2 + \int_{T_0}^{T} \frac{\Delta c_p(T, x_2)}{T} dT, \end{aligned}\right\} \tag{6,55}$$

где T_0 — температура сравнения, x_2 — концентрация растворенного вещества. Если справедливо (6,52), то

$$\alpha = \Delta H(T_0, 0) - T_к \Delta S(T_0, 0) + \int_0^{x_2} \frac{\partial \Delta H}{(\partial x_2)_{T_0}} dx_2 - T_к \int_0^{x_2} \frac{\partial \Delta S}{(\partial x_2)_{T_2}} dx_2 + \\ + \int_{T_0}^{T} \Delta c_p(T, x_2)\, dT - T_к \int_{T_0}^{T} \frac{\Delta c_p(T, x_2)}{T} dT. \tag{6,56}$$

Величина α мала и приближенно постоянна, если Δc_p слабо зависит от температуры.

Ламри и Ражендер [26] предположили, что эффект компенсации определяется свойствами воды. Допустим, что реакция $A \rightarrow B$ сопровождается изменением состояния n молекул воды

$$A + nw_1 \rightarrow B + nw_2.$$

Тогда

$$\Delta H = \Delta H_{A\to B} + n\,\Delta H_{w_1\to w_2},$$
$$\Delta S = \Delta S_{A\to B} + n\,\Delta S_{w_1\to w_2}.$$

Если величины $\Delta H_{A\to B}$ и $\Delta S_{A\to B}$ малы, а переход $w_1 \to w_2$ подобен фазовому, то

$$T_к = \frac{\Delta H_{w_1\to w_2}}{\Delta S_{w_1\to w_2}} \quad \text{и} \quad \Delta F_{w_1\to w_2}(T = T_к) = 0.$$

Компенсационный эффект свойствен ферментативным процессам. Так, при гидролитическом расщеплении этилового эфира N-ацетил-L-триптофана химотрипсином ΔF очень мало, а ΔH и ΔS велики. В сущности, почти все данные, приведенные в последних трех столбцах табл. 6.2, свидетельствуют о компенсации. Связывание ряда ингибиторов ацетилхолинэстеразой также сопровождается компенсацией — ΔH варьирует в этих процессах от -7 до $+2$ *ккал/моль*, а ΔS от -10 до $+20$ *кал/моль·град* [26]. Если здесь справедливо предположение об определяющей роли воды, то нужно установить, как влияет на поведение белковых молекул окружающая водная структура. Ламри и Ражендер считают, что связь белка с водой проявляется в изменении объема белковой молекулы в ходе реакции. Как будет показано в §§ 6.5 и 6.7, ферментативная активность зависит от конформационных превращений белка и, тем самым, глобулы могут изменять свой объем. Изменение энергии водно-белковой системы можно представить в виде

$$dE = T\,dS - p\,dV + W_w\,dV_w + W_p\,dV_p + \sigma\,dA, \qquad (6{,}57)$$

где W_w — удельная работа изменения свободного объема воды на dV_w, W_p — аналогичная величина для белка, σ — удельная работа изменения поверхности, разделяющей белковые молекулы и воду, на dA. Изменение свободной энергии равно

$$dF = dH - T\,dS - S\,dT = dE + p\,dV + V\,dp - T\,dS - S\,dT$$

и, согласно (6,57),

$$dF = -S\,dT + V\,dp + W_w\,dV_w + W_p\,dV_p + \sigma\,dA,$$

а при постоянных T и p

$$dF = W_w\,dV_w + W_w\,dV_p + \sigma\,dA. \qquad (6{,}58)$$

В ферментативных реакциях, изученных Васловым и Доэрти [27], максимальное измеренное изменение H, компенсируемое ΔS, приблизительно равно -27 *ккал/моль* и соответственно $\Delta S \approx$ ≈ -100 *кал/моль·град*. Полное максимальное изменение объема воды, оцененное по структурной релаксации, составляет

—83 *мл/моль*, что менее 0,5% от объема белка. Непосредственное наблюдение этого эффекта затруднительно. Тем не менее высказанные предположения физически осмысленны. Изменение конформации белка, вытеснение воды из внутренней полости глобулы молекулой субстрата могут вызвать перестройку окружающей водной структуры.

«Водный» компенсационный эффект может иметь важное физиологическое значение для теплокровных организмов и, тем самым, для эволюции в целом. Малость изменений свободной энергии вследствие компенсации означает малую чувствительность соответствующих ферментативных процессов к температурным изменениям в окружающей среде.

Существование компенсационного эффекта и его объяснение нельзя, однако, считать строго доказанным. Эффект может объясняться просто неправильным применением уравнения Аррениуса, как это показал Блюменфельд (см. стр. 370). Вопрос остается открытым, пока нет достоверных определений истинных термодинамических параметров. Тем не менее результаты рассмотрения компенсационного эффекта указывают на важные особенности ферментативных процессов.

Как уже отмечалось, понимание структуры и свойств белковых молекул невозможно без учета их водного окружения (см. гл. 4). Рассмотрение ферментов в водном растворе как целостной системы необходимо и для изучения термодинамики ферментативных процессов. Такой системный подход характерен для методологии современной физики. Вычленение белковых молекул из окружающей их водной среды незакономерно в строгой теории. Это относится и к кинетике. Теория абсолютных скоростей реакций, переносящая на ферменты положения, справедливые для газовых реакций, пригодна лишь для грубых оценок. Теория ферментативных реакций требует учета физических свойств среды.

6.4. ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Характерные особенности ферментативного катализа — большая активность и строгая специфичность по отношению к субстрату или группе субстратов.

Молекулярной активностью фермента называется число молекул субстрата, превращаемых в 1 *мин* одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата. Молекулярная активность может быть выражена и как *число оборотов* (Варбург) — число молей превращенного субстрата, приходящееся на моль фермента за 1 *мин*.

Хорошо разработаны методы выделения и очистки ферментов и множество ферментов получено в чистой кристаллической форме [15, 29, 30]. Это дает возможность изучать реакции и структуру ферментов и фермент-субстратных комплексов (ФСК) *in vitro*. Различие ситуаций *in vitro* и в клетке, *in vivo*, состоит в том, что клетка представляет собой открытую, а не замкнутую систему и в ней протекает одновременно множество ферментативных реакций, в том числе и сопряженных друг с другом. Тем не менее изучение ферментов *in vitro* дает реальную основу для понимания соответствующих биологических процессов.

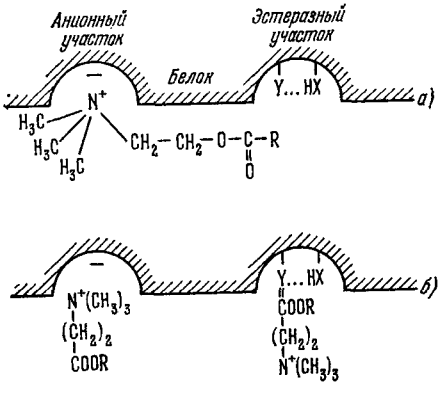


Рис. 6.7. Схема взаимодействия ацетилхолинэстеразы с ацетилхолином (*а*) и его каталитического расщепления (*б*).

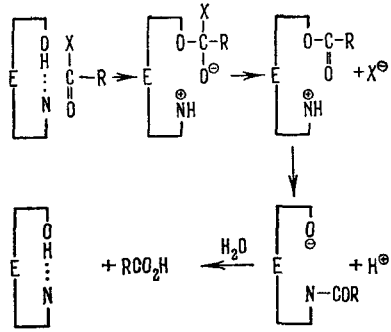


Рис. 6.8. Схема действия эстеразы.

При образовании ФСК малая молекула субстрата стехиометрически связывается с большой молекулой фермента. Очевидно, субстрат непосредственно взаимодействует с определенным малым участком молекулы фермента — с ее активным центром. Природа активного центра, т. е. совокупность и расположение аминокислотных остатков, а также кофакторов (см. стр. 94), входящих в его состав, устанавливается посредством химических и физических исследований. Изменения активности, возникающие в результате химической модификации белка, позволяют выявить функциональные группы активного центра. Сведения о его структуре дает спектроскопия, спектрополяриметрия, спектроскопия ЯМР и ЭПР (в последнем случае в белок вводится парамагнитная метка, см. стр. 344) и т. д. Рентгеноструктурный анализ непосредственно раскрывает картину взаимодействия фермента с субстратом (например, в случаях лизоцима, карбоксипептидазы и др.).

Разнообразие аминокислотных остатков фермента и атомных групп кофактора определяет полифункциональность активного центра — его способность связывать молекулы субстрата или модификатора в нескольких «узлах» и каталитическую активность [31].

Так, у эстераз и эстеролитически активных протеиназ определено наличие в активном центре функционального остатка Сер, который подвергается ацилированию на промежуточной стадии процесса. Активный серил фигурирует в псевдохолинэстеразе, фосфоглюкомутазе, в химотрипсине и трипсине и в ряде других ферментов. На рис. 6.7 изображена схема связывания субстрата ацетилхолина ацетилхолинэстеразой (АХЭ) и схема ингибирования ее активности при высокой концентрации субстрата [32]. В эстеразный участок АХЭ входят нуклеофильная группа Y и смежная с ней диссоциирующая кислотная группа HX. Ацильный остаток в промежуточной реакции присоединяется к группе Y и далее отщепляется от нее под действием воды.

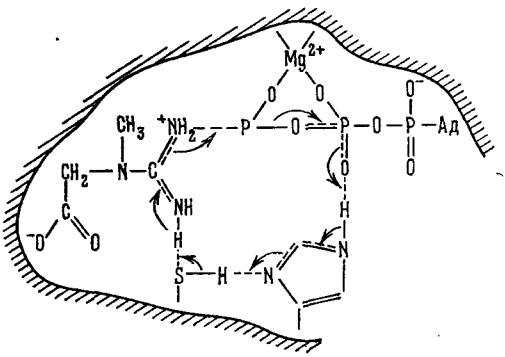


Рис. 6.9. Схема действия креатинкиназы. Переходное состояние.

Упрощенная схема действия эстераз показана на рис. 6.8 [33]. Согласно этой схеме эстеразы реализуют бифункциональный кислотно-основный катализ. Происходит ориентированная сопряженная атака нуклеофильных и электрофильных функциональных групп на молекулу субстрата [34].

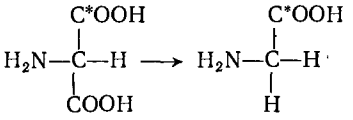
Согласованное воздействие на субстрат различных групп фермента можно иллюстрировать также примером креатинкиназы [33, 34], катализирующей реакцию

$$АТФ^{4-} + \text{креатин} \rightleftarrows АДФ^{3-} + \text{фосфокреатин}^{2-} + H^+.$$

На рис. 6.9 изображена схема переходного состояния для этой реакции. Кофактором служит ион Mg^{++}. Особо важную роль в активном центре играет SH-группа. Фермент инактивируется иодацетамидом и иодацетатом, причем скорость алкилирования SH-группы не зависит от pH в интервале 6,0—10,0. Начальная скорость реакции с иодацетатом сильно зависит от ионной силы среды. В присутствии Mg^{++} и обоих субстратов SH-группы оказываются защищенными от действия блокирующих

реагентов. Из приведенных фактов следует, что SH-группа, вероятно, соединена водородной связью с одной из основных групп фермента. Благодаря легкому переходу протона в системе кислота — основание, соединенных водородной связью, такая система обладает высокой каталитической активностью.

Эти немногие примеры показывают, что при образовании ФСК существенна точная взаимная ориентация функциональных групп фермента и субстрата или модификатора. Будучи построен из L-аминокислотных остатков, активный центр стереоспецифичен. С помощью меченых атомов установлено, что реакции молекул типа CAABB происходят на поверхности фермента асимметрично. Это относится, в частности, к ферментативному превращению аминомалоновой кислоты (содержащей меченый углерод в одном из двух карбоксилов) в глицин:



В реакцию вступает только одна группа, химически и геометрически неотличимая от другой. Это объясняется асимметрией активного центра. Так как группы Y и Z фермента, связывающиеся с карбоксилом, различны, неодинаковы и реакционные способности двух карбоксилов [34, 35]. Ферменты хорошо различают стереоизомеры, и оптический антипод данного субстрата субстратом уже не является.

Прямые рентгеноструктурные исследования комплексов ферментов с аналогами субстратов — конкурентными ингибиторами дают результаты, хорошо согласующиеся с химическими представлениями. Таких исследований пока немного, но они уже служат источником особенно ценной информации.

Филлипс и сотрудники, установившие структуру лизоцима, исследовали также строение комплексов лизоцима с ингибирующими аналогами субстратов-полисахаридов [36]. Установлено внедрение лиганда в полость, существующую в глобуле лизоцима, и выявлены контакты между функциональными группами фермента и лиганда. На рис. 6.10 показана структура комплекса лизоцима с β-N-ацетальглюкозамином. Эти работы позволили дать детальную расшифровку взаимодействий фермента с субстратом [37, 38].

Рентгенографически исследованы структуры комплексов карбоксипептидазы с субстратом глицил-L-тирозином (рис. 6.11) и с ингибиторами, например с β-(*n*-иодофенол)-пропионатом [39]. У этого фермента кофактором служит атом Zn. Лиганды входят в полость молекулы белка и присоединяются в области, в которой

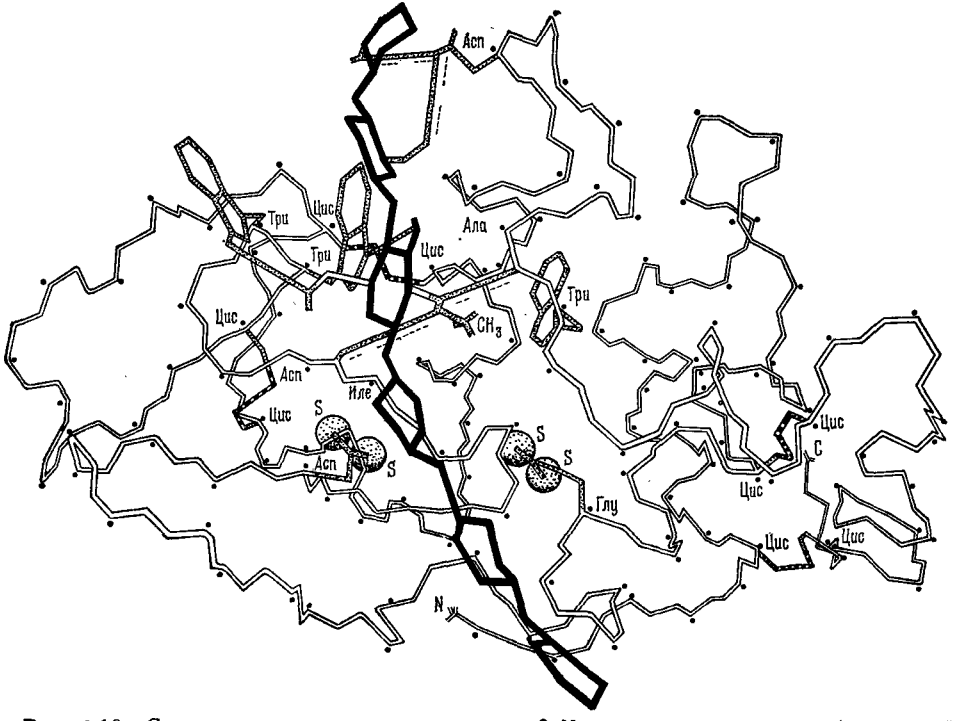


Рис. 6.10. Структура комплекса лизоцима с β-*N*-ацетальглюкозамином (последний зачернен).

находится Zn — этот атом принимает непосредственное участие в работе активного центра (см. стр. 393).

Остановимся еще на одном примере — на структуре и функции аспартатаминотрансферазы (ААТ), детально изученной Браунштейном и его сотрудниками. Аминотрансферазы содержат кофермент — пиридоксальфосфат (ПАЛФ). Общая теория действия таких ферментов была построена Браунштейном и

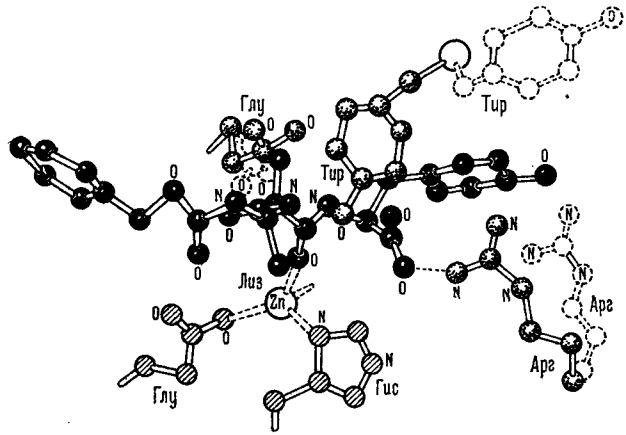
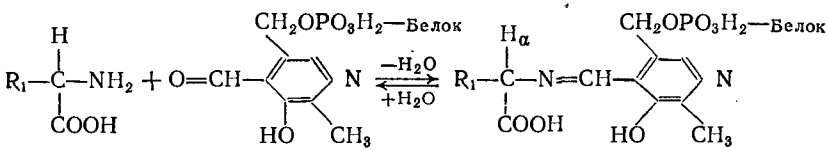
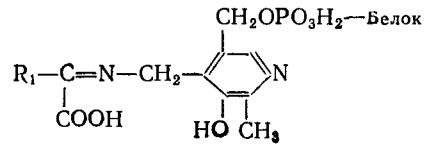


Рис. 6.11. Структура комплекса карбоксипептидазы с глицил-L-тирозином. Арг 145, Тир 248 и Глу 270 показаны до связывания субстрата (пунктир) и после него (сплошные линии).

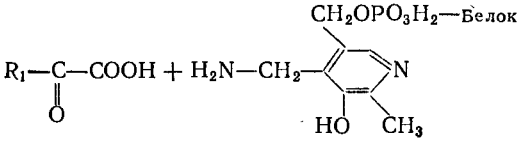
его школой (см. [40, 41]). Согласно этой теории ПАЛФ, присоединенный к белку, реагирует с аминокислотой, образуя так называемое шиффово основание или альдимин



В шиффовом основании существенно изменено распределение электронов в аминокислотном остатке по сравнению с аминокислотой и атом H_α легко диссоциирует. При реакциях переаминирования альдимин испытывает таутомерное превращение в кетимин



который гидролизуется водой с образованием кетокислоты



В результате возникает фосфопиридоксаминная форма фермента. Она реагирует с другой кетокислотой, содержащей R_2, причем регенерируется исходный фермент и получается новая аминокислота. Сходная схема была независимо предложена Снеллом [42, 43].

Практически все реакции, катализируемые ферментами, могут протекать и в отсутствие ферментов, но, конечно, с гораздо меньшей скоростью. В ряде случаев стадии ферментативного процесса можно моделировать в низкомолекулярных системах — в «конгруэнтных модельных системах» [44].

Реакции трансаминирования были изучены в системе, содержащей ПАЛФ, ионы тяжелых металлов и субстраты. Добавление слабого основания к системе, содержащей пиридоксаль и аминокислоту, полностью подавляет все реакции, кроме расщепления C_α — H-связи; в такой модели происходит только трансаминирование [45, 46]. В работе [47] были определены индивидуальные константы скорости для стадии образования альдимина. Их значения для реакции аминокислоты (глутамата) с анионной, биполярной и катионной формами модельного соединения 3-оксипиридин-4-альдегида равны соответственно $k_{ан} = 80{,}2$ *моль*$^{-1}$·*мин*$^{-1}$, $k_{бип} = 1{,}12 \cdot 10^4$ *моль*$^{-1}$·*мин*$^{-1}$, $k_{кат} = 2{,}3 \cdot 10^6$ *моль*$^{-1}$·*мин*$^{-1}$. Константа скорости ферментативной реакции много больше, а именно $k = 10^8$ *моль*$^{-1}$·*мин*$^{-1}$. Теоретический расчет показывает, что скорость нуклеофильного присоединения к карбонильной группе возрастает в 10^3—10^4 раз, если бимолекулярная реакция трансформируется в мономолекулярную с надлежащим пространственным расположением взаимодействующих групп [48]. Можно предположить, что фермент обеспечивает такую ориентацию этих групп на всех последовательных стадиях процесса и стабилизует наиболее активные в соответствующих стадиях ионные формы субстратов, коферментов и функциональных групп активного центра [49].

Основываясь на изложенной выше гипотезе, Иванов и Карпейский предложили трехмерную динамическую модель для реакции, катализируемой ААТ [49]. В спектре этого фермента имеется полоса поглощения при 3620 Å, а при понижении pH появляется полоса при 4260 Å, что определяется ионизацией фенольной группы кофермента (pK перехода равно 6,2). Оптическая

активность ПАЛФ индуцирована апоферментом [50] (см. стр. 312). Фермент с пиридоксаминфосфатом, в отличие от фермента с ПАЛФ, имеет полосу при 3300 Å. Таким образом, кофермент служит выразительной спектральной меткой. Так как субстраты ААТ содержат две карбоксильные группы, можно считать, что специфичность фермента определяется взаимодействием COO^- субстратов с комплементарными катионными группами фермента. Это доказывается тем, что дикарбоновые кислоты служат конкурентными ингибиторами ААТ. При обработке фермента борогидридом Na и при кислотном гидролизе был изолирован ε-N-пиридоксиллизил. Фосфатная группа ПАЛФ также связана с апоферментом (рис. 6.12). Изучение спектров поглощения и кругового дихроизма ААТ в различных формах (рис. 6.13) дало метод идентификации протонодонорной группы Апо — ААТ, связывающей атом N пиридина [49, 51, 52]. Этой группой оказался Тир. Изучение кинетики ассоциации Апо — ААТ с рядом алкильных аналогов ПАЛФ показало, что метильная группа ПАЛФ находится в тесном контакте с апоферментом [52]. Наконец, установлены электростатические взаимодействия фенольной группы ПАЛФ с апоферментом. Иванов и Карпейский приходят к выводу о связи всех функциональных групп кофермента с белком. Вследствие такой многоточечной связи сопряженная система кофермента находится в активном центре в состоянии с высокой энергией и с высокой реакционной способностью.

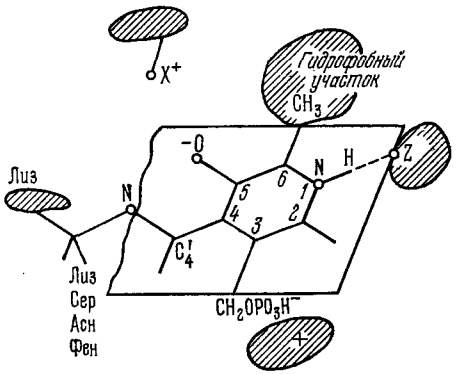


Рис. 6.12. Связывание кофермента активным центром ААТ.

Модель связывания ПАЛФ апоферментом дает возможность детально рассмотреть механизм ферментативного трансаминирования [49]. Первая стадия процесса состоит в нековалентном связывании аминокислоты активным центром. Вторая стадия — нуклеофильное присоединение аминогруппы субстрата к связи $\rangle C{=}N-$ альдимина. Акцептором протона $-NH_2$-группы здесь, видимо, является отрицательно заряженная фенольная группа кофермента. Таким образом, неионизованная нуклеофильная аминогруппа оказывается по соседству с высокореактивной катионной формой кофермента. Фиксированное активным центром

пространственное расположение аспарагиновой кислоты должно отвечать *цис*-конформации карбоксилов, так как малеиновая кислота (*цис*-соединение), в отличие от фумаровой (*транс*-соединение), является конкурентным ингибитором ААТ. Это расположение показано на рис. 6.14. Из такой модели следует, что реакционная координата для нуклеофильного присоединения к карбоксилу направлена вдоль орбитали p_z карбонильного углерода. С помощью пространственных молекулярных моделей построена структура альдиминной формы комплекса фермент — субстрат (рис. 6.15). Образование альдиминной формы субстрата происходит в результате поворота коферментного цикла приблизительно на 40° вокруг оси, соединяющей группы CH_3 в положении *2* и CH_2 в положении *5* (см. рис. 6.15).

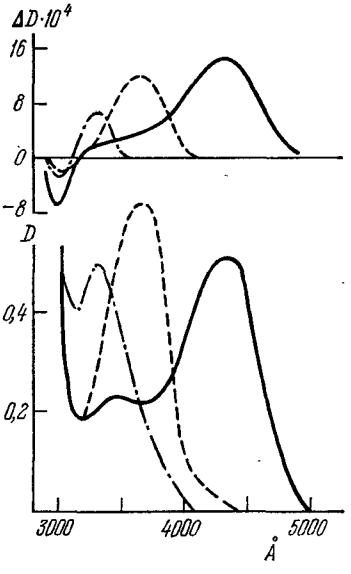


Рис. 6.13. Спектры кругового дихроизма (вверху) и спектры поглощения (внизу) различных форм свободного фермента.

Сплошная кривая — альдиминная форма, pH 5,2; пунктирная — то же, pH 8,3; штрихпунктирная — амнноформа. *D* — оптическая плотность, ΔD — разность величин *D* для левого и правого циркулярно-поляризованного света.

Общая схема процесса показана на рис. 6.16. Правильность описанных и последующих стадий подтверждается рядом экспериментальных фактов [49]. Предложенная теория объясняет важнейшие свойства ААТ.

Иванов и Карпейский считают многоточечное связывание причиной стабилизации активной электронной конфигурации, термодинамически невыгодной в гомогенном растворе, и причиной надлежащей ориентации реагирующих групп. Существование в активном центре по крайней мере двух пространственно различных структур (в случае ААТ двух различных ориентаций коферментного цикла) обеспечивает выполнение указанных условий в многостадийной ферментативной реакции. Условия оптимальности каждой последовательной стадии обеспечиваются структурной перестройкой, происходящей в предыдущей стадии. На языке термодинамики изложенное означает, что в активном центре происходит выравнивание уровней свободной энергии промежуточных соединений. В случае ААТ этот эффект проявляется в спектре поглощения ФСК (рис. 6.17), содержащем полосы поглощения практически всех

важнейших промежуточных соединений реакции. В соответствующей конгруэнтной системе наблюдается лишь одна полоса 3300 Å.

Рассмотренный пример показывает, какую информацию о ФСК, о механизме действия фермента дает спектроскопия и

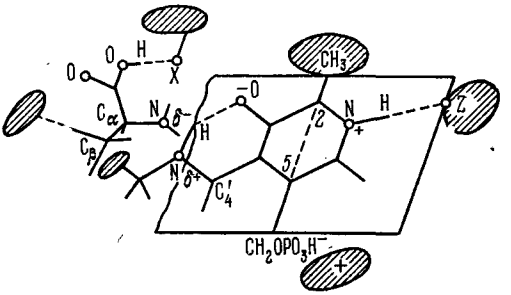


Рис. 6.14. Предполагаемая структура комплекса ААТ — субстрат.

спектрополяриметрия. Здесь особенно ценны также методы ЯМР, ЭПР, люминесценции и методы релаксационной кинетики реакций (см. § 7.7).

Стереохимическая картина, изображающая ситуацию в активном центре, получается на основе большой совокупности

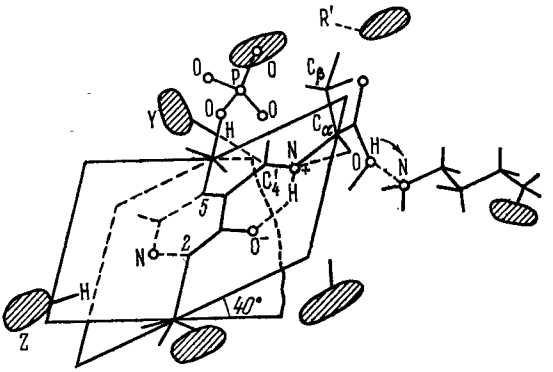


Рис. 6.15. Предполагаемая структура альдиминиой формы комплекса фермент — субстрат.

разнообразных экспериментальных данных с помощью атомных моделей. В последнее время были развиты математические методы расчета этой картины, эффективно применяющие ЭВМ [53].

Итак, существуют реальные возможности для расшифровки взаимодействий между активным центром фермента и

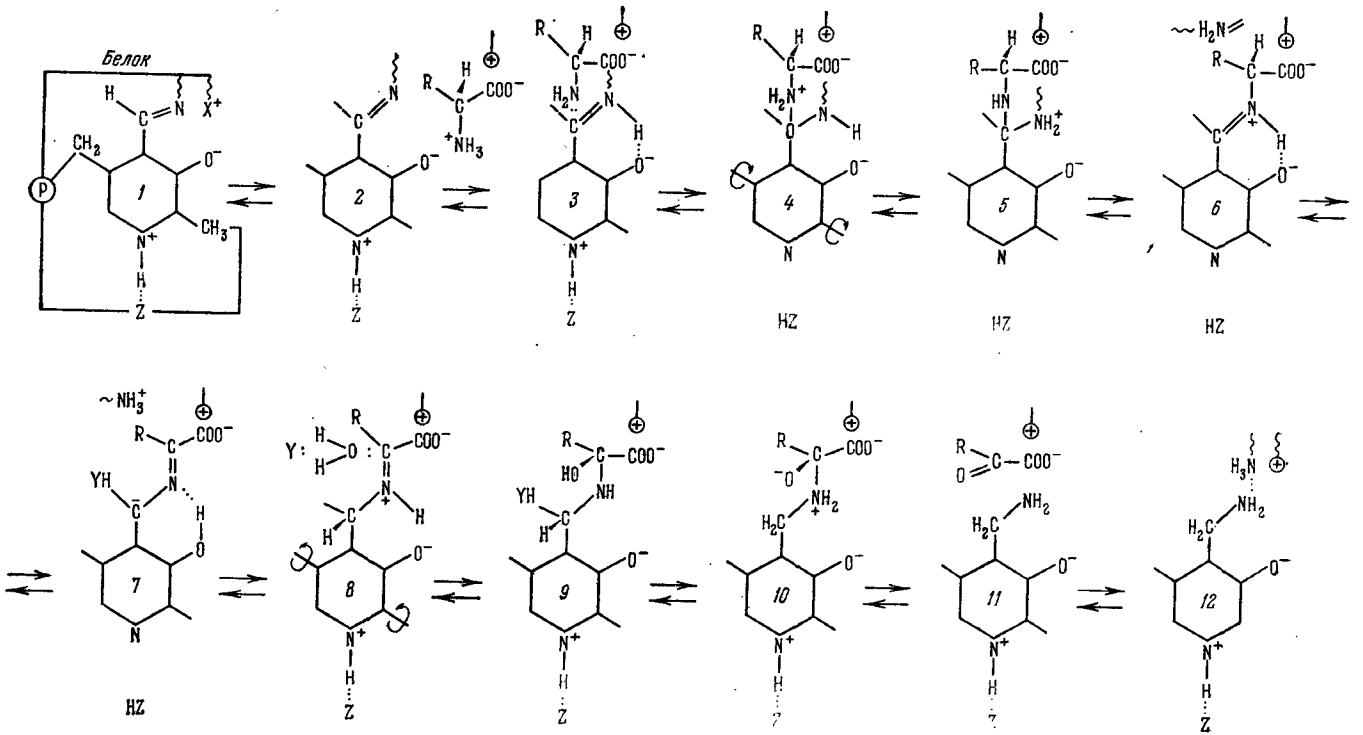


Рис. 6.16. Схема последовательных событий в активном центре ААТ.

лигандами. В химическом аспекте проблемы получается качественная картина взаимодействий, выявляется поведение функциональных групп фермента и кофакторов. Однако химический аспект недостаточен для построения количественной теории. Рассмотрение взаимодействий в активном центре показывает, что энергия активации должна быть понижена по сравнению с конгруэнтной реакцией, но неизвестно, на какую величину. Достаточно ли этих взаимодействий для количественного объяснения активности ферментов?

Химический аспект исходит из существования активного центра определенной структуры. Ясно, что эта структура возникает в организованной белковой глобуле таким образом, что в состав активного центра входят аминокислотные остатки, сильно удаленные друг от друга вдоль полипептидной цепи. Анализ взаимодействий в активном центре не дает ответа ни на вопрос о роли глобулы как целостной системы, ни на вопрос о влиянии окружающей среды.

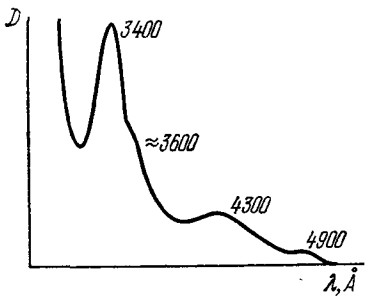


Рис. 6.17. Спектр поглощения ААТ в присутствии L-аспартата.

Несомненно, что в катализе участвует вся белковая глобула. В некоторых работах утверждалось, что можно отрезать значительную часть белковой цепи без изменения активности фермента (см., например, [54]). В дальнейшем эти данные были опровергнуты [55, 56].

Брауншгейн суммировал качественные причины, ответственные за каталитическое действие фермента [57].

1. Большое сродство фермента и субстрата, т. е. большая вероятность образования ФСК, эквивалентная резкому увеличению концентрации реагентов в обычных условиях (*эффект сближения*).

2. Строгая взаимная ориентация реагентов, кофакторов и активного центра (*эффект ориентации*). В обычных гомогенных реакциях вероятность строгой взаимной ориентации трех или большего числа взаимодействующих молекул очень мала.

3. Воздействие на субстрат в контактном участке ФСК нуклеофильных и электрофильных групп активного центра (*эффект синхронного внутримолекулярного кислотно-основного катализа*).

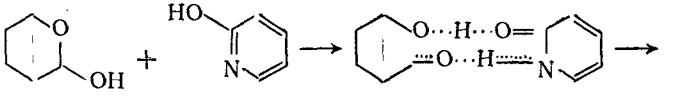
Кооперация нескольких групп катализатора моделируется некоторыми явлениями гомогенного кислотно-основного катализа. Так, 2-оксипиридин катализирует мутаротацию глюкозы,

Таблица 6.3

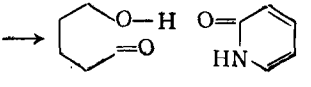
Оценка каталитических факторов для двух гипотетических реакций с двумя субстратами

		Реакция 1	Реакция 2
Характеристика реакции	Концентрация субстрата	$S_1 = 10^{-3}$ $S_2 = 10^{-4}$	$S_1 = 10^{-3}$ $S_2 = 55$ (вода)
	Заряд на субстрате	Нет	Нет
	Заряд в переходном состоянии	Малый	Полный положительный
	Каталитические остатки	Один кислотный, один основный	Один кислотный, одна отрицательно заряженная группа
Факторы, разумно оцененные на основании известных химических данных	Ковалентное промежуточное соединение	Есть	Нет
	Эффект сближения субстратов	$5{,}5 \cdot 10^3$	10^{-2}
	Общий эффект основного катализа	4	—
	Общий эффект кислотного катализа	10	20
	Эффект сближения каталитических групп	$3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$
	Эффект промежуточного ковалентного соединения	10	—
	Эффект растворителя	10^{-2}	10^{-5}
	Эффект образования ионных пар	10^2	10^5
Произведение этих факторов		$7 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^2$
Число оборотов фермента, деленное на скорость реакции субстратов в отсутствие катализатора		$7 \cdot 10^{18}$	$6 \cdot 10^{14}$
Множитель, требующий объяснения		10^9	10^{12}

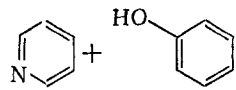
разрывая ее шестичленное кольцо и испытывая таутомерное превращение



Глюкоза 2-оксипиридин



Такая же реакция с участием смеси пиридина и фенола



протекает в 7000 раз медленнее [58].

В результате трех перечисленных эффектов происходит резкое увеличение абсолютной скорости реакции, так как маловероятные реакции высших порядков, требующие соударений трех и большего числа молекул, заменяются высокоэффективными реакциями первого порядка — реакциями внутримолекулярного полифункционального катализа.

4. Активация субстрата путем перераспределения электронной плотности под действием электроактивных групп фермента (*эффект поляризации*).

5. Изменение конформации белка при взаимодействии с субстратом (*эффект индуцированного контакта*).

Влияние первых четырех причин иллюстрируется рассмотренными примерами. О пятой рассказано в следующем параграфе.

Данные современной физической органической химии позволяют грубо оценить порядки величин этих и других каталитических факторов, т. е. ускорение реакции, ими вызванное. Эти оценки приведены в табл. 6.3 [59].

Таблица 6.4

Сравнение скоростей ферментативных реакций со скоростями неферментативных аналогов

Фермент	Неферментативный аналог	Скорость ферментативного процесса v, $сек^{-1}$	Скорость неферментативного процесса v_0, $сек^{-1}$	v/v_0
Лизоцим	Гидролиз ацеталя, основный катализ	$5 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{8}$
Химотрипсин	Гидролиз амида, основный катализ	$4 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{3}$
β-амилаза	Гидролиз ацеталя, основный катализ	$1 \cdot 10^{3}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{11}$
Фумараза	Гидрирование алкена, кислотный и основный катализ	$5 \cdot 10^{2}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{11}$

В табл. 6.4 сопоставлены скорости конкретных ферментативных и неферментативных процессов. Скорости последних умножены на коэффициент, отвечающий эффекту сближения. Для двух молекул, имеющих размеры молекулы H_2O, этот множи-

тель равен 55, т. е. молярной концентрации воды; иными словами, молярная концентрация пар взаимодействующих молекул равна произведению молярных концентраций реагентов, деленному на 55 и умноженному на координационное число в водном растворе [60, 61] (см. также [62]).

Задача состоит в заполнении «разрыва», в количественном объяснении ферментативного катализа. Существует ли какой-либо основной фактор, ответственный за большую скорость ферментативных реакций, или необходимо «концертное» действие всех факторов? Пока нет ответа на эти вопросы, но можно наметить некоторые пути их исследования.

§ 6.5. КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Из конформационной лабильности макромолекулы белка следует специфическое взаимодействие фермента с субстратом и другими лигандами. Возможно, что в некоторых конформациях белок более эффективно связывает субстрат, чем в других. При связывании может происходить отбор конформаций субстрата. Каруш объяснил способность альбумина плазмы связывать различные вещества «конфигурационной адаптабильностью» этого белка [63].

Можно думать, что в ФСК отбираются те конформации белка и субстрата, которые находятся в структурном соответствии друг с другом, обеспечивающем оптимальное значение свободной энергии взаимодействия [64, 65]. Структурное соответствие при образовании ФСК можно считать динамическим, индуцируемым. Таким образом, при образовании ФСК могут происходить изменения реальных конформаций белка и субстрата или одного из них. Васлов и Доэрти констатировали наличие конформационных эффектов при связывании химотрипсином молекул субстратов и конкурентных ингибиторов [66]. Структурное соответствие в ФСК до некоторой степени подобно соответствию в гетерогенном катализе (см. стр. 359). Исходя из своей мультиплетной теории, Баландин предложил качественную схему структурного соответствия фермента, кофермента и субстрата [67, 68].

Можно думать, что значительные изменения энтропии при образовании ФСК происходят именно в результате конформационных эффектов. Понижение энтропии при отборе определенной конформации может компенсироваться понижением энтальпии вследствие взаимодействия и повышением энтропии других участков глобулы. Как мы видели, физический анализ событий такого типа в белке требует учета явлений в окружающей водной среде (см. стр. 371).

Последовательное развитие теории индуцированного структурного соответствия в ферментативном катализе было проведено Кошландом [69]. Задача теории состояла прежде всего в объяснении специфичности ферментов, катализирующих реакции переноса связи типа

$$B{-}X{+}Y \rightleftarrows B{-}Y{+}X.$$

Старая идея о статической системе со структурным соответствием, идея «ключ — замок» (Фишер) объясняла специфичность фермента не гибкостью, а жесткостью его структуры, обусловливающей притяжение определенной молекулы субстрата, и стерическое отталкивание незначительно отличающегося аналога. Ряд фактов противоречит этой простой модели. Так, вода и другие малые молекулы, содержащие гидроксил, не участвуют в реакциях переноса гидроксила, катализируемых фосфорилазами и киназами. Напротив, гидроксилсодержащие молекулы большого размера являются в этих случаях субстратами. Зачастую у хорошо сорбируемых активным центром лигандов реакционная способность отсутствует, несмотря на то, что весьма сходные соединения обладают ею. Вместе с тем известны случаи, когда малые молекулы не сорбируются, а их аналоги большего размера хорошо сорбируются активным центром. Фосфотрансацетилаза действует на ацетат, пропионат, бутират, но не на формиат, а β-глюкозидаза действует на глюкозиды, но не на 2-дезоксиглюкозиды. Аналогичные данные приведены в [64, 69].

Кошланд сформулировал следующие положения [70]:

1. Субстрат вызывает изменения геометрии фермента, поскольку он проникает в активный центр.

2. Для ферментативного действия необходима надлежащая взаимная ориентация каталитических групп.

3. Субстрат индуцирует такую ориентацию изменениями, которые он вызывает в геометрии фермента.

Эти положения иллюстрируются рис. 6.18. Рис. 6.18, *в* и *г* показывают, почему молекулы, сходные с субстратом, но отличные от него по размерам, нереакционноспособны. Согласно модели Кошланда специфичность и каталитическая эффективность фермента связаны друг с другом, но их механизмы различны, и реакция осуществляется только при надлежащем взаимном расположении сорбирующих и каталитического центров относительно молекулы субстрата. Кошланд иллюстрирует это примером β-амилазы [71]. Этот фермент действует на конечные группы амилозы, но не на другие глюкозидные связи полисахарида. Циклоамилозы являются конкурентными ингибиторами фермента. Сказанное поясняется схемой на рис. 6.19. Реакция происходит лишь при определенном пространственном расположе-

нии сорбирующих и каталитических групп фермента A, B, X (см. также [72, 73]).

Наглядная модель действия модификатора по Кошланду показана на рис. 6.20 [72]. Ингибитор конкурентен, если группа B

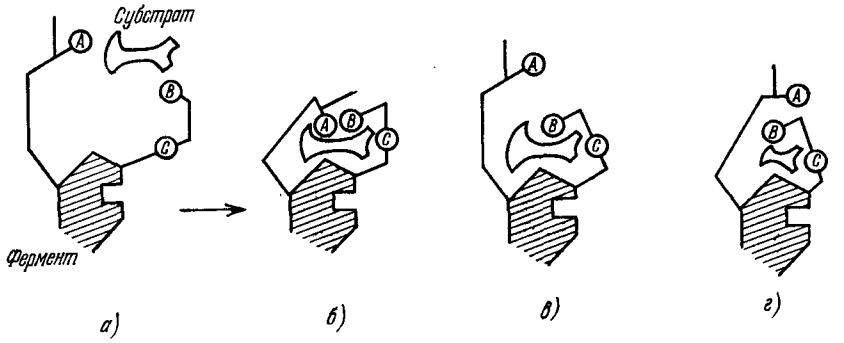


Рис. 6.18. Схема образования комплекса фермент — субстрат посредством индуцированного структурного соответствия.
а) Фермент; *б*) ФСК; *в*) и *г*) комплексы с аналогами субстрата.

существенна для присоединения субстрата, и неконкурентен в случае ее каталитической активности.

Столь же наглядная схема отбора конформации белка субстратом показана на рис. 6.21 [59], где H в кружке — гидрофоб-

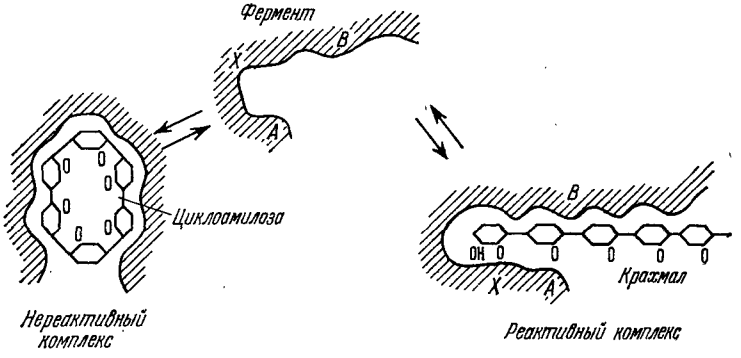


Рис. 6.19. Схема, иллюстрирующая действие β-амилазы.

ная группа, а знаки плюс и минус в кружках — заряженные группы.

Наглядное моделирование было применено и для рассмотрения эффекта ориентации в ФСК. При элементарных расчетах

этого эффекта исходили из предположения об очень резкой зависимости энергии системы от углов ориентации [62]. В дальнейшем было показано, что такой резкой зависимости не может быть [74]. Для увеличения скорости реакции в 10^5 раз необходимо снижение активационного барьера на 7 *ккал/моль*. Такое изменение энергии возможно при поворотах вокруг двойных связей на 10—15° или при изменениях валентных углов на 5—10°. Между тем оценки в [62] предполагают изменения углов всего лишь на 0,1°.

Для подтверждения качественных положений теории Кошланда нужно доказать, что при взаимодействии белка с лигандами действительно происходят конформационные изменения и что они служат причиной наблюдаемого возрастания скорости.

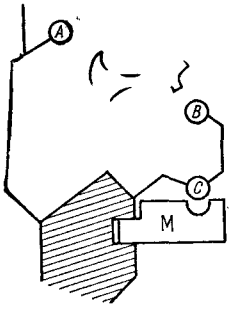


Рис. 6.20. Схема действия модификатора М.

Ряд фактов свидетельствует о конформационных превращениях ферментов (см. [68, 71]). В присутствии субстратов некоторые ферменты становятся более жесткими, другие, напротив, более лабильными — легче денатурируются при нагревании [75]. Субстраты индуцируют диссоциацию глутаматдегидрогеназы [76] и гексокиназы [77]. Под действием субстрата изменяется реакционная способность аминокислотных остатков фермента; так, иодирование пенициллиназы усиливается субстратом [78]. Эти явления можно объяснить моделью Кошланда [79] (см. также обзоры [80, 81]).

Спектр поглощения химотрипсина меняется при его взаимодействии с субстратом, и эти изменения могут быть интерпретированы как вызванные изменениями конформации [82]. Сходные явления наблюдались и в ряде других случаев (см., например, [83]). Изменения конформаций проявляются и в спектрах люминесценции как ароматических аминокислотных остатков, так и сорбированных на белке красителей (см. [84]). Конформационные изменения фосфоглюкомутазы при ее взаимодействии с субстратом глюкозо-6-фосфатом находят свое выражение в спектрах поглощения и в спектрах люминесценции [68, 85].

Спектрополяриметрия позволяет выявить структурные изменения, происходящие в активном центре и в глобуле в целом. Выше уже было сказано об исследовании аспартатаминотрансферазы (см. стр. 379, а также [68, 86]). В ряде ферментов наблюдалось изменение степени α-спиральности, возникающее при взаимодействии фермента с субстратом, коферментом и другими лигандами (см. [68]). Подробное изучение ДОВ лактатдегидрогеназы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы показало, что

присоединение кофермента (НАД, см. стр. 95) значительно изменяет степень α-спиральности этих белков [68, 87].

Сведения о конформационных изменениях дают также спектры ЭПР ферментов, содержащих метку (парамагнитный радикал), спектры ЯМР и люминесценции (см. гл. 5).

Таким образом, основное предположение теории Кошланда в ряде случаев доказано. Эти результаты, однако, еще не свидетельствуют о том, что изменения конформации белка приводят

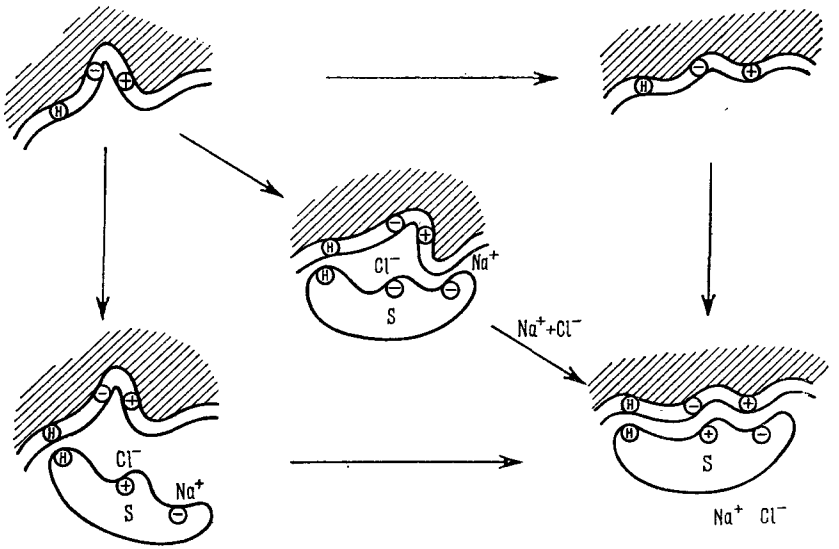


Рис. 6.21. Схема отбора конформации белка субстратом.

к достижению структурного соответствия. Для доказательства такого соответствия оптические методы сами по себе недостаточны, их должно сочетать с химическими и с глубоким теоретическим анализом (см. сказанное об ААТ, стр. 378—383). Непосредственную информацию об изменении структуры фермента и субстрата при образовании их комплекса дает рентгеноструктурный анализ [88].

Необходимо подчеркнуть, что теория Кошланда не обязательно предполагает значительные изменения конформации белка. Эти изменения могут быть и малыми, если структура глобулы такова, что ее соответствие с субстратом уже предопределено. Вместе с тем структурное соответствие может обеспечиваться и изменением конформации субстрата.

Именно такой оказывается ситуация у лизоцима. Как показывает рентгенография [36, 88], субстрат входит в уже

имеющуюся полость молекулы фермента (см. стр. 377). При этом полость сужается для того, чтобы плотнее «зажать» субстрат. Смещения аминокислотных остатков белка невелики, но заметны — остаток Три 62 смещается на 0,75 Å. Одновременно происходит изменение конформации субстрата — небольшой поворот углеводных колец вокруг гликозидной связи.

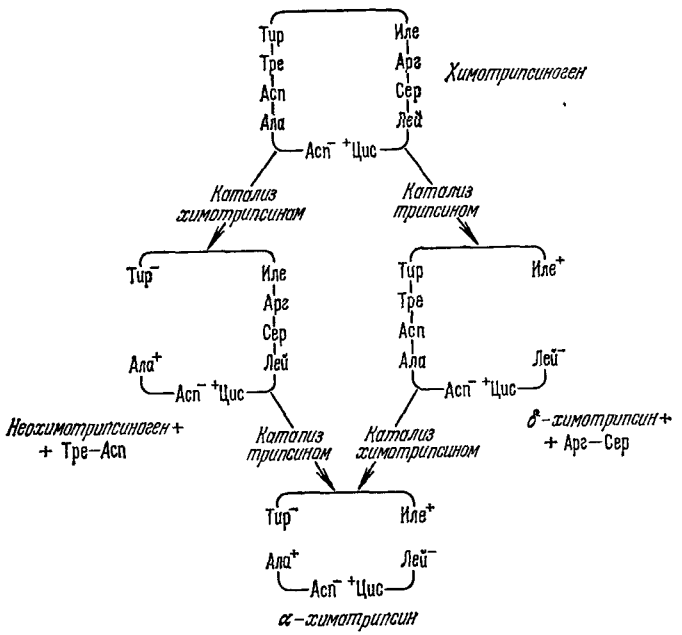


Рис. 6.22. Схема активации химотрипсиногена.

Наличие предуготовленной для субстрата полости обнаружено рентгенографически и у других ферментов. Активный центр рибонуклеазы, расположенный в этой полости, содержит основные остатки Лиз и Арг, взаимодействующие с фосфатными группами РНК (рибонуклеаза катализирует гидролитическое расщепление РНК). Каталитический участок в той же полости образован двумя остатками Гис, осуществляющими основный катализ [89, 90]. Аналогичная полость обнаружена в папаине, активными остатками которого являются Цис 25 и Гис 159 [91].

Рентгеноструктурный анализ раскрывает события, происходящие при образовании химотрипсина в результате активации химотрипсиногена. Такая активация состоит в расщеплении пептидной связи Арг 15 — Иле 16 (см., например, [15, 64]).

Установлено, что при этом аминогруппа Иле соединяется с γ-СООН-группой остатка Асп 194 и образуется глубокая полость. Локальное окружение этих групп имеет малую диэлектрическую проницаемость и ионная связь $COO^-—H_3N^+$ очень сильна. Активный центр химотрипсина содержит Сер 195, Гис 57 вблизи поверхности полости, глубже расположен Асп 102, его карбоксильная группа образует водородную связь с имидазолом Гис 57, который становится сильно поляризованным и притягивает протон гидроксила Сер 195. Участок, определяющий специфичность химотрипсина по отношению к ароматическим боковым цепям, расположен в глубокой полости вслед за активным центром. На рис. 6.22 дана схема превращения химотрипсиногена в химотрипсин (см. [88, 92, 93]).

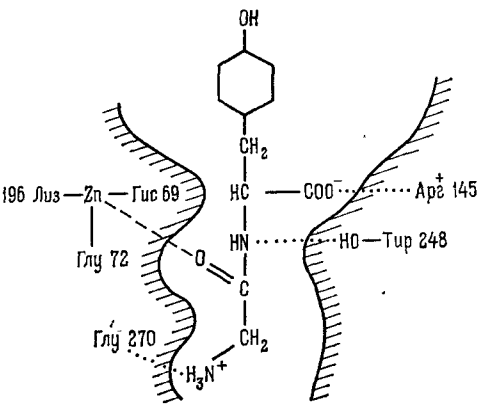


Рис. 6.23. Схема активного центра карбоксипептидазы.

Прямое подтверждение теории Кошланда получено при исследовании карбоксипептидазы [39, 94, 95] (см. стр. 376). В присутствии глицилтирозина расположение аминокислотных остатков фермента существенно изменяется. Активный центр представляет собой глубокую полость, подобную «рту паука» [88], со «щупальцами», готовыми направить субстрат к атому Zn. Одно «щупальце», содержащее Тир 248, направляется к NH-группе субстрата, Арг 145 другого взаимодействует с карбоксилом субстрата, Глу 270 третьего — с конечной аминогруппой (рис. 6.23).

Очевидно, что не следует понимать теорию Кошланда как теорию гибкой структуры фермента. Фермент скорее можно сравнить с механизмом, функциональные части которого могут испытывать дискретные перемещения, транслокации, необходимые для структурных соответствий с лигандами. Конструкция такого механизма характеризуется не пластичностью, но, скорее, упругостью. Модель белковой глобулы, построенная из шарнирно сочлененных упругих стержней (см. стр. 252), согласуется с фактами, полученными при изучении ферментов.

Структурное соответствие в ФСК, по-видимому, действительно достигается. Оно реализуется в полости молекулы фермента. Как показывает сопоставление всех изученных

рентгенографических структур, их единственная общая особенность состоит в том, что внутренняя поверхность полости образована преимущественно неполярными остатками. Вследствие гидрофобных взаимодействий полярные остатки выведены наружу (см. стр. 223). Неполярное «нутро» белковой молекулы имеет малую диэлектрическую проницаемость, что облегчает электрические взаимодействия [88]. Значение этого рассмотрено далее (см. стр. 403).

§ 6.6. ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА ФЕРМЕНТ

Очевидно, что ферментативная активность должна существенно зависеть от pH среды. Макромолекулы белка содержат ионизуемые группы. То же относится к большинству субстратов, модификаторов и коферментов. Подробная классификация возможных влияний pH на ферменты дана Уэббом [16] (см. также [68]). Изменение pH может изменить состояние ионизуемых групп в активном центре или соседствующих с ним; оно может также влиять на состояние неферментных компонент системы и на структуру глобулы локально или в целом.

Фермент может существовать в различных состояниях ионизации, находящихся в равновесии друг с другом. Рассмотрим простейшую модель системы с двумя состояниями ионизации [96]. Такова любая двухосновная кислота. Имеем

$$AH_2 \underset{K_1}{\rightleftarrows} AH^- \underset{K_2}{\rightleftarrows} A^{2-},$$

где K_1 и K_2 — первая и вторая константы ионизации. Обозначим сумму концентраций всех трех форм через A_t

$$A_t = [AH_2] + [AH^-] + [A^{2-}]. \tag{6,59}$$

Константы K_1 и K_2 равны

$$K_1 = \frac{[AH^-][H^+]}{[AH_2]}, \quad K_2 = \frac{[A^{2-}][H^+]}{[AH^-]} = \frac{[A^{2-}][H^+]^2}{[AH_2]K_1}. \tag{6,60}$$

Следовательно,

$$A_t = [AH_2]f = [AH^-]f^- = [A^{2-}]f^{2-}, \tag{6,61}$$

где f, f^-, f^{2-} — так называемые pH-функции Михаэлиса:

$$f = 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1K_2}{[H^+]^2}, \quad f^- = 1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]},$$
$$f^{2-} = 1 + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{[H^+]^2}{K_1K_2}. \tag{6,62}$$

Применим эту грубую модель к ферменту, приняв, что активный центр может существовать в трех указанных формах, но

лишь одна из них AH^- реакционноспособна. Тогда скорость реакции пропорциональна концентрации этой формы, т. е.

$$v = k[AH^-], \tag{6,63}$$

и мы получаем

$$v = kA_t \Big/ \left(1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}\right). \tag{6,64}$$

График зависимости v от $[H^+]$, т. е. от pH, проходит через максимум, отвечающий условию $[H^+] = \sqrt{K_1 K_2}$, т. е.

$$pH = {}^1/_2(pK_1 + pK_2). \tag{6,65}$$

Действительно, во многих случаях зависимость активности фермента от pH имеет колоколообразную форму. Изложенная феноменологическая теория это объясняет и приводит к удобным для расчетов формулам [15, 16]. Однако зависимость скорости реакции от pH можно истолковать и иначе. Кирквуд и Шомейкер рассмотрели флуктуации электрических зарядов в молекуле фермента [97, 98]. Если свободные энергии различных состояний ионизации молекулы мало отличаются друг от друга, то заряды могут перемещаться, флуктуировать. Эти флуктуации могут привести к добавочному электростатическому взаимодействию фермента с субстратом.

Пусть U — потенциальная энергия ФСК при данном распределении зарядов. Усредним эту энергию по всем распределениям зарядов

$$\exp(-W/kT) = \langle \exp(-U/kT) \rangle. \tag{6,66}$$

Имеем

$$W = \langle U \rangle - \frac{1}{2kT}[\langle U^2 \rangle - \langle U \rangle^2] + \ldots \tag{6,67}$$

В отсутствие флуктуаций $\langle U^2 \rangle = \langle U \rangle^2$ и $W = \langle U \rangle$. Допустим, что белок содержит n основных групп с зарядами $Z_i e$. Обозначив дипольный момент молекулы субстрата через $\mathbf{p}$, расстояние между i-й группой активного центра и субстратом через $\mathbf{R}_i$, угол между $\mathbf{p}$ и $\mathbf{R}$ через γ_i и диэлектрическую проницаемость через ε, получим

$$U = \sum_{i=1}^{n} \frac{(z_i + x_i)\, ep \cos \gamma_i}{\varepsilon R_i^2}. \tag{6,68}$$

Величина x_i равна 1 или 0 в зависимости от того, присоединен ли к i-й группе протон или нет. Вычислим W. Имеем

$$\langle U \rangle = \sum_{i=1}^{n} \frac{z_i + \bar{x}_i}{\varepsilon R_i^2} ep \cos \gamma_i \tag{6,69}$$

и

$$\bar{x}_i = \frac{[A_iH]}{[A_iH]+[A_i]} = \frac{[H^+]}{[H^+]+K_i}, \tag{6,70}$$

где

$$K_i = \frac{[A_i][H^+]}{[A_iH]}. \tag{6,71}$$

Аналогичным образом находим

$$\langle U^2\rangle = \sum_i (z_i^2 + 2z_i\bar{x}_i + \overline{x_i^2}) \frac{e^2p^2\cos^2\gamma_i}{\varepsilon^2 R_i^4} + \\ + \sum_{i,j}{}' \overline{(z_i+x_i)(z_j+x_j)} \frac{e^2p^2\cos\gamma_i\cos\gamma_j}{\varepsilon^2 R_i^2 R_j^2}, \tag{6,72}$$

причем

$$\overline{x_i^2} = \overline{x_j^2}, \quad \overline{x_ix_j} = \bar{x}_i\bar{x}_j = \frac{[H^+]^2}{([H^+]+K_i)^2}. \tag{6,73}$$

Следовательно,

$$\langle U^2\rangle - \langle U\rangle^2 = \sum_i (\overline{x_i^2} - \bar{x}_i^2) \frac{e^2p^2\cos^2\gamma_i}{\varepsilon^2 R_i^4}, \tag{6,74}$$

где

$$\overline{x_i^2} - \bar{x}_i^2 = \frac{[H^+]}{[H^+]+K_i}\left(1 - \frac{[H^+]}{[H^+]+K_i}\right) = \frac{[H^+]\,K_i}{([H^+]+K_i)^2}. \tag{6,75}$$

Итак,

$$W = \sum_{i=1}^{n}\left(z_i + \frac{[H^+]}{[H^+]+K_i}\right)\frac{ep\cos\gamma_i}{\varepsilon R_i^2} - \\ - \frac{1}{2kT}\sum_{i=1}^{n}\frac{K_i[H^+]}{([H^+]+K_i)^2}\frac{e^2p^2\cos^2\gamma_i}{\varepsilon^2 R_i^4} + \ldots \tag{6,76}$$

Энергию, связанную с флуктуациями зарядов, можно записать в виде

$$\Delta W = -\frac{n_\alpha e^2 p^2}{4\varepsilon^2 R_\alpha^4 kT}\frac{K_\alpha[H^+]}{([H^+]+K_\alpha)^2}. \tag{6,77}$$

Здесь n_α, R_α, K_α — эффективные величины.

Вследствие флуктуаций зарядов должны изменяться и константа Михаэлиса (см. стр. 363) и константа скорости k_2 в финальной реакции образования продукта. Можно принять, что

$$\ln\frac{k_2}{k_2^0} = -\frac{W^* - W_0^*}{kT} = -\frac{\Delta W^*}{kT}, \tag{6,78}$$

где W^* и W_0^* — энергии активации при наличии флуктуаций зарядов и в отсутствие флуктуаций. Если ΔW^* выражается формулой типа (6,77), то

$$\ln \frac{k_2}{k_2^0} = \frac{n_\alpha e^2 \Delta p^2}{4\varepsilon^2 R_\alpha^4 k^2 T^2} \frac{K_\alpha [H^+]}{([H^+] + K_\alpha)^2}, \qquad (6,79)$$

где Δp^2 — разность квадратов дипольных моментов субстрата в активированном и неактивированном состояниях. Формула (6,79) дает колоколообразную зависимость k_2 от pH. Максимуму k_2 соответствует $pH = pK_\alpha$.

Очевидно, что форма кривой k_2(pH) объясняется в этой теории причинами, совершенно отличными от рассматриваемых в теории Михаэлиса. Прямые доказательства существования флуктуаций зарядов пока не получены. Кирквуд и Шомейкер показали, что флуктуации должны привести к появлению добавочных компонент в спектре времен релаксации. Позднее было установлено, что это не так [99], и сейчас трудно указать способ экспериментального обнаружения и изучения зарядовых флуктуаций.

Кирквуд считал механизм флуктуационного взаимодействия фермента и субстрата универсальным и определяющим явление ферментативной активности в целом [97, 98, 100]. Все изложенное показывает, что за ферментативную активность ответствен ряд факторов, и здесь весьма важны конформационные явления. Теория Кирквуда не решает проблему. Вместе с тем и механизм Михаэлиса, и механизм Кирквуда отражают реальные свойства полиэлектролитной системы. Остается неясным, в какой мере, так как отсутствуют строгие количественные оценки и получить их трудно.

Следует рассмотреть еще один механизм влияния pH на фермент — прямое влияние pH на конформационную структуру белка. Если считать, что реализуется индуцированный контакт фермента с субстратом, то повороты связей сопровождаются перемещением зарядов. Конечно, электростатические взаимодействия (включая образование ионных пар) между боковыми привесками могут играть не меньшую роль, чем состояние водородных связей в α-спиралях и β-формах. Ясно, что концентрация водородных ионов должна влиять на конформационные свойства белка. Она не может не сказываться также на гидрофобных взаимодействиях, формирующих глобулу. Зависимость гидрофобных взаимодействий от pH мало изучена.

Как уже сказано выше (см. стр. 215—218), имеется возможность строгого анализа влияния pH среды на степень спирализации полипептида. Соответствующие модельные расчеты, проведенные в работах [101], показали, что форма зависимости

степени спиральности от pH определяется характером последовательности катионных и анионных групп цепи. Если эти группы регулярно чередуются, будучи разделены постоянным числом нейтральных групп, то кривая имеет форму симметричного колокола с максимумом при $pH = {}^1/_2(pK_a + pK_к)$ (см. стр. 217). В других случаях возможен минимум, а не максимум, и более сложные формы кривых.

Исследование ДОВ лактатдегидрогеназы (ЛДГ) показало колоколообразную зависимость констант в формулах Друде и Моффитта (см. стр. 304, 305) от pH. На рис. 6.24 изображены

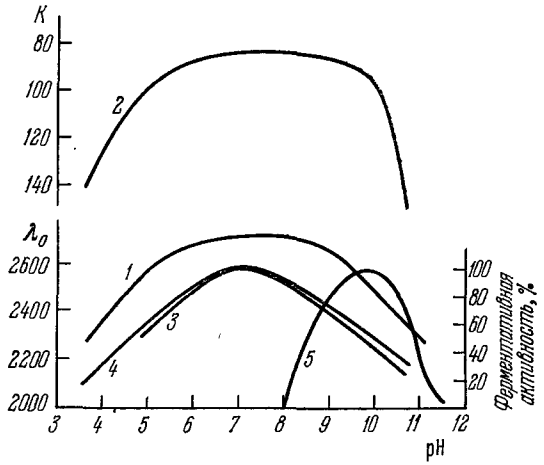


Рис. 6.24. Влияние pH на поведение ЛДГ.

1 — зависимость λ_0 (формула Друде) от pH, *2* — зависимость *K* (формула Друде (5,113)) от pH, *3* — зависимость λ_0 от pH для ЛДГ + НАД-Н, *4* — зависимость ферментативной активности ЛДГ от pH для реакции пируват ⟶ лактат, *5* — то же для обратной реакции.

соответствующие кривые, а также кривые зависимости скоростей прямой и обратной реакции (пируват ⇄ лактат) от pH. Для прямой реакции имеется корреляция между ферментативной активностью и степенью α-спиральности фермента. Наибольшая скорость отвечает максимальной спиральности. Эта корреляция становится существенно лучше в присутствии кофермента НАД. НАД меняет вторичную структуру фермента (см. стр. 390), причем эти изменения зависят от pH. Анализ ДОВ по Блоуту — Шехтеру (см. стр. 318) показывает, что экспериментальные точки попадают на линейный график зависимости a_{2250} от a_{1930}, отвечающий $\varepsilon < 30$, т. е. органическому растворителю. Тем самым, α-спиральные участки находятся в гидрофобном окружении. При изменении pH экспериментальные точки перемещаются вдоль той же прямой. Значит, изменения степени α-спирально-

сти, вызванные изменением pH в исследованном интервале, не сопровождаются развертыванием глобулы.

Сходные результаты получены для глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, но здесь нет такой четкой корреляции, как для первого фермента (дальнейшие подробности см. в [68, 87]). Ряд данных о влиянии pH среды на вторичную структуру белков приводит Жоли [102].

Описанные выше результаты подтверждают общие представления об определяющей роли конформационных явлений в ферментативной активности и в этом смысле согласуются с теорией Кошланда. Установленная для лактатдегидрогеназы корреляция степени спиральности и скорости реакции весьма показательна. Конечно, нет оснований считать подобную корреляцию обязательной во всех случаях.

Но пока не существует метода — теоретического или экспериментального — для учета относительной роли всех трех механизмов: механизма, рассмотренного в феноменологической теории Михаэлиса и Давидзона (см. стр. 394), механизма Кирквуда и Шомейкера и конформационного механизма. Следует отметить, что наряду с флуктуациями зарядов, исследованными Кирквудом, должны существовать пространственные флуктуации, определяемые подвижностью полипептидных цепей.

§ 6.7. ФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Основная нерешенная задача физики и физической химии ферментов состоит в количественном объяснении их высокой каталитической активности.

Несомненно, что все рассмотренные выше эффекты дают свои вклады в ферментативную активность. Однако количественные оценки здесь недостаточно достоверны и не решают проблему.

В физическом аспекте должно поставить вопрос об едином механизме ферментативной активности, определяемом физическими свойствами глобулы как целостной системы. Мы не знаем пока, существует ли такой механизм или ферментативная активность полностью определяется уже рассмотренными химическими и физико-химическими факторами. Очевидно, что здесь интересен и положительный, и отрицательный ответ на вопрос о существовании единого физического механизма.

Следует подчеркнуть, что свойства глобулы как целого, за исключением наличия в ней полости с неполярными остатками, не учитываются ни в теории Кошланда, ни, тем более, в химических теориях взаимодействий в активных центрах ферментов.

Вряд ли осмысленно искать этот механизм в специальных полупроводниковых или иных электронных свойствах глобулы.

Выше уже были приведены аргументы, опровергающие представления об особых электронных свойствах белков (см. стр. 109). Эти аргументы безусловно справедливы применительно к подавляющему большинству известных ферментов. Следует, однако, согласиться с Перутцом, указывающим, что специальные механизмы могут быть существенны в ферментах, участвующих в переносе электронов или в превращении различных форм энергии (таких, например, как энергия фотонов) в химическую энергию [88].

Белковая глобула представляет собой не статистическую, а динамическую систему. Это своего рода машина, работа которой в конечном счете определяется конкретными деталями ее устройства. Как пишет Эйген: «...мы встречаемся здесь с видами молекул, которые кажутся проявляющими некоторую степень «разумности», в отличие от своих неорганических «коллег», которые просто говорят «да», когда они реагируют, или «нет», когда они не реагируют» [103]. Тем не менее не только законно, но и необходимо рассмотреть эту машину как целостную физическую систему.

Естественная физическая идея состоит в предположении о способности глобулы служить неким энергетическим резервуаром. Энергия теплового движения или энергия, приобретенная глобулой при сорбции субстрата, конвертируется в энергию ФСК, в результате чего происходит эффективное понижение энергии активации. Неполная упорядоченность глобулы и малые различия в свободных энергиях упорядоченного и неупорядоченного состояний (порядка 1 *ккал/моль*) означают наличие конформационных флуктуаций [104, 105]. Косвенные свидетельства в пользу таких флуктуаций состоят в заметном дейтерообмене с водородами пептидных связей —CO—NH— при температурах, значительно меньших температуры денатурации белка, при которой водородные связи рвутся [104]. О том же говорит повышенная жесткость ФСК по сравнению со свободным ферментом — ФСК труднее расщепляется трипсином [105—107]. По-видимому, связывание субстрата уменьшает конформационную подвижность глобулы. Наличие значительных флуктуаций следует также из общей феноменологической теории полимерной глобулы, развитой Лифшицем (см. стр. 143, 236).

Накопление энергии флуктуаций в ФСК и вызванное этим понижение энергии активации процесса, казалось бы, можно рассматривать на основе общей теории мономолекулярного распада. Представим себе химическую связь, включенную в сложную систему других связей. Система как целое испытывает тепловые колебания. Имеется конечная вероятность накопления в данной связи энергии, достаточной для ее разрыва. В изолированной связи такой возможности нет. Не может ли включение

субстрата в комплекс с ферментом создать возможность накопления энергии на связях субстрата?

Идея эта заманчива, но ошибочна. Как показывает теория мономолекулярного распада [1, 108], накопление колебательной энергии не влияет на энергию активации, необходимую для разрыва связи, но сказывается лишь на предэкспоненциальном множителе b, имеющем смысл средней частоты колебательной системы (ср. (6,10)). Средняя частота в ФСК не может сильно отличаться от частоты колебаний субстрата [68].

Другое предположение состоит в том, что энергия, выделяемая при сорбции субстрата, трансформируется в энергию упругих колебаний глобулы, ведущей себя подобно капле жидкости. Частоты таких колебаний попадают в гиперзвуковую область (максимальная дебаевская частота порядка 10^{13} *сек*$^{-1}$). Стоячие волны в капле могут образовать пучность в области активного центра, и энергия упругих колебаний может активировать молекулу субстрата [109]. Количественные оценки, основанные на этой идее, показали, что энергия упругих колебаний глобулы действительно может достигать 5—10 *ккал/моль* и обеспечивать значительное понижение эффективного активационного барьера [110]. Однако такая гипотеза ничем не доказана и, в частности, она не объясняет, почему энергия колебаний не диссипирует в окружающую среду.

Из ненадежности «капельной» гипотезы не следует, однако, невозможность понижения эффективной энергии активации за счет энергии сорбции субстрата. Структурное соответствие фермент — субстрат приводит и белок и малую молекулу в напряженное состояние. Можно сказать, что молекула субстрата «растянута на дыбе» [21].

Допустим, что длина нерастянутой молекулы субстрата равна l_0, длина полости фермента, контактирующей с субстратом, l. Изменения длины молекул субстрата и фермента равны x и y соответственно. Тогда $x + y = l - l_0$ и условие равенства упругих сил имеет вид

$$k_s x = k_e y,$$

где k_s и k_e — коэффициенты упругости субстрата и фермента. Из двух написанных соотношений находим

$$x = \frac{l - l_0}{1 + k_s/k_e}, \quad y = \frac{k_s}{k_e}\frac{l - l_0}{1 + k_s/k_e}.$$

Упругая энергия субстрата, т. е. величина, на которую понижается энергия активации, равна

$$\Delta E = {}^1/_2 k_s x^2 = {}^1/_2 k_s \left(\frac{l - l_0}{1 + k_s/k_e}\right)^2. \qquad (6,80)$$

Порядок величины k_e отвечает произведению линейных размеров глобулы на модуль упругости $L\epsilon$. Для белка $L \approx 50$ Å, $\epsilon \sim 10^{10}$ *эрг·см*$^{-3}$. Следовательно, $k_e \sim 5 \cdot 10^3$ *дин·см*$^{-1}$. Наибольшая энергия упругой деформации сосредоточивается в наиболее слабом месте молекулы субстрата. Деформация валентных углов происходит значительно легче, чем валентных связей [111]. Вместе с тем энергия, запасенная на угловых степенях свободы молекулы, может перейти на валентные связи и уменьшить энергию активации, нужную для разрыва. Коэффициент упругости, отвечающий низкочастотным деформационным колебаниям ($\nu \sim 10^{13}$ *сек*$^{-1}$), примерно равен $1{,}5 \cdot 10^4$ *дин·см*$^{-1}$. Допустим, что $\Delta E = 7{,}5$ *ккал/моль* (при такой величине ΔE скорость реакции увеличивается в 10^5 раз). Тогда $x \approx 0{,}8$ Å, $y \approx 2{,}3$ Å, упругая энергия фермента $^1/_2 k_e y^2 \approx 21$ *ккал/моль*. Значит, суммарная энергия, расходуемая при сорбции на упругую деформацию, составляет приблизительно 30 *ккал/моль*. Эта величина не чрезмерна, если учесть, что сорбция происходит за счет многоточечного связывания, т. е. образования нескольких химических и нехимических связей между субстратом и ферментом. Наблюдаемая энергия сорбции равна разности истинной энергии сорбции и упругой энергии фермента и субстрата.

Этот элементарный расчет проведен в предположении об однородных упругих свойствах белковой глобулы. Если область присоединения субстрата в ФСК имеет повышенную жесткость, то энергия упругой деформации фермента уменьшится и может оказаться даже меньше энергии молекулы субстрата.

Рассмотренная модель имеет статический характер. В действительности механизм «дыбы» следует считать динамическим, что может существенно изменить приведенные оценки. Так, при резонансе колебаний молекул субстрата и фермента для ускорения реакции в 10^5 раз нужны средние упругие энергии, в четыре раза меньшие, чем в статическом случае, так как биения периодически удваивают амплитуду колебаний.

Механизм «дыбы» должен следовать из теории глобулы Лифшица (см. стр. 236), согласно которой даже гомогенная глобула представляет собой систему с дискретными уровнями свободной энергии. Флуктуации ее оболочки могут обеспечить индуцированное структурное соответствие, предполагаемое Кошландом, а изменение уровня свободной энергии глобулы при сорбции субстрата эквивалентно накоплению энергии упругой деформации. Возможно, что эти представления окажутся полезными для понимания работы ферментов.

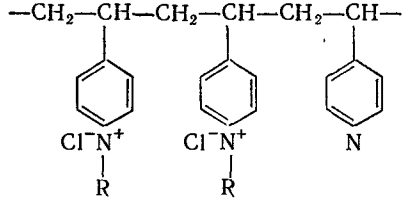
Все приведенные выше соображения не учитывают, однако, еще одного весьма важного фактора. Как уже сказано (см. стр. 376), молекула субстрата внедряется в гидрофобную, неполярную, полость в молекуле фермента. Тем самым, молекула

субстрата переходит из водного в гидрофобное окружение. Фермент является не только специфическим реагентом, но и специфической средой реакции [88, 112]. Как писал Перутц [112], «Мы можем спросить себя, почему химические реакции, нормально требующие мощных органических растворителей или сильных кислот и оснований, могут протекать в водном растворе вблизи нейтрального pH в присутствии ферментных катализаторов. Органические растворители имеют преимущества по сравнению с водой, обеспечивая среду с низкой диэлектрической проницаемостью, в которой могут иметь место сильные электрические взаимодействия между реагентами. Неполярные внутренние области ферментов обеспечивают живую клетку эквивалентами органических растворителей, применяемых химиками. Субстрат может быть введен в среду с низкой диэлектрической проницаемостью, в которой могут осуществиться сильные электрические взаимодействия между ними и полярными группами фермента».

Исследование поведения фермента как среды реакции требует, с одной стороны, экспериментального моделирования, с другой — построения теории скоростей реакций в растворах.

Имеются пока немногочисленные работы, в которых ферменты частично моделируются синтетическими полиэлектролитами. Остановимся на исследованиях, опубликованных в работах [113—116].

Поли-4-винилпиридины (ПВП), частично алкилированные 2-(2′-хлорэтил)-пиридином или бензилхлоридом, проявляют высокую каталитическую активность при гидролизе сложноэфирной связи, на 2—4 порядка превосходящую каталитическую активность низкомолекулярных аналогов. Был изучен ряд алкилированных ПВП типа



Гидролизу подвергались следующие субстраты: *п*-нитрофенилацетат (НФА), *п*-нитрофенилтриметилацетат (НФТМА), *п*-нитрофенилбензоат (НФБ), *п*-нитрофенилциннамат (НФЦ). Часть полимеров вела себя не как истинные катализаторы, но в соответствии со схемой

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} ES' + P,$$

т. е. «катализатор» изменялся в ходе реакции, образуя соединение *ES′*. Таким образом, здесь происходит «субстратное

ингибирование». Другие алкилпроизводные ПВП вели себя как истинные катализаторы — комплекс ES' расщеплялся. Кинетика гидролиза в обоих случаях отвечала уравнению Михаэлиса — Ментен (см. стр. 363). Величина k_2/K_M для полимеров варьировала от 4,5 до 64,0 $л \cdot моль \cdot сек^{-1}$ (в зависимости от природы алкилов и их содержания), тогда как для низкомолекулярного аналога 4-этилпиридина $k_2/K_M = 1{,}6 \cdot 10^{-2}$ $л \cdot моль \cdot сек^{-1}$. Повышенная каталитическая активность полимера объясняется возникновением в макромолекулярном клубке активных полостей, образованных гидрофобными заместителями. Это подтверждается интересными фактами. Каталитическая активность имеет резко выраженный максимум при определенном содержании α неалкилированных пиридиновых колец. Значение α, отвечающее максимуму, в свою очередь возрастает с увеличением степени полимеризации. В то же время приведенная вязкость полимера имеет острый минимум при том же значении α. Очевидно, что при этом полимер приобретает форму организованной глобулы с гидрофобной полостью внутри нее. Полимерный катализатор характеризуется высокой специфичностью; так, ПВ-бензилпиридин гидролизует НФА в 25 раз быстрее, чем НФТМА, и неизмеримо быстрее, чем НФБ и НФЦ. Активными центрами служат незамещенные пиридиновые кольца, окруженные N-алкилированными кольцами. В полости находятся, таким образом, нуклеофильные группы (пиридиновые кольца), окруженные гидрофобными заместителями. Кинетическое поведение полимерных катализаторов имитирует поведение α-химотрипсина. Для них изучено влияние среды на глобуляризацию и гидролиз и определены термодинамические характеристики элементарных стадий гидролиза.

В изложенных выше исследованиях моделированы свойства фермента как среды реакции, что позволяет количественно оценить соответствующий вклад в ферментативную активность. Как можно найти этот вклад теоретически?

Имеется ряд попыток построить теорию ионных и ион-дипольных реакций в растворах, основанную на теории абсолютных скоростей реакций Эйринга [2, 117, 119]. Сама эта теория является, по существу, «газовой», и в указанных работах вакуум заменяется непрерывной средой, характеризуемой макроскопическим значением статической диэлектрической проницаемости ε, и все изменения в константах скоростей выражаются через ε. Между тем среда поляризуется, перестраивается при изменении электронной структуры реагентов, причем первый процесс происходит значительно медленнее второго. Расчеты скоростей окислительно-восстановительных реакций в растворах, учитывающие динамическую роль среды, были впервые выполнены Маркусом [120]. В дальнейшем скорость электронного

обмена была рассчитана более строго в рамках квантовомеханической теории химических реакций, протекающих в полярных средах [121—124]. Основное положение теории состоит в том, что все движения частиц, участвующих в реакции, включая частицы растворителя, могут трактоваться либо классически, либо квантово. Классическими являются движения с частотами $\omega \ll kT/\hbar$, квантовыми — с частотами $\omega \gg kT/\hbar$. Энергия активации процесса определяется высотой потенциального барьера, преодолеваемого классической подсистемой, а трансмиссионный коэффициент $\varkappa$ (см. стр. 357) — способностью квантовой подсистемы к туннельному прохождению под барьером.

Состояние полимерного «растворителя» можно описать набором гармонических осцилляторов с координатами q_x и частотами ω_x. Зависимость кинетических параметров реакции от свойств растворителя можно определить, если известна комплексная диэлектрическая проницаемость среды $\varepsilon(\mathbf{k}, \omega)$, где зависимость ε от волнового вектора $\mathbf{k}$ описывает изменение ε, вызванное изменением состояния среды. Энергию ее реорганизации можно записать в виде

$$E_s = {}^1/_2 \sum_{\substack{x \\ (\text{класс})}} \hbar\omega_x (q^f_{x0} - q^i_{x0}) =$$

$$= \frac{1}{8\pi} \sum_{\mathbf{k}} (\mathbf{D}_i(\mathbf{k}) - \mathbf{D}_f(\mathbf{k})) \frac{1}{\pi} \int_{(\text{класс})} \frac{\operatorname{Im} \varepsilon(\mathbf{k}, \omega)}{\omega |\varepsilon(\mathbf{k}, \omega)|} d\omega, \qquad (6{,}81)$$

где q^i_{x0}, q^f_{x0} — равновесные значения нормальных координат до и после электронного перехода; $\mathbf{D}_i(\mathbf{k})$ и $\mathbf{D}_f(\mathbf{k})$ — фурье-амплитуды вектора электрической индукции реагентов и продуктов реакции

$$\mathbf{D}_{i,f} = \int \mathbf{D}_{i,f}(\mathbf{r}) \exp(-i\mathbf{kr})\, d\mathbf{r}. \qquad (6{,}82)$$

В формуле (6,81) суммирование и интегрирование проводятся по частотам, соответствующим классическим степеням свободы.

Для вычисления энергии активации простейших процессов электронного переноса нужно найти седловую точку на поверхности пересечения термов начального U_i и конечного U_f состояний:

$$\left.\begin{aligned} U_i &= J_i + {}^1/_2 \sum_{\substack{x \\ (\text{класс})}} \hbar\omega_x (q_x - q^i_{x0})^2, \\ U_f &= J_f + {}^1/_2 \sum_{\substack{x \\ (\text{класс})}} \hbar\omega_x (q_x - q^f_{x0})^2. \end{aligned}\right\} \qquad (6{,}83)$$

Координаты седловой точки q_x^* даются формулой

$$q_x^* = {}^1/_2 (q_{x0}^f - q_{x0}^i) + \frac{\Delta J}{2E_s}(q_{x0}^f - q_{x0}^i), \tag{6,84}$$

где $\Delta J = J_f - J_i$ — тепловой эффект реакции. Энергия активации равна

$$E^* = {}^1/_2 \sum_{\substack{x \\ (\text{класс})}} \hbar\omega_x (q_x^* - q_{x0}^i)^2 = \frac{(\Delta J + E_s)^2}{4E_s}. \tag{6,85}$$

Для энтропии активации (см. [124]) имеем

$$S^* = k \ln \frac{\hbar\omega_{\text{эфф}}}{kT}, \tag{6,86}$$

где

$$\omega_{\text{эфф}}^2 = \frac{\sum\limits_x \omega_x^3 (q_{x0}^i - q_{x0}^f)^2}{\sum\limits_x \omega_x (q_{x0}^i - q_{x0}^f)^2}; \tag{6,87}$$

здесь суммы берутся также по классическим степеням свободы. Трансмиссионный коэффициент равен

$$\varkappa = \left\{ \begin{array}{ll} 1, & \text{если } |\mathscr{L}|^2 \gg \hbar_{\text{эфф}}\, \omega\, (kTE_s)^{1/2}, \\ |\mathscr{L}|^2 \left(\dfrac{4\pi^3}{\hbar^2 \omega_{\text{эфф}}^2 kTE_s}\right)^{1/2}, & \text{если } |\mathscr{L}|^2 \ll \hbar\omega_{\text{эфф}}\, (kTE_s)^{1/2}, \end{array} \right\} \tag{6,88}$$

где $\mathscr{L}$ — электронный обменный интеграл.

Изложенное относится к полярной среде. В ФСК реагенты (субстраты) находятся в полностью или частично неполярной среде. Однако физическая природа влияния среды на реакцию должна оставаться такой же. В отсутствие среды относительное расположение электронных уровней реагентов не меняется во времени. Электронный переход совершается практически мгновенно, и поэтому в силу закона сохранения энергии изменение энергии электрона должно компенсироваться изменением кинетических энергий реагентов. Но из-за большой массы ядер резкое изменение их скоростей маловероятно. Поэтому электронный переход может совершаться лишь при практическом совпадении начального и конечного уровней, отвечающих переносу электрона, т. е. переходу из восстановленного состояния $E^0_{\text{восст}}$ в окисленное $E^0_{\text{окис}}$. Положение этих уровней зависит от динамического состояния среды. Переходному состоянию будет отвечать такая конфигурация диполей среды и (или) такая деформированная конфигурация ФСК (фермента), при которой совпадают уровни $E^0_{\text{восст}}$ и $E^0_{\text{окис}}$. Эти энергии оказываются функциями некоторых обобщенных координат q, характеризую-

щих состояние среды. В гармоническом приближении гамильтониан среды имеет вид

$$\mathcal{H} = -\tfrac{1}{2}\sum_x \hbar\omega_x \frac{\partial^2}{\partial q_x^2} + \tfrac{1}{2}\sum_x \hbar\omega_x (q_x - q_{x0})^2 + J, \quad (6{,}89)$$

где ω_x и q_x — частоты и координаты нормальных колебаний среды, q_{x0} — равновесные координаты, J — минимальная потенциальная (или свободная) энергия системы. В общем случае

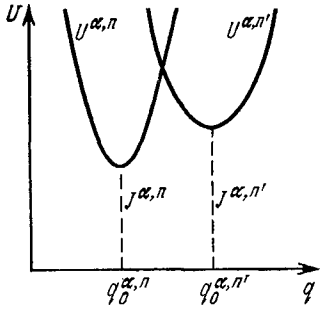


Рис. 6.25. Электронный переход без изменения α.

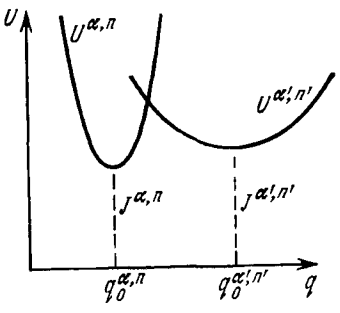


Рис. 6.26. Электронный переход с изменением α.

равновесная конфигурация среды будет характеризоваться различными конформационными состояниями α и различными электронными состояниями активного центра n. Учет ЭКВ (электронно-конформационных взаимодействий) требует записи гамильтониана $\mathcal{H}$ в виде

$$\mathcal{H} = -\tfrac{1}{2}\sum_x \hbar\omega_x^{\alpha,n} \frac{\partial^2}{\partial q_x^2} + \tfrac{1}{2}\sum_x \hbar\omega_x^{\alpha,n} (q_x - q_{x0}^{\alpha,n})^2 + J^{\alpha,n}, \quad (6{,}90)$$

и вероятность элементарного акта реакции равна

$$W = \sum_{\substack{\alpha,\alpha' \\ n,n'}} \Phi_{\alpha,n} W_{\substack{\alpha,\alpha' \\ n,n'}}, \quad (6{,}91)$$

где $\Phi_{\alpha,n}$ — вероятность того, что до реакции среда характеризовалась конформационным состоянием α и электронным состоянием n, а $W_{\substack{\alpha,\alpha' \\ n,n'}}$ — вероятность перехода системы в состояние α', n'. Электронные термы (поверхности потенциальной энергии), соответствующие различным конформационным и электронным состояниям, схематически изображены на рис. 6.25 (электронный переход без изменения α) и 6.26 (с изменением α).

Отличие неполярной среды от полярной состоит в том, что при переносе электрона или при сдвиге электронной плотности

энтропия реакции может быть значительной. Это определяется тем, что частоты, характеризующие флуктуацию поляризации в ходе реакции, не меняются, а деформационные акустические частоты при конформационных переходах могут существенно изменяться. Соответственно для неполярных сред скорость реакции может в значительной мере определяться энтропией активации. Из-за низких значений акустических частот, соответствующих ядерным осцилляторам, в неполярной среде электронная подсистема всегда будет адиабатически следовать за деформационными колебаниями и трансмиссионный коэффициент $\varkappa$ должен равняться 1.

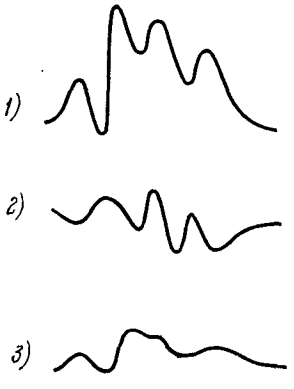


Рис. 6.27. Эффект дополнительности.

1 — профиль химической свободной энергии, *2* — профиль конформационной свободной энергии, *3* — суммарный профиль.

Таким образом, актуальной задачей является построение физической теории ферментативного катализа, основанной на рассмотрении ЭКВ (см. [125, 126]). Приведенные соображения дают физическую трактовку роли акустических колебаний (см. стр. 401), «дыбы» (см. стр. 401), а также так называемому *эффекту дополнительности*. Ламри и Билтонен [127] полагают, что профиль конформационной свободной энергии вдоль реакционной координаты дополнителен к профилю химической (электронной) свободной энергии (рис. 6.27). В результате в суммарном профиле активационные барьеры снижены.

Ясные сведения об ЭКВ дают исследования влияния конформации на скорость медленного изотопного обмена водорода в полинуклеотидах, проведенные Варшавским и сотрудниками [128]. Скорость обмена водорода на тритий у атома C_8 пуринового кольца в полиаденилоной кислоте зависит от распределения электронной плотности в пурине. Это распределение изменяется при конформационных движениях, вызванных сдвигом pH и комплексообразованием с полиуридиловой кислотой. Скорость изотопного обмена весьма чувствительна к таким изменениям электронной плотности.

Общий результат ЭКВ состоит в том, что электронная перестройка в ходе ферментативной реакции влечет за собой изменение конформации макромолекулы. Эту ситуацию можно описать на языке физики твердого тела. Перемещение электрона или электронной плотности в макромолекуле вызывает деформацию «решетки», т. е. конформационную перестройку. Ее можно трактовать как возбуждение длинноволновых фононов, и си-

стема электрон плюс деформация макромолекулы оказывается подобной полярону. Назовем такую систему *конформоном* [129]. Энергия конформона меньше энергии свободного электрона. Понижен и барьер для реакции.

В отличие от полярона, конформон не является истинной квазичастицей, способной перемещаться на большие расстояния. Его энергия быстро диссипирует из-за неоднородности и апериодичности структуры глобулы. Однако для реализации ферментативного процесса достаточно конформационного превращения, т. е. возбуждения длинноволновых фононов в пределах нескольких пептидных связей. Дальнейшая конформационная перестройка глобулы может происходить уже не в результате ЭКВ, но вследствие кооперативности макромолекулы.

Представляется естественным применить концепцию конформона к рассмотрению неоднократно упоминаемых в литературе полупроводниковых свойств биополимеров [130]. Очевидно, что конформационные изменения должны сопровождать перемещение электрона в биополимерной системе и, тем самым, сказываться как на значении предэкспоненциального фактора σ_0, так и на эффективной ширине энергетической щели E в выражении для электропроводности

$$\sigma = \sigma_0 \exp(-E/2RT).$$

Однако существование у биополимеров полупроводниковых свойств и биологическая значимость последних отнюдь не доказаны. Наблюдаемые эффекты плохо воспроизводимы, они могут объясняться ионными примесями и другими факторами. Как уже сказано, все то, что мы знаем о структуре и свойствах биополимеров, не дает оснований считать их полупроводниками (см. стр. 110).

Напротив, ионную проводимость мембран вероятно следует рассматривать на основе концепции конформона.

В наиболее непосредственной форме представления об ЭКВ, о конформоне применимы к окислительно-восстановительным ферментам — к цитохромам. Уже сформулированы гипотезы, объясняющие окислительное фосфорилирование на основе представлений об ЭКВ [131—134]. Проведены модельные квантовомеханические расчеты электронного обмена у цитохрома *c*.

Экспериментальную информацию об ЭКВ может дать систематическое исследование изменений химических (электронных) свойств биополимера, вызванных изменением лиганда или кофактора, и наблюдение возникающих при этом изменений конформационных свойств макромолекулы как целого. Такое исследование было проведено на системах аспартатаминотрансфераза (ААТ) — лиганд (кофактор) [135, 147, 148]. Изучалась денатурация в растворе мочевины апофермента, нормального холофер-

мента и ряда комплексов апофермента с модифицированными коферментами. Равновесные изотермы денатурации распадаются для изученных систем на два типа кривых — со значениями концентрации мочевины c_m^*, отвечающими средней точке денатурации и равными приблизительно 5 и 7 *М*. Весьма близкие по электронному строению системы, содержащие соответственно С—О—CH_3- и С—Н-группы, дают разные кривые. Известно, что наличие —О—CH_3 препятствует образованию альдиминной связи с ААТ (см. стр. 380). Напротив, кривые для аминоформы и холофермента, восстановленного $NaBH_4$, практически совпадают, несмотря на то, что в первом случае альдиминная связь отсутствует, а во втором она очень прочна. Эти результаты непосредственно показывают, что электронные изменения в активном центре сильно сказываются на конформационной стабильности белка. О том же свидетельствуют данные, полученные для миоглобина (см. гл. 7).

Сопоставление ферментативного процесса, катализируемого ААТ, с реакцией в конгруэнтной модельной системе (см. стр. 381) показывает, что в ферментной системе происходит выравнивание энергетических уровней различных промежуточных форм и, тем самым, согласно правилу Бренстеда, понижение активационных барьеров. В этом проявляется комплементарность профилей химической (электронной) и конформационной энергий (см. стр. 408). Можно предположить, что изменение конформационной стабильности белка как целого коррелирует с конформационной свободной энергией многостадийного процесса. Промежуточные формы, возникающие в реакции с ААТ, моделируются комплексами холофермента с ингибиторами, останавливающими реакцию на различных стадиях. Была изучена денатурация таких комплексов. Из значений c_m^*, согласно Тенфорду (стр. 245), можно найти абсолютные значения свободной энергии денатурации ΔF, определяющие конформационную стабильность. Установлено, что конформационная стабильность на разных стадиях процесса различна. Формы, обладающие наименьшей химической энергией, в конгруэнтной системе имеют наибольшую конформационную энергию. Эти результаты согласуются с представлением о комплементарности, реализуемой в результате ЭКВ [147, 148].

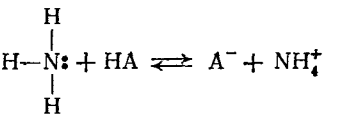
§ 6.6. МЕТАЛЛОФЕРМЕНТЫ

ЭКВ отчетливо проявляются в свойствах *металлоферментов*. Металлы служат кофакторами многих ферментов — в большинстве классов ферментов имеются металлозависимые. Ион металла непосредственно воздействует на конформационные свойства фермента и является удобной для исследования меткой в

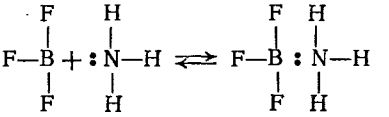
активном центре. Соединения переходных металлов характеризуются выразительными электронными спектрами, спектрами ЭПР, ЯМР и т. д. Многие ферменты (карбоксипептидаза, щелочная фосфатаза, карбоангидраза, альдолаза и т. д.) содержат в качестве кофактора непереходной металл — цинк. Однако возможно замещение Zn на переходные металлы с сохранением ферментом его активности. Так, пептидазная активность карбоксипептидазы А сохраняется при замене Zn на Co, Mn, Ni; эстеразная активность сохраняется при замене Zn на Cd, Co, Hg, Mn, Ni, Pb. Замена металла — более «мягкий» процесс, чем многие химические модификации фермента.

Действие ионов металлов на белок определяется тем, что они являются кислотами по Льюису, а также катализаторами окислительно-восстановительных процессов. Кроме того, ионы металлов поддерживают структурную организацию фермента.

Льюисовская кислота представляет собой акцептор пары электронов, в отличие от кислоты по Бренстеду — донора протона. Основание по Бренстеду является акцептором протона. Так, в реакции



NH_3 есть основание по Бренстеду. В реакции



BF_3 есть льюисовская кислота [1]. Ионы металлов в водных растворах являются кислотами, а такие комплексные ионы, как $Fe(NO)^{2+}$, $Cr(H_2O)_6^{3+}$, AlF_6^{3-} можно считать комплексами кислота — основание.

Бренстед предложил эмпирическое соотношение, характеризующее кислотно-основный катализ [136]. Этот процесс сводится к переносу водорода. Каталитическая способность кислот связана с их константой ионизации. Химическая реакция кислотно-основного катализа записывается следующим образом:

$$HA + B \rightleftarrows A^- + HB^+,$$

где HA, HB^+ — бренстедовы кислоты, B и A^- — основания. Уравнение Бренстеда, выражающее константу скорости реакции, катализируемой кислотой, имеет вид

$$k_{HA} = G_A (K_{HA})^{\alpha} \qquad (6,92)$$

и для реакции, катализируемой основанием, — вид

$$k_B = G_B (K_B)^{\beta}. \qquad (6,93)$$

Здесь k_{HA}, k_B — каталитические константы скорости реакции второго порядка, K_{HA}, K_B — соответствующие константы ионизации. G_A, G_B, $0 < \alpha, \beta < 1$ — константы. Следовательно,

$$\lg k_{HA} = \lg G_A + \alpha \lg K_{HA}, \qquad (6,94)$$

$$\lg k_B = \lg G_B + \beta \lg K_B. \qquad (6,95)$$

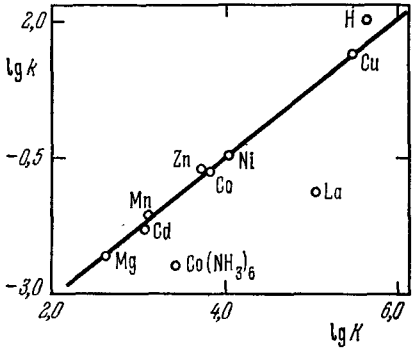


Рис. 6.28. Корреляция каталитической константы скорости разложения ацетондикарбоксилата и константы стабильности малонатовых комплексов металлов.

На рис. 6.28 показано, какие места занимают двухвалентные ионы металлов на графике зависимости каталитической константы скорости реакции разложения ацетондикарбоксилата от константы стабильности K для малонатовых комплексов металлов [137]. По своей каталитической способности двухвалентные ионы располагаются во многих модельных реакциях в следующий ряд:

$$Ca < Mg < Mn < Fe < Co \leqslant Zn \leqslant Ni < Cu.$$

Так обстоит дело при неферментативном катализе. Однако в металлоферментах этот порядок нарушается [138]. На рис. 6.29 показаны относительные скорости реакций, катализируемых металлоферментами, и скорости реакций для идеализированной модельной системы. Это нарушение обычного порядка может определяться связыванием металлов различными функциональными группами белка, которое, вероятно, происходит так:

$-O^-$	$\equiv N, -O^-$	$\equiv N, -S^-$	$-S^-$
Ca Mg Mn	Fe Co Ni	Cu Zn	Cd Pb Hg

Наиболее сильные льюисовские кислоты блокируют наиболее активные основания. Мы имеем дело с активируемой металлом системой, в которой ион металла легко обменивается. Вместе с тем металлы могут связываться одним и тем же центром, но в различных геометрических условиях. Первый случай, по-видимому, имеет место в реакциях переноса фосфата. В случае

Mg-активируемой АТФазы, вероятно, Mg (или заменяющий его Mn) связывается фосфатной группой субстрата и, казалось бы, не существенно, какой именно двухвалентный катион в этом участвует. Однако при соединении, например, комплекса металл — АТФ с ферментом разные металлы действуют по-разному, связываясь с различными группами белков. Поэтому Ni, Cd, Co оказываются не активаторами (подобно Mg, Mn), но ингибиторами процесса.

Металлоферменты характеризуются точной локализацией иона металла в активном центре, которая не меняется при замещении одного металла другим. В карбоксипептидазе особенно велика активность Zn и Co. В то же время по своим константам связывания металлы сохраняют порядок, обычный для модельных систем

$$Hg > Cu > Ni > Co > Fe > Mn \geqslant Zn.$$

Следовательно, аномалия каталитической способности вызывается не различием в связывании того или иного металла, но индивидуальными особенностями его физического состояния в активном центре фермента. Эти особенности выражаются и в химическом поведении. Галогены соединяются со свободным ионом Zn в последовательности $F^- > Cl^- > Br^- > J^-$. Присоединение галогена к Zn в карбоксипептидазе [139, 140], ингибирующее фермент, происходит в обратной последовательности $J^- > Br^- > Cl^- > F^-$, причем константа связывания иода в 1000 раз больше, чем константа связывания фтора свободным Zn. Анализ реакций с другими анионами показывает, что константа связывания определяется конформационным соответствием аниона и полости в молекуле белка в области атома Zn [138].

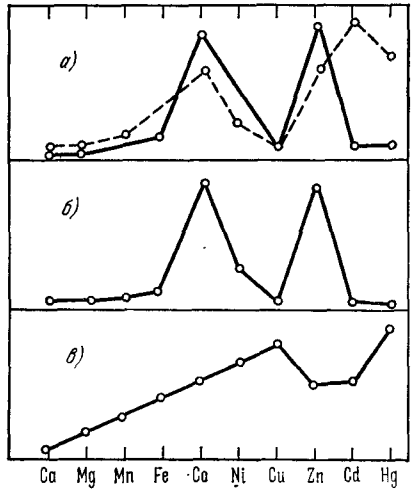


Рис. 6.29. Скорости реакций, катализируемых металлоферментами, и скорости реакций в модельной системе.

а) Карбоксипептидаза, действующая как пептидаза (сплошная линия); карбоксипептидаза, действующая как эстераза (пунктир); *б*) карбоангидраза; *в*) идеализированная модельная система.

Валли и Вильямс формулируют положение, полностью согласующееся со всем сказанным в предыдущих разделах: «Ферменты являются катализаторами не потому, что они содержат необычные химические группы, а скорее потому, что

специфическая трехмерная структура таких белков создает окружение, сообщающее группам необычные свойства» [138]. Необычны и спектральные свойства металлоферментов [141]. В табл. 6.5 приведены спектральные характеристики ферментов, содержащих медь, негеминовые железо и кобальт, и модельных комплексных соединений [141].

Об особенностях металлов в ферментах свидетельствуют и необычные параметры спектров ЭПР [141]. Эти данные указывают на своеобразие электронных оболочек металлов, фигурирующих в ферментах. Спектры цитохромов также заметно отличаются от спектров модельных соединений [142].

Изменение координационной сферы вследствие присоединения лиганда в ряде случаев превращает необычные спектры в спектры, характерные для симметричных комплексов.

Окислительно-восстановительные потенциалы металлоферментов также необычны. Например, потенциалы синих медных ферментов много выше, чем для всех медных комплексов, за исключением тех, в которых сильно нарушена тетрагональная симметрия (соответственно от $+0{,}3$ до $+0{,}4$ *в* по сравнению с $-0{,}5$ до $+0{,}2$ *в*). Значения этих необычных потенциалов особенно существенны в случае цитохромов, участвующих в переносе электронов.

Биологические функции металлоферментов связаны либо с переносом электрона, либо с гидролизом. Можно думать, что особое электронное состояние металла имеет непосредственное отношение к этим функциям. Валли и Вильямс предполагают что металлы в металлоферментах находятся в *энтатическом*, т. е. напряженном состоянии [138, 141]. В ферменте имеется область в состоянии, более близком к переходному состоянию мономолекулярной реакции, чем к обычному состоянию стабильной молекулы. Перенос электрона с участием комплексного иона требует геометрии связей, промежуточной между геометриями, свойственными двум разным валентным состояниям, т. е. активированный комплекс должен иметь искаженную симметрию. Обычно ионы Cu^{+} образуют тетраэдрические, а Cu^{++} — тетрагональные комплексы. В энтатическом состоянии структура комплекса должна быть промежуточной. По-видимому, именно такая структура присуща синим медным ферментам. С другой стороны, симметрия комплексов Fe^{2+} и Fe^{3+} одинакова (октаэдрическая), но длины связей различны. По-видимому, в цитохромах несколько увеличены длины связей для Fe^{3+}.

В связи с изложенным уместно вспомнить о работе Полинга [143], в которой впервые было высказано предположение о том, что фермент особенно сильно связывает субстрат, находящийся в переходном состоянии, в результате чего и понижается активационный барьер.

Таблица 6.5

Характеристики полос поглощения комплексов Cu (А), Fe (Б) и Co (В) и белков, содержащих эти металлы [1])

Вещество	λ, Å			Симметрия
А. 1. Простые Cu (II)-комплексы				
$[Cu(NH_3)_4]^{2+}$	6600 (~20)	6600 (~40)	7500 (~25)	Тетрагональная
Бис(3-фенил-2,4-пентандитионат)-Cu (II)	4900 (~50)	5200 (~25)	5800 (~50) 6500 (~50)	Ось второго порядка
$[Cu(H_2O)_2]^{2+}$	7000 (~5)	7900 (~10)	9500 (~5)	Тетрагональная
2. Комплексы белка с Cu				
Cu (II)-карбоангидраза	7600 широкая (120)			Неизвестная низкая симметрия
Cu (II)-альбумин плазмы	5700 широкая (90)			
3. «Инертные» Cu-белки				
Эритрокупреин	6500 широкая (280)			Неизвестная симметрия
Цереброкупреин	6500 широкая (400)			Возможно тетрагональная
4. «Активные» Cu-белки				
Пластоцианин	4600 (500)	5970 (4400)	7700 (1600)	Неизвестная низкая симметрия
Лакказа	4500 (970)	6080 (4000)	8500 (700)	
Синий белок из *Pseudomonas aeruginosa*	5000 (сл)	6250 (3000)	7250 (сл)	
Синий белок из *Pseudomonas dentrificans*	4500 (сл)	5940 (3000)	8000 (1000)	
Б. $[Fe(CN)_6]^{3-}$ / $[Fe(H_2O)_5OH]^{2+}$	Одна или две дискретные полосы			Октаэдрическая
Ферредоксин (шпинат)	3250 (5160)	5200 (5160)	4630 (4650) 5700 (плечо)	?
В. $[Co(H_2O)_6]^{2+}$	5100 (10)	1200 (2)		Октаэдрическая
$[CoCl_4]^{2-}$	6850 (700)	1700 (100)		Тетраэдрическая
Со-карбоангидраза	5100 (280)	5500 (380)	615 (300) 640 (280)	Нерегулярно тетраэдрическая или с координационным числом 5
Со-щелочная фосфатаза	5150 (265)	555 (350)	605 (180) 640 (230)	

[1]) В скобках при всех длинах волн указаны величины молярного поглощения в единицах *моль*$^{-1} \cdot$ *см*$^{-1}$.

Если металл участвует в переносе атома или группы атомов, то необходимо лигандное замещение. Активные промежуточные соединения в реакциях замещения простых хелатных соединений металлов предположительно имеют свободные координационные связи или искаженную координационную сферу. По-видимому, такие структуры фигурируют в Co(II)-карбоангидразе, карбоксипептидазе и фосфатазе до присоединения субстрата. Особая активность Co^{2+} и Zn^{2+} в этих ферментах определяется тем, что их комплексы деформируются легче, чем комплексы остальных металлов первого переходного ряда.

Эти особенности выражают напряжения, которым подвергается ион металла в результате многоточечного взаимодействия с аминокислотными остатками, определяемого конформационной структурой белка. Необычное расположение лигандов задает направленную геометрию комплекса. Напряжение создается совместно и металлом и лигандами. Взаимодействие металл — лиганд в металлоферментах сходно с взаимодействием активных групп Гис, Сер, Тир, — SH ряда ферментов с протонами, являющимися простейшими катионами.

В активной области металлофермента субстрат подвергается атаке сильно активированных групп, в результате чего понижается энергия активации процесса [144].

Концепция энтазиса, предложенная Валли и Вильямсом, полностью согласуется с представлениями об ЭКВ (см. стр. 408). Ион металла изменяет конформацию фермента, конформационное состояние фермента определяет электронное состояние иона. Валли и Вильямс рассматривают возникающую вследствие ЭКВ статическую картину, своего рода «дыбу» (см. стр. 401).

Из изложенного следует необходимость специального развития квантовой химии координационных соединений применительно к проблемам биофизики. В частности, теория поля лигандов (см. [145]) должна быть применена к системам с искаженной симметрией.

Особого рассмотрения требуют ферменты, активируемые металлами, и прежде всего АТФазы, активируемые ионами щелочных и щелочноземельных металлов. K, Na-активируемая АТФаза, подвергнутая также действию Ca^{++}, ответственна за явления активного транспорта в биологических мембранах. Ca, Mg-активируемая АТФаза определяет механохимические процессы в биологических сократительных системах, в частности в мышце. И в том и в другом случае расщепление АТФ, катализируемое АТФазой, служит источником необходимой энергии (дальнейшие подробности см. в [146]). Бионеорганическая химия, частью которой является химия металлсодержащих белков, становится сейчас очень актуальной областью науки.

Литература

1. *С. Бенсон*, Основы химической кинетики, «Мир», 1964.
2. *С. Глесстон, К. Лейдлер, Г. Эйринг*, Теория абсолютных скоростей реакций, ИЛ, 1948.
3. *М. В. Волькенштейн*, Строение и физические свойства молекул, Изд-во АН СССР, 1955.
4. *Л. Д. Ландау*, Собрание трудов, т. 1, «Наука», 1969, стр. 71, 81.
5. *Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц*, Квантовая механика, «Наука», 1964.
6. *C. Zener*, Proc. Roy. Soc. **A137**, 696 (1932).
7. *М. И. Темкин*, Приложение 1 в кн. Н. Н. Семенова «О некоторых проблемах химической кинетики и реакционной способности», Изд-во АН СССР, 1954.
8. *М. И. Темкин*, Acta physicochimica UdSSR **8**, 141 (1938).
9. *А. А. Баландин*, Современное состояние мультиплетной теории катализа, «Наука», 1968.
10. *Ж. Жермен*, Гетерогенный катализ, ИЛ, 1961.
11. *Ч. Уолтер*, Кинетика ферментативных реакций, «Мир», 1969.
12. *Ю. М. Романовский, Н. В. Степанова, Д. С. Чернавский*, Что такое математическая биофизика, «Просвещение», 1971.
13. *Н. Н. Боголюбов, Ю. А. Митропольский*, Асимптотические методы в теории нелиинейных колебаний, Физматгиз, 1958.
14. *В. А. Яковлев*, Кинетика ферментативного катализа, «Наука», 1965.
15. *М. Диксон, Э. Уэбб*, Ферменты, ИЛ, 1961.
16. *Л. Уэбб*, Ингибиторы ферментов и метаболизма, «Мир», 1966.
17. *H. Linewiver, D. Burke*, J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658 (1934).
18. *Д. Брей, К. Уайт*, Кинетика и термодинамика биохимических процессов, ИЛ, 1959.
19. *H. Gutfreund*, Disc. Faraday Soc. **20**, 167 (1955).
20. *R. Alberty, W. Miller, H. Fischer*, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 3973 (1957); J. Phys. Chem. **62**, 154 (1958).
21. *R. Lumry*, in «The Enzymes», vol. 1, Acad. Press, 1959, ch. 4.
22. *И. В. Березин, К. Мартинек*, ЖВХО им. Менделеева **16**, № 4, 411 (1971).
23. *Л. А. Блюменфельд*, Биофизика, **16**, 724 (1971).
24. *Я. С. Лебедев, Ю. Д. Цветков, В. В. Воеводский*, Кинетика и катализ **1**, 496 (1960).
25. *Г. И. Лихтенштейн*, Биофизика **11**, 23 (1966).
26. *R. Lumry, S. Rajender*, in «Water Solutions of Proteins and Small Molecules», Intersci. Publ., 1970.
27. *F. Vaslow, D. Doherty*, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 931 (1952).
28. *B. Belleau, J. Lavoie*, Canad. J. Biochem. **46**, 1397 (1968).
29. *В. Л. Кретович*, Введение в энзимологию, «Наука», 1967.
30. *Е. В. Горяченкова*, в сб. «Основы молекулярной биологии. Ферменты», «Наука», 1964, гл. 2.
31. *О. Л. Поляновский*, в сб. «Основы молекулярной биологии. Ферменты», «Наука», 1964, гл. 4.
32. *D. Nachmansohn*, Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity, Acad. Press, 1959.
33. *F. Westheimer*, in «The Enzymes», vol. 1, Acad. Press, 1959, ch. 6.
34. *А. Е. Браунштейн, М. Я. Карпейский, Р. М. Хомутов*, в сб. «Основы молекулярной биологии. Ферменты», «Наука», 1964, гл. 9.
35. *А. Е. Браунштейн*, в сб. «Актуальные вопросы современной биохимии», Медгиз, 1962.
36. *C. Blake* a. o., Proc. Roy. Soc. **B167**, 365, 378 (1967).
37. *C. Vernon*, Proc. Roy. Soc. **B167**, 389 (1967).
38. *N. Sharon*, Proc. Roy. Soc. **B167**, 402 (1967).

39. *T. Steitz, M. Ludwig, F. Quiocho, W. Lipcomb*, J. Biol. Chem. **242**, 4662 (1967).
40. *А. Е. Браунштейн, М. М. Шемякин*, Биохимия **18**, 393 (1953).
41. *А. Е. Браунштейн*, in «The Enzymes», vol. 2, Acad. Press, 1960, ch. 6.
42. *D. Metzler, M. Ikawa, E. Snell*, J. Amer. Chem. Soc. **26**, 648 (1954).
43. *E. Snell, W. Jenkins*, J. Cell. Compar. Physiol. **54**, 161 (1959).
44. *Э. Косовер*, Молекулярная биохимия, «Мир», 1964.
45. *D. Auld, T. Bruice*, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 2098 (1967).
46. *J. Thanassi, A. Butler, T. Bruice*, Biochemistry **4**, 1463 (1965).
47. *T. French, D. Auld, T. Bruice*, Biochemistry **4**, 77 (1965).
48. *T. Bruice, S. Benkovic*, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 418 (1964).
49. *В. И. Иванов, М. Я. Карпейский*, Adv. Enzymol. **32**, 21 (1969).
50. *Ю. М. Торчинский, Л. Т. Коренева*, Биохимия **28**, 1087 (1963).
51. *В. И. Иванов, Ю. Н. Бреусов, М. Я. Карпейский, О. Л. Поляновский*, Мол. биол. **1**, 588 (1967).
52. *А. А. Бочаров* и др., Biochem. Biophys. Res. Commun. **30**, 459 (1968).
53. *J. Gass, A. Meister*, Biochemistry **9**, 1380 (1970).
54. *С. Е. Бреслер*, Труды 5-го Международного биохим. конгресса. Симпозиум 5, Изд-во АН СССР, 1962.
55. *E. Smith* a. o., J. Biol. Chem. **240**, 253 (1965).
56. *J. Chevallier* a. o., Biochim. Biophys. Acta **92**, 521 (1964).
57. *А. Е. Браунштейн*, ЖВХО им. Менделеева **8**, № 1, 81 (1963).
58. *C. Swain, J. Brown*, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 2538 (1952).
59. *D. Koshland, K. Neet*, Ann. Rev. Biochem. **37**, 359 (1968).
60. *D. Koshland*, J. Theor. Biol. **2**, 85 (1962).
61. *D. Koshland*, Adv. Enzymol. **22**, 45 (1960).
62. *D. Koshland, D. Storm*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **66**, 445 (1970).
63. *F. Karush*, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2705 (1950).
64. *М. В. Волькенштейн*, Молекулы и жизнь, «Наука», 1965.
65. *А. Е. Браунштейн, М. Я. Карпейский*, ЖВХО им. Менделеева **16**, № 4, 362 (1971).
66. *F. Vaslow, D. Doherty*, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 928 (1953).
67. *А. А. Баландин*, ДАН СССР **114**, 1008 (1957); Биохимия **83**, 475 (1958).
68. *М. В. Волькенштейн*, Физика ферментов, «Наука», 1967.
69. *D. Koshland*, in «The Enzymes» vol. 1, Acad. Press, 1959, ch. 7.
70. *D. Koshland*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **44**, 98 (1958); Cold Spring Harbor Symposia **28**, 473 (1963).
71. *D. Koshland, J. Yankeelov, J. Thoma*, Fed. Proc. **21**, 1031 (1962).
72. *M. Burr, D. Koshland*, Proc. Nat. Acad. Sci, US **52**, 1017 (1964).
73. *D. Koshland, Y. Karkhanis, H. Latam*, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 1448 (1964).
74. *T. Bruice, A. Brawn, D. Harris*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **68**, 658 (1971).
75. *S. Grisolia, B. Joyce*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **1**, 280 (1959).
76. *G. Tomkins, K. Yielding, J. Curban*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **47**, 270 (1961).
77. *H. Schachman*, Brookhaven Symposia Theor. Biol. **17**, 91 (1964).
78. *M. Citri, N. Garber*, Biochem. Biophys. Res. Commun, **4**, 143 (1961).
79. *G. Ning Ling*, Biopolymers, Simposia **1**, 91 (1964).
80. *W. Jencks*, Ann. Rev. Biochem. **32**, 639 (1963).
81. *Д. Кошланд*, в сб. «Горизонты биохимии», «Мир», 1964.
82. *J. Wooton, G. Hess*, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 440 (1962).
83. *B. Laboesse, B. Havsteen, G. Hess*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **48**, 2137 (1962).
84. *G. Fasman, K. Norland, A. Pesce*, Biopolymers, Simposia **1**, 325 (1964).
85. *J. Yankeelov, D. Koshland*, J. Biol. Chem. **240**, 1593 (1965).
86. *Ю. М. Торчинский*, в сб. «Усп. биол. химии», т. 8, «Наука», 1967.
87. *И. А. Болотина, М. В. Волькенштейн, П. Заводский, Д. С. Маркович*, Биохимия **31**, 649, 873 (1966); Biochim. Biophys. Acta **132**, 260, 271 (1967); Мол. биол. **1**, 231 (1967).

88. *M. Perutz*, Europ. J. Biochem. 8, 455 (1969).
89. *G. Kartha, J. Bello, D. Harker*, Nature **213**, 862 (1967).
90. *H. Wykoff* a.o., J. Biol. Chem. **242**, 3984 (1967).
91. *J. Dreuth* a.o., Nature **218**, 929 (1968).
92. *B. Matthews, P. Sigler, R. Headerson, D. Blow*, Nature **214**, 652 (1967); J. Mol. Biol. **35**, 143 (1968).
93. *D. Blow, J. Birletoft, B. Hartley*, Nature **221**, 337 (1969).
94. *G. Reeke* a.o., Proc. Nat. Acad. Sci. US **58**, 2220 (1967).
95. *W. Lipscomb* a.o., Brookhaven Symposia Theor. Biol. **21**, 250 (1968).
96. *L. Michaelis, H. Davidsohn*, Biochem. Z. 35, 386 (1911).
97. *J. Kirkwood, J. Shumaker*, Proc. Nat. Acad. Sci, US **38**, 863 (1952).
98. *J. Kirkwood*, Disc. Faraday Soc. **20**, 78 (1955).
99. *W. Scheider*, Biophys. J. **5**, 617 (1965).
100. *J. Kirwood*, in «Symposium on the Mechanism of Enzyme Action», John's Hopkins Univ. Press, 1954.
101. *М. В. Волькенштейн, С. Н. Фишман*, Биофизика **11**, 956 (1966); **12**, 14 (1967).
102. *М. Жоли*, Физическая химия денатурации белков, «Мир», 1968.
103. *M. Eigen*, in «Fast Reactions and Primary Processes in Chemical Kinetics», Nobel Symposium 5, ed. S. Claesson, Interscі. Publ. 1967.
104. *K. Linderstrom-Lang, J. Schellmann*, in «The Enzymes», vol. I, Acad. Press, 1959, ch. 10.
105. *Ф. Штрауб, Г. Сабольчи*, в сб. «Молекулярная биология. Проблемы и перспективы», «Наука», 1964.
106. *K. Okunuki*, Adv. Enzymol. **23**, 29 (1961).
107. *G. Szabolcsi, E. Biszku*, Biochim. Biophys. Acta **48**, 335 (1961).
108. *N. Slater*, Theory of Unimolecular Reactions. Cornell Univ. Press, 1959.
109. *М. В. Волькенштейн*, в сб. «Молекулярная биология. Проблемы и перспективы», «Наука», 1964.
110. *Ю. И. Хургин, Д. С. Чернавский, С. Э. Шноль*, в сб. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», «Наука», 1967.
111. *М. В. Волькенштейн, Л. А. Грибов, М. А. Ельяшевич, Б. И. Степанов*, Колебания молекул, «Наука», 1972.
112. *M. Perutz*, Proc. Roy. Soc. **B167**, 448 (1967).
113. *Ю. Э. Кирш* и др., Высокомол. соед. **A12**, 186 (1970).
114. *Н. А. Венгерова, Ю. Э. Кирш, В. А. Кабанов, В. А. Каргин*, ДАН СССР **190**, 131 (1970).
115. *Ю. Э. Кирш* и др., ДАН СССР **191**, 603 (1970).
116. *В. А. Кабанов*, ЖВХО им. Менделеева **16**, № 4, 446 (1971).
117. *G. Scatchard*, J. Chem. Phys. **7**, 657 (1939).
118. *Э. Амис*, Влияние растворителя на скорость и механизм химических реакций, ИЛ, 1968.
119. *E. Caldin*, Fast reactions in solution, Oxford Univ. Press, 1964.
120. *R. Marcus*, J. Chem. Phys. **24**, 966 (1956); **26**, 867, 872 (1957); **43**, 697 (1965).
121. *В. Г. Левич*, в сб. «Итоги науки. Электрохимия 1965», изд. ВИНИТИ, 1967.
122. *Р. Р. Догонадзе, А. М. Кузнецов*, в сб. «Итоги науки. Электрохимия 1967», изд. ВИНИТИ, 1969.
123. *Р. Р. Догонадзе, А. М. Кузнецов, В. Г. Левич*, ДАН СССР **188**, 383 (1969).
124. *В. Г. Левич* и др., Electrochem. Acta **15**, 353 (1970).
125. *М. В. Волькенштейн* и др., Мол. биол. **6**, 431 (1972).
126. *М. В. Волькенштейн*, Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 805 (1971).
127. *Р. Ламри, Р. Билтонен*, в сб. «Структура и стабильность биологических макромолекул», «Мир», 1973.

128. *Р. Н. Маслова, Е. А. Лесник, Я. М. Варшавский*, Мол. биол. **3**, 728 (1969); FEBS Letters **3**, 211 (1969); Biochem. Biophys. Res. Commun. **34**, 260 (1969).
129. *М. В. Волькенштейн*, J. Theor. Biol. **34**, 193 (1972).
130. *G. Kemeny, I. Goklany*, J. Theor. Biol., **40**, 107 (1973); **48**, 23 (1974).
131. *D. Green*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **67**, 544 (1970).
132. *Н. Чернавская, Д. С. Чернавский, Л. Григоров*, Препринт, № 68, ФИАН, 1970.
133. *Л. А. Блюменфельд, В. Кольтовер*, Мол. биол. **6**, 161 (1972).
134. *Л. А. Блюменфельд*, Проблемы биологической физики, «Наука», 1974.
135. *В. И. Иванов* и др., Europ. J. Biochem. **40**, 519 (1973).
136. *J. Brönsted, K. Pedersen*, Z. Phys. Chem. **108**, 185 (1924).
137. *J. Prue*, J. Chem. Soc. 2331, 1952.
138. *B. Vallee, R. Williams*, Chem. in Britain **4**, 397 (1968).
139. *S. Lindskod*, J. Biol. Chem. **238**, 945 (1963).
140. *J. Coleman*, Nature **214**, 193 (1967).
141. *B. Vallee, R. Williams*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **59**, 498 (1968).
142. *R. Lemberg, A. Ehrenberg, R. Williams*, in «Hemes and Hemoproteins». Acad. Press, 1966.
143. *L. Pauling*, Chem. Eng. News **24**, 1375 (1946).
144. *T. Bruice, S. Benkovic*, Bioorganic Mechanisms, vol. 1, W. Benjamin Inc. 1966.
145. *К. Бальхаузен*, Введение в теорию поля лигандов, «Мир», 1964.
146. *В. З. Горкин*, в сб. «Основы молекулярной биологии. Ферменты», «Наука», 1964.
147. *М. В. Волькенштейн*, Pure and Applied Chemistry **36**, 9 (1973).
148. *А. М. Макаров, В. И. Иванов, М. В. Волькенштейн*, Мол. биол. **8**, 433 (1974).

КООПЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

§ 7.1. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА МИОГЛОБИНА И ГЕМОГЛОБИНА

В этой главе рассматриваются специфические свойства ферментов с *четвертичной структурой*, определяемые взаимодействием субъединиц в молекуле белка.

Миоглобин (Mb) и гемоглобин (Hb) — не ферменты. Их функция состоит в обратимом связывании молекулярного кислорода. Mb служит депо кислорода, запасая его для последующего потребления. Соответственно большие количества миоглобина содержатся в организмах китообразных, проводящих длительное время под водой. Hb — функциональный белок эритроцитов — переносит кислород от легких ко всем органам и тканям и участвует в обратном транспорте CO_2.

Исследование Mb и Hb дает, однако, информацию, весьма ценную для понимания действия ферментов, для понимания природы ЭКВ. Связывание O_2 и других лигандов этими белками вполне сходно со связыванием субстрата ферментом. Молекулярный кислород проникает в полость молекулы Mb или Hb, но в отличие от субстрата не подвергается химическому превращению. Принято говорить о миоглобине и гемоглобине как о «почетных ферментах» [1], моделирующих ряд их свойств.

Mb и Hb — белки, сравнительно легко получаемые в кристаллической форме, удобные объекты структурных исследований. Как уже говорилось, оба белка детально изучены методом рентгеноструктурного анализа с разрешением до 2,8 Å как в оксигенированной (MbO_2, HbO_8), так и в дезоксигенированной (Mb, Hb) формах (см. стр. 274). Наличие в этих белках простетической группы гема, обладающей специфическими электронными свойствами, позволяет эффективно пользоваться при изучении Mb и Hb методами спектроскопии, ЭПР, а также магнитной восприимчивостью, эффектом Мёссбауэра (см. стр. 423) и т. д.

Как уже сказано (см. стр. 231), молекула Hb состоит из четырех субъединиц, каждая из которых подобна, хотя и не тождественна, молекуле Mb. Соответственно Hb обладает кооперативными свойствами, определяемыми так называемым *гем-гем взаимодействием*. Напротив, Mb этих свойств лишен.

Присоединение O_2 и других лигандов к Mb и Hb происходит в группе гема. Лиганды насыщают шестую координационную валентность атома железа в геме. Образование этой химической связи вызывает ряд событий в молекуле белка.

Гем представляет собой ферропротопорфирин (см. рис. 2.15). Атом железа, находящийся в двухвалентном (Fe^{2+}), или ферросостоянии, координационно связан с четырьмя атомами азота пиррольных групп плоского порфиринового кольца. Пятая координационная связь, направленная перпендикулярно к плоскости кольца, соединяет атом Fe с имидазолом гистидила, шестая валентность либо свободна, либо занята лигандом.

Hb и Mb и в оксигенированной и в дезоксигенированной формах содержат феррогем. При окислении Hb и Mb образуются феррисоединения, содержащие трехвалентный (Fe^{3+}) атом железа.

Атом Fe, вообще говоря, парамагнитен. В табл. 7.1 приведены некоторые магнитные свойства Hb и его производных в различных состояниях.

Таблица 7.1

Магнитные свойства гемоглобина

Соединение	Валентность железа	Шестой лиганд	Магнитный момент, магнетоны Бора	Спин	Спектр ЭПР g-факторы [1])
Дезоксигемоглобин (Hb)	2+	Нет	5,2—5,5	2	Нет
Оксигемоглобин (HbO_8)	2+	O_2	0	0	Нет
Карбоксигемоглобин ($Hb(CO)_4$)	2+	CO	0	0	Нет
Ферригемоглобин	3+	H_2O	5,6—5,8	$^5/_2$	$g_\parallel=2, g_\perp=6$
Метгемоглобин	3+				
Кислый метгемоглобин	3+				
Гидроксиферригемоглобин	3+	OH^-	4,5—4,7	$^1/_2$, $^5/_2$	
Гидроксиметгемоглобин	3+				
Щелочной метгемоглобин	3+				
Фторид ферригемоглобина	3+		5,8—5,9	$^5/_2$	$g_\parallel=2, g_\perp=6$
Азид ферригемоглобина	3+		2,4—2,8	$^1/_2$	$g_x=1{,}72$, $g_y=2{,}22$, $g_z=2{,}80$
Цианид ферригемоглобина	3+		2,3—2,5	$^1/_2$	

[1]) $g_\parallel$ — компонента g — фактора в направлении оси z, перпендикулярной к плоскости порфиринового кольца xy, $g_\perp$ — компонента, лежащая в этой плоскости.

Мы видим, что феррогем может быть в высокоспиновом (Hb) и низкоспиновом (HbO_8, $Hb(CO)_4$) состояниях. Связывание лиганда ярко проявляется в спектре поглощения в видимой области (рис. 7.1). В табл. 7.2 приведены соответствующие данные.

Интерпретация магнитных и спектральных свойств гема основывается на квантовомеханическом анализе. Внешние электроны атома железа имеют конфигурацию $3d^6$ для Fe^{2+} и $3d^5$

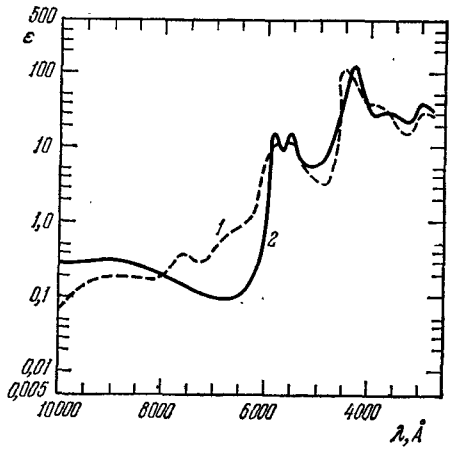


Рис. 7.1. Спектры поглощения Hb (*1*) и HbO_8 (*2*).

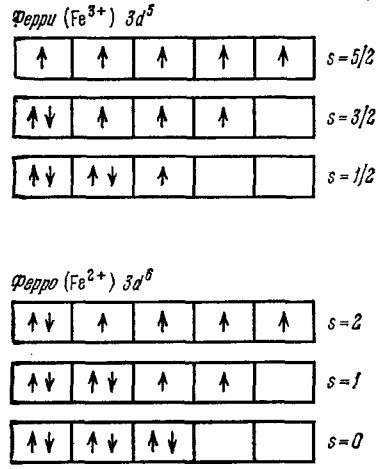


Рис. 7.2. Электронная структура Fe^{2+} и Fe^{3+}.

для Fe^{3+} (рис. 7.2). Теоретические расчеты основаны на теории поля лигандов [5]. В приближении молекулярных орбит лиганды рассматриваются на равных правах с центральным ионом, и МО системы представляются линейными комбинациями орбиталей Fe и лигандов. Соответствующие вычисления для железопорфириновых комплексов проводились рядом авторов [6—8]. Расчеты дали распределение электронной плотности и набор энергетических уровней, однако полученную интерпретацию спектра пока нельзя считать однозначной (дальнейшие подробности см. в [29]).

Актуальной задачей квантовой химии следует считать рассмотрение напряженного гема с пятью координационными связями в Hb и Mb (см. [131]).

Во всех природных соединениях железа в нем содержится 2,2% изотопа Fe^{57}. Это дает возможность изучать Hb и Mb методом спектроскопии Мёссбауэра (см. [10]). Образец подвергается действию пучка монохроматических γ-лучей, испускаемых радиоактивным Fe^{57} (получаемым из Co^{57}). Если сообщить

источнику небольшую скорость движения относительно поглотителя (т. е. исследуемого образца), то частота γ-кванта немного изменится вследствие эффекта Допплера. При некотором значении собственной частоты ядра Fe^{57} образца будут поглощать γ-кванты резонансно, переходя из основного в возбужденное состояние. Резонансная частота ядра Fe^{57} в геме весьма чувствительна к воздействию соседних атомов и групп. Это позволяет получать с помощью эффекта Мёссбауэра ценную информацию об электронной структуре гема в различных его состояниях в Hb и Mb (см. [2, 11]).

Таблица 7.2

Спектры поглощения некоторых гем-соединений [1])

	α-полоса		β-полоса		γ-полоса (полоса Соре)	
	λ, Å	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$	λ, Å	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$	λ, Å	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$
Гем	5650	6,1			3900	39,6
CO-гем	5620	14,6	5300	11,9	4065	147
Hb	5550	13,5			4300	119
HbO_8	5770	14,6	5420	13,8	4120	135
$Hb(CO)_4$	5690	13,4	5390	13,4	4190	191
Mb	5550	12,0			4350	114
MbO_2	5820	13,1	5440	12,7	4170	119
MbCO	5780	12,3	5410	14,1	4230	185

[1]) Данные для Hb и его пронзводных [3] относятся к гемоглобину человека, для миоглобина и его производных [4] — к Mb кашалота.

Известны первичные структуры гемоглобина и миоглобина ряда видов животных, а также многих мутантных гемоглобинов человека (см. § 2.5). Расшифровка строения Mb и Hb и выявление конформационных изменений, возникающих при их оксигенации, имеют принципиальное значение. Именно для этих белков проблема связи между строением и свойствами изучена сегодня наиболее подробно.

Кривая насыщения Mb молекулярным кислородом $Y(p)$, где p — парциальное давление кислорода, лишена особенностей и подобна изотерме Лэнгмюра:

$$Y = \frac{Kp}{1 + Kp}. \qquad (7,1)$$

Напротив, аналогичная кривая для Hb имеет S-образную форму и ее можно описать *уравнением Хилла* [12]

$$Y = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n}, \qquad (7,2)$$

где параметр $n \approx 2{,}8$. Обе кривые показаны на рис. 7.3 (ср. стр. 45).

Физиологический смысл S-образности кривой $Y(p)$ для Hb состоит в падении сродства гемоглобина к кислороду по мере отщепления его молекул. Изменения парциального давления O_2 в тканях должны быть невелики. Если бы для гемоглобина была характерна гиперболическая кривая $Y(p)$, подобная кривой $Y(p)$ для миоглобина, то лишь малая доля переносимого O_2 отщеплялась бы в тканях. В результате организм задыхался бы даже в атмосфере чистого кислорода. Эффективность дыхательного транспорта еще больше повышается 2,3-дифосфоглицератом (ДФГ) и вследствие эффекта Бора; первый фактор понижает сродство Hb к O_2, а второй увеличивает его.

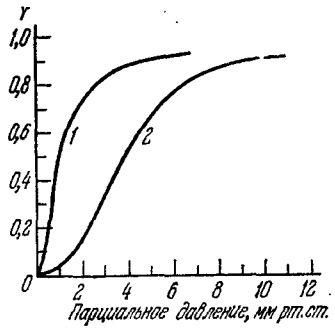


Рис. 7.3. Кривые насыщения молекулярным кислородом миоглобина *(1)* и гемоглобина *(2)*.

Эффект Бора, свойственный гемоглобину, но не миоглобину, состоит в том, что сродство Hb к O_2 зависит от pH среды. Оно минимально вблизи pH 6 и максимально вблизи pH 9. Иными словами, малые концентрации протонов облегчают присоединение O_2 и, наоборот, малые концентрации O_2 облегчают присоединение протонов. Повышая pH венозной крови и тем самым увеличивая ее способность поглощать бикарбонат, эффект Бора обеспечивает главный механизм обратного транспорта CO_2 из тканей к легким. Последующий механизм непосредственно зависит от взаимодействия Hb с CO_2. Зависимость сродства к O_2, выражаемого $\lg p_{1/2}$ ($p_{1/2}$ — парциальное давление, отвечающее полунасыщению Hb кислородом), от pH (т. е. эффект Бора), показана на рис. 7.4 [13].

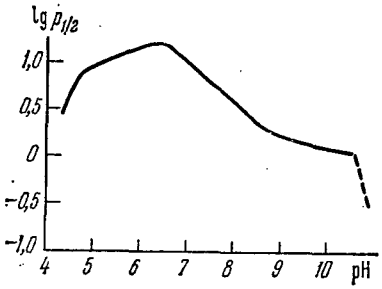


Рис. 7.4. Зависимость сродства Hb к O_2 от pH.

Отличие коэффициента n от 1 в уравнении Хилла и соответствующая S-образность кривой отражают гем-гем-взаимодействие, т. е. взаимосвязь четырех субъединиц и, следовательно, кооперативность присоединения O_2. Впервые эта проблема была рассмотрена Эдейром [14], предположившим, что связывание

лиганда происходит в четыре стадии

$$HbX_i + X \underset{k_{-(i+1)}}{\overset{k_{i+1}}{\rightleftarrows}} HbX_{i+1} \quad (i = 0, 1, 2, 3), \qquad (7,3)$$

причем каждая стадия характеризуется своей константой равновесия K_i.

Парциальное насыщение лигандом (X — его концентрация) описывается соотношением

$$\overline{Y} = \frac{K_1X + 2K_1K_2X^2 + 3K_1K_2K_3X^3 + 4K_1K_2K_3K_4X^4}{4(1 + K_1X + K_1K_2X^2 + K_1K_2K_3X^3 + K_1K_2K_3K_4X^4)}. \qquad (7,4)$$

Другие более совершенные варианты выражения для $\overline{Y}$ предложены Полингом [15], Уайманом [16], Рафтоном [17] Алленом, Гуте и Уайманом [18]. Гвидотти [19] учел при выводе выражения для $\overline{Y}$ влияние диссоциации Hb и HbO_8 на димеры. Опыт дает уравнение Хилла, которое может совпасть с выражением типа (7,4) при надлежащих значениях констант.

Подробные обзоры физических и химических свойств гемоглобина и миоглобина можно найти в [20, 23, 132]. Приведем здесь некоторые термодинамические их характеристики (табл. 7.3 [20] и 7.4 [21]).

Таблица 7.3

Равновесие миоглобина с O_2 (pH 7, 20 °C)

Источник Mb	$p_{1/2}$, *мм* Hg	K, 10^{-6} *моль*$^{-1}$	$\frac{\Delta \lg p_{1/2}}{\Delta \text{ pH}}$	ΔH, *ккал/моль*
Лошадь	0,65	0,85	0,09	—20,6
Человек	0,72	0,77	0,03	—13,1

Таблица 7.4

Равиовесие изолированных α- и β-цепей Hb и Hb с O_2, CO и этилизоцианидом (ЭИЦ) (pH 7, 20 °C)

	O_2		CO		ЭИЦ	
	K, 10^{-5} *моль*$^{-1}$	ΔF, *ккал/моль* O_2	K, 10^{-7} *моль*$^{-1}$	ΔF, *ккал/моль* CO	K, 10^{-4} *моль*$^{-1}$	ΔF, *ккал/моль* ЭИЦ
α-цепь	12	—8,2	30	—11,4	45	—7,65
β-цепь	14	—8,25	48	—11,7	42	—7,6
Hb	0,56	—6,4	1,4	—9,6	2	—5,8

Малость отношения $\Delta \lg p_{1/2}/\Delta$ pH свидетельствует об отсутствии эффекта Бора у Mb.

По оценкам Рафтона и др. [22] теплоты отдельных стадий реакций с O_2 (см. (7,3)) равны (Hb овцы) $\Delta H_1 = -15{,}7 \pm 0{,}8$, $\Delta H_2 = -11{,}4 \pm 2{,}5$, $\Delta H_3 = -7{,}8 \pm 3{,}3$ *ккал/моль*, $\Delta H_4 = -8{,}7 \pm 3{,}3$ *ккал/моль*. Для среднего значения имеем $\Delta H = {}^1/_4(\Delta H_1 + \Delta H_2 + \Delta H_3 + \Delta H_4) = -10{,}9 \pm 0{,}3$ *ккал/моль*.

События, происходящие в молекуле Hb при оксигенации, были раскрыты Перутцом в результате рентгенографического исследования [23] (см. также стр. 234). Молекула O_2 присоединяется к атому Fe гема. В оксигемоглобине атом железа расположен в плоскости порфиринового кольца, в его центре (с точностью до 0,05 Å). В высокоспиновом дезоксигемоглобине атом Fe отстоит от этой плоскости приблизительно на 0,8 Å в направлении имидазольного кольца Гис F 8. В таком состоянии координационное число Fe равно пяти. Оксигенация переводит Fe в низкоспиновое состояние и увеличивает число лигандов Fe на единицу. Эти изменения вызывают изменения контактов между порфириновым кольцом и плотно упакованными аминокислотными остатками глобина. Иными словами, в результате ЭКВ происходит перестройка белковых глобул.

С кольцом непосредственно контактируют 60 атомов глобина, находящихся на расстоянии ван-дер-ваальсовых контактов от кольца [24]. При введении даже наименьшего лиганда OH^-, имеющего радиус 1,5 Å, происходит конформационная перестройка в β-субъединицах дезоксигемоглобина. В этих субъединицах группа γ-CH_3 остатка Вал E 11 (67) оказывается на расстоянии 2,5 Å от OH^-, что меньше суммы ван-дер-ваальсовых радиусов. Следовательно, в β-глобулах Hb нет места даже для наименьшего лиганда и при оксигенации расстояние между кольцом и Вал E 11 (67) должно увеличиться примерно на 1 Å. Напротив, в α-субъединицах такого перемещения нет, так как ширина «кармана» достаточна для внедрения лигандов.

В оксигемоглобине С-концы всех четырех цепей имеют полную свободу вращения, а предпоследние остатки Тир — частичную свободу, в том смысле, что они проводят лишь малую долю времени в связанном положении между спиралями F и H. Напротив, в дезоксигемоглобине каждый из С-концов дважды закреплен солевыми мостиками: α-карбоксил остатка Арг H C 3(141)α_1 связан с α-NH_2-группой Вал A 1(1)α_2, а гуанидиновая группа Арг(141) — с Асп H 9(126)α_2; α-карбоксил Гис H C 3(146)β_1 с ε-NH_2-группой Лиз C 5(40)α_2, а его имидазол — с Асп F G 1(94)β_1. Все четыре предпоследних Тир жестко закреплены в полостях между спиралями F и H ван-дер-ваальсовыми и водородными связями. Оксигенация Hb вызывает перемещение спирали F и разрыв солевых мостиков, вследствие

чего Тир H C 2(140) выводится из «кармана» между спиралями F и H. При оксигенации ширина «карманов» для Тир H C 2 уменьшается на 1,3 Å в α-цепях и на 2 Å в β-цепях. Эта перестройка схематически показана на рис. 7.5. Сказанное подтверждается данными, полученными при соответствующей химической модификации белка. Роль этих событий в гем-гем-взаимодействиях определяется прежде всего разрывом солевых мостиков между субъединицами.

Перестройки в отдельных глобулах и разрывы солевых мостиков изменяют четвертичную структуру. В контактах $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$ происходят сдвиги на 1 Å, в $\alpha_1\beta_2$ и $\alpha_2\beta_1$ — на 7 Å! Роль

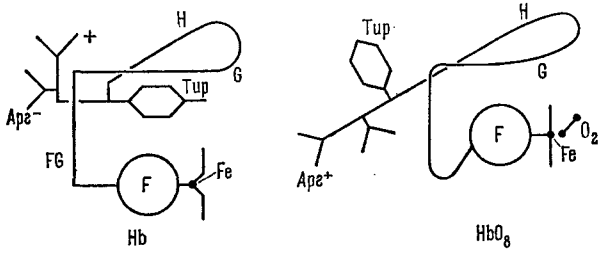


Рис. 7.5. Схема перемещения Тир H C 2 (140) при оксигенации.

последних контактов для взаимодействий гем — гем особенно велика. Следует подчеркнуть, что почти все остатки в контакте $\alpha_1\beta_2$ инварианты для любых позвоночных животных; напротив, среди остатков, образующих контакт $\alpha_1\beta_1$, наблюдаются большие вариации. Мутантные замещения в контакте $\alpha_1\beta_2$ заметно уменьшают гем-гем-взаимодействие.

В контакте $\alpha_1\beta_2$ CD-область одной цепи входит в FG-область другой. При дезоксигенации это плотное сочленение нарушается. В оксигемоглобине выступ, образуемый боковой цепью Тре C 3(38)α, входит в выемку цепи Вал FG 5(98)β. В дезоксигемоглобине эта выемка занята боковой цепью Тре C 6(41)α, т. е. цепью, выступающей из следующего поворота спирали C. В то же время водородная связь, соединяющая Асп G 1(94)α с Асн G 4(102)β в оксигемоглобине заменяется водородной связью между Тир C 7(42)α и Асп G 1(99)β.

Таким образом, при оксигенации гемоглобина происходит ряд последовательных конформационных событий. Триггером этих событий служит перемещение атома Fe в плоскость порфиринового кольца и соответствующая передвижка проксимального Гис кольца на 0,75—0,95 Å. Это вызывает изменение третичной структуры, так как атом железа жестко связан с Гис F 8 и кольцо контактирует с 60 атомами глобина. Спираль F перемещается к центру молекулы и выталкивает Тир H C 2(140) из

полости между спиралями F и H. Вытолкнутый Тир тянет за собой Арг H C 3(141) и разрывает поэтому солевые мостики с противолежащей α-целью. Ситуация в β-цепях иная. Прежде чем лиганд достигнет атома Fe, он должен «открыть» полость вблизи гема. Затем в результате образования связи с лигандом атом железа перемещается в плоскость кольца, спираль F сдвигается к центру молекулы и выталкивает Тир H C 2(145) из его полости. Этот остаток тянет за собой Гис H C 3(146) и разрывает солевой мостик с Асп F G 1(94).

Перутц установил, что структура дезоксигемоглобина стабилизована кофактором 2,3-дифосфоглицератом (ДФГ), образующим дополнительные солевые мостики между β-цепями. При оксигенации ДФГ удаляется из молекулы.

Какова же последовательность событий во всей четырехцепочечной молекуле Hb? Перутц выдвигает хорошо аргументированную гипотезу, согласно которой присоединение O_2 к каждой из субъединиц переводит ее в окси-конформацию, но четвертичная структура остается дезокси-структурой пока не присоединены две молекулы O_2. Иными словами, каждая субъединица может принимать одну из двух альтернативных конформаций, а четвертичная структура может быть «ошибочной». Оксигенация предположительно начинается с α-цепей, так как в них, в отличие от β-цепей, имеется достаточно места для внедрения лиганда. Общая схема процесса такова (O — оксиформа, D — дезоксиформа):

$$(\alpha_1^D\alpha_2^D\beta_1^D\beta_2^D)^D \rightarrow (\alpha_1^O\alpha_2^D\beta_1^D\beta_2^D)^D \rightarrow (\alpha_1^O\alpha_2^O\beta_1^D\beta_2^D)^D \underset{\text{ДФГ}}{\rightarrow}$$

$$\rightarrow (\alpha_1^O\alpha_2^O\beta_1^D\beta_2^D)^O \rightarrow (\alpha_1^O\alpha_2^O\beta_1^O\beta_2^D)^O \rightarrow (\alpha_1^O\alpha_2^O\beta_1^O\beta_2^O)^O.$$

Наглядное изображение этой схемы дано на рис. 7.6. Сущность механизма сводится к тому, что вследствие специфической конструкции группа гема усиливает малое изменение атомного радиуса, испытываемое Fe при переходе от высокоспинового к низкоспиновому состоянию, и трансформирует это малое изменение в большое смещение Гис, связанного с гемом. Затем происходят уже описанные события.

Энергия взаимодействия субъединиц составляет примерно 12 *ккал/моль*, что хорошо согласуется с энергией шести солевых мостиков, образующих контакты $\alpha_1\alpha_2$, $\alpha_1\beta_2$ и $\alpha_2\beta_1$. Действительно, ферментативное отделение четырех С-концевых остатков лишает стабильности четвертичную структуру дезоксигемоглобина и ингибирует гем-гем взаимодействие. Энергия одного солевого мостика равна 1—2 *ккал/моль*.

Дезоксигемоглобин практически всегда тетрамереи, его расщепление на димеры может произойти лишь при очень низких

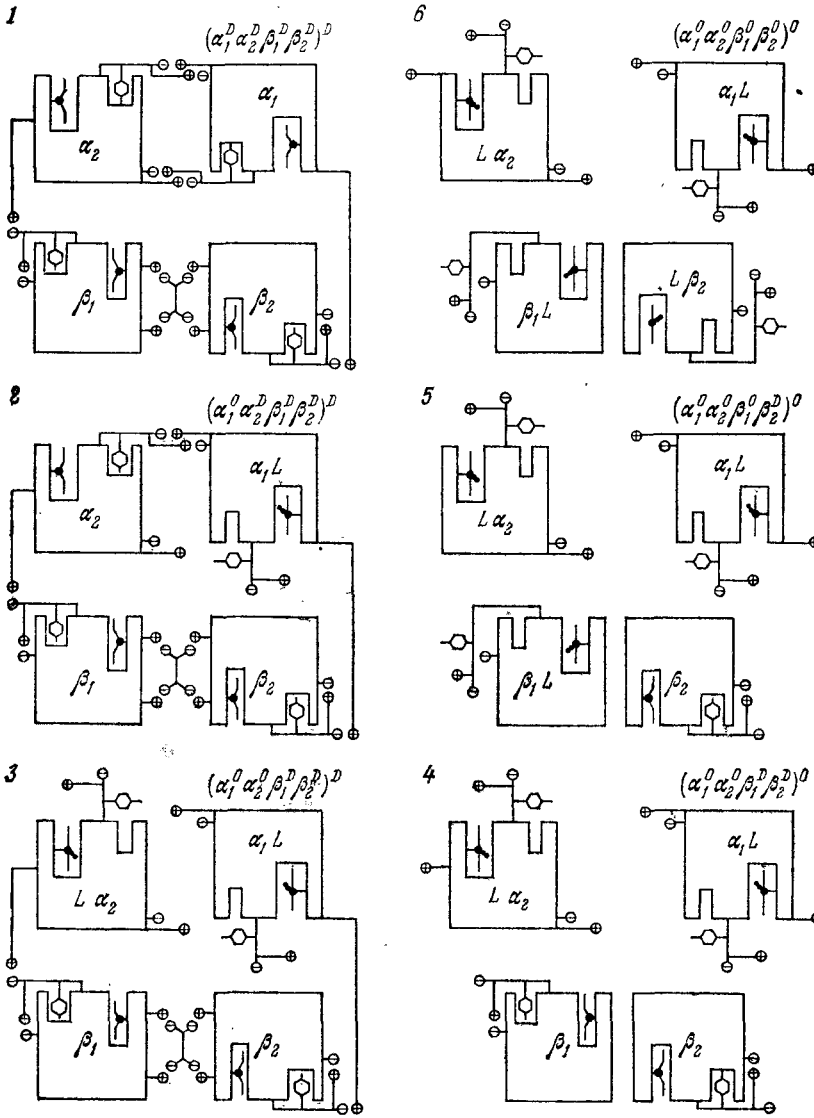


Рис. 7.6. Схема оксигенации гемоглобина по Перутцу.

1. Hb с интактными солевыми мостиками и с одной молекулой ДФГ, «зажатой» между двумя β-цепями. *2*. HbO_2. *3*. HbO_4. На стадиях *1—2* и *2—3* оксигенируются α-цепи. *4*. HbO_4 с измененной конформацией; на стадии *3—4* происходит конформационное превращение. *5*. HbO_6. *6*. HbO_8.

концентрациях. При этом должны разорваться солевые мостики и четвертичная структура примет форму, соответствующую оксигемоглобину. Все кооперативные эффекты, наблюдаемые при связывании лигандов, определяются тетрамерной дезокси-структурой. Впрочем, выдвинута и другая модель, согласно которой основной функциональной единицей, определяющей кооперативные свойства, служит димер [21]. В результате исследований

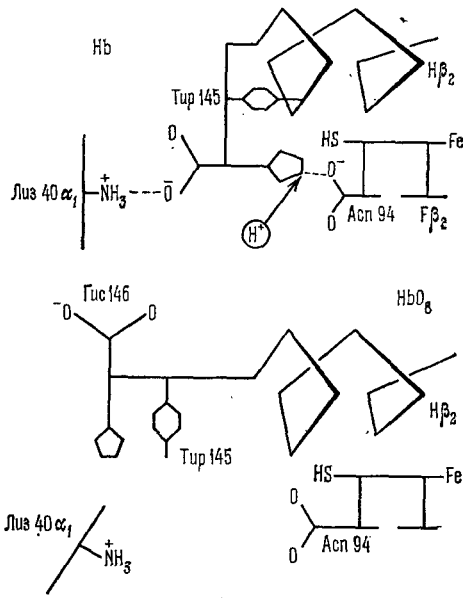


Рис. 7.7. Схема конформационных изменений в β_2-цепи гемоглобина при оксигенации.

Перутца эффект Бора (см. стр. 425) получил молекулярное истолкование. Изменение структуры при переходах окси-Hb $\rightleftarrows$ дезокси-Hb изменяет окружение трех пар слабых оснований таким образом, что они стремятся присоединять протоны при отщеплении O_2. В оксигемоглобине α-NH_2-группы Вал 1α и имидазолы Гис 146β свободны, но в дезоксиформе они сближаются с карбоксильными группами. Имидазол Гис 122α сближается с гуанидином в оксигемоглобине, но с карбоксилом в дезоксигемоглобине. При дезоксигенации α_1-цепь поворачивается относительно β_2-цепи на 13,5°. Группа ε-NH_2 Лиз С 5(40)α_1 смещается на 7 Å в область контакта $\alpha_1\beta_2$ и образует солевой мостик с С-конце-

вым карбоксилом β_2. Солевой мостик фиксирует Тир 145 β_2 в полости между F β_2 и H β_2 и дает возможность образоваться мостику между имидазолом Гис 146 β_2 и карбоксилом Асп 94 β_2. Это показано схематически на рис. 7.7. Гис 146 β_2 участвует в эффекте Бора вследствие изменения pK имидазола, вызванного изменением окружения.

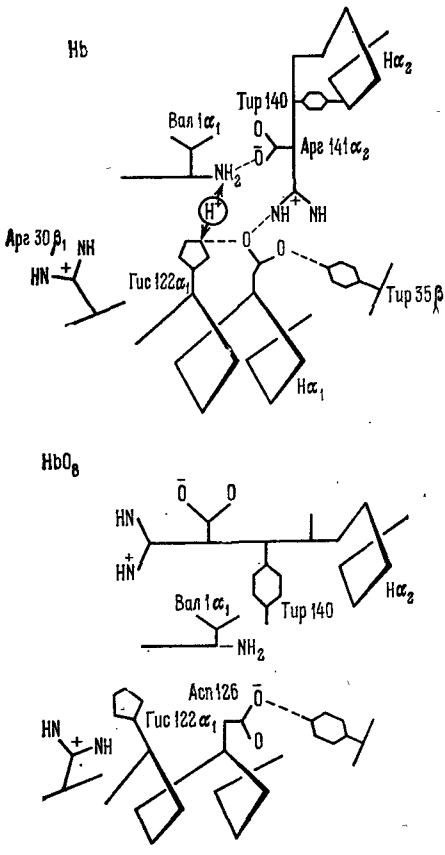


Рис. 7.8. Схема конформационных изменений в α-цепях гемоглобина при оксигенации.

pK α-NH_2-групп Вал 1α имеют нормальные значения в оксигемоглобине, но возрастают в дезоксиформе вследствие связывания с α-карбоксилами другой α-цепи. В эффекте Бора участвуют также С-концевые Арг каждой α-цепи, образующие в дезоксигемоглобине два мостика с другой α-цепью (рис. 7.8).

Дальнейшие подробности можно найти в оригинальной статье Перутца [23], в которой рассмотрен также кислотный эффект Бора. Обсуждая эти конформационные явления, Перутц справедливо указывает, что белок — динамическая система. И третичная, и четвертичная структуры гемоглобина быстро и непрерывно осциллируют между окси- и дезокси-конформациями. В присутствии лиганда происходит не выключение дезокси-конформации, но сдвиг конформационного равновесия [23].

Рассмотренные Перутцом явления ярко выражают ЭКВ (см. стр. 408). Сдвиг электронной плотности в геме вызывает конформационную перестройку глобулы.

Атанасов изучал конформационные свойства миоглобина с помощью ряда физических методов. Он установил наличие конформеров у Mb и получил результаты, в целом согласующиеся с описанной моделью [25, 26] (см. также [27]).

Для физического понимания взаимодействия гем — гем и связанных с ним событий, наряду с молекулярной картиной явления, необходимо общее феноменологическое рассмотрение. Оно проводится с помощью теории связанных функций, развитой Уайманом (см. ниже), и общей теории кооперативного кинетического поведения белков (см. § 7.5).

§ 7.2. ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ РАВНОВЕСНЫХ СВОЙСТВ ГЕМОГЛОБИНА

Рассмотрим теорию связанных функций Уаймана [28]. Допустим, что макромолекула M имеет q центров, способных связывать лиганд X. Общая концентрация связанного лиганда равна

$$X = M_0 \sum_{i=0}^{q} iK_i x^i, \tag{7,5}$$

где M_0 — концентрация свободных макромолекул, x — активность лиганда и K_i — кажущаяся макроскопическая константа равновесия i-й реакции

$$M + iX \rightleftarrows MX_i.$$

Очевидно, что $K_0 = 1$. Полная концентрация макромолекул во всех их формах равна

$$M = M_0 \sum_{i=0}^{q} K_i x^i. \tag{7,6}$$

Количество лиганда, связанного молем макромолекул M, равно

$$\overline{X} = X/M = \sum_i iKx^i / \sum_i K_i x^i = \frac{d \ln \sum_i K_i x^i}{d \ln x}. \tag{7,7}$$

Если связываются два различных лиганда, причем в молекуле имеется r центров для лиганда Y, то

$$M = M_0 \sum_{i=0}^{q} \sum_{j=0}^{r} K_{ij} x^i y^j, \tag{7,8}$$

где K_{ij} — константа равновесия для реакции

$$M + iX + jY \rightleftarrows MX_iY_j.$$

Функции насыщения равны

$$\overline{X} = \frac{\partial \ln \sum \sum K_{ij} x^i y^j}{\partial \ln x}, \quad \overline{Y} = \frac{\partial \ln \sum \sum K_{ij} x^i y^j}{\partial \ln y}. \tag{7,9}$$

Отсюда следует основное уравнение Уаймана, связывающее функции $\bar{X}$ и $\bar{Y}$,

$$\left(\frac{\partial \ln \bar{X}}{\partial \ln y}\right)_x = \left(\frac{\partial \ln \bar{Y}}{\partial \ln x}\right)_y. \tag{7,10}$$

Если число лигандов равно n, то понадобится $n(n-1)/2$ таких уравнений. Напишем далее

$$d\bar{X} = \left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln x}\right)_y d\ln x + \left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln y}\right)_x d\ln y, \tag{7,11}$$

$$d\bar{Y} = \left(\frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x}\right)_y d\ln x + \left(\frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln y}\right)_x d\ln y. \tag{7,12}$$

Из последних трех уравнений следует ряд дифференциальных соотношений, в частности

$$\left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \bar{Y}}\right)_x = -\left(\frac{\partial \ln y}{\partial \ln x}\right)_{\bar{Y}}, \tag{7,13}$$

$$\left(\frac{\partial \ln x}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{X}} = \left(\frac{\partial \ln y}{\partial \bar{X}}\right)_{\bar{Y}}. \tag{7,14}$$

Этот формализм был развит Уайманом также применительно к системам, содержащим различные типы макромолекул, и к системам, в которых макромолекулы полимеризуются или участвуют в химических реакциях. При этом выясняется влияние лигандов на соответствующие константы равновесия. Здесь мы ограничимся случаем одного вида макромолекул и двух видов лигандов.

Для равновесной системы при постоянных температурах и давлении термодинамика дает

$$\left(\frac{\partial \mu_1}{\partial n_2}\right)_{n_1} = \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial n_1}\right)_{n_2}, \tag{7,15}$$

где μ_1, μ_2 — химические потенциалы, n_1, n_2 — количества лигандов. С учетом равенств $d\mu_1 = RTd\ln x$, $d\mu_2 = RTd\ln y$ и при замене n_1, n_2 на $\bar{X}$ и $\bar{Y}$ мы вновь получаем основное уравнение (7,10).

Уравнения (7,5) или (7,7) описывают равновесие между макромолекулой и лигандом в терминах q констант равновесия K_i. Мы можем написать выражение для разности химических потенциалов лиганда в равновесии с макромолекулой и в стандартном состоянии в виде

$$\mu_X - \mu_0 = RT\ln x = -RT\ln K_X = \Delta F_X, \tag{7,16}$$

где ΔF_X — изменение свободной энергии при взаимодействии с макромолекулой. Если

$$\left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln x}\right) > q,$$

то взаимодействие является положительным, или стабилизующим.

Удобно представить кривую равновесия лиганда не величиной $\bar{X}$ или величиной парциального насыщения $\bar{x} \equiv \bar{X}/q$, но в виде зависимости $\ln[\bar{x}/(1-\bar{x})]$ от $\ln x$ и ввести параметр n, определяемый следующим образом

$$n \equiv \frac{d\ln(\bar{x}/(1-\bar{x}))}{d\ln x} = \frac{1}{\bar{x}(1-\bar{x})}\frac{d\bar{x}}{d\ln x}. \qquad (7,17)$$

Если все центры идентичны и независимы друг от друга, то график имеет вид прямой с $n = 1$, как и следует из простого закона действия масс. При наличии сильных стабилизующих взаимодействий $n > 1$ и график прямолинеен в широкой области с центром $x = {}^1/_2$. Это соответствует уравнению Хилла (7,2), которое можно переписать в виде

$$\bar{x} = \frac{Kx^n}{1+Kx^n} \quad \text{или} \quad \ln\frac{\bar{x}}{1-\bar{x}} = \ln K + n\ln x.$$

Поэтому Уайман называет график зависимости $\ln[\bar{x}/(1-x)]$ от $\ln x$ графиком Хилла. Параметр Хилла n связан со средней свободной энергией взаимодействия центров. Из (7,16) и (7,17) следует, что

$$\frac{d\,\Delta F_X}{d\bar{x}} = RT\frac{d\ln x}{d\bar{x}} = \frac{RT}{n\bar{x}(1-\bar{x})} \equiv \Delta F'_X. \qquad (7,18)$$

Если центры идентичны и независимы, $n = 1$. Для этого случая парциальные свободные энергии при связывании первого и второго лигандов X одинаковы $\Delta F'_X = \Delta F'^{(1)}_X$. Разность $\Delta F'_X - \Delta F'^{(1)}_X \equiv \equiv \Delta F_{XX}$ есть энергия стабилизации системы, приходящаяся на центр. Считая ее положительной при $n > 1$, получаем

$$\Delta F_{XX} = \frac{RT}{\bar{x}(1-\bar{x})}\left(1-\frac{1}{n}\right). \qquad (7,19)$$

n не может быть больше q — общего числа центров. В случае независимых, но не идентичных центров $n < 1$.

Интеграл

$$\int_0^1 \Delta F_{XX}\,d\bar{x} = RT\int_{x=0}^{\infty}(n-1)\,d\ln x \qquad (7,20)$$

выражает минимальное значение полной энергии взаимодействия, приходящейся на центр, при насыщении макромолекулы лигандом. Интеграл не обращается в бесконечность, если n стремится к 1, когда x стремится к 0 или ∞, т. е. когда $\bar{x}$ стремится к 0 или 1.

Применим, вслед за Уайманом, этот метод исследования к гемоглобину. На рис. 7.9 приведен график Хилла для насыщения Hb лошади кислородом (0,6 *М* фосфатный буфер, pH 7,0, 19 °C). Полная свободная энергия взаимодействия 2,6 *ккал/моль*, $n = 2{,}95 \pm 0{,}05$ при $\bar{Y} = 1/2$.

Гемоглобин может связывать O_2 и CO. При насыщении коэффициент распределения A не зависит от парциального давления обоих газов (первый закон Холдейна)

$$\frac{\text{Hb}(\text{CO})_4}{\text{Hb}(\text{O}_2)_4} = A\,\frac{p\text{CO}}{p\text{O}_2}. \qquad (7{,}21)$$

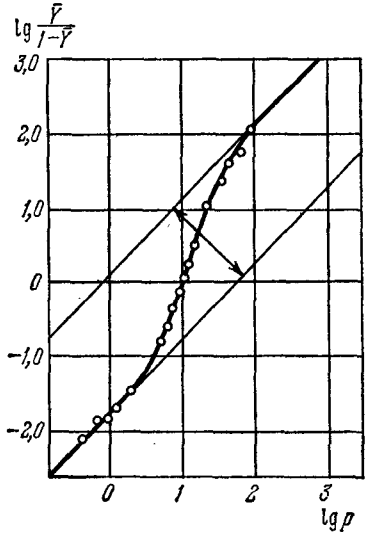


Рис. 7.9. График Хилла для насыщения гемоглобина лошади кислородом.

Согласно второму закону Холдейна насыщение при взаимодействии со смесью O_2 и CO есть функция $pO_2 + ApCO$. Второй закон следует из первого. Пусть $X = O_2$, $Y = CO$. Введем обозначения $\sigma_x = \bar{X}/x$ и $\sigma_y = \bar{Y}/Ay$. Согласно (7.21) $\sigma_x = \sigma_y = \sigma$. Уравнение связи (7.13) дает

$$\left(\frac{\partial\sigma}{\partial x}\right)_y = \left(\frac{\partial\sigma}{\partial Ay}\right)_x. \qquad (7{,}22)$$

Интеграл этого уравнения есть функция $x + Ay$

$$\sigma = \varphi(x + Ay).$$

Для полного насыщения имеем

$$\bar{X} + \bar{Y} = (x + Ay)\,\sigma = f(x + Ay). \qquad (7{,}23)$$

И наоборот, первый закон следует из второго.

Уравнения связи хорошо описывают эффект Бора. Здесь мы имеем дело вновь с двумя лигандами O_2 и H^+. Уравнение (7,13) дает ($\bar{H}^+$ и $\bar{Y}$ — количества связанных H^+ и O_2 на гем-эквивалент, α_H — активность протонов, p — парциальное давление O_2)

$$\left(\frac{\partial\bar{H}^+}{\partial\bar{Y}}\right)_{\alpha_H} = -\left(\frac{\partial \ln p}{\partial \ln \alpha_H}\right)_{\bar{Y}}, \qquad (7{,}24)$$

и уравнение (7,14) —

$$\left(\frac{\partial \ln \alpha_H}{\partial\bar{Y}}\right)_{\bar{H}^+} = \left(\frac{\partial \ln p}{\partial\bar{H}^+}\right)_{\bar{Y}}. \qquad (7.25)$$

Допустим, что протоны вводятся в систему с анионом A^- сильной кислоты, и пусть ее активность равна α и количество,

отнесенное к количеству гема, $\bar{c}$. Если отождествить H^+ с $\bar{c}$, то (7,25) примет вид

$$\left(\frac{\partial \ln \alpha}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}} = \left(\frac{\partial \ln p}{\partial \bar{c}}\right)_{\bar{Y}}. \qquad (7,26)$$

Введем соотношение

$$\alpha = \alpha_H \alpha_A = \alpha_H \gamma_A \bar{c},$$

где α_A — активность аниона, γ_A — доля аниона, оставшегося в растворе. Тогда уравнение (7,26) запишется следующим образом:

$$\left(\frac{\partial \ln \alpha_H}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_A}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}} = \left(\frac{\partial \ln p}{\partial \bar{c}}\right)_{\bar{Y}}, \qquad (7,27)$$

или

$$\left(\frac{\partial \bar{c}}{\partial \bar{Y}}\right)_{\alpha_H} = -\left(\frac{\partial \ln p}{\partial \ln \alpha_H}\right)_{\bar{Y}} + \left(\frac{\partial \ln \gamma_A}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}} \left(\frac{\partial \bar{c}}{\partial \ln \alpha_H}\right)_{\bar{Y}}. \qquad (7,28)$$

Последний сомножитель в правой части (7,28) дает наклон кривой титрования гемоглобина при степени оксигенации $\bar{Y}$. Последние два уравнения совпадают с (7,24) и (7,25), если γ_A не меняется при изменении $\bar{Y}$, т. е. если доля связанного аниона не зависит от степени оксигенации. Опыт показывает, что действительно нет расхождения между эффектом Бора, измеренным как изменение сродства к O_2 при изменении pH, с одной стороны, и освобождением протонов при оксигенации, с другой. Опыт дает

$$\left(\frac{\partial \bar{c}}{\partial \text{pH}}\right)_{\bar{Y}} = 3; \quad \left|\left(\frac{\partial \lg p}{\partial \text{pH}}\right)_{\bar{Y}}\right| = 0{,}6; \quad \left|\left(\frac{\partial \lg \gamma_A}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{c}}\right| < 0{,}01.$$

Метод связанных функций устанавливает общий термодинамический смысл кооперативности поведения Hb, конкурентных взаимодействий лигандов и эффекта Бора.

Уайман обобщил свою теорию, введя так называемый связывающий потенциал Λ [29], соответствующий любому термодинамическому потенциалу. Пусть F — любая непрерывная функция p переменных n_i, причем непрерывны и ее первая и вторая производные. Имеем

$$\mu_i = \frac{\partial F}{\partial n_i}, \quad i = 1, 2, \ldots, p. \qquad (7,29)$$

Связывающий потенциал определяется соотношениями

$$n_i = \frac{\partial \Lambda}{\partial \mu_i}. \qquad (7,30)$$

Например, если $F = n_1 n_2 + n_2^3$, то $\mu_1 = n_2$, $\mu_2 = n_1 + 3n_2^2$ или

$n_1 = \mu_2 - 3\mu_1^2$. Соответственно $\Lambda = \mu_1\mu_2 - \mu_1^3$, что не совпадает с $F = \mu_1\mu_2 - 2\mu_1^3$. Общее выражение для связывающего потенциала имеет вид

$$\Lambda = \Lambda_\mu + \sum_{i=1}^{p} \Lambda_{\bar{\mu}_i}, \qquad (7,31)$$

где Λ_μ — функция всех μ, а $\Lambda_{\bar{\mu}_i}$ — функция всех μ, кроме μ_i. Это выражение показывает, что присоединение любой компоненты системы связано с присоединением другой ее компоненты. Таким образом, компоненты образуют *группу связывания*. Если одна из компонент — полифункциональная макромолекула, то ее способность связывать каждый из лигандов мы вправе называть *функцией связывания*. Можно также говорить не о связывании компонент, но о связывании функций и пользоваться термином *связанные функции*.

Если речь идет об одном лиганде, присоединяемом макромолекулой, то потенциал Λ можно представить в виде

$$\Lambda = RT \ln (1 + K_1 x + K_2 x^2 + \ldots + K_q x^q), \qquad (7,32)$$

где x — активность лиганда X, K_i — константы, q — число связывающих центров. Этот полином факторизуется, т. е.

$$\Lambda = RT \ln (1 + k_1 x)(1 + k_2 x) \ldots (1 + k_q x), \qquad (7,33)$$

если все q центров независимы друг от друга. Считая, что на каждый гем в Hb приходится два кислотных центра, ответственных за эффект Бора и ионизующихся независимо друг от друга, получим полином для Hb. Он должен выражаться произведением двух полиномов — одного четвертой степени по p (активность O_2) и восьмой по H^+ (активность H^+) и другого степени $(q - 8)$ по H^+, где q — общее число ионизуемых групп в молекуле. Первый из этих полиномов должен иметь вид

$$N_1 = (1 + \alpha_0 H^+)^4 (1 + \beta_0 H^+)^4 + (1 + \alpha_0 H^+)^3 (1 + \beta_0 H^+)^3 (1 + \alpha_1 H^+) \times$$
$$\times (1 + \beta_1 H^+) K_1 p + \ldots + (1 + \alpha_1 H^+)^4 (1 + \beta_1 H)^4 K_4 p^4. \qquad (7,34)$$

Здесь $1/\alpha_0$ и $1/\beta_0$ — константы ионизации двух центров для дезоксиформы, $1/\alpha_1$ и $1/\beta_1$ — то же для оксиформы, K_i — константы равновесия последовательных стадий реакции при $H^+ = 0$. При $p \to 0$, т. е. в дезокси-Hb, нужно учитывать лишь первый член, при больших p — только последний. Это дает основу для оценки констант взаимодействия групп, связанных с кислородом. Если бы степени ионизации каждой пары таких групп были не независимы, то вместо $(1 + \alpha_0 H^+)(1 + \beta_0 H^+)$ и $(1 + \alpha_1 H^+)(1 + \beta_1 H^+)$ фигурировали бы сомножители типа $(1 + \alpha' H^+ + \beta' H^{+2})$. Характеристики кривых титрования Hb и $Hb(O_2)_4$ показывают, что вто-

рой полином N_2 степени $(q-8)$ по H^+ полностью факторизуется.

Дальнейшее развитие теории применительно к белкам, содержащим очень большое число связывающих центров (эритрокруорины), приведено в работе [30].

§ 7.3. ЭФФЕКТ ФАРАДЕЯ

В 1846 г. Фарадей открыл, что при прохождении поляризованного света вдоль направления магнитного поля через вещество, в нем находящееся, плоскость поляризации световой волны поворачивается на угол, пропорциональный толщине слоя вещества l и напряженности магнитного поля H

$$\varphi = VlH, \tag{7,35}$$

где V — константа магнитного вращения (*постоянная Верде*). Фарадей писал: «...в конце концов мне удалось намагнитить и наэлектризовать луч света и осветить магнитную силовую линию» [31]. В действительности речь идет о воздействии магнитного поля не на луч света, а на вещество. В результате этого воздействия электронные оболочки молекул становятся асимметричными и вещество оказывается обладающим круговым двулучепреломлением (см. (5.47)), т. е.

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda}(n_L - n_D)l. \tag{7,36}$$

Как уже сказано, оптические свойства молекул определяются их поляризуемостью. В свою очередь поляризуемость зависит от напряженности магнитного поля. В первом приближении составляющую тензора поляризуемости молекулы можно записать в виде

$$a_{\sigma\tau} = a^0_{\sigma\tau} + \sum_\rho a_{\sigma\tau,\rho}H_\rho + \ldots \tag{7,37}$$

Здесь $\sigma, \tau, \rho = \xi, \eta, \zeta$ — координаты в системе, закрепленной в молекуле, H_ρ — компоненты вектора напряженности магнитного поля в той же системе. Так как $\mathbf{H} = \mathrm{rot}\,\mathbf{A}$ ($\mathbf{A}$ — вектор-потенциал) — аксиальный вектор, то величины $a_{\sigma\tau,\rho}$ антисимметричны относительно перестановки индексов σ, τ, т. е.

$$a_{\xi\eta,\zeta} \equiv \left(\frac{\partial a_{\xi\eta}}{\partial H_\zeta}\right)_{H=0} = \left(\frac{\partial a_{\xi\eta}}{\partial\left(\frac{\partial A_\eta}{\partial\xi} - \frac{\partial A_\xi}{\partial\eta}\right)}\right)_{H=0} = -a_{\eta\xi,\zeta}.$$

Из закона сохранения энергии следует эрмитовость тензора $a_{\sigma\tau}$ (см. [32]). Следовательно, величины $a_{\sigma\tau,\rho}$ мнимые. Если поле $\mathbf{H}$ направлено вдоль оси z пространственно неподвижной

системы координат x, y, z, то соотношения между напряженностью и индукцией электрического поля в веществе, находящемся в поле H_z, имеют вид

$$D_x = \varepsilon E_x - i\varepsilon' E_y, \quad D_y = i\varepsilon' E_x + \varepsilon E_y, \quad D_z = \varepsilon E_z, \qquad (7,38)$$

где $\varepsilon' = i\varepsilon_{xy} = 4\pi i N_1 a_{xy}$ (для газа N_1 — число молекул в 1 $см^3$). Так как a_{xy} — мнимая величина (она появляется вследствие наличия мнимых антисимметричных составляющих поляризуемости, зависящих от H_z), то ε' — вещественно и пропорционально H_z. Если вдоль оси z распространяется плоская световая волна, для которой

$$D_x = n^2 E_x, \quad D_y = n^2 E_y, \quad D_z = 0, \qquad (7,39)$$

то из уравнений (7,38), (7,39) следует

$$(\varepsilon - n^2) E_x - i\varepsilon' E_y = 0, \quad i\varepsilon' E_x + (\varepsilon - n^2) E_y = 0. \qquad (7,40)$$

Отсюда получаем два значения показателя преломления среды

$$n^2 = \varepsilon \pm \varepsilon'. \qquad (7,41)$$

Решение со знаком плюс отвечает волне, поляризованной по кругу влево, со знаком минус — вправо (см. стр. 290). Круговое двулучепреломление равно

$$\Delta n \equiv n_L - n_D \approx \varepsilon'/n, \qquad (7,42)$$

где $n = {}^1/_2 (n_L + n_D)$. Сравнивая (7,35), (7,36) и (7,42), находим

$$V = \frac{\pi\varepsilon'}{\lambda n H}. \qquad (7,43)$$

Такова феноменологическая теория эффекта Фарадея [32, 33]. В классической электронной теории эффект Фарадея сводится к эффекту Зеемана. Электрон, рассматриваемый как гармонический осциллятор, колеблется в отсутствие магнитного поля с круговой частотой ω_0. В присутствии поля, направленного параллельно лучу света, спектральная линия с частотой ω_0 расщепляется на две, поляризованные по кругу вправо и влево. Величина расщепления равна $2|\omega_H|$, где ω_H — частота ларморовой прецессии:

$$|\omega_H| = eH/2mc$$

(e, m — заряд и масса электрона, c — скорость света). Круговое двулучепреломление выражается величиной производной n по частоте световой волны ω

$$\Delta n = \left(\frac{\partial n}{\partial \omega}\right)_{H=0} 2\omega_H = \frac{eH}{mc}\left(\frac{\partial n}{\partial \omega}\right)_{H=0},$$

или

$$\Delta n = \lambda^2 \left(\frac{\partial n}{\partial \lambda}\right)_{H=0} \frac{eH}{2\pi mc^2}. \qquad (7,44)$$

Таким образом,

$$\varphi = \frac{eH}{2mc^2}\lambda\left(\frac{\partial n}{\partial \lambda}\right)_{H=0} l$$

и

$$V = \frac{e\lambda}{2mc^2}\left(\frac{\partial n}{\partial \lambda}\right)_{H=0}. \qquad (7,45)$$

Мы получили *формулу Беккереля*, грубо согласующуюся с опытом для диамагнитных веществ.

Истинная теория эффекта может быть только квантовомеханической. Под влиянием магнитного поля происходит несколько

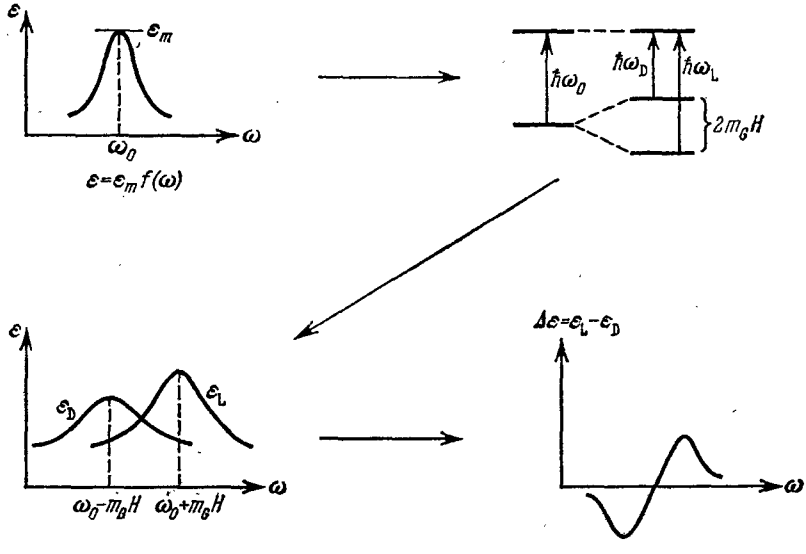


Рис. 7.10. Схема, поясняющая возникновение МКД.

явлений. Во-первых, расщепляется основной энергетический уровень электронной системы. Во-вторых, правой и левой волнам отвечают различные вероятности перехода. В-третьих, расщепляется и возбужденное состояние. Если молекулы парамагнитны, то изменяется населенность подуровней основного уровня, возникающих в магнитном поле (вследствие ориентации собственных магнитных моментов).

В согласни с общими положениями молекулярной оптики (см. § 5.5) магнитному оптическому вращению (МОВ) отвечает магнитный круговой дихроизм (МКД) в полосах поглощения вещества. Перечисленные явления удобно продемонстрировать в поглощении (рис. 7.10) [34]). Расщепление основного состояния дает частоты поглощения правой и левой волн $\omega_D =$

$= \omega_0 + m_G H$, $\omega_L = \omega_0 - m_G H$, различие в вероятностях перехода дает коэффициенты поглощения этих волн $\varepsilon_D = \varepsilon_m(1 - bH)$, $\varepsilon_L = \varepsilon_m(1 + bH)$, различие в населенностях

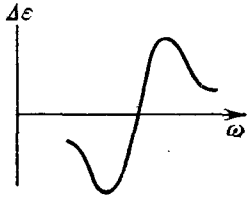


Рис. 7.11. График МКД, отвечающий члену A.

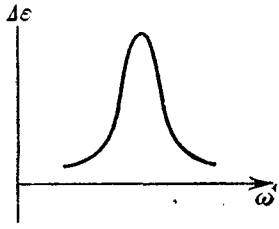


Рис. 7.12. График МКД, отвечающий $B + C/kT$.

подуровней дает множители 1 и $(1 - 2m_G H/kT)$ (m_G — характеризует расщепление). Получаем [34]

$$\varepsilon_L = \varepsilon_m(1 + bH) f(\omega - m_G H),$$
$$\varepsilon_D = \varepsilon_m(1 - bH) f(\omega + m_G H)(1 - 2m_G H/kT)$$

и

$$\Delta\varepsilon = 2\varepsilon_m H\left\{ - m_G \frac{df(\omega)}{d\omega} + \left(b + \frac{m_G}{kT}\right) f(\omega)\right\} = A + B + C/kT. \quad (7{,}46)$$

Если учесть и расщепление возбужденного уровня, характеризуемое m_E, то

$$\Delta\varepsilon = 2\varepsilon_m H\left\{ - (m_G + m_E) \frac{df(\omega)}{d\omega} + \left(b + \frac{m_G}{kT}\right) f(\omega)\right\} =$$
$$= A' + B + C/kT. \quad (7{,}47)$$

МКД выражается линейной комбинацией кривой поглощения $(B + C/kT)$ и ее первой производной (A или A'). То же относится к МОВ, где член A выражает производную кривой дисперсии $n(\omega)$ по ω, а члены B и C — саму эту кривую. Очевидно, что формула Беккереля соответствует только члену A [35]. Она справедлива для диамагнитного вещества ($C = 0$) и равенства интенсивностей обеих компонент ($b = 0$). В таком случае график МКД имеет вид, показанный на рис. 7.11. Фактически b всегда отлично от нуля. Напротив, если член A пренебрежимо мал, кривая МКД отвечает $B + C/kT$ и симметрична (рис. 7.12).

Строгая квантовомеханическая теория МОВ и, следовательно, МКД развита на основе теории возмущений [36—39]. Вдали от полосы поглощения удельное вращение, определяемое элек-

тронным переходом с уровня 0 (основного) на уровень j дается величиной

$$\varphi(0\to j)=-\frac{4\pi}{\hbar c}N_1\left\{\frac{2\omega_{j0}\omega^2 A_j}{\hbar\left(\omega_{j0}^2-\omega^2\right)^2}+\frac{\omega^2}{\omega_{j0}^2-\omega^2}\left(B_j+\frac{C_j}{kT}\right)\right\}H_z, \quad (7{,}48)$$

где

$$\left.\begin{aligned}
A_j&=[(j\,|\,m_z\,|\,j)-(0\,|\,m_z\,|\,0)]\,\mathrm{Im}\,[(0|\,p_x\,|\,j)\,(j|\,p_y\,|\,0)],\\
B_j&=\mathrm{Im}\left\{\sum_{l\neq 0}\frac{(l\,|\,m_z\,|\,0}{\hbar\omega_{l0}}[(0|\,p_x\,|\,j)\,(j|\,p_y\,|\,l)-(0\,|\,p_y\,|\,j)\,(j\,|\,p_x\,|\,l)]+\right.\\
&\quad\left.+\sum_{l\neq j}\frac{(j\,|\,m_z\,|\,0)}{\hbar\omega_{lj}}[(0\,|\,p_x\,|\,j)\,(l|\,p_y\,|\,0)-(0|\,p_y\,|\,j)\,(l|\,p_x\,|\,0)]\right\},\\
C_j&=(0\,|\,m_z\,|\,0)\,\mathrm{Im}\,[(0|\,p_x\,|\,j)\,(j|\,p_y\,|\,0)].
\end{aligned}\right\} \quad (7{,}49)$$

Здесь ω — частота падающего света, $(j|m_z|j)$ и т. д. — матричные элементы составляющей магнитного момента по оси z, $(0|p_x|j)$, $(l|p_y|0)$ и т. д. — матричные элементы составляющих электрического дипольного момента, Im — символ, указывающий на то, что берется мнимая часть выражения. Для диамагнитных молекул $(0|m_z|0)=0$, следовательно, $C=0$ и член A определяется только магнитным моментом возбужденного состояния $(j|m_z|j)$. Вклад члена C в МОВ определяется (7,48), если $(0|m_z|0)H_z\ll kT$.

В области собственного поглощения наблюдается аномальная дисперсия магнитного вращения (АДМВ), описываемая формулой

$$\varphi(0\to j)=-\frac{4\pi}{\hbar c}N_1\left\{\frac{2\omega_{j0}\omega^2\left[\left(\omega_{j0}^2-\omega^2\right)^2-\omega^2\Gamma_{j0}^2\right]}{\hbar\left[\left(\omega_{j0}^2-\omega^2\right)^2+\omega^2\Gamma_{j0}^2\right]^2}A_j+\right.$$
$$\left.+\frac{\omega^2\left(\omega_{j0}^2-\omega^2\right)}{\left(\omega_{j0}^2-\omega^2\right)^2+\omega^2\Gamma_{j0}^2}(B_j+C_j/kT)\right\}H_z, \quad (7{,}50)$$

где A_j, B_j, C_j имеют прежние значения (см. (7,49), а Γ_{j0} приближенно совпадает с полушириной спектральной полосы, соответствующей переходу $0\to j$. Виды кривых АДМВ, отвечающих A и $(B+C/kT)$, показаны на рис. 7.13 и 7.14 соответственно. АДМВ типа A впервые наблюдали Макалузо и Корбино в 1898 г. в парах натрия ([40], см. также [32, 41]). Такая симметрия АДМВ называется *эффектом Макалузо — Корбино*. Простые классические соображения показывают, что этот эффект должен быть весьма чувствителен к изменениям в положениях и

интенсивностях спектральных полос. Член A, как уже сказано, определяется продольным эффектом Зеемана и выражает разностный, интерференционный эффект внутри полосы поглощения (рис. 7.15).

Непосредственное наблюдение эффекта Зеемана в молекулярных спектрах практически невозможно, так как полосы широки, а расщепление $2\omega_H$ мало. Напротив, симметричная АДМВ

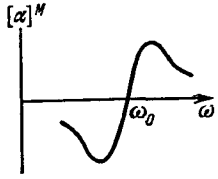


Рис. 7.13. График АДМВ, отвечающий члену A.

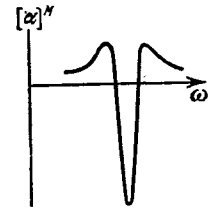


Рис. 7.14. График АДМВ, отвечающий, $B + C/kT$.

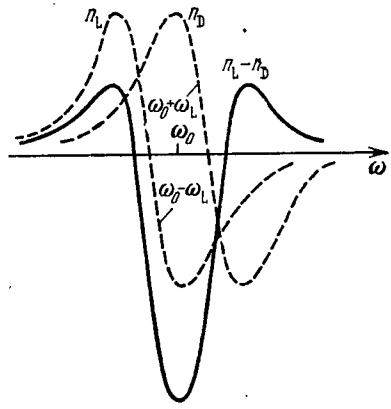


Рис. 7.15. Схема, поясняющая возникиовение АДМВ.

может быть очень резко выражена, в частности, у гем-содержащих белков.

МКД, характеризуемый эллиптичностью θ (см. стр. 292), описывается формулой

$$\theta(0\to j) = -\frac{4\pi}{\hbar c} N_1 \left\{ \frac{4\omega_{j0}\omega^3 \left(\omega_{j0}^2 - \omega^2\right)^2 \Gamma_{j0}}{\hbar\left[\left(\omega_{j0}^2 - \omega^2\right)^2 + \omega^2\Gamma_{j0}^2\right]^2} A_j + \right.$$

$$\left. + \frac{\omega^3\Gamma_{j0}}{\left(\omega_{j0}^2 - \omega^2\right)^2 + \omega^2\Gamma_{j0}^2} \left(B_j + C_j/kT\right) \right\} H_z. \quad (7{,}51)$$

Легко видеть, что члену A отвечает асимметричная кривая МКД (см. рис. 7.11), а членам B и C — симметричная (см. рис. 7.12).

Для изотропной среды с помощью усреднения соотношения (7,49) по всем ориентациям молекулы получаем выражения для

A, B, C, не зависящие от ориентации пространственно фиксированных осей:

$$\left.\begin{aligned} A_f &= {}^1/_6[(j|\,\mathbf{m}\,|j) - (0|\,\mathbf{m}\,|0)]\,\mathrm{Im}\,[(0|\,\mathbf{p}\,|j)(j|\,\mathbf{p}\,|0)], \\ B_f &= {}^1/_3\,\mathrm{Im}\left\{\sum_{l\neq 0}\frac{(l|\,\mathbf{m}\,|0)}{\hbar\omega_{l0}}(0|\,\mathbf{p}\,|j)(j|\,\mathbf{p}\,|l) + \right. \\ &\quad \left. + \sum_{l\neq j}\frac{(j|\,\mathbf{m}\,|l)}{\hbar\omega_{lf}}(0|\,\mathbf{p}\,|j)(l|\,\mathbf{p}\,|0)\right\}, \\ C_f &= {}^1/_6(0|\,\mathbf{m}\,|0)\,\mathrm{Im}\,[(0|\,\mathbf{p}\,|j)(j|\,\mathbf{p}\,|0)]; \end{aligned}\right\} \qquad (7{,}52)$$

$\mathbf{m}$, $\mathbf{p}$ — векторы магнитного и электрического моментов молекулы. Связь между φ и θ по-прежнему дается соотношениями Кронига — Крамерса (ср. стр. 298).

Выражения для МОВ, АДМВ, МКД отличны от соответствующих величин для естественной оптической активности, ДОВ, АДОВ и КД (см. § 5.5). Эффект Фарадея никак не связан с естественной оптической активностью — он наблюдается в веществах, построенных как из асимметричных, так и из симметричных молекул. Явное различие состоит в том, что при вторичном прохождении луча света, отраженного от зеркала, через оптически активное вещество, вращение компенсируется и исчезает, а эффект Фарадея удваивается. Таким образом, эффект Фарадея дает новую информацию о структуре молекул и важные сведения для интерпретации спектров.

Экспериментальное наблюдение АДМВ проводится с успехом на системах, характеризуемых сильным магнитным вращением при относительно малом поглощении. Таковы порфириновые соединения, соединения редкоземельных элементов и т. д. При малом магнитном вращении измерение АДМВ затруднительно. Эффект Фарадея линеен относительно магнитного поля, и поэтому, увеличивая H, можно улучшить условия наблюдения. В ряде современных работ применяются магнитные поля, создаваемые сверхпроводниками и достигающие 50 000 *гс* и более [42]. Без этой техники удается получить поля до 20 000—30 000 *гс* (описание соответствующей дифференциальной установки см. в [43]).

Наблюдение МКД возможно не только для соединений с большим вращением. Оно проводится с помощью кругового дихрографа с магнитной приставкой [42]. Подробные сводки экспериментальных данных по АДМВ и МКД многих веществ см. в [39, 44]. Широкое изучение этих эффектов началось лишь в последние годы, в частности в работах Джерасси [45—47].

§ 7.4. МАГНИТНОЕ ОПТИЧЕСКОЕ ВРАЩЕНИЕ В ГЕМСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКАХ

Относительные значения МКД различных органических соединений характеризуются следующими величинами: порфирины ≈ 100, аннулены ≈ 3, пурин $\approx 0{,}2$, циклогексанон $\approx 0{,}00002$ [48]. Порфирины занимают особое положение вследствие высокой молекулярной симметрии. Это делает эффект Фарадея сильным средством для изучения гемсодержащих белков, кобамидных ферментов, хлорофилла и его производных. Из изложенного в предыдущем разделе следует, что АДМВ и МКД имеют особенности, позволяющие получать информацию, недостижимую для других спектральных методов. Переходы, которым отвечают очень слабые полосы поглощения, могут давать ярко выраженные АДМВ и МКД. Эти эффекты характеризуются большим разрешением полос и оказываются весьма чувствительными к малым структурным изменениям.

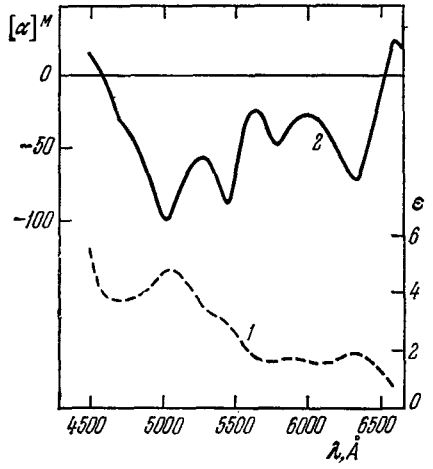


Рис. 7.16. Кривая поглощения (*1*) и график АДМВ (*2*) метмиоглобина.

Первые качественные данные по ДМВ гемсодержащих белков были получены Шашуа [49]. Систематические количественные исследования в этой области принадлежат Шаронову и др. [50—57].

На рис. 7.16 приведены спектры поглощения и кривые *) АДМВ метмиоглобина, содержащего Fe^{3+}. Сильно перекрывающиеся полосы поглощения 5000, 5400, 5800 и 6300 Å хорошо разрешены в АДМВ. Полосы 5400, 5800 Å, по-видимому, отвечают $\pi\pi^*$-переходам в порфириновом кольце, 5000 и 6300 Å — переходам с переносом заряда. При добавлении сильного лиганда, например азида, Fe переходит в низкоспиновое состояние, что выражается в усилении β- и особенно α-полос поглощения и в увеличении ДМВ. Аналогичные изменения наблюдаются при переходе к гидроксимиоглобину при увеличении pH среды. Этот

*) Здесь и на рис. 7.17—7.22 величины $[\alpha]^M$ отнесены к напряженности поля 10 000 *эс*, а коэффициент поглощения рассчитан для 1%-ного раствора и толщины слоя 1 *см*.

пример демонстрирует возможности метода. В спектре поглощения CN-метмиоглобина не наблюдается α-полоса, на кривой ДМВ этой полосе отвечает особенно сильный эффект.

При добавлении к железу гема одного электрона и при сохранении низкоспинового состояиия ДМВ в α-полосе увеличивается на порядок, а поглощение — лишь на 20—30%. На рис. 7.17 показаны кривые поглощения и ДМВ окси- и дезоксимиоглобина. ДМВ в α-полосе очень чувствительна к изменениям электронной плотности в геме. Величина минимума на кривой ДМВ MbO_2 примерно в 40 раз больше, чем у метмиоглобина. То, что эти различия действительно определяются изменениями электронной плотности в геме, вызываемыми различными лигандами, доказывается корреляцией между величиной минимума и изомерным сдвигом в эффекте Мёссбауэра, являющимся мерой электронной плотности у атома Fe [51, 58]. На рис. 7.18 показаны соответствующие кривые для комплексов Mb, рис. 7.19 иллюстрирует указанную корреляцию.

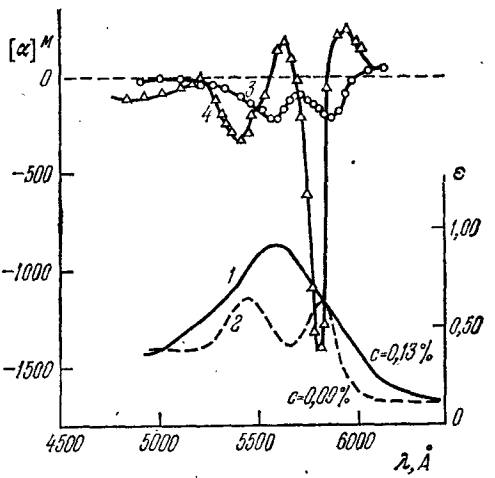


Рис. 7.17. Кривые поглощения Mb (*1*) и MbO_2 (*2*) и ДМВ Mb (*3*) и MbO_2 (*4*).

Наблюдаемая корреляция между ДМВ и конформационной стабильностью комплексов Mb с лигандом при денатурации мочевиной является ярким и непосредственным выражением ЭКВ [59].

Практически не обнаруживаемая в поглощении, но сильная в ДМВ α-полоса в дезоксимиоглобине (ср. стр. 424, табл. 7.2) оказывается весьма чувствительной к гем-гем-взаимодействию. В ДМВ α- и β-полосам отвечают эффекты примерно одинаковой величины (см. рис. 7.17). В гемоглобине, спектр поглощения которого почти не отличается от спектра миоглобина, эффект в β-полосе тот же, что и у Mb, а в α-полосе вдвое больше (рис. 7.20) [50]. У изолированных α- и β-субъединиц Hb (см. рис. 7.20) картина такая же, как и у Mb. Это также следует считать выражением ЭКВ — электронное состояние гема, проявляющееся в ДМВ, оказывается зависящим от четвертичной структуры, т. е. от коиформациониого состояния белка.

Метод ДМВ дает прекрасную возможность изучения диссоциации Hb на субъединицы. Исследование диссоциации гемоглобина человека этим методом позволило установить, что в интервале pH от 10 до 11 тетрамеры диссоциируют на некооперативные димеры $\alpha_1\beta_1$; оно дало также возможность найти зависимость константы диссоциации тетрамеров на димеры $K_{4,2}$ от

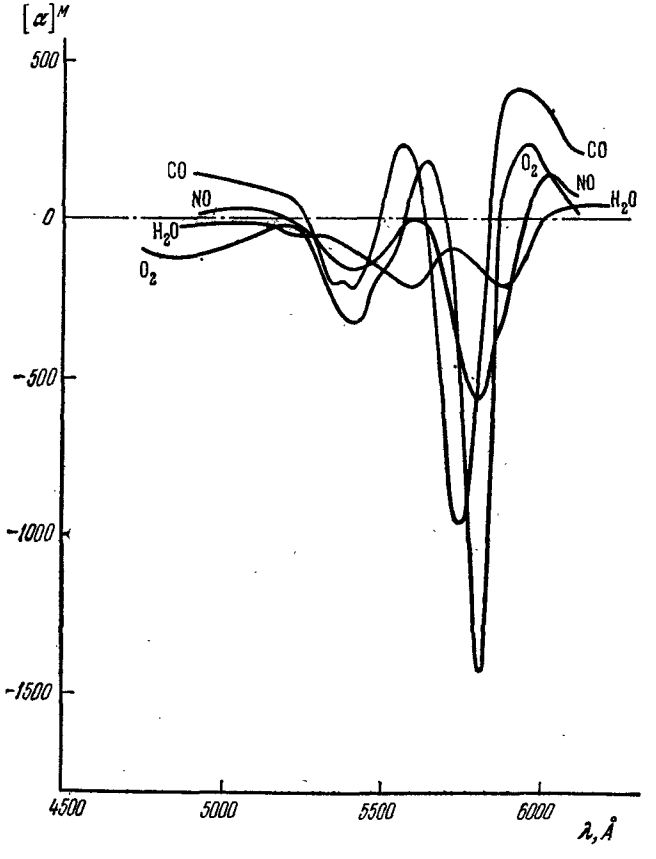


Рис. 7.18. Кривые ДМВ комплексов Mb.

pH и таким образом выяснить, что диссоциация сопровождается изменением степени ионизации четырех аминокислотных остатков (двух Тир и, по-видимому, двух Лиз). Экстраполяция на область нейтральных pH показала, что константа $K_{4,2}$ для Hb не больше 10^{-8} *моль*, т. е. по крайней мере на два порядка меньше, чем $K_{4,2}$ для HbO_8.

При увеличении pH минимум кривой ДМВ, отвечающий β-полосе, вначале остается неизменным, а минимум для α-полосы изменяется по мере диссоциации. При полной диссоциации величины минимумов равны (рис. 7.21). При дальнейшем увеличении pH минимум для β-полосы увеличивается почти в 30 раз, а минимум, соответствующий α-полосе, исчезает [55] (см.

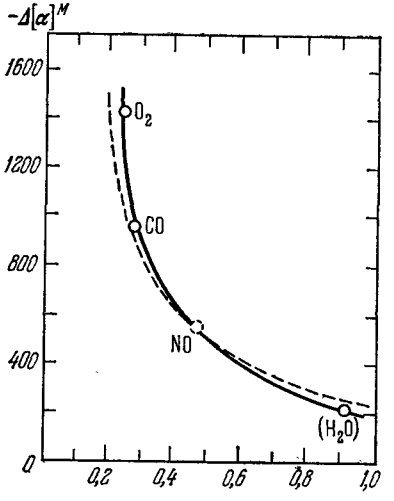


Рис. 7.19. Корреляция ДМВ с эффектом Мёссбауэра.
По оси абсцисс — изомерный сдвиг в эффекте Мёссбауэра Δ, *мм/сек*.

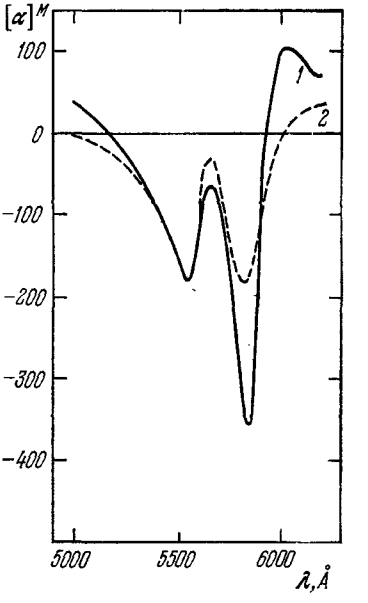


Рис. 7.20. Кривые ДМВ Hb (*1*) и изолированных α- и β-цепей (*2*).

рис. 7.21). Это связано с денатурацией цепей. Метод ДМВ очень чувствителен к денатурации Hb и дает возможность обнаруживать присутствие 0,5% денатурированных молекул.

В связи с изложенным следует подчеркнуть, что естественное оптическое вращение (АДОВ) и КД миоглобина и гемоглобина в собственных полосах поглощения гема (индуцированная оптическая активность, см. стр. 311) относительно малы (см. [60]).

Метод ДМВ весьма эффективен и в исследованиях другого гемсодержащего белка — цитохрома *с*. Цитохром *с* участвует в переносе электрона в цепи окислительно-восстановительного фосфорилирования и атом Fe гема окисляется и восстанавливается (см. стр. 98). Очевидно, что причины различного

поведения гема в Mb и Hb, с одной стороны, и цитохрома *c* — с другой, следует искать в различиях белковой структуры, примыкающей к гему. В цитохроме *c* шестая координационная валентность Fe занята метионилом белковой цепи, в Mb и Hb она свободна и может присоединять лиганд. При модификации цитохрома *c* в результате взаимодействия с бромуксусной кислотой (pH

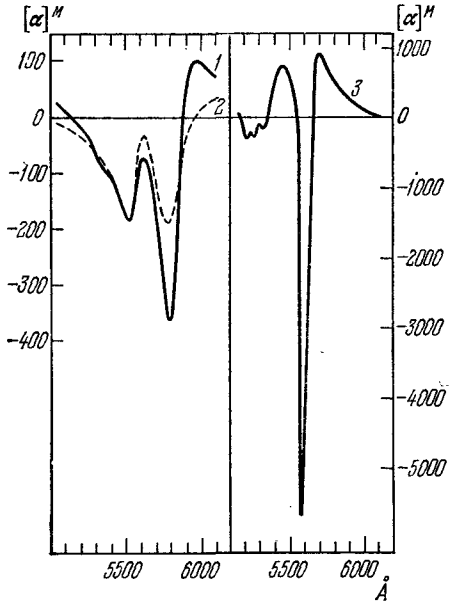


Рис. 7.21. ДМВ в дезоксигемоглобине человека при разных условиях.

1—0,1 *M* фосфатный буфер, 20 °С, pH 7,0; *2*—0,2 *M* фосфатноглициновый буфер, pH 11,2; *3*—ДМВ в денатурированном гемоглобине (0,11%-ном) в 0,2 *M* (NaCl + NaOH), pH 13,0.

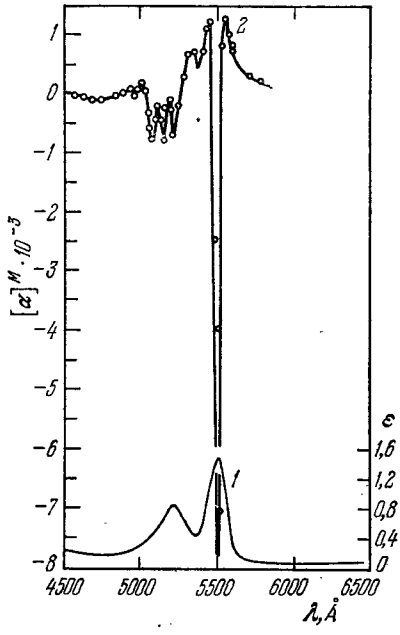


Рис. 7.22. Кривая поглощения (*1*) и график ДМВ (*2*) нативного цитохрома *c*.

7,0, комнатная температура) упомянутый Мет алкилируется и связь его с Fe ослабляется. Такой карбоксиметилированный ферроцитохром *c* оказывается, подобно Mb и Hb, способным связывать CO и O_2 без окисления. Нативный белок этой способности не имеет. ДМВ нативного белка и его спектр поглощения показаны на рис. 7.22, кривая МКД — на рис. 7.23. Ясно видны преимущества ДМВ и МКД в этом случае — в спектре поглощения наблюдаются лишь две полосы, а в магнитных спектрах до пяти полос, весьма чувствительных к изменениям структуры белка. На рис. 7.24 приведены кривые ДМВ карбоксиметилированного цитохрома *c* и его комплексов с CO и O_2. Картина оказывается

весьма сходной с картиной для Mb (см. рис. 7.18). Карбоксиметилированный цитохром *c* миоглобиноподобен [54, 56].

Интерпретация описанных магнитных спектров гемсодержащих белков требует детальных квантовомеханических расчетов

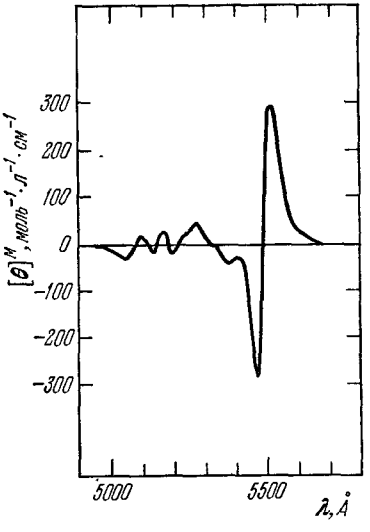


Рис. 7.23. Кривая МКД нативного цитохрома *c* (10 000 *гс*).

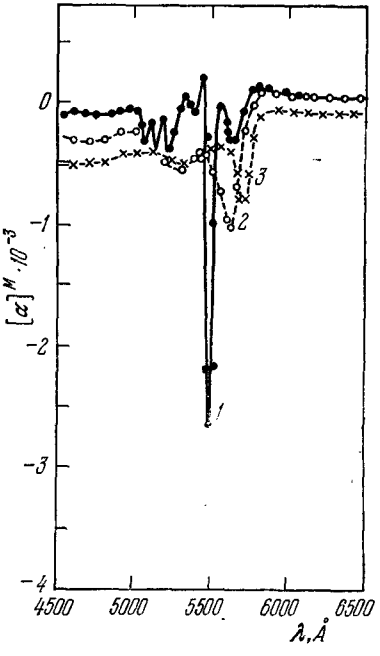


Рис. 7.24. Кривые ДМВ карбоксиметилированного цитохрома *c* (*1*) и его комплексов с CO (*2*) и O_2 (*3*).

с тем, чтобы воспользоваться результатами теории, приведенными выше. В нескольких работах были выполнены такие расчеты для порфириновых комплексов [61—63]. Однако здесь необходимы не только усовершенствования и уточнения, но и учет роли белка.

§ 7.5. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Каталитическое действие ферментов определяет течение всех биохимических реакций — природу и скорости образования продуктов. Биохимические реакции *in vivo* подлежат точной регуляции и самосогласованию, обеспечивающим оптимальное химическое поведение клетки и организма. Из самых общих

соображений следует, что ферменты должны играть не только организующую, но и регуляторную роль.

Наличие регуляции означает существование каналов прямой и обратной связи, по которым передается надлежащая информация. Передача информации в клетке есть передача химических сигналов, т. е. молекул и ионов. В клетке должны функционировать вещества, реактивность которых определяется воздействием на них молекулярных сигналов. Поскольку источником

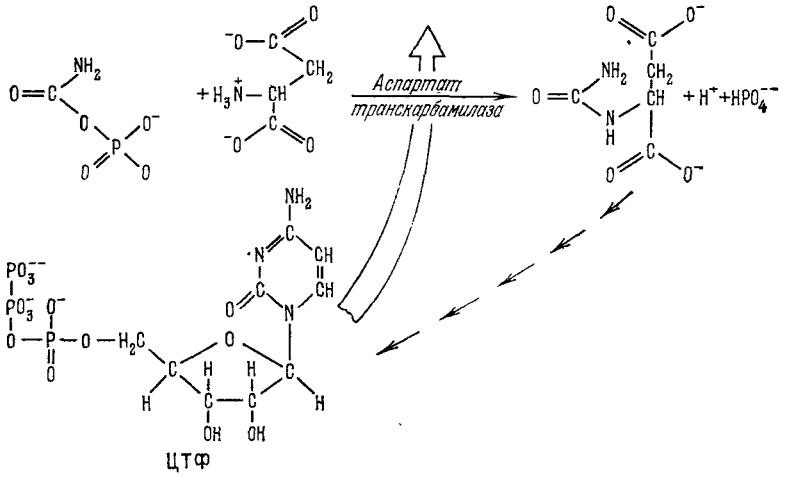


Рис. 7.25. Схема аллостерической обратной связи.

таких сигналов являются ферменты, именно они подлежат влиянию химических обратных связей. Таким образом, можно прийти к умозрительному выводу о существовании регуляторных моно- и полиферментных систем. Как уже говорилось, фермент можно рассматривать как преобразователь сигналов: входной сигнал, т. е. субстрат, преобразуется в выходной сигнал, т. е. продукт. Если выходной сигнал влияет на работу преобразователя, то реализуется обратная связь, положительная или отрицательная в зависимости от того, активирует или ингибирует конечный продукт функцию фермента.

Такого рода системы действительно функционируют в клетке. Умбаргер впервые обнаружил существование последовательных ферментативных реакций, в которых конечный метаболит влияет на активность фермента, катализирующего первую реакцию последовательности [64]. Вначале было установлено ингибирование, кинетика которого сходна с кинетикой конкурентного ингибирования, хотя структура ингибитора, именуемого в данном

случае *аллостерическим* (в буквальном переводе с древнегреческого это слово означает «инопространственный»), отлична от структуры субстрата. Умбаргер нашел, что треониндезаминаза *E. coli*, субстратом которой является треонин, ингибируется изолейцином — продуктом последней стадии цепи реакций. В настоящее время известно множество аллостерических ферментов (АСФ), регулируемых сходным образом по принципу обратной связи. Список 24 таких систем был опубликован еще в 1965 г. [65]; с тех пор их число значительно увеличилось. Подробный обзор более новых данных приводится болгарскими учеными [66] (см. также [67]). На рис. 7.25 показана схема аллостерической

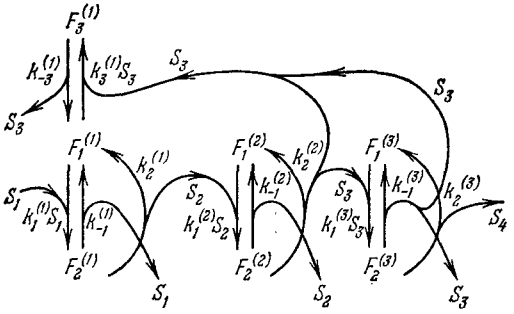


Рис. 7.26. Схема аллостерического ингибирования.

обратной связи в системе синтеза ЦТФ, в которой АСФ — аспартаттранскарбамилаза, а аллостерический эффектор (АСЭ), влияющий на работу аллостерического фермента, — ЦТФ [68].

Приведем иллюстративный расчет для стационарной обратной связи в элементарной аллостерической системе, состоящей из трех ферментативных реакций, причем катализатором первой служит АСФ [33, 62, 70]. Схема реакций показана на рис. 7.26. В стационарных условиях скорости реакций $S_1 \to S_2$, $S_2 \to S_3$ и $S_3 \to S_4$ равны соответственно

$$v_1 = \frac{v_{m1} S_1}{S_1 + K_1 (1 + K_I S_3)}, \quad v_2 = \frac{v_{m2} S_2}{S_2 + K_2}, \quad v_3 = \frac{v_{m3} S_3}{S_3 + K_3}, \qquad (7{,}53)$$

где S_1, S_2, S_3 — концентрации соответствующих субстратов, v_{m1}, v_{m2}, v_{m3} — максимальные скорости реакций, K_1, K_2, K_3 — константы Михаэлиса, K_I — константа ингибирования (ср. стр. 365). В стационарном режиме $v_1 = v_3$, следовательно,

$$S_3^2 + \frac{1}{K_I}\left[1 + \frac{S_1}{K_1}\left(1 - \frac{v_{m1}}{v_{m3}}\right)\right] S_3 - \frac{v_{m1} K_3 S_1}{v_{m3} K_1 K_I} = 0. \qquad (7{,}54)$$

Стационарная скорость $v_1 = v_3$ меньше, чем в системе без обратной связи, т. е. при $K_I = 0$. Регуляция, т. е. поддержание S_3

на стационарном уровне, определяется тем, что увеличение S_3 вызывает неограниченное увеличение S_1 (при неизменных значениях констант), так как, согласно (7,54),

$$S_1 = v_{m3} K_1 S_3 \frac{1 + K_I S_3}{v_{m1} K_3 + (v_{m1} - v_{m3}) S_3}.$$

Напротив, в отсутствие обратной связи предельное значение S_1 от S_3 не зависит:

$$(S_1)_{\substack{S_3 \to \infty \\ K_I \to 0}} = \frac{v_{m3}}{v_{m1} - v_{m3}} K_1.$$

Скорость образования S_3 определяется потребностью в этом веществе в последующих реакциях, т. е. скоростью v_3 превращения $S_3 \to S_4$. Если v_{m3} велико ($v_{m3} \gg v_{m1}$), то, согласно уравнению (7,54), S_3 мало́ и нет ингибирования первого фермента. Напротив, если v_{m3} мало, т. е. $v_{m3} \ll v_{m1}$, то S_3 велико. Если $S_3 \gg K_3$, то

$$S_3 \approx \frac{S_1}{K_1 K_I} \frac{v_{m1}}{v_{m3}},$$

$$v_1 \approx \frac{v_{m1} v_{m3} S_1}{(v_{m1} + v_{m3}) S_1 + v_{m3} K_1} \approx v_{m3} \ll \frac{v_{m1} S_1}{S_1 + K_1}.$$

Максимальная скорость первой реакции равна уже не v_{m1}, а v_{m3}, т. е. она много меньше. При $v_{m3} \to 0$ получим $S_3 \to \infty$ и $v_1 = v_3 \to 0$, т. е. полное торможение процесса.

Отличие АСЭ от субстрата АСФ заставляет думать, что АСЭ связывается другим центром фермента, отличным от активного центра, в котором связывается и претерпевает превращение субстрат. Аллостерическое ингибирование можно считать результатом конформационного превращения молекулы АСФ как целостной системы. Это превращение затрагивает и активный центр, возможно расположенный вдали от центра связывания АСЭ, и уничтожает тем самым его каталитические свойства [71]. Такая модель согласуется с теорией Кошланда (см. § 6.5) и, если модель верна, то явление аллостеризма следует считать веским подтверждением этой теории.

На самом же деле ситуация здесь более сложна. Исследование АСФ установило две их основные особенности. Во-первых, все изученные АСФ обладают четвертичной структурой, т. е. их молекулы состоят из нескольких глобулярных субъединиц. Во-вторых, стационарная кинетика соответствующих реакций отлична от кинетики Михаэлиса — Ментен — кривые $v(S)$ имеют особенности, большей частью перегибы. На рис. 7.27 показана S-образная кривая $v(S)$ для аспартаттранскарбамилазы [68]. В присутствии аллостерического ангибитора ЦТФ S-образность исчезает. В свою очередь кинетика ингибирования также отлична от элементарной. Как показал Шанжё [72], кинетику превра-

щения треонина АСФ — треониндезаминазой можно описать следующим образом:

$$\lg \frac{v}{v_m - v} = n \lg S - \lg K, \qquad (7,55)$$

а кинетику ингибирования АСЭ —

$$\lg \frac{v}{v_0 - v} = \lg K' - n' \lg I. \qquad (7,56)$$

Здесь v — стационарная скорость, v_m — максимальная скорость, v_0 — скорость при $I = 0$, K и K' — константы. Для элементарной кинетики n и n' должны равняться единице. Шанжё нашел, что $n = 1{,}37$ и $n' = 1{,}86$.

Указанные основные свойства АСФ подобны свойствам гемоглобина. Гемоглобин имеет четвертичную структуру, и кривая

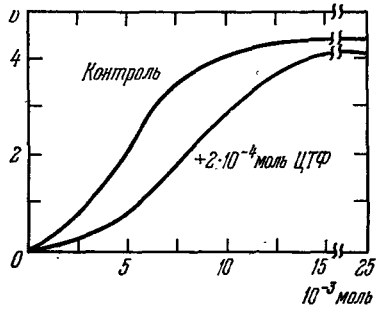


Рис. 7.27. Кривая $v(S)$ для аспартаттраискарбамилазы.
По оси абсцисс — концентрация аспартата, 10^{-3} *моль/л*.

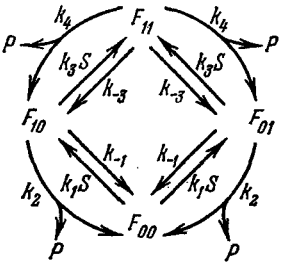


Рис. 7.28. Схема реакции с ферментом, состоящим из двух субъединиц.
P — продукт; объяснение остальных символов см. в тексте.

его насыщения кислородом S-образна. Как показано в § 7.1, эта S-образность определяется кооперативными взаимодействиями субъединиц. На тех же основаниях можно заключить, что особенности кинетики АСФ определяются кооперативным взаимодействием субъединиц фермента. В этом смысле Hb является не только «почетным ферментом» (см. стр. 421), но и «почетным аллостерическим ферментом». Гемоглобин обладает свойствами, моделирующими свойства АСФ, и не случайно он включен в их перечень [65]. Рассмотрение приведенных выше результатов на основе представлений о кооперативности позволило успешно истолковать формулы (7,55) и (7,56) [70].

Рассмотрим элементарную модель фермента, молекула которого содержит две взаимодействующие тождественные субъединицы [39, 70]. Каждая субъединица имеет активный центр. Схема стационарного процесса показана на рис. 7.28. Молекула

фермента может существовать в трех состояниях: F_{00} (оба активных центра свободны), $F_{01} = F_{10}$ (один центр занят субстратом, второй — свободен) и F_{11} — оба центра заняты субстратом. Уравнения стационарной кинетики имеют вид

$$\left.\begin{aligned} \dot{F}_{00} &= -2k_1SF_{00} + 2(k_{-1} + k_2)F_{10} = 0, \\ 2\dot{F}_{10} &= 2k_1SF_{00} - 2(k_{-1} + k_2 + k_3S)F_{10} + 2(k_{-3} + k_4)F_{11} = 0, \\ \dot{F}_{11} &= 2k_3SF_{10} - 2(k_3 + k_4)F_{11} = 0. \end{aligned}\right\} \tag{7,57}$$

Общая концентрация фермента есть величина постоянная

$$E = F_{00} + 2F_{01} + F_{11}. \tag{7,58}$$

Скорость образования продукта, согласно схеме на рис. 7.28, равна

$$v = 2k_2F_{10} + 2k_4F_{11}. \tag{7,59}$$

При помощи уравнений (7,57) и (7,58) находим

$$v = 2k_2ES\,\frac{\beta K + \alpha S}{\beta K^2 + 2\beta KS + S^2}, \tag{7,60}$$

где $\alpha = k_4/k_2$, $\beta = K'K$, $K = (k_{-1} + k_2)/k_1$, $K' = (k_{-3} + k_4)/k_3$.

Кооперативность, т. е. взаимодействие двух активных центров, выражается отличием α и β от единицы. Действительно, при $\alpha = \beta = 1$

$$v = 2k_2ES\,\frac{K + S}{(K + S)^2} \equiv \frac{v_mS}{K + S}, \tag{7,61}$$

т. е. кинетика такого процесса совпадает с кинетикой Михаэлиса — Ментен. Напротив, если условие $\alpha = \beta = 1$ не выполнено, то на кривой $v(S)$ возможно появление точки перегиба или даже максимума, или и того и другого. Анализ формулы (7,60) показывает, что точки перегиба могут появиться при следующих условиях:

$$\begin{aligned} &\text{при } \alpha < 0{,}5 \quad \text{и любых } \beta, \\ &\text{при } 1 > \alpha > 0{,}5 \quad \text{и } \frac{\alpha}{2\alpha - 1} > \beta > \frac{\alpha^2}{2\alpha - 1}, \\ &\text{при } \alpha > 1 \quad \text{и } \frac{\alpha^2}{2\alpha - 1} > \beta > \frac{\alpha}{2\alpha - 1}. \end{aligned}$$

Максимум возможен лишь при $\alpha < 0{,}5$ и любых β.

Допустим, что каждая из двух субъединиц имеет одновременно центр, связывающий ингибитор I, т. е. АСЭ. Соответственно мы будем иметь дело уже с девятью состояниями фермента F_{00}^{00}, $F_{10}^{00} = F_{01}^{00}$, F_{11}^{00}, $F_{00}^{20} = F_{00}^{02}$, $F_{01}^{20} = F_{10}^{02}$, F_{00}^{22}, где индекс 0 — при-

писывается свободному центру, 1 — занятому S, 2 — занятому I, индексы, соответствующие центрам для S, указаны внизу, а для I — вверху. Считая для простоты, что состояния F_{01}^{20} и F_{10}^{02} не реализуются и превращение в продукт происходит только из состояния F_{11}^{00}, получаем [70]

$$\frac{v_0}{v_m - v_0} = \frac{zS^2}{x_1 + y_1 S},$$

$$\frac{v}{v_0 - v} = \frac{x_1 + y_1 S + zS^2}{x_2 I + x_3 I^2 + y_2 SI + y_3 SI^2},$$

где x_i, y_i, z — комбинации кинетических констант. Эти формулы согласуются с (7,55), (7,56) при $2 > n, n' > 1$.

Рассмотрение таких ферментативных процессов требует математических алгоритмов, упрощающих решение сложных систем уравнений (см. § 7.6).

Приведенная модель выражает прямую кооперативность — константы скоростей для состояний системы, в которых субстратом заняты один или два центра, различны. Равновесная функция насыщения фермента субстратом для рассмотренной двухцентровой системы выражается соотношением

$$\bar{Y} = \frac{2F_{10} + 2F_{11}}{2(F_{00} + 2F_{10} + F_{11})} = \frac{\beta KS + S^2}{\beta K^2 + 2\beta KS + S^2}, \quad (7{,}62)$$

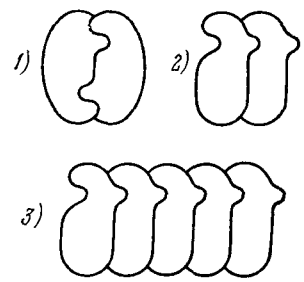


Рис. 7.29. Возможные структуры изологичного (*1*), гетерологичного (*2*) димеров и гетерологичного полимера (*3*).

обращающимся в формулу изотермы Лэнгмюра при $\beta = 1$. При $\beta \neq 1$ кривая $\bar{Y}(C)$ может иметь перегиб, но не максимум.

Из сказанного вытекает, что наличие особенностей у кривых $v(S)$, $v(I)$, $\bar{Y}(S)$ следует считать свидетельством кооперативности. Напротив, отсутствие таких особенностей еще не означает отсутствия кооперативности.

Другая модель косвенной кооперативности, предназначенная для трактовки свойств АСФ, была предложена Моно, Уайманом и Шанжё (модель МУШ [65]). Молекула белка представляет собой олигомер, состоящий из двух или большего числа идентичных субъединиц — протомеров, занимающих эквивалентные пространственные положения. Тем самым, молекула обладает элементами симметрии. Она может быть построена изологично или гетерологично; в последнем случае возможна неограниченная длина олигомера (рис. 7.29). Каждому лиганду (субстрату или АСЭ) отвечает один активный центр протомера.

Предполагается, что протомер как целое может находиться в двух или нескольких конформационных состояниях, сохраняя при этом свою симметрию. Сродство стереоспецифических центров к лиганду изменяется при изменении состояния олигомера. Такая система кооперативна.

Без ограничения общности рассмотрим димер, который может находиться в двух различных состояниях R и T. В каждом из этих состояний димер способен присоединять 0, 1 или 2 молекулы лиганда S. Тогда число состояний димера равно шести: R_{00}, R_{10} (два состояния) R_{11}, T_{00}, T_{10} (два состояния), T_{11}. Условия равновесия имеют вид

$$T_{00} = LR_{00},$$

$$R_{10} = 2R_{00}S/K_R, \quad R_{11} = {}^1/_2 R_{10}S/K_R = R_{00}S^2/K_R^2,$$

$$T_{10} = 2T_{00}S/K_T, \quad T_{11} = {}^1/_2 T_{10}S/K_T = T_{00}S^2/K_T^2.$$

Общая концентрация фермента равна

$$E = R_{00} + R_{10} + R_{11} + T_{00} + T_{10} + T_{11}.$$

Здесь K_R и K_T — константы диссоциации для S в состояниях R и T, L — константа равновесия для перехода $R \rightleftarrows T$ в отсутствие S. Константы диссоциации в состояниях R_{10} и R_{11} (и соответственно в T_{10} и T_{11}) приняты одинаковыми. Функция насыщения белка субстратом имеет вид

$$\bar{Y} = \frac{R_{10} + 2R_{11} + T_{10} + 2T_{11}}{2(R_{00} + R_{10} + R_{11} + T_{00} + T_{10} + T_{11})} =$$

$$= \frac{K_R(1 + Lg)(1 + Lg^2)^{-1} S + S^2}{K_R^2(1 + L)(1 + Lg^2)^{-1} + 2K_R(1 + Lg)(1 + Lg^2)^{-1} S + S^2}, \quad (7{,}63)$$

где $g = K_R/K_T$. Кривая $\bar{Y}(S)$ имеет перегиб. При $g = 1$ или при L, стремящемся к нулю или к бесконечности, кооперативность исчезает и последнее соотношение обращается в изотерму Лэнгмюра

$$\bar{Y} = \frac{S}{K_R + S}. \quad (7{,}64)$$

Выражение для скорости реакции превращения субстрата, полученное из условий равновесия, имеет вид

$$v = 2Ek \frac{1 + \varkappa Lg^2}{1 + Lg^2} \frac{K_R(1 + \varkappa Lg)(1 + \varkappa Lg^2)^{-1} S + S^2}{K_R(1 + L)(1 + Lg^2)^{-1} + 2K_R(1 + Lg)(1 + Lg^2)^{-1} S + S^2}, \quad (7{,}65)$$

где k — константа скорости для состояний R_{10} и R_{11}, а $\varkappa k$ — для состояний T_{10} и T_{11}.

При обобщении уравнения (7,63) на систему с n протомерами, получаем

$$\bar{Y} = \frac{Lgx(1+gx)^{n-1} + x(1+x)^{n-1}}{L(1+gx)^n + (1+x)^n}, \qquad (7,66)$$

где $x = S/K_R$. Это уравнение было использовано при изучении гемоглобина лошади, для которого было принято $n = 4$ [65]. При сравнении формулы (7,66) с экспериментальной кривой оксигенации было найдено, что $L = 9054$ и $g = 0{,}014$. Однако следует подчеркнуть, что четыре субъединицы Hb тождественны только попарно, $\alpha^2\beta^2$ (см. стр. 231), и поэтому излагаемая теория требует уточнения.

Приведенные расчеты относятся к гомотропному кооперативному эффекту, сводящемуся к смещению равновесия $R \rightleftarrows T$ под действием одного лиганда S. При $g \ll 1$ и не слишком больших L и $\varkappa$ формулы (7,63) и (7,65) для димера принимают вид

$$\bar{Y} \approx x\frac{1+x}{L+(1+x)^2}, \qquad (7,67)$$

$$v \approx 2Ekx\frac{1+x}{L+(1+x)^2}. \qquad (7,68)$$

Допустим, что, наряду с субстратом S на димер действуют ингибитор I и активатор A и каждый из двух протомеров содержит по три активных центра — по одному для S, I и A. Считая для простоты, что димер имеет сродство к I только в T-состоянии, и к A — только в R-состоянии, получаем при $g \ll 1$ функцию насыщения фермента субстратом

$$\bar{Y} \approx x\frac{1+x}{L'+(1+x)^2}, \qquad (7,69)$$

где

$$L' = L\frac{(1+I/K_I)^2}{(1+A/K_A)^2}. \qquad (7,70)$$

Гетеротропное взаимодействие АСЭ влияет на $\bar{Y}(S)$. Ингибатор повышает кооперативность, активатор ее уменьшает.

Модель МУШ обобщена в работе Котани [73], рассматривающей непрерывное распределение белка по конформациям и независимое изменение конформации каждой субъединицы (см. также [74]).

В случае положительной кооперативности модели прямой и косвенной кооперативности могут привести к эквивалентным результатам [33]. Однако в отличие от модели МУШ, модель прямой кооперативности может описывать и отрицательную кооперативность, т. е. уменьшение сродства к лиганду по мере насыщения активных центров.

Кошланд, Немети и Филмер [75] рассмотрели прямую кооперативность в тетрамерном белке. Если тетрамер имеет форму тетраэдра, то попарные взаимодействия четырех субъединиц одинаковы. Если тетрамер имеет форму квадрата, то каждая субъединица взаимодействует лишь с двумя соседними, но не по диагонали. Допустим, что каждая субъединица может находиться в двух конформациях A и B, из которых только B связывает лиганд. Функция насыщения для квадратной модели имеет вид

$$\bar{Y} = \frac{K_{AB}^2 x' + \left(K_{AB}^4 + 2K_{AB}^2 K_{BB}\right) x'^2 + 3K_{AB}^2 K_{BB}^2 x'^3 + K_{BB}^4 x'^4}{1 + 4K_{AB}^2 x' + \left(2K_{AB}^4 + 4K_{AB}^2 K_{BB}\right) x'^2 + 4K_{AB}^2 K_{BB}^2 x'^3 + K_{BB}^4 x'^4}, \quad (7{,}71)$$

где K_{AB} и K_{BB} — константы взаимодействия между субъединицами в соответствующих конформациях ($K_{AA} = 1$). В значение эффективной концентрации лиганда x' входят как множители константа сродства лиганда к субъединице и константа равновесия двух конформаций субъединицы. $\bar{Y}(x')$ при $K_{BB}/K_{AB} < 1$ имеет вид кривой с промежуточным плато, при $K_{BB}/K_{AB} > 1$ — S-образную форму (см. также [76, 77]).

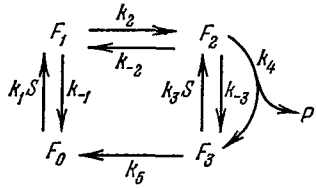


Рис. 7.30. Схема реакции по Рабину.

Наличие четвертичной структуры аллостерических ферментов определяет возможность их диссоциации под действием субстратов и АСЭ. Это действительно было обнаружено для ряда ферментов. Диссоциация обусловливает аллостерические взаимодействия, определяемые смещением равновесия между олигомерными формами АСФ под действием АСЭ. Эти эффекты проявляются в кооперативной кинетике. Их теория была развита в работах Курганова (см. [67, 78—80].

Четвертичная структура АСФ непосредственно наблюдается с помощью электронной микроскопии [81].

В принципе особенности на кривой $v(S)$ могут возникать не в результате кооперативного взаимодействия субъединиц, но вследствие неравновесных конформационных свойств фермента. Допустим, что молекула фермента, переработавшая субстрат в продукт, выходит из реакции в активном конформационно измененном состоянии. Если время возвращения в исходное невозмущенное состояние превышает время между встречами фермента с субстратом или того же порядка, то кинетика будет имитировать кооперативную. Соответствующая модель была предложена Рабином [82] (см. также более позднюю работу [83]). Схема процесса показана на рис. 7.30. Здесь F_0 — свободная от субстрата молекула фермента в исходной конформации, F_1 —

неактивный комплекс фермент — субстрат, F_2 — активный комплекс, F_3 — свободный фермент в активной конформации. Кинетические уравнения имеют вид

$$\left.\begin{aligned}
\dot{F}_0 &= -k_1SF_0 + k_{-1}F_1 + k_5F_3,\\
\dot{F}_1 &= k_1SF_0 - (k_{-1}+k_2)F_1 + k_{-2}F_2,\\
\dot{F}_2 &= k_2F_1 - (k_{-2}+k_{-3}+k_4)F_2 + k_3SF_3,\\
\dot{F}_3 &= (k_{-3}+k_4)F_2 - (k_3S+k_5)F_3.
\end{aligned}\right\} \tag{7,72}$$

Скорость реакции $v = k_4F_2$. Стационарное решение при условии

$$E = F_0 + F_1 + F_2 + F_3 = \text{const}$$

записывается следующим образом:

$$\begin{aligned}
v = k_1k_2k_4S(k_3S+k_5)E\,\{&k_1(k_{-2}+k_2)(k_3S+k_5)S +\\
&+[k_{-1}k_{-2}k_3 + (k_{-3}+k_4)k_5]S +\\
&+(k_{-1}+k_2)(k_{-3}+k_4)k_5 + k_{-1}k_{-2}k_5\}^{-1}.
\end{aligned} \tag{7,73}$$

Эта функция имеет такой же вид, как и (7,60), т. е.

$$v = \frac{AS^2+BS}{CS^2+DS+K}, \tag{7,74}$$

и, следовательно, может обладать особенностями. «Кооперативность» исчезает при $k_3 = 0$. В этом случае v не зависит от k_5. При $k_5 = 0$ кооперативность также отсутствует и скорость реакции не зависит от k_3. Она, естественно, обращается в нуль и при $k_2 = 0$ и при $k_4 = 0$. S-образная кривая скорости может возникать при этом механизме независимо от наличия четвертичной структуры. Тем не менее значительные изменения четвертичной структуры при оксигенации гемоглобина (см. стр. 430) указывают на непосредственную ее роль в кооперативном поведении белка.

Приведенный расчет имеет лишь иллюстративное значение. Неравновесные ферментативные процессы требуют специального исследования.

С явлением аллостеризма, с кооперативными свойствами олигомерных белков, играющих регуляторную роль, приходится, по-видимому, встречаться во многих биологических процессах. Есть основания думать, что аллостерическими свойствами обладают функциональные белки мембран и сократительные белки. Аллостеризм представляет собой важнейший механизм обратной связи на молекулярном уровне.

§ 7.6. КИНЕТИКА СЛОЖНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Решение кинетических задач для сложных химических реакций, в том числе и ферментативных, требует даже в стационарном случае упрощающих алгоритмов. Структурные методы анализа сложных реакций развивались Швабом [84], Хориути [85], Христиансеном [86], Семеновым [87]. Применительно к стационарным ферментативным реакциям эффективный алгоритм был предложен Кингом и Альтманом [88] и применен к ряду конкретных проблем [89—91]. Основываясь на этом алгоритме, Клеланд [92] предложил номенклатуру многосубстратных реакций и наглядный способ их изображения. Однако метод Кинга и Альтмана и способ Клеланда практически неприменимы в сложных случаях. Наилучший в настоящее время алгоритм основан на применении *теории графов*. Графом в математике называется топологическая схема, построенная из узловых точек и соединяющих их линий [93—95]. Теория ненаправленных графов впервые использована при расчете химических реакций в работах Темкина [96]. В применении к ферментативным реакциям метод направленных графов развит в работах [97]. Направленный граф есть совокупность узлов, соединенных направленными линиями [93]. Такие графы применимы к решению ряда задач, относящихся к разветвленным и направленным потокам вещества, зарядов или информации. Теория графов весьма эффективна в электро- и радиотехнике [98—100].

Пусть ферментативная реакция протекает с образованием $n+1$ ферментных комплексов EX_i, включая свободный фермент, т. е. $i = 0, 1, \ldots, n$. Сопоставим с каждым комплексом узел графа i, j и т. д., а с каждой стадией взаимодействия — две противоположно направленные ветви, если стадия обратима, или одну направленную ветвь, если стадия необратима. Каждую ветвь охарактеризуем ее величиной — вероятностью осуществления данной стадии w_{ij}, равной константе скорости k_{ij} или константе k_{ij}, умноженной на концентрацию лиганда в стадиях взаимодействия фермента с лигандом. Скорость стадии v_{ij} вдоль ветви $i \to j$ равна

$$v_{ij} = [EX_i] w_{ij}, \tag{7,75}$$

где $[EX_i]$ — концентрация комплекса EX_i. В каждом узле соблюдается условие непрерывности, т. е.

$$[EX_i] \sum_{j \neq i} w_{ij} = \sum_{j \neq i} [EX_j] w_{ji}. \tag{7,76}$$

Это условие эквивалентно условию стационарности реакции.

Рассмотрим в качестве примера реакцию с участием одного субстрата S и одного модификатора M, исследованную Кингом и Альтманом [88]. Уравнения реакции имеют вид

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_\beta} E + P,$$

$$E + M \underset{k_8}{\overset{k_7}{\rightleftarrows}} EM,$$

$$ES + M \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} EMS \xrightarrow{k_\alpha} EM + P,$$

$$EM + S \underset{k_6}{\overset{k_5}{\rightleftarrows}} EMS.$$

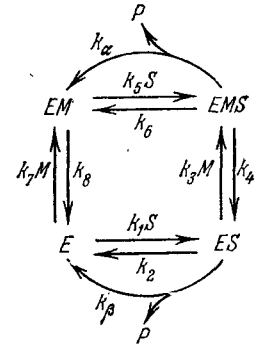


Рис. 7.31. Граф реакции E с S и M.

Граф для стационарной системы показан на рис. 7.31. Нахождение стационарной скорости производится по простым правилам без громоздких расчетов. Определим некоторые понятия.

Путем называется незамкнутая последовательность *ветвей*, направленных в одну сторону. Так, в нашем случае из узла ES в узел EM ведут четыре пути, величины которых G равны произведению величин ветвей вдоль пути. Имеем

$$G^{(1)} = k_2 k_7 M, \quad G^{(2)} = k_\beta k_7 M,$$
$$G^{(3)} = k_3 M k_6, \quad G^{(4)} = k_3 M k_\alpha.$$

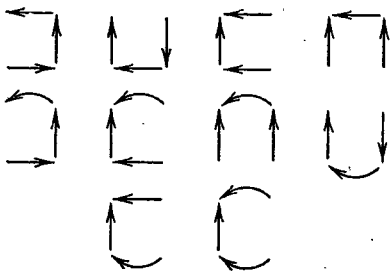


Рис. 7.32. Деревья графа.

Деревом графа, направленным в данный узел, называется совокупность ветвей, соединяющих все узлы графа без образования замкнутых циклов и направленных в этот узел. Так, в узел EM направлено 10 деревьев (рис. 7.32).

Циклом называется непрерывная последовательность ветвей, направленных в одну сторону. *Определителем* узла i называется сумма величин всех деревьев, направленных в этот узел.

Стационарная скорость ферментативной реакции выражается через определители графа следующим образом:

$$v = E \frac{\sum_i k_i D_i}{\sum_i D_i}, \qquad (7,77)$$

где E — общая концентрация фермента, D_i — определитель узла i, k_i — константы скорости образования продукта в i-м узле,

Суммирование в знаменателе ведется по всем узлам графа, в числителе — по узлам, отвечающим комплексам, из которых выделяется продукт. Это правило совпадает с предложенным Кингом и Альтманом [88], но метод графов позволяет резко упростить решение задачи, уменьшив число деревьев. Метод направленных графов обладает также рядом преимуществ по сравнению с методом ненаправленных графов Темкина [96], так как дает возможность находить количественные зависимости по простым правилам без решения уравнений.

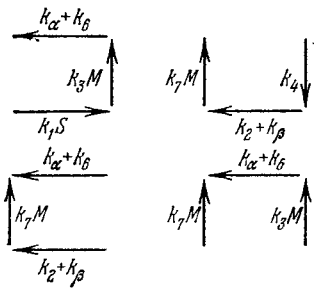


Рис. 7.33. Основные деревья графа.

Упрощение вычисления v проводится прежде всего путем слияния ветвей графа $i \to j$, если таких ветвей несколько (N). Они могут быть заменены одной ветвью с величиной

$$w_{ij} = \sum_{m=1}^{N} w_{ij}^{(m)}. \qquad (7,78)$$

Так, в нашем случае (см. рис. 7.31) суммарная ветвь $EMS \to EM$ имеет величину $k_\alpha + k_6$, ветвь $ES \to E$ — величину $k_\beta + k_2$. Вместо 10 получаем 4 дерева (рис. 7.33).

Определители узлов различаются по путям. Рассмотрим D_i. Выберем некоторый вспомогательный узел j и рассмотрим все пути $j \to i$ с величинами $G_{ji}^{(1)}$, $G_{ji}^{(2)}$, ... Если сжать путь в точку, граф упростится. Обозначим определители графов, полученных при таком слиянии, через $D_{ji}^{(1)}$, $D_{ji}^{(2)}$, ... соответственно для каждого из слитых в один узел путей $G_{ji}^{(1)}$, $G_{ji}^{(2)}$, ... Тогда определитель D_i узла i равен

$$D_i = \sum_m G_{ji}^{(m)} D_{ji}^{(m)}. \qquad (7,79)$$

Для примера вычислим D_{EM} нашего графа. Выберем вспомогательный узел ES. С учетом сложения параллельных ветвей находим два пути $ES \to E \to EM$ и $ES \to EMS \to EM$ с величинами

$$G^{(1)} = (k_\beta + k_2)\, k_7 M \quad \text{и} \quad G^{(2)} = k_3 M\, (k_\alpha + k_6).$$

После сжатия этих путей в точку получим графы с определителями

$$D^{(1)} = k_\alpha + k_6 + k_4, \quad D^{(2)} = k_7 M + k_1 S.$$

Поясним нахождение этих путей и деревьев графически (рис. 7.34). Пунктирными стрелками показаны пути из ES в EM,

сплошными — определители подграфов, оставшихся после слияния путей в точку (деревья, направленные в слитый узел). Каждый такой подграф состоит из двух параллельных ветвей, величины которых складываются. Получаем

$$D_{EM} = G^{(1)}D^{(1)} + G^{(2)}D^{(2)} = (k_2 + k_\beta)\, k_7 M\, (k_\alpha + k_6 + k_4) + \\ + k_3 M\, (k_\alpha + k_6)\, (k_7 M + k_1 S).$$

Разложение по путям при вычислении D_{EM} позволяет ограничиться только двумя членами вместо десяти по правилу Кинга

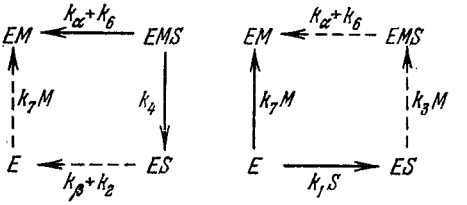


Рис. 7.34. Нахождение путей и деревьев.

и Альтмана. Остальные определители находят аналогичным образом. Окончательно имеем

$$v = E\frac{k_\beta D_{ES} + k_\alpha D_{EMS}}{D_E + D_{ES} + D_{EM} + D_{EMS}}, \qquad (7{,}80)$$

где

$$D_E = (k_\alpha + k_5)\, k_7\, (k_\beta + k_2 + k_3 M) + k_4\, (k_\beta + k_2)\, (k_6 S + k_7),$$
$$D_{ES} = k_1 k_7 S\, (k_\alpha + k_4 + k_5) + k_4 k_6 S\, (k_8 M + k_1 S),$$
$$D_{EM} = (k_2 + k_\beta)\, k_7 M\, (k_\alpha + k_4 + k_6) + k_3 M\, (k_\alpha + k_6)\, (k_7 M + k_1 S),$$
$$D_{EMS} = k_8 M k_6 S\, (k_\beta + k_2 + k_3 M) + k_1 S k_3 M\, (k_8 S + k_7).$$

Дальнейшее усовершенствование некоторых деталей метода, развитого в [97], было проведено в работе Фромма [101].

В многостадийной ферментативной реакции некоторые стадии могут идти быстрее, чем остальные. В соответствующих подграфах стационарной системы устанавливается квазиравновесие. Это позволяет упростить вычисление скорости [102]. Можно выделить подграф, соответствующий быстрому установлению равновесия, — часть графа, состоящую только из быстрых стадий и отделенную от остальных частей медленными стадиями. Если скорость образования фермент-субстратного комплекса значительно превышает скорость появления продуктов, то имеется лишь один подграф быстрого равновесия, содержащий узлы,

изображающие комплексы. При расчете оказывается возможным пренебречь медленными стадиями, поскольку деревья, включающие эти стадии, имеют малые величины. Скорость реакции выражается через константы равновесия и константы скорости превращения фермент-субстратных комплексов в фермент-продуктные и наоборот. Если стадия превращения является лимитирующей, то концентрация комплексов определяется голько константами равновесия. Оказывается возможным воспользоваться *диаграммным методом* [103, 104], представляющим дальнейшее упрощение метода графов. Диаграммный метод развит применительно к реакциям с одним и несколькими выходами (т. е. с несколькими комплексами, из которых получается продукт), детально разработаны правила, упрощающие расчет. Метод с успехом используется для ряда сложных реакций, в частности для реакций с участием изоферментов. Диаграммный метод, описанный в цитированных выше работах, имеет самостоятельное значение.

Механизмы быстрого равновесия могут быть однозначно восстановлены по экспериментальным данным о зависимости скоростей реакции от концентраций лигандов [105, 106].

Метод графов позволяет обобщить различные модели АСФ [65, 74, 75]. Все эти модели можно представить единым графом, который однозначно определяется по зависимости начальной стационарной скорости от концентраций лигандов.

Рассмотрим связывание одного лиганда несколькими центрами фермента. В простейшем случае двух идентичных центров граф быстрого квазиравновесного связывания субстрата с последующим медленным его превращением в продукт имеет вид

$$E \overset{{}^{2}/_{1}K_1S}{\longrightarrow} ES \underset{k_i}{\overset{{}^{1}/_{2}K_2S}{\rightleftarrows}} ES_2, \qquad (7{,}81)$$

здесь K_1, K_2 — константы квазиравновесия для быстрых стадий, k_1, k_2 — константы скорости для медленных стадий. Коэффициенты ${}^{2}/_{1}$ и ${}^{1}/_{2}$ означают, что в первой стадии может быть занят один из двух свободных центров и освобожден один занятый, а во второй — может быть занят один свободный центр и освобожден один из двух занятых. В этих обозначениях получаем

$$v = 2E\,\frac{k_1K_1S + k_2K_1K_2S^2}{1 + 2K_1S + K_1K_2S^2}, \qquad (7{,}82)$$

что эквивалентно (7,60). Граф (7,81) можно полностью и однозначно восстановить по зависимости $v(S)$. Зависимость формы кривой от значений констант рассмотрена на стр. 456. Граф для фермента с четырьмя идентичными центрами содержит 16 узлов, однако старшая степень S в выражении для v не превышает 4. Поэтому эквивалентный граф с минимальным числом ветвей

представляется цепью из четырех стадий связывания субстрата

$$E \xrightarrow{4/1K_1S} ES \overset{k_1}{\uparrow} \xrightarrow{3/2K_2S} ES_2 \overset{2k_2}{\uparrow} \xrightarrow{2/3K_3S} ES_3 \overset{3k_3}{\uparrow} \xrightarrow{1/4K_4S} ES_4 \overset{4k_4}{\uparrow}. \quad (7,83)$$

Уравнение для скорости имеет вид

$$v = 4E\,\frac{k_1K_1S + 3k_2K_1K_2S^2 + 3k_3K_1K_2K_3S^3 + k_4K_1K_2K_3K_4S^4}{1 + 4K_1S + 6K_1K_2S^2 + 4K_1K_2K_3S^3 + K_1K_2K_3K_4S^4}. \quad (7,84)$$

Различным моделям тетрамерного фермента, рассмотренным в [13] (тетраэдр, квадрат и др.), соответствует это уравнение

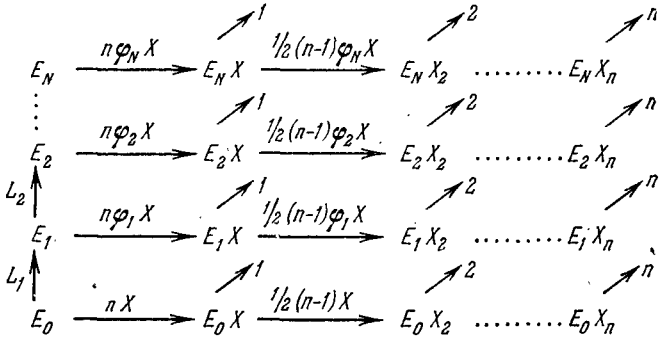


Рис. 7.35. Граф для системы с косвенной кооперативностью.

с различными величинами констант. Такие модели можно представить единым графом (7,83), однозначно восстанавливаемым по экспериментальной зависимости $v(S)$.

В общем случае n идентичных центров имеем

$$E \xrightarrow{(n/1)K_1S} ES \overset{k_1}{\uparrow} \xrightarrow{1/2(n-1)K_2S} ES_2 \overset{2k_2}{\uparrow} \longrightarrow \ldots$$

$$\ldots \longrightarrow ES_{n-1} \overset{(n-1)k_{n-1}}{\uparrow} \xrightarrow{(1/n)K_nS} ES_n \overset{nk_n}{\uparrow}. \quad (7,85)$$

Модель МУШ можно представить таким графом с определенным законом возрастания констант K_i. Тем самым, эта модель эквивалентна модели прямой кооперативности Кошланда и соавторов при положительной кооперативности. Предположим, что фермент может находиться в $N+1$ конформационных состояниях $E_0, E_1, \ldots, E_N$. Константы равновесия превращений $E_0 \rightleftarrows E_1$, $E_1 \rightleftarrows E_2$ и т. д. равны соответственно L_1, L_2 и т. д. Константы ассоциации лиганда для одного центра в состояниях $E_0, E_1, \ldots, E_i$ равны соответственно $\varphi_1 K, \ldots, \varphi_i K$. Константы скоростей медленных стадий во всех состояниях E_i одинаковы. Граф имеет вид, показанный на рис. 7.35. Для такого дерева находим v, определив пути из узла E_0 во все узлы графа (рис. 7.35).

Можно показать, что константы K_i связаны с параметрами L_i и φ_i равенством [107]

$$\frac{K_{i+1}}{K_i} = \frac{\left(\sum_{m=0}^{N} a_m^{i-1}\right)\left(\sum_{m=0}^{N} a_m^{i+1}\right)}{\left(\sum_{m=0}^{N} a_m^{i}\right)^2}, \qquad (7,86)$$

где $a_m = \varphi_m \prod_{j=1}^{m} L_j$ для $m = 1, 2, \ldots,$ и $a_0 = 1$. К этому уравнению можно применить неравенство Коши — Буняковского, из которого следует, что $K_1 \leqslant K_2 \leqslant K_3 \leqslant \ldots \leqslant K_n$.

При наличии лишь двух конформаций E_0 и E_1 (7,86) имеет вид

$$\frac{K_i}{K_n} = \frac{L_1\varphi_1^i + 1}{L_1\varphi_1^{i-1} + 1}. \qquad (7,87)$$

Если лиганд связывается ферментом только в одном состоянии, то $\varphi_1 = 0$ и последнее соотношение переходит в

$$K_1/K_n = 1/(L_1 + 1) < 1, \quad K_{i\neq 1}/K_n \equiv 1.$$

Этот случай эквивалентен меньшему сродству к первой молекуле лиганда по сравнению с последующими, т. е. $K_1 < K_2 = K_3 = \ldots = K_n$.

При $K_1 = K$, $K_{i\neq 1} = \alpha K$

$$v = nkE\,\frac{x(1+x)^{n-1}}{\alpha - 1 + (1+x)^n}, \qquad (7,88)$$

где $x = \alpha KX$, α — параметр кооперативности. Если кооперативность положительна, $\alpha > 1$ и уравнение (7,88) подобно уравнению (7,66) теории МУШ при $g = 0$. Если $\alpha < 1$, кооперативность отрицательна (ср. [108]) и уравнение (7,88) уже нельзя получить из модели МУШ, в которой $(\alpha - 1)$ — положительная аллостерическая константа. Это уравнение является общим.

Таким образом, модели квазиравновесных реакций для ферментов с любым числом центров представляются единым графом, по соотношению параметров которого можно установить пригодность той или иной модели. Однозначность восстановления графа по экспериментальной кривой зависит от точности эксперимента (ср. [109]).

Прямые методы для выявления медленной стадии и, следовательно, для нахождения подграфов быстрого равновесия дают релаксационная (см. ниже) и предстационарная (см. [110]) кинетики. Вместе с тем некоторые критерии применимости квазиравновесного приближения можно получить из анализа кривой для начальной стационарной скорости и функции насыщения.

Для ряда ферментов наблюдаются кривые $v(S)$ с промежуточными плато (см., например, [111]). В рамках модели МУШ такие кривые получить нельзя. Напротив, они хорошо объясняются в предположении о сочетании положительной и отрицательной кооперативности [109]. Последняя для модели МУШ невозможна.

На кривых насыщения вообще не могут появляться промежуточные плато. Кривизна этих графиков имеет ограничения сверху и снизу (см. [112]). Число точек перегиба на кривых насыщения также ограничено числом центров: для $n = 1$ их нет, для $n = 2$ возможна только одна точка перегиба, для $n = 3$ — две, для $n = 4$ — три точки перегиба. Это легко показать, определяя число положительных корней многочлена методом Декарта (см. [113]). В отличие от функции насыщения график $v(S)$ может иметь экстремумы. Рассмотрим условия появления промежуточных максимумов $v(S)$ для тетрамерного фермента. Положим для простоты, что все константы K_i одинаковы, т. е.

$$v = 4E\frac{k_1\sigma + 3k_2\sigma^2 + 3k_3\sigma^3 + k_4\sigma^4}{(1+\sigma)^4}, \qquad (7{,}89)$$

где $\sigma = KS$. Найдем $v' \equiv dv/d\sigma$. Уравнение $v' = 0$ имеет вид

$$\sigma^6(4k_4 - 3k_3) + 6\sigma^5(2k_4 - k_2) + 3\sigma^4[(4k_4 - k_1) + 2(3k_3 - 2k_2)] + \\ + 4\sigma^3[2(3k_3 - k_1) + k_4] + 3\sigma^2[2(2k_2 - k_1) + 3k_3] + 6k_2\sigma + k_1 = 0. \qquad (7{,}90)$$

Это уравнение, согласно правилу Декарта, имеет наибольшее число положительных корней, если знаки коэффициентов чередуются, т. е. имеем $- + - + - + -$; тогда $k_4 < {}^3/_4 k_3$, $k_4 > {}^1/_2 k_2$, $4k_4 - k_1 < 2(2k_2 - 3k_3)$, $k_4 > 2(k_1 - 3k_3)$, $3k_3 < 2(k_1 - 2k_2)$. Следовательно, уравнение (7,90) не может иметь более пяти положительных корней. Однако, как легко показать, эта система неравенств несовместна, и в действительности может быть лишь три изменения знака. Следовательно, график $v(\sigma)$ (см. (7,89)) может иметь не более трех экстремумов — два промежуточных максимума и один минимум. Если константы k_i изменяются с i монотонно, то на кривой $v(\sigma)$ может существовать лишь один максимум при любом числе центров.

Дальнейшее развитие стационарной кинетики реакций, катализируемых кооперативными ферментами, как при наличии, так и в отсутствие детального равновесия, а также анализ экспериментальных кривых можно найти в работах Гольдштейна и др. [107, 114, 115], Курганова и др. [78—80, 116, 117], Магаршака и др. [102—106].

Теория графов эффективно применяется и к исследованию кинетики ферментативных реакций на предстационарных

стадиях [118]. В этом случае производные концентраций ферментных комплексов по времени не равны нулю. Имеем уравнения

$$\frac{d[EX]}{dt} = \sum_{j \neq i}^{n} w_{ji}[EX_j] - [EX_i] \sum_{j \neq i}^{n} w_{ij}. \qquad (7,91)$$

В предстационарном режиме предполагается, что можно пренебречь зависимостью от времени концентраций лигандов, так как они мало меняются по сравнению с $[EX_i]$. Поэтому w_{ij} в уравнениях (7,91) постоянны.

Применение интегрального преобразования Лапласа—Карсона к системе (7,91) превращает ее в систему алгебраических уравнений, которую можно решать методом графов [33, 116, 118].

Введем обозначение $[EX_i]/[E] = x_i(t)$, где $[E]$ — общая концентрация фермента. Имеем трансформанту $x_i(t)$:

$$x_i^*(z) = z \int_0^\infty \exp(-zt)\, x_i(t)\, dt, \quad \text{или} \quad x_i(t) \leftrightarrow x_i^*(z), \qquad (7,92)$$

$$\frac{dx_i}{dt} \leftrightarrow zx_i^* - zx_i(0); \qquad (7,93)$$

здесь z (комплексная переменная) — трансформированное время t. Начальные значения относительных концентраций комплексов зададим в виде $x_i(0) = \delta_{i0}$. В результате преобразования системы (7,91) принимает форму

$$\left.\begin{aligned} -z &= -x_0^*(w_{00} + z) + x_1^* w_{10} + x_2^* w_{20} + \ldots + x_n^* w_{n0}, \\ 0 &= x_0^* w_{01} - x_1^*(w_{11} + z) + x_2^* w_{21} + \ldots + x_n^* w_{n1}, \\ &\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \\ 0 &= x_0^* w_{0n} + x_1^* w_{1n} + x_2^* w_{2n} + \ldots - x_n^*(w_{nn} + z), \end{aligned}\right\} \qquad (7,94)$$

где $w_{ii} = \sum_{j \neq i} w_{ij}$. Условие постоянства общей концентрации фермента в применении к трансформантам имеет вид

$$\sum_{i=0}^{n} x_i^* = 1.$$

Следовательно, первое уравнение системы (7,94) принимает форму

$$0 = -x_0^* w_{00} + x_1^*(w_{10} + z) + \ldots + x_n^*(w_{n0} + z)$$

и вся система записывается следующим образом:

$$\sum_{j=0}^{n}{}' x_j^* w_{ji}^* = x_i^* \sum_{j=0}^{n}{}' w_{ij}^*, \quad i = 0, 1, \ldots, n, \qquad (7,95)$$

где

$$w_{ij}^* = \begin{cases} w_{ij}, & j \neq 0, \\ w_{i0} + z, & j = 0. \end{cases}$$

Мы получили систему уравнений, аналогичную по форме системе уравнений стационарной кинетики. Граф предстационарной кинетики, в отличие от графа стационарной кинетики, содержат добавочные ветви величины z, направленные из каждого узла графа в узел, соответствующий свободному ферменту. Расчет по методу графов дает трансформанту скорости реакции v^*, оригинал v получается из v^* стандартными методами операционного исчисления. При необратимом образовании продукта

$$v^*(z) = \frac{\sum\limits_i k_i D_i^*}{\sum\limits_i D_i^*}, \tag{7,96}$$

где D_i^* — определители графа предстационарной системы реакций. Иначе

$$v^* = \sum_i k_i x_i^*,$$

где $x_i^* = D_i^* \Big/ \sum\limits_j D_j^*$. Функции x_i^* имеют вид

$$x_i^*(z) = \frac{\delta_{i0} z^n + z^{n-1} b_{n-1}^{(i)} + \ldots + b_0^{(i)}}{z^n + z^{n-1} a_{n-1} + \ldots + a_0}. \tag{7,97}$$

Здесь степень полинома в знаменателе для графа с $n+1$ узлами равна n, так как число z-ветвей в таком графе n. Старшая степень z^n определяется величиной дерева, составленного из z-ветвей, направленных в узел 0. Такое дерево — единственное. Величина каждой его ветви равна z, и поэтому коэффициенты при z в числителе и знаменателе (7,97) равны 1. Коэффициенты a и $b^{(i)}$ выражаются через w_{ij}. Стационарное решение получается из (7,97) при $t \to \infty$, т. е. при $z \to 0$. Следовательно,

$$x_i(\infty) = x_i^*(0) = b_0^{(i)}/a_0 = D_i \Big/ \sum_i D_i. \tag{7,98}$$

Каждое слагаемое в числителе и знаменателе (7,97) есть сумма деревьев с числом ветвей (включая z-ветви), равным n. Поэтому a_{n-1} и $b_{n-1}^{(i)}$ — суммы некоторых ветвей графа без z-ветвей, a_{n-2} и $b^{(i)}$ — суммы парных произведений ветвей и т. д. a_{n-1} равно сумме всех ветвей графа без z-ветвей. Справедливы равенства

$$a_m = \sum_{i=0}^{n} b_m^{(i)}, \quad m = 0, 1, \ldots, n.$$

Рассмотрим в качестве примера случай кооперативного фермента, обладающего двумя идентичными центрами. В стационарном случае в отсутствие квазиравновесных стадий вместо

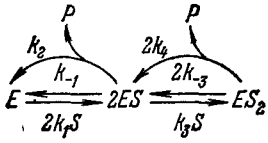


Рис. 7.36. Граф для двухцентровой системы (стациоиарная кинетика).

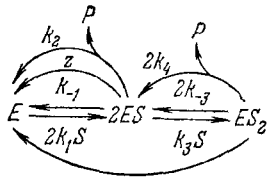


Рис. 7.37. Граф для двухцентровой системы (предстационарная кинетика).

(7,81) получаем упрощенный граф, показанный на рис. 7.36. Определители равны

$$D_1 = (k_2 + k_{-1})\,2\,(k_4 + k_{-3}), \quad D_2 = 2k_1S2\,(k_4 + k_{-3}), \quad D_3 = 2k_1Sk_3S$$

и для скорости реакции имеем

$$v = E\frac{2k_2D_2 + 2k_4D_3}{D_1 + D_2 + D_3} = 2E\frac{k_2K'S + k_4S^2}{KK' + 2K'S + S^2}, \qquad (7,99)$$

где $K = (k_{-1} + k_2)/k_1$, $K' = (k_{-3} + k_4)/k_3$. Мы получили уже знакомое выражение (ср. (7,60), (7,82)). В предстационарных условиях граф имеет вид, показанный на рис. 7.37. Соответствующие определители равны

$$D_1^* = (k_2 + k_{-1} + z)\,2\,(k_4 + k_{-3}) + z\,(k_{-1} + k_2 + z) + zk_3S,$$
$$D_2^* = 2k_1S2\,(k_{-3} + k_4) + z2k_1S_1, \quad D_3^* = 2k_1Sk_3S$$

и

$$v^*(z) = E\frac{2k_2D_2^* + 2k_4D_3^*}{D_1^* + D_2^* + D_3^*} = 2k_1k_2ES\frac{z + C}{z^2 + 2Az + B}, \qquad (7,100)$$

где

$$2A = 2k_4 + 2k_{-3} + k_{-1} + k_2 + k_3S + 2k_1S,$$
$$B = 2\,(k_2 + k_{-1})\,(k_4 + k_{-3}) + 4k_1S\,(k_4 + k_{-3}) + 2k_1k_3S^2,$$
$$C = 2\,(k_{-3} + k_4) + 2Sk_4k_3/k_2.$$

При $t \to \infty$ или $z \to 0$

$$v^*(0) = 2k_1k_2ESC/B = v.$$

В общем случае оригинал (7,100) равен

$$v(t) = v_{\text{стац}} - 2k_1k_2SE\left[\frac{z_1 + C}{z_1\,(z_2 - z_1)}\exp(z_1, t) + \frac{z_2 + C}{z_2\,(z_1 - z_2)}\exp(z_2t)\right], \qquad (7,101)$$

где $z_{1,2} = -A \pm \sqrt{A^2 - B}$ — корни соответствующего характеристического уравнения.

Если для сложной реакции справедлив принцип детального равновесия, то корни характеристического уравнения вещественны и отрицательны [119]. Такие реакции изображаются графами с разомкнутыми циклами, т. е. деревьями стадий, хотя общая схема реакции может содержать замкнутые циклы. Соответственно все реакции, графы которых представляются деревьями стадий, не могут привести к возникновению колебаний в предстационарном режиме. Если условие детального равновесия не выполняется, в системе могут возникать колебания. Трансформанта Лапласа — Карсона для скорости реакции является мероморфной функцией комплексного переменного z; корни ее характеристического многочлена лежат в левой полуплоскости комплексных чисел для всех ферментативных реакций. Поэтому ферментная система в предстационарном режиме устойчива и в ней могут возникать лишь затухающие колебания. Для их появления необходимо, чтобы граф реакции содержал цикл по крайней мере из трех стадий.

Дальнейшие подробности, относящиеся к применению теории графов в стационарной и предстационарной кинетике ферментативных реакций, изложены в цитированных выше оригинальных работах, в приложении 1 в [33] и в работе Гольдштейна [115]. В кинетике ферментативных процессов метод направленных графов является удобным алгоритмом. Вместе с тем он позволяет выявить глубокую аналогию, существующую между процессами в сложных электронных цепях и ферментативными реакциями. Системы обоих типов работают на сигналах, связанных сходными функциональными зависимостями. В электронных цепях сигналами являются напряжения и токи, в ферментативных реакциях — концентрации и скорости стадий. Аналогом закона Ома служит закон действующих масс. Однако закон Ома требует учета разности напряжений на концах двухполюсников, а закон действующих масс учитывает концентрацию ферментного комплекса (аналог напряжения) лишь на входе двухполюсника (ветви графа). Это отличие определяет неприменимость графических правил, разработанных для электрических цепей, непосредственно к ферментативным реакциям и затрудняет прямое электрическое моделирование реакций [120, 121].

§ 7.7. ХИМИЧЕСКАЯ РЕЛАКСАЦИЯ

Механизм действия ферментов эффективно изучается методами химической релаксации, впервые развитыми Эйгеном [122]. Система выводится из равновесного или стационарного состояния быстрыми изменениями внешнего параметра и изучается

кинетика ее приближения к новому равновесному или стационарному состоянию. Доступны измерению времена релаксации τ вплоть до 10^{-10} *сек*. Применяются методы одномоментного и стационарного возмущений. Чаще всего пользуются скачком концентрации и температуры, возмущением электрическим полем, воздействием ультразвуком. Времена релаксации измеряются посредством скоростной спектрофотометрии. Обзоры экспериментальных основ и теорий методов даны в [123—126].

Релаксационные методы позволяют определять весь набор констант скоростей сложного процесса. Основное преимущество методов состоит в том, что при малых возмущениях равновесного или стационарного состояния жидкой смеси реагентов нелинейные кинетические уравнения линеаризуются.

Рассмотрим простейшую одностадийную реакцию (M — лиганд) $F_0 + M \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} F_1$. Кинетическое уравнение имеет вид

$$\dot{F}_0 = -k_1 F_0 M + k_{-1} F_1. \qquad (7{,}102)$$

В стационарном состоянии $\dot{F}_0 = \dot{F}_1 = \dot{M} = 0$. При отклонениях от стационарных концентраций $\bar{F}_0$, $\bar{F}_1$, $\bar{M}$

$$F_0 = \bar{F}_0 + \delta F_0, \quad M = \bar{M} + \delta M, \quad F_1 = \bar{F}_1 + \delta F_1.$$

Имеем

$$\frac{d(\delta F_0)}{dt} = -k_1 \bar{F}_0 \delta M - k_1 \bar{M} \delta F_0 - k_1 \delta F_0 \delta M + k_{-1} \delta F_1. \qquad (7{,}103)$$

При малом возмущении пренебрегаем $k_1 \delta F_0 \delta M$. Из закона сохранения массы следует, что $\delta F_0 = \delta M = -\delta F_1$, и можно написать

$$\frac{d(\delta M)}{dt} = -(k_1 F_0 + k_1 M + k_{-1}) \delta M, \qquad (7{,}104)$$

или

$$\tau \frac{d(\delta M)}{dt} + \delta M = 0, \qquad (7{,}105)$$

где

$$\tau^{-1} = k_1 (F_0 + M) + k_{-1}.$$

Решение (7,105) имеет вид

$$\delta M = (\delta M)_0 \exp(-t/\tau); \qquad (7{,}106)$$

здесь $(\delta M)_0$ — значение δM при $t = 0$. Измерение τ при разных концентрациях F_0 и M позволяет определить k_1 и k_{-1}.

Рассмотрим более сложные модели ферментативных реакций.

Пусть фермент взаимодействует с неким модифицирующим, но не реагирующим лигандом M. Имеем для двухстадийной реакции модификации

$$F_0 + M \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} F_1 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} F_2,$$

где F_1 и F_2 — два модифицированных комплекса фермент — лиганд. Методы стационарной кинетики не позволяют определить четыре константы скорости.

Напишем соответствующие кинетические уравнения

$$\dot{M} = -k_1F_0M + k_{-1}F_1, \quad \dot{F}_1 = k_1F_0M - (k_{-1} + k_2)F_1 + k_{-2}F_2. \quad (7,107)$$

Введем малые отклонения x_i от стационарных концентраций:

$$M = \overline{M} + x_1, \quad F_0 = \overline{F}_0 + x_1, \quad F_1 = \overline{F}_1 + x_2, \quad F_2 = \overline{F}_2 - (x_1 + x_2).$$

Получаем в пренебрежении членами второго порядка относительно x_1, x_2 два линейных уравнения

$$\dot{x}_1 = \alpha_{11}x_1 + \alpha_{12}x_2, \quad \dot{x}_2 = \alpha_{21}x_1 + \alpha_{22}x_2, \quad (7,108)$$

где

$$\alpha_{11} = -k_1(\overline{F}_0 + \overline{M}), \quad \alpha_{12} = k_{-1}, \quad \alpha_{21} = k_1(\overline{F}_0 + \overline{M}) - k_{-2},$$
$$\alpha_{22} = -(k_{-1} + k_2 + k_{-2}).$$

Решение системы (7,108) записывается следующим образом:

$$x_1 = x_{10}\exp(-t/\tau), \quad x_2 = x_{20}\exp(-t/\tau).$$

Характеристическое уравнение имеет вид

$$\begin{vmatrix} \alpha_{11} + \tau^{-1} & \alpha_{12} \\ \alpha_{21} & \alpha_{22} + \tau^{-1} \end{vmatrix} = 0, \quad (7,109)$$

и мы получаем два вещественных значения

$$\tau_{1,2}^{-1} = -\frac{\alpha_{11} + \alpha_{22}}{2}\left[1 \pm \left(1 - \frac{4(\alpha_{11}\alpha_{22} - \alpha_{12}\alpha_{21})}{(\alpha_{11} + \alpha_{22})^2}\right)^{1/2}\right], \quad (7,110)$$

или

$$\left.\begin{aligned} \tau_1^{-1} + \tau_2^{-1} &= -(\alpha_{11} + \alpha_{22}) = k_1(F_0 + M) + k_{-1} + k_2 + k_{-2}, \\ \tau_1^{-1}\tau_2^{-1} &= \alpha_{11}\alpha_{22} - \alpha_{12}\alpha_{21} = \\ &= k_1(k_2 + k_{-2})(F_0 + M) + k_{-1}k_{-2}. \end{aligned}\right\} \quad (7,111)$$

Эти две комбинации τ_1 и τ_2 непосредственно дают все четыре константы скорости. Метод был применен для определения констант скорости в реакции α-химотрипсина с профлавином [126].

В общем случае мы получаем систему n линеаризованных кинетических уравнений относительно $x_1, x_2, \ldots, x_n$ и

соответственно характеристическое уравнение n-го порядка, дающее n значений τ_i. Общее решение трудно интерпретировать, но если величины τ_i при разных i сильно различаются, то оно упрощается. Эйген рассматривает в качестве примера простую ферментативную реакцию

$$F_0 + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} F_1 \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} F_2 \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} F_0 + P,$$

где F_1 — комплекс фермент — субстрат, F_2 — комплекс фермент — продукт. Предположим, что стадии 1 и 3 быстрые, а стадия $F_1 \rightleftarrows F_2$ медленная, лимитирующая превращение $S \rightarrow P$. Для быстрых стадий линеаризованные уравнения имеют прежнюю форму (7,108), где

$$x_1 = \delta S, \quad -x_1 = \delta F_1, \quad x_2 = \delta P, \quad -x_2 = \delta F_2, \quad x_1 + x_2 = \delta F_0,$$

и

$$\alpha_{11} = -[k_1(F_0 + S) + k_{-1}], \quad \alpha_{12} = -k_1 S, \quad \alpha_{21} = -k_{-3} P,$$
$$\alpha_{22} = -[k_{-3}(F_0 + P) + k_3].$$

Решение имеет вид

$$\left.\begin{aligned} \tau_1^{-1} + \tau_2^{-1} &= (k_1 + k_{-3}) F_0 + (k_1 + k_{-3}K) S + k_{-1} + k_3, \\ \tau_1^{-1}\tau_2^{-1} &= k_1 k_{-3} F_0^2 + k_1 k_{-3}(1 + K) F_0 S + \\ &+ (k_1 k_3 + k_{-1} k_{-3}) F_0 + (k_1 k_3 + k_{-1} k_{-3} K) S + k_{-1} k_3, \end{aligned}\right\} \quad (7,112)$$

где K — константа равновесия реакции $S \rightleftarrows P$.

Уравнение для константы скорости медленной стадии имеет вид

$$\frac{d(S + F_1)}{dt} = -\frac{d(P + F_2)}{dt} = -k_2 F_1 + k_{-2} F_2. \quad (7,113)$$

Ему отвечает одно время релаксации

$$\tau_3^{-1} = \frac{k_2}{1 + (K_1/F_0) f_2} + \frac{k_{-2}}{1 + (K_2/F_0) f_1}, \quad (7,114)$$

где K_1, K_2 — константы равновесия реакций связываний, т. е. образования F_1 из F_0 и S и F_2 из F_0 и P,

$$f_1 = \frac{K_1 + F_0 + S + PK_1/K_2}{K_1 + F_0 + S + P}, \quad f_2 = \frac{K_2 + F_0 + S + PK_2/K_1}{K_2 + F_0 + S + P}. \quad (7,115)$$

Метод релаксационной кинетики позволяет определить все константы.

Если скорости всех стадий близки по порядку величины, ситуация усложняется. В этом случае оказывается целесообразным рассматривать усредненные значения τ, также дающие ценную информацию о константах скорости [125, 127].

При малых концентрациях фермента реализуются стационарные значения концентраций промежуточных комплексов. Релаксационный спектр сводится к одному значению τ, характерным образом зависящему от S.

Таким образом, релаксационная методика дает возможность получения детальной информации о промежуточных комплексах и соответствующих константах скоростей.

Обратимся теперь к спектру времен релаксации для аллостерического белка, также исследованному Эйгеном [125].

Согласно теории МУШ (см. стр. 457) аллостерический фермент характеризуется тремя параметрами — константами связывания лиганда в R- и T-состояниях и параметром, описывающим конформационный переход $R \rightleftarrows T$. Соответственно система должна иметь не меньше трех временны́х постоянных. Предположим, что переход $R \rightleftarrows T$ есть наиболее медленная стадия. Связывание субъединицами в R-состоянии характеризуется одной наблюдаемой временно́й постоянной τ_1, соответствующей реакции свободных молекул субстрата с незанятыми R-центрами. В случае тетрамера для концентрации свободных связывающих центров в R-состояниях имеем

$$\varphi_R = 4R_0 + 3R_1 + 2R_2 + R_3.$$

Величина $1/\tau_1$ должна быть функцией суммы S и φ_R. То же относится к T-состоянию тетрамера, характеризуемому τ_2. Оба равновесия сопряжены посредством S, тогда как центр в T-состоянии реагирует с субстратом и изменение его концентрации влияет на более быстрое связывание центром в R-состоянии. Релаксационный спектр n-мерного фермента был вычислен Эйгеном в предположении о постоянстве концентрации S (буфер) или более быстром установлении равновесия с R-состоянием, чем с T-состоянием, т. е. $n\tau_T^{-1} \ll \tau_R^{-1}$. Имеем

$$\varphi_R = nR_0 + (n-1)R_1 + (n-2)R_2 + \ldots + R_{n-1} \quad (7{,}116)$$

и при указанных условиях

$$\tau_{1R}^{-1} = k_A^R(S + \varphi_R) + k_D^R, \quad \tau_{2R}^{-1} = 2(k_A^R S + k_D^R), \ldots,$$
$$\tau_{nR}^{-1} = n(k_A^R S + k_D^R), \quad (7{,}117)$$

$$\tau_{1T}^{-1} = k_A^T(S + f_R\varphi_T) + k_D^T, \quad \tau_{2T}^{-1} = 2(k_A^T S + k_D^T), \ldots,$$
$$\tau_{nT}^{-1} = n(k_A^T S + k_D^T), \quad (7{,}118)$$

где k_A и k_D — константы скорости ассоциации с лигандом и диссоциации, φ_T аналогично φ_R,

$$f_R = \frac{K_R + S}{K_R + S + \varphi_R},$$

K_R — константа связывания для R-состояния.

Превращение $R \rightleftarrows T$ характеризуется одним временем релаксации $\tau_{конф}$, вообще говоря, зависящим от S. При малых S нет связывания, и система находится в T_0- и R_0-состояниях. При очень больших S центры насыщены и система находится в T_4- и R_4-состояниях. В этих двух случаях $\tau_{конф}$ не зависят от S, но различны. Если состояние T_0 более стабильно, чем R_0, но, напротив, R_4 более стабильно, чем T_4, то получается S-образный переход от одного значения $\tau_{конф}$ к другому. При $S = \text{const}$ имеем

$$\sum R_i \rightleftarrows \sum T_i,$$

$$\frac{d\sum R_i}{dt} = -k_0^{RT} R_0 + k_0^{TR} T_0 - k_1^{RT} R_1 + k_1^{TR} T_1 - \ldots \quad (7{,}119)$$

Как и выше, линеаризуем кинетические уравнения, вводя малые отклонения от стационарных концентраций δR_0 и т. д. Заменяя δR_0 на

$$\frac{\delta \sum R_i}{1 + \delta R_1/\delta R_0 + (\delta R_2/\delta R_1)(\delta R_1/\delta R_0) + \cdots}$$

и производя аналогичные замены для всех δR_i и δT_i, находим

$$\tau_{конф}^{-1} = \frac{k_0^{RT} + k_1^{RT}(\delta R_1/\delta R_0) + k_2^{RT}(\delta R_2/\delta R_1)(\delta R_1/\delta R_0) + \ldots}{1 + (\delta R_1/\delta R_0) + (\delta R_2/\delta R_1)(\delta R_1/\delta R_0) + \ldots} + \\ + \frac{k_0^{TR} + k_1^{TR}(\delta T_1/\delta T_0) + \ldots}{1 + (\delta T_1/\delta T_0) + \ldots}. \quad (7{,}120)$$

Расчет при $\delta S = 0$ дает приближенное значение

$$\tau_{конф}^{-1} = \left[\frac{k_0^{TR}}{(1 + S/K_T)^n} + \frac{k_0^{RT}}{(1 + S/K_R)^n}\right] f(S/K_T), \quad (7{,}121)$$

где

$$f\left(\frac{S}{K_T}\right) = \sum_{i=0}^{n} \alpha_i^T \frac{n!}{(n-i)!\, i!} \left(\frac{S}{K_T}\right)^i,$$

$\alpha_i^T \equiv k_i^{TR}/k_0^{TR}$. При $\alpha_i^T \to 1$ функция $f(S/K_T)$ принимает значение $(1 + S/K_T)^n$.

В предельных случаях находим:

если $S/K_T \ll 1$, $S/K_R \ll 1$, то $\tau^{-1} = k_0^{TR} + k_0^{RT}$,

если $S/K_T \ll 1$, $S/K_R \gg 1$, то $\tau^{-1} = k_0^{TR} + k_n^{RT}$,

если $S/K_T \gg 1$, $S/K_R \gg 1$, то $\tau^{-1} = k_n^{TR} + k_n^{RT}$.

Наличие первых двух релаксационных эффектов, для которых τ^{-1} линейно растет с концентрацией, дает детальную информацию о связывании в обоих состояниях. Третье значение τ ука-

зывает на конформационное превращение. Если $\tau_{конф}$ переходит от одного постоянного значения к другому, то имеются лишь две конформации. Резкость перехода характеризует кооперативность. Киршнер исследовал релаксационными методами D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФД) и действительно установил все отмеченные особенности релаксационного спектра в согласии с теорией МУШ. Эти данные не исключают, однако, альтернативной модели Кошланда и соавторов (см. стр. 460).

Недавно Шварц предложил теорию химической релаксации при кооперативных конформационных переходах в линейных биополимерах [128]. Исследована релаксация в переходах спираль — клубок в полипептидах на основе модели Изинга. Теория применима как к коротким, так и к длинным цепям. Показано, что конформационный переход контролируется наибольшим временем релаксации.

Очевидно, что именно изучение релаксационного спектра дает наиболее непосредственные сведения об ЭКВ, позволяя раздельно изучать быстрые и медленные движения в ФСК. Было бы особенно интересно исследовать оксигенацию гемоглобина с целью прямой проверки динамической модели, предложенной Перутцом (см. стр. 430). Можно думать, что широкое развитие релаксационных исследований — дело ближайшего будущего. Эффективные методы быстрых возмущений системы и скоростной регистрации релаксационных процессов успешно применяются [123—127, 129, 130, 129, 130], однако нет сомнений в том, что здесь имеется много неиспользованных возможностей.

Литература

1. *M. Perutz*, Proc. Roy. Soc. **B167**, 448 (1967).
2. *М. Вейсблут*, Физика гемоглобина, в сб. «Структура и связь», «Мир», 1969.
3. *A. Rossi-Fanelli, E. Antonini, A. Caputo*, Biochim. Biophys. Acta **35**, 93 (1959).
4. *T. Samejima, J. Yang*, J. Mol. Biol. **8**, 863 (1964).
5. *К. Бальхаузен*, Введение в теорию поля лигандов, «Мир», 1964.
6. *K. Ohno, Y. Tanable, F. Tasaki*, Theor. Chim. Acta **1**, 378 (1963).
7. *A. Veillard, B. Pullmann*, J. Theor. Biol. 8, 317 (1965).
8. *M. Zerner, M. Gouterman, H. Kobayashi*, Theor. Chim. Acta **6**, 363 (1966).
9. *Г. П. Гуринович, А. Н. Севченко, К. Н. Соловьев*, Спектроскопия хлорофиллов и родственных соединений, «Наука и техника», Минск, 1968.
10. *C. Johnson*, Physics Today **24**, 35 (1971).
11. *G. Lang, T. Asakura, T. Yonetani*, Biochim. Biophys. Acta **214**, 381 (1970).
12. *A. Hill*, J. Physiol. **40**, IV (1910).
13. *E. Antonini, A. Rossi-Fanelli, A. Caputo*, Arch. Biochem. Biophys. **97**, 343 (1962).
14. *G. Adair*, J. Biol. Chem. **63**, 529 (1925); Proc. Roy. Soc. **A109**, 282 (1925).
15. *L. Pauling*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **21**, 186 (1935).
16. *J. Wyman*, Adv. Protein Chem. **4**, 407 (1948).

17. *F. Roughton*, in «Haemoglobin», eds F. Roughton, J. Kendrew, Butterworths, 1949.
18. *D. Allen, K. Guthe, J. Wyman*, J. Biol. Chem. **187**, 393 (1950).
19. *G. Guidotti*, J. Biol. Chem. **242**, 3694 (1967).
20. *A. Rossi-Fanelli, E. Antonini, A. Caputo*, Adv. Protein Chem. **19**, 73 (1964).
21. *E. Antonini, M. Brunelli*, Ann. Rev. Biochem. **39**, 977 (1970).
22. *F. Roughton, A. Otis, R. Lyster*, Proc. Roy. Soc. **B144**, 29 (1955).
23. *M. Perutz*, Nature **228**, 726 (1970).
24. *M. Perutz, H. Muirhead, J. Cox, L. Godman*, Nature **219**, 139 (1968).
25. *Б. Атанасов*, Nature **233**, 560 (1971).
26. *Б. Атанасов*, Мол. биол. **4**, 51, 348 (1970).
27. *Е. А. Сабурова, Д. С. Маркович, М. В. Волькенштейн*, Мол. биол. **5**, 461 (1971).
28. *J. Wyman*, Adv. Protein Chem. **19**, 223 (1964); Quart. Rev. Biophys. **1**, 35 (1968).
29. *J. Wyman*, J. Mol. Biol. **11**, 631 (1965).
30. *J. Wyman*, J. Mol. Biol. **39**, 523 (1969).
31. *М. Фарадей*, Экспериментальные исследования по электричеству, т. 3, Изд-во АН СССР, 1959, стр. 13.
32. *М. В. Волькенштейн*, Молекулярная оптика, Гостехиздат, 1951.
33. *М. В. Волькенштейн*, Физика ферментов, «Наука», 1967.
34. *B. Briat, C. Djerassi*, Nature **217**, 918 (1968).
35. *Ю. А. Шаронов*, Оптика и спектроскопия **29**, 463 (1970).
36. *R. Serber*, Phys. Rev. **41**, 489 (1932).
37. *I. Tobias, W. Kautzmann*, J. Chem. Phys. **35**, 538 (1961).
38. *M. Groenewege*, Mol. Phys. **5**, 541 (1962).
39. *A. Buckingham, P. Stephens*, Ann. Rev. Phys. Chem. **17**, 399 (1967); в сб. «Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии», «Мир», 1970.
40. *D. Macaluso, O. Corbino*, Nuovo Cimento **8**, 257 (1898); **9**, 381 (1899).
41. *Р. Вуд*, Физическая оптика, ОНТИ, 1936.
42. *D. Schooley, E. Bunnenberg, C. Djerassi*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **53**, 579 (1965).
43. *Ю. А. Шаронов*, Оптика и спектроскопия **25**, 930 (1968).
44. *П. Шатц, А. Мак Кафри*, Успехи химии **40**, 1698 (1971).
45. *W. Voelter, G. Barth, R. Records, E. Bunnenberg, C. Djerassi*, J. Amer. Chem. Soc. **91**, 6165 (1969).
46. *W. Voelter, R. Records, E. Bunnenberg, C. Djerassi*, J. Amer. Chem. Soc. **90**, 6163 (1968).
47. *G. Barth, R. Records, E. Bunneberg, C. Djerassi, W. Voelter*, J. Amer. Chem. Soc. **93**, 254 (1971).
48. *C. Djerassi*, Лекция на Симпозиуме по химии природных соединений, Рига, 1970.
49. *V. Schashoua*, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 2109 (1964); **87**, 4044 (1965); Nature **203**, 972 (1964); Biochemistry **3**, 1719 (1964); Arch. Biochem. Biophys. **111**, 550 (1965).
50. *М. В. Волькенштейн, Ю. А. Шаронов, А. К. Шемелин*, Nature **209**, 709 (1966); Мол. биол. **1**, 467 (1967).
51. *Б. Атанасов, М. В. Волькенштейн, Ю. А. Шаронов, А. К. Шемелин*, Мол. биол. **1**, 477 (1967).
52. *М. В. Волькенштейн, Л. И. Говшовичус, Ю. А. Шаронов, А. К. Шемелин*, Мол. биол. **1**, 854 (1967).
53. *М. В. Волькенштейн, Ю. А. Шаронов, А. К. Шемелин*, Мол. биол. **2**, 864 (1968).
54. *Б. Атанасов, М. В. Волькенштейн, Ю. А. Шаронов*, Мол. биол. **3**, 518, 696, 804 (1969).

55. *Н. А. Шаронова, Ю. А. Шаронов, М. В. Волькенштейн*, Biochem. Biophys. Acta **271**, 65 (1972).
56. *А. М. Арутюнян, Ю. А. Шаронов*, Мол. биол. **7**, 587 (1973).
57. *Ю. А. Шаронов, Н. А. Шаронова*, FEBS Letters **27**, 221 (1972).
58. *G. Lang, W. Marshall*, Proc. Phys. Soc. **87**, 3 (1966).
59. *М. В. Волькенштейн*, Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 805 (1971).
60. *T. Li, B. Johnson*, Biochemistry **8**, 3638 (1969).
61. *P. Stephens, W. Suetaaka, P. Schatz*, J. Chem. Phys. **44**, 4592 (1966).
62. *M. Malley, G. Feher, O. Manzerall*, J. Mol. Spectr. **26**, 320 (1968).
63. *A. McHugh, M. Gouterman, C. Weiss*, Theor. Chim. Acta **24**, 346 (1972).
64. *H. Umbarger*, Science **123**, 848 (1956); **145**, 674 (1964).
65. *J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux*, J. Mol. Biol. **12**, 88 (1965).
66. *Н. Томова, М. Сеченска, Г. Дечев, Н. Кръстева, Л. Димитриева*, Ферментативная регуляция клеточного метаболизма по принципу обратной связи, изд. Болгарской АН, София, 1968.
67. «Итоги науки. Биологическая химия, 1969. Аллостерическая регуляция действия ферментов», изд. ВИНИТИ, 1971.
68. *J. Gerhart, A. Pardee*, Cold Spring Harbor Symposia **28**, 329 (1963).
69. *С. Уэбб*, Ингибиторы ферментов и метаболизма, «Мир», 1966.
70. *М. В. Волькенштейн*, в сб. «Молекулярная биофизика», «Наука», 1965.
71. *J. Monod, J.-P. Changeux, F. Jacob*, J. Mol. Biol. **6**, 306 (1963).
72. *J.-P. Changeux*, Cold Spring Harbor Symposia **28**, 313 (1963).
73. *M. Kotani*, Progr. Theor. Phys. Suppl. extra number 233 (1968).
74. *E. Whitehead*, Biochemistry **9**, 1440 (1970).
75. *D. Koshland, G. Nemethy, D. Filmer*, Biochemistry **5**, 365 (1966).
76. *J. Teipel, D. Koshland*, Biochemistry **8**, 4656 (1969).
77. *D. Koshland*, in «Current Topics in Cellular Regulation», vol. 1, eds. B. Horecker, E. Stadtman, Acad. Press, 1969.
78. *Б. И. Курганов*, Мол. биол. **1**, 17 (1967); **2**, 166, 430 (1968).
79. *Б. И. Курганов, В. А. Яковлев*, Мол. биол. **4**, 781 (1970).
80. *Б. И. Курганов, О. Л. Полянский*, ЖВХО им. Менделеева **16**, 421 (1971).
81. *Н. А. Киселев*, ЖВХО им. Менделеева **16**, 431 (1971).
82. *B. Rabin*, Biochem. J. **102**, 226 (1967).
83. *Н. П. Сидоренко, В. И. Дещеревский*, Биофизика **15**, 785 (1970).
84. *G. Schwab*, Z. Phys. Chem. **88**, 141 (1930).
85. *I. Horiuti*, J. Res. Inst. Catalysis Hokkaido Univ. **5**, 1 (1957).
86. *J. Christiansen*, Adv. Catalysis **5**, 311 (1953).
87. *Н. Н. Семенов*, Ж. физ. хим. **17**, 183 (1943); **27**, 187 (1953).
88. *E. King, C. Altman*, J. Phys. Chem. **60**, 1375 (1956).
89. *J. Wong, C. Hanes*, Canad. J. Biochem Physiol. **40**, 763 (1962); Arch. Biochem. Biophys. **135**, 50 (1969).
90. *A. Schulz, D. Fisher*, Canad. J. Biochem. **47**, 889 (1969).
91. *R. Hurst*, Canad. J. Biochem. **47**, 643, 941 (1969).
92. *W. Cleland*, Biochim. Biophys. Acta **67**, 104, 173, 183 (1963).
93. *К. Берж*, Теория графов и ее применения, ИЛ, 1962.
94. *Л. А. Бессонов*, Основы теории графов, Физматгиз, 1964.
95. *F. Haray*, Graph Theory and Theoretical Physics Acad. Press, 1967.
96. *М. И. Темкин*, ДАН СССР **152**, 156 (1963); **165**, 615 (1965); в сб. «Научные основы подбора и производства катализаторов», «Наука», Новосибирск, 1964.
97. *М. В. Волькенштейн, Б. Н. Гольдштейн*, ДАН СССР **170**, 963 (1966); Биохимия **31**, 541, 679 (1966); Biochim. Biophys. Acta **115**, 471, 478 (1966).
98. *С. Мэзон, Г. Циммерман*, Электронные цепи, сигналы, системы, ИЛ, 1964.
99. *Л. Робишо, М. Буавер, Ж. Робер*, Направленные графы, «Энергия», 1964.
100. *П. А. Ионкин, А. А. Соколов*, Электричество, № 5, 67 (1964); № 8, 26 (1964).
101. *H. Fromm*, Biochem. Biophys. Res. Comm. **40**, 692 (1970).

102. *Б. Н. Гольдштейн, Ю. Б. Магаршак, М. В. Волькенштейн*, ДАН СССР **191**, 1172 (1970).
103. *М. В. Волькенштейн, Ю. Б. Магаршак*, Биофизика **15**, 777, 949 (1970); ДАН СССР **192**, 665 (1970).
104. *М. В. Волькенштейн, Ю. Б. Магаршак, В. Е. Стефанов*, ДАН СССР **197**, 958, 1193 (1971).
105. *М. В. Волькенштейн, Ю. Б. Магаршак, В. Е. Стефанов*, Биофизика **17**, 379 (1972).
106. *Ю. Б. Магаршак*, Биофизика **19**, 219 (1974).
107. *Б. Н. Гольдштейн, М. В. Волькенштейн*, Мол. биол. **5**, 555 (1971).
108. *A. Conway, D. Koshland*, Biochemistry **7**, 4011 (1968).
109. *A. Cornish-Bowden, D. Koshland*, Biochemistry **9**, 3325 (1970).
110. *J. Darvey*, J. Theoret. Biol. **19**, 125 (1968).
111. *A. Levitzki, D. Koshland*, Proc. Nat. Acad. Sci, US **62**, 1121 (1969).
112. *G. Weber, S. Anderson*, Biochemistry **4**, 1942 (1965).
113. *J. Botts*, Trans. Faraday Soc. **54**, 593 (1958).
114. *Б. Н. Гольдштейн, М. В. Волькенштейн*, ДАН СССР **178**, 386 (1968).
115. *Б. Н. Гольдштейн*, Метод графов в кинетике ферментативных реакций, Диссертация, МФТИ, 1971.
116. *Б. И. Курганов, В. А. Яковлев*, Мол. биол. **6**, 113 (1972).
117. *З. С. Каган, Д. А. Хашимов, Б. И. Курганов*, Биохимия **35**, 937 (1970).
118. *М. В. Волькенштейн, Б. Н. Гольдштейн, В. Е. Стефанов*, Мол. биол. **1**, 52 (1967).
119. *Д. Уэй, Ч. Претер*, Катализ, «Наука», 1965.
120. *A. Deri, M. Wolleman*, Acta Biochim. Biophys., Acad. Sci. Hungarica **5**, 177 (1970).
121. *C. Schugurensky, J. Olavarria*, Acta Physiol. Latino-americana **19**, 153 (1969).
122. *M. Eigen*, Disc. Faraday Soc. **17**, 194 (1954).
123. *M. Eigen, L. de Maeyer*, in «Techniques of Organic Chemistry», vol. 8, Intersci. Publ., 1963, № 2, p. 895.
124. *G. Czerlinsky*, Chemical Relaxation, ed. M. Dekker, 1966; in «Theoretical and Experimental Biophysics», ed. A Cole, vol. 2, 1969, p. 69.
125. *M. Eigen, G. Hammes*, Adv. Enzymol. **25**, 1 (1963).
126. *G. Hammes*, Adv. Protein Chem. **23**, 1 (1968).
127. *M. Eigen*, in «Fast Reactions and Primary Processes in Chemical Kinetics», Nobel Symposium 5, ed. S. Claesson, Intersci. Publ., 1970; Quart. Rev. Biophys. **1**, 3 (1968).
128. *G. Schwartz*, J. Theor. Biol. **36**, 569 (1972).
129. *B. Havsteen*, J. Biol. Chem. **242**, 769 (1967).
130. *G. Schwartz*, Biopolymers **5**, 321 (1967).
131. *И. Б. Голованов, В. М. Соболев, М. В. Волькенштейн*, ДАН СССР **218**, 478 (1974).
132. *Ю. А. Шаронов, Н. А. Шаронова*, Мол. биол. **9**, 145 (1975).

ФИЗИКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

§ 8.1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Молекулярная биология исследует молекулярную природу основных явлений жизни, прежде всего наследственности и изменчивости. Эти явления определяются строением и свойствами нуклеиновых кислот, и возникновение молекулярной биологии связано с открытием их биологической функциональности. Годом рождения молекулярной биологии можно считать 1944, когда Эвери, Мак-Леод и Мак-Карти [1] открыли трансформацию бактерий посредством ДНК (см. стр. 486). Молекулярная биология ищет объяснение биологических явлений в химии и молекулярной физике. Тем самым, биология включается в единую область точного естествознания. Молекулярная биология изучает не только наследственность и изменчивость, но всю совокупность жизненных процессов — ферментативный катализ, мембранный транспорт, механохимические явления и т. д. Реализуется общий атомно-молекулярный подход к биологическим проблемам.

Нельзя, конечно, провести границу между молекулярной биологией и биохимией. Тем не менее отождествление этих областей (см., например, [2]) нецелесообразно. Биохимия изучает любые химические реакции в живых организмах, биологически функциональные вещества, далеко не всегда ставя задачи, относящиеся к основным явлениям жизни. Биохимия имеет безграничное поле практических приложений в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве. Практические применения молекулярно-биологических исследований только начинаются. В отличие от классической биохимии, молекулярная биология объединяется с физикой и ее специфика состоит прежде всего в новых аспектах исследований, в новых постановках задач.

Очевидна тавтология и, тем самым, отсутствие смысла в термине «молекулярная биохимия» [3]. Химия и биохимия имеют дело только с молекулами — «немолекулярной» биохимии не существует.

Молекулярная биофизика неотделима от молекулярной биологии. Различие здесь не в конечных целях исследований, а в характере постановки задач (ср. стр. 46).

История молекулярной биологии рассказана Уотсоном [4]. Укажем также другие книги, которые могут служить введением в эту область науки [5—11].

Из теории эволюции Дарвина следует единство основных явлений жизни во всех организмах. То же положение вытекает из клеточной теории, предложенной Шлейденом и Шванном в 1839 г. Существование одноклеточных и факт возникновения многоклеточного организма из одной клетки — зиготы показывает, что свойства живого тела присущи отдельной клетке. В клетке заложен механизм наследственности и изменчивости, ответственный за биологическую эволюцию. Дальнейшее развитие биологии локализовало этот механизм со все возрастающей точностью. Зигота, возникающая в результате слияния яйцеклетки и сперматозоида, приобретает наследственные свойства обеих клеток. Так как сперматозоид состоит в основном из ядерного материала, за наследственность ответственна не вся клетка, а ее ядро (Геккель, 1868 г.). Цитология и генетика показали, что аппарат наследственности сосредоточен в *хромосомах*, находящихся в ядре клетки.

Следующий шаг состоял в открытии *гена* и в определении положения генов в хромосомах (Морган).

Наконец, молекулярная биология установила, что гены представляют собой участки молекул ДНК, входящих в состав хромосом. Уточнение материального носителя наследственности можно представить следующей исторической схемой:

организм ⟶ клетка ⟶ ядро ⟶ хромосомы ⟶ гены ⟶ ДНК.

Ясно, что в основе молекулярной биологии лежит великое открытие Менделя (1865 г.). Смысл законов Менделя, вполне им понятый, состоит в существовании «материальных элементов» в клетке, ответственных за передачу наследственных признаков [12]. Иными словами, наличие генов прямо следует из законов Менделя. Более того, оно логически вытекает из двух очевидных и общеизвестных фактов — из того, что родительские признаки, отсутствующие в первом поколении потомства, зачастую обнаруживаются во втором и последующих поколениях, и из того, что организм возникает из одной оплодотворенной яйцеклетки.

Однако установление молекулярной структуры генов еще не означает создания молекулярной биологии. Ее обоснование требовало раскрытия молекулярного механизма функционирования генов. При каждом делении клетки происходит удвоение хромосом. Следовательно, гены (т. е. ДНК) должны обладать способностью к самокопированию, к редупликации. Существование мутаций показывает, что редупликация генов *конвариантна* [13], т. е. в копиях генов отражаются мутационные изменения, возникшие перед копированием или во время него. Молекулы ДНК

действительно редуплицируются (см. § 8.7), но это еще не объясняет смысла работы гена на языке химии и молекулярной физики. Еще в 1909 г. английский врач Гэррод предположил, что ген дикого типа ответствен за присутствие в организме определенного фермента. У особей, гомозиготных по соответствующему мутантному гену, этот фермент отсутствует. Так Гэррод объяснял наследственные, т. е. врожденные нарушения обмена, например фенилкетонурию — тяжелое наследственное заболевание, определяемое неспособностью организма разрушать фенилаланин (см. [14]). Таким образом, функция гена состоит в синтезе определенного белка. Попытки введения молекулярных представлений в генетику делались и ранее — видимо, первая из них была предпринята еще в 1893 г. московским химиком Колли (см. [13]). В дальнейшем биосинтетическая функция генов выявлялась со все большей определенностью. Кольцов сформулировал соответствующую гипотезу вполне отчетливо, но полагал, что вещество гена — это белок (значение нуклеиновых кислот еще не было известно) [15]. Молекулярная биология установила, что нуклеиновые кислоты ответственны за биосинтез белковых цепей. Основной тезис молекулярной биологии, сформулированный Бидлом, гласит: «один ген — один фермент» (см., например, [16]). Сейчас этот тезис формулируется более точно: «один ген — одна белковая цепь».

Таким образом, на молекулярном уровне наследственность означает воспроизведение синтеза определенных белков в последующих поколениях, запрограммированного в ДНК. Генные мутации сводятся к изменениям этой программы, т. е. к изменениям в структуре ДНК. Молекулярная природа мутаций, их соответствие законам физики были раскрыты Тимофеевым-Ресовским, Дельбрюком и Циммером (см. [17, 18]). Напротив, так называемые модификации, т. е. ненаследуемые изменения, определяются изменением структуры и функционирования белков (ферментов) в онтогенезе и не затрагивают генетическую программу, т. е. структуру ДНК.

Построение молекулярной биологии ознаменовалось крупнейшими открытиями, сделанными за сравнительно короткое время. В 1953 г. Уотсон, Крик и Уилкинз установили методом рентгенографии вторичную структуру ДНК (см. стр. 489). История этого открытия ярко описана Уотсоном [19]. Структура ДНК — двойная спираль — непосредственно объясняет способность ДНК к конвариантной редупликации. Общее понимание биосинтетической функции ДНК позволило сформулировать физическую проблему *генетического кода* (Гамов, 1954, см. гл. 9). В дальнейшем были выяснены детали процесса биосинтеза и характер участия в нем других нуклеиновых кислот — матричной и транспортной РНК — и нуклеопротеидов — рибосом. Эти успехи моле-

кулярной биологии тесно связаны с развитием генетики, физики и химии. Генетика обратилась к бактериям и вирусам, что позволило изучить химизм передачи наследственных признаков. Весьма существенным здесь оказалось открытие полового размножения у бактерий и, тем самым, возможности их гибридизации [20]. Явления, возникающие при конъюгации бактерий, изучены и описаны Жакобом и Вольманом [21]. Корнберг осуществил редупликацию ДНК *in vitro* (см. стр. 537). Успехи синтеза полинуклеотидов позволили решить проблему генетического года (см. гл. 9). Корана произвел синтез гена (см. гл. 9). Таким образом, ряд основных проблем наследственности и изменчивости был не только поставлен, но и решен. Это дало возможность обратиться к более сложным вопросам, еще далеким от решения — к дифференцировке клеток, к эмбриогенезу и канцерогенезу.

Молекулярная биология тесно связала биологию с химией и физикой и полностью устранила возможности виталистического толкования явлений жизни. Построение молекулярной биологии знаменует революцию в естествознании, перестройку естественнонаучного мировоззрения на материалистической основе.

Обратимся к краткому рассмотрению биологической функциональности нуклеиновых кислот.

Доказательства генетической роли ДНК в целом неопровержимы. ДНК локализована в хромосомах, причем содержание ДНК в диплоидных (соматических) клетках разных тканей у особей одного и того же вида практически постоянно. В гаплоидных половых клетках количество ДНК вдвое меньше, чем в соматических [22]. Содержание ДНК в клетках удваивается при митозе, т. е. при удвоении хромосом.

Шредингер поставил вопрос о причинах поразительной стабильности наследственного вещества, построенного из легких атомов, в ряде поколений [18]. ДНК действительно обладает высокой метаболической стабильностью. Меченный P^{32} аденин не включается в ДНК неделящихся клеток. При делении клеток в среде, содержащей меченые атомы, последние включаются во вновь образуемую ДНК, но в дальнейшем сохраняются в ней, не участвуя более в метаболизме. Высокая стабильность ДНК определяется ее специфической вторичной структурой (см. § 8.2). Сегодня вопрос, поставленный Шредингером, решен. Вместе с тем доказано участие ДНК в мутагенезе. Установлены изменения ДНК, вызываемые радиацией. Выяснены изменения азотистых оснований при химическом мутагенезе (см. § 9.9).

ДНК определяет *трансформацию* бактерий, открытую в 1928 г. Гриффитом [23]. Мутантные штаммы пневмококков (*Diplococcus pneumoniae*) разнятся характером своих полисахаридных клеточных оболочек. Эти различия обнаруживаются иммунологически и непосредственно по виду колоний. Штамм *S* обра-

зует «гладкие» блестящие колонии — клетки имеют прочные капсульные оболочки. Штамм *R* состоит из клеток, лишенных способности вырабатывать необходимый для таких капсул полисахарид — колонии являются «шероховатыми». Если живая культура типа *R* вводилась в организм мыши вместе с убитыми пневмококками типа *S*, то мышь заболевала пневмонией и посев размножившихся в ней бактерий давал живую культуру вирулентных пневмококков типа *S*. Следовательно, мертвые бактерии *S* содержат некий трансформирующий фактор, способный превращать штамм *R* в штамм *S*. Аналогичные явления были обнаружены и у других видов бактерий, причем не только *in vivo*, но и *in vitro*.

В дальнейшем было установлено, что трансформирующим фактором служат ДНК [1], и показано, что чистые препараты ДНК, выделенные из определенных штаммов, вызывают соответствующие наследуемые изменения других штаммов.

Фермент дезоксирибонуклеаза (ДНКаза), расщепляющий ДНК, прекращает трансформацию. ДНК может переносить несколько генетических признаков сразу — устойчивость к антибиотикам, способность образовывать капсулы и т. д.

В исходной культуре пневмококков содержатся мутанты, устойчивые к пенициллину. При воздействии на культуру этим антибиотиком гибнут все клетки, кроме мутантных; последние после размножения образуют культуру *P*. Из нее извлекается ДНК. При добавлении этой ДНК к исходной культуре в ней возникает значительно больше *P*-мутантов, чем в отсутствие трансформирующего фактора. Если число спонтанных *P*-мутантов составляло 1 на 10^7 клеток, то в результате трансформации оно увеличивалось на 4—5 порядков.

Бактериофаги, т. е. вирусы, размножающиеся в бактериях, состоят из белковой оболочки и содержащейся внутри нее ДНК или РНК. С помощью меченых атомов S^{35} и P^{32} установлено, что при заражении бактериальной клетки фагом в нее не входит белок (метка по сере), но входит ДНК (метка по фосфору). Частица бактериофага «вспрыскивает» свою ДНК в клетку. Размножение частиц фага в клетке показывает, что ДНК ответственна за синтез своих копий и белковых оболочек, т. е. она является генетическим веществом фага.

В частицах ряда вирусов роль ДНК играет РНК. Установлено, что РНК, выделенная из вируса табачной мозаики (ВТМ), обладает инфицирующим действием [3, 24, 25]. Это означает, что молекулы вирусной РНК, попадая в клетки, организуют синтез белков новых вирусных частиц. Вирусная РНК ВТМ с белком последнего образует частицы, обладающие свойствами исходного вируса. Удалось получить также гибридные вирусы путем комбинирования РНК одного штамма с белком другого штамма. В белке потомства гибридного вируса содержались аминокислот-

ные остатки, характерные для белка вируса-донора РНК, но отсутствующие в белке второго штамма. Эти результаты также свидетельствуют о генетической роли вирусной РНК [26].

Еще одним доказательством генетической роли фаговой ДНК служит явление *трансдукции.* Некоторые фаги способны переносить генетический материал от бактерии-донора, в которой фаг размножался, к бактерии-реципиенту, инфицируемой данным фагом. Трансдукция есть перенос генетических признаков бактерии, т. е. фаг переносит как свой собственный генетический материал, так и часть генетического материала бактерии-донора. Этим материалом опять-таки служит ДНК [27, 28].

О том же свидетельствует явление *лизогении.* Так называемые умеренные, или *лизогенные фаги* могут сохраняться в бактериальных клетках в виде безвредного для них *профага.* В течение ряда поколений клетки нормально размножаются, причем воспроизводится и профаг. Если на такую клетку подействовать индуктором, например ультрафиолетовыми лучами, она начнет продуцировать фаг и погибнет. Лизогения — наследственное свойство бактерии, приобретаемое при заражении фагом. ДНК фага объединяется с ДНК бактериальной клетки [28].

Приведенные выше факты и ряд других однозначно доказывают, что гены — это ДНК. В молекулах ДНК заложена наследственная информация, т. е. программа синтеза белков.

Рибонуклеиновые кислоты также являются непременными участниками биосинтеза белка.

Как уже сказано, РНК ряда вирусов играет роль, подобную роли ДНК. Высокомолекулярная информационная, или *матричная*, РНК (мРНК) переносит генетическую информацию от ДНК хромосомы к органоидам клетки, в которых реализуется синтез белка. Эти органоиды — рибосомы, построенные из *рибосомальной* РНК (рРНК) и белков. Низкомолекулярные *транспортные* РНК (тРНК) служат веществами, с которыми непосредственно взаимодействуют аминокислоты, собираемые в белковую цепь. На ДНК синтезируются (с участием ферментов) все три вида РНК — м-, р- и тРНК; далее они организуют белковый синтез [4—11] (см. гл. 9).

Ряд физических проблем возникает в связи с функциональностью нуклеиновых кислот. Необходимо установить механизм консервативной редупликации ДНК, механизм матричного синтеза РНК на ДНК и полипептидных цепей на комплексах мРНК с рибосомами. Необходимо решить проблему генетического кода — соответствия между первичной структурой ДНК (и, значит, мРНК) и первичной структурой белковой цепи. Недостаточно описать химизм биосинтеза белка, но следует выяснить физические и физико-химические механизмы и условия этого синтеза, в частности механизмы действия ферментов. Биофизика должна

исследовать термодинамику и кинетику редупликационных и биосинтетических процессов, а также термодинамику и кинетику денатурации нуклеиновых кислот. Важным разделом биофизики является физика мутагенеза — спонтанного, химического и радиационного.

§ 8.2. СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Далеко не всегда связь между структурой молекулы и ее функцией проста и очевидна. Мы видели, что для белков проблему установления такой связи еще никак нельзя считать решенной. Иначе обстоит дело с нуклеиновыми кислотами, в частности с ДНК. Здесь по крайней мере одна важнейшая функция — *редупликация* ДНК была качественно объяснена сразу же после открытия вторичной структуры.

Вторичная структура ДНК была установлена методом рентгенографии в работах Франклин, Крика, Уотсона и Уилкинза [29—32]. Ориентированные волокна литиевой соли

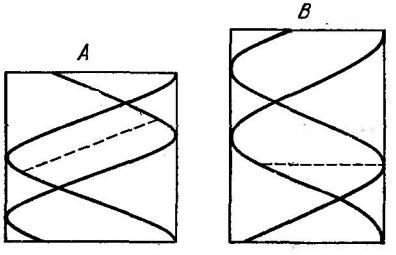


Рис. 8.1. Схема строения *A*- и *B*-форм ДНК.

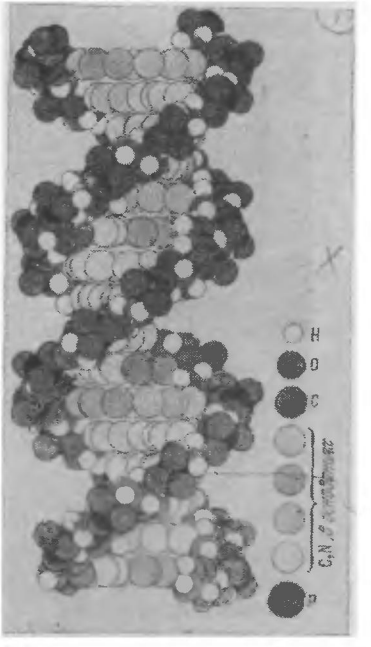


Рис. 8.2. Молекулярная модель *B*-формы ДНК.

нативной ДНК дали рентгенограммы, содержащие до 100 рефлексов (см. рис. 5.8). Крестообразное расположение рефлексов показывает, что структура является спиральной.

Расшифровка рентгенограмм и применение молекулярных моделей раскрыли двуспиральную структуру ДНК. Дезоксирибонуклеиновая кислота может кристаллизоваться в различных двуспиральных формах. При низкой относительной влажности (до 70%) ДНК кристаллизуется в моноклинной *A*-форме с параметрами решетки $a = 40{,}4$ Å, $b = 22{,}07$ Å, $\beta = 97{,}1°$. При

большой влажности реализуется гексагональная *B*-форма, для которой $a = 46$ Å. Обе формы натриевой соли ДНК из тимуса теленка показаны на рис. 8.1, а на рис. 8.2 — молекулярная модель *B*-формы. Позднее была открыта *C*-форма [33], получающаяся при низкой влажности. В табл. 8.1 приведены геометрические характеристики *A*-, *B*- и *C*-форм ДНК [34]. Они различаются значениями проекции остатка на ось спирали, углами поворота между соседними парами оснований и наклоном плоскости пар к оси спирали.

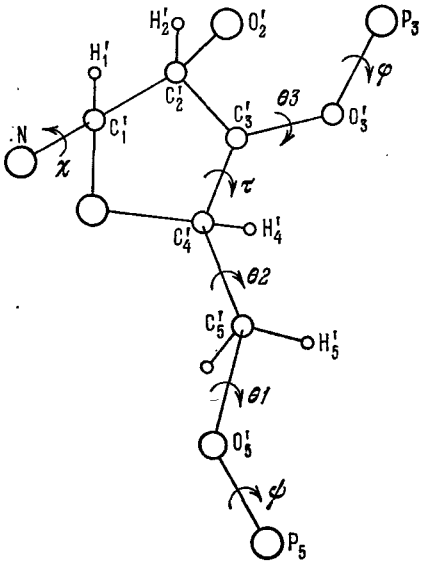


Рис. 8.3. Конформация полинуклеотидной цепи и обозначения углов поворота.

Особой *T*-формой обладает ДНК фага T 2 [35]. Эта ДНК содержит вместо цитозина оксиметилцитозин, причем 70% всех оксиметилцитозинов глюкозилированы, а 5% диглюкозилированы. При низкой влажности глюкозилированная ДНК фага имеет *T*-форму с шагом спирали 27,2—28,2 Å и числом пар оснований на виток 8,0—8,3.

Конформация полинуклеотидной цепи определяется шестью углами поворота (рис. 8.3). Они отсчитываются следующим образом: если смотреть вдоль связи, вокруг которой проис-

Таблица 8.1

Геометрия ДНК в различных формах [1])

Соль ДНК	Влажность, %	Число нуклеотидов на виток спирали	Шаг спирали, Å	Трансляция на нуклеотид, Å	Поворот на нуклеотид, *град*	φ, *град*	ψ, *град*
Натриевая, *A*-форма	75	11	28,15	2,55	32,7	20	16
Натриевая, *B*-форма	92	10	34,6	3,36	36	—	—
Литиевая, *B*-форма	66	10	33,7	3,37	36	2	5
Литиевая, *C*-форма	66	9,3	31,0	3,32	39	6	10

[1]) φ — угол между перпендикуляром к оси спирали и плоскостью оснований, ψ — диэдрический угол между плоскостями оснований пары.

ходит вращение, то дальняя связь вращается по часовой стрелке относительно ближней (рис. 8.4). Угол, отвечающий *цис*-положению связей, принимается равным нулю. Сопоставление структур полинуклеотидов и нуклеотидов позволяет найти те значения углов, которые встречаются в природе. Существенную роль в определении углов играют и расчеты наивыгоднейших конформаций.

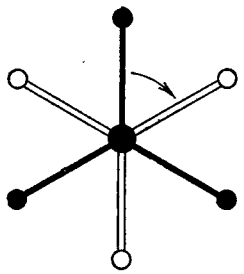


Рис. 8.4. Направление поворота.

Конформация полинуклеотидной цепи в большой степени зависит от конформации рибозы (дезоксирибозы). В кристаллах нуклеозидов и нуклеотидов, а также полинуклеотидов, рибоза встречается в четырех конформациях, различающихся тем, какой из атомов пятичленного цикла C_2' или C_3' выведен из плоскости остальных четырех атомов. Перечислим эти конформации: C_2'-*эндо*, C_3'-*эндо*, C_2'-*экзо*, C_3'-*экзо*. Если атом C_2' или C_3' находится по ту же сторону от плоскости, что и атом C_5', то такое смещение называют *эндо*-смещением. В противном случае говорят об *экзо*-смещении. C_2'-*эндо*- и C_3'-*эндо*-конформации встречаются наиболее часто. C_2'-*эндо*-конформации рибозы фигурируют в *B*-форме и *C*-форме ДНК; в *A*-форме ДНК, в двуспиральной РНК и поли-А рибоза находится в C_3'-*эндо*-конформации. Смещение атомов C_2' и C_3' от плоскости, образованной другими атомами, не превышает 0,6 Å.

Существуют две преимущественные конформации (*анти* и *син*) для вращения вокруг гликозидной связи, соединяющей атом N_9 пурина (или N_1 пиримидина) с атомом C_1 рибозы. *Анти*-конформация отвечает наиболее растянутой форме нуклеотида и встречается в большинстве исследованных нуклеотидов и нуклеозидов, а также в полинуклеотидах. *Син*-конформация обнаружена в кристаллах дезоксигуанозина и в некоторых минорных нуклеотидах, встречающихся в тРНК. Стерически разрешенные области значений угла χ (см. рис. 8.3) разнятся для C_2'-*эндо*- и C_3'-*эндо*-конформаций сахара.

Имеются три энергетически благоприятные конформации при вращении вокруг $C_4'—C_5'$-связи, отвечающие значениям угла $\theta 2$ 60, 180, 300°, тогда как существует лишь одна конформация, отвечающая вращению вокруг $C_5'—O_5'$, а именно $\theta 1 \approx 180°$. Последняя соответствует наиболее растянутой конформации полинуклеотидной цепи. Для угла $\theta 3$ стерически разрешены все значения углов в пределах от 210 до 260°. Конформации относительно связей $O_3'—P—O_5'$ во всех без исключения полинуклеотидах и фосфорных диэфирах — *гош — гош* или *гош — транс*, причем углы φ и ψ равны 60, 60 и 300, 300° для *гош — гош*-конформации,

а также 180, 300°, 60, 180° для *гош — транс*-конформации. В полинуклеотидах встречается лишь *гош*-300°, а не *гош*-60° конформация. Существенно, что наиболее растянутая *транс — транс*-конформация в полинуклеотидах отсутствует.

Таблица 8.2

Конформации полинуклеотидов и нуклеиновых кислот

Конформация	ψ, *град*	θ1, *град*	θ2, *град*	τ, *град*	θ3, *град*	φ, *град*
1	285	170	60	80	210	280
2	285	170	60	150	210	280
3	285	170	175	150	210	280
4	285	170	175	80	210	280
5	285	170	175	80	210	210
6	285	170	175	150	210	210
ДНК-*B*	281	212	58	130	147	282
ДНК-*C*	315	143	48	168	211	212
ДНК-*A*	283	167	67	76	221	279
РНК-11	282	165	74	95	216	273
Поли-*A*	285	168	69	83	216	293
РНК-10	257	188	88	80	203	285
Динуклеотид *A*-2′-*p*-5′-У	313	170	57 (У) 45 (А)	84 (У) 184 (А)	244	232

Согласно расчетам Сундаралингама шесть преимущественных конформаций полинуклеотидов характеризуются углами, приведенными в табл. 8.2. Там же указан угол поворота вокруг связи $C_3'—C_4'$, определяющий смещение из плоскости атомов C_3' и C_2' рибозы.

Двойная спираль обычной ДНК состоит из двух взаимно перевитых полинуклеотидных цепей, азотистые основания которых попарно соединены водородными связями. Аденин (А) одной цепи связан с тимином (Т) другой, а гуанин (Г) с цитозином (Ц). Схемы этих пар (*уотсон-криковские пары*) показаны на рис. 8.5. Таким образом, две цепи ДНК взаимно комплементарны, т. е. имеется однозначное соответствие между их нуклеотидами. Это соответствие раскрывает смысл правил Чаргаффа (см. стр. 89).

Специфическая структура двуспиральной ДНК характеризуется широкой и узкой спиральными бороздками, выемками на поверхности макромолекулы.

Очевидно, что имеются две возможности организации двойной спирали — из параллельных и антипараллельных цепей (рис. 8.6). Вторая модель следует из рентгенографических данных Однозначное доказательство антипараллельности получено биохимическим методом [39]. Возможен редупликационный синтез

ДНК *in vitro* (см. § 8.8). Для этого необходимы смесь нуклеозидтрифосфатов (НТФ) всех четырех типов, фермент ДНК-полимераза и нативная ДНК в качестве затравки для матричного

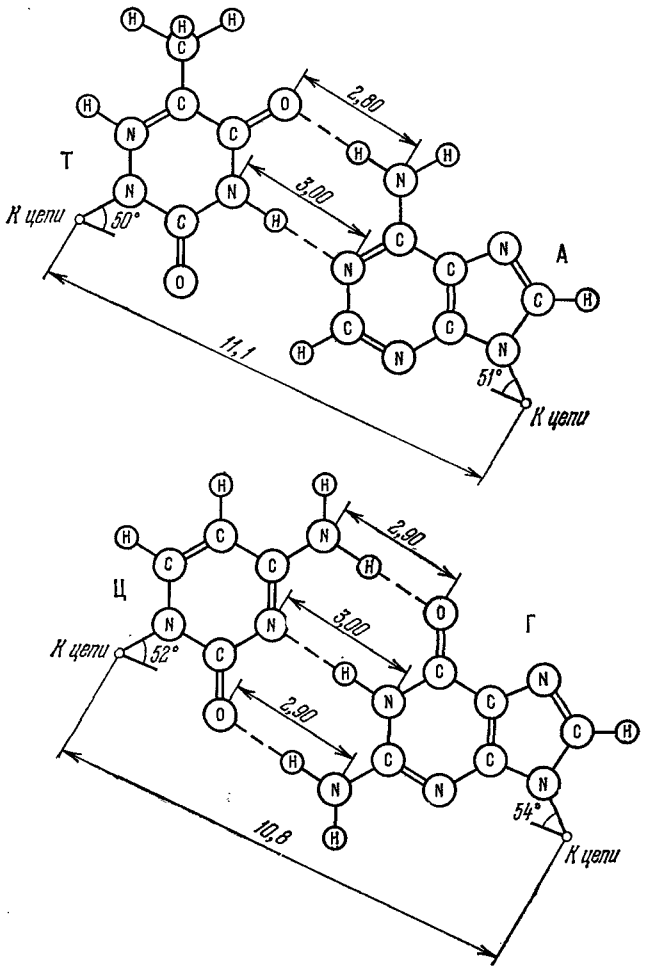


Рис. 8.5. Пары А—Т и Г—Ц

синтеза ДНК, идентичной исходной. В опытах Джосса один из четырех НТФ содержал P^{32} в фосфате, соединенном с дезоксирибозой в 5′-положении (рис. 8.7). Синтезированную ДНК расщепляли с помощью ферментов до 3′-дезоксирибонуклеотидов так, чтобы меченый атом Р оказывался в положении 3′ ближайшего

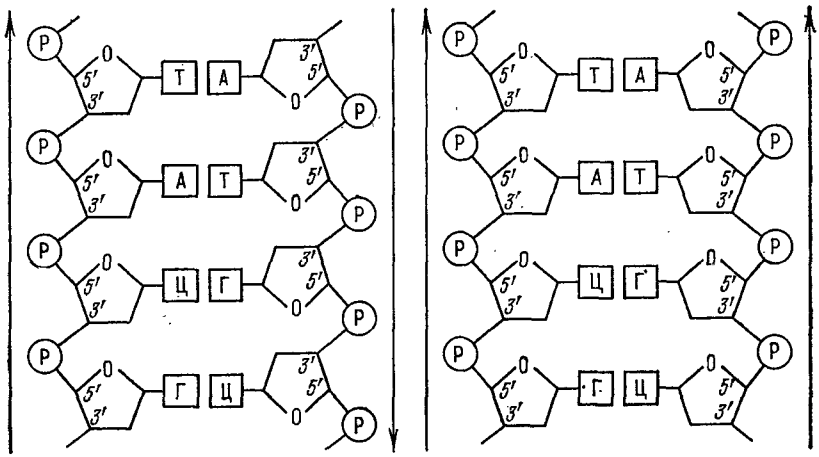


Рис. 8.6. Двойные спирали, построенные из антипараллельных (*а*) и параллельных (*б*) цепей.

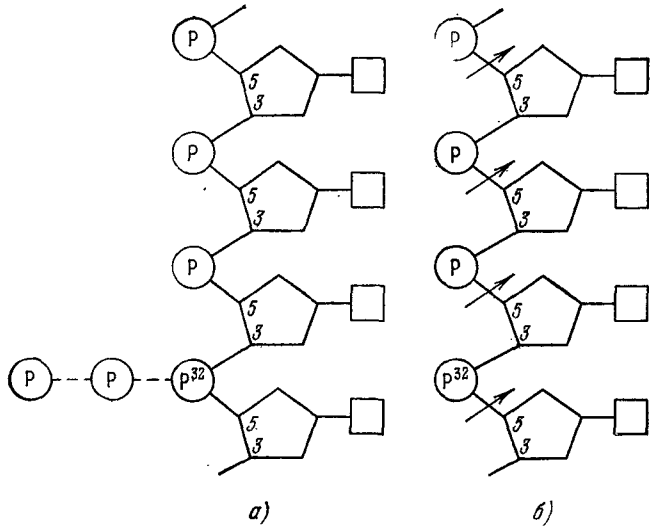


Рис. 8.7. Синтез цепи ДНК, меченной P^{32}, и ее расщепление.

нуклеотида (см. рис. 8.7). Образовывались четыре разных 3′-дезоксинуклеотида, которые разделяли электрофорезом на бумаге. Определяя их радиоактивность, можно было установить, как часто P^{32} связывается с другими нуклеотидами. Опыты были проделаны со всеми четырьмя НТФ и, тем самым, были исследованы все 16 возможных комбинаций. Полученные результаты приведены в табл. 8.3.

Таблица 8.3

Относительное содержание различных сочетаний соседних нуклеотидов в препарате, полученном с затравкой — нативной ДНК из тимуса теленка [39]

Меченый трифосфат	Выделенный 3′-дезоксирибонуклеотид			
	ТФ	АФ	ЦФ	ГФ
АТФ	*a* ТФА 0,053	*b* АФА 0,089 α	*c* ЦФА 0,080 β	*d* ГФА 0,064 γ
ТТФ	*b* ТФТ 0,087 α	*a* АФТ 0,073	*d* ЦФТ 0,067 δ	*c* ГФТ 0,056 ε
ГТФ	*e* ТФГ 0,076 β	*f* АФГ 0,072 δ	*g* ЦФГ 0,016	*h* ГФГ 0,050 φ
ЦТФ	*f* ТФЦ 0,067 γ	*e* АФЦ 0,052 ε	*h* ЦФЦ 0,054 φ	*g* ГФЦ 0,044
Итого	0,283	0,286	0,217	0,214

Естественно, что правила Чаргаффа соблюдаются. Одинаковыми греческими буквами обозначены сочетания, содержание которых должно быть равным, если цепи антипараллельны, одинаковыми латинскими буквами — если цепи параллельны. В самом деле, в первом случае (см. рис. 8.6) должны быть равны, например, содержания комбинаций АФЦ и ГФТ, а во втором — АФЦ и ТФГ, так как разрезаемые с помощью фермента связи с P^{32} расположены в этих случаях по-разному. Мы видим, что цепи антипараллельны.

Двуспиральная структура позволяет качественно объяснить редупликацию ДНК и ее конвариантный характер. По мысли Крика и Уотсона, при редупликации двойная спираль сначала

разделяется вследствие разрыва водородных связей и раскручивания двойной спирали. Каждая из двух образовавшихся цепей служит матрицей для сборки новой цепи. Мономеры соединяются с матрицей, образуя уотсон-криковские пары А — Т, Т — А, Г — Ц и Ц — Г. Одновременно происходит поликонденсация нуклеотидов, и в результате образуются две двойные спирали, тождественные первоначальной. Если случайно включился неподходящий нуклеотид, то при дальнейшем удвоении он оказывается уже законно занимающим свое место и редуплицируется. Такая *полуконсервативная модель* (новая спираль содержит одну старую и одну новую цепь) действительно подтверждается опытом (см. § 8.8).

Структура ДНК наблюдается с помощью электронного микроскопа. На рис. 8.8 и 8.9 приведены электронные микрофотографии нативной ДНК. Из фага Т2 были выделены нативные молекулы длиной до 49 *мк*, а из *E. coli* — до 400 *мк*, что соответствует молекулярному весу порядка 10^9. Вся ДНК фаговой частицы является одной молекулой.

Исследование рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами дает результаты, хорошо согласующиеся с двуспиральной структурой ДНК [40]. Растворы нативной ДНК очень вязки. Однако это не означает, что вся макромолекула ДНК является жестким стержнем. Данные, полученные методами рассеяния света, седиментации, вискозиметрии, динамического двойного лучепреломления, показывают, что двойная спираль нативной ДНК свернута в рыхлый клубок [41]. Характеристическая вязкость $[\eta]$ ДНК пропорциональна примерно первой степени молекулярного веса M, что отвечает рыхлому клубку. Зависимость $[\eta]$ от M имеет вид (в 0,15 M NaCl) [42]

$$\left.\begin{aligned} [\eta] &= 6{,}9 \cdot 10^{-4} M^{0{,}7}, \quad \text{если} \quad 2 \cdot 10^6 < M < 130 \cdot 10^6, \\ [\eta] &= 1{,}05 \cdot 10^{-7} M^{1{,}32}, \quad \text{если} \quad M < 2 \cdot 10^6. \end{aligned}\right\} \qquad (8{,}1)$$

Исследование двойного лучепреломления в потоке позволяет определить термодинамическую гибкость нативной ДНК (см. стр. 131). Гибкость характеризуется *персистентной длиной* примерно прямолинейного участка. В 0,15 M растворе персистентная длина ДНК равна 500 Å, в 0,0014 M растворе — 800 Å, т. е. гибкость уменьшается с уменьшением ионной силы [43]. Длине 500 Å отвечает примерно 150 мономерных звеньев. По-видимому, макромолекулу нативной ДНК нельзя считать зигзагообразной, состоящей из строго прямолинейных участков. Скорее она имеет «червеобразную» форму с непрерывно меняющейся кривизной. Персистентная длина есть условная величина, выражающая длину прямолинейного участка при замене червеобразной цепи зигзагообразной.

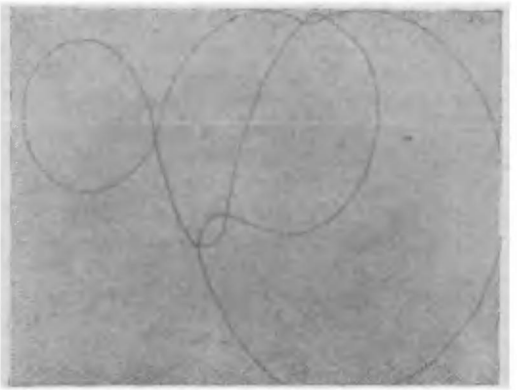


Рис. 8.8. Электронная микрофотография замкнутой двойной спирали ДНК из фага λ. Увеличение 44 000.

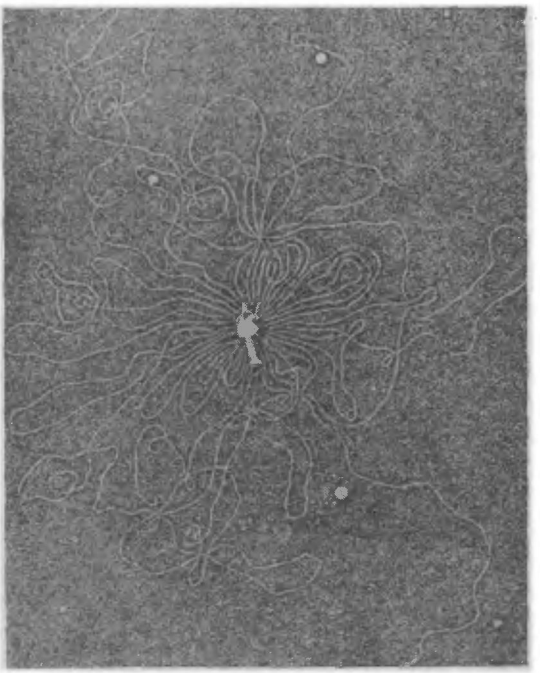


Рис. 8.9. Электронная микрофотография ДНК из фага Т2. Увеличение 80 000.

Доти показал, что плотность ДНК (приблизительно равная 1,7 *г/см*^{3}) линейно растет с увеличением содержания Г + Ц (м. в. А + Т = 247, Г + Ц = 273). Вместе с тем эти пары занимают примерно равные объемы в двойной спирали. На каждый процент увеличения содержания Г + Ц приходится возрастание плотности на 0,00103 *г/см*^{3}. Эти результаты получены методом седиментации в градиенте плотности (см. стр. 153).

При нагревании, изменении pH и т. д. происходит денатурация ДНК — переход двойная спираль → два клубка (см. § 8.4).

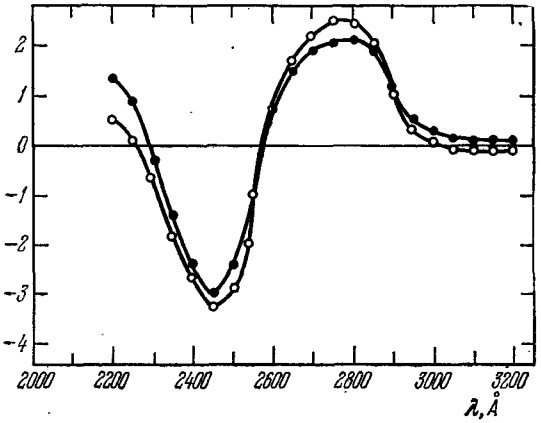


Рис. 8.10. Спектры кругового дихроизма раствора натриевой соли ДНК из тимуса теленка (светлые кружки) и пленки той же ДНК (зачерненные кружки).

По оси ординат отложены величины $\varepsilon_L - \varepsilon_D$ в *л/моль · см*.

Спирализация ДНК отчетливо проявляется в ее спектральных свойствах — в эффекте гипохромизма в области собственного поглощения азотистых оснований при 2600 Å (см. стр. 288—290). Интенсивность полосы поглощения 2600 Å у двуспиральной нуклеиновой кислоты значительно меньше, чем у денатурированной формы. Степени спиральности ДНК и РНК определяются по гипохромному эффекту без труда.

В работе [34] было проведено детальное исследование КД ориентированных и неориентированных пленок ДНК при различных значениях влажности и концентрации солей. Спектры КД натриевой и литиевой солей ДНК при относительной влажности (о. в.) $\geqslant$92% такие же, как для растворов, и отвечают *B*-форме ДНК. При о. в. от 75 до 66% пленки с 3% Na^+ дают измененный спектр КД, совпадающий со спектром раствора *A*-формы. Литиевая соль ДНК при низкой о. в. дает спектр, типичный для *C*-формы. На рис. 8.10 показаны спектры кругового дихроизма

раствора натриевой соли ДНК из тимуса теленка и пленки той же ДНК при о. в. 92%. Таким образом, КД пленок позволяет судить о вторичной структуре ДНК. В работе [34] построена теория КД для ориентированных пленок, обладающих и линейным дихроизмом (ЛД). Анализ КД и ЛД позволяет определить ориентацию оптических переходов в молекуле ДНК. Получены данные о возможном наличии $n\pi^*$-перехода с $\lambda < 2400$ Å (вероятно, при $\lambda = 2250$ Å). С помощью КД наблюдаются конформационные изменения нуклеиновых кислот в растворе. Двуспиральные участки РНК и гибридные двойные спирали ДНК — РНК фигурируют в *A*-форме, ДНК в головках бактериофага — в более компактной *C*-форме, ДНК в растворе — в *B*-форме. Под действием одновалентных катионов, нейтрализующих фосфатные группы, происходит переход *B*-формы в *C*-форму ДНК. В водно-метанольных растворах этот переход облегчается. Этанол вызывает кооперативный переход $B \rightarrow A$ [44].

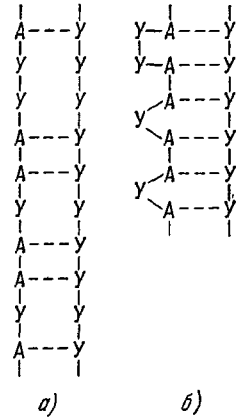


Рис. 8.11. Возможные вторичные структуры комплексов Поли-У с Поли-АУ.

Двуспиральные участки нуклеиновых кислот моделируются синтетическими полинуклеотидами. В 0,1 *M* растворе NaCl Поли-А образует двойную спираль с Поли-У, причем наибольший гипохромизм, т. е. наибольшая степень спирализации, наблюдается при составе смеси полинуклеотидов 1 : 1 [45]. В присутствии двухвалентных катионов в $1{,}2 \cdot 10^{-2}$ *M* растворе $MgCl_2$ максимальный гипохромизм отвечает соотношению Поли-У: Поли-А = 2 : 1, т. е. образуется тройная спираль. Ионы Mg^{++}, по-видимому, компенсируют заряды фосфатных групп, что уменьшает электростатическое отталкивание цепей.

Изучение смесей Поли-У и сополимеров Поли-АУ различного состава позволило раскрыть природу дефектных участков в двойной спирали [42]. Аденин комплементарен урацилу и поэтому связывается с ним; аналогичная связь У с У не возникает. При взаимодействии Поли-У с Поли-АУ имеются две возможные структуры, показанные на рис. 8.11. Либо в тех местах, где против У расположен У, нет водородных связей, но спираль остается спиралью (рис. 8.11, *а*), либо неспаренные группы вытесняются из спирали и образуют *петли* (рис. 8.11, *б*). Эти две структуры различаются соотношением Поли-У и Поли-АУ одинаковой степени полимеризации в системе с максимальным гипохромизмом, т. е. в двойной спирали. Для фрагментов спиралей, изображенных на рис. 8.11, *а*, соотношение Поли-АУ : Поли-У составляет 10 : 10 ≡ 1 : 1, на рис. 8.11, *б* — 6 : 10 ≡ 3 : 5. Эксперимент

однозначно свидетельствует в пользу второй возможности [45] (см. также [6]). Рассмотрение структуры типа *б* с помощью молекулярной модели показывает, что петли не мешают организации двойной спирали; происходит лишь небольшое сближение фосфатных групп — расстояние между ними уменьшается с 7 до 6 Å. Можно думать, что и в нативной ДНК случайное включение неподходящего нуклеотида (т. е. мутация) вызывает образование петли.

Рис. 8.12. Модель структуры РНК.
а) при высокой ионной силе раствора, *б*) при низкой ионной силе, *в*) денатурированная РНК.

В работе [46] исследовалась двуспиральная Поли-дезоксиИЦ (И — инозин). Рентгенограммы Na-соли при 75% о.в. и спектры КД указывают на необычную конформацию спирали — возможно левую, в отличие от всех известных двойных спиралей, с восемью мономерами на каждый оборот. Не исключено, однако, что здесь фигурирует все же правая спираль, но в иной конформации. Недавно было показано, что вывод о левой спирали ошибочен [193].

Вирусная РНК и рибосомальная РНК не кристаллизуются. В растворе все эти виды РНК обнаруживают значительно меньшую вязкость, чем ДНК, и бо́льшие скорости седиментации.

Способность РНК к денатурации (выражающейся, в частности, в увеличении интенсивности полос поглощения λ 2600 Å), большая компактность клубков ($[\eta]$ примерно пропорциональна $M^{1/2}$), вид спектров КД свидетельствуют о частично спиральной структуре нативной РНК. Денатурационная стабильность РНК возрастает с содержанием Г + Ц. Доти и сотрудники предложили для РНК структуру «морской звезды» с «лучами», построенными из двуспиральных участков с дефектами (см. [6, 47]). Подобная структура позволяет объяснить наблюдаемый высокий процент спиральных участков — до 77% в рРНК и даже до 88% в РНК из ВТМ. Спирин описывает структуру высокомолекулярной РНК с помощью модели, показанной на рис. 8.12 [48]. Структура одноцепочечная, при высокой ионной силе она имеет вид компактного клубка, при низкой — компактного

стержнеобразного образования, при денатурации — статистического клубка. Такая модель согласуется с результатами исследования РНК в растворе.

Структура низкомолекулярных транспортных РНК (тРНК), также частично двуспиральных, описана ниже (см. § 9.4).

Недавно было открыто возникновение третичной структуры двунитчатой ДНК в растворе в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) [49]. Условия ее образования: комнатная температура, 0,25—0,5 *М* раствор NaCl, молекулярный вес ПЭГ 20 000, его концентрация больше 80 *мг/мл*, молекулярный вес ДНК $1{,}4 \cdot 10^6$, ее концентрация около 10 *мкг/мл*. ДНК приобретает форму тора. Этой форме соответствует уменьшение интенсивности полосы 2600 Å и появление интенсивного минимума КД в области 2600—2700 Å. Торы наблюдаются в электронном микроскопе, их диаметры варьируют в пределах от 800 до 1400 Å. Таким образом, установлен специфический конформационный переход ДНК, являющийся обратимым. Возможно, что он имеет биологически-функциональное значение.

§ 8.3. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ

Структура двойной спирали ДНК задается, согласно первоначальным предположениям, водородными связями, фиксирующими уотсон-криковские пары (см. рис. 8.5). Определяющая роль трех водородных связей в Г—Ц и двух в А—Т представляется естественной и согласуется с данными рентгеноструктурного анализа. Однако подлинное выяснение природы взаимодействий в двойной спирали требует специальных теоретических и экспериментальных исследований. Количественные данные об этих взаимодействиях получаются путем квантовомеханических расчетов и прямых физических исследований простых моделей.

Свободные азотистые основания образуют водородно-связанные пурин-пиримидиновые комплексы в твердом состоянии. Это было впервые установлено Хугстином [50], получившим такой комплекс при совместной кристаллизации 9-метиладенина с 1-метилтимином (МА—МТ). Атомы азота N_1 в тимине и N_9 в аденине заблокированы метильными группами с тем, чтобы избежать образования дополнительных водородных связей. Результаты рентгенографического исследования кристалла МА — МТ показали, что структура комплекса отлична от уотсон-криковской (рис. 8.13, ср. рис. 8.5). Атом N_1 (МТ) образует водородную связь с имидазольным азотом N_7. Аналогичная хугстиновская структура была установлена для комплекса 9-этиладенина с 1-метилурацилом (ЭА—МУ) [51]. Возможно, что хугстиновская структура более стабильна, чем уотсон-криковская уже в растворе. Другая возможность состоит в том, что

тип комплекса, реализуемого в кристалле, определяется кристаллической упаковкой. Данные инфракрасной и ЯМР-спектроскопии растворов действительно показывают, что пурин-пиримидиновые комплексы образуются, но не позволяют определить их структуру [52—57]. Примечательно, что в растворах возникают водородные связи в парах А — У, А — Т и Г — Ц, но не в парах Г — У, А — Г и А — Ц. Соответственно не удается получить из раствора кристаллы с некомплементарными парами.

В кристаллическом комплексе 9-этилгуанина с 1-метилцитозином (ЭГ — МЦ) установлена уотсон-криковская структура с тремя водородными связями (рис. 8.14) [58]. Аналогичное строение имеет комплекс 9-этилгуанина с 1-метил-5-фторцитозином

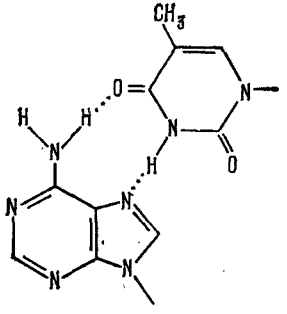


Рис. 8.13. Структура комплекса МА—МТ.

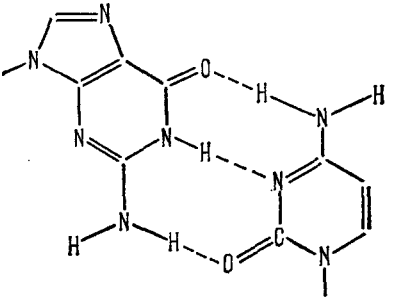


Рис. 8.14. Структура комплекса ЭГ—МЦ.

[59]. Структура комплекса 9-этилгуанина с 1-метил-5-бромцитозином характеризуется несколько иной упаковкой пар в кристалле [59]. Более близкая к ДНК система дезоксигуанозин-5-Br-дезоксицитидин также содержит три водородных связи между основаниями [60].

Сильный мутаген — бромурацил (метилированный) изучался в пáрах с этиладенином [61] и метиладенином [62]. Интересно, что в этих двух случаях были получены различные результаты. В первой паре образуются водородные связи O_2—N_6 и N_3—N_7, во второй паре O_4—N_6 и N_3—N_7. Эти результаты показывают, что азотистые основания способны не только к таутомерии, но и к образованию разнотипных водородных связей (дальнейшие подробности см. в обзорах [63, 64]).

Квантовохимические расчеты взаимодействий в пурин-пиримидиновых парах были проведены с учетом монополь-монопольных сил, сил взаимодействия монополей с индуцированными диполями и дисперсионных сил [65, 66] (см. также [6]). Расчеты показали бóльшую устойчивость хугстиновской структуры по

сравнению с уотсон-криковской для пар А — Т и А — У и устойчивость уотсон-криковской структуры для пары Г — Ц.

Очевидно, что в двойной спирали структура комплементарной пары осиований не может определяться исключительно ее свойствами в изолированном состоянии. Наряду с «горизонтальными» взаимодействиями в паре существуют и «вертикальные» взаимодействия соседних неспарениых осиований (см. далее). Стабилизуется структура, оптимальная для двойной спирали как целостной системы. Вместе с тем возможность образования водородных связей между различными атомами, по-видимому, существенна для мутагенеза (см. § 9.9).

Теоретические расчеты взаимодействий в двойной спирали проводились в ряде работ, начиная с работы Де-Во и Тиноко [67] (см. также [6]). Важная идея работы [67] состояла в выявлении роли вертикальных взаимодействий между параллельными азотистыми основаниями («stacking»). Известно, что между плоскими π-электронными циклами, расположенными параллельно друг другу, реализуются значительные дисперсионные взаимодействия (см. стр. 195). Поэтому молекулы красителей оказываются способными образовывать полимеры в растворе (так называемые полимеры Шайбе), обладающие своеобразными оптическими свойствами. Эти свойства связаны с экситонным механизмом передачи энергии возбуждения. В ДНК и в упорядоченных двуспиральных полинуклеотидах достаточно плотная параллельная упаковка оснований проявляется, в частности, в эффекте гипохромизма (см. § 5.4).

В работе Де-Во и Тиноко вычислялись энергии ван-дер-ваальсовых — диполь-дипольных, индукционных и дисперсионных взаимодействий (как горизонтальных, так и вертикальных). Дипольные моменты аденина и тимина направлены в их паре почти антипараллельно, и диполь-дипольное взаимодействие приводит к отталкиванию. Напротив, в паре гуанин — цитозин оно создает значительное притяжение. Суммарные энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий в парах А — Т и Г — Ц (горизонтальных взаимодействий), вычисленные при диэлектрической проницаемости, равной единице, равны соответственно 0,2 и 3,9 *ккал/моль*. В реальной среде эти энергии, видимо, в несколько раз меньше, так как эффективная диэлектрическая проницаемость варьирует в пределах 2—5. Таким образом, отдельная пара стабилизуется преимущественно водородными связями. Более строгий расчет, рассматривающий взаимодействие монополей, а не диполей, дает, однако, для уотсон-криковских пар А — Т и Г — Ц значительно бо́льшие энергии притяжения, равные соответственно —5,5 и —19,2 *ккал/моль* [65].

В последующих работах наряду с «монопольными» вычислениями ван-дер-ваальсовых взаимодействий [68, 69] учитывались

и силы отталкивания [70], оцениваемые с помощью атом — атом потенциалов Китайгородского (см. стр. 124). Разработан полуэмпирический метод расчета энергии горизонтальных и вертикальных взаимодействий, вычисляемых в приближении атом — атом взаимодействий. Определяется сумма энергий электростатических, поляризационных взаимодействий и энергии отталкивания на малых расстояниях, π-электронные заряды вычисляются по методу Хюккеля, σ-электронные — по методу Дель Ре [71]. Во всех расчетах применялись параметры, найденные в работе [72]. Поляризационная энергия находится как сумма энергий поляризации всех атомов основания в электрическом поле остальных атомов. Дисперсионная энергия и энергия отталкивания вычисляются с помощью модифицированной функции Бэкингема (см. стр. 124)

$$U(r) = Be^{-qr} - Ar^{-6}; \qquad (8,2)$$

здесь A, B и q — полуэмпирические параметры, характеризующие взаимодействие в данной паре. Параметры A находятся из приближенной формулы Лондона, q — из графика, построенного на основе данных для инертных газов. Параметр B выражается формулой

$$B_{mn} = 6A_{mn}\frac{\exp(q_{mn}\rho_{mn})}{q_{mn}\rho_{mn}^{7}}, \qquad (8,3)$$

где q_{mn} — константа для данной пары атомов, ρ_{mn} — абсцисса минимума на кривой зависимости U от межатомного расстояния. Предполагается, что $\rho_{mn} = \rho_m + \rho_n$, где ρ_m и ρ_n — равновесные радиусы атомов. Вычисление энергии взаимодействия слоев в кристалле графита для различных расстояний между ними дало значение ρ для углерода в состоянии sp^2-гибридизации, равное 1,86 Å. Исходя из этого значения, были определены ρ для других атомов. Для водорода, участвующего в водородной связи, ρ = 0,4 Å, три атома H метильной группы рассматривались как один с ρ = 1,9 Å [73].

Контролем эффективности такого метода служат расчеты энергий ряда молекулярных кристаллов и их сравнение с экспериментальными значениями теплот сублимации. Для нафталина найдено 18,1 *ккал/моль* (17.3, 17,03), для антрацена 24,4 (23,54, 23,35, 24,4, 23,9), для *п*-бензохинона 14,1 (15,0), для пиразина 14,4 (13,45), для имидазола 20,2 (20,4) *ккал/моль*. (В скобках указаны данные, полученные на опыте.)

В табл. 8.4 сопоставлены энергии взаимодействий, вычисленные в ряде работ.

В табл. 8.5 приведены результаты расчетов энергий взаимодействия оснований в триплетах, полученные в работе [71] (см. также расчеты Клавери [70]). Согласно этим данным наименее

стабильные участки двойной спирали ДНК должны содержать чередующиеся А и Т в обеих цепях, а наиболее стабильные — чередующиеся Г и Ц. Обе таблицы показывают, что последовательность нуклеотидов существенно сказывается на взаимодействиях.

Таблица 8.4

Энергии взаимодействия соседних пар оснований в двойной спирали (*ккал/моль*) [1])

Соседние пары оснований	*а*	*б*	*в*	*г*	*д*	*е*
↑Г — Ц / Г — Ц↓	—22,8	—15,42	—7,20	—1,26	—8,72	—9,5
↑Ц — Г / Г — Ц↓	—39,6	—22,66	—10,96	—4,99	—13,50	—15,0
↑Г — Ц / Ц — Г↓	—11,4	—16,08	—15,18	—9,80	—16,01	—15,5
↑А — Т / А — Т↓	—1,0	—14,98	—8,32	—4,08	—9,76	—12,8
↑Т — А / А — Т↓	—10,4	—10,26	—7,28	—2,52	—8,64	—11,7
↑А — Т / Т — А↓	—3,2	—13,28	—7,22	—4,48	—7,97	—11,9
↑А — Т / Г — Ц↓	—14,8	—20,32	—8,04	—3,50	—9,63	—12,3
↑Г — Ц / А — Т↓	—22,4	—13,90	—11,36	—6,04	—12,69	—13,6
↑А — Т / Ц — Г↓	—15,6	—14,88	—11,16	—7,25	—12,05	—13,8
↑Ц — Г / А — Т↓	—14,4	—14,24	—7,52	—2,41	—9,09	—12,1

[1]) Стрелки указывают на направление сахариофосфатной цепи от атома C_3' дезоксирибозы к атому C_5'. *а* — приближение молекулярных точечных диполей [67], *б* — приближение моиополей и молекулярной поляризуемости [68], *в* — приближение монополей и поляризуемостей связей [69], *г* — то же, что и *в*, но с учетом энергии отталкивания [70], *д* — то же, что и *в*, но с учетом энергии обменного взаимодействия [74], *е* — по данным [73] без учета поляризационной энергии.

Дальнейшее усовершенствование этих расчетов важно как для определения вероятностей возникновения различных точечных мутаций, так и для определения взаимодействия кодона с

Таблица 8.5

Энергии взаимодействии оснований в триплетах (в *ккал/моль* пар оснований)

Триплет	Г—Ц Ц—Г Г—Ц	Ц—Г Г—Ц А—Т	Ц—Г Г—Ц Т—А	Т—А Г—Ц Ц—Г	А—Т Г—Ц Ц—Г	Т—А Г—Ц Т—А	А—Т Г—Ц Т—А	Т—А Г—Ц А—Т
Энергия	—42,0	—40,5	—40,3	—40,1	—40,1	—38,6	—38,5	—38,4
Триплет	Г—Ц Ц—Г Ц—Г	А—Т Г—Ц А—Т	Ц—Г Ц—Г Г—Ц	Г—Ц Г—Ц А—Т	Г—Ц Г—Ц Т—А	А—Т Г—Ц Г—Ц	Т—А Г—Ц Г—Ц	Г—Ц Г—Ц Г—Ц
Энергия	—38,4	—38,3	—38,3	—36,8	—36,7	—36,3	—36,2	—34,4
Триплет	Г—Ц А—Т Ц—Г	Г—Ц А—Т А—Т	Г—Ц А—Т Г—Ц	А—Т А—Т Ц—Г	Ц—Г А—Т Ц—Г	Г—Ц А—Т Ц—А	Т—А А—Т Ц—Г	А—Т А—Т Г—Ц
Энергия	—23,2	—22,5	—22,4	—22,3	—22,1	—22,1	—21,9	—21,7
Триплет	А—Т А—Т А—Т	Ц—Г А—Т Г—Ц	Ц—Г А—Т А—Т	Т—А Т—А А—Т	Т—А А—Т Г—Ц	А—Т Т—А Т—А	Ц—Г А—Т Т—А	А—Т Т—А А—Т
Энергия	—21,7	—21,7	—21,5	—21,3	—21,3	—21,1	—21,0	—21,7

антикодоном (см. гл. 9). Следует подчеркнуть, однако, что в функционировании нуклеиновых кислот кинетические факторы играют, вероятно, более важную роль, чем термодинамические.

§ 8.4. ТЕРМОДИНАМИКА ПЕРЕХОДОВ СПИРАЛЬ — КЛУБОК

Денатурация нуклеиновых кислот сводится к разрушению двойной спирали. По-видимому, в клетке только тРНК обладают фиксированной третичной структурой.

Нагревание раствора нативной ДНК при некоторых значениях pH и ионной силы вызывает разделение двойной спирали на две цепи, сворачивающиеся в статистические клубки. При этом значительно уменьшаются вязкость и оптическая активность, исчезает гипохромизм, т. е. возрастает интенсивность полосы поглощения в области 2600 Å (см. стр. 498) [75]. Разделение на две цепи непосредственно доказывается центрифугированием ДНК, содержащей N^{15}, в градиенте плотности CsCl (см. стр. 153). Клетки *E. coli*, выращенные в среде, содержащей N^{15}, переносились в среду с обычным N^{14}. При делении клеток образовывались редуплицированные двойные спирали, в которых одна цепь содержала N^{15}, другая — N^{14}. До денатурации наблюдался один пик плотности 1,717 *г/см*^{3}, отвечающий двойным спиралям N^{15}—N^{14}. После денатурации появляются два пика, а именно: 1,740 и 1,724 *г/см*^{3}, отвечающие однонитевым клубкам соответственно с N^{15} и N^{14}. Плотность повышается, так как клубки более компактны, чем спираль [76]. Прямые определения молекулярного веса ДНК показывают, что при денатурации он уменьшается вдвое [75, 77]. Образование клубков при денатурации непосредственно наблюдается в электронном микроскопе (рис. 8.15).

Как и в случае полиаминокислот (см. § 4.5), переход спираль — клубок может рассматриваться как плавление спирали. Простейшая модель для изучения этих процессов — синтетический гомополинуклеотид, содержащий комплементарные пары только одного сорта, например Поли-А — Поли-У. Такая двойная спираль плавится при 65 °C в 0,15 *М* растворе NaCl при pH 7,0. Интенсивность полос поглощения при 2600 Å увеличивается на 34%, а удельное вращение $[\alpha]_D$ убывает на 275°.

Как и следует ожидать, температура плавления ДНК возрастает с увеличением относительного содержания Г — Ц — эти нуклеотиды связаны сильнее, чем А — Т (см. § 8.3). Зависимость $T_{пл}$ от содержания Г — Ц линейна [78]. Экстраполяция этой прямой дает предельные значения $T_{пл}$=69 °C для Поли-АТ и 110 °C для Поли-ГЦ, хорошо согласующиеся с экспериментальными значениями для соответствующих синтетических полинуклеотидов (65 и 104 °C). Температура плавления ДНК растет

с увеличением ионной силы раствора приблизительно пропорционально логарифму концентрации катионов.

Теория плавления простейших моделей — гомополинуклеотидов развита в ряде работ [79—82] (см. также монографии [6, 83, 84]).

В области перехода молекула состоит из чередующихся спиральных и неупорядоченных участков. Если обозначить число разорванных пар через N_1, число связанных пар через N_2 и

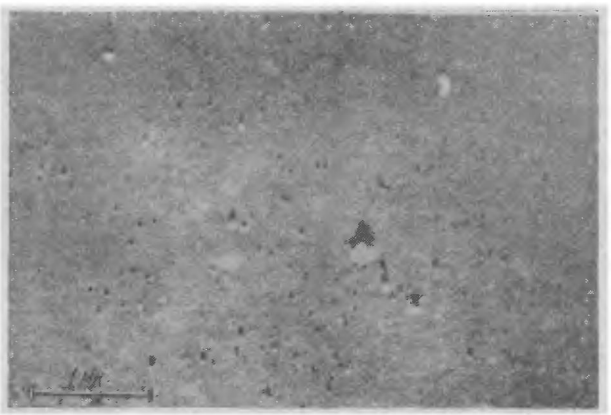


Рис. 8.15. Электронная микрофотография денатурированной ДНК.

число спиральных участков (равное числу неупорядоченных участков) через n, то свободная энергия системы запишется в виде

$$F(N_1, N_2, n) = N_1F_1 + N_2F_2 + nF_s - TS_0, \qquad (8,4)$$

где F_1 и F_2 — свободные энергии полностью разделенных и полностью спиральных молекул, отнесенные к одной паре оснований, F_s — энергия, необходимая для возникновения расплавленной области между двумя спиральными. Образование расплавленного участка, содержащего m пар, происходит в результате разрыва m поперечных и $m+1$ продольных связей. Наконец, S_0 есть энтропия смешения спиральных и неспиральных участков

$$S_0 = R \ln \frac{N_1!}{n!\,(N_1-n)!} \frac{N_2!}{n!\,(N_2-n)!}; \qquad (8,5)$$

F имеет минимум при некотором значении n, удовлетворяющем условию

$$[N_1/n - 1][N_2/n - 1] = 1/\sigma, \qquad (8,6)$$

где $\sigma = \exp(-F_s/RT)$ — фактор кооперативности (ср. стр. 210).

Равновесные значения N_1, N_2 и n определяются условием, полученным путем минимизирования F при постоянном значении $N_1 + N_2 = N$

$$\frac{1 - n/N_2}{1 - n/N_1} = s \equiv \exp\frac{F_1 - F_2}{RT}. \qquad (8,7)$$

Кривая плавления, т. е. зависимость доли неупорядоченных пар $1 - \theta = N_1/N$ (θ — степень спиральности) от T, идет тем круче, чем меньше σ. При $\sigma = 1$ кооперативность отсутствует, при $\sigma = 0$ кооперативность полная. Температурный интервал перехода спираль — клубок ΔT (рис. 8.16) определяется условием

$$\Delta T = \frac{1}{|d\theta/dT|_{\max}}, \qquad (8,8)$$

и расчет, основанный на модели Изинга (ср. стр. 209), дает

$$\Delta T = 4\sigma^{1/2}\frac{RT_{пл}^2}{\Delta H}, \qquad (8,9)$$

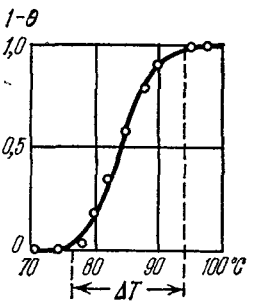


Рис. 8.16. Переход спираль — клубок в ДНК — изменение степени спиральности θ с повышением температуры.

где ΔH — разность энтальпий спиральной и неспиральной молекулы в расчете на пару оснований. Более строгая теория должна учесть то обстоятельство, что неупорядоченный участок образует замкнутую петлю, которая может быть и асимметричной [81, 82]. Уточненный расчет дает

$$\Delta T = \frac{16\pi^{1/3}}{3}(2\sigma)^{2/3}\frac{RT_{пл}^2}{\Delta H}. \qquad (8,10)$$

Из экспериментальных значений ΔT для синтетических гомополинуклеотидов находят $\sigma \sim 10^{-4}$—10^{-5}, т. е. $F_s \approx 7$ *ккал/моль*. Как мы видим, степень кооперативности весьма высока.

Подробный анализ ситуации для гетерополимеров, проведенный Лазуркиным, Франк-Каменецким и их сотрудниками, не только позволил построить теорию, применимую к ДНК и ее комплексам с малыми молекулами, но и привел к созданию метода исследования структуры нуклеиновых кислот [85].

Рассмотрение гетерогенности требует учета двух факторов — добавочного укрепления или ослабления двойной спирали лигандами и различной стабильности пар А — Т и Г — Ц. Эти факторы должны трактоваться по-разному — лиганды перераспределяются по цепи в процессе плавления, а первичная структура остается неизменной.

Влияние обратимого связывания лигандов на плавление гомополимеров рассмотрено в работах [82, 85, 86]. Допустим, что m_1 молекул лиганда связано неспиральными и m_2 — спиральными участками полимера. Вместо (8,4) имеем

$$F(N_1, N_2, n, m_1, m_2) = N_1F_1 + N_2F_2 + nF_s + m_1\psi_1 + \\ + m_2\psi_2 - TS_0 - RT\ln\frac{N_1!}{m_1!\,(N_1-m_1)!}\frac{N_2!}{m_2!\,(N_2-m_2)!}, \quad (8,11)$$

где ψ_1 и ψ_2 — свободные энергии лиганда на участках 1 и 2. Уравнение (8,11) отвечает случаю невзаимодействующих лигандов. Условие минимума $\partial F/\partial n = 0$ совпадает с (8,6), т. е. средняя длина спиральных участков при данном θ не зависит от присутствия лигандов. С другой стороны, из условия $\partial F/\partial N_1 = 0$ вместо (8,7) получается

$$\frac{1-n/N_2}{1-n/N_1} = s^* \equiv s\frac{1-c_1}{1-c_2}, \quad (8,12)$$

где $c_1 = m_1/N_1$, $c_2 = m_2/N_2$. Эти концентрации лигандов выражаются через концентрацию лиганда в растворе c_0 и константы связывания K_1 и K_2 следующим образом:

$$K_1 = \frac{c_1}{c_0(1-c_1)}, \quad K_2 = \frac{c_2}{c_0(1-c_2)}. \quad (8,13)$$

Кривая плавления гомополимера без лигандов описывается функцией

$$\theta = f(s). \quad (8,14)$$

Можно положить $\theta = 0{,}5$ при $s_{пл} = 1$. При наличии лигандов

$$\theta = f(s^*) \quad (8,15)$$

и $\theta = 0{,}5$ при $s^* = 1$, т. е. при $s_{пл} = (1-c_2)/(1-c_1)$. Сдвиг температуры плавления по сравнению с температурой плавления для чистого полимера T_0 определяется как

$$\delta\left(\frac{1}{T_{пл}}\right) = \frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_{пл}} = \frac{R_0}{\Delta H}\ln\left(\frac{1-c_1}{1-c_2}\right). \quad (8,16)$$

Изменение интервала температур плавления

$$\delta\left(\frac{\Delta T}{T_{пл}^2}\right) = \frac{\Delta T}{T_{пл}^2} - \frac{\Delta_0 T}{T_0^2} = -\frac{R}{\Delta H}\left[\frac{\partial}{\partial\theta}\ln\left(\frac{1-c_1}{1-c_2}\right)\right]_{\theta=1/2}. \quad (8,17)$$

Если лиганды находятся в избытке в растворе, то

$$\delta\left(\frac{1}{T_{пл}}\right) = \frac{R}{\Delta H}\ln\left(\frac{1+K_2D}{1+K_1D}\right), \quad (8,18)$$

где D — полная концентрация лигандов в растворе. Величина $\delta(\Delta T/T_{пл}^2)$ в этом случае равна нулю. Напротив, при прочном

связывании лигандов полимером во всей области перехода, т. е. при $K_1 p \gg 1$ или $K_2 p \gg 1$ (p — концентрация связывающих фосфатных групп полинуклеотида),

$$\delta T_{\text{пл}} = 2\left(\frac{p-1}{p+1}\right)\frac{RT_0^2}{\Delta H}c, \qquad (8{,}19)$$

$$\delta\,\Delta T = 4\left(\frac{p-1}{p+1}\right)^2\frac{RT_0^2}{\Delta H}c, \qquad (8{,}20)$$

где $p = K_2/K_1$, $c = 2D/p$. Последние две формулы справедливы для малых c. Теория описывает и общий случай [85]. Таким образом, при $p > 1$ лиганды действуют в качестве «скрепок», стабилизующих двойную спираль.

Опыт подтверждает приведенные выше соотношения. Уравнение (8,18) хорошо описывает влияние pH на кривые плавления. С его помощью при высоких ионных силах и нейтральных pH найдено значение ΔH, варьирующее в пределах 10—11 *ккал/моль* [87]. Уравнения (8,19) и (8,20) согласуются с данными, полученными для комплексов ДНК (из фага T2) с акридиновыми красителями и актиномицином при низких ионных силах [88, 89]. Изложенная выше теория была с успехом применена также к исследованию комплексов ДНК с рибонуклеазой [85].

Ионы щелочных металлов, а также Ag^+, Cu^+, связываются ДНК и стабилизуют ее структуру [90—93]. Ионы Ag^+ и Cu^+ могут перераспределяться по молекуле, преимущественно связываясь с парами Г — Ц. Исследования связывания ионов металлов позволили определить ΔH, равное $8{,}1 \pm 1$ при 0,01 M NaCl и $11{,}0 \pm 2$ *ккал/моль* при 0,1 M той же соли [93]. Эти и другие определения ΔH, основанные на изложенной теории, хорошо согласуются с результатами прямых микрокалориметрических измерений, дающих $\Delta H \approx 9$ *ккал/моль* [94] (см. также ниже, стр. 517).

Обратимся теперь к плавлению двуспирального гетерополимера. Такое плавление в принципе может происходить с образованием петель или без их образования [85]. Общая теория плавления для моноспирального гетерополимера (скажем, полиаминокислоты) дана в работах [95—97] (см. § 4.5). Теория для двойной спирали исходит из беспорядочного распределения пар А — Т и Г — Ц. Указанная на стр. 507 линейная зависимость $T_{\text{пл}}$ от содержания пар Г — Ц согласуется с этим предположением.

Особенность гетерополимера состоит в относительно малом числе микросостояний, отвечающих данной энергии. Маловероятно, чтобы два разных распределения клубков и спиралей по цепи с теми же значениями N_1, N_2 и n имели одинаковую

энергию, так как они почти наверняка будут содержать разное число пар Г — Ц в расплавленных участках. Поэтому энтропия смешения не может существенно влиять на плавление гетерополимеров. Вместе с тем должен появиться новый энергетический фактор, определяемый тем, что при уменьшении средней длины расплавленных участков содержание в них более стабильных пар Г — Ц должно уменьшаться. Конкуренция этого фактора и фактора, обусловленного невыгодностью «стыков» спиральных и неспиральных участков, должна приводить к чередованию спиральных и неспиральных участков определенной средней длины при данном значении θ.

Приближенное решение задачи о плавлении гетерополимера с беспорядочной последовательностью пар дано в [85]. Разделим молекулу на одинаковые отрезки, каждый из которых содержит λ пар. Если λ достаточно велико, то распределение содержания пар по этим отрезкам будет гауссовым, т. е.

$$P_\lambda(x) = \frac{1}{(2\pi)^{1/2}\sigma_\lambda} \exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_\lambda^2}\right), \qquad (8{,}21)$$

где $\sigma_\lambda^2 = x_0(1-x_0)/\lambda$; x — содержание пар Г — Ц.

Общее число пар Г — Ц в расплавленных участках минимально, если все отрезки с концентрацией этих пар, меньшей некоторого предельного значения x_λ, расплавлены и все отрезки с $x > x_\lambda$ спиральны. Тем самым значение x_λ определяется условием

$$\int_0^{x_\lambda} P_\lambda(x)\,dx = N_1/N. \qquad (8{,}22)$$

Средняя концентрация Г — Ц в расплавленных участках $\bar{x}_1$ равна

$$\bar{x}_1 = \int_0^{x_\lambda} xP_\lambda(x)\,dx \Big/ \int_0^{x_\lambda} P_\lambda(x)\,dx = \frac{N}{N_1}\int_0^{x_\lambda} xP_\lambda(x)\,dx. \qquad (8{,}23)$$

Так как состав каждого данного отрезка не зависит от состава других, вероятность того, что расплавленная область состоит из k отрезков, следующих друг за другом, равна

$$(1 - N_1/N)\,(N_1/N)^{k-1} \qquad (8{,}24)$$

и среднее число отрезков в расплавленной области

$$\bar{k} = \frac{1}{1 - N_1/N}. \qquad (8{,}25)$$

Среднее число пар оснований в этой области

$$\bar{m}_1 = \lambda\bar{k}. \qquad (8{,}26)$$

Число расплавленных участков во всей молекуле

$$n = \frac{N_1}{\lambda \bar{k}} = N_1 \frac{1 - N_1/N}{\lambda}. \qquad (8,27)$$

Свободная энергия полимера равна

$$F(N_1, N_2, n) = N_1\left[\bar{x}_1 F_1^{\text{ГЦ}} + (1 - \bar{x}_1) F_1^{\text{АТ}}\right] + \\ + N_2\left[\bar{x}_2 F_2^{\text{ГЦ}} + (1 - \bar{x}_2) F_2^{\text{АТ}}\right] + nF_s. \qquad (8,28)$$

Вводя условия $N_1 + N_2 = N$, $\bar{x}_1 N_1 + \bar{x}_2 N_2 = x_0 N$, обозначая $\Delta F_{\text{ГЦ}} = F_1^{\text{ГЦ}} - F_2^{\text{ГЦ}}$, $\Delta F_{\text{АТ}} = F_1^{\text{АТ}} - F_2^{\text{АТ}}$ и переходя от переменной n к переменной λ, получаем в пренебрежении постоянными членами

$$F(N_1, \lambda) = N_1 \bar{x}_1 \Delta F_{\text{ГЦ}} + N_1 (1 - \bar{x}_1) \Delta F_{\text{АТ}} + \frac{N_1}{\lambda}\left(1 - \frac{N_1}{N}\right) F_s. \qquad (8,29)$$

$\bar{x}_1$ и x_λ определены (8,23) и (8,22). Равновесные значения N_1 и λ находят из соответствующих условий минимума F. Анализ выражения для F в области перехода, т. е. вблизи $N_1/N = 1/2$, производится путем разложения в ряд по переменной $\epsilon \equiv N_1/N - 1/2$. Пользуясь уравнением (8,29) и вновь отбрасывая постоянные члены, получаем

$$F(N_1, \lambda) = N\left\{\epsilon \Delta F - \frac{1}{(2\pi)^{1/2}}\left[\frac{x_0(1 - x_0)}{\lambda}\right]^{1/2} (\Delta F_{\text{ГЦ}} - \Delta F_{\text{АТ}})(1 - \pi\epsilon^2) + \right. \\ \left. + \frac{F_s}{4\lambda}(1 - 4\epsilon^2)\right\}, \qquad (8,30)$$

где

$$\Delta F = x_0 \Delta F_{\text{ГЦ}} + (1 - x_0) \Delta F_{\text{АТ}}. \qquad (8,31)$$

Из условия $\partial F/\partial\lambda = 0$ (при $\epsilon = 0$) находим

$$\lambda_0 = \frac{\pi}{2}\left(\frac{F_s}{\Delta F_{\text{ГЦ}} - \Delta F_{\text{АТ}}}\right)^2 \frac{1}{x_0(1 - x_0)}. \qquad (8,32)$$

Поскольку

$$\Delta F_{\text{ГЦ}} - \Delta F_{\text{АТ}} = (T_{\text{ГЦ}} - T_{\text{АТ}}) \Delta H_{\text{АТ}}/T_{\text{АТ}}, \qquad (8,33)$$

где $T_{\text{ГЦ}}$ и $T_{\text{АТ}}$ — температуры плавления для соответствующих полимеров, имеем

$$\bar{m}_1 = \pi\left[\frac{T_{\text{АТ}}}{\Delta H_{\text{АТ}}} \frac{F_s}{(T_{\text{ГЦ}} - T_{\text{АТ}})}\right]^2 \frac{1}{x_0(1 - x_0)}. \qquad (8,34)$$

Приравняв нулю производную свободной энергии по ϵ при постоянном λ и продифференцировав полученное выражение по T, находим

$$\Delta T = 2\frac{\pi - 2}{\pi}\frac{\Delta H_{AT}}{T_{AT}}\frac{(T_{GC} - T_{AT})^2}{F_s}x_0(1 - x_0). \qquad (8,35)$$

Строгое решение задачи отличается от приведенного лишь численными множителями [98]. Образование петель при плавлении учитывается добавочным членом в F, отвечающим энтропии петель [85].

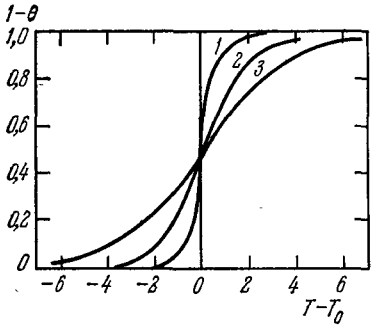


Рис. 8.17. Зависимость θ полигетеронуклеотида от T.
1 — $x_0=0$, $T_{пл}=340$ °K, $N=2\cdot10^4$;
2 — $x_0=0,1$, $T_{пл}=344$ °K, $N=4\cdot10^4$;
3 — $x_0=0,5$, $T_{пл}=360$ °K, $N=6\cdot10^4$.

Численные расчеты на ЭВМ с использованием в качестве независимых параметров доли пар Г — Ц x_0, температуры плавления гомополимеров T_{AT} и T_{GC}, а также ΔH_{AT} и σ, позволили определить кривые плавления, зависимость средней длины спирального участка от степени спиральности θ и зависимость ширины интервала перехода от x_0 при различных значениях указанных параметров [85, 95, 99]. На рис. 8.17—8.19 показаны кривые, полученные при $T_{AT} = 340$ °K, $T_{GC} = 380$ °K, $\Delta H_{AT} = 7$ *ккал/моль*, $\sigma = 5\cdot10^{-5}$, $N = 2\cdot10^4$—10^6. Линейная зависимость $T_{пл}$ от x_0 получается непосредственно

$$T_{пл} = T_{AT} + (T_{GC} - T_{AT})x_0. \qquad (8,36)$$

Эти расчеты проведены без учета образования петель. Такой учет приводит к некоторому уменьшению ΔT [85, 100].

Форма теоретической кривой плавления согласуется с опытом практически независимо от модели. Напротив, теоретический график для ΔT существенно зависит от принятой модели и от выбранных значений параметров. Все они, кроме σ, находятся из независимых экспериментов. Прекрасное согласие с опытом для ряда типов ДНК получено при $\sigma = 5\cdot10^{-5}$ [85]. Тем самым, опыт позволяет найти σ.

Определения оптической плотности (и, следовательно, степени спиральности θ) и размеров молекулы ДНК в растворе путем измерения характеристической вязкости в процессе термической денатурации позволили найти средние длины спиральных участков независимым путем [101]. В согласии с теорией в области $\theta = 0,8$—$0,9$ длины спиральных отрезков варьируют

от 1000 до 2500 пар, тогда как в области перехода, т. е. при $\theta = 0{,}5$ $\bar{m} = 400$—500 пар.

$T_{пл}$ понижается и ΔT увеличивается с уменьшением длины цепи [102]. Теория этого явления развита в работе [103] и подтверждена экспериментально [104].

Описанные результаты позволяют на основе измерения кривых плавления обнаруживать дефекты вторичной структуры

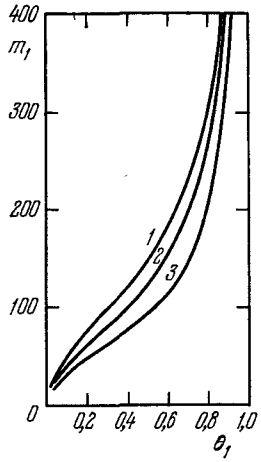


Рис. 8.18. Зависимость среднего числа пар оснований в расплавленных участках от $\theta_1 = 1 - \theta$.
Кривые *1—3* отвечают тем же параметрам, что и на рис. 8.17.

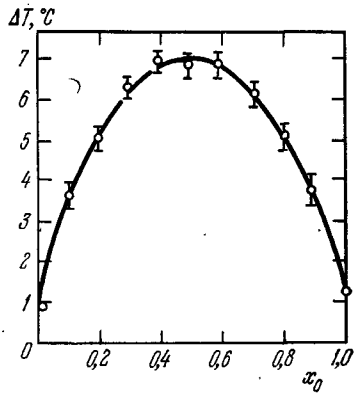
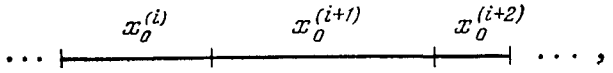


Рис. 8.19. Зависимость интервала температур плавления от концентрации пар Г—Ц.

ДНК и определять их концентрацию. Ультрафиолетовое облучение вызывает расширение кривых $\theta(T)$ вследствие локальной денатурации [105]. Наличие дефектов доказывается кинетическими опытами [106], число дефектов оценивается путем калибровки термодинамического метода с помощью фрагментированной ДНК [104].

Особенно интересна возможность установить характер распределения нуклеотидов по цепи путем исследования перехода спираль — клубок. Установлено, что ДНК ряда умеренных фагов содержит области, различающиеся по концентрации пар Г — Ц [107]. Это отражается в появлении ступенек на кривой плавления и в распределении фрагментированных молекул ДНК при центрифугировании в градиенте плотности. Такую блочную гетерогенность можно исследовать путем параллельного изучения кривых плавления и зависимости характеристической вязкости от T в области перехода [107].

Пусть блочная последовательность имеет вид



причем внутри блока пары Г — Ц распределены беспорядочно. Обычно исследуемые фрагменты ДНК, именуемые молекулами, содержат $n_0 = 1000$—$50\,000$ пар нуклеотидов. В этой области значений n_0 кривые $\theta(T)$ не зависят от n_0. Напротив, кривые зависимости характеристической вязкости $[\eta]$ от T зависят от n_0/n_B, где n_B — средняя длина блока. Если $n_B \ll n_0$, то каждая молекула в растворе содержит большое число блоков с различным содержанием пар Г — Ц. Поэтому при плавлении каждая молекула будет распадаться на спиральные и неупорядоченные участки без полного разделения цепей вплоть до последних стадий плавления. Кривые $[\eta](T)$ смещены к меньшим температурам по сравнению с кривыми $\theta(T)$, так как образование малого числа коротких расплавленных участков, расположенных далеко друг от друга, уменьшает размер молекулы. Это происходит вследствие малости размеров неупорядоченных участков и сближения спиральных участков, а также потому, что возникают добавочные резкие изломы, уменьшающие размер статистического сегмента.

Если $n_B \gg n_0$, то молекулы существенно различаются содержанием пар Г — Ц. ΔT для каждого сорта молекул меньше, чем общая ΔT для их смеси. В области плавления бóльшая часть молекул будет либо полностью спиральной, либо полностью расплавленной. Следовательно,

$$[\eta] = [\eta]_1 \theta_1 + [\eta]_2 (1 - \theta_1), \tag{8,37}$$

где $\theta_1 = 1 - \theta$ — степень неупорядоченности, и если молекулы либо полностью спиральны, либо полностью расплавлены, то

$$\theta_1 = g = \frac{[\eta]_2 - [\eta]}{[\eta]_2 - [\eta]_1}. \tag{8,38}$$

На рис. 8.20 показаны зависимости $g(T)$ и $\theta_1(T)$ для разных видов ДНК, а на рис. 8.21 — зависимость $g(\theta_1)$ [85, 101]. Кривые для высших организмов близки к следующей из уравнения (8,38); для *E. coli* и фага Т2 это не так. Следовательно, ДНК высших организмов свойственна блочная гетерогенность. Эти результаты позволяют оценить нижний предел размеров блока из условия $n_B \gg n_0$. Молекулярные веса ДНК высших организмов равнялись по порядку величины 10^9, средний вес блока несомненно превышал 10^7.

Таким образом, внимательное изучение кривых плавления ДНК дает ценные сведения о ее структуре. Надо думать, что этот метод окажется полезным и для изучения РНК.

Лифшиц провел детальное теоретическое рассмотрение зависимости формы кривой плавления ДНК от последовательности пар А — Т и Г — Ц [108]. Показано, что в идеале исследование кривой плавления ДНК может дать ценную информацию об ее

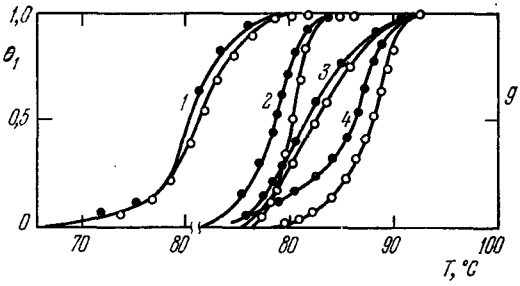


Рис. 8.20. Зависимость относительных изменений [η] (зачерненные кружки) и оптической плотности (светлые кружки) от T.

1 — ДНК из спермы сельди, *2* — из фага Т2, *3* — из тимуса теленка, *4* — из *E. coli*.

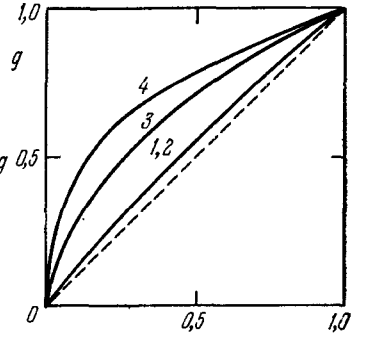


Рис. 8.21. Зависимость g от θ_1 — доли расплавленных пар оснований.

1 — ДНК из спермы сельди, *2* — из тимуса теленка, *3* — из *E. coli*, *4* — из фага Т2.

первичной структуре. Однако современная экспериментальная точность для этого недостаточна.

Термодинамические характеристики денатурации ДНК были определены методом микрокалориметрии в работах Привалова [94, 109, 110]. Теплота денатурации сильно зависит от pH. При возрастании pH от 7,0 до 9,7 величина $T_{пл}$ убывает от 84,8 до 66,3 °С, ΔH — от 9650 до 7140 *кал/моль*, ΔS — от 27 до 21 *э. е.* При убывании pH от 5,4 до 3,2 $T_{пл}$ убывает от 84 до 55 °С, ΔH — от 9400 до 4000 *кал/моль*, ΔS — от 25,6 до 12,4 *э. е.* Значение $T_{пл}$ сильно меняется с ионной силой, ΔH мало зависит от ионной силы и, следовательно, от температуры. Разность свободных энергий денатурованной и нативной ДНК при 37 °С убывает от 1250 до 620 *кал/моль* при возрастании pH от 7,0 до 9,7 и от 1240 до 220 *кал/моль* при убывании pH с 5,4 до 3,2. При pH 7,0 ΔF убывает от 1250 до 710 *кал/ моль* при возрастании p Na от 0,84 до 2,04. Свободная энергия стабилизации нативной структуры ДНК линейно зависит от активности NaCl. Логарифмическая зависимость ΔF от ионной силы при постоянном pH

показывает, что механизм стабилизации спирали одновалентными ионами имеет энтропийный характер. По-видимому, число связанных макромолекулой противоионов определяется линейной плотностью зарядов на цепи и не зависит от концентрации противоионов в растворе. При денатурации плотность зарядов на

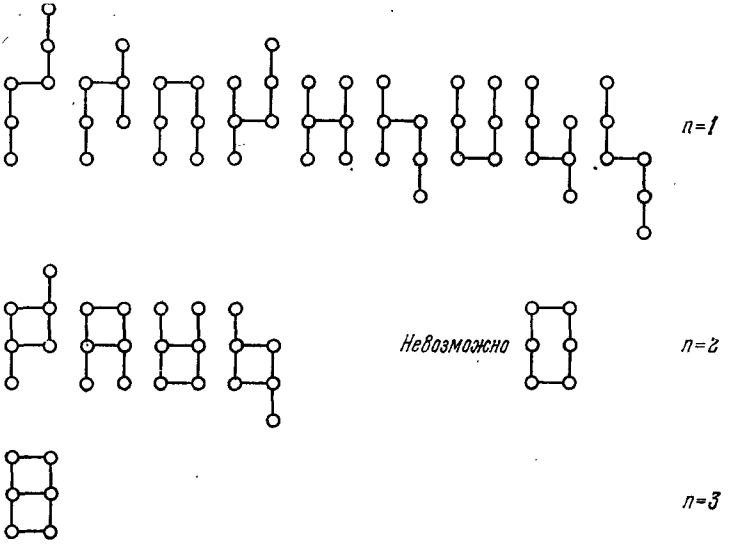


Рис. 8.22. Модели спаривания тринуклеотидов.

цепи понижается, противоионы уходят в раствор и изменяется энтропия.

Детальное исследование термодинамики переходов спираль — клубок проведено на простейших моделях — на олигорибоадениловых кислотах [111, 112]. При низких pH олигоаденины образуют двойные спирали, начиная с тетрануклеотида. Возможные модели спаривания тринуклеотидов, предложенные в работе [111], показаны на рис. 8.22. Вообще говоря, число разных двойных спиралей с n связанными парами при данной степени полимеризации N равно $(N-n+1)^2$. Переходы изучались по гипохромному эффекту при 2650 Å для N от 6 до 10. Образование двойной спирали из двух цепей характеризуется двумя константами — константой нуклеации β и константой роста спирали s. Константа $s = \exp(-\Delta H/RT + \Delta S/R)$. Константа равновесия для перехода две цепи $\rightleftarrows$ двойная спираль равна

$$K = \beta \sum_{n=1}^{N} (N-n+1)^2 s^n \equiv \beta L(s) \equiv$$
$$\equiv \beta s [N^2 - (2N^2 + 2N - 1)s + (N+1)^2 s^2 - s^{N+1} - s^{N+2}]/(1-s)^3. \quad (8,39)$$

Доля спаренных нуклеотидов составляет [113]

$$\theta = \frac{s\{1 + 4\gamma L - (1 + 8\gamma L)^{1/2}\} L'}{4\gamma N L^2}, \qquad (8,40)$$

где $L' = dL/ds$, $\gamma = \beta c$ (c — общая молярная концентрация как свободных, так и связанных цепей). При $s \gg 1$ (большое разбавление) $L(s) \to s^N$ и

$$\theta = \frac{1 + 4\gamma s^N - (1 + 8\gamma s^N)^{1/2}}{4\gamma s^N}. \qquad (8,41)$$

В средней точке перехода $\theta = 0{,}5$ и $\gamma s^N = 1$. Острота перехода в этой точке

$$\left(\frac{d\theta}{d \ln s}\right)_{T_{пл}} = {}^1/_6 N. \qquad (8,42)$$

Следовательно,

$$\left(\frac{d\theta}{dT}\right)_{T_{пл}} = \frac{N \Delta H}{6RT_{пл}^2}, \qquad (8,43)$$

т. е. ΔH можно определить по наклону кривой $\theta(T)$ при $T_{пл}$. Значения $T_{пл}$ возрастают с увеличением c. Если $\theta = \text{const}$, то $\gamma s^N = \text{const}$, если $\theta = 0{,}5$, то $\gamma s^N = 1$. Имеем $(\partial \ln s/\partial \ln \gamma)_{\theta, N} = -1/N$ и

$$\left(\frac{\partial T}{\partial \ln \gamma}\right)_{\theta, N} = -\frac{RT^2}{N \Delta H}. \qquad (8,44)$$

Интегрируя это уравнение от c до c' при постоянном β, находим

$$\frac{1}{T'} = \frac{1}{T} + \frac{R}{N \Delta H} \ln \frac{c'}{c}. \qquad (8,45)$$

Зависимость $T_{пл}$ от длины цепи следует из $(\gamma s^N)_{пл} = 1$; имеем

$$\frac{1}{T_{пл}} = \frac{1}{T_c} + \frac{R \ln \gamma}{N \Delta H}. \qquad (8,46)$$

Тщательные измерения, проведенные в работе [112], дали при $N = 6, 7, 8, 9$ и 10 $\Delta H = 5{,}85$; $6{,}7$; $7{,}5$; $8{,}1$; $8{,}9$ *ккал/моль* соответственно. Необходимо, однако, учесть статистическое распределение полимеров по различным значениям n, наличие вертикальных взаимодействий и в единичных цепях (это дает $\Delta S_{ст} \approx \approx 26$ *э. е.* и $\Delta H_{ст} = 6{,}1$; $5{,}4$; $4{,}4$; $4{,}1$; $4{,}0$ *ккал/моль* при $N = 6, 7, 8, 9, 10$), а также протонирование цепей. Единичные цепи протонированы при pH 4,2 на 10%, двуспиральные олигомеры — на 80% [113, 114]. При таком изменении протонирования (на 70%) $\Delta H_{пр} = 2{,}2$ *ккал/моль*. Учет этих поправок при $\beta = 10^{-3}$ *л/моль* дает для $N = 6, 7, 8, 9, 10$ значения ΔH, равные соответственно

10,0; 10,2; 10,2; 10,6; 11,4 *ккал/моль*. Дальнейший анализ показал, однако, что предположение о независимости β от T не согласуется с опытом. Из эксперимента следует, что от T не зависит βs. Учет этого обстоятельства дает значение ΔH, независимое от N и равное $11{,}8 \pm 0{,}6$ *ккал/моль* пар оснований. Величина βs составляет $3 \cdot 10^4$ *л/моль*.

Евдокимов и Варшавский исследовали плавление ДНК в легкой и тяжелой воде в широком интервале значений pH — от 2 до 12 [115]. График зависимости $T_{пл}$ от pH имеет колоколообразную форму с плато при 80—85 °С (ДНК фага Т2) в интервале pH 4,5—8,5 и резкое падение $T_{пл}$ при бо́льших и меньших pH (при ионной силе 0,18—0,25). При нейтральных pH температуры плавления ДНК в H_2O и D_2O совпадают. Отсюда следует, что водородные связи не определяют стабильность ДНК. В кислой области более устойчива H-ДНК, а в щелочной — D-ДНК. Различна и зависимость температур плавления H-ДНК и D-ДНК от ионной силы при низких ее значениях ($\sim 0{,}01$). Этот эффект можно объяснить различиями в степени гидратации, меньшей в D_2O. Из экспериментальных данных получены следующие значения ΔH и ΔS: при 37% пар Г — Ц $\Delta H = 8{,}0$, $\Delta S = 23{,}0$; при 40% $\Delta H = 8{,}7$, $\Delta S = 25{,}4$; при 48% $\Delta H = 9{,}5$ *ккал/моль* пар оснований, $\Delta S = 27{,}4$ *э. е.* Значения для H_2O и D_2O практически совпадают.

В работе [116] калориметрическим и оптическим методами изучена кислотная денатурация ДНК, определяемая протонизацией азотистых оснований. Установлено возникновение некоторой промежуточной конформации ДНК, отличной как от нативной, так и от денатурированной.

Обзор теории переходов спираль — клубок в ДНК дан в работе [117].

§ 8.5. КИНЕТИКА ДЕНАТУРАЦИИ ДНК

Кинетика расплетания двойной спирали ДНК была впервые рассмотрена Куном [118] (см. также [6]). Как показал Кун, если допустить что раскручивание (возникшее после разрыва связей между цепями) происходит в результате вращательного броуновского движения, то этот процесс потребует времени τ, гораздо большего, чем наблюдаемое. Так, для ДНК с м. в. $3 \cdot 10^6$ раскручивание 450 витков спирали, что необходимо для полного разделения, требует 150 дней. Между тем τ для ДНК с м. в. порядка 10^8 составляет около 1 *мин*. Кун считал, что раскручивание происходит на концах спирали, но не учитывал свертывания в клубки освободившихся цепей. Если отвлечься от их неизбежного перепутывания, то τ для расплетания цепей, свертывающихся в клубки, получится существенно меньшим [6, 119]. Кун

рассмотрел разделение цепей, происходящее при сочетании вращательного теплового движения с поступательным, и получил для ДНК с м. в. $3 \cdot 10^6$ $\tau = 58$ *сек*, что также слишком много.

Лонгет-Хиггинс и Зимм учли вращательный момент цепи, создаваемый увеличением энтропии у разделившихся цепей [120]

$$P = \frac{T\,\Delta S}{\varphi} = \frac{57{,}3}{36}\,T\,\Delta S; \qquad (8{,}47)$$

$\varphi = 36°/57{,}3°$ —выраженный в радианах угол, на который нужно повернуть конец цепи для освобождения одной пары оснований. Скорость раскручивания, т. е. относительная угловая скорость двух половин спирали $\omega = P/b$, где b — коэффициент трения. Для спиралей с м. в. порядка 10^6 τ оказывается порядка секунд. Эта оценка не учитывает необратимости развертывания и переплетания освободившихся цепей.

Фиксман рассмотрел одновременное действие куновского (диффузионного) и энтропийного механизма [121]. Крозерс также исследовал сочетание обоих механизмов, но учел возможность одновременного плавления в разных точках молекулы, а не только на ее концах [122]. Особый интерес представляет работа Фонга [123]. Перепутывание свободных цепей не должно возникать, если разрыв цепей происходит в средней точке спирали. Две ее половины флуктуируют независимо, половину времени они развертываются, половину — скручиваются вновь. Однако на начальных стадиях процесса ввиду плотной упаковки спирали вторичное скручивание невозможно и кинетическая энергия скручивания превращается в потенциальную, способствующую раскручиванию. Если произошло много поворотов, возможно обратное скручивание. Таким образом, две половины спирали беспорядочно скручиваются и раскручиваются без изменения радиуса спирали. Но скручивание не может продолжаться неопределенно долго, и поэтому при таком беспорядочном движении происходит преимущественно развертывание спирали. Число поворотов $N(t)$ при $t > 0$, следовательно, меньше или равно начальному числу поворотов спирали N_0. Задача состоит в нахождении τ для условия

$$\int_0^{\tau} \omega(t)\,dt = -2\pi N_0, \qquad (8{,}48)$$

где $\omega(t)$ — относительная угловая скорость двух половин спирали. Если $N(t) = N_0$, то $\omega(t_-) = -\omega(t_+)$. Можно оценить нижний и верхний пределы τ. Среднее значение $\omega(t)$ в некотором интервале времени $\bar{\omega}(t)$ есть монотонно убывающая функция t, так как для развертывания двойной спирали с удвоенным числом оборотов, требуется более чем удвоенное время. Нижний

предел τ получится при замене $\tilde{\omega}(t)$ начальным максимальным значением $\tilde{\omega}(0)$. Пусть начальная относительная угловая скорость равна ω_0. Если обе половины спирали развертываются, то $\omega(0) = 2\omega_0$. Так как в момент $t = 0$ ДНК развертывается половину времени, то $\tilde{\omega}(0) = {}^1/_2\omega(0) = \omega_0$. Эта величина находится из условия

$$ {}^1/_2 J\omega_0^2 = {}^1/_2 kT, \qquad (8,49) $$

где J — момент инерции половины спирали относительно ее оси. При $N_0 = 2\cdot 10^4$ (м. в. $1{,}2\cdot 10^8$, число пар оснований $2\cdot 10^5$) и 20 °C $\omega_0 = 3\cdot 10^8$ *рад/сек*. Нижний предел τ равен

$$ \tau_н = 2\pi N_0/\tilde{\omega}(0) = 4{,}2\cdot 10^{-4}\ \text{сек}. $$

Верхний предел, $\tau_в$ отвечает хаотическому свертыванию и развертыванию без преимущества для последнего процесса. Считаем, что молекула ДНК находится в воде при 20 °C. Средний вращательный момент $P_{1/2}$ половины молекулы ДНК равен $1{,}34\cdot 10^{-22}$ СГС, момент количества движения молекулы воды $p = 1{,}9\cdot 10^{-18}$ СГС. Умножая p на радиус спирали, находим (по порядку величины) средний вращательный момент, возникающий вследствие соударения молекулы ДНК с молекулой H_2O, $p' = 1{,}7\cdot 10^{-25}$ СГС. Таким образом, $r = P_{1/2}/p' = 7{,}8\cdot 10^2$. Следовательно, для уменьшения $P_{1/2}$ до нуля нужно большое число соударений, равное r^2. Расчет дает $2\cdot 10^{15}$ соударений в 1 *сек* и время, необходимое для r^2 соударений, т. е. для уменьшения углового момента от P до 0, равно $3\cdot 10^{-10}$ *сек*. Среднее время между двумя последовательными нулями флуктуирующего углового момента $\tilde{t}$ вдвое больше вследствие симметрии флуктуаций во времени. За время $\tilde{t}$ угловая скорость не меняет знака, и можно рассматривать $\tilde{t}$ и число оборотов n за это время как шаг в броуновском блуждании. Имеем $n = \omega_0\tilde{t} = 2{,}9\cdot 10^{-2}$ оборота и время $\tau_в$ для 10^4 оборотов оказывается равным

$$ \tau_в = (10^4/n)^2\,\tilde{t} = 73\ \text{сек}. $$

Можно показать, что при $N \gg 1$ τ близко к верхнему пределу. Это значение согласуется с опытом.

Такой процесс эффективнее куновского, так как в интервале времени $\tilde{t}$ угловая скорость флуктуирует по величине, но не по направлению и нужные повороты происходят один за другим. Рассматривается коллективное движение развернутой части ДНК. Начало развертывания во многих местах спирали, ее фрагментация может только уменьшить τ. В модели Фонга не обязательно учитывать вращение освободившихся концов цепей, которые должны быть короткими. Из расчета следует, что $\tau_в \sim M^3$, а $\tau_н \sim M^{3/2}$. Реальное τ может иметь промежуточное значение.

Теория Фонга достаточно груба, но, вероятно, дает правильный порядок величины τ, который не должен изменяться при строгом решении стохастической задачи (о развертывании ДНК при редупликации см. стр. 541).

Возможность внутреннего разупорядочения двойной спирали без разделения цепей, по-видимому, действительно существует. В работе [124] наблюдалась денатурация кольцевой двуспиральной ДНК без раскручивания. Время денатурации некольцевой фаговой ДНК (около 25 *сек*) зависит от молекулярного веса. Для ряда видов фаговых ДНК оно пропорционально M^2. Квадратичная зависимость следует непосредственно из того, что τ должно быть пропорционально числу витков, т. е. M, и вязкости среды, т. е. также M. Мэсси и Зимм [125] исследовали денатурацию ДНК релаксационными методами (см. § 7.7) и установили, что τ зависит от многих факторов — от стадии перехода спираль — клубок, от ионной силы растворителя и его вязкости, от концентрации ДНК и ее молекулярного веса, а также от числа и расположения разрывов в цепи. Итак,

$$\tau = \alpha(1 + c[\eta])\eta M\psi, \qquad (8{,}50)$$

где $0 < \psi < 1$ — фактор, характеризующий стадию перехода, c — концентрация ДНК, $[\eta]$ — ее характеристическая вязкость, η — вязкость растворителя, α — константа, зависящая от ионной силы. При малых c имеем $\tau \sim M$. Повышение τ от начала перехода к его концу показывает, что сопротивление среды все же возрастает по мере развертывания молекулы. Одновременно вследствие образования петель увеличивается эффективный радиус двойной спирали — обстоятельство, которое не учитывается в теории [123].

Та же релаксационная техника (температурный скачок) применялась к изучению денатурации ДНК в работе [126]. Это исследование показало наличие трех последовательных процессов. При малом температурном скачке (от 6 до 18 °С) сначала возникает «мгновенный» ответ ($\tau < 20$ *мсек*), состоящий в быстрой структурной дезорганизации спирали без разделения цепей. Дезорганизация должна начинаться в участках с избытком пар А — Т. За мгновенным ответом следует постепенная деспирализация, которую авторы назвали быстрым эффектом. Длительность этого процесса пропорциональна $M^{2,3}$. Далее малые температурные возмущения в области перехода проявляются в весьма медленном кинетическом эффекте, характеризующемся большой энергией активации (~ 100 *ккал/моль*) и практически не зависящем от молекулярного веса. Он может быть истолкован как явление нуклеации в кооперативном переходе, т. е. как уничтожение спиральных участков, разделяющих неупорядоченные.

Очевидно, что кинетика плавления нативной ДНК отвечает целому спектру времен релаксации. Подлинная теория явления еще не построена и наталкивается на большие трудности при исследовании кинетической связи между достижением внутреннего равновесия и раскручиванием. В предыдущих расчетах это не учитывалось, так как раскручивание считалось лимитирующей стадией. В действительности же процесс может лимитироваться «сплавлением» дезорганизованных участков спирали.

Варшавский и Евдокимов изучали расплетание ДНК методом теплового удара (ср. стр. 474). Раствор ДНК в течение 0,5 *сек* нагревался на 5—20 °С (в зависимости от ионной силы). Кинетические кривые свидетельствуют о наличии двух или даже трех стадий структурного перехода. В первой, быстрой, стадии возникает почти весь гиперхромный эффект. Полупериод всего перехода меняется в зависимости от условий в пределах от нескольких секунд до нескольких десятков секунд. Константа скорости следует уравнению Аррениуса. Расплетание спирали происходит с наибольшей скоростью при экстремальных pH — зависимость энергии активации от pH колоколообразна. Максимальное значение $E^* = 170$ *ккал/моль* отвечает pH 7,5 (ионная сила 0,18—0,25); оно падает до 20—25 *ккал/моль* при pH 3 и 10,5. Авторы интерпретируют первую стадию как образование неподвижных петель и считают, что полное расплетение происходит во второй стадии. Время расплетания возрастает с увеличением молекулярного веса. Полученные результаты показывают, что характер зависимости τ от M определяется ионной силой раствора, числом и распределением разрывов цепей [127—129].

Лазуркин и его сотрудники разработали кинетический формальдегидный метод (КФМ), основанный на изучении кинетики раскручивания, для определения дефектов во вторичной структуре ДНК [85, 128].

Если в растворе содержится вещество, реагирующее с локально деспирализованными нуклеотидами и препятствующее образованию ими уотсон-криковских пар, то реакция будет протекать вплоть до полной деспирализации. Если время связывания такого реагента сильно превышает время раскручивания, то именно эта реакция лимитирует скорость раскручивания. Константа скорости реакции нативной ДНК с реагентом равна $w\tilde{k} = k$, где w — вероятность разделения для любой пары нуклеотидов в молекуле, а $\tilde{k}$ — константа скорости реакции разделенных нуклеотидов с указанным реагентом. Если некоторые из оснований нативной ДНК прореагировали и образовали локально денатурированный участок, вероятность тепловой денатурации примыкающих к этому участку нуклеотидов $w' \gg w$. Константа скорости реакции этих пар значительно больше $k' = w'\tilde{k}$.

Образование локально денатурированного отрезка требует свободной энергии F_s (см. стр. 508). Поэтому $k/k' = w/w' \approx \approx \exp(-F_s/RT) = \sigma \sim 10^{-4} - 10^{-5}$. Так как $k \ll k'$, раскручивание, идущее вначале медленно, постепенно ускоряется и кинетическая кривая должна иметь S-образную форму. Наличие дефектов в двойной спирали приводит к увеличению начального наклона этой кривой. Определим ее форму.

Обозначим через $W(x, t)$ вероятность того, что в момент t отрезок, содержащий x пар, целиком спирален. Допустим, что молекула содержит N пар и находится на некоторой стадии раскручивания. Степень спиральности в момент t равна

$$\theta = W(x, t), \tag{8,51}$$

в момент $t + dt$ —

$$W(x, t + dt) = W(x + 2k'\,dt, t)\,[1 - (x + y - 1)\,k\,dt], \tag{8,52}$$

так как для полной спиральности отрезка, содержащего x пар в момент $t + dt$, необходимо, чтобы в момент t каждый конец отрезка имел «резерв» по длине, не меньший чем $k'dt$, и в отрезке не возникали бы новые центры раскручивания. Начальные размеры (в числе пар) центра раскручивания обозначены через y. Уравнение (8,52) можно записать в дифференциальной форме

$$\frac{\partial W}{\partial t} = 2k' \frac{\partial W}{\partial x} - (x + y - 1)\,kW. \tag{8,53}$$

Решаем его с начальным условием

$$W(x, 0) = f(x).$$

Если молекула ДНК не имеет дефектов, то $f(x) = 1$. Если дефекты наличествуют, причем длины спиральных участков распределены между ними случайным образом, то $f(x) = \exp[-c(x - 1)]$, где $c = \bar{n}^{-1}$ — концентрация дефектов, $\bar{n}$ — среднее число пар в спиральном участке. Решение уравнения (8,53) при указанном начальном условии дает [106]

$$\theta = f(1 + 2k't)\exp\{-kyt - kk't^2\}, \tag{8,54}$$

и при беспорядочном распределении дефектов находим

$$\theta = \exp\{-(ky + 2k'c)\,t - kk't^2\} \tag{8,55}$$

или

$$-\frac{\ln\theta}{t} = ky + 2k'c + kk't. \tag{8,56}$$

На рис. 8.23 и 8.24 показаны кривые (8,55) и (8,56). Пересечение прямой, изображающей зависимость $-\ln\theta/t$ от t с осью ординат позволяет определить c.

Формальдегид является раскручивающим реагентом. Экспериментальные кривые $\theta(t)$ прекрасно согласуются с теоретическими. Их исследование позволило показать, что ультрафиолетовое облучение ДНК приводит к повышению концентрации дефектов, и найти ее значения. Определены величины k' (порядка 2 *мин*$^{-1}$). Минимальная концентрация дефектов, обнаруживаемая КФМ, составляет один дефект на 10^4 пар нуклеотидов — метод очень чувствителен [106].

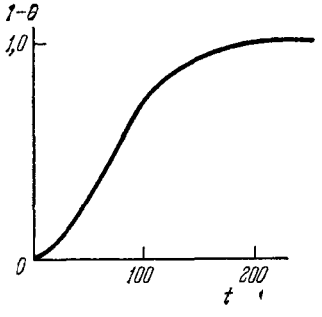


Рис. 8.23. Кинетическая кривая для ДНК с дефектами.
По оси абсцисс отложено t в условных единицах.

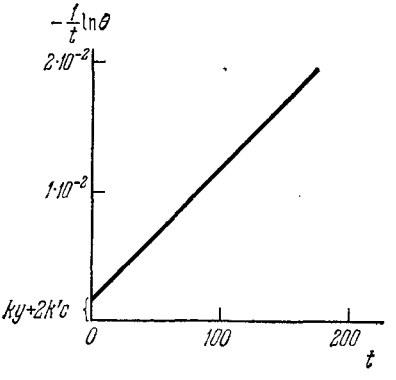


Рис. 8.24. Кинетическая кривая, трансформированная согласно уравнению (8,56).
По оси абсцисс отложено t в условных единицах.

Теория КФМ была уточнена с тем, чтобы учесть различия в значениях k и k' в разных точках молекулы [131]. Для гомополимера со «слабыми точками» зависимость $-\frac{1}{t}\ln 0$ от t, вообще говоря, криволинейна. Блочная гетерогенность ДНК также успешно учитывается теорией.

КФМ эффективно применялся для изучения ДНК с разрывами, вызванными панкреатической ДНКазой, к изучению ДНК, подвергшейся ультрафиолетовому облучению, и т. д. Нативная, интактная, ДНК оказалась практически лишенной дефектов или «слабых точек», что опровергает зигзагообразную модель нативной ДНК с резкими изломами и позволяет допустить справедливость червеобразной модели, в которой гибкость цепи определяется малыми поворотами в мономерах. КФМ применим к изучению комплексов ДНК с РНК-полимеразой (см. стр. 565), к изучению тонкой структуры ДНК [131, 132].

Денатурированные, клубкообразные одиночные цепи ДНК способны ренатурироваться, вновь образовывать двуспиральную

дезоксирибонуклеиновую кислоту. *Ренатурация* ДНК была открыта и изучена Мармуром, Доти и сотрудниками [133, 134]. При медленном охлаждении, т. е. «отжиге», денатурированной ДНК частично восстанавливаются ее биологическая активность (рис. 8.25) и гипохромный эффект. Восстановление оказывается неполным, в частности вследствие деструкции ДНК. Renатурация происходит и после быстрого охлаждения («закалки») денатурированной ДНК, если вновь подвергнуть такой образец нагреванию до температуры, несколько меньшей $T_{пл}$. За ренатурацией удобно следить по изменению плотности с помощью седиментации в градиенте CsCl. Например, плотность нативной ДНК равна 1,704 $г/см^3$, у денатурированной и закаленной в этом состоянии она составляет 1,716, а у ренатурированной — 1,700 $г/см^3$.

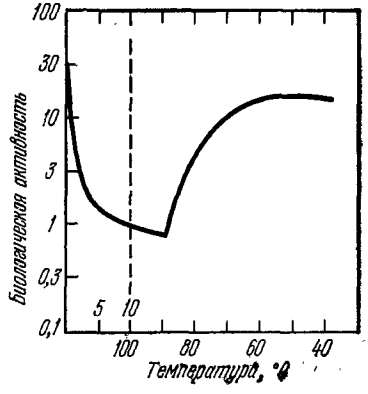


Рис. 8.25. Ренатурация ДНК. Числа над абсциссой 5 и 10 — время выдерживания образца при 100 °С.

Ренатурация должна, очевидно, сильно зависеть от температуры. Для ренатурации необходима температура, достаточно высокая для развертывания клубков и вместе с тем достаточно низкая для стабилизации двойной спирали. Следовательно, должна существовать оптимальная температура ренатурации. Это действительно так — ДНК из *Diplococcus pneumoniae* ренатурируется при 67 °С в 2,5 раза быстрее, чем при 80 и 50 °С.

Ренатурация легко проходит у фаговой ДНК, несколько труднее у бактериальной, но практически неосуществима у ДНК высших организмов. Если бы образцы ДНК, полученные из тимуса теленка, клеток *E. coli* и фага Т2 все имели молекулярный вес 10^7, то число различных молекул ДНК, приходящееся на одну клетку (или частицу фага), составило бы соответственно 10^6, 100, 10. При одинаковой весовой концентрации эти три образца имели бы весьма различные концентрации комплементарных цепей, и вероятность встречи двух таких цепей, возникших при денатурации одной молекулы, в образце, полученном из клеток млекопитающих, была бы очень мала.

Ренатурация позволяет получать гибридные двойные спирали из ДНК различного происхождения. Получены гибриды ДНК, выделенных из различных штаммов *E. coli*, и межбактериальные гибриды [134]. Гибридизация ДНК вскрывает эволюционно-генетические связи между организмами.

§ 8.8. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С МАЛЫМИ МОЛЕКУЛАМИ

Исследование взаимодействий ДНК (и РНК) с малыми молекулами важно для познания структуры ДНК и возможных ее изменений. Малые молекулы ряда соединений существенно влияют на биологическую функцию ДНК в качестве мутагенов (например, акридиновые красители, см. стр. 529) и ингибиторов транскрипции (например, актиномицин и другие антибиотики). Установлено, что это влияние определяется способностью антибиотиков образовывать медленно диссоциирующие комплексы с ДНК [135—137]. Ингибирование транскрипции (см. стр. 565) создается как затруднениями для расплетания ДНК [89], так и практической необратимостью образования комплексов типа ДНК — актиномицин. Акридиновые красители (АК), имеющие примерно такую же константу связывания с ДНК, как и актиномицин при низкой ионной силе, и увеличивающие $T_{пл}$ ДНК примерно на ту же величину [88], практически не влияют на транскрипцию [138]. Время диссоциации комплекса ДНК — профлавин составляет по порядку величины 10^{-3} *сек*, время диссоциации комплекса ДНК — актиномицин — 260 *сек*.

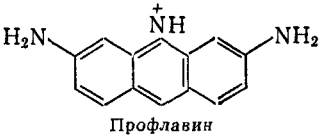
Связывание актиномицина и АК идет ступенчато, через ряд промежуточных форм. Комплексообразование меняет конформацию ДНК. Рентгенографическое исследование показало, что ДНК в комплексе с профлавином имеет бо́льший шаг спирали, чем у свободной ДНК и частично раскручивается [139]. Опыты со сверхскрученной (supercoiled) кольцевой ДНК показали, что в присутствии АК и актиномицина она раскручивается [140, 141]. В такой ДНК основная правая спираль закручена в правую спираль более высокого порядка. Раскручивание сверхскрученной ДНК при образовании комплекса приводит вследствие топологических особенностей кольцевой структуры самой ДНК к изменениям геометрии всей макромолекулы. Установлено существование критической концентрации лиганда, отвечающей полному раскручиванию сверхспирали; дальнейшее добавление красителя вызывает закручивание ДНК в обратном направлении с образованием левой сверхспирали. Эти факты обнаруживаются методом седиментации.

Пространственная модель комплекса должна учитывать раскручивание ДНК и его особенности. Лерман предложил модель *интеркаляции*, согласно которой молекулы АК прослаиваются между парами оснований ДНК, вступая с ними в вертикальное взаимодействие [142]. Для такой интеркаляции необходимо раскручивание сахаро-фосфатных остовов обеих цепей ДНК, что создает между парами оснований свободное пространство, достаточное для включения молекулы красителя. Ван-дер-ваальсова «толщина» этой молекулы составляет 3,4 Å. Модель Лермана

объясняет раскручивание, но детальный количественный анализ показал, что увеличение шага спирали ДНК, требуемое такой моделью, слишком велико. Модифицированная модель интеркаляции предполагает поворот пар оснований на 24° [126]. Тем самым и сахаро-фосфатный остов поворачивается на 24°, что показано экспериментально [143].

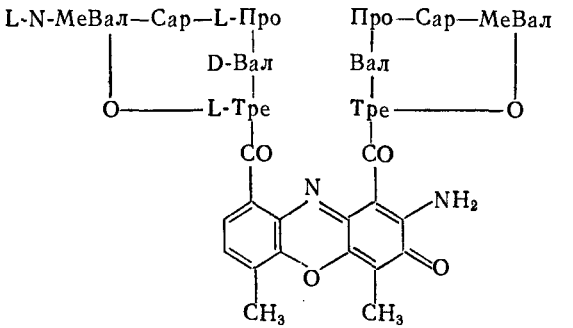
Однако раскручивание ДНК объясняют и модели «внешнего присоединения». Неплоские молекулы без сопряженных связей (например, стероид иредиамин) также вызывают раскручивание, равно как и ряд антибиотиков. Угол поворота пар оснований в комплексе с этидиумбромидом равен 12°, с профлавином $(8{,}4 \pm 2{,}4)°$, с дауномицином $(5{,}2 \pm 1{,}4)°$, с ногаломицином $(8{,}1 \pm 2{,}3)°$, с актиномицином $(11{,}4 \pm 3{,}0)°$ [141].

Изменение шага спирали ДНК вызывают также ионы металлов и некоторые белки, в том числе гистоны [144]. Изменение шага спирали ДНК в комплексах с АК и актиномицином, однако, значительно больше, что не вызывает удивления, так как для упаковки массивного органического катиона необходимы дополнительные геометрические условия. Приводим формулы некоторых лигандов



Профлавин

Акридиновый оранжевый



Актиномицин C_1
(Сар – сарколизин)

Модели «внешнего присоединения» были детально разработаны Гурским [145]. Предполагается, что АК или актиномицин располагаются в узкой бороздке на поверхности двойной спирали ДНК. Молекула профлавина погружена в эту бороздку таким образом, что на внешней поверхности ДНК располагаются кольцевой азот акридинового кольца и аминогруппы, несущие

положительные заряды. Они взаимодействуют с атомами кислорода фосфатных групп посредством водородных и электростатических связей. Диэтил- или диметиламиногруппы в положениях 2 и 8 образуют только электростатические связи. Эти взаимодействия стягивают фосфатные группы двух цепей и вызывают раскручивание спирали. Хромофорное кольцо актиномицина образует водородные связи с 2-аминогруппой гуанина, а амиды пептидных колец — с фосфатными группами. Пептидные кольца актиномицина расположены в узкой бороздке ДНК на разных сторонах хромофорного кольца симметрично; соответствующая ось симметрии второго порядка совпадает с такой же осью ДНК и направлена перпендикулярно к длинной оси хромофора. Эта теоретическая модель отчасти подтверждается рентгенографическими исследованиями комплекса актиномицина с дезоксигуанозином [146]. Другая модель «внешнего присоединения», ранее предложенная в работе [147], таких подтверждений не имеет.

И модель Лермана, и модель Гурского согласуются с рядом фактов [145, 148—150], но обе они встречаются и с трудностями при объяснении некоторых экспериментальных данных [145, 150, 151]. Однозначный выбор модели пока затруднителен.

Крозерс сообщил о получении кристаллического комплекса актиномицина с коротким олигомером, содержащим пять пар оснований [152]. Олигомер имеет лишь одно связывающее место для антибиотика. Исследование таких комплексов методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР обещает установление структуры комплексов ДНК с АК и актиномицином.

Изучение связывания малых молекул макромолекулой ДНК требует построения теории одномерной адсорбции на полимере. Если связывающие места независимы друг от друга, то изотерма адсорбции совпадает с изотермой Лэнгмюра

$$y = \frac{Kan}{1 + Ka}, \tag{8,57}$$

где y — количество связанного лиганда в расчете на мономер, K — константа связывания, n — число связывающих мест в молекуле ДНК, a — активность лиганда. Такую зависимость [153] следует считать скорее исключением. При кооперативной адсорбции связанные молекулы образуют «неидеальный газ». В модели Крозерса [154] каждая молекула лиганда занимает m звеньев подряд, т. е. мы имеем дело с «неидеальным газом с отталкиванием». Эта модель объясняет экспериментальные кривые адсорбции акридиновых красителей на ДНК с помощью одной константы связывания.

В работе [155] модель Крозерса была обобщена. В ней учтено, что макроскопическая константа связывания может зависеть от расстояния между ближайшими соседними лигандами.

Анализ экспериментальных изотерм адсорбции позволяет получить сведения о форме этой зависимости.

Крозерс провел также численные расчеты изотерм адсорбции для гетерополимеров с различными последовательностями оснований [154]. В работах [156] рассмотрена адсорбция на неоднородной линии и поверхности.

Строгое решение задачи для гетерополимера со связывающими местами двух сортов (пары А — Т и Г — Ц) дано в работе [157]. Статистическая сумма для такой системы имеет вид

$$Z = \sum_{q=0}^{n} a^q Z_q, \tag{8,58}$$

где Z_q — статистическая сумма для полимера, связавшего q молекул лиганда, n — максимальное число адсорбируемых молекул. Для гомополимера

$$Z_q = \frac{(N - mq + q)!}{(N - mq)!\, q!} \exp\left(-\frac{\Delta F q}{RT}\right); \tag{8,59}$$

здесь N — число связывающих мест (нуклеотидных пар) в полимере, m — число мест, занимаемых одной молекулой лиганда, $\Delta F = RT \ln K$. Предэкспоненциальный множитель есть число способов расположения отрезков длины m на одномерной решетке.

Предположим, что константы связывания молекул равны $K_А$ или $K_Г$ в зависимости от того, какая из пар (А — Т или Г — Ц) находится на расстоянии l звеньев от левого края лиганда. В определенном положении в молекуле лиганда имеется группа, узнающая нуклеотидную пару. Пронумеруем связывающие места слева направо. Связывающее место j занято лигандом, если начало последнего находится в местах j, $j-1$, ..., $j-m+1$. Каждой такой ситуации отвечает вклад в статистическую сумму b_j^1, b_j^2, ..., b_j^m соответственно; при незанятом месте j получаем вклад b_j^0. Имеем

$$\left.\begin{aligned}
b_j^0 &= 1 \cdot b_{j-1}^0 + 0 \cdot b_{j-1}^1 + \ldots + 1 \cdot b_{j-1}^m, \\
b_j^1 &= s_{j+l} b_{j-1}^0 + 0 \cdot b_{j-1}^1 + \ldots + s_{j+l} b_{j-1}^m, \\
&\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \\
b_j^m &= 0 \cdot b_{j-1}^0 + 0 \cdot b_{j-1}^1 + \ldots + 1 \cdot b_{j-1}^{m-1} + 0 \cdot b_{j-1}^m,
\end{aligned}\right\} \tag{8,60}$$

где $s_j = s_А = K_А a$, если в месте j находится пара А — Т, и $s_j = s_Г = K_Г a$, если в нем расположена пара Г — Ц. Сумма (8,58) принимает форму

$$Z_N = b_{N-m+1}^0 + b_{N-m+1}^1 + \ldots + b_{N-m+1}^m. \tag{8,61}$$

Из двух последних соотношений следует, что

$$Z_N = Z_{N-1} + s_{N-m+l} Z_{N-m}. \tag{8,62}$$

Для числа сорбированных молекул на пару оснований получаем

$$y = N^{-1}\left\{ s_{\text{А}} \frac{\partial}{\partial s_{\text{А}}} (\ln Z_N) + s_{\text{Г}} \frac{\partial}{\partial s_{\text{Г}}} (\ln Z_N) \right\}. \qquad (8{,}63)$$

Величина y, будучи интегральной характеристикой, мало зависит от последовательности пар А — Т и Г — Ц. Для случайной последовательности

$$y = s_{\text{А}} \frac{\partial}{\partial s_{\text{А}}} \langle N^{-1} \ln Z_N \rangle + s_{\text{Г}} \frac{\partial}{\partial s_{\text{Г}}} \langle N^{-1} \ln Z_N \rangle. \qquad (8{,}64)$$

Угловые скобки означают усреднение по всем возможным последовательностям. Имеем

$$N^{-1} \ln Z_N = N^{-1} \sum_{j=1}^{N-m+1} \ln (1 + w_j), \qquad (8{,}65)$$

где

$$w_j = b_j^1 / (b_j^0 + b_j^2 + \ldots + b_j^m).$$

Вместе с тем

$$\left.\begin{aligned} w_j &= \frac{s_{j+l}}{\prod_{i=0}^{l-1} (1 + w_{j-i})}, \quad \text{если} \quad m+1 \leqslant j \leqslant N-m+1, \\ w_j &= \frac{s_{j+l}}{\prod_{i=1}^{l-1} (1 + w)}, \quad \text{если} \quad 2 \leqslant j \leqslant m, \\ w_1 &= s_l. \end{aligned}\right\} \qquad (8{,}66)$$

Усреднение $\ln Z_N$ производится с помощью функции [158]

$$C_N(t) = N^{-1} \left\langle \sum_{j=1}^{N-m+1} \ln (t + w_j) \right\rangle. \qquad (8{,}67)$$

Ясно, что $C_N(1) = N^{-1} \langle \ln Z_N \rangle$. При $m = 2$ получается [157, 158]

$$\left[\frac{N}{N-1}\right] C_N(t) = x_{\text{А}} C_{N-1}\left[\frac{(t + s_{\text{А}})}{t}\right] + x_{\text{Г}} C_{N-1}\left[\frac{(t + s_{\text{Г}})}{t}\right] - C_{N-1}(1) + \frac{2}{(N-1)} C_2(t) + \frac{(N-2)}{(N-1)} \ln t, \qquad (8{,}68)$$

где

$$C_2(t) = {}^1/_2 \{ x_{\text{А}} \ln (t + s_{\text{А}}) + x_{\text{Г}} \ln (t + s_{\text{Г}}) \},$$

$x_{\text{А}}$, $x_{\text{Г}} = 1 - x_{\text{А}}$ — доли пар А — Т и Г — Ц. При $N \to \infty$ (8.68) принимает вид

$$C_\infty(t) = x_{\text{А}} C_\infty [(t + s_{\text{А}})/t] + x_{\text{Г}} C_\infty [(t + s_{\text{Г}})/t] - C_\infty(1) + \ln t. \qquad (8{,}69)$$

Из (8.63), (8,64), (8,68) и (8,69) можно найти точное решение задачи при $m = 2$. При $m > 2$ можно оценить $C_\infty(1)$ приближенно. Расчет дает [157] для случая связывания лиганда только одним типом центров ($s_A = 0$)

$$\left[1 + \frac{y}{x_\Gamma - y[1 - x_\Gamma(m-1)]}\right]^{x_\Gamma(m-1)} \frac{y}{x_\Gamma - y[1 + x_\Gamma(m-1)]} = s_\Gamma. \quad (8,70)$$

Если x_Γ мало, то эта изотерма с точностью до членов первого порядка малости обращается в изотерму Лэнгмюра $y/(x_\Gamma - y) = x_\Gamma a$. Если $x_\Gamma \to 1$, изотерма (8,70) превращается в изотерму для гомополимера. Формула (8,70) совпадает с вычисленной по Крозерсу тем лучше, чем больше m. Расчеты проводятся с помощью ЭВМ. Однако для нахождения основных параметров из экспериментальной изотермы достаточно рассмотреть асимптотические зависимости при $a \to 0$ и $a \to \infty$. Имеем

$$\left.\begin{aligned} \lim_{y\to 0}(y/a) &= \langle Z_1\rangle / NZ_0, \\ \lim_{y\to 0}\frac{\partial(y/a)}{\partial y} &= \frac{\langle 2Z_2 - Z_1^2/Z_0\rangle}{\langle Z_1\rangle} \end{aligned}\right\}. \quad (8,71)$$

где Z_1 и Z_2 — статистические суммы для полимера, на котором адсорбированы один и два лиганда. Усреднение проводится по всем возможным последовательностям пар А — Т и Г — Ц. Статистическую сумму Z_2 можно представить в виде

$$\frac{Z_2}{Z_0} = {}^1/_2\left[\frac{Z_1^2}{Z_0^2} - \sum_{\xi=1}^{\nu}\sum_{\eta=1}^{\nu}\varphi_{\xi\eta}K_\xi K_\eta\right], \quad (8,72)$$

где ν — число комплексов различного типа, образуемых молекулами лиганда на полимере, K_ξ и K_η — константы связывания. Здесь в Z_1^2 учитывается число потенциально возможных микросостояний для двух адсорбированных лигандов. $\varphi_{\xi\eta}$ есть общее число микросостояний с константами K_ξ, K_η, не реализуемых вследствие того, что каждый адсорбированный лиганд занимает некоторое число мест, способных связать второй лиганд.

Допустим, что $\nu = 2$ и имеются две константы K_A и K_Γ. Из (8,71) и (8,72) следует

$$\lim_{y\to 0}\frac{\partial(y/a)}{\partial y} = \frac{\langle\varphi_{AA}\rangle K_A^2 + 2\langle\varphi_{A\Gamma}\rangle K_A K_\Gamma + \langle\varphi_{\Gamma\Gamma}\rangle K_\Gamma^2}{\langle Z_1\rangle/Z_0}. \quad (8,73)$$

Пронумеруем последовательно все возможные способы связывания одной молекулы лиганда, приписав каждому месту связывания индекс i ($i = 1,2, \ldots, N - m + 1$). Имеем

$$Z_1 = (N - m + 1)(K_A x_A + K_\Gamma x_\Gamma) Z_0. \quad (8,74)$$

Для средних значений чисел $\varphi_{\xi\eta}$ получим

$$\langle\varphi_{\xi\eta}\rangle = \sum_{i=1}^{N-m+1} \langle\varphi^i_{\xi\eta}\rangle, \tag{8,75}$$

где $\langle\varphi^i_{\xi\eta}\rangle$ — среднее число связывающих мест с константой связывания K_η, недоступных для связывания второго лиганда вследствие того, что первый лиганд адсорбирован на i-м месте с константой связывания K_ξ. Имеем

$$\langle\varphi_{\xi\eta}\rangle = x_\xi (N - m + 1)\,\delta_{\xi\eta} + x_\xi x_\eta (m-1)(2N - 3m + 2), \tag{8,76}$$

где $\delta_{\xi\eta}$ — символ Кронекера. Окончательно получим

$$\left.\begin{aligned} &\lim_{y\to 0} (y/a) = \frac{N-m+1}{N}(x_A K_A + x_\Gamma K_\Gamma), \\ &\lim_{y\to 0} \frac{\partial (y/a)}{\partial y} = -\frac{x_A K_A^2 + x_\Gamma K_\Gamma^2}{x_A K_A + x_\Gamma K_\Gamma} - \\ &\qquad -\left(2 - \frac{m}{N-m+1}\right)(m-1)(x_A K_A + x_\Gamma K_\Gamma). \end{aligned}\right\} \tag{8,77}$$

Формулы очевидным образом упрощаются при $N \to \infty$;

$$\left.\begin{aligned} &\lim_{y\to 0} (y/a) = x_A K_A + x_\Gamma K_\Gamma, \\ &\lim_{y\to 0} \frac{\partial (y/a)}{\partial y} = -\frac{x_A K_A^2 + x_\Gamma K_\Gamma^2}{x_A K_A + x_\Gamma K_\Gamma} - (2m-2)(x_A K_A + x_\Gamma K_\Gamma). \end{aligned}\right\} \tag{8,78}$$

Если концентрация свободного лиганда очень велика, то на полимере реализуется максимально плотная упаковка адсорбированных молекул. Значения $y_{\max}$ можно определить, исходя из геометрических свойств такой упаковки.

Если для всех возможных положений лиганда на полимере K отличны от нуля, то $y_{\max} = m^{-1}$.

Допустим, что лиганд связывается только с парами одного типа. Пусть молекула лиганда на расстоянии $l \leqslant [1/2 m]$ от левого конца имеет группу, узнающую пару Г — Ц. Здесь $[1/2 m]$ — целое число, $1/2 m - 1 < [1/2 m] \leqslant 1/2 m$. Будем мысленно присоединять молекулы лиганда, начиная с левого конца, так, чтобы узнающая группа каждого последующего лиганда приходилась на ближайшую пару Г — Ц, расположенную на расстоянии, большем или равном l от правого конца предыдущего лиганда. Это дает плотную упаковку. При случайном расположении пар Г — Ц их средняя доля, непосредственно занятая связанными молекулами, равна $y[1 + x_\Gamma (m-1)]$. Незанятыми могут остаться лишь те пары Г — Ц, которые отстоят от правых концов связанных молекул лиганда на 1,2, ..., $l-1$ пар. Вероятность w_i обнаружить i

незанятых пар равна

$$\left.\begin{aligned} w_i &= W^{-1}x_\Gamma(1-x_\Gamma)^i, \quad 1 \leqslant i \leqslant l-2, \\ w_i &= W^{-1}(1-x_\Gamma)^{l-1}, \quad i = l-1, \end{aligned}\right\} \tag{8,79}$$

где

$$W = \sum_{i=1}^{l-1} w_i.$$

Общая доля незанятых пар Г — Ц равна $y_{\max} = \sum_{i=1}^{l-1} i x_\Gamma w_i$. Поскольку каждая пара Г — Ц может быть либо занята, либо свободна, получаем

$$y_{\max} = \frac{x_\Gamma}{1 + x_\Gamma(m-1) + (1-x_\Gamma)\left[1-(1-x_\Gamma)^{l-1}\right]}. \tag{8,80}$$

Если $[{}^1/_2 m] < l \leqslant m$, то

$$y_{\max} = \frac{x_\Gamma}{1 + x_\Gamma(m-1) + (1-x_\Gamma)\left[1-(1-x_\Gamma)^{m-l}\right]}. \tag{8,81}$$

Если $l = 1$ или $l = m$, то $y_{\max} = x_\Gamma/[1 + x_\Gamma\ (m-1)]$, что согласуется с приближенной формулой (8,57). В общем случае $y_{\max}$ зависит от положения узнающей группы в молекуле лиганда.

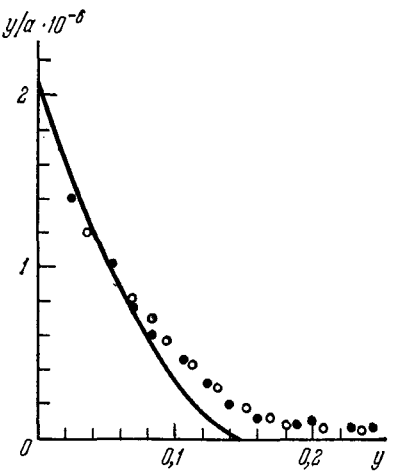


Рис. 8.26. Изотерма адсорбции актиномицина на ДНК.

В случае гомополимера или адсорбции лиганда, независимой от природы мономеров, изотерму адсорбции можно получить в аналитическом виде [154, 155]. Согласно [154] имеем

$$\left(1 + \frac{y}{1-ym}\right)^{m-1} \frac{y}{1-ym} = Ka. \tag{8,82}$$

Однако эта формула не учитывает взаимодействия между молекулами лиганда — непосредственного или в результате вызванного ими изменения структуры полимера. Комбинаторный расчет такого кооперативного связывания проведен в работе [157].

Изложенная теория позволяет интерпретировать результаты эксперимента. Антибиотики типа актиномицина (см. стр. 529) ад-

сорбируются на ДНК и поли-Г — Ц, но не поли-А — Т [158—160]. Типичная изотерма адсорбции актиномицина на ДНК из тимуса представлена на рис. 8.26. Из начального наклона и пересечения кривой с осью ординат можно определить K и m (т. е. размер участка ДНК, занимаемого одной молекулой лиганда). Теоретическая изотерма адсорбции, рассчитанная по формуле (8,70), представлена сплошной кривой на рис. 8.26. Совпадение кривой (8.70) с опытной в области малых y получается при $m = 5$ и $K = 5 \cdot 10^6$ *л/моль* пар оснований. Та же оценка m сохраняется для ДНК из Т-четных фагов, в которых последовательность оснований близка к случайной, Мюллер и Крозерс [161] получили аналогичную оценку m из данных, относящихся к ДНК с неслучайной последовательностью. Это показывает, что среднее число пар Г — Ц, занимаемых одной молекулой актиномицина, по-видимому, близко к величине, найденной для полимера со случайной последовательностью. Значение $m = 5$ согласуется с ван-дер-ваальсовыми размерами молекулы актиномицина.

Изотерма адсорбции профлавина на ДНК согласуется с теоретическим расчетом, учитывающим взаимодействие адсорбированных молекул. При малых y имеем $m = 3$, $K = 16 \cdot 10^6$ *л/моль*. В области значений $0{,}2 \leqslant y \leqslant 0{,}33\ m$ в среднем убывает до 2, а K до $1{,}6 \cdot 10^6$ *л/моль*.

§ 8.7. РЕДУПЛИКАЦИЯ ДНК

В принципе возможны три механизма редупликации ДНК [162]: консервативный с сохранением исходной двойной спирали и созданием новой дочерней спирали, полуконсервативный (см. стр. 496) и дисперсный с равномерным распределением исходного материала между четырьмя цепями двух дочерних двойных спиралей (см. [6]). Месельсон и Сталь изучали редупликацию ДНК при делении клеток *E. coli* с помощью меченых атомов и седиментации в градиенте плотности CsCl [76]. Была получена популяция клеток, меченных N^{15}. В период интерфазы митоза эти клетки переносились в среду, содержавшую N^{14} (но не N^{15}), и в ней делились. Из исходной популяции «детей» и «внуков» извлекалась ДНК и определялась ее плотность и радиоактивность. Исходная ДНК имела наибольшую плотность и была мечена N^{15}. ДНК «детей» оказалась меченной наполовину и ее плотность равнялась среднему арифметическому плотностей N^{15}-ДНК и N^{14}-ДНК. Наконец, ДНК «внуков» разделились при седиментации на две зоны — на зону с ДНК, меченную N^{14}, и зону ДНК, содержащую оба типа ДНК. Эти результаты точно согласуются с полуконсервативным механизмом.

Отвлекаясь от вопроса о структуре хромосом высших организмов, укажем, что, пользуясь методом авторадиографии, Тейлор нашел, что их хромосомы в целом редуплицируются также полуконсервативно, и предложил модель, связывающую редупликацию хромосом с редупликацией ДНК [163] (см. также [6]).

Методом авторадиографии была изучена редупликация кольцеобразной двойной спирали ДНК — единственной хромосомы *E. coli*. Включение тритиевой метки идет последовательно от нуклеотида к нуклеотиду. Хромосома редуплицируется, начиная с некоторого локуса [164] (см. также [6]).

Корнберг провел редупликационный матричный синтез ДНК *in vitro* [165, 166]. Инкубационная смесь содержала трифосфаты всех четырех дезоксинуклеозидов (ТТФ, ЦТФ, ГТФ, АТФ), ионы Mg^{++} ($6 \cdot 10^{-3} M$), полимеризующий фермент, выделенный из *E. coli*, и нативную ДНК (из тимуса теленка) в качестве затравки; pH равнялось 7,5. В такой полной системе ДНК редуплицируется. Реакция не идет в отсутствие хотя бы одной из компонент или при предварительной обработке затравочной ДНК дезоксирибонуклеазой — ферментом, разрушающим ДНК. С помощью нуклеотидов, меченных P^{32}, показано, что синтез цепи ДНК поликонденсационный — при включении одного нуклеотида в цепь выделяется одна молекула пирофосфата $H_4P_2O_7$. Согласно закону действия масс реакция тормозится при добавлении избытка пирофосфата. Если его количество в 100 раз превышает общее количество трифосфатов, скорость реакции уменьшается вдвое. Позднее, пользуясь улучшенной ферментной системой, Корнберг редуплицировал этим методом ДНК фага φX 174. Вновь полученная ДНК оказалась обладающей инфицирующим действием — при ее введении в бактериальную клетку синтезировались частицы фага [167]. С помощью ДНК-полимеразы удается синтезировать и двойные спирали из синтетических полидезоксирибонуклеотидов

— А — Т — А — Т — А — Т — А — Т —
— Т — А — Т — А — Т — А — Т — А —

и

— Г — Г — Г — Г — Г — Г — Г — Г —
— Ц — Ц — Ц — Ц — Ц — Ц — Ц — Ц — .

В дальнейшем было установлено, что полимераза Корнберга является скорее репаразой — медленно действующим ферментом, заполняющим бреши в полинуклеотидных блоках. *In vivo* работает истинная полимераза. Мы еще мало знаем об этих ферментах.

Статистико-термодинамическое рассмотрение редупликации ДНК проведено в работах [168, 169] (см. также [6]). Изменение свободной энергии при образовании двух двойных спиралей из одной исходной двойной спирали и нуклеозидтрифосфатов можно представить в виде

$$\Delta F = N(2E_1 + \bar{E}_2) - T\Delta S, \tag{8,83}$$

где N — число нуклеотидов в цепи, E_1 — энергия, выделяемая при включении одного нуклеотида в цепь, $\bar{E}_2$ — среднее значение энергии, выделяемой в результате взаимодействий, стабилизующих уотсон-криковскую пару. $\bar{E}_2$ зависит от относительного содержания α пар Г — Ц:

$$\bar{E}_2 = \alpha E_{\text{ГЦ}} + (1-\alpha)E_{\text{АТ}}. \tag{8,84}$$

Изменение энтропии определяется заменой нуклеозидтрифосфата (НТФ) на пирофосфат (ФФ) в растворе и утратой нуклеотидом, включившимся в двойную спираль, вращательных и поступательных степеней свободы. Этот последний фактор запишем в виде $k \ln q$. В целом

$$\Delta S = 2Nk \ln\left(q \frac{\bar{x}_{\text{НТФ}}}{x_{\text{ФФ}}}\right), \tag{8,85}$$

где $x_{\text{ФФ}}$ — концентрация ФФ в растворе, $\bar{x}_{\text{НТФ}}$ — средняя концентрация НТФ, равная $\left(x_{\text{Г}}^{\alpha} x_{\text{Ц}}^{\alpha} x_{\text{А}}^{1-\alpha} x_{\text{Т}}^{1-\alpha}\right)^{1/2}$, $x_{\text{Г}}$, $x_{\text{Ц}}$, $x_{\text{А}}$, $x_{\text{Т}}$ — концентрации соответствующих НТФ. Если они равны друг другу, то $\bar{x}_{\text{НТФ}} = x_{\text{Г}} = x_{\text{Ц}} = x_{\text{А}} = x_{\text{Т}} = {}^1/_4 x_{\text{НТФ}}$. Условие редупликации имеет вид

$$2E_1 + \bar{E}_2 + 2kT \ln\left(q \frac{\bar{x}_{\text{НТФ}}}{x_{\text{ФФ}}}\right) \geqslant 0. \tag{8,86}$$

Величины E_1 и $\bar{E}_2$ равны примерно 4 и 5 *ккал/моль*. Величина q равна $Z_1' Z_2 / Z_1 Z_2'$, где Z_1 и Z_1' — статистические суммы для НТФ в растворе и для НТФ, присоединенного к матрице водородными связями, Z_2 и Z_2' — статистические суммы для ФФ в растворе и ФФ, входящего в НТФ и присоединенного к матрице.

Оценка дает $q \sim 10^{-2}$. При 300 °К условие редупликации (8,86) выполняется, пока $x_{\text{ФФ}}/\bar{x}_{\text{НТФ}}$ не превысит 400. В клетках и в системах Корнберга это отношение много меньше. Условие (8,86) выполняется, и редупликации, если она не идет, препятствуют, видимо, не термодинамические, но кинетические причины или нехватка НТФ.

Аналогичное рассмотрение денатурации приводит к значению разности свободных энергий разделенных цепей и двойной спирали, равному

$$\Delta F' = N\bar{E}_2 - 2NkT \ln q', \tag{8,87}$$

где q' характеризует изменение собственной энтропии цепи, приходящееся на один нуклеотид. Условие денатурации есть $\Delta F' \leqslant 0$, q' можно приравнять числу конформаций звена одиночной цепи. В звене содержится пять единичных связей, вращению вокруг каждой из них отвечают две-три конформации. q' равно по порядку величины 10—100. Из (8,87) следует, что температура денатурации

$$T_{\text{пл}} = \frac{\bar{E}_2}{2k \ln q'} = \frac{E_{\text{АТ}}}{2k \ln q'} + \alpha \frac{E_{\text{ГЦ}} - E_{\text{АТ}}}{2kT \ln q'}. \qquad (8,88)$$

Экспериментальная зависимость $T_{\text{пл}}$ (в градусах Кельвина) от α

$$T_{\text{пл}} = 342 + 41\alpha$$

получается при $E_{\text{АТ}} = 4{,}7$, $E_{\text{ГЦ}} = 5{,}3$ *ккал/моль* и $q' = 32$.

Эти грубые расчеты не учитывают роли противоионов (см. стр. 524) и, конечно, строгого количественного значения не имеют. Однако они позволяют оценить порядок величин ΔH и ΔS.

Очевидно, что судьба двойной спирали зависит от соотношения ΔF и $\Delta F'$. Если $\Delta F < \Delta F'$ и $\Delta F \leqslant 0$, то возможна редупликация. Если $\Delta F' < \Delta F$ и $\Delta F' \leqslant 0$, то происходит денатурация. Если $\Delta F = \Delta F' \leqslant 0$, то оба процесса равновероятны, и, наконец, при $\Delta F > 0$, $\Delta F' > 0$ двойная спираль остается без изменений.

Статистическая механика редупликации [168, 169] (см. также [6]) исходит из модели Изинга (см. стр. 137). Первое предположение состояло в том, что происходит расплетание спирали на обоих концах. На звеньях освободившихся цепей сорбируются НТФ. Нуклеотидная связь новой цепи возникает, если на любых двух соседних звеньях матрицы сорбированы нуклеотиды, пригодные для образования уотсон-криковской пары. Исследование полученной при этих предположениях статистической суммы позволяет найти зависимость степени редупликации от концентрации НТФ. В силу условия кооперативности (требования надлежащего соседства сорбированных НТФ) редупликация должна идти при критическом значении $\bar{x}_{\text{НТФ}}/x_{\text{ФФ}}$ по принципу «все или ничего», как фазовый переход. Это справедливо, конечно, лишь при очень больших N; при $N \sim 10^2$ получается лишь S-образность. В рамках той же теории мы приходим к грубому описанию денатурационного перехода.

Однако ряд данных показывает, что НТФ сорбируется на звеньях освободившихся цепей не случайным образом. Синтез новой цепи осуществляется путем последовательного присоединения НТФ к 3-нуклеозидному концу растущей цепи [171]. Следовательно, процесс «антипараллелен» — редупликация происходит на первом конце одной цепи и втором — другой [172]. Такой процесс также кооперативен, так как следующий НТФ

может присоединиться, только если предыдущее место уже занято НТФ. Статистическая сумма системы имеет вид [169] (см. также [6])

$$Z = \sum_{r=0}^{N-1} \sum_{i=0}^{r} \sum_{p=0}^{N-1-r} \sum_{l=0}^{p} b_1^{r+p} b_2^{i+l} + b_1^N \sum_{r'=0}^{N} \sum_{r''=0}^{N} b_2^{r'+r''}. \qquad (8,89)$$

Здесь $b_1 = \exp(-\bar{E}_2/kT + 2\ln q)$, $b_2 = a_3/a_2$, $a_2 = \exp(-F_2/kT)$, $a_3 = \exp[-(F_1 - F_3)/kT]$, $F_2 = -kT\ln q$, $F_1 = -\bar{E}_2 - kT\ln(\bar{x}_{\text{НТФ}} Z_1'/Z_1)$, $F_3 = -E_1 - kT\ln(x_{\text{фф}} Z_2'/Z_2)$. Первое слагаемое в (8.89) относится к состояниям, в которых цепи еще не разделились и удерживаются вместе хотя бы одной водородной связью. В качестве произвольного промежуточного состояния взято состояние, в котором с одного конца разорвано r связей между основаниями и выросла новая цепь из i нуклеотидов, а с другого конца разорвалось p связей и выросла цепь из l нуклеотидов. Второе слагаемое относится к состояниям, в которых все связи между основаниями разорваны и синтез идет на одиночных цепях ДНК. Промежуточным считается состояние, в котором на одной цепи выросла новая цепь из r', а на другой — из r'' нуклеотидов. Сложное суммирование упрощается, если учесть, что при невысоких температурах, когда денатурация термодинамически невыгодна, $b_1 < 1$. Редупликация идет лишь при $b_1 b_2^2 \geqslant \geqslant 1$. Можно пренебречь в интересующей нас области температур членами порядка b_1^N и $b_1^N b_2^N$. Тогда

$$Z \approx \frac{1}{(1-b_1)^2(1-b_1 b_2)^2} + \frac{(b_1 b_2^2)^N b_2^2}{(1-b_2)^2}, \qquad (8,90)$$

Среднее число присоединившихся нуклеотидов равно

$$2\bar{r} = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln b_2}. \qquad (8,91)$$

Если $b_1 b_2^2 < 1$, то $2\bar{r} \approx \frac{2b_1 b_2}{1 - b_1 b_2}$, и если b_1 мало, то мало и $\bar{r}$. Если $b_1 b_2^2 > 1$, то $2\bar{r} \approx 2N - \frac{2}{b_2 - 1}$, т. е. $\bar{r} \approx N$ — редупликация идет до конца. Условие редупликации есть $b_1 b_2^2 = 1$. Оно совпадает с (8,86). В точке перехода $\bar{r}$ равно не $^1/_2 N$, а примерно $^1/_5 N$. Это объясняется ролью промежуточных состояний при неполном разделении цепей, когда синтез новых цепей менее выгоден, так как разрыв данной пары оснований может привести к росту лишь одной цепи. Переход по-прежнему очень резок только при $N \gg 1$.

Статистико-термодинамическая теория редупликации не противоречит опыту, но не имеет и прямых подтверждений, так как

не исследовалось влияние $x_{\Phi\Phi}$ на синтез ДНК *in vitro*. Вместе с тем теория эта груба, поскольку она не учитывает роли противоионов и pH среды.

Ряд фактов действительно показывает, что редупликация требует расплетания исходной двойной спирали. Репликативный синтез идет с непременным участием ДНК-полимеразы, которая по-видимому, перемещается вдоль двойной спирали, расплетая ее и синтезируя новые цепи (модель «застежка-молния»). Бактериофаг φX 174 содержит не двуспиральную, а односпиральную, однонитевую ДНК. Синсхеймер показал, что размножение этого фага идет через репликативную стадию, в которой ДНК фага становится двуспиральной [173]. Следовательно, в данном случае редуплицируется именно двойная спираль. Это относится и к РНК вирусов, при редупликации которых возникает промежуточная двуспиральная структура [174]. Одноцепочечная ДНК фага φX 174 кольцеобразна. В упомянутых выше опытах Корнберга (см. стр. 537) эта ДНК служила затравкой. ДНК-полимераза строила на ней новую цепь, не замкнутую в кольцо. Между тем только кольцевая ДНК биологически активна, т. е. обладает инфекционностью. Корнберг воспользовался другим ферментом — лигазой (препарат Лемана — Оливера) для замыкания новой цепи. Новые цепи строились не с тимином, а с бромурацилом. Для выделения синтетической ДНК препарат кратковременно обрабатывался ДНКазой так, чтобы примерно у половины молекул в кольце происходил один разрыв. В результате получалась смесь, содержащая в равных количествах матричные кольца, синтетические кольца, матричные и синтетические незамкнутые ДНК, а также двойные кольца без разрывов. Методом седиментации в градиенте плотности выделялись синтетические кольца, содержавшие тяжелый бромурацил. Эти кольца оказались способными инфицировать клетки *E. coli*. Ранее Синсхеймер показал, что замена одного из 5500 нуклеотидов ДНК из фага φX 174 приводит к утрате инфекционности. Следовательно, синтез Корнберга был абсолютно точен. Далее удалось получить и синтетические двойные кольца — репликативную форму [167].

Кинетика редупликации ДНК представляет значительно больший интерес, чем термодинамика. Термодинамические условия редупликации несомненно реализованы в делящейся клетке. Исследование кинетики может дать сведения о работе полимеразы — еще очень мало изученного белка.

Расплетание двойной спирали ДНК при одновременной редупликации (а также при синтезе мРНК, см. стр. 565) должно происходить не так, как при денатурации. Выигрыш свободной энергии при образовании новых цепей обусловливает появление значительного вращающего момента. Эта проблема рассматривалась в [120, 175—177]. Автор работы [177] исходит из того, что

полимераза, перемещающаяся вдоль двойной спирали, создает локальные условия, нарушающие баланс взаимодействий между цепями. Предположительно она препятствует гидрофобным взаимодействиям оснований. Соответствующая модель показана на рис. 8.27. Количественная теория процесса, однако, еще не построена.

Элементарная модель для изучения кинетики редупликации ДНК — одномерная матрица, на которой сорбируются НТФ, причем с одного конца идет необратимая поликонденсация. Анализ такой модели, учитывающей необходимость энергии активации для адсорбции и десорбции НТФ (разрыв водородных связей с водой при адсорбции и с матрицей при десорбции), проведен в работе [178] (см. также [6]). Грубые оценки показывают, что диффузия к матрице НТФ из раствора протекает быстрее процессов на матрице и скорость синтеза лимитируется не сорбцией и десорбцией, а ферментативным процессом. В согласии с опытом теория показывает, что синтез должен идти без индукционного периода.

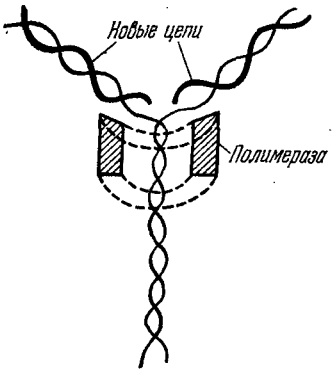


Рис. 8.27. Модель расплетания двойной спирали ДНК при редупликации.

Другая кооперативная модель, предполагающая, что соединение нуклеотидов происходит в любом месте матрицы, где две или большее число соседних ячеек заняты сорбированными нуклеотидами, противоречат опыту, так как дает заметный индукционный период.

Более строгое рассмотрение линейного матричного синтеза было проведено в последующих работах [179—184]. Изложим работу [184].

Рассмотрим одномерную матрицу из m ячеек. Центр роста (полимераза) входит в первую ячейку и уходит из m-й. Синтез необратим, т. е. процесс перемещения центра от $i-1$-й к i-й ячейке протекает вдали от равновесия. Константа скорости роста k_r для любой ячейки одинакова, константа скорости инициирования k_0 много меньше k_r. Уход центра роста из m-й ячейки происходит быстро и не лимитирует процесс. Задача сводится к рассмотрению необратимого блуждания в одномерной системе. Кинетические уравнения имеют вид

$$\left.\begin{aligned} \dot{N}_1 &= k_0 - k_r N_1, \\ \dot{N}_i &= k_r N_{i-1} - k_r N_i, \\ \dot{N}_m &= k_r N_{m-1}, \end{aligned}\right\} \qquad (8,92)$$

где $i = 2, 3, \ldots, m-1$, а N_i — вероятность того, что фермент находится в i-й ячейке. Ищем среднечисленную степень полимеризации

$$\langle i(t)\rangle = \frac{\sum_{i=1}^{m} iN_i(t)}{\sum_{i=1}^{m} N_i(t)} \tag{8,93}$$

при начальных условиях $N_1(0) = \ldots = N_m(0) = 0$. Решение системы (8,92) с помощью преобразования Лапласа — Карсона имеет вид

$$N_i(t) = \frac{k_0}{k_r}\sum_{l=i}^{\infty} f(l), \quad i = 1, \ldots, m-1,$$

$$N_m(t) = k_0 t \sum_{l=m-2}^{\infty} f(l) - (m-1)\frac{k_0}{k_r}\sum_{l=m-1}^{\infty} f(l), \tag{8,94}$$

где

$$f(l) = (k_r t)^l \frac{\exp(-k_r t)}{l!}.$$

Получаем

$$2k_2 t\langle i\rangle = \left[2k_r t\sum_{l=0}^{m-3} f(l) + (k_r t)^2\sum_{l=0}^{m-4} f(l) + 2mk_r t\sum_{m-2}^{\infty} f(l) - m(m-1)\sum_{m-1}^{\infty} f(l)\right]. \tag{8,95}$$

При $k_r t \ll 1$ имеем $N_i \to 0$, $N_m \to 0$, $\langle i\rangle \to 1$, т. е. синтеза нет. При $k_r t \gg 1$ находим $N_i \to k_0/k_r$, $N_m \to k_0 t$, $\langle i\rangle \to m$, т. е. синтез идет нацело. Эти результаты совпадают с полученными в работах [179, 180].

Константа скорости $k_r = wk_t$, где w — вероятность того, что ячейка, находящаяся перед центром роста, содержит адсорбированный мономер, а k_t — константа скорости его включения в растущую цепь. Так как процесс не лимитируется диффузией [178, 184], w имеет равновесное значение и выражается изотермой Лэнгмюра

$$w = \frac{Ka}{1+Ka}, \tag{8,96}$$

где $K = \exp(-E/kT)$, $a = \exp(\mu/kT)$, E — энергия сорбции, a — абсолютная активность НТФ в растворе, μ — химический

потенциал НТФ. Так как $\mu = \mu^0 + kT \ln(\gamma c)$, $a = Ac$, $A = \gamma \exp(\mu^0/kT)$, где γ — коэффициент активности, c — концентрация НТФ, μ^0 — стандартный химический потенциал. При $\omega \ll 1$ $Ka \ll 1$ и

$$w = Ka = Ac \exp(-E/kT), \tag{8,97}$$

$$k_r = k_t Ac \exp(-E/kT). \tag{8,98}$$

Необходимо резкое увеличение c, чтобы перейти от малого к большому значению $\langle i \rangle$. Такое увеличение вряд ли происходит во время деления клетки. С другой стороны, зависимость $\langle i \rangle$ от E оказывается S-образной, и достаточно малого изменения E для полного синтеза, что может определяться кооперативностью процесса — взаимодействием соседних нуклеотидов на матрице. При малых значениях w уравнения (8,97) и (8,98) справедливы и в этом случае.

Приведенная трактовка эквивалентна рассмотрению, основанному на теории абсолютных скоростей реакций (см. стр. 354). Константу скорости реакции i-мера, включающего в цепь сразу два нуклеотида, можно записать в виде

$$k = \frac{kT}{h} w. \tag{8,99}$$

Экспериментальные значения для скорости синтеза ДНК равны для *E. coli* $1{,}8 \cdot 10^3$, для клеток лимфомы мышей 200 мономеров на звено в 1 *сек*. Это отвечает $w = 2{,}8 \cdot 10^{-10}$ и $3{,}1 \cdot 10^{-11}$.

Свободная энергия активации $F^{\ddagger}$ выражается через константу равновесия активированного комплекса i-мера с двумя нуклеотидами

$$F^{\ddagger} = -RT \ln K^{\ddagger},$$

где

$$K^{\ddagger} = \frac{w}{[i]\,\tilde{c}^2}.$$

Концентрация i-мера $[i]$ и $\tilde{c}$ выражаются в безразмерных единицах ($\tilde{c}$ — число молекул НТФ в клетке). Оценки дают $F^{\ddagger}$ для *E. coli* 13,0 *ккал/моль*, для мыши 9,3 *ккал/моль*. Следует подчеркнуть, что в этом расчете энергия активации относится только к адсорбции НТФ, но не к включению в цепь. Теория также не учитывает ряда факторов: гетерогенности матрицы, кооперативности процесса, влияния растворителя. Тем не менее, она дает разумное полуколичественное описание матричного синтеза и применима также к синтезу РНК на ДНК и к синтезу белка на мРНК.

Ферментативный синтез полинуклеотидов может идти и без матрицы. В этом случае полимер получается после длительного

латентного периода, продолжительность которого убывает с ростом концентрации фермента [185]. Так идет, например, синтез Поли- А — Т. Если в качестве затравки введен олигомер, то лаг-период быстро убывает с его длиной. По-видимому, даже короткие олигомеры могут служить матрицами для растущего полимера, если он соскальзывает с матрицы [186, 187]. Это было доказано в работе [188], посвященной синтезу Поли-А — Т на олигомерах. Теория такого синтеза, исходящая из скольжения новых цепей, развита в [189]. Рис. 8.28 поясняет модель. Ищем

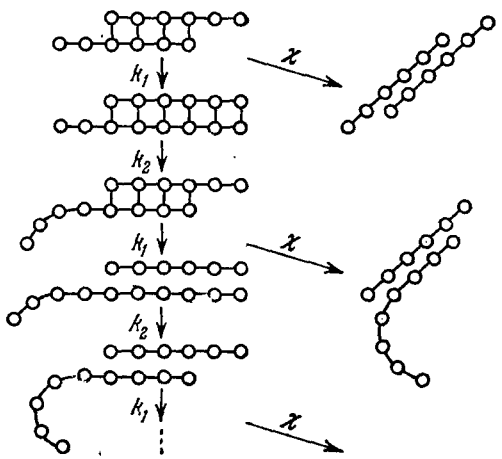


Рис. 8.28. Схема синтеза полинуклеотида на олигонуклеотиде.

время τ, нужное для построения цепи из N звеньев на матрице из n звеньев ($n < N$). Необходимо учесть также возможность полного ухода новой цепи с матрицы, в результате чего синтез прекращается. Пусть в момент $t = 0$ растущая цепь достигла размеров матрицы n и сдвигается на одну пару связей. Система может перейти из этого состояния в состояние i, отвечающее дальнейшему росту цепи и ее скольжению. Константа скорости k такого процесса дается выражением

$$1/k = 1/k_1 + 1/k_2, \qquad (8{,}100)$$

где k_1 характеризует рост цепи, k_2 — скольжение. Кроме того, система может перейти в состояние i' отделения цепи от матрицы, характеризуемого константой скорости χ. Обозначим число субсистем в состоянии i через $m_i(t)$, в состоянии i' через

$m_i'(t)$. Кинетические уравнения записываются следующим образом:

$$\left.\begin{aligned} \dot{m}_0 &= -(k+\chi)\, m_0, \\ \dot{m}_i &= k m_{i-1} - (k+\chi)\, m_i, \\ \dot{m}_{i'} &= \chi m_{i-1}, \\ m_i(0) &= m_{i'}(0) = 0. \end{aligned}\right\} \tag{8,101}$$

Решения этих уравнений имеют вид

$$\left.\begin{aligned} m_i(t) &= m_0(0)\,[(kt)^i/i!]\exp[-(k+\chi)\,t], \quad i \geqslant 0, \\ m_{i'}(t) &= m_0(0)\,\chi \int_0^t [(kt)^{i-1}/(i-1)!]\exp[-(k+\chi)\,t]\,dt, \quad i \geqslant 1. \end{aligned}\right\} \tag{8,102}$$

Вероятность найти субсистему в состоянии i есть

$$w_i = A m_i. \tag{8,103}$$

Коэффициент пропорциональности A находится из условия нормировки

$$\sum_{i=0}^{\infty} (w_i + w'_{i+1}) = 1.$$

Состояния i и $(i+1)'$ отвечают цепям, длины которых на i пар связей больше n. В состоянии i цепь связана с матрицей, в состоянии $(i+1)'$ она сошла с нее. Получаем $A = m_0(0)^{-1}$. Средняя длина растущей цепи равна

$$\bar{l} = \sum_{i=0}^{\infty} i(w_i + w'_{i+1}) = \sum_{i=0}^{\infty} i\,[(kt)^i/i!]\exp[-(k+\chi)\,t] +$$

$$+ \chi \int_0^t \sum_{i=0}^{\infty} i\,[(kt)^i/i!]\exp[-(k+\chi)\,t]\,dt = \frac{k}{\chi}[1 - \exp(-\chi t)], \tag{8,104}$$

и при $t \to \infty$ получим $\bar{l} \to k/\chi$. Для времени, в течение которого $\bar{l}$ становится равным $N - n$, имеем

$$t_{N-n} = \frac{1}{\chi} \ln [1 - \chi/k\,(N-n)]^{-1}, \tag{8,105}$$

для среднего времени роста цепи длиной n —

$$t_n = n/k_1 + 1/k_2. \tag{8,106}$$

Время τ_N равно сумме $t_n + t_{N-n}$. Если $N \gg n$, то

$$\tau_N = \frac{1}{\chi} \ln [1 - \chi N/k]^{-1}. \tag{8,107}$$

Наблюдаемая сильная зависимость τ_N от n определяется тем, что χ должно убывать с увеличением n. Из опыта следует, что χ резко убывает в области между $n = 4$ и $n = 5$. Это означает, что $n = 4$ есть критический размер матрицы, при котором новая цепь может, по-видимому, образовывать с матрицей двойную спираль. Оценки параметров дают $N/k \sim 1$ *мин*, $k_1 \sim \sim 30\,N$ *мин*$^{-1}$, $k_2 \sim N$ *мин*$^{-1}$.

Новая ДНК синтезируется *in vitro* всегда в направлении $5' \longrightarrow 3'$. Вместе с тем имеются данные, указывающие, что *in vivo* редуплицируются обе цепи — одна в направлении $5' \longrightarrow 3'$, другая в направлении $3' \longrightarrow 5'$. Оказаки и сотрудники [190] предложили выход из этого противоречия, допустив существование

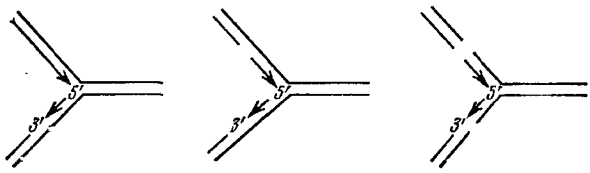


Рис. 8.29. Возможные схемы редупликации ДНК по Оказаки.

прерывного механизма редупликационного синтеза. Короткие участки новой ДНК синтезируются на одной или на обеих цепях в точке репликации, всегда в направлении $5' \longrightarrow 3'$ (рис. 8.29). Далее участки соединяются, образуя новые цепи. Если модель правильна, то последние реплицированные участки одной или обеих дочерних цепей могут быть отделены. Селективное и временное ингибирование фермента, катализирующего образование фосфодиэфирных связей между цепями ДНК, должно приводить к накоплению новых коротких цепей.

Эти предсказания подтверждены экспериментальными исследованиями, показавшими, что меченный тритием тимидин инкорпорируется в короткие цепи [190, 191], которые лишь позднее объединяются в длинные.

Вернер исследовал репликацию, пользуясь меченым тимином, а не тимидином, и показал, что тимин используется бактериями для репликации, а тимидин — для репарационного синтеза [192]. Вернер предлагает измененную модель: ДНК непрерывно реплицируется в развилке двойной спирали посредством одновременного удлинения обеих новых цепей. Преимущественное использование тимина показывает, что процесс репликации отличен от репарационного синтеза. Короткие цепи, найденные Оказаки, возникают под действием специфических нуклеаз. Однако схема Вернера не подтвердилась.

Точный механизм редупликации ДНК пока нельзя считать установленным. Репликация *in vivo* начинается на определенной стадии развития клетки с участием регуляторных факторов, по-видимому, связанных с клеточной мембраной.

Литература

1. *O. Avery, C. McLeod, M. McCarty*, J. Exp. Med. **79**, 137 (1944).
2. *Е. М. Крепс*, Вестник АН СССР, № 10, 84 (1970).
3. *Э. Коссовер*, Молекулярная биохимия, «Мир», 1964.
4. *Д. Уотсон*, Молекулярная биология гена, «Мир», 1967.
5. *К. Анфинсен*, Молекулярные основы эволюции, ИЛ, 1962.
6. *М. В. Волькенштейн*, Молекулы и жизнь. Введение в молекулярную биофизику, «Наука», 1965. (Дополненные издания: Moleküle und Leben, Thieme, 1969; Molecules and Life, Plenum Press, 1970.)
7. *С. Е. Бреслер*, Молекулярная биология, «Наука», 1973.
8. *Д. Хаггис, Д. Михн, А. Мюир, К. Робертс, П. Уокер*, Введение в молекулярную биологию, «Мир», 1967.
9. *В. Браун*, Генетика бактерий, «Наука», 1968.
10. *Д. Кендрью*, Нить жизни, «Мир», 1968.
11. *У. Хэйс*, Генетика бактерий и бактериофагов, «Мир», 1965.
12. *Г. Мендель*, Опыты над растительными гибридами, «Наука», 1965.
13. *Н. В. Тимофеев-Ресовский*, Цитология **2**, 45 (1960).
14. *В. П. Эфроимсон*, Введение в медицинскую генетику, Медгиз, 1964.
15. *Н. К. Кольцов*, Организация клетки, Биомедгиз, 1936; Бюлл. МОИП **70**, № 4, 75 (1963).
16. *Д. Бидл*, в сб. «Химические основы наследственности», ИЛ, 1960.
17. *M. Delbrück, N. Timofeev-Resovsky, K. Zimmer*, Nachr. Biologie Ges. Wiss., Göttingen **1**, 189 (1935).
18. *Э. Шредингер*, Что такое жизнь с точки зрения физики? ИЛ, 1947; Атомиздат, 1972.
19. *Д. Уотсон*, Двойная спираль, «Мир», 1969.
20. *J. Lederberg, E. Tatum*, Cold Spring Harbor Symposia **11**, 113 (1946).
21. *Ф. Жакоб, Э. Вольман*, Пол и генетика бактерий, ИЛ, 1962.
22. *Д. Дэвидсон*, Биохимия нуклеиновых кислот, «Мир», 1968.
23. *F. Griffith*, J. Hyg. Cambridge **27**, 113 (1928).
24. *H. Fraenkel-Conrat*, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 882 (1956).
25. *A. Gierer, G. Schramm*, Nature **177**, 702 (1956).
26. *Г. Френкель-Конрат, В. Сингер, Р. Вильямс*, в сб. «Химические основы наследственности», ИЛ, 1960.
27. *Ф. Гартман*, в сб. «Химические основы наследственности», ИЛ, 1960.
28. *Г. Стент*, Молекулярная биология вирусов и бактерий, «Мир», 1965.
29. *R. Franklin, R. Gosling*, Nature **171**, 156, 740 (1953).
30. *J. Watson, F. Crick*, Nature **171**, 737, 964 (1953).
31. *M. Wilkins, A. Stokes, H. Wilson*, Nature **172**, 759 (1953).
32. *F. Crick*, Sci. Amer. Oktober, 1954.
33. *D. Marvin, M. Spencer, M. Wilkins*, J. Mol. Biol. **3**, 547 (1961).
34. *M. Tunis-Schneider, M. Maestre*, J. Mol. Biol. **52**, 521 (1970).
35. *Т. Д. Мокульская*, Биофизика **11**, 528 (1966).
36. *M. Sundaralnigam*, Biopolymers **7**, 821 (1969).
37. *A. Lakshminarayanam, V. Sasisekharan*, Biopolymers **8**, 475, 489, 505 (1969).
38. *S. Arnott*, Progr. Biophys. Mol. Biol. **21**, 265 (1970).
39. *Д. Джосс*, Труды 5-го Международного биохим. конгресса, Симпозиум 1, Изд-во АН СССР, 1962.

40. *D. Luzzati, A. Nicolaieff, F. Masson*, J. Mol. Biol. **3**, 185 (1961).
41. *П. Доти*, в сб. «Современные проблемы биофизики», т. I, ИЛ, 1961.
42. *J. Eigner, P. Doty*, J. Mol. Biol. **12**, 549 (1965).
43. *Л. В. Щагина, Д. Рихтер, Э. В. Фрисман, В. И. Воробьев*, Мол. биол. **3**, 221 (1969).
44. *В. И. Иванов* и др., Biopolymers **12**, 89 (1973); Studia Biophysica **40**, 1 (1973).
45. *J. Fresco, B. Alberts*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **46**, 311 (1960).
46. *Y. Mitsui* a. o., Nature **228**, 1166 (1970).
47. *J. Fresco, B. Alberts, P. Doty*, Nature **188**, 98 (1960).
48. *А. С. Спирин*, Некоторые проблемы макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот, Изд-во АН СССР, 1963.
49. *Ю. М. Евдокимов* и др., Мол. биол. **7**, 151 (1973).
50. *K. Hoogsteen*, Acta Crystallogr. **12**, 822 (1959); **16**, 907 (1963).
51. *F. Mathews, A. Rich*. J. Mol. Biol. 8, 89 (1964).
52. *R. Hamlin, R. Lord, A. Rich*, Science **148**, 1734 (1965).
53. *H. Miles*, Nature **195**, 459 (1962).
54. *Y. Kyogoku, T. Shimanouchi, M. Tsuboi, I. Watanabe*, Nature **195**, 460 (1962).
55. *Y. Kyogoku, R. Lord, A. Rich*, Science **154**, 518 (1966).
56. *L. Katz, S. Penman*, J. Mol. Biol. **15**, 220 (1966).
57. *P. Ts'o*, in «Molecular Associations in Biology», ed. B. Pullman, Acad. Press, 1968.
58. *E. O'Brien*, J. Mol. Biol. **7**, 107 (1963); **22**, 377 (1966); Acta Crystallogr. **23**, 92 (1967).
59. *H. Sobell, K. Tomita, A. Rich*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **49**, 885 (1963).
60. *A. Hashemeyer, H. Sobell*, Nature **202**, 969 (1964); Acta Crystallogr. **19**, 125 (1965).
61. *L. Katz, K. Tomita, A. Rich*, J. Mol. Biol. **13**, 340 (1965).
62. *Ю. Г. Баклагина, М. В. Волькенштейн, Ю. Д. Кондрашев*, Ж. структ. хим. **7**, 399 (1966).
63. *Ю. Г. Баклагина*, Мол. биол. **2**, 635 (1968).
64. *K. Hoogsteen*, in «Molecular Associations in Biology», ed. B. Pullman, Acad. Press, 1968.
65. *B. Pullman, P. Claverie, J. Caillet*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **55**, 904 (1966); J. Mol. Biol. **22**, 373 (1966).
66. *H. Nash, D. Bradly*, J. Chem. Phys. **45**, 1380 (1966).
67. *H. DeVoe, I. Tinoco*, J. Mol. Biol. **4**, 500 (1962).
68. *P. Claverie, B. Pullman, J. Caillet*, J. Theor. Biol. **12**, 419 (1966).
69. *R. Rein, P. Claverie, M. Pollak*, Intern. J. Quant. Chem. **2**, 129 (1968).
70. *P. Claverie*, J. Chim. Phys. **65**, 57 (1968); in «Molecular Associations in Biology», ed B. Pullman, Acad. Press, 1968; Studia Biophys. **24/25** 161 (1970).
71. *G. Del Re*, J. Chem. Soc. 4031 (1958).
72. *H. Berthod, A. Pullman*, J. Chim. Phys. **62**, 942 (1965).
73. *В. И. Полтев, Б. И. Сухоруков*, Биофизика **12**, 763 (1967); **13**, 941 (1968); Ж. структ. хим. **9**, 298 (1968); Studia Biophys. **24/25**, 179 (1970).
74. *R. Rein* a. o., Ann. N. Y., Acad. Sci. **153**, 805 (1969).
75. *Д. Мармур, Р. Роунд, К. Шильдкраут*, в сб. «Нуклеиновые кислоты», «Мир», 1965.
76. *M. Meselson, F. Stahl*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **44**, 671 (1958).
77. *C. Thomas, K. Berns*, J. Mol. Biol. **3**, 277 (1961).
78. *J. Marmur, P. Doty*, Nature **183**, 1429 (1959).
79. *B. Zimm*, J. Chem. Phys. **33**, 1349 (1960).
80. *S. Lifson, B. Zimm*, Biopolymers **1**, 15 (1963).
81. *D. Crothers, B. Zimm*, J. Mol. Biol. **9**, 1 (1964).
82. *М. Д. Франк-Каменецкий*, Мол. биол. **2**, 408 (1968).

83. *Т. М. Бирштейн, О. Б. Птицын*, Конформации макромолекул, «Наука», 1964.
84. *D. Poland, H. Scheraga*, Theory of Helix — Coil Transitions in Biopolymers, Acad. Press, 1970.
85. *Ю. С. Лазуркин, М. Д. Франк-Каменецкий, Е. Н. Трифонов*, Biopolymers **9**, 1253 (1970).
86. *М. Д. Франк-Каменецкий*, ДАН СССР **157**, 187 (1964); Высокомол. соед. **7**, 354 (1965).
87. *Б. И. Сухоруков, Ю. Ш. Мошковский, Т. М. Бирштейн, В. Н. Лысцов*, Биофизика **8**, 294 (1963).
88. *В. И. Пермогоров, М. Д. Франк-Каменецкий, Л. А. Сердюкова, Ю. С. Лазуркин*, Высокомол. соед. **7**, 362 (1965).
89. *В. И. Пермогоров, А. А. Прозоров, М. Ф. Шемякин, Ю. С. Лазуркин, Р. Б. Хесин*, в сб. «Молекулярная биофизика», «Наука», 1965.
90. *M. Daune, C. Dekker, H. Schachman*, Biopolymers **4**, 51 (1966).
91. *R. Jensen, M. Davidson*, Biopolymers **4**, 17 (1966).
92. *Л. Е. Минченкова, В. И. Иванов*, Biopolymers **5**, 615 (1967).
93. *А. И. Полетаев, В. И. Иванов, Л. Е. Минченкова, А. К. Щелкина*, Мол. биол. **3**, 303 (1969).
94. *П. Л. Привалов*, Мол. биол. **3**, 690 (1969).
95. *А. А. Веденов, А. М. Дыхне, А. Д. Франк-Каменецкий, М. Д. Франк-Каменецкий*, Мол. биол. **1**, 313 (1967).
96. *G. Lehman. J. McTague*, J. Chem. Phys. **49**, 3170 (1968).
97. *Т. М. Бирштейн, Н. З. Наморадзе*, Сообщения АН Груз. ССР **44**, 4567 (1966).
98. *А. А. Веденов, А. М. Дыхне*, ЖЭТФ **55**, 357 (1968).
99. *М. Д. Франк-Каменецкий, А. Д. Франк-Каменецкий*, Мол. биол. **3**, 375 (1969).
100. *D. Crothers*, Biopolymers **6**, 1391 (1968).
101. *А. В. Шугалий, М. Д. Франк-Каменецкий, Ю. С. Лазуркин*, Мол. биол. **3**, 133 (1969); **4**, 275 (1970).
102. *D. Crothers, N. Kallenbach, B. Zimm*, J. Mol. Biol. **11**, 802 (1965).
103. *М. Д. Франк-Каменецкий, А. Д. Франк-Каменецкий*, Мол. биол. **2**, 778 (1968).
104. *И. В. Берестецкая, Ю. Н. Касаганов, Ю. С. Лазуркин, Е. Н. Трифонов*, Мол. биол. **4**, 137 (1970).
105. *J. Marmur a. o.*, J. Cell. Comp. Physiol. **58**, Suppl. 1, 33 (1961).
106. *Е. Н. Трифонов, Н. Н. Шафрановская, М. Д. Франк-Каменецкий, Ю. С. Лазуркин*, Мол. биол. **2**, 887 (1968).
107. *S. Falkow, D. Cowie*, J. Bacteriol. **96**, 777 (1968).
108. *И. М. Лифшиц*, ЖЭТФ **65**, 1100 (1973).
109. *П. Л. Привалов*, Диссертация, Институт биофизики АН СССР, Пущино-на-Оке, 1970.
110. *П. Л. Привалов, О. Б. Птицын, Т. М. Бирштейн*, Biopolymers **8**, 559 (1969).
111. *J. Applequist, V. Damle*, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 1450 (1965).
112. *M. Eigen, D. Pörschke*, J. Mol. Biol. **53**, 123 (1970).
113. *J. Applequist, V. Damle*, J. Chem. Phys. **39**, 2719 (1963).
114. *D. Holcomb, S. Timasheff*, Biopolymers **6**, 513 (1968).
115. *Ю. М. Евдокимов, Я. М. Варшавский*, Биофизика **11**, 7 (1966); FEBS, Third Meeting, Warsaw 1966; в сб. «Структура и функции клеточного ядра», «Наука», 1967.
116. *А. Л. Платонов, Ю. М. Евдокимов, И. И. Протасевич*, Мол. биол. 8 (1974).
117. *А. А. Веденов, А. М. Дыхне, М. Д. Франк-Каменецкий*, УФН **105**, 479 (1971).
118. *W. Kuhn*, Experientia **13**, 301 (1957).

119. *М. В. Волькенштейн, Н. М. Годжаев, Ю. Я. Готлиб*, Биофизика **7**, 16 (1962).
120. *H. Longuet-Higgins, B. Zimm*, J. Mol. Biol. **2**, 1 (1960).
121. *M. Fixman*, J. Mol. Biol. **6**, 39 (1963).
122. *D. Crothers*, J. Mol. Biol. **9**, 712 (1964).
123. *P. Fong*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **52**, 239 (1964).
124. *J. Vinograd, J. Lebowitz, R. Watson*, J. Mol. Biol. **33**, 173 (1968).
125. *H. Massie, B. Zimm*, Biopolymers **7**, 475 (1969).
126. *H. Spatz, D. Crothers*, J. Mol. Biol. **42**, 191 (1969).
127. *Ю. М. Евдокимов, Я. М. Варшавский*, ДАН СССР **170**, 1205 (1966).
128. *Ю. М. Евдокимов, К. Г. Кнорре, Я. М. Варшавский*, Мол. биол. **3**, 163 (1969).
129. *Ю. М. Евдокимов* и др., Studia Biophys. **24/25**, 83 (1970).
130. *Е. Н. Трифонов, М. Д. Франк-Каменецкий, Ю. С. Лазуркин*, Мол. биол, **1**, 164 (1967).
131. *Ю. А. Банников, Э. Н. Трифонов*, Мол. биол. **4**, 734 (1970).
132. *J. Marmur, P. Doty*, J. Mol. Biol. **3**, 585 (1961).
133. *C. Schildkraut, J. Marmur, P. Doty*, J. Mol. Biol. **4**, 430 (1962).
134. *Д. Мармур, Р. Раунд, К. Шильдкраут*, в сб. «Нуклеиновые кислоты», «Мир», 1965.
135. *W. Müller, D. Crothers*, J. Mol. Biol. **35**, 251 (1968).
136. *W. Behr, K. Honikel, G. Hartmann*, Europ. J. Biochem. **9**, 82 (1969).
137. *M. Tsuboi, K. Matsuo, P. Ts'o*, J. Mol. Biol. **15**, 256 (1966).
138. *J. Richardson*, J. Mol. Biol. **21**, 83 (1966).
139. *D. Neville, D. Davies*, J. Mol. Biol. **17**, 57 (1966).
140. *L. Crawford, M. Waring*, J. Mol. Biol. **25**, 23 (1967).
141. *M. Waring*, J. Mol. Biol. **54**, 247 (1970).
142. *L. Lerman*, J. Mol. Biol. **3**, 18 (1961).
143. *J. Wang*, J. Mol. Biol. **87**, 797 (1974).
144. *B. Richards, J. Pardon*, Exp. Cell. Res. **62**, 184 (1970).
145. *Г. В. Гурский*, Биофизика **11**, 737 (1966); Мол. биол. **3**, 749 (1969); Studia Biophys. **24/25**, 265 (1970).
146. *H. Sobell, S. Jain, T. Sakore, C. Nordman*, Nature, New Biology **231**, 200 (1971).
147. *L. Hamilton, W. Fuller, A. Rich*, Nature **198**, 538 (1963).
148. *A. Blake, A. Peacocke*, Biopolymers **6**, 1225 (1968).
149. *M. Waring*, Nature **219**, 1320 (1968).
150. *A. Peacocke*, Studia Biophys. **24/25**, 213 (1970).
151. *G. Löber*, Studia Biophys. **24/25**, 447 (1970).
152. *D. Crothers*, Studia Biophys. **24/25**, 449 (1970).
153. *G. Scatchard*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**, 660 (1949).
154. *D. Crothers*, Biopolymers **6**, 574 (1968).
155. *А. С. Заседателев, Г. В. Гурский, М. В. Волькенштейн*, Мол. биол. **5**, 245 (1971).
156. *Ю. А. Чизмаджев, В. С. Маркин*, Электрохимия **3**, 127 (1968); **4**, 3 (1969).
157. *Г. В. Гурский, А. С. Заседателев, М. В. Волькенштейн*, Мол. биол. **6**, 479 (1972).
158. *R. Wells, J. Larson*, J. Mol. Biol. **49**, 319 (1970).
159. *A. Cerami, E. Reich, D. Ward, J. Goldberg*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **57**, 1036 (1967).
160. *J. Goldberg, M. Rabinowitz, E. Reich*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **48**, 2094 (1962).
161. *W. Müller, D. Crothers*, J. Mol. Biol. **35**, 251 (1968).
162. *М. Дельбрюк, Г. Стент*, в сб. «Химические основы наследственности», ИЛ, 1960.
163. *Д. Тэйлор*, в сб. «Молекулярная генетика», т. I, «Мир», 1964.

164. *J. Cairns*, Cold Spring Harbor Symposia **28**, 43 (1963).
165. *А. Корнберг*, в сб. «Современные проблемы биофизики», т. I, ИЛ, 1961.
166. *A. Kornberg*, Enzymatic Synthesis of DNA, J. Wiley, 1961.
167. *А. Корнберг*, в сб. «Молекулы и клетки», вып. 4, «Мир», 1969.
168. *М. В. Волькенштейн*, ДАН СССР **130**, 889 (1960); Труды 5-го Международного биохим. конгресса, Симпозиум I, Изд-во АН СССР, 1962.
169. *М. В. Волькенштейн, А. М. Ельяшевич*, ДАН СССР **131**, 538 (1960); **132**, 565 (1960); **136**, 1216 (1961); Биофизика **6**, 513 (1961).
170. *J. Marmur, P. Doty*, J. Mol. Biol. **3**, 585 (1961).
171. *J. Adler*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **44**, 651 (1958).
172. *K. Atwood*, Science **132**, 617 (1960).
173. *R. Sinsheimer*, J. Chem. Phys. **58**, 986 (1961); J. Mol. Biol. **4**, 142 (1962).
174. *C. Weissman* a. o., Proc. Nat. Acad. Sci. US **49**, 407 (1963); Science **142**, 1188 (1963).
175. *C. Levinthal, H. Crane*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **42**, 436 (1956).
176. *S. Erhan*, J. Theor. Biol. **23**, 339 (1969).
177. *A. Phillips*, J. Theor. Biol. **24**, 273 (1969).
178. *М. В. Волькенштейн, Н. М. Годжаев, Ю. Я. Готлиб, О. Б. Птицын*, Биофизика **8**, 3 (1963).
179. *R. Simha, J. Zimmerman, J. Moacanin*, J. Chem. Phys. **39**, 1239 (1963).
180. *J. Zimmerman, R. Simha*, J. Theor. Biol. **9**, 156 (1965); **13**, 106 (1966).
181. *A. Pipkin, J. Gibbs*, Biopolymers **4**, 3 (1966).
182. *C. MacDonald, J. Gibbs, A. Pipkin*, Biopolymers **6**, 1 (1968).
183. *M. Garrick*, J. Theor. Biol. **17**, 19 (1967).
184. *J. Maniloff*, J. Theor. Biol. **23**, 441 (1969).
185. *H. Schachman, J. Adler, C. Radding, I. Lehman, A. Kornberg*, J. Biol. Chem. **235**, 3242 (1960).
186. *M. Chamberlin, P. Berg*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **48**, 81 (1962).
187. *A. Kornberg, L. Bertsch, J. Jackson, M. Khorana*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **51**, 315 (1964).
188. *A. Falashi, J. Adler, M. Khorana*, J. Biol. Chem. **238**, 3080 (1963).
189. *М. В. Волькенштейн, С. Н. Фишман*, Biopolymers **4**, 77 (1966).
190. *R. Okazaki* a. o., Cold Spring Harbor Symposia **33**, 129 (1968).
191. *R. Okazaki, K. Sugimoto, Y. Imae, A. Sugino*, Nature **228**, 223 (1970).
192. *R. Werner*, Nature **230**, 570 (1971).
193. *S. Arnott* a. o., J. Mol. Biol. **88**, 523 (1974).

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

§ 9.1. ПРОБЛЕМА ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА

Ген (цистрон, см. [1, 2]) есть часть макромолекулы ДНК, ответственная за синтез белковой цепи. Является ли роль ДНК инструктивной или разрешающей? Многочисленные данные свидетельствуют в пользу первой возможности. Синтез белка программируется молекулой ДНК, содержащей информацию о первичной структуре белковых цепей, иначе говоря, генетическую информацию. Эта информация записана в первичной структуре ДНК, т. е. в последовательности нуклеотидов. В частицах вирусов РНК-типа генетическая программа заложена в молекулах РНК.

Каково соответствие между последовательностью нуклеотидов в ДНК (и вирусной РНК) и последовательностью аминокислотных остатков в белковой цепи? В этом и состоит проблема генетического кода.

Это физическая проблема. Во-первых, ставится вопрос о соответствии информационного содержания ДНК и белка, во-вторых — о количественных взаимоотношениях между нуклеотидами и аминокислотами, определяемых в конечном счете взаимодействиями молекул в матричном синтезе белка. В-третьих, возникает вопрос о физическом смысле генетического кода, т. е. о степени неслучайности этого соответствия. Характерно, что проблема генетического кода была впервые сформулирована физиком Гамовым [3], и ряд физиков принял участие в ее решении. Однако код был расшифрован биологическими и химическими методами.

Постановка вопроса о коде, определяющем атомно-молекулярное строение и свойства вещества, типична для физики. Химические свойства атомов (т. е. структура периодической системы Менделеева) закодированы числом электронов в атоме в соответствии с принципами квантовой механики. То же относится к атомным спектрам. Зная последовательность квантовых уровней, мы получаем кодовые условия для химии и оптики. Число и природа нуклонов в атомном ядре кодируют свойства ядра. Систематика элементарных частиц и их превращений — одна из актуальных проблем современной физики — также

означает нахождение некоторого кода. Для кодовых проблем характерна обязательность реализуемых количественных взаимоотношений.

Первая попытка нахождения генетического кода, принадлежавшая Гамову [3,4], была предпринята сразу же после открытия двуспиральной структуры ДНК. Гипотеза Гамова оказалась несостоятельной. Тем не менее она заслуживает внимания, так как ею был поставлен ряд важных проблем. Работа Гамова сыграла большую роль и в привлечении внимания физиков к молекулярной биологии.

Белковый текст написан 20-буквенным алфавитом, текст ДНК (или РНК) — 4-буквенным. Из элементарных соображений следует, что кодовое отношение, т. е. число нуклеотидов, кодирующих одну аминокислоту, не может быть меньше трех. Количество информации, приходящейся на одну аминокислоту, равно $i_а = \log_2 20 = 4{,}322$ *бит*, а на один нуклеотид $i_н = \log_2 4 = 2{,}000$ *бит*. Следовательно, наименьшее число нуклеотидов, приходящееся на одну аминокислоту, равно $i_а/i_н = 2{,}161$.

Аминокислота не может кодироваться нецелым числом нуклеотидов. Значит, кодовое отношение должно быть не меньше трех. В самом деле, число размещений с повторениями из четырех по два равно 16, что меньше 20 — числа аминокислот. Число размещений с повторениями из четырех по три равно 64. Трех нуклеотидов в кодоне, т. е. в совокупности нуклеотидов, кодирующих одну аминокислоту, более чем достаточно.

Гамов предполагал, что белковая цепь синтезируется непосредственно на двойной спирали ДНК, причем каждая аминокислота располагается в выемке между четырьмя нуклеотидами. Эта выемка имеет примерно ромбическую форму. Два нуклеотида принадлежат одной цепи, два — другой. Один из нуклеотидов первой цепи образует уотсон-криковскую пару с одним нуклеотидом второй цепи.

«Бубновый код» Гамова обеспечивает именно 20 «букв». Каждая «буква», т. е. ромб, состоит из четырех нуклеотидов. Число сочетаний из 4 по 4 равно 256. Но здесь наложены ограничения — малая диагональ ромба соединяет А с Т или Г с Ц. Если считать тождественными правые и левые формы несимметричных ромбов, например

$$\begin{matrix} & Г & & Г & \\ А & --- & Т \equiv Т & --- & А, \\ & А & & А & \end{matrix}$$

то получится 20 различных ромбов.

«Бубновый код» перекрывающийся. Так как в каждый ромб входят нуклеотиды из трех последовательных пар, два нуклеотида, находящиеся на одной стороне ромба, являются общими для двух соседних ромбов. Тем самым, возникает корреляция

между соседними аминокислотами. За данным остатком может следовать не любой из 20, но лишь некоторые (см. [1]).

Гамов попытался проверить правильность своего кода, сопоставив возможность сочетания ромбов с известной первичной структурой инсулина и адренокортикотропина. При этом возникли неразрешимые противоречия. Дальнейшие исследования показали, что никакие перекрывающиеся коды нельзя согласовать с опытом. Наличие перекрытий в кодонах может выражаться в корреляциях между соседними аминокислотными остатками. Иными словами, некоторые парные сочетания остатков должны быть запрещены. Анализ первичных структур белков показал, что таких корреляций нет — любой остаток может следовать за любым, хотя разные остатки встречаются с различными частотами [4, 5]. Можно, однако, представить себе перекрывающиеся нуклеотидные коды, допускающие любую последовательность аминокислот [6].

Допустим, что кодон содержит четыре нуклеотида, но последний нуклеотид данного кодона одновременно является первым в следующем кодоне. Кодовое отношение равно трем. Если все кодирующие квартеты начинаются, скажем, с Г или У, то они должны заканчиваться также Г и У. Общее число таких кодонов равно 64 (2·16·2). Эти кодоны распределяются по 20 аминокислотам так, что каждая из них имеет по крайней мере один квартет, начинающийся с Г, и один, начинающийся с У. Так как каждый квартет должен заканчиваться также Г или У, возможны любые последовательности аминокислот.

Отсутствие корреляций в полипептидных цепях, таким образом, нельзя считать решающим аргументом против перекрывающихся кодов. Но отсутствие корреляций делает невозможной умозрительную расшифровку кода.

Более существенный аргумент состоит в том, что не удается наблюдать мутационные замещения двух соседних аминокислотных остатков в белке. Между тем мутация нуклеотида, общего для двух соседних аминокислот, должна приводить к такому двойному замещению. Уолл привел соображения, снижающие силу этого аргумента [6]. Однако, поскольку не было найдено ни одного экспериментального доказательства перекрывания, есть веские основания считать генетический код неперекрывающимся. Полная расшифровка кода это подтвердила.

Изучение мутаций показало, что код коллинеарен, т. е. кодоны в нуклеиновой кислоте и соответствующие аминокислотные остатки в белке расположены в той же линейной последовательности. Ряд доказательств этого положения приведен в монографии Ичаса [5]. Там же описаны другие попытки умозрительного нахождения кода, представляющие сегодня исторический интерес (см. также [1, 7]).

Кодовое отношение может быть найдено лишь экспериментально. Это было сделано в результате генетического исследования, проведенного Криком с сотрудниками [8], изучавшими цистрон *B* в области *r* II бактериофага T4, паразитирующего на *E. coli*. Ранее Бензер детально проанализировал генетические свойства системы фаг T4 — *E. coli* [9]. Среди точечных мутаций *r* II есть мутации, состоящие в выпадении нуклеотидов (делеции) и в их добавлении к цепи ДНК. Такие мутации могут быть вызваны акридиновыми красителями.

Дикий тип фага *w* размножается на штаммах *B* и *K* 12 (λ) *E. coli*. Мутантные фаги *r* размножаются только на *B*-штаммах, образуя резко ограниченные бляшки. Мутанты *FCO*, индуцируемые профлавином, относятся к типу *r*. Они обладают способностью спонтанно ревертировать, возвращаться к дикому типу *w*. Генетический анализ показал, что такие ревертанты возникают не в результате обратной мутации $r \rightarrow w$, но вследствие появления второй супрессорной мутации вблизи первой мутации $w \rightarrow r$. Супрессоры относятся к тому же фенотипу *r*, что и супрессируемые ими мутации. Каждая из двух мутаций порознь приводит к утрате способности синтезировать соответствующий белок, но сочетание двух мутаций в одном цистроне эту способность восстанавливает. Всего было изучено около 80 *r*-мутантов, в том числе двойные и тройные их комбинации — супрессоры супрессоров и супрессоры супрессоров супрессоров. Все супрессоры оказались относящимися к двум классам: + (добавление нуклеотида) и — (делеция). Если исходная мутация *r* есть +, то ее супрессор — и наоборот. Дикий фенотип дает комбинации + —, — +, + + +, — — —, но не + +, — —, + + + +, — — — — и т. д.

Эти факты нетрудно объяснить, если допустить, что код триплетный, неперекрывающийся и «читаемый», начиная с некоторого фиксированного нуклеотида. Представим цепь ДНК последовательностью букв АВС АВС ... (рис. 9.1). Чтение кода, начиная с определенной буквы, эквивалентно наложению на эту последовательность рамки с прорезью. Если одна из букв выпала (—) или, напротив, добавилась новая (+), то вся последовательность, начиная с места мутации, искажена, т. е. нормальный белок дикого типа не может синтезироваться (рис. 9.1, б). Если появилась супрессорная мутация (— + или + —), то последовательность искажена лишь в области между двумя мутациями (рис. 9.1, *г* и *д*). Если искаженная область не слишком длинна, то синтезируемый белок может сохранить свою функцию и будет наблюдаться реверсия. Рис. 9.1, *е*, *ж* соответствуют реверсии при наличии трех однотипных мутаций — — — или + + +. Понятно также, почему двойные, четверные и пятерные однотипные мутации не дают реверсий.

Из этих результатов следует кодовое отношение, кратное трем. Естественно предположить, что оно равно именно трем. Впрочем, Уолл показал, что данные Крика и сотрудников согласуются и с предложенным им квартетным перекрывающимся кодом [5, 6]. Однако код Уолла непригоден по другим причинам.

Ряд деталей, относящихся к описанным «мутациям сдвига рамки» (frame shift mutations), содержится в оригинальной работе [8] и в монографиях [1, 5]. Вначале отсутствовали прямые

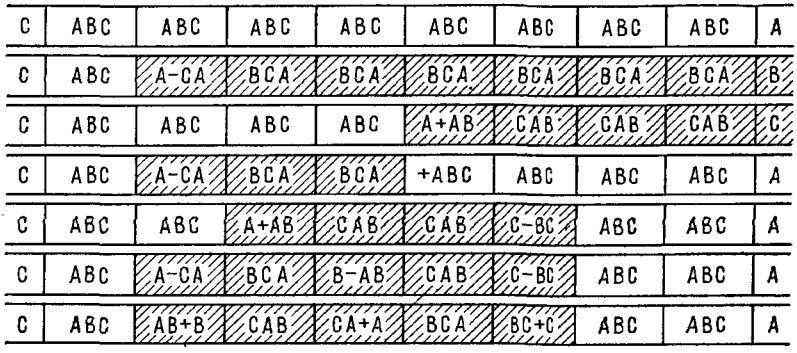


Рис. 9.1. Тексты ДНК.

а) Дикий тип; *б*) мутант (делеция); *в*) мутаит с добавлением; *г*), *д*) двойиые мутанты типа + −; *е*) тройной мутант − − −; *ж*) тройной мутант + + +. Заштрихованы искаженные участки текста.

доказательства белок-синтезирующей роли области *r* II цистрона. В дальнейшем Терзаги и сотрудники [10] изучили аналогичные мутации цистрона фага Т4, продуцирующего лизоцим. Оказалось, что «сдвиги рамки» действительно искажают белковый текст. Двойной ревертированный мутант лизоцима отличается от дикого типа последовательностью шести остатков

Дикий *w*-тип ... Тре—Лиз—Сер—Про—Сер—Лей—Аси—Ала ...

Ревертант (псевдо *w*-тип) ... Тре—Лиз—Вал—Гис—Гис—Лей—Мет—Ала ...

Эти биологические исследования привели к решению ряда физических вопросов. Установлено кодовое отношение, еще раз доказана коллинеарность кода, доказано, что код читается, начиная с определенного нуклеотида и не имеет запятых, т. е. материальных единиц, разделяющих кодоны. Из описанных работ следовало, что кодоном является линейная последовательность трех нуклеотидов. Общее число разных кодонов равно 64.

В связи с этим встал вопрос о вырождении кода. Так как общее число кодонов (64) больше числа аминокислот (20), то

нужно выяснить, сколькими различными кодонами кодируется каждая аминокислота. Следует обратить внимание на типично физическую постановку вопроса и физический термин «вырождение» в отличие от биологического смысла этого слова.

То же исследование мутаций сдвига рамки свидетельствует в пользу вырожденного кода. Это следует с особенной ясностью из работы [10]. Если код не вырожден, то оба кодона для Гис в ревертанте лизоцима должны быть одинаковыми, скажем АВС. Если сдвиг вызывается добавлением нуклеотида слева и кодон для Про есть ВСА, то соотношение между диким типом и ревертантом изобразится так:

... Про—Сер ...
А ВСА ВСА
АВС АВС
... Гис—Гис ...

Но отсюда следует, что кодон для Сер есть также ВСА. Противоречие можно устранить, только допустив наличие различных кодонов для Гис.

Вырождение кода доказывается и тем, что при значительных вариациях в составе ДНК различных организмов доля Г + Ц варьирует от 25 до 75% (см. стр. 90), средний состав белков меняется мало. Вместе с тем ряд фактов указывает на универсальность кода. Предположение о том, что значительная часть нуклеотидов ДНК не функциональна, трудно согласовать с однородностью состава ДНК у данного биологического вида. Напротив, эти факты находят естественное объяснение, если код сильно вырожден.

Другие косвенные данные, указывающие на вырождение кода, получены при изучении мутаций, как индуцированных химическими агентами, так и спонтанных. Виттман исследовал мутации в белке вируса табачной мозаики (ВТМ), вызванные нитритом [11]. Под действием азотистой кислоты аминная группа заменяется на гидроксильную

$$—NH_2 + HNO_2 \longrightarrow —OH + N_2 + H_2O.$$

Тем самым нитрит превращает Ц в У, Г в ксантин и А в гипоксантин. После репликации ксантин и гипоксантин замещаются на Г. Следовательно, происходят замены Ц $\longrightarrow$ У и А $\longrightarrow$ Г: 64 триплетных кодона можно представить восемью октетами. На рис. 9.2 изображены эти октеты и стрелками показаны нитритные точечные мутации. Наблюдаемые замещения в белке ВТМ соответственно располагаются по тем же октетам. Виттман установил, что по крайней мере Сер и Иле должны кодироваться несколькими триплетами (рис. 9.3), т. е. код вы-

рожден. Эти даные одновременно показывают, что большая часть замещений в белке происходит в результате замены одного нуклеотида в кодоне.

Всего может быть 190 (20·19:2) замещений одной аминокислоты на другую. Часть из них является результатом замены

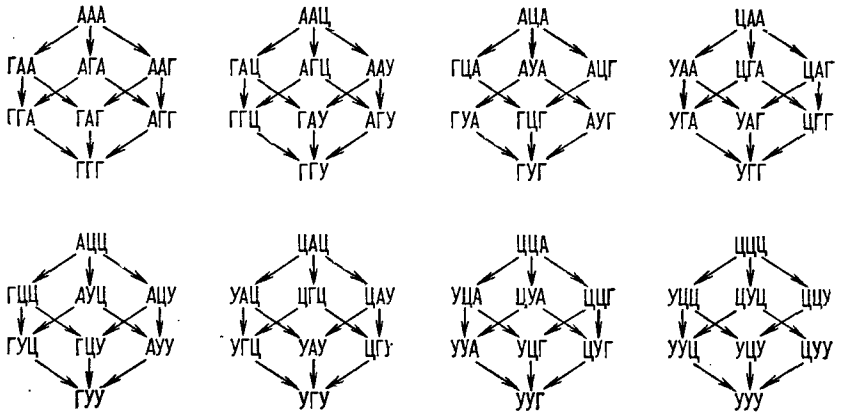


Рис. 9.2. Классификация кодонов по октетам.

одного нуклеотида в триплетном кодоне («разрешенные» замены), остальные замещения требуют изменения двух или даже трех нуклеотидов. Экк проанализировал большое число известных мутаций в белках, считая, что «разрешенные» замены должны быть распределены равномерно [12]. По его оценке

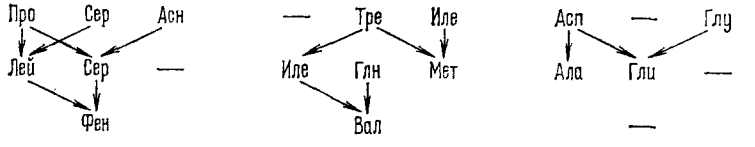


Рис. 9.3. Отнесение аминокислотных остатков к октетам на основании нитритных мутаций ВТМ.

число разрешенных замещений, практически реализующихся в белках, 75 ± 20. Более подробный статистический анализ также дал значение, близкое к 70 [13]. Само по себе это число свидетельствует о вырождении кода, но не указывает степень вырождения — число кодонов, приходящихся на одну аминокислоту. Однако статистический анализ показывает, что наряду с 75 разрешенными заменами имеется примерно 103 замены, определяемые изменениями двух нуклеотидов в кодоне и всего

лишь 12, определяемых изменениями трех нуклеотидов. Такое распределение согласуется как с двойным (40 кодонов), так и с тройным (60 кодонов) равномерным вырождением [13].

Итак, генетический код является *триплетным, неперекрывающимся, лишенным запятых и вырожденным.* Полная расшифровка кода потребовала прямых биохимических опытов, ставших возможными лишь после раскрытия механизма биосинтеза белка.

§ 9.2. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Современная молекулярная биология белкового синтеза изложена в монографии [14] (см. также [2]). Здесь мы ограничимся краткими сведениями, уделив в последующем изложении главное внимание физическим вопросам.

Информация, содержащаяся в ДНК, передается мРНК в процессе *транскрипции.* Белок синтезируется на мРНК и, таким образом, в этом процессе реализуется информационная цепь ДНК → РНК → Белок.

Первые экспериментальные доказательства существования мРНК получили Белозерский, Спирин и их сотрудники [15, 16]. Они показали, что состав тотальной РНК бактерий коррелирует с составом их ДНК и пришли к заключению о наличии по крайней мере двух типов РНК, один из которых (бóльшая фракция) имеет состав, не отражающий состава ДНК, а второй воспроизводит состав ДНК. В дальнейшем выяснилось, что первая фракция это рибосомальная РНК (рРНК), а вторая — мРНК. Матричная функциональность РНК следовала из опытов с растительными вирусами. Было установлено, что РНК, выделенная из ВТМ, обладает инфицирующим действием. Это значит, что молекулы вирусной РНК, попадая в клетки растения, организуют синтез новых частиц ВТМ, т. е. синтез их белков [17, 18]. Френкель-Конрат восстановил инфицирующие свойства частиц ВТМ, смешивая РНК ВТМ с белком, и получил гибридные вирусы, комбинируя РНК одного штамма ВТМ с белком другого штамма [19].

Волкин и Астрахан изучали события, происходящие в клетке *E. coli* после заражения фагом Т2. При размножении фага синтезируется некоторое количество РНК, обладающей повышенной метаболической активностью: она быстро включает P^{32}. Состав синтезируемой РНК сходен с составом фаговой ДНК [20, 21].

В дальнейшем мРНК была обнаружена и в незараженных бактериальных клетках [22]. Ее состав аналогичен составу бактериальной ДНК. Было показано, что мРНК непосредственно синтезируется на ДНК как на матрице. Это доказывается, во-первых, наличием специального фермента — РНК-полимеразы

[23]. Во-вторых, установлена гибридизация ДНК с комплементарной ей мРНК [24—26].

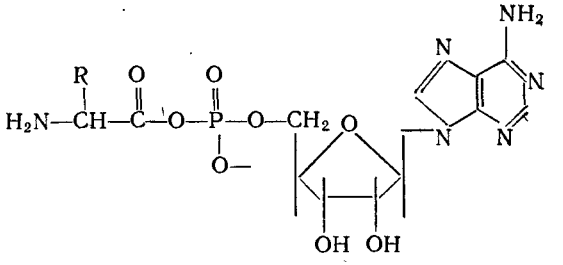
Можно подвергнуть критике утверждение о том, что эта мРНК выполняет функцию переноса генетической информации от ДНК к белку (см. [5]). Строго установлено, что лишь некоторая доля клеточной РНК действительно кодирует белок. Тем не менее вся совокупность экспериментальных данных согласуется с представлением о транскрипции и нет оснований сомневаться в его правильности.

Таким образом, мРНК — переносчик информации от ДНК к *рибосомам*, т. е. синтезирующему белок аппарату клеток. мРНК обеспечивает программу биосинтеза. Но для биосинтеза необходимы аминокислоты и реализация надлежащих термодинамических и кинетических условий.

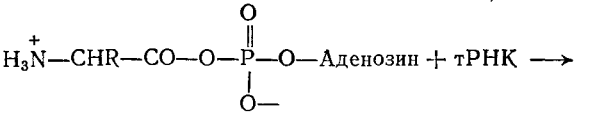
Аминокислоты фигурируют в клетке в свободном виде. Их прямая поликонденсация является эндергоническим процессом и сопровождается увеличением свободной энергии примерно на 3 *ккал/моль* при образовании пептидной связи. В клетке поликонденсация аминокислот сопряжена с экзергонической реакцией дефосфорилирования АТФ (см. стр. 103) Аминокислота вступает в реакцию биосинтеза в активированной форме [26—28]:

$$\text{Аминокислота} + \text{АТФ} + \text{фермент} \longrightarrow \text{Аминоациладенилат} + \text{фермент} + \text{ФФ}$$

(ФФ — пирофосфат) Аминоациладенилат представляет собой активированную аминокислоту. Его строение



Фермент аминоацил — тРНК-синтетаза бифункционален. Он катализирует реакцию образования аминоациладенилата и перенос активированной аминокислоты на конец молекулы-адаптора тРНК. Схема этой второй реакции записывается следующим образом:



Энергия, необходимая для биосинтеза, запасается в химической связи между аминокислотой и тРНК.

Для каждой аминокислоты существует по крайней мере одна специфическая тРНК. Таким образом, число различных тРНК должно быть не менее 20 и соответственно должно существовать не менее 20 различных аминоацилсинтетаз. В действительности число тРНК больше 20. Относительно ферментов это еще не установлено.

Биосинтез белка происходит на рибосомах. Рибосомы представляют собой нуклеопротеидные частицы, состоящие из белков и рибосомальной РНК (рРНК). В растущей клетке *E. coli* содержится примерно 15 000 рибосом с молекулярным весом около $3 \cdot 10^6$. Они составляют до 0,25 всей массы клетки. Рибосомы обеспечивают надлежащее взаимодействие мРНК с комплексом аминокислоты с тРНК. В этом смысле рибосома подобна ферменту.

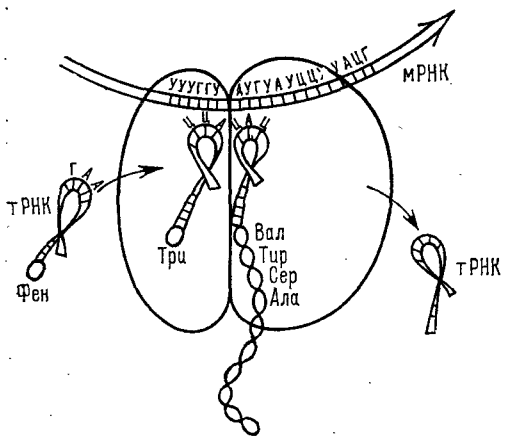


Рис. 9.4. Схема присоединения АК ~ тРНК к мРНК с участием рибосомы.

Рибосома присоединяется к 5′-концу мРНК, кодирующему начало полипептидной цепи — ее N-конец. Рибосома движется вдоль цепи мРНК, «читая текст» таким образом, что кодоны в комплексе мРНК — рибосома последовательно присоединяют АК ~ тРНК. тРНК, несущая аминокислоту, комплементарно взаимодействует с кодоном мРНК своим *антикодоном*. Специфическая для данной аминокислоты тРНК содержит антикодон — триплет, комплементарный кодону мРНК. В данной рибосоме, в данном локусе мРНК происходит последовательное присоединение двух АК ~ тРНК к n-му и $(n+1)$-му кодонам мРНК. При этом образуется пептидная связь между n-й и $(n+1)$-й аминокислотами, n-я тРНК отделяется и рибосома, несущая $(n+1)$-ю тРНК с присоединенной к ней растущей полипептидной цепью, перемещается вдоль мРНК на один кодон. В новом положении рибосома взаимодействует уже с $(n+1)$-м и $(n+2)$-м кодонами мРНК. Этот процесс изображен схематически на рис. 9.4. Вдоль одной цепи мРНК перемещается не одна, а ряд рибосом, на каждой из которых растет своя белковая цепь. Система мРНК — рибосомы, похожая на нитку с бу-

сами, называется *полисомой*. Таким образом, на одной цепи мРНК синтезируется ряд одинаковых белковых цепей. Общая схема синтеза белка представлена на рис. 9.5.

Образование пептидной связи требует участия макроэргических молекул ГТФ.

Таким образом, белок синтезируется *de novo* из аминокислот, а не путем сборки заранее изготовленных полипептидных блоков. Описанная последовательность событий при биосинтезе достаточно сложна, но характеризуется едиными принципами.

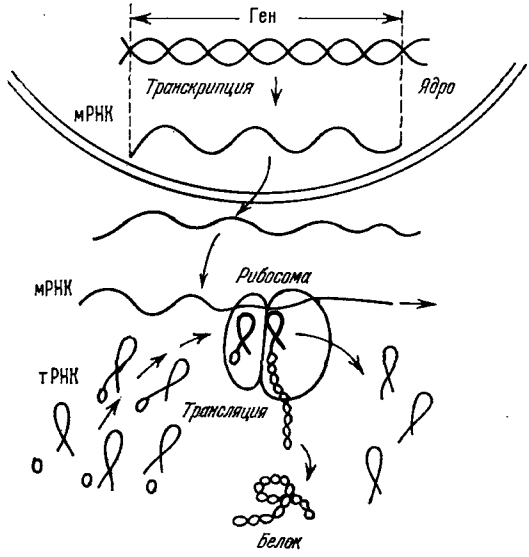


Рис. 9.5. Общая схема синтеза белка.

Четыре типа нуклеиновых кислот участвуют в биосинтезе — ДНК, мРНК, рРНК и тРНК. Функции их различны, но структурные особенности имеют много общего. В биосинтезе вновь реализуется фундаментальный для биологии и биофизики принцип структурного соответствия, комплементарности взаимодействующих молекул. Комплементарны две цепи в двойной спирали ДНК, цепь ДНК и цепь мРНК, антикодоны тРНК и кодоны мРНК. Комплементарны ДНК и тРНК, ДНК и рРНК, так как эти РНК также синтезируются на ДНК как на матрице. В этом смысле ДНК содержит гены двух типов — структурные гены, ответственные за синтез мРНК и соответствующих белков, и гены, ответственные за синтез тРНК и рРНК.

Взаимодействия между комплементарными молекулами — слабые взаимодействия. Но сложная игра этих слабых сил

приводит к образованию сильных химических пептидных связей.

Биосинтез белка — матричный синтез. Здесь мы встречаемся с двумя типами чтения линейной матрицы. Синтез мРНК, тРНК и рРНК на ДНК, подобно редупликации ДНК, происходит путем непосредственного роста новой цепи вдоль исходной цепи ДНК с участием фермента РНК-полимеразы, молекула которой перемещается вдоль исходной матрицы. Синтез белковой цепи более сложен, в нем участвуют молекулы тРНК, а вдоль матрицы перемещаются рибосомы. Сама белковая цепь не находится в коплементарном соответствии с мРНК. Здесь происходит не транскрипция нуклеотидного текста ДНК в текст мРНК, а *трансляция* нуклеотидного текста в аминокислотный.

Все эти процессы требуют затраты энергии, расходуемой прежде всего на образование химических связей — пептидных и межнуклеотидных. В то же время перемещение РНК-полимеразы вдоль цепи ДНК или перемещение рибосомы вдоль цепи мРНК — механические процессы, в которых химическая энергия превращается в механическую работу. Источником энергии для всех этих процессов служат макроэргические нуклеозидтрифосфаты.

Исследование биосинтеза белка выдвигает ряд физических проблем. Необходимо построить теорию матричного синтеза, необходимо понять структурные и динамические особенности РНК-полимеразы, рибосом и ферментов, участвующих в биосинтезе. Необходимо исследовать структурные основы биоэнергетических процессов, определяющих биосинтез.

Новые задачи возникают в связи с открытием синтеза ДНК на РНК. «Центральная догма» молекулярной биологии выражается схемой (см. стр. 560)

$$\text{ДНК} \longrightarrow \text{РНК} \longrightarrow \text{Белок.} \qquad \text{(А)}$$

В действительности это не «догма», а закон природы. Однако у некоторых онкогенных вирусов была установлена передача информации от РНК к ДНК (см. [29—32]). Это означает существование РНК-зависимой ДНК-полимеразы. ДНК из зараженных вирусом клеток гибридизуется с вирусной РНК. По-видимому, в системе действует несколько ферментов — «обратных транскриптаз». Позднее РНК-зависимая ДНК-полимераза была открыта и в неинфицированных клетках мыши и человека [33]. Этот фермент может копировать синтетические матрицы РНК — РНК и РНК — ДНК. Еще в 1960 г. Гершензон обнаружил, что вирус ДНК-типа, вызывающий ядерный полиэдроз у насекомых, создает в клетках хозяина мРНК. Инъекция этой мРНК здоровым насекомым вновь вызывает полиэдроз (см. [34]). Все пере-

численные факты не нарушают «догму», но требуют ее дополнения. Вместо схемы А следует пользоваться схемой

$$\text{ДНК} \rightleftarrows \text{РНК} \longrightarrow \text{Белок} \qquad \text{(Б)}$$

или

$$\text{РНК}' \longrightarrow \text{ДНК} \longrightarrow \text{РНК} \longrightarrow \text{Белок}. \qquad \text{(В)}$$

Основное положение молекулярной биологии, согласно которому происходит передача информации от нуклеиновой кислоты к белку, но не обратно, естественно, остается справедливым. Нуклеиновые кислоты обладают «законодательной», а белки «исполнительной» функцией. Причины этого подробно рассмотрены Эйгеном [57].

§ 9.3. ТРАНСКРИПЦИЯ

Синтез РНК на матрице ДНК происходит с помощью РНК-полимеразы. Большинство исследований проведено на РНК-полимеразе из *E. coli* или из бактерии *Azotobacter vinelandii*. Эти ферменты являются своего рода молекулярными машинами — они имеют сложную четвертичную структуру и выполняют ряд функций: узнавание начального локуса синтеза и специфическое связывание в этом локусе ДНК, инициацию синтеза РНК (образование первой межнуклеотидной связи), непосредственно синтез РНК и терминацию — обрыв синтезируемой цепи РНК в конце гена или линейной последовательности генов (при синтезе полицистронной РНК) и «сваливание» фермента с матрицы.

При низких ионных силах РНК-полимераза является димерным ферментом с молекулярным весом, несколько меньшим 10^6 и константой седиментации 23 S. При ионных силах, бо́льших 0,1 M, фермент обратимо распадается на два мономера; $21\,S \rightleftarrows 2 \cdot 13\,S$. Показано, что мономер 13 S является ферментативно активной формой [35], но относительно димера 21 S мнения расходятся (см. [14]).

Мономерный фермент 13 S в свою очередь состоит из субъединиц: двух больших субъединиц β и β' (м.в. 150 000 и 165 000 соответственно), двух одинаковых меньших субъединиц α (м.в. каждой около 40 000), и так называемого σ-фактора (м.в. 80 000). Таким образом, РНК-полимераза 13 S может быть символически представлена в виде $\sigma\alpha_2\beta\beta'$ [36].

Вопрос о роли субъединиц не решен, но известно, что σ-фактор обеспечивает специфическое «считывание» определенной системы генов. Если от РНК-полимеразы отделить σ-фактор, то эффективность транскрипции так называемых предранних генов фага Т4 понижается на два порядка, тогда как на неспецифической для этого фермента матрице (тимусной ДНК) влияние σ-фактора незначительно. В самом синтезе РНК σ-фактор не

участвует и, как только полимераза начинает двигаться по матрице, выделяется в раствор, чтобы опять состыковаться с основной частью $\alpha_2\beta\beta'$ после отделения фермента от матрицы. Следует подчеркнуть, что сложное строение полимеразы связано с многообразием функций, которые выполняет этот фермент, и необходимостью регуляции процесса транскрипции. В тех случаях, когда единственная функция РНК-полимеразы состоит в синтезе РНК, структура фермента может быть значительно проще. Так, например, специфическая РНК-полимераза из фага Т7 состоит из одной лишь полипептидной цепи с молекулярным весом около 100 000. Терминация синтеза *in vivo* осуществляется с помощью еще одного так называемого ρ-фактора, представляющего собой отдельный белок, нормально не связанный с РНК-полимеразой. Этот фактор «узнает» конец цепи и заставляет полимеразу прекращать синтез РНК [37].

Обсуждаемые РНК-полимеразы более активны с двуспиральной, чем с денатурированной ДНК и *in vivo* используется именно такая матрица, локально расплетаемая в точке роста цепи РНК [38]. Скорости синтеза РНК *in vivo* и в оптимальных условиях *in vitro* близки и составляют 20—30 нуклеотидов в секунду. *In vivo*, а на специфичной и неразрушенной матрице и *in vitro* считывается лишь одна нить ДНК, но для разных последовательностей генов (разных оперонов) эта нить не всегда одна и та же. Поэтому начала последовательностей должны давать информацию о том, какую из нитей ДНК должна читать полимераза. В связи с этим интересна гипотеза Шибальского [39], согласно которой начала генной последовательности характеризуются неравномерным распределением пуриновых и пиримидиновых оснований между цепями ДНК: одна нить богата пуринами, другая — пиримидинами. Однако расшифровка последовательностей в местах связывания полимеразы не подтвердила гипотезу Шибальского [153].

Рентгеноструктурное исследование полинуклеотидов, у которых одна нить содержит лишь пурины, а другая — пиримидины, показало отличие пространственной структуры таких полимеров от структуры *B*-формы ДНК [40]. Таким образом, возможно, что РНК-полимераза узнает начало считывания по пространственной структуре.

Применению физических методов для изучения механизма транскрипции в значительной степени препятствует то, что РНК-полимераза «сидит» на ДНК очень редко, и конформационные превращения матрицы, сопровождающие синтез РНК, захватывают лишь незначительную часть длинной молекулы ДНК. Поэтому большой интерес представляет изучение комплексов РНК-полимеразы с отрезками ДНК минимальной длины, еще несущими все специфические функции, исключая разве лишь

терминацию растущей цепи. Их можно получить, если обработать комплекс полимеразы с ферментом ДНКазой. При этом остается нетронутым связанный с полимеразой отрезок ДНК размером несколько менее трех витков спирали (около 30 нуклеотидных пар). Оказалось, что такой комплекс способен выполнять основную функцию полимеразы (синтез РНК), создавая короткие молекулы РНК длиной в 15—20 нуклеотидных звеньев [41]. Можно надеяться, что применение различных физических методов, позволит выяснить механизм процессов, идущих при перемещении РНК-полимеразы вдоль ДНК, которое происходит со скоростью 20 нуклеотидов в секунду.

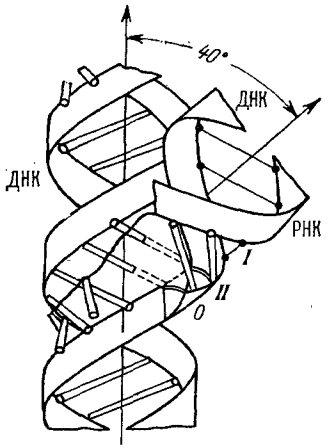


Рис. 9.6. Структура двуспиральной матрицы ДНК и растущего конца РНК при действии РНК-полимеразы.

Флорентьев и Иванов предложили модель действия РНК-полимеразы [42]. При росте цепи РНК (рис. 9.6) происходит связывание 3′-гидроксила рибозы с 5′-фосфатной группой атакующего нуклеотида. Последовательность оснований РНК определяется этой последовательностью в ДНК [43].

Известно, что расщепление фосфоэфирной связи идет через промежуточное состояние, в котором пять ковалентных связей атома Р находятся в тригональной бипирамидальной конфигурации. Поэтому реакцию присоединения нуклеотида можно представить двухстадийной схемой (рис. 9.7). Образование промежуточной системы *II* требует энергии; напротив, выделение пирофосфата освобождает свободную энергию. Модель исходит из представления о перекрывании обеих стадий. Предполагается, что при раскручивании ДНК и возникновении гибридной двойной спирали ДНК—РНК матрица ДНК функционирует в *A*-, а не в обычной *B*-форме, т. е. *A*-форма стабилизуется в участке матрицы, примыкающем к активному центру системы. Это положение аргументировано рядом фактов [42]. Локальный переход *B*-формы в *A*-форму во время действия полимеразы может индуцироваться удалением молекул воды из участка ДНК, связанного с ферментом, что благоприятствует поликонденсации нуклеотидов. Как показывает изучение молекулярных моделей, нет стерических препятствий для выхода основания в одной цепи ДНК из гликозидной выемки в *A*-форме ДНК после разрыва водородных связей с основанием комплементарной цепи. При этом конформация второй цепи не меняется.

Для «перекрывания» стадий необходимо предположить одновременное участие в процессе двух нуклеотидов, один из которых находится в состоянии *I*, а другой в состоянии *II* (см. рис. 9.7) и оба комплементарны нуклеотидам ДНК. Модель показывает, что ось образующейся гибридной спирали наклонена к оси исходной двойной спирали ДНК под углом 40° (см. рис. 9.6).

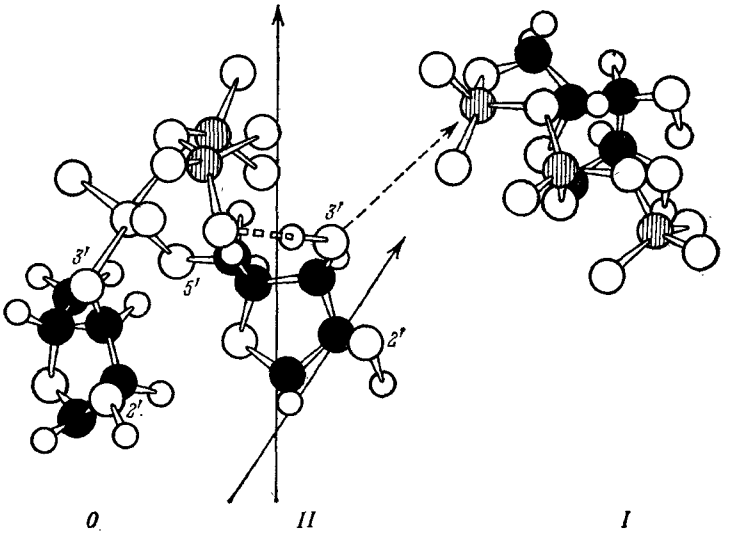


Рис. 9.7. Двухстадийная схема присоединения нуклеотида.

Слева изображена конформация двух последних рибонуклеотидов в точке роста цепи РНК, справа — вновь присоединяющийся нуклеозидтрифосфат. 0 — нуклеотид, образовавший ковалентную связь с *II*, но еще не отщепивший пирофосфат.

Таким образом, при каждом шаге новое основание «извлекается» из матрицы ДНК, и дезоксирибонуклеотид, комплементарный рибонуклеотид которого лишился пирофосфата, поворачивается назад в ДНК с восстановлением водородных связей. Ось гибридной спирали движется вдоль ДНК винтовым способом с одновременным перемещением фермента.

Известно, что в отсутствие субстратов (нуклеозидтрифосфатов) РНК-полимераза слабо связывается с ДНК. Напротив, во время синтеза РНК образуется недиссоциирующий комплекс ДНК — фермент [43]. Согласно описываемой модели этот комплекс стабилизован связями между пирофосфатными группами двух взаимодействующих рибонуклеозидтрифосфатов и катионными группами субъединиц полимеразы. Основания этих три-

фосфатов образуют уотсон-криковские пары с основаниями ДНК. Нуклеотиды *I* и *II* вместе с нуклеотидами 0 образуют переходную гибридную область. В любой момент одновременно функционируют два рибонуклеозидтрифосфата; тем самым модель объясняет сильное связывание фермента. Модель позволяет установить конформации сахаро-фосфатной части нуклеотидов 0 и *II* и аргументировать предположение о конформации нуклеотида *I*. При перемещении фермента вдоль ДНК происходят конформационные изменения, способствующие реакции. Модель учитывает субъединичную структуру полимеразы.

Качественно энергетический аспект процесса транскрипции сводится к сопряжению экзергонических и эндергонических стадий между двумя последовательными реакционными циклами. Предлагаемая модель сходна с моделью действия трансаминазы (см. стр. 380) в том отношении, что фермент создает надлежащие условия на каждом этапе полистадийного процесса. Эти условия обеспечиваются структурными перестройками на предыдущей стадии. По существу, модель исходит из рассмотрения ЭКВ (см. стр. 408).

Альтернативная модель была одновременно предложена Райли [44], считающим, что транскрипция происходит без раскручивания двойной спирали ДНК. РНК растет в широкой бороздке двойной спирали ДНК в результате специфического стереохимического взаимодействия между рибонуклеотидами и парами оснований ДНК. На промежуточных стадиях транскрипции образуются триплеты из двух оснований ДНК и основания РНК. Модель Райли не рассматривает работу фермента.

Экспериментальные данные, появившиеся вскоре после работ [42, 44], подтвердили модель с раскручиванием. Воспользовавшись формальдегидным методом (см. стр. 524), Косаганов и соавторы исследовали комплекс ДНК из фага T2 с РНК-полимеразой из *E. coli* в присутствии всех четырех нуклеозидтрифосфатов [38]. Формальдегидный метод позволяет обнаружить дефекты в ДНК в количестве 1 на 10 000 пар оснований. В полной системе была установлена концентрация дефектов в ДНК, равная $(6 \pm 2) \cdot 10^{-4}$, что соответствует среднему расстоянию между двумя дефектами в 1600 ± 500 пар оснований. В исходной ДНК и в комплексе ДНК — РНК-полимераза в отсутствие НТФ концентрация дефектов менее 10^{-4} и расстояние между двумя соседними дефектами превышает 10^4 пар оснований. Инактивация полимеразы нагреванием также уменьшает число дефектов до 10^{-4}. Позднее, пользуясь модифицированным формальдегидным методом, те же авторы обнаружили расплетание ДНК уже на стадии ее связывания с ферментом.

Исследование упомянутых выше (см. стр. 566) комплексов РНК-полимеразы с короткими отрезками ДНК, проведенное

методом кругового дихроизма, показало, что в ходе синтеза мРНК возникает ранее отсутствовавшая *A*-форма либо ДНК, либо гибридного участка ДНК — РНК [149].

§ 9.4. ТРАНСПОРТНЫЕ РНК

Транспортные РНК (тРНК), впервые открытые в 1957 г. [45, 46], составляют около 10% от общего содержания РНК в клетке. Для ряда тРНК полностью определена первичная структура, что связано с наличием в тРНК минорных азотистых оснований — метилированных в различных местах аденозина, гуанозина и т. д. Минорные нуклеотиды служат идентифицируемыми реперами при расщеплении тРНК под действием нуклеаз. тРНК расщепляют на блоки, получающиеся олигонуклеотиды фракционируют и производят концевой анализ и определение структуры олигонуклеотидов. Впервые этот метод был применен Холли и сотрудниками [47, 48] к Ала-тРНК из дрожжей. В работах Баева и сотрудников, завершившихся определением первичной структуры дрожжевой Вал-тРНК$_1$ [49], при идентификации олигонуклеотидов широко применялись оптические методы — спектрофотометрия и исследование КД [50, 51]. Подробное описание этих исследований приведено в монографии [52]. К началу 1975 г. установлена первичная структура около семидесяти тРНК *различного происхождения*.

Можно наглядно представить вторичную структуру тРНК, исходя из возможности спаривания комплементарных оснований А с У и Г с Ц и считая, что неспаривающиеся участки представляют собой петли. Тогда все известные тРНК могут быть изображены схемой «клеверного листа», с четырьмя или пятью двуспиральными участками (рис. 9.8). Определенная различными методами степень спирализации согласуется с такой схемой. «Клеверный лист» изображает проекцию на плоскость развернутой молекулы тРНК и передает лишь топологию молекулы, т. е. расположение двуспиральных участков.

Принципиально задача нахождения вторичной структуры РНК по последовательности нуклеотидов была решена Туманяном с сотрудниками [53—55]. Алгоритм нахождения решения включает два этапа. Во-первых, строится треугольная матрица всех возможных пар по простому правилу: элемент таблицы a_{ij}, стоящий на пересечении i-го столбца и j-й строки, равен 1 или 0, если i-й и j-й нуклеотиды соответственно комплементарны или некомплементарны. Если надо учесть разную свободную энергию образования пар Г — Ц и А — У, то вместо 1 ставятся соответствующие веса.

Первая часть алгоритма Туманяна была спустя более чем 5 лет воспроизведена Тиноко и др. [56]. После составления

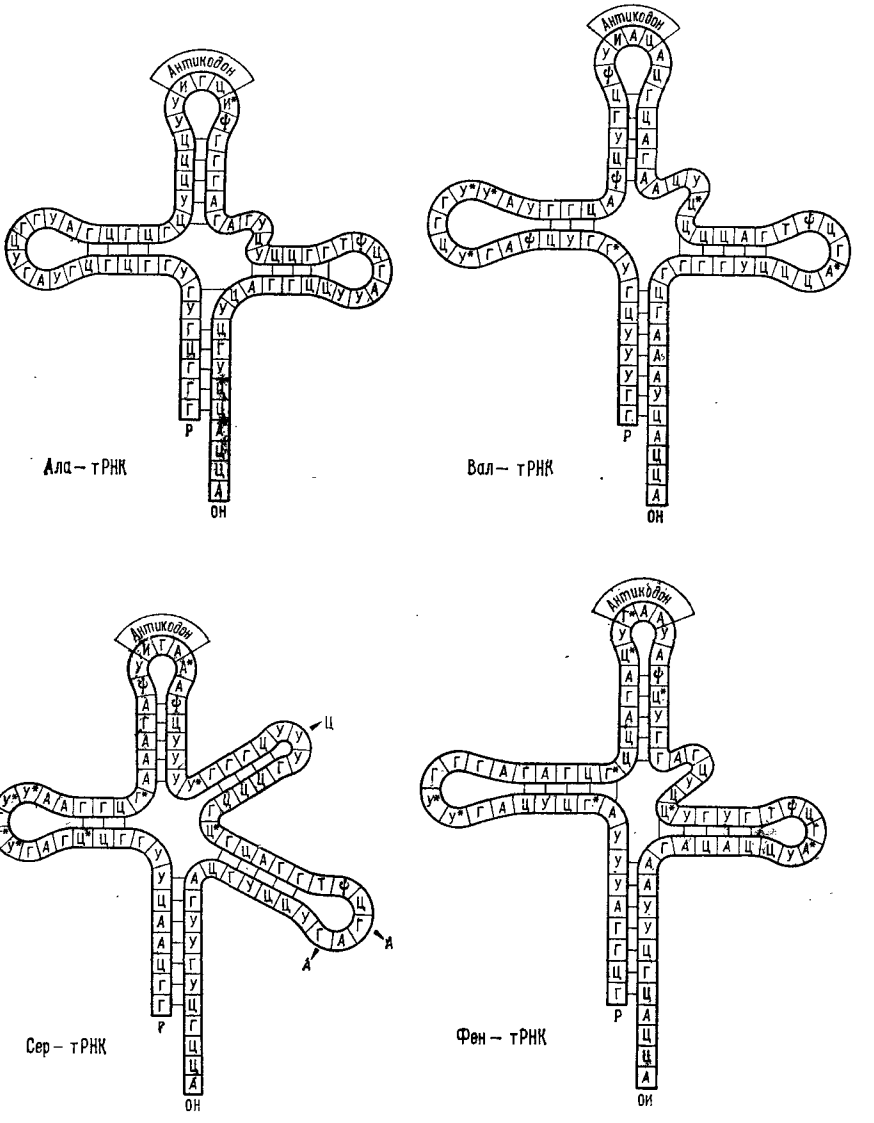


Рис. 9.8. Вторичные структуры некоторых тРНК.
ψ. А*, У*, Г*, И* — минорные нуклеотиды.

матрицы пар задача может решаться перебором (как у Тиноко) всевозможных вариантов последовательности пар (разумеется, допустимых топологически) с учетом свободной энергии образования разного рода петель.

Алгоритм Туманяна дополнен еще вторым этапом — алгоритмом построения «максимальных шпилек» («максимальной шпилькой» называется вторичная структура с одной двуспиральной областью, обладающая максимальной отрицательной свободной энергией, что соответствует в первом приближении максимуму числа пар). Справедливость алгоритма доказана методом полной математической индукции. Затем осуществляется уже довольно ограниченный перебор вторичных структур с разным числом найденных максимальных шпилек.

Такой алгоритм дает полное решение задачи нахождения вторичных структур РНК, но при этом, разумеется, необходимо использование правильных параметров (величин свободных энергий образования различных пар, петель разной конфигурации и т. д.).

В работе [56] предложены оценки свободной энергии образования петель (см. стр. 499) и двуспиральных участков. Инициирование спаривания оснований в одноцепочечной молекуле РНК включает образование петли. Свободная энергия инициации есть $-RT\ln\gamma_m$, где γ_m — вероятность образования петли из m неспаренных звеньев. С уменьшением m γ_m возрастает, пока образованию петли не помешают стерические факторы. Если T_m^∞ — температура, при которой равные количества двуспиральных и одноцепочечных участков находятся в равновесии, т. е. температура плавления двойной спирали, то для спирализации $\Delta F(\text{спир}) = 0$ и

$$\Delta S(\text{спир}) = \Delta H(\text{спир})/T. \qquad (9.1)$$

При температуре T для короткой двойной спирали РНК

$$\Delta F(\text{спир}) = \Delta H\left(1 - T/T_m^\infty\right) \qquad (9.2)$$

и полная свободная энергия образования двойной спирали оказывается равной

$$\Delta F = \Delta H\left(1 - T/T_m^\infty\right) - RT\ln\gamma_m. \qquad (9.3)$$

Наиболее устойчива структура с наинизшим значением ΔF. Образование пары А — У дает $\Delta F = -1{,}2$ *ккал/моль*. Примем это значение за «число стабильности» β, равное $+1$. Тогда из данных, относящихся к температурам плавления и термодинамическим характеристикам двуспиральных олигонуклеотидов, получаются следующие значения β: 1) пара А — У $+1$; 2) пара Г — Ц $+2$; 3) пара Г — У 0; 4) шпилечные петли от -5 до -7;

5) внутренние петли от —4 до —7; 6) односторонние петли от —2 до —6. С помощью этих данных в работе [53] вычислены ΔF для трех возможных структур (рис. 9.9), отвечающих последовательности 55 оснований РНК из вируса R 17 и показанных

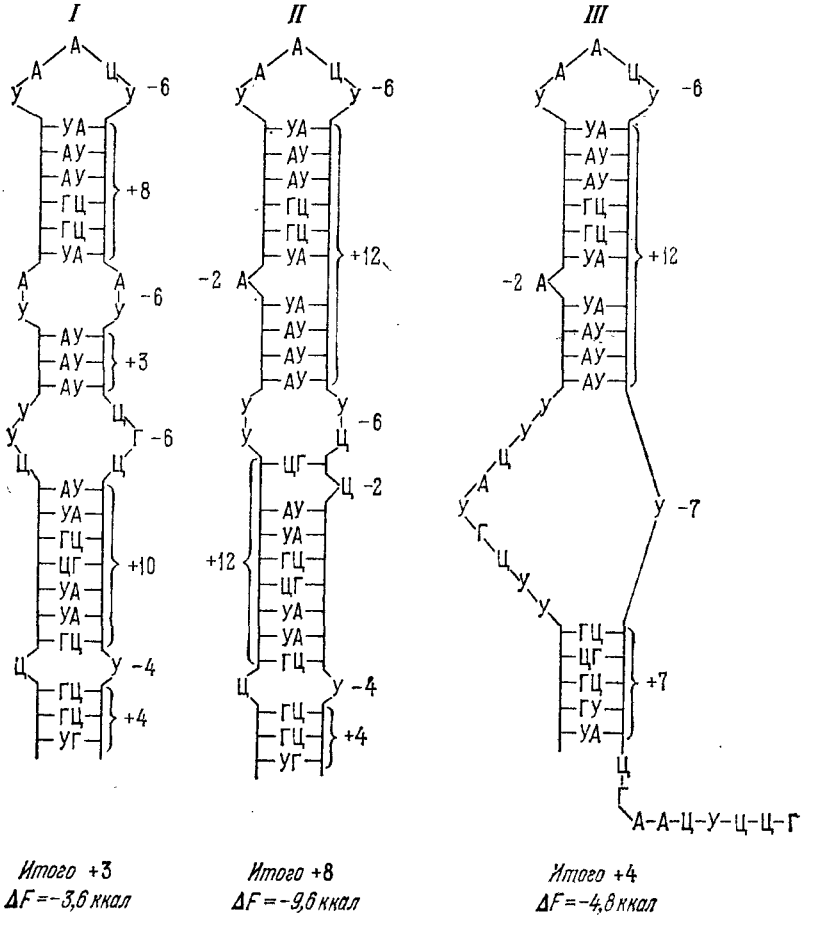


Рис. 9.9. Три возможные структуры фрагмента вирусной РНК.

на рис. 9.9. Наиболее стабильна структура *II*. Эти расчеты основаны на предварительных данных и не учитывают факторов среды. В дальнейшем результаты работы [56] были уточнены в [150]. Вместо того чтобы приписывать определенное значение свободной энергии каждой паре оснований, рассматриваются две соседние пары оснований и, тем самым, учитывается их

взаимодействие. Необходимые для этого термодинамические данные получены из исследований олигонуклеотидов. Изменены также оценки свободных энергий для петель.

Причины возникновения структуры «клеверного листа» у тРНК наглядно выявляются в «игре в тРНК», описанной Эйгеном [57]. Представим себе двух игроков, которым дана беспорядочная последовательность N единиц четырех сортов А, У, Г, Ц и тетраэдрическая кость, каждая грань которой представляет одну из этих единиц. Бросая кость по очереди и заменяя полученной единицей заранее объявленную единицу в последовательности, каждый игрок стремится получить двуспиральную структуру с максимальным числом пар А — У или Г — Ц. Игра кончается, когда игрок объявляет «полную» структуру. Выигрывает тот, кто набрал большее число очков — пара Г — Ц дает два очка, пара А — У — одно. Наложено ограничение, состоящее в том, что пары образуются лишь в минимальных последовательностях 2(Г — Ц) или 1(Г — Ц) + 2(А — У), или 4(А — У). (кооперативность). Каждая петля в структуре должна содержать не менее пяти неспаренных единиц. Результатом игры действительно оказывается «клеверный лист». «Шпилька» с одной петлей имеет наибольшее число оснований, которые могут спариться, но «клеверный лист» более гибок — дает больше комбинаций, чем «шпилька». Для 80 нуклеотидов оптимум отвечает 3—4 «листьям». По мнению Эйгена, природа давно «играла в эту игру».

Пространственное строение тРНК характеризуется большой компактностью молекул в нативном состоянии. Положение спиральных участков фиксировано, вероятно, в результате взаимодействия неспиральных участков. В этом смысле молекула тРНК сходна с белковой глобулой. Для поддержания нативной пространственной структуры необходимы ионы Mg. Термически денатурированная тРНК способна к ренатурации. Эти особенности структуры установлены путем исследования гидродинамических свойств и рентгеновского рассеяния под малыми углами (см., в частности, [58, 59]).

тРНК удалось получить в кристаллической форме и исследовать структуру кристаллов методом рентгенографии [60—62]. При разрешении 12 Å были найдены молекулярные размеры формилметиониловой тРНК из *E. coli*, равные $80 \times 25 \times 35$ Å^3. Высокое разрешение 2,3 Å, примененное к исследованию кристаллов дрожжевой Фен-тРНК, дало молекулярные размеры $80 \times 33 \times 28$ Å^3. Размеры орторомбической единичной ячейки $a = 33{,}2$, $b = 56{,}1$, $c = 161$ Å. Дифракционная картина вдоль оси a (но не вдоль оси b) характерна для двуспиральных нуклеиновых кислот. Отсюда, видимо, следует, что длины двуспиральных участков отвечают не менее, чем половине оборота

спирали, т. е. содержат более 4—7 пар оснований. Эти результаты согласуются с моделью клеверного листа [63].

тРНК кристаллизуется в различных элементарных ячейках, разные кристаллические формы получаются при изменении условий кристаллизации.

Позднее Рич с сотрудниками провели полную расшифровку пространственной структуры Фен-тРНК на основе рентгенограмм с разрешением до 4 Å [154]. Третичная ее структура состоит из двух спиральных сегментов, соединенных под прямым углом друг к другу так, что получается подобие буквы Г. Антикодоновая шпилька объединяется в одну спиральную систему со шпилькой, содержащей дегидроуридиловую петлю. Эта структура показана на рис. 9.10 (см. также [152]).

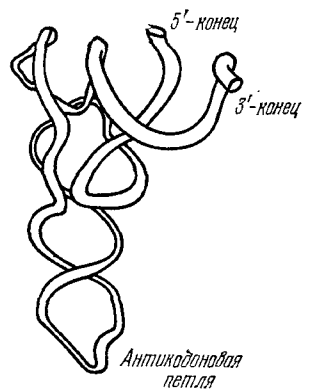


Рис. 9.10. Пространственная структура Фен-тРНК.

Компактная структура тРНК стабилизована горизонтальными и вертикальными взаимодействиями оснований. В их упаковке играют роль также гидрофобные взаимодействия и кулоновское отталкивание заряженных фосфатных групп. Исследования тритиевого обмена и реакции формальдегида с молекулами тРНК показали наличие в структуре молекул стабильного двутяжевого остова (48 медленно обменивающихся протонов, что количественно согласуется с моделью «клеверного листа»), окруженного основаниями, формирующими более лабильную третичную структуру [64].

Ионы Mg нейтрализуют отрицательные заряды фосфатных групп и обеспечивают наибольшую стабилизацию компактной структуры молекулы, которая в этих условиях приобретает характерную оптическую активность [65, 66]. Спектр КД тРНК имеет интенсивный положительный максимум при 2640 Å ($\Delta\varepsilon \sim \sim 5{,}5$), отрицательные максимумы 2960 ($\Delta\varepsilon = -0{,}35$), 2330 ($\Delta\varepsilon = -1{,}0$) и 2100 Å ($\Delta\varepsilon \sim -5{,}0$); кроме того, при 1880 Å наблюдается интенсивный положительный максимум ($\Delta\varepsilon \sim 18$), величина которого крайне чувствительна к структурным изменениям [67, 68]. Интенсивности полос 2640, 2100 и 2960 Å также чувствительны к изменениям конформации тРНК [67—69]. У частично разупорядоченных молекул (низкая ионная сила, повышенная температура среды, отсутствие ионов Mg, присутствие органического растворителя) исчезает полоса 2960 Å, уменьшается интенсивность полосы 2640 на 20—25%, а полосы 2100 Å — на 50—55% [67, 70]. Разупорядочение структуры

сопровождается сдвигом максимума 2640 Å в длинноволновую сторону [71]. Этот эффект, а также исчезновение полосы 2960 Å вызваны изменением взаимной ориентации пентоз и оснований и самих оснований друг относительно друга [70, 71]. Исследование температурной зависимости спектров КД тРНК показало наличие нескольких ступенчатых изменений конформации молекул в процессе плавления и вновь подтвердило схему вторичной структуры типа «клеверного листа» (см. [70—73]).

Упорядочение структуры молекул тРНК сопровождается появлением гипохромизма (до 22%) [64], увеличением числа медленно обменивающихся протонов [74], уменьшением числа оснований, доступных для формальдегида [64] и различных нуклеаз [75], увеличением коэффициента седиментации и уменьшением характеристической вязкости. Полная стабилизация ионами Mg^{++} и Ca^{++} происходит при отношении их концентрации к концентрации фосфатов 1 : 2 [70].

Плавление молекул тРНК в отсутствие ионов Mg имеет некооперативный характер, ширина интервала плавления (ΔT) примерно равна 55° [76]. Добавление ионов Mg делает процесс кооперативным ($\Delta T \approx 18°$) и повышает температуру до 75—80° [76]. Теоретический анализ кривых плавления тРНК вновь подтверждает структуру «клеверного листа» [64, 77].

При нагревании молекул тРНК обнаружены изменения их структуры при температуре 30—40 °С, т. е. до начала плавления. Эти изменения наблюдались по гидродинамическим характеристикам [78] и при исследовании поляризации люминесценции присоединенных к тРНК молекул красителей. Очевидно, что в молекулах тРНК еще до плавления остова появляются степени свободы, позволяющие отдельным фрагментам молекулы перемещаться друг относительно друга. Данные по поляризации люминесценции показали, что молекулы тРНК имеют в растворе форму эллипсоидов с соотношением полуосей 1 : 4 [79].

Исследование миграции энергии между люминесцирующим основанием, находящимся в петле антикодона молекул Фен-тРНК, и хромофорами акридинового типа, ковалентно привязанными к акцепторному концу, позволило оценить расстояние между ними [80]. Оно оказалось больше 40 Å. Изучение миграции энергии между молекулами акридиновых красителей, адсорбированными на молекулах тРНК, говорит в пользу компактной третичной структуры [81].

Антикодоновый триплет расположен в верхнем лепестке клеверного листа. Как правило, он содержит минорный нуклеотид — инозин (И). Абрахам предложил для Фен-тРНК модель, имеющую столько же вертикальных взаимодействий, сколько и «клеверный лист», но в одной непрерывной двойной спирали с дефектами. Основной аргумент этой работы — необходимость

совместной упаковки двух тРНК, связанных с соседними кодонами мРНК, в рибосоме [82]. Эта модель не имеет структурных подтверждений.

Естественный путь для выяснения структурно-функциональных свойств тРНК состоит в ее ферментативном расщеплении на фрагменты и в исследовании их свойств. Баев и сотрудники [83] показали, что половины молекулы, полученные из дрожжевой Вал-тРНК$_1$ расщеплением фосфодиэфирной связи в пределах антикодона и сами по себе неактивные, будучи смешаны, полностью восстанавливают акцепторную активность к аминокислоте. В то же время расщепление фосфодиэфирной связи в антикодоне необратимо уничтожает его способность взаимодействовать с кодоном [84]. В дальнейшем было установлено, что восстановлению активности предшествует самосборка фрагментов, причем агрегированная молекула тРНК может быть даже лишена части полинуклеотидной цепи [85, 86]. При самосборке 3′- и 5′-половины агрегируют в эквимолярном соотношении, и самосборка проходит количественно менее чем за 2 *мин*. Самосборка специфична — 3′- 5′-половины Вал-тРНК в присутствии 5′-половины других тРНК образуют только гомологичный комплекс. В каждой тРНК существует своя нуклеотидная последовательность. Половины не обладают сродством к Вал-тРНК-синтетазе. Баев считает, что структурные участки Вал-тРНК, входящие в состав половин, непосредственно не участвуют в узнавании Вал-тРНК-синтетазы, но спирализованные части антикодоновой и акцепторной ветвей необходимы для образования активной конформации тРНК.

Пространственное строение тРНК исследуется и косвенными методами. Акридиновые красители сорбируются на двуспиральных участках нуклеиновых кислот между соседними парами А — У (или А — Т в ДНК) попарно. Изучая тушение люминесценции красителей, вызванное миграцией энергии от одной сорбированной молекулы к другой, можно установить относительное расположение двойных пар $(А — У)_2$ (см. [73]).

Изоакцепторные тРНК различаются своей первичной структурой. По-видимому, это определяется не только вырождением генетического кода (см. § 9.6). В строении тРНК проявляются видовые различия. Установлено, что минорные основания имеют вторичное, а не генетическое происхождение — тРНК метилируется под действием фермента метилазы.

§ 9.5. РИБОСОМЫ

Рибосомы непосредственно наблюдаются с помощью электронной микроскопии как округлые гранулы диаметром 150—250 Å. Физические характеристики рибосом *E. coli* приведены в табл. 9.1 [87].

Таблица 9.1

Физические свойства рибосом *E. coli*

Константа седиментации $S^0_{20,w}$ (сведберги)	69,1—70,5
Характеристическая вязкость [η], *см*³/*г*	6,1—6,8
Коэффициент поступательной диффузии $D^0_{20,w} \cdot 10^7$	1,83
Парциальный удельный объем, *см*³/*г*	0,64—0,60
Молекулярный вес	$\sim 3 \cdot 10^6$
Размеры в высушенном состоянии, Å	200×170×170
Объем, Å³	$\sim 3 \cdot 10^6$
Размеры в водной среде, Å	~300×300×200
Объем, Å³	$\sim (7—10) \cdot 10^6$
Вероятное количество удержнваемой воды, *г*/*г*	0,9

Рибосомы *эукариотов* (организмов, клетки которых содержат ядра) характеризуются бóльшим значением $S^0_{20,w}$ (80 *S*, а не 70 *S*), м. в. $(4{,}1—4{,}7) \cdot 10^6$ и несколько бóльшими размерами (сухой объем $5 \cdot 10^6$ Å³). Для рибосом митохондрий и хлоропластов эукариотов константа седиментации близка к 70 *S*, а не к 80 *S*. 70 *S*-рибосомы состоят из двух субъединиц — 30 *S* и 50 *S*, на которые они диссоциируют при уменьшении концентрации двухвалентных ионов (Mg^{++}) или при увеличении концентрации одновалентных ионов. Молекулярный вес 50 *S*-частиц вдвое больше, чем 30 *S*-частиц $1{,}8 \cdot 10^6$ и $(0{,}7—1{,}0) \cdot 10^6$ соответственно. Форма и размеры 70 *S*-, 30 *S*- и 50 *S*-частиц показаны на рис. 9.11. Аналогичным образом 80 *S*-рибосомы состоят из 60 *S*- и 40 *S*-частиц. Установлено, что присутствие ионов Mg^{++} необходимо для поддержания целостности рибосом [88, 89]. Имеются два критических уровня содержания Mg^{++} — если оно меньше первого уровня, то рибосомы диссоциируют на субъединицы, если меньше второго, то сами субъединицы утрачивают компактную структуру. Первый уровень равен 0,5 *мкмоль* Mg^{++} на 1 *мкмоль* фосфата для 70 *S*-частиц и 0,3—0,1 для 80 *S*-частиц, т. е. 2500—3000 ионов Mg на рибосому. Второй уровень — 0,3 для 70 *S*- и 0,15 для 80 *S*-частицы, т. е. менее 1000 ионов Mg на рибосому [88].

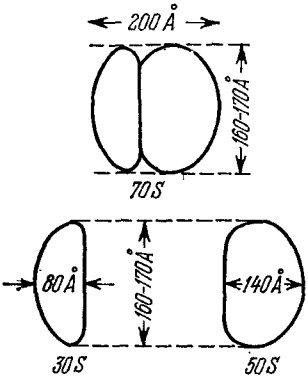


Рис. 9.11. Схема 70*S*-, 30*S*- и 50*S*-частиц.

Рибосомальная РНК составляет около 65% сухого веса рибосом, белки — примерно 35%. рРНК разделяются на три класса,

а именно на высоко-(23—28 *S*, м.в. $\geqslant 1 \cdot 10^6$), средне-(16—18 *S*, м.в. $< 1 \cdot 10^6$) и низкомолекулярные (5 *S*, м.в. около 40 000). В нативном состоянии эти компоненты рРНК являются непрерывными цепями [90]. Нуклеотидный состав различных компонент рРНК неодинаков и не подчиняется правилам Чаргаффа. Исследования структурных превращений рибосом привели к следующим представлениям о структуре рРНК в растворе и о ее взаимодействиях с белками [87, 91]. По-видимому, вторичная структура рРНК характеризуется многочисленными короткими двуспиральными участками, соединенными промежуточными однотяжевыми участками в гибкую палочку. Молекулы белка взаимодействуют с неспиральными участками рРНК, не нарушая ее вторичной структуры, и образующийся таким образом рибонуклеопротеидный комплекс сворачивается в компактную структуру рибосомной субъединицы. В 70 *S*-рибосоме содержится около 65 полипептидных цепей со средним молекулярным весом каждой цепи 65 000, в 80 *S*-рибосоме число таких цепей вдвое больше. В 30 *S*-частицах имеется 19—20 сортов белков, в 50*S*-частицах их более 50. Установлена частично глобулярная структура этих белков и наличие в них α-спиральных участков.

Рибосомы испытывают три вида структурных превращений: обратимую диссоциацию на две субъединицы, разворачивание субъединиц, разборку субъединиц. Как уже сказано, диссоциация может быть вызвана понижением концентрации ионов Mg^{++}. Электронная микроскопия показывает, что ассоциирующие субъединицы взаимодействуют определенными участками своих поверхностей. Роль ионов Mg^{++} (или Ca^{++}), вероятно, сводится к экранировке отрицательных зарядов фосфатных и карбоксильных групп. Взаимодействие субъединиц в рибосоме до сих пор детально не изучено. Имеются данные, указывающие на существование в клетке фонда свободных субъединиц, находящихся в равновесии с нефункционирующими рибосомами, в которых связь между субъединицами недостаточно стабильна. Эта связь стабилизуется при взаимодействии с компонентами белок-синтезирующей системы, в частности тРНК [92]. Спирин и Гаврилова подчеркивают значение лабильной ассоциации двух неравных субчастиц в рибосоме [87].

На рибосомах *E. coli* было открыто и изучено разворачивание субчастиц при удалении ионов Mg^{++} и увеличении концентрации одновалентных ионов [93—95]. Разворачивание происходит ступенчато, в несколько стадий, каждая из которых реализуется в узком интервале изменений ионного окружения. Эти скачкообразные переходы свидетельствуют о кооперативности соответствующих процессов. В конечном счете образуется рыхлый неупорядоченный рибонуклеопротеид.

Разборка рибосомных частиц состоит в отделении белка от рРНК при повышении концентрации одновалентных ионов. Эти процессы также имеют многостадийный и кооперативный характер. Весьма интересна возможность обратной самосборки рибосомных частиц при надлежащем изменении среды. Реконструированные частицы биологически функциональны [96, 97]. Согласно Спирину, эти явления определяются особой ролью рРНК, которая служит «каркасом или матрицей для специфического размещения на ней молекул рибосомального белка» [87]. В основе самосборки лежит узнавание участка РНК молекулой определенного белка.

Полная разборка рибосом и их реконструкция из полученных белков и рРНК была осуществлена Номурой и сотрудниками [98—100]. Роль рРНК оказалась специфичной, но не абсолютно — функциональные 30 *S*-частицы получаются из 16 *S* рРНК одного вида бактерий и рибосомных 30 *S*-белков другого вида. Было выделено 19 белков. Установлено, что чувствительность 30 *S*-частиц к стрептомицину (препятствующему правильному чтению текста мРНК) определяется одним лишь белком, обозначаемым *P* 10. Оказалось, что частицы, лишенные белка *P* 10, точнее читают текст в присутствии веществ, этому препятствующих, — не только антибиотиков, но и C_2H_5OH и ионов Mg^{++} при их высокой концентрации. Отсутствие любого из 19 белков влияет на ряд функций 30*S*-частиц. Несколько различных функций этих частиц изменяется при отсутствии любого из 19 белков. Таким образом, все белки действуют согласованно, что необходимо и для самосборки.

Кинетика самосборки отвечает реакции первого порядка, что означает наличие медленной, лимитирующей процесс перестройки некоторой промежуточной компоненты. Сильная зависимость скорости от температуры показывает, что на эту перестройку требуется около 40 *ккал/моль* рибосом. Самосборка рибосом из всех компонент *in vitro* происходит примерно за 5 *мин.*

Генетический анализ мутантов *E. coli*, характеризуемых различными дефектами самосборки рибосом, свидетельствует в пользу того, что самосборка *in vivo* и *in vitro* происходит сходным образом. Молекулярные механизмы этих интересных и важных явлений еще не изучены.

Исследование функционирования рибосом — актуальная задача. Для работы рибосом необходимо присутствие в них специальных белков — *трансферных факторов* (см. [87]). Известны три фракции трансферных факторов: *G*-фактор, зависимый от ГТФ, T_c — стабильный фактор и T_n — нестабильный фактор [101]. В присутствии *G*-фактора появляется ГТФ-азная активность. Трансферные факторы объединяются с рибосомой в присутствии двухвалентных катионов. Структура и роль трансфер-

ных факторов недостаточно изучены. Установлено наличие также белковых факторов инициации и терминации синтеза полипептидной цепи (см. [87]).

Для комплексообразования рибосом с мРНК или с искусственными полинуклеотидами требуется присутствие Mg^{++} в концентрации, не меньше 0,005 *М*. Каждая рибосома соединяется лишь с одной полинуклеотидной цепью. Связывание происходит в 30 *S*-субъединице. В тройном комплексе рибосома — мРНК — аминоацил — тРНК последняя связывается строго избирательно: антикодон тРНК с кодоном мРНК. Образование прочной пары кодон — антикодон также происходит в 30 *S*-субъединице. В отсутствие матрицы деацилированная тРНК или аминоацил — тРНК связываются 50 *S*-субъединицей, неким пептидил — тРНК-связывающим участком.

Процесс трансляции начинается с *инициации*, т. е. с синтеза первой пептидной связи. В инициацию должны вовлекаться одновременно два комплекса аминоацил — тРНК. Один из них оказывается N-блокированным, инициаторным. Установлено, что это всегда N-формилметионил — тРНК, *обладающий повышенным* сродством к пептидил — тРНК-связывающему участку рибосомы на 50 *S*-частице [101]. Инициирующим кодоном мРНК служит АУГ или ГУГ, расположенный у 5′-конца полинуклеотида. По-видимому, этот кодон предварительно связывается аминоацил — тРНК-связывающим участком 30 *S*-субъединицы. Общая схема процесса инициации (см. [87]) записывается в виде (Ф — формил)

$$\begin{matrix}50S\\|\\30S\end{matrix} + \text{Ф—Мет—тРНК} \rightleftarrows \begin{matrix}50S\\|\\30S \ldots \text{АУГ}\end{matrix} + \text{Ф—Мет—тРНК} \rightleftarrows$$

$$\rightleftarrows \begin{matrix}50S\\|\\30S\\\vdots\\\text{АУГ}\end{matrix} \ldots \text{Ф—Мет—тРНК} \longrightarrow \begin{matrix}50S\text{—Ф—Мет—тРНК}\\|\qquad\qquad|\\30S\qquad\text{АУГ}\end{matrix}.$$

Далее происходит последовательная поликонденсация аминокислот. На протяжении всей трансляции растущий полипептид удерживается на рибосоме. Пристраивание каждого следующего аминоацила идет на С-конце полипептида. тРНК, принесшая пристроившийся аминоацил, остается с ним связанной. Очередной аминоацил пристраивается путем замещения тРНК на комплекс аминоацил — тРНК. Общая схема трансляции (рис. 9.12)

$$\text{Пептидил}\,(n) - \text{тРНК}' + \text{аминоацил} - \text{тРНК}'' \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{пептидил}\,(n+1) - \text{тРНК}'' + \text{тРНК}'.$$

Цикл повторяется многократно. Суммарное его описание дано Уотсоном [2, 102]. Допустим, что в некоторый произвольный

момент на 50*S*-частице, в ее пептидил — тРНК-связывающем участке, находится пептидил — тРНК, а в аминоацил — тРНК-связывающем участке 30 *S*-частицы — аминоацил — тРНК (рис. 9.12, *б*). На 50 *S*-частице находятся также пептидилтрансферазный центр, обеспечивающий перенос пептидила. На рис. 9.12, *в* аминоацильный конец комплекса аминоацил — тРНК располагается вплотную к этерифицированному карбоксилу пептидила; далее этот карбоксил переносится на аминогруппу аминоацила комплекса аминоацил — тРНК и на 50 *S*-частице остается деацилированная тРНК (рис. 9.12, *г*). Затем происходит транслокация — остаток тРНК молекулы новообразованного пептидил — тРНК переходит с 30 *S*- на 50 *S*-частицу, увлекая за собой связанный с ним кодон мРНК и вытесняя деацилированную тРНК из пептидил — тРНК-связывающего участка (рис. 9.12, *а*). Затем на расположенный в 30 *S*-частице новый кодон поступает новый комплекс аминоацил — тРНК и цикл начинается сначала.

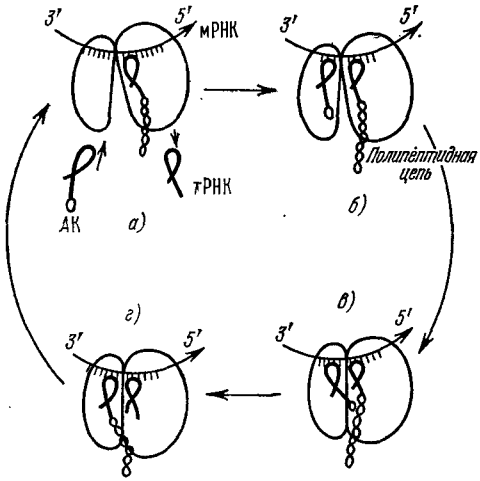


Рис. 9.12. Вероятная схема рабочего цикла рибосомы по Спирину.

Его результатом является синтез одной пептидной связи и перемещение мРНК относительно рибосомы на один кодон. Трансляция, надо думать, происходит в результате конформационного изменения рибосомы; энергия для этого черпается из ГТФ. Реализуется механохимический процесс — работа перемещения мРНК производится за счет химической энергии.

Как уже говорилось, одна молекула мРНК сочетается с несколькими рибосомами, образуя полисому. Размеры полисом зависят от длины цепей мРНК. При максимальном ее использовании на каждые 80 нуклеотидов приходится одна рибосома. При синтезе белков, содержащих примерно 150 аминокислот, в полисоме имеются 4—6 рибосом, при синтезе более длинных белковых цепей — 12—20 рибосом и больше. Наличие полисом объясняет сравнительно низкое содержание мРНК в клетке (1—2% общего количества РНК) — одна цепь мРНК обеспечивает синтез большого числа полипептидных цепей (дальнейшее описание трансляции см. в § 9.8).

§ 9.6. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Расшифровка генетического кода была проведена синтетическим, а не аналитическим путем. Аналитический путь еще закрыт, так как пока не удалось установить первичную структуру матрицы — ДНК или мРНК, соответствующую синтезируемой белковой цепи с известной последовательностью аминокислотных остатков.

Путь к решению проблемы был впервые найден в работе Ниренберга и Маттеи, доложенной на 5-м Международном биохимическом конгрессе в Москве в 1961 г. [103]. При введении синтетических полирибонуклеотидов в бесклеточную систему аминокислоты включаются в полипептидную цепь. Бесклеточная система содержит рибосомы, набор тРНК, АТФ, все необходимые ферменты, но не содержит ДНК и мРНК. Система приготовлялась из разрушенных клеток *E. coli*. Центрифугированием выделялись рибосомная и надосадочная фракции. Рибосомы отмывались, надосадочная жидкость, содержавшая ацилирующие ферменты и тРНК, диализовалась против специального буфера, включавшего стабилизующий систему меркаптоэтанол. К смеси этих двух очищенных фракций добавлялась система, генерирующая АТФ, и 20 аминокислот. В бесклеточную систему вводились РНК или синтетические полирибонуклеотиды и изучалось включение меченных C^{14} аминокислот во фракцию, нерастворимую в трихлоруксусной кислоте, т. е. в полипептиды. Оказалось, что в присутствии РНК метка включается значительно больше, чем в отсутствие РНК. Включение подавляется рибонуклеазой — ферментом, разрушающим РНК, а также пуромицином и хлорамфениколом. Было устновлено, что Поли-У стимулирует включение C^{14}-фенилаланила в полипептид. В отсутствие Поли-У на 1 *мг* белка приходилось 44 радиоактивных импульса в минуту, в его присутствии — 39 800 импульсов.

Таким образом, удалось «обмануть» биологическую систему — вместо природной мРНК рибосомы взаимодействовали с синтетической цепью Поли-У. Этот полимер кодировал фенилаланин. Если код триплетен, то остатку Фен отвечает кодон УУУ. Воспользовавшись полицитидиловой кислотой Поли-Ц, Ниренберг и Маттеи нашли, что она стимулирует включение Про. Таким образом, для Про был установлен кодон ЦЦЦ.

Работа с полимерами, имеющими регулярные последовательности, например с ... АУАУАУАУ ..., оказалась невозможной, так как они образуют двуспиральные структуры, лишенные матричной активности [104]. Неактивен также Поли-Г. Полинуклеотиды со случайной спиральной структурой не связываются с рибосомами. Далее (см. [1, 5, 7]) изучалось действие сополимеров известного состава, но с неизвестной последовательностью

нуклеотидов. В таком полимере известна частота появления триплетов определенного состава. Сополимер А — У в пропорции 1 : 5 стимулирует включение Фен, Лей, Иле и в меньших количествах Асн и Лиз. Если 100 — доля триплета 3У, то доля 1А 2У — 20(3У/1А 2У = 5), 2А 1У — 4(3У/2А 1У = 25) и 3А — 0,8(3У/3А = 125). Сравнивая эти значения со степенями включения (для Фен она принимается равной 100), можно установить состав кодонов для названных аминокислотных остатков. (табл. 9.2).

Таблица 9.2

Кодирующие триплеты, полученные на основании опытов с Поли-АУ (1:5) [3]

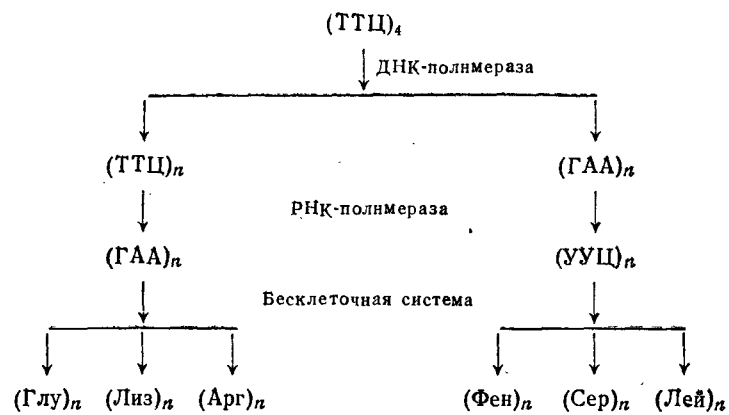
Аминокислотный остаток	Вычисленные доли триплетов				Сумма долей	Включение аминокислоты
	3А	2А 1У	1А 2У	3У		
Асн	—	4	—	—	4	6,6
Иле	—	4	20	—	24	20
Лей	—	—	20	—	20	15
Лиз	0,8	4	—	—	4,8	3,1
Тир	—	—	20	—	20	25
Фен	—	—	—	100	100	100

Так были установлены триплеты 3У для Фен, 1А 2У для Тир, 2А 1У и 1А 2У для Иле, 1А 2У для Лей, 2А 1У для Асн и 3А и 2А 1У для Лиз. В дальнейшем последний триплет оказался не кодирующим Лиз, остальные подтвердились.

Однако эти опыты еще не дают полной расшифровки кода. Неизвестно, какой из трех кодонов АУУ, УАУ или УУА кодирует Тир и т. п. Подробная история исследования кода изложена в монографии Ичаса [5]. Полная расшифровка кода была получена в работах Ниренберга, применившего в последующих опытах уже не полинуклеотиды, а тринуклеотиды известного строения [105]. В системах образуются комплексы тринуклеотид — тРНК — АК (аминокислота). Синтез полипептида в этих условиях не идет, но, поскольку тринуклеотид имитирует кодон, образование комплекса позволяет прочесть его. Для этого нужно изучить все тРНК, которые последовательно связываются с меченными C^{14} аминокислотами. Так были исследованы все 64 триплета и установлено, с какими аминокислотами они связаны. Окончательную расшифровку, подтвердившую эти результаты, провел Корана (см. [106, 107]). Он синтезировал олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие от 8 до 12 звеньев в цепи, с известной последовательностью. Они представляли собой по-

вторяющиеся триплеты (например, $(ТТЦ)_4$). Далее такой олигомер применялся в качестве матрицы *in vitro* для синтеза ДНК-подобного полимера в системе, содержавшей нуклеозидтрифосфаты Т, Ц, Г, А, нужное количество ионов и ДНК-полимеразу (ср. стр. 537). При этом синтезировалась двойная спираль, подобная ДНК. Обе цепи спирали содержали комплементарные, повторяющиеся n раз триплеты. Каждая из цепей затем служила матрицей для синтеза полирибонуклеотида с помощью РНК-полимеразы.

Таким образом, Корана получил две цепи, имитирующие мРНК с известной последовательностью повторяющихся триплетов. Обе цепи вводились в бесклеточную систему, и определялось включение аминокислоты в полипептидную фракцию по методу Ниренберга. Эти элегантные опыты позволили проверить шесть кодонов в одном многостадийном синтезе в соответствии со схемой



Полимер $(ГАА)_n$ содержит кодоны ГАА, ААГ и АГА, а полимер $(УУЦ)_n$ — кодоны УУЦ, УЦУ и ЦУУ. Так как функциональность гомополимеров $(ААА)_n$, $(ЦЦЦ)_n$, $(ГГГ)_n$ и $(УУУ)_n$ уже определена, для проверки остальных 60 кодонов нужно провести 10 таких многостадийных синтезов.

Приведем установленный Ниренбергом с сотрудниками и Кораной с сотрудниками кодонно-аминокислотный словарь (табл. 9.3), а также обратный аминокислотно-кодонный словарь (табл. 9.4).

Нуклеотиды расположены в последовательности букв А, Ц, Г, У, совпадающей с латинским алфавитом.

Кодоны ГУГ (Вал) и АУГ (Мет) кодируют указанные аминокислоты в середине цепи мРНК. Вместе с тем они служат

Таблица 9.3

Кодонио-аминокислотный словарь

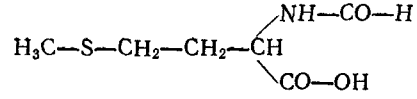
1. ААА	Лиз	17. ЦАА	Гли	33. ГАА	Глу	49. УАА	—
2. ААЦ	Асн	18. ЦАЦ	Гис	34. ГАЦ	Асп	50. УАЦ	Тир
3. ААГ	Лиз	19. ЦАГ	Глн	35. ГАГ	Глу	51. УАГ	—
4. ААУ	Асн	20. ЦАУ	Гис	36. ГАУ	Асп	52. УАУ	Тир
5. АЦА	Тре	21. ЦЦА	Про	37. ГЦА	Ала	53. УЦА	Сер
6. АЦЦ	Тре	22. ЦЦЦ	Про	38. ГЦЦ	Ала	54. УЦЦ	Сер
7. АЦГ	Тре	23. ЦЦГ	Про	39. ГЦГ	Ала	55. УЦГ	Сер
8. АЦУ	Тре	24. ЦЦУ	Про	40. ГЦУ	Ала	56. УЦУ	Сер
9. АГЦ	Арг	25. ЦГА	Арг	41. ГГА	Гли	57. УГА	—
10. АГЦ	Сер	26. ЦГЦ	Арг	42. ГГЦ	Гли	58. УГЦ	Цис
11. АГГ	Арг	27. ЦГГ	Арг	43. ГГГ	Гли	59. УГГ	Три
12. АГУ	Сер	28. ЦГУ	Арг	44. ГГУ	Гли	60. УГУ	Цис
13. АУА	Иле	29. ЦУА	Лей	45. ГУА	Вал	61. УУА	Лей
14. АУЦ	Иле	30. ЦУЦ	Лей	46. ГУЦ	Вал	62. УУЦ	Фен
15. АУГ	Мет	31. ЦУГ	Лей	47. ГУГ	Вал	63. УУГ	Лей
16. АУУ	Иле	32. ЦУУ	Лей	48. ГУУ	Вал	64. УУУ	Фен

Таблица 9.4

Аминокислотно-кодонный словарь

1. Ала	ГЦА, ГЦЦ, ГЦГ, ГЦУ	12. Лиз	ААА, ААГ
2. Арг	АГА, АГГ, ЦГА, ЦГЦ, ЦГГ, ЦГУ	13. Мет	АУГ
		14. Про	ЦЦА, ЦЦЦ, ЦЦГ, ЦЦУ
3. Асн	ААЦ, ААУ	15. Сер	АГЦ, АГУ, УЦА, УЦЦ, УЦГ, УЦУ
4. Асп	ГАЦ, ГАУ		
5. Вал	ГУА, ГУЦ, ГУГ, ГУУ	16. Тир	УАЦ, УАУ
6. Гис	ЦАЦ, ЦАУ	17. Тре	АЦА, АЦЦ, АЦГ, АЦУ
7. Гли	ГГА, ГГЦ, ГГГ, ГГУ	18. Три	УГГ
8. Глн	ЦАА, ЦАГ	19. Фен	УУЦ, УУУ
9. Глу	ГАА, ГАГ	20. Цис	УГЦ, УГУ
10. Иле	АУА, АУЦ, АУУ		
11. Лей	ЦУА, ЦУЦ, ЦУГ, ЦУУ, УУА, УУГ		

инициаторами синтеза цепи, кодируя на ее N-конце формилметионин



Если искусственная матрица этих кодонов не содержит, то синтезируются цепи, начинающиеся с произвольного звена и имеющие поэтому различные N-концы. Напротив, при наличии ГУГ или АУГ образуются стандартные формилметониновые N-концы. Корана показал, что Поли-УГ образует цепь Формилмет — (Цис — Вал)$_n$. Однако в природных белках формилметионин не содержится. В бесклеточной системе *E. coli* образуются

цепи с N-концами Формилмет — Ала, Формилмет — Сер —, но не Формилмет — Мет —. Естественные белки *E. coli* имеют обычно на N-концах Мет, Ала, Сер. Можно думать, что в живых системах действуют два фермента, один из них отщепляет Формилмет от цепи, другой — формильную группу от Мет (см. статьи Циндера и др. в [107]). Кодоны УАА («охра»), УАГ («янтарь») и УГА не кодируют никаких аминокислот, на них белковая цепь обрывается. Это — терминальные кодоны. Корана установил, что синтез полипептида не идет на матрицах $(ГАУА)_n$ и $(ГУАА)_n$. Последние содержат много нефункциональных триплетов.

Установленный таким образом код подтверждается множеством фактов (см. [5, 7]).

Еще до расшифровки кода Суеока исследовал корреляцию состава тотального белка бактерий с составом их ДНК [108] Суеока нашел для 16 аминокислотных остатков линейную зависимость их содержания в белках от содержания ГЦ в ДНК. При этом аминокислотные остатки разделяются на три группы. Для остатков первой группы их содержание растет с увеличением Г + Ц и коэффициент корреляции b велик. Для остатков второй группы их содержание практически не зависит от концентрации Г + Ц и b близко к нулю. Для остатков третьей группы их содержание убывает с увеличением Г + Ц. Эти результаты хорошо объясняются кодовым словарем, что показано в табл. 9.5 [1, 109].

Универсален ли генетический код? Действуют ли аналогичным образом одинаковые кодоны в различных организмах? Ответ на этот вопрос положителен. Поли-У стимулирует включение Фен в полипептидную цепь в бесклеточных системах, полученных из клеток млекопитающих и водорослей. То же относится к другим синтетическим полинуклеотидам (см. [5]). Тринуклеотидная техника Ниренберга была применена к бесклеточным системам, полученным из клеток амфибии *Xenopus laevis* и морской свинки, и привела к тем же результатам [110]. Меняется, по-видимому, лишь относительное участие различных кодонов для одной и той же аминокислоты, но кодовый словарь остается тем же, что и для *E. coli*.

Универсальность кода в сущности доказывается размножением фагов и вирусов в клетках. Вирусная ДНК или РНК использует биосинтетический аппарат клетки и синтезирует свои белки. Белок закодирован нуклеиновой кислотой вируса, а «бесклеточная система» — иная.

Методы, развитые Кораной, позволили решить проблему синтеза гена. Корана провел химический синтез последовательности дезоксинуклеотидов, комплементарной к известной последовательности рибонуклеотидов в Ала-тРНК дрожжей [111].

Была получена двуспиральная ДНК, т. е. ген, кодирующий синтез этой тРНК. Синтез первой цепи ДНК осуществлялся присоединением олигонуклеотидов к растущей последовательности при участии ферментов ДНК-лигаз и АТФ в качестве источника энергии. Вторая цепь получалась в редупликационном синтезе (см. стр. 585).

Таблица 9.5

Корреляция содержания аминокислотных остатков в белке с содержанием Г + Ц в ДНК

Амино-кислотный остаток	Коэффициент корреляции	Кодоны	Число Г + Ц в кодонах	Средняя доля Г + Ц в кодонах
		Группа 1, $b>0$		
Ала	0,164	ГЦА, ГЦЦ, ГЦГ, ГЦУ	2, 3, 3, 2	0,83
Арг	0,089	АГА, АГГ, ЦГА, ЦГЦ ЦГГ, ЦГУ	1, 2, 2, 3 3, 2	0,72
Гли	0,051	ГГА, ГГЦ, ГГГ, ГГУ	2, 3, 3, 2	0,83
Про	0,024	ЦЦА, ЦЦЦ, ЦЦГ, ЦЦУ	2, 3, 3, 2	0,83
Среднее	0,082		2, 39	0,79
		Группа 2, $b\approx0$		
Вал	0,008	ГАУ, ГУЦ, ГУГ, ГУУ	1, 2, 2, 1	0,50
Тре	0,000	АЦА, АЦЦ, АЦГ, АЦУ	1, 2, 2, 1	0,50
Лей	—0,006	ЦУА, ЦУЦ, ЦУГ, ЦУУ УУА, УУГ	1, 2, 2, 1 0, 1	0,39
Гис	—0,010	ЦАЦ, ЦАУ	2, 1	0,50
Сер	—0,017	АЦГ, АГУ, УЦА, УЦЦ УЦГ, УЦУ	2, 1, 1, 2 2, 1	0,50
Среднее	—0,005		1, 41	0,47
		Группа 3, $b<0$		
Мет	—0,024	АУГ	1	0,33
Фен	—0,040	УУЦ, УУУ	1, 0	0,17
Тир	—0,047	УАЦ, УАУ	1, 0	0,17
Глу Глн	—0,052	ГАА, ГАГ ЦАА, ЦАГ	1, 2 1, 2	0,50 0,50
Асп Асн	—0,053	ГАЦ, ГАУ ААЦ, ААУ	2, 1 1, 0	0,50 0,17
Лиз	—0,084	ААА, ААГ	0, 1	0,17
Иле	—0,098	АУА, АУЦ, АУУ	0, 1, 0	0,11
Среднее	—0,057		0, 83	0,28

Расшифровка генетического кода — крупнейшее достижение молекулярной биологии, биохимии и биофизики. От постановки задачи до ее решения прошло лишь 10 лет — срок очень малый.

Установление кода выдвинуло новые проблемы.

Имеет ли генетический словарь физический, молекулярный смысл или корреляция между кодонами и аминокислотами совершенно случайна? Что можно сказать об эволюции кода в этой связи? Какие факторы влияют на чтение кода, на процессы транскрипции и трансляции? Что и как искажает код? Каковы физико-химические причины мутаций?

Код есть программа трансляции. Чрезвычайно важно понять условия реализации этой программы. Молекулярные механизмы ответственны за кинетику взаимодействия антикодонов с кодонами, за действие рибосом и ацилирующих ферментов. Сегодня мы почти ничего не знаем об этих механизмах и еще не располагаем физической теорией чтения кода (см. § 9.8).

§ 9.7. ФИЗИЧЕСКИЙ СМЫСЛ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА

Генетически кодируется только первичная структура белка. Однако биологические функции определяются его пространственным строением. Первичная структура и пространственное строение однозначно связаны (см. § 4.9). Тем самым, генетически закодированы пространственное строение и биологическая функция белка. В то же время естественный отбор идет не по первичной, а по пространственной структуре — по биологическому поведению.

Различные мутационные замещения по-разному сказываются на строении белка. Из изложенного в § 4.6 следует, что мутации, сильно изменяющие гидрофобность аминокислотного остатка, должны сильнее сказываться на биологических свойствах белка, чем мутации, мало меняющие гидрофобность. Первый тип мутаций более опасен для существования вида, чем второй. Можно думать, что генетический код построен природой таким образом, чтобы обеспечить преимущество мутациям первого типа. Нужно выявить эти особенности кода.

Такая формулировка проблемы содержалась в работах [112], где было показано, что код обладает большой надежностью по отношению к неблагоприятным заменам полярных аминокислотных остатков на неполярные и наоборот. Между аминокислотами и кодонами имеется осмысленная корреляция (см. также [113]).

Прежде всего следует установить, какой характер имеют мутационные аминокислотные замещения. Мы уже видели, что внутренние аминокислотные остатки в гемоглобине и миоглобине варьируют, но остаются неполярными (см. стр. 232).

Марголиаш обратил внимание на постоянство расположения полярных (основных) и неполярных остатков в цитохроме *с* позвоночных пяти видов [114]. В связи с этим Марголиаш писал: «... является ли такое эволюционное постоянство следствием давления отбора на структурные особенности цитохрома или, хотя бы частично, результатом генетической изменчивости ... Это вопрос, на который сейчас нельзя ответить». Анализ кодового словаря дает искомый ответ [112, 115].

Уже отмечалось, что последовательность остатков вблизи активного центра гемоглобинов подчиняется той же закономерности. Бóльшая часть природных мутантов гемоглобина человека характеризуется сохранением класса аминокислоты — чаще всего в мутантах полярная аминокислота заменяется на полярную. И во многих других случаях бóльшая часть мутаций такова, что класс аминокислоты сохраняется.

Наблюдаемая ситуация может иметь два объяснения. Во-первых, «неправильные» мутации, меняющие класс аминокислоты, могут быть настолько опасны для функции белка, что они элиминируются естественным отбором. Эти мутации летальны и поэтому не наблюдаются. Во-вторых, сам генетический код может быть устроен таким образом, что он обеспечивает преимущества для правильных мутаций. Рассмотрим подробно вторую возможность.

Как мы видели (см. стр. 229), гидрофобность аминокислотного остатка может быть оценена, согласно Тенфорду, количественно — изменением свободной энергии ΔF при переносе аминокислоты из C_2H_3OH в воду (см. табл. 4.11). Вычислим среднюю разность величин ΔF при произвольном замещении любого остатка на любой — без учета различной встречаемости остатков, пользуясь данными табл. 4.11. По всем 20 аминокислотам $\Delta\Delta F = 1280$ *кал/моль*. В пределах условно введенных первого и второго классов — гидрофобных аминокислот (первые 10) и гидрофильных аминокислот (вторые 10) средние разности равны 805 и 392 *кал/моль* соответственно.

Представим словарь кодонов, обозначаемых *xyz*, квадратной таблицей (рис. 9.13). На рисунке заштрихованы гидрофобные остатки. Характерно, что при У на втором месте кодона (y = У) остаток всегда гидрофобен. При замене одного из нуклеотидов в кодоне *xyz* получается следующее распределение «правильных» и «неправильных» мутаций:

Замена	120 «правильных»	74 «правильных»	156 «правильных»
x	y		z
64 «неправильных»	102 «неправильных»		20 «неправильных»

Всего 350 (т. е. 66,5%) «правильных» замен и 176 (33,5%) «неправильных». Вероятность «правильной» мутации вдвое больше, чем вероятность «неправильной».

Вычислим средние разности ΔF для однократных замещений нуклеотидов. Получаем (в *кал/моль*)

при замене x 1000, y 1280, z 340.

В среднем по всем трем нуклеотидам имеем 870 *кал/моль*, что существенное меньше величины 1280 *кал/моль* для случайного замещения аминокислот. Средняя разность степеней гидрофобности исходной и замещающей аминокислот для 70 мутанов человеческого гемоглобина составляет 834, средняя разность для шести цитохромов *с* (безпозвоночных и позвоночных) 900, средняя разность для мутантов триптофансинтетазы А [116] 1030 *кал/моль*. Процент «правильных» замещений в этих трех случаях соответственно равен 57,0%, 56,3% и 61,3%. Анализ 423 замещений при сопоставлении шести гомологичных белков различных видов (цитохром *с*, гемоглобины α и β, инсулины *А* и В, ферредоксин [117]) дает среднее значение разности степеней гидрофобности, равное 772 *кал/моль*. Все эти данные удовлетворительно согласуются с кодовой таблицей.

x \ y	А	Ц	Г	У	z
А	Лиз	Тре	Арг	Иле	А
	Асн	Тре	Сер	Иле	Ц
	Лиз	Тре	Арг	Мет	Г
	Асн	Тре	Сер	Иле	У
Ц	Глн	Про	Арг	Лей	А
	Гис	Про	Арг	Лей	Ц
	Глн	Про	Арг	Лей	Г
	Гис	Про	Арг	Лей	У
Г	Глу	Ала	Гли	Вал	А
	Асп	Ала	Гли	Вал	Ц
	Глу	Ала	Гли	Вал	Г
	Асп	Ала	Гли	Вал	У
У	—	Сер		Лей	А
	Тир	Сер	Цис	Фен	Ц
	—	Сер	Три	Лей	Г
	Тир	Сер	Цис	Фен	У

Рис. 9.13. Таблица генетического кода.

Наиболее опасно замещение среднего нуклеотида *у*. Оно приводит к наибольшим изменениям гидрофобности. Наименее опасно замещение *z*.

Эта закономерность выражает физический смысл кодового словаря. Преимущество «правильных» мутаций определяется пространственным строением белка в водном окружении и, тем самым, особыми физическими свойствами воды. Таким образом, корреляция кодонов с аминокислотами продиктована физикой воды. Код обладает высокой, хотя и не абсолютной, надежностью по отношению к «неправильным» мутациям.

Ичас указывает, что и слишком большая, и слишком малая частота мутаций эволюционно невыгодны, необходима промежуточная оптимальная частота [5]. Если мутабильность,

определяемая кодом, ниже оптимальной, то изложенная аргументация до некоторой степени обесценивается. Однако мы ничего еще не знаем об оптимальной мутабильности, и нет оснований думать, что код ей не соответствует. Указанная его помехоустойчивость является несомненным фактом.

Молекулярный механизм, определяющий корреляцию кодонов и аминокислот, заключен в ацилирующем ферменте, обеспечивающем присоединение надлежащей аминокислоты к надлежащей тРНК, т. е. корреляцию между антикодоном тРНК и аминоациладенилатом.

По-видимому, фермент чувствителен как к аминокислоте, так и к структуре тРНК как целого. Мы еще очень мало об этом знаем. Не исключено, что фермент обладает аллостерическими свойствами (см. § 7.5).

Румер отметил, что 16 дублетов xy можно сгруппировать в два октета так, чтобы в первом октете содержались дублеты xy, которые однозначно, независимо от z, определяют кодируемый остаток, а во втором октете — дублеты xy, кодирующие одни остатки при $z =$ пурин, а другие при $z =$ пиримидин (табл. 9.6) ([118], ср. [119]).

Таблица 9.6

Система кодонов

Первый октет					Второй октет					
z=А, Г, У, Ц					z=У, Ц	z=А, Г				
x	y	остаток	группа	n	остаток	x	y	остаток	группа	n
Ц	Ц	Про	I	6	Фен	У	У	Лей	I	4
Ц	У	Лей	I	5	Иле	А	У	Иле z = А Мет z = Г	I	4
Г	У	Вал	I	5	Цис	У	Г	— z = А Трн z = Г	II I	5
Ц	Г	Арг	II	6	Тир	У	А	—	I	4
Г	Ц	Ала	II	6	Гис	Ц	А	Глн	I II	5
А	Ц	Тре	II	5	Аси	А	А	Лиз	II I	4
У	Ц	Сер	II	5	Асп	Г	А	Глу	II	5
Г	Г	Гли	II	6	Сер	А	Г	Арг	II	5

Группа I — гидрофобные, II — гидрофильные остатки.

Дублеты xy первого и второго октета резко различаются по составу. В первом октете А встречается только один раз, во втором Ц присутствует один раз. В первом октете и для x и для y $\frac{Г+Ц}{А+У}=3$, во втором $\frac{Г+Ц}{А+У}=\frac{1}{3}$.

В последних столбцах левой и правой сторон таблицы приведены числа n водородных связей между нуклеотидами xy кодона и комплементарными нуклеотидами $x'y'$ антикодона. Значения n (можно назвать эту величину степенью комплементарности) в первом октете равны 6 и 5, во втором 5 и 4. Можно думать, что при $n = 6$ взаимодействие $z - z'$ кодона и антикодона не имеет существенного значения, так как связь $xy - x'y'$ достаточно прочна и обеспечивает необходимую комплементарность. Поэтому кодоны первого октета «безразличны» к z. В этом случае возможны 16 сочетаний кодон — антикодон, при которых одна и та же аминокислота включается в белковую цепь и отвечает любым z и z' при фиксированных xy и, следовательно, $x'y'$. Если в первом октете $n = 5$, то возможно, что взаимодействие $z - z'$ уже играет некоторую роль в обеспечении комплементарности, и число допустимых сочетаний кодон — антикодон может оказаться меньше 16, но больше 4. Из сказанного, конечно, не следует, что все мыслимые сочетания встречаются в природе. Было бы интересно экспериментально определить число различных антикодонов, т. е. различных тРНК, отвечающих данной аминокислоте, и, конечно, число соответствующих кодонов. Возможно, что опыт действительно покажет наличие бо́льшего числа антикодонов и кодонов для тех аминокислот первого октета, для которых $n = 6$, и меньшего их числа для $n = 5$. Мутационные замещения z в кодонах мРНК могут заметно отличаться по эффективности для $n = 6$ и $n = 5$.

Таблица 9.7

Образование пар третьим нуклеотидом антикодона

Нуклеотид антикодона z'	Нуклеотиды кодона, соединяющиеся с z'	Нуклеотид антикодона z'	Нуклеотиды кодона, соединяющиеся с z'
У	А, Г	Г	У, Ц
Ц	Г	И	У, Ц, А
А	У		

Во втором октете существен тип последнего нуклеотида — пурин это или пиримидин. При $n = 5$ максимальное число сочетаний кодон — актикодон, отвечающее одной и той же аминокислоте, равно восьми (если z' не фиксировано). При $n = 4$ связи $z - z'$, надо думать, фиксированы однозначно, и это число равно двум.

Крик охарактеризовал свойства третьего нуклеотида антикодона гипотезой «виляний» (wobbles) [120]. В то время как комплементарное спаривание кодон — антикодон по первым двум нуклеотидам актикодона $x'y'$ стандартно и однозначно, нуклеотид z' связывается с z кодона неоднозначно. Анализ возможных структур образующихся пар приводит к результатам, суммированным в табл. 9.7.

x \ y	А	Ц	Г	У
А	Лиз Асн Лиз (2) Асн	Тре (1)	Арг Сер Арг (2) Сер	Иле Иле Мет (2) Иле
Ц	Глн Гис Глн (2) Гис	Про (1)	Арг (1)	Лей (1)
Г	Глу Асп Глу (2) Асп	Ала (1)	Гли (1)	Вал (1)
У	— Тир — (2) Тир	Сер (1)	— Цис Три (2) Цис	Лей Фен Лей (2) Фен

Рис. 9.14. Таблица дублетов.

Эти результаты подтверждаются опытом. Неоднозначность спаривания $z — z'$ имеет структурное объяснение. Минорный нуклеотид, инозин И, фигурирующий в антикодоне, особенно полифункционален.

На рис. 9.14 представлена таблица дублетов xy, указывающая кодоны первого и второго октетов (*1* и *2*) и распределение гидрофобных аминокислот (штриховка).

Корреляция кодонов с аминокислотами имеет прямое отношение к эволюции кода. Если современный код оптимален по отношению к мутациям, нарушающим пространственную структуру белка, то можно думать, что код возник в результате биохимической эволюции. Однако мы не располагаем пока серьезными аргументами в пользу оптимальности кода, за исключением его помехоустойчивости по отношению к неправильным мутациям.

Как отмечает Везе, существенны не столько ошибки в трансляции, сколько биологическая значимость этих ошибок [121]. Везе предполагает, что код примитивной клетки был весьма неоднозначен, различал не отдельные аминокислоты, но их «функциональные» или «нефункциональные» группы. В дальнейшем код совершенствовался таким образом, чтобы свести ошибки при трансляции и их влияние к минимуму. Имеется и ряд других спекулятивных соображений (см. [5, 7]). Крик подверг эти гипотезы критике, отметив невозможность их экспериментальной проверки [122]. Сегодня установлены важные особенности кода,

раскрыта осмысленная корреляция кодонов с аминокислотами, но о происхождении кода и его эволюции можно высказывать лишь более или менее обоснованные гипотетические соображения (ср. [57]).

§ 9.8. ТРАНСЛЯЦИЯ

Основные физические проблемы, связанные с синтезом белка на полисоме, состоят в определении механизмов точного узнавания кодоном антикодона, образования пептидной связи и перемещения рибосомы вдоль мРНК.

Узнавание кодоном антикодона весьма точно — ошибки составляют сотые доли процента [123]. Точное спаривание не может обеспечиваться термодинамическими факторами — разностями энергий различных пар. Исходя из квантовомеханических расчетов горизонтальных и вертикальных взаимодействий между триплетами кодона и антикодона, Нинио пришел к выводу о неизбежности большой неоднозначности узнавания [124]. Неоднозначность должна увеличиваться и за счет «виляний». Ошибочные антикодоны часто мало отличаются от правильных по энергии взаимодействия. Энергии взаимодействия ГУГ и ЦАЦ и ЦЦЦ разнятся лишь на 2,1 *ккал/моль*. Пытаясь преодолеть эту трудность, Нинио предложил гипотезу существования лишних триплетов — антикодоны, приводящие к большой неоднозначности (например, АЦГ, АЦЦ, ИЦЦ), просто не существуют.

Эта гипотеза противоречит общим представлениям молекулярной биофизики. Трансляция — не термодинамически равновесное состояние, но кинетический процесс, идущий с участием фермента, роль которого играет рибосома. В трансляции обеспечено и точное узнавание и оптимальный темп чтения мРНК. Поэтому существенна не только термодинамика, но и кинетика узнавания — разные антикодоны тРНК могут взаимодействовать с кодонами мРНК с различной скоростью, определяемой структурой и свойствами как молекул тРНК в целом, так и рибосом.

Везе предложил гипотетические модели узнавания, учитывающие свойства рибосом [125]. Узнавание не сводится к спариванию кодона с антикодоном. Кодон читается дважды — рибосомой и тРНК. Первое чтение приблизительное, рибосома различает не все буквы кодона, но вследствие своих аллостерических свойств допускает взаимодействие лишь определенных тРНК с кодоном. Модель, тем самым, предполагает существование классов тРНК, различаемых рибосомой. Существенна не только структура антикодона, но и структура молекулы тРНК в целом. Предположительно существуют ключевые звенья тРНК, расположенные рядом с антикодоном.

Структуры тРНК подлежат физической классификации. Рибосома испытывает конформационное изменение под действием кодона. Опыт показывает, что состояние рибосомы сильно влияет на точность трансляции. Такое влияние оказывают мутации рибосомальных белков [126]. На определяющую роль конформаций рибосом указывают и исследования *in vitro* трансляции мРНК, содержащей галогенированные основания. При этом совершаются ошибки в чтении первого нуклеотида кодона [7].

Везе полагает, что тРНК также испытывает конформационное превращение при взаимодействии с рибосомой, а затем с мРНК и моделирует это превращение. Трансляция есть аллостерический процесс.

Экспериментально показано, что трансляция действительно зависит от конформации мРНК. В работе [127] РНК фага $R17$ инкубировалась в присутствии Mg^{++}, а затем вводилась в качестве матрицы в бесклеточную систему *E. coli*. Инкорпорация Фен и Гис в белок и количество синтезируемого белка оказывались иными, чем в случае применения РНК, не инкубированной с Mg^{++}. Эти изменения нельзя объяснить деградацией РНК, так как они исчезают при надлежащей обработке РНК. В описанной ситуации происходит синтез трех белков. Последовательность их синтеза зависит от конформационного состояния РНК.

Спирин разработал наглядную модель работы рибосомы [87, 128]. Гипотеза исходит из того, что аминоацил — тРНК-связывающий участок и пептидил — тРНК-связывающий участок локализуются на двух разных субъединицах. Постулируется, что мРНК-связывающий и тРНК-связывающий участки локализованы на контактирующих внутренних поверхностях двух субъединиц и что 70*S*-рибосома периодически переходит из сомкнутого в разомкнутое состояние и обратно. При смыкании двух субъединиц сближаются пептидил — тРНК и аминоацил — тРНК и образуется пептидная связь, при размыкании происходит поступление нового комплекса аминоацил — тРНК в рибосому и выход из рибосомы деацилированной тРНК. Периодическое размыкание и смыкание субчастиц рибосомы есть приводной механизм, обеспечивающий все пространственные перемещения тРНК и мРНК в процессе трансляции [87]. Периодическое изменение четвертичной структуры рибосомы преобразуется в поступательное движение цепи мРНК (см. рис. 9.12). Смыкание субчастиц индуцируется поступлением в рибосому аминоацил — тРНК, размыкание тербует энергии расщепления ГТФ.

Гипотеза Спирина конкретизирует представление о конформационном изменении рибосомы и дает наглядное объяснение ряда фактов. Однако количественная физическая теория молекулярного механизма работы рибосом не построена. Для этого

пока нет данных — недостаточны сведения о структуре рибосом и тРНК, недостаточно изучена кинетика биосинтеза.

Эксперимент показывает, что активный рибосомный комплекс действительно испытывает при трансляции периодические конформационные изменения. Согласно работе [129] в синхронизованной системе, содержащей Поли-У, субъединицы рибосом *E. coli* и очищенные трансферные факторы, образование активного комплекса происходит в несколько этапов:

$$\text{Поли-}У + 30S \rightleftarrows [\text{Поли-}У\text{—}30S],$$

$$[\text{Поли-}У\text{—}30S] + \text{НО—Фен—тРНК} \rightleftarrows [30S],$$

$$[30S] + 50S \longrightarrow [60S],$$

$$[60S] + [\text{Фен—тРНК—}T_n\text{—ГТФ}] \longrightarrow [70S] + T_n + \text{ГДФ} + Ф,$$

где [ ] — обозначают активную форму, T_n — трансферный фактор, Ф — фосфат. Превращения исследовались методом седиментации и электрофореза. Установлено, что активный комплекс проходит цикл сжатия и расширения при добавлении каждого комплекса аминоацил — тРНК. Связывание аминоацил — тРНК, катализируемое трансферным фактором T_n, создает стабильную компактную 70*S*-конформацию, трансляция при посредстве *G*-фактора расширяет рибосому, переводя ее в менее устойчивую 60*S*-форму. Образованию первой пептидной связи предшествует транслокация. Эти факты согласуются с моделью инициирования цепи без инициирующего фактора. Деацилированная Фен — тРНК, связанная рибосомой, вызывает транслокацию с участием *G*-фактора и ГТФ как только комплекс [60*S*] переходит в [70*S*]-форму вследствие связывания Фен — тРНК.

Гаврилова и Спирин показали, что рибосома может «работать» и без участия макроэргического вещества — ГТФ [130]. В той же работе установлено, что парахлормеркурибензоат (ПХМБ) активирует способность рибосом *E. coli* синтезировать полифенилаланин в присутствии Поли-У и Фен — тРНК в отсутствие белковых факторов трансляции и ГТФ. ПХМБ модифицирует 30*S*-субъединицу. Трансляция, как и в нормальном синтезе, подавляется некоторыми антибиотиками и SH-соединениями. По-видимому, способность к трансляции заложена в самой структурной организации рибосомы (см. также [131]). ПХМБ блокирует какую-то или какие-то SH-группы, вызывая структурные изменения, позволяющие рибосоме работать без каталитических факторов и ГТФ. Блокирование SH-группы раскрывает потенциальную способность рибосомы к «неэнзиматической» транслокации.

Кинетика синтеза белка на полисомах исследовалась в ряде работ. Время, необходимое для синтеза белковой цепи обычного размера (400 остатков), составляет около 30 *сек*. Рибосомы, синтезирующие белковые цепи, движутся вдоль мРНК от 5′-

к 3′-концу. Время τ прохождения рибосомой среднего расстояния δ между двумя рибосомами, равного, согласно данным седиментационного анализа и электронной микроскопии, 90 нуклеотидам, составляет примерно 3 *сек*, что отвечает линейной скорости порядка 10^{-6} *см/сек*. Кинетика синтеза изучается по скорости включения меченной C^{14} аминокислоты в белковую цепь (см., например, [132]).

Кинетическая теория трансляционного синтеза на полисоме дана в работе [133]. Были получены кривые зависимости количества включенной аминокислоты от времени для полисом, содержащих разные количества рибосом. Теоретические кривые хорошо согласуются с опытными, полученными в работе [132]. Однако эта теория не учитывает деградации мРНК, происходящей под действием еще неизученной экзонуклеазы. Время жизни мРНК составляет примерно 40 *сек*.

В работах [134—136] развита теория, учитывающая деградацию мРНК. Следуем работе Сингха [135]. Предполагается, что рибосомы присоединяются к 5′-концу мРНК, экзонуклеаза действует так же, начиная с 5′-конца. Рибосома защищает конечный участок мРНК от деградации. При перемещении рибосомы 5′-конечный участок либо деградирует, либо присоединяет новую рибосому. Деградировавший конец уже не может присоединить рибосому, но ранее присоединенные рибосомы, находящиеся впереди, продолжают двигаться, синтезируя белок.

Для случайного процесса вероятность того, что 5′-конец просуществует время t, равна $\exp(-kt)$. Число молекул белка, синтезированных полисомами P_1, $P_2, \ldots, P_{n-1}$, содержащими $1, 2, \ldots, (n-1)$ рибосом, за время $(n-1)\tau$ составляет

$$(1-\exp(-k))+2\exp(-k)(1-\exp(-k))+\ldots$$
$$\ldots+(n-1)\exp[-(n-2)k](1-\exp(-k)). \quad (9,4)$$

В этом выражении время исчисляется в единицах τ. Число молекул белка, синтезированных полисомой P_n за время $t\to\infty$, равно

$$\exp[-(n-1)k]+\exp(-nk)+\ldots\to\infty+$$
$$+(n-1)(1-\exp(-k))(\exp[-(n-1)k]+$$
$$+\exp(-nk)+\ldots+\infty). \quad (9,5)$$

Суммируя (9.4) и (9.5), получаем полное число белковых молекул, синтезируемых на одной цепи мРНК за бесконечное время,

$$N=\frac{1}{1-e^{-k}}. \quad (9,6)$$

Для стабильной мРНК $k = 0$, $N \to \infty$, для весьма нестабильной $k \to \infty$, $N \to 1$.

Сведения о деградации мРНК основываются на наблюдаемой скорости распада меченых цепей. Можно считать, что распад определяется случайной инактивацией 5′-конца мРНК, за которой следует ее ступенчатая деградация со скоростью, определяемой перемещением рибосомы. Если мечены цепи мРНК длиною $(n-1)\delta$, то число единиц длины δ, уцелевших к моменту $(n-1)\tau$, равно

$$M_0 = (1 - \exp(-k))[\exp(-k) + 2\exp(-2k) + \\ + 3\exp(-3k) + \ldots + (n-2)\exp[-(n-2)k] + \\ + (n-1)\exp[-(n-1)k] = \frac{\exp(-k)(1-\exp[-(n-1)k])}{1-\exp(-k)}. \quad (9,7)$$

Число единиц в любой последующей момент времени t равно

$$M_t = \frac{\exp[-(t+1)k](1-\exp[-(n+t-1)k])}{1-\exp(-k)},$$

и доля единиц длиной δ, доживших до t, составляет

$$f = M_t/M_0 = \frac{\exp(-kt)(1-\exp[-(n+t-1)k])}{1-\exp[-(n-1)k]}. \quad (9,8)$$

При $n \gg 1$ получим $f = \exp(-kt)$.

Реальная ситуация зависит от относительных скоростей транскрипции и трансляции. Согласно [137] первая происходит значительно быстрее. Напротив, Стент считает эти две скорости соизмеримыми [138]. Корреляция между длинами меченых мРНК и полисом, а также отсутствие свободных меченых мРНК свидетельствует в пользу второй возможности.

Теория позволяет, таким образом, вычислить распределение размеров мРНК. Седиментационный анализ меченых бактериальных мРНК дает широкую область радиоактивности от 4 до 30*S* с пиком от 8 до 12*S*. Теория Сингха предлагает сходное распределение.

В работе [136] детально проанализированы экспериментальные данные. Наблюдаемый седиментационный профиль быстромеченой бактериальной РНК не обязательно выражает распределение размеров интактной мРНК. Пик 8—12*S* зависит от скорости трансляции, времени жизни мРНК и продолжительности процесса внесения метки. Модель предсказывает, что положение пика сдвигается в сторону бóльших значений S с увеличением длительности этого процесса, пока не достигает стационарного значения, определяемого скоростью трансляции и временем жизни РНК. Теоретические кривые хорошо согласуются с экспериментальными.

Эта стохастическая теория не исчерпывает проблемы. Необходимо установить молекулярные механизмы работы рибосом, действия макроэргов (ГТФ), работы экзонуклеаз (дальнейшие подробности, относящиеся к механизму трансляции, см. в работе [14]).

§ 9.9. МУТАЦИИ

Изменения наследственной программы — мутации происходят либо спонтанно, либо под влиянием мощных внешних факторов: химических или радиационных воздействий, на хромосомы. Видимые под микроскопом хромосомные мутации, т. е. перестройки хромосом, означают изменение надмолекулярных структур, точечные или генные мутации в ДНК означают изменение молекулярной первичной структуры.

Вопросы мутагенеза уже не раз затрагивались в предыдущем изложении.

Сейчас изучен ряд мутационно измененных белков, в частности мутанты белка ВТМ, щелочной фосфатазы *E. coli*, триптофансинтетазы *E. coli* и т. д. [107]. В ряде случаев удалось установить прямую корреляцию между изменениями нуклеотидов и соответствующими изменениями аминокислотных остатков. Разумно различать три типа точечных мутаций: а) мутации, изменяющие смысл кодона (missense mutations) и вызывающие поэтому замену аминокислотного остатка в белке, б) мутации, превращающие осмысленный кодон в бессмысленный УАА, УАГ, УГА (nonsense mutations) и обрывающие белковую цепь; в) делеции и включения, т. е. мутации сдвига рамки (см. стр. 557).

Спонтанные генные мутации определяются ошибками, возникающими вследствие теплового движения атомов и молекул при редупликации ДНК. Очевидно, что ошибки при транскрипции и трансляции не наследуются.

Редупликация ДНК — стохастический процесс, в котором не могут быть полностью исключены шумы.

Включение некомплементарного матричному нуклеотида или делеция приводит, по-видимому, к образованию петли (см. стр. 499). В последующих поколениях вследствие полуконсервативного синтеза петля исчезает, но первичная структура ДНК остается измененной. Главная трудность при физико-химической трактовке таких ошибок связана с необходимостью выявить относительную роль термодинамических и кинетических факторов.

Из элементарных соображений следует, что замена пары А — Т на Г — Ц термодинамически выгодна. Можно рассчитать термодинамическую вероятность такой замены [139]. Если бы все сводилось к термодинамике, то в ходе эволюции должно было бы увеличиваться относительное содержание Г + Ц в ДНК.

Это противоречит опыту — у высших организмов содержание Г + Ц стабилизовано на уровне 40—45%. Вычисленные термодинамические вероятности образования различного рода петель (10^{-2}—10^{-4}) значительно больше опытных (у бактерий число мутаций на ген на поколение не превышает 10^{-5}—10^{-7}).

Для редупликации существенна как термодинамика, так и кинетика матричного синтеза. Появление ошибочного нуклеотида в цепи в результате добавления, замены или делеции определяются и темпом процесса, т. е. в конечном счете поведением ДНК-полимеразы, катализирующей редупликационный синтез ДНК. Если синтез идет прерывно, согласно Оказаки (см. стр. 547), то существенны кинетические условия и при репликации отрезков ДНК, и при их объединении в общую цепь.

Результаты мутационных шумов дают материал для естественного отбора на молекулярном и организменном уровне и, тем самым, находятся под мощным воздействием отбора. Отбор создал современный генетический код с его вырождением, сильно уменьшающим опасность ошибок, т. е. уменьшающим вероятность мутации белка. Особенности кода в смысле его помехоустойчивости к наиболее опасным мутациям, рассмотрены выше.

Очевидно, что эволюционное образование «Г + Ц-организма», выгодное с точки зрения термодинамики, невозможно, так как триплеты, не содержащие А и Т (А и У в мРНК), кодируют только Про, Арг, Ала и Гли, т. е. лишь $^1/_5$ всех аминокислот. Естественный отбор — биологический фактор, и он существенно ограничивает мутации, совместимые с жизнью, ограничивает роль термодинамических и кинетических факторов.

Возможность включения ошибочного нуклеотида в растущую цепь ДНК определяется прежде всего его связыванием данным локусом матрицы. Образование пары, отличной от уотсон-криковской, может в свою очередь определяться таутомерией нуклеотида и его способностью создавать необычные водородные связи (см. стр. 502). Фриз считал таутомерию главной причиной мутаций [140].

Некоторые производные азотистых оснований обладают высокой мутагенной активностью (химический мутагенез). Таковы, в частности, 5-бромурацил (БУ) и 2-аминопурин (АП). При синтезе ДНК *in vitro* БУ включается вместо Т. По-видимому, БУ может образовать пару с А, если он фигурирует в обычной кето-форме, а в более редкой енольной форме БУ имитирует Ц и образует пару с Г (рис. 9.15). В первом случае происходит ошибка включения во время редупликации. Во втором случае происходит ошибка редупликации — цепь ДНК, уже содержавшая БУ, образует в этом месте не пару БУ — А (что исправило бы ошибку включения: А — БУ → А, БУ → А — Т, БУ — А → А — Т, БУ, А → А — Т, БУ — А, А — Т и т. д.), но пару

БУ — Г вследствие таутомерного превращения БУ [141]. Вероятность такого превращения в присутствии атома Br увеличена.

Очевидна важность квантовохимических расчетов таутомерии азотистых оснований. Наряду с таутомерией существенное значение для мутагенеза может иметь образование пар, отличных от уотсон-криковских вследствие иного расположения водородных связей (см. стр. 502).

Все, что мы знаем о ДНК, заставляет думать о кооперативной природе мутагенеза. Азотистые основания взаимодействуют и «горизонтально» и «вертикально». Любая ошибка при редупликации означает изменение этих взаимодействий. Следовательно, вероятность мутации в данном локусе ДНК должна зависеть от соседних пар оснований. Эта идея была выдвинута для объяснения «горячих точек», наблюдавшихся при изучении мутабильности локуса *r* II фага Т4 [141, 142]. Главная трудность при трактовке частот прямых и обратных мутаций связана с тем, что мы не знаем, какой вырожденный кодон находится в данном месте ДНК. Однако определение аминокислотного состава ряда ревертантов «амбер-мутантов» (т. е. результатов мутаций, приводящих к бессмысленному кодону УАГ) в белке головки фага Т4 показало, что замены пар оснований в различных локусах цистрона происходят с разными вероятностями [143]. Мутации ЦАА → УАА в локусе *r* II фага Т4 индуцируются NH_2OH с частотами, меняющимися в 20 раз в зависимости от локуса ДНК [144]. Сходные факты обнаружены при ультрафиолетовой реверсии этих мутаций [145]. Все приведенные выше факты могут объясняться и тем, что вероятности мутаций внутри цистрона зависят от направления репликации гена, близости контрольных, регулирующих элементов и т. д. Однако Кох получил прямые доказательства влияния соседних пар оснований на мутагенез [146].

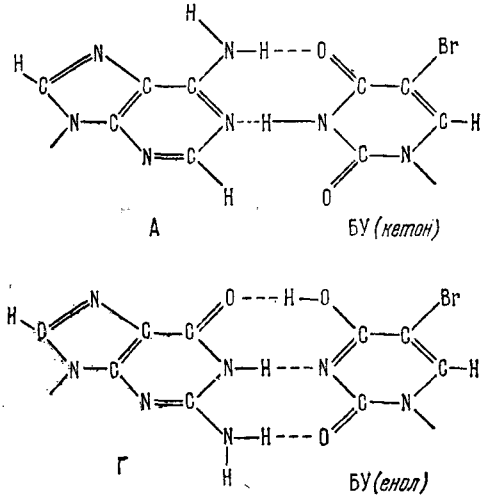
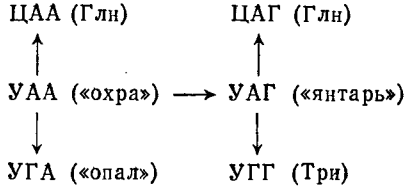


Рис. 9.15. Пары БУ—А и БУ—Г.

Обрывающие цепь кодоны «янтарь» УАГ и «охра» УАА превращаются друг в друга при замене третьего нуклеотида. Частоты мутаций первых двух нуклеотидов УАА и УАГ можно из-

мерить в локусе *r* II фага Т4. Мутаген *А* II вызывает *транзиции* (т. е. замены пурина на пурин или пиримидина на пиримидин), но не *трансверсии* (т. е. замены пурина на пиримидин и наоборот) [147]. Кох идентифицировал генотипы ревертантов, возникающих в локусе *r* II фага Т4 под действием АП. Схему этих мутаций можно записать следующим образом:



Оказалось, что частоты транзиций первых двух нуклеотидов кодона зависят от природы третьего нуклеотида и резко возрастают при замене пары А — Т на Г — Ц.

Механизм этой кооперативности еще совершенно не изучен. Физика спонтанного и химического мутагенеза не развита, ее построение требует детальной расшифровки структуры ДНК-полимеразы и выяснения механизма ее действия. Богатый материал, относящийся к молекулярному механизму мутаций, приведен в обзоре [148] и в монографии [147].

Наряду с аналогами азотистых оснований сильными химическими мутагенами являются азотистая кислота (см. стр. 558), диэтилсульфат $(C_2H_5)_2SO_4$, вызывающий этилирование Г и его последующее удаление из ДНК, гидроксиламин NH_2OH, взаимодействующий с Ц с образованием соединения, имитирующего Т. Найдены особо сильные мутагены — NN′-нитрозонитрогуанидин, акридиновые соединения азотистого аналога иприта и т. д.

Ряд веществ, в частности антибиотиков, оказывает сильное влияние на трансляцию кода. Речь идет не о мутагенах в собственном смысле слова. Изучение их действия важно в связи с проблемами молекулярной регуляции биологических процессов.

Литература

1. *М. В. Волькенштейн*, Молекулы и жизнь, «Наука», 1965.
2. *Д. Уотсон*, Молекулярная биология гена, «Мир», 1967.
3. *J. Gamow*, Nature **173**, 318 (1954); Kgl. Dansk. Videnskab. Selskab. Biol. Medd. **22**, 1 (1954).
4. *Г. Гамов, А. Рич, М. Икас*, в сб. «Вопросы биофизики», ИЛ, 1957.
5. *М. Ичас*, Генетический код, «Мир», 1971.
6. *R. Wall*, Nature **193**, 1268 (1962).
7. *C. Woese*, The genetic code, Harper a. Row, 1967.
8. *F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, R. Watts-Tobin*, Nature **192**, 1227 (1961).
9. *S. Benzer*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **45**, 1607 (1959); **47**, 403 (1961).
10. *E. Terzaghi* a. o., Proc. Nat. Acad. Sci. US **56**, 500 (1966).

11. *H. Wittmann*, Z. Vererbungslehre **93**, 491 (1962).
12. *R. Eck*, J. Theor. Biol. **2**, 139 (1962).
13. *Н. В. Лучник*, Труды Инст. биол. АН СССР, Уральский филиал, вып. 37, 1963.
14. *Л. Л. Киселев, В. Г. Никифоров, О. Б. Астаурова, Б. П. Готтих, А. А. Краевский*, Молекулярные основы биосинтеза белков, «Наука», 1971.
15. *А. А. Спирин, А. Н. Белозерский, Н. В. Шугаева, В. Ф. Ванюшин*, Биохимия **22**, 744 (1957).
16. *А. Н. Белозерский, А. С. Спирин*, Nature **182**, 111 (1958); Progr. Nucleic Acids Res. a. Mol. Biol. **3**, 147 (1960).
17. *H. Fraenkel-Conrath*, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 147 (1960).
18. *A. Gierer, G. Schramm*, Nature **177**, 702 (1956).
19. *Г. Френкель-Конрат, В. Сингер, Р. Вильямс*, в сб. «Химические основы наследственности», ИЛ, 1960.
20. *E. Volkin, L. Astrachan*, Virology **2**, 149, 433 (1956).
21. *Э. Волкин*, в сб. «Молекулярная генетика», «Мир», 1964.
22. *F. Gross* a. o., Cold Spring Harbor Symposia **26**, 111 (1961).
23. *J. Hurwitz, J. August*, Progr. Nucleic Acids Res. a. Mol. Biol. **1**, 59 (1963).
24. *B. Hall, S. Spiegelman*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **47**, 137 (1961).
25. *S. Spiegelman*, Sci. Amer. **210**, № 5, 48 (1964).
26. *M. Hoagland, E. Keller, P. Zamečnik*, J. Biol. Chem. **218**, 345 (1956).
27. *А. Майстер*, в сб. «Современные проблемы биофизики», т. 2, ИЛ, 1962.
28. *М. Хогленд*, в сб. «Современные проблемы биохимии», ИЛ, 1961.
29. *H. Temin, S. Mizutani*, Nature **226**, 1211 (1970).
30. *S. Mizutani, D. Boettiger, H. Temin*, Nature **228**, 424 (1970).
31. *S. Spiegelman* a. o., Nature **228**, 430 (1970).
32. *E. Skolnik, E. Rands, S. Aaronson, G. Todaro*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **67**, 1789 (1970).
33. *E. Skolnik, S. Aaronson, G. Todaro, W. Parks*, Nature **229**, 318 (1971).
34. *С. М. Гершензон* и др., Исследование возможности передачи генетической информации от РНК к ДНК при репродукции вирусов ядерного полиэдроза, «Наукова думка», Киев, 1971.
35. *D. Anthony, D. Goldthwait*, Biochim. Biophys. Acta **205**, 156 (1970).
36. *A. Travers, R. Burgess*, Nature **222**, 537 (1969).
37. *J. Roberts*, Proc. First Intern. Repetit. Colloq. Florence Nov. 1969, p. 208.
38. *Ю. Н. Косаганов* и др., Nature, New Biology **231**, 212 (1971).
39. *W. Szybalski* a. o., J. Cell Physiol. **74**, Suppl. 1 (1969), p. 33.
40. *R. Langridge*, J. Cell Physiol. **74**, Suppl. 1 (1969), p. 3.
41. *W. Rüger*, Biochim. Biophys. Acta **238**, 202 (1971).
42. *В. Л. Флорентьев, В. И. Иванов*, Nature **228**, 519 (1970).
43. *E. Geiduschek, E. Brody, D. Wilson*, in «Molecular Associations in Biology», Acad. Press, 1968.
44. *P. Riley*, Nature **228**, 522 (1970).
45. *M. Hoagland, P. Zamečnik, M. Stephenson*, Biochim. Biophys. Acta **23**, 215 (1957).
46. *K. Ogata, H. Nohara*, Biochim. Biophys. Acta **25**, 659 (1957).
47. *R. Holley, G. Everett, J. Madison, A. Zamir*, J. Biol. Chem. **240**, 2122 (1965).
48. *Р. Холли*, в сб. «Молекулы и клетка», вып. 3, «Мир», 1968.
49. *А. А. Баев* и др., Мол. биол. **1**, 754 (1967).
50. *Г. Б. Завильгельский, Т. В. Венкстерн, А. А. Баев*, ДАН СССР **166**, 978 (1966).
51. *Г. Б. Завильгельский, Л. Ли*, Мол. биол. **1**, 323 (1967).
52. *Т. В. Венкстерн*, Первичная структура транспортных нуклеиновых кислот, «Наука», 1970.

53. *В. Г. Туманян, Л. Е. Сотникова, А. В. Холопов*, ДАН СССР **166**, 1465 (1966).
54. *В. Г. Туманян*, в сб. «Нуклеиновые кислоты», «Медицина», 1966.
55. *В. Г. Туманян, Л. Е. Сотникова*, Биофизика **12**, 5 (1967).
56. *I. Tinoco, O. Uhlenbeck, M. Levine*, Nature **230**, 362 (1971).
57. *М. Эйген*, Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул, «Мир», 1973.
58. *J. Fresco, A. Adams, R. Ascione, D. Henley, T. Lindahl*, Cold Spring Harbor Symposia **31**, 527 (1966).
59. *J. Fresco, T. Lindahl, D. Henley*, Federation Proc. **27**, 796 (1968).
60. *S. Kim, A. Rich*, Science **162**, 1381 (1968); **166**, 1621 (1969).
61. *A. Hampel* a. o., Science **162**, 1384 (1968).
62. *J. Fresco, R. Blake, R. Langridge*, Nature **220**, 1285 (1968).
63. *S. Kim, G. Quigley, F. Suddath, A. Rich*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **68**, 841 (1971).
64. *A. Rosenfeld, C. Stevens, M. Priatz*, Biochemistry **9**, 4971 (1970).
65. *M. Lanborg, P. Zamečnik, T. Li, J. Kagi, B. Vallee*, Biochemistry **4**, 63 (1965).
66. *T. Samejima, J. Yang*, J. Biol. Chem. **240**, 2094 (1965).
67. *P. Sarin, P. Zamečnik, P. Bergquist, J. Scott*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **55**, 579 (1966).
68. *F. Wolfe, K. Oikawa, C. Kay*, Biochemistry **7**, 3361 (1968).
69. *Г. Б. Завильгельский, А. Д. Мирзабеков, А. И. Полетаев, А. А. Баев*, Мол. биол. **6**, 231 (1972).
70. *А. И. Полетаев*, Мол. биол. **7**, 84 (1973).
71. *H. Hashizume, K. Imahory*, J. Biochem. (Tokyo) **61**, 738 (1967).
72. *А. И. Полетаев* и др., в сб. «Конформационные изменения биополимеров в растворах», «Наука», 1973.
73. *G. Melcher, D. Paulin, W. Guschelbauer*, Biochemie **53**, 43 (1971).
74. *S. Englander, J. Englander*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **53**, 370 (1965).
75. *S. Nishimura, G. Novelli*, Biochim. Biophys. Acta **80**, 574 (1964).
76. *S. Nishimura, F. Harada, V. Narushima, T. Seno*, Biochim. Biophys. Acta **142**, 133 (1967).
77. *N. Kalenbach*, J. Mol. Biol. **37**, 445 (1968).
78. *D. Henley, T. Lindahl, J. Fresco*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **55**, 191 (1966).
79. *А. Н. Суровая, О. Ф. Борисова, Т. Юлаева, В. Шейнкер, Л. Л. Киселев*, FEBS, Letters **8**, 201 (1970).
80. *R. Beardsley, C. Kantor*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **65**, 39 (1970).
81. *С. Н. Трубицын, А. Н. Суровая, О. Ф. Борисова*, Мол. биол. **5**, 419 (1971).
82. *D. Abraham*, J. Theor. Biol. **30**, 83 (1971).
83. *А. А. Баев, И. Фодор, А. Д. Мирзабеков, В. Д. Аксельрод, Л. Я. Казаринова*, Мол. биол. **1**, 859 (1967).
84. *А. Д. Мирзабеков, Д. Грюнбергер, А. А. Баев*, Biochim. Biophys. Acta **166**, 68 (1968).
85. *А. Д. Мирзабеков, Л. Я. Казаринова, А. А. Баев*, Мол. биол. **3**, 879 (1969).
86. *А. Д. Мирзабеков, Л. Я. Казаринова, Д. Ластить, А. А. Баев*, Мол. биол. **3**, 909 (1969).
87. *А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова*, Рибосома, «Наука», 1971.
88. *A. Tissières, J. Watson*, Nature **182**, 778 (1958).
89. *M. Hamilton, M. Petermann*, J. Biol. Chem. **234**, 1441 (1959).
90. *А. С. Спирин*, J. Mol. Biol. **2**, 436 (1960); Биохимия **26**, 511 (1961).
91. *А. С. Спирин*, Некоторые проблемы макромолекулярной структуры нуклеиновых кислот, Изд-во АН СССР, 1963.

92. *D. Schlessinger, G. Mangisrotti, D. Apirion*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **58**, 1782 (1967).
93. *А. С. Спирин, Н. А. Киселев, Р. С. Шакулов, А. А. Богданов*, Биохимия **28**, 920 (1963).
94. *Л. П. Гаврилова, М. И. Лерман, А. С. Спирин*, Изв. АН СССР, сер. биол. **7**, 826 (1966).
95. *Л. П. Гаврилова, Д. А. Иванов, А. С. Спирин*, J. Mol. Biol. **16**, 473 (1966).
96. *А. С. Спирин, Н. В. Белицина*, J. Mol. Biol. **15**, 282 (1966).
97. *А. С. Спирин, М. И. Лерман, Л. П. Гаврилова, Н. В. Белицина*, Биохимия **31**, 424 (1966).
98. *K. Nosokawa, R. Fujimura, M. Nomura*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **55**, 198 (1966).
99. *P. Traub, M. Nomura*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **59**, 777 (1968); J. Mol. Biol. **40**, 391 (1969).
100. *М. Номура*, в сб. «Молекулы и клетка», вып. 5, «Мир», 1970.
101. *M. Bretscher, K. Marcker*, Nature **211**, 380 (1966).
102. *J. Watson*, Bull. Soc. Chim. Biol. **46**, 1399 (1964).
103. *М. Ниренберг, Г. Маттеи*, Труды 5-го Международного биохим. конгресса, Симпозиум I, Изд-во АН СССР, 1962, стр. 211.
104. *H. Khorana*, Federation Proc. **24**, 1473 (1965).
105. *M. Nirenberg* a. *o.*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **53**, 1161 (1965).
106. *D. Jones, S. Nishimura, H. Khorana*, J. Mol. Biol. **16**, 454 (1966).
107. The Genetic Code, Cold Spring Harbor Symposia **31** (1966).
108. *N. Sueoka*, Cold Spring Harbor Symposia **26**, 35 (1961); Proc. Nat. Acad. Sci. US **48**, 582 (1963).
109. *М. В. Волькенштейн*, Биофизика **8**, 394 (1963).
110. *R. Marshall, T. Caskey, M. Nirenberg*, Science **155**, 180 (1967).
111. *N. Gupta* a. *o.*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **60**, 1338 (1968).
112. *М. В. Волькенштейн*, Генетика, № 2, 54 (1965); № 4, 119 (1966); Biochim. Biophys. Acta **119**, 421 (1966).
113. *C. Woese, D. Dugre, W. Saxinger, S. Dugre*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **55**, 966 (1966).
114. *E. Margoliash*, Canad. J. Biochem. **42**, 745 (1964).
115. *М. В. Волькенштейн*, Физика ферментов, «Наука», 1967.
116. *C. Yanofsky, C. Ito, K. Horn*, Cold Spring Harbor Symposia **31**, 151 (1966).
117. *M. Dayhoff, R. Eck*, Atlas of Protein Sequence and Structure 1967—1968. Nat. Biomed. Res. Found, Silver Spring, 1968.
118. *Ю. Б. Румер*, ДАН СССР **167**, 1394 (1966); **183**, 225 (1968).
119. *М. В. Волькенштейн, Ю. Б. Румер*, Биофизика **12**, 10 (1967).
120. *F. Crick*, J. Mol. Biol. **19**, 548 (1966).
121. *C. Woese*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **54**, 1546 (1965).
122. *F. Crick*, Cold Spring Harbor Symposia **31**, 3 (1966).
123. *W. Szer, S. Ochoa*, J. Mol. Biol. **8**, 323 (1964).
124. *J. Ninio*, J. Mol. Biol. **56**, 63 (1971).
125. *S. Woese*, J. Theor. Biol. **26**, 83 (1970); Nature **226**, 817 (1970).
126. *R. Rosset, L. Gorini*, J. Mol. Biol. **39**, 95 (1969).
127. *H. Fukami, K. Imahori*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **68**, 570 (1971).
128. *А. С. Спирин*, ДАН СССР **179**, 1467 (1968).
129. *M. Schreier, H. Noll*, Nature **227**, 128 (1970); Proc. Nat. Acad. Sci. US **68**, 805 (1971).
130. *Л. П. Гаврилова, А. С. Спирин*, Мол. биол. **6**, 311 (1972).
131. *Л. П. Гаврилова, В. В. Смолянинов*, Мол. биол. **5**, 883 (1971).
132. *H. Noll, T. Staehelin, F. Wettstein*, Nature **198**, 632 (1963).
133. *М. В. Волькенштейн, С. Н. Фишман*, ДАН СССР **160**, 1407 (1965).
134. *R. Parker, T. Linkoln*, J. Theor. Biol. **15**, 218 (1967).
135. *U. Singh*, J. Theor. Biol. **25**, 444 (1969).
136. *U. Singh, R. Gupta*, J. Theor. Biol. **30**, 603 (1971).

137. *O. Maaloe, N. Kjeldgaard*, in «Control of Macromolecular Synthesis», W. Beujamin Inc., 1966.
138. *G. Stent*, in «Mendel Centennial Symposium», Royal Soc., 1965.
139. *М. В. Волькенштейн, А. М. Ельяшевич*, ДАН СССР **136**, 1216 (1961).
140. *Э. Фриз*, Труды 5-го Международного биохим. конгресса, Симпозиум I, Изд-во АН СССР, 1962, стр. 231.
141. *S. Benzer, E. Freese*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **44**, 112 (1958).
142. *S. Benzer*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **47**, 403 (1961).
143. *A. Stretton, S. Kaplan, S. Brenner*, Cold Spring Harbor Symposia **31**, 173 (1966).
144. *S. Brenner, A. Stretton, S. Kaplan*, Nature **206**, 994 (1965).
145. *F. Sherman, J. Stewart, M. Cravens, F. Thomas, N. Shipman*, Genetics **61**, 55 (1969).
146. *P. Koch*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **68**, 773 (1971).
147. *J. Drake*, The Molecular Basis of Mutation. Holden Day Inc., 1970.
148. *Э. Фриз*, в сб. «Молекулярная генетика», «Мнр», 1964.
149. *Р. Ш. Бибилашвили, В. И. Иванов, Л. Е. Минченкова, Л. П. Савочкина*, Biochim. Biophys. Acta **259**, 35 (1972).
150. *I. Tinoco* a. o., Nature, New Biology **246**, 40 (1973).
151. *S. Kim* a. o., Proc. Nat. Acad. Sci. US **69**, 3746 (1972); Science **281**, 3322 (1973).
152. *В. Г. Туманян*, в сб. «Итоги науки и техники. Молекулярная биология», т. 2, ВИНИТИ, 1973.
153. *T. Sekiya, H. Khorana*, Proc. Nat. Acad. Sci. US **71**, 2978 (1974).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой книге изложена, конечно, не исчерпывающим образом, — молекулярная биофизика, т. е. физика белков и нуклеиновых кислот, биологических макромолекул. Понимание их строения и свойств основывается на уже установленных физических принципах, достаточных для дальнейшего развития молекулярной биофизики.

Клетка, организм представляют собой молекулярные, т. е. химические машины, функционирующие на основе точно сбалансированных взаимодействий нейтральных молекул и ионов. Эти взаимодействия реализуются в открытых системах и определяют термодинамическое сопряжение химических реакций с транспортом вещества. В клетку и из клетки переносятся нейтральные молекулы, ионы и электроны.

Для возникновения и существования биосферы необходим приток энергии. В конечном счете источником жизни на Земле является Солнце.

Фотосинтез трансформирует энергию солнечного света в химическую. Химическая энергия, запасенная прежде всего в АТФ, используется для всех нужд живой системы.

Работа такой системы — молекулярной машины — организована посредством прямых и обратных информационных потоков, посредством молекулярной сигнализации. В живой системе сигналами, их источниками, приемниками и преобразователями служат молекулы и надмолекулярные структуры. Узнавание сигнала определяется многоточечными слабыми взаимодействиями, имеющими кооперативный характер. В этой книге рассмотрен ряд явлений молекулярного узнавания — взаимодействие фермент — субстрат, взаимодействие комплементарных нуклеотидов, реализуемое в двойной спирали ДНК, в транскрипции, а также в трансляции (т. е. взаимодействие кодона с антикодоном). К тем же явлениям относится взаимодействие антитела с антигеном, в этой книге не рассмотренное.

Биологическая специфика процессов молекулярного узнавания определяется макромолекулярной структурой основных биологически функциональных веществ — белков и нуклеиновых кислот. Важнейшее физическое свойство макромолекулы — ее

гибкость — определяет существование белковой глобулы, обладающей индивидуализированным строением, существование молекулярного апериодического кристалла. Удаленные друг от друга по цепи аминокислотные остатки оказываются пространственно сближенными в глобуле и образуют активный центр молекулы фермента или антитела. Сочетание фиксированного строения глобулы в целом с локальной подвижностью участков цепи обеспечивает динамическое поведение белковых молекул, ответственное за их биологические свойства. Функция белка — фермента является химической, иными словами, фермент организует перестройку электронных оболочек соответствующих субстратов. Вследствие электронно-конформационных взаимодействий такая перестройка происходит в результате конформационных превращений белка. Различные кофакторы, среди которых важная роль принадлежит системам с сопряженными π-связями, принимают непосредственное участие в ЭКВ и, тем самым, регулируют поведение белка.

Рассмотрение ЭКВ только начато в этой книге. Дальнейшее развитие таких представлений, теоретическое и экспериментальное исследование ЭКВ — одна из наиболее актуальных задач молекулярной биофизики. Здесь особенно перспективным представляется изучение ферментов, содержащих в качестве кофакторов атомы переходных металлов. О металлоферментах коротко рассказано в § 6.8. Электронные оболочки переходных металлов являются «мягкими» в том смысле, что для их перестройки требуются сравнительно малые энергии — речь идет о d-электронах. Соответственно координационные связи, образуемые атомом переходного металла, зависят от окружающей среды. Известно явление так называемой *дисторсионной изомерии* — существования комплексов переходных металлов в изомерных формах, разнящихся длинами связей и углами между связями. Конформационная перестройка белковой структуры, образующей координационную систему переходного металла, может сильно воздействовать на строение такой системы. Тем самым, в этих случаях непосредственно реализуются электронно-конформационные взаимодействия. Их изучение требует развития соответствующих разделов квантовой химии. Научная идеология этой области та же, что в современной неорганической химии, и поэтому законно считать исследования металлоферментов, а также любых комплексов биополимеров с металлами, относящимися к *бионеорганической химии*.

Дальнейшее развитие физики белка пойдет, очевидно, в направлении построения общей теории гетерополимерной глобулы с ее статистическими, динамическими и топологическими особенностями. Такое построение уже начато в работах Лифшица, кратко изложенных в §§ 3.5 и 4.7 книги. Изучение строения и

свойств глобулярной макромолекулы, а также изучение ЭКВ в глобуле должно дать ответы на основные вопросы, стоящие перед физикой ферментов.

Строение и свойства других важнейших биополимеров — нуклеиновых кислот — существенно отличны от строения и свойств белков. Это различие выражает принципиальную разницу биологических функций. Можно сказать, что функция белков — исполнительная, в то время как функция нуклеиновых кислот — законодательная, поскольку она сводится к участию в синтезе белка. В конечном счете главный молекулярный процесс, лежащий в основе всей биологии, — *матричный синтез биополимеров*, реализуемый в транскрипции и трансляции (а также в обратной транскрипции). Физические основы этих явлений описаны в книге. Однако мы ограничились рассмотрением простейших модельных процессов, реализуемых в бесклеточных системах, и не затрагивали *процессы регуляции матричного синтеза*, т. е. регуляции действия генов. Очевидно, что клеточная дифференцировка, морфогенез и онтогенез в целом не могли бы реализоваться без такой регуляции. В самом деле, в любой соматической клетке многоклеточного организма наличествует тот же геном, что и в исходной зиготе, но функции соматических клеток различны, так как в них синтезируются разные белки. Регуляция действия генов осуществляется на молекулярном уровне в системе *оперона* у прокариотов или *транскриптона* у эукариотов. Рассмотрение этих систем выходит за рамки книги.

Для регуляторных биомолекулярных систем характерны нелинейные соотношения между обобщенными силами и потоками. Яркий пример нелинейного поведения — кооперативные свойства аллостерических ферментов. Именно вследствие нелинейности, присущей химико-диффузионным системам, далеким от равновесия, в клетках и организмах возникают колебательные и волновые процессы и оказываются возможными процессы развития.

Как индивидуальное развитие организма, так и эволюционное развитие в целом, в конечном счете определяются сложными нелинейными молекулярными процессами. Мы вправе говорить о молекулярных основах эволюции. С одной стороны, эволюционные взаимосвязи между биологическими структурами прослеживаются вплоть до молекулярного уровня — устанавливаются закономерные гомологии в первичной структуре однотипных белков разных видов (цитохром *c*, гемоглобин и т. д.). С другой стороны, сделаны первые шаги в построении молекулярной теории эволюции. Эйген предложил теорию эволюции и самоорганизации макромолекул, дающую принципиальное модельное истолкование естественного отбора в добиологической системе. Исходное понятие этой теории, имеющее, как уже сказано, фун-

даментальное значение для всей биологии, — матричный синтез биополимера.

В свете современного развития науки стало очевидным истинное содержание так называемой «антиэнтропийности» жизни. Ранее подчеркивалась высокая упорядоченность клетки организма. Но упорядочены и кристаллы. «Антиэнтропийность», если уж пользоваться этим понятием, выражается в ограниченной применимости понятия энтропии (и соответственно эквивалентного понятия количества информации) к живой системе. Будучи динамической, «машинной», а не статистической системой, живой организм следует, конечно, законам термодинамики, но должен описываться в иных терминах. Развитию организма отвечают очень малые изменения энтропии. Для «информационной» трактовки явлений жизнедеятельности понятие о количестве информации бесплодно. В биологии существенно не количество, а качество информации, ее программирующее значение, ее ценность. Так, в теории Эйгена в качестве характеристики, определяющей молекулярную селекцию и эволюцию, фигурирует *селективная ценность*, выражаемая через кинетические величины.

При переходе от молекулярных систем к надмолекулярным структурам живых клеток и организмов мы встречаемся со специфическими проблемами физики конденсированных сред. Биологические мембраны, сократительные системы, любые клеточные структуры имеют высоко специализированное гетерогенное строение. Во всех функциональных надмолекулярных структурах определяющую роль играют белки, взаимодействующие с другими органическими молекулами (например, с липидами в мембранах) и с различными ионами, начиная с малых ионов щелочных и щелочноземельных металлов. В гетерогенных надмолекулярных системах реализуется специальное динамическое поведение, ответственное в конечном счете за важнейшие явления жизнедеятельности. Это поведение определяется особым состоянием биологических надмолекулярных систем. Мембраны имеют жидкое или жидкокристаллическое строение, «белки плавают в липидном море». Сократительные белковые системы, ответственные за превращение химической энергии (запасенной преимущественно в АТФ) в механическую работу, т. е. системы механохимические, построены из различных фибриллярных белков, взаимодействующих друг с другом. Естественно, что внутримолекулярная и молекулярная подвижность, т. е. конформационные движения, играют главную роль в динамике надмолекулярных структур. В конечном счете электронно-конформационные или ионно-конформационные взаимодействия лежат в основе всей клеточной динамики.

Целый ряд физических проблем, изучение которых лишь начинается, возникает в связи с поведением надмолекулярных биологических систем. С еще более сложными проблемами физика встречается при переходе к клеткам и организмам.

Молекулярная биофизика служит надежной основой биофизики клетки и биофизики сложных систем. Пока лишь в немногих случаях удается «навести мосты» между молекулярной биофизикой и физикой регуляторных процессов в организме, физикой процессов развития и т. д. Тем не менее нет сомнения в том, что соответствующие проблемы будут решаться на основе представлений о строении и свойствах биологически функциональных молекул.

Молекулярная биофизика есть первая часть биофизики в целом. Дальнейшее изложение биофизики должно быть посвящено, с одной стороны, общим физическим основам биологии, с другой, — физическому рассмотрению ряда важнейших процессов, имеющих универсальный характер в живой природе. К этим процессам относятся мембранный транспорт вещества и зарядов, механохимические процессы и другие биоэнергетические явления, в частности, дыхание и фотосинтез. На основе общих представлений теоретической биофизики, развиваемых в термодинамике необратимых процессов и в нелинейной кинетике, подлежат рассмотрению разнообразные нелинейные явления в живых организмах и проблемы развития. Построение физики всех названных явлений лишь начато, но многое уже стало известным и понятным.

И молекулярная биофизика и биофизика в целом должны рассматриваться как естественные части физики — единой науки, посвященной строению и свойствам материи. Сегодня теоретические основы любой области естествознания сводятся к физике. Соответственно биофизика сливается с теоретической биологией. Однако процесс объединения физики и биологии сегодня лишь начинается.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аденозиндифосфат 86, 103—108, 114
Аденозинтрифосфат 54, 86, 103—108, 112—114, 416, 495
—, запасание энергии 103—105, 108
—, структура 86
Активность оптическая 80—82, 209, 290 и д.
— —, дисперсия 296
— — индуцированная 311—313, 319, 449
— —, теория 290—310
Аминокислоты 54—61, 65 и д.
— каионические 56—60
Амплитуда структурная 266, 270, 276
Антикодоны 506, 562, 576, 577, 581, 589, 592, 595
Апофермент 380, 410

Бактерин 486 и д.
—, трансформация 486
Барьер активационный 44, 200, 335—358, 370, 390, 401, 410
Белки 8, 9, 12, 17 и д.
—, аминокислотный состав 68—73
— глобулярные 132, 220 и д.
— —, денатурация 242—249
—, исследоваине 69 и д.
—, — люминесцентное 320—326
—, — нейтроиографическое 275
—, — рентгеноструктурное 265—276
—, молекулярный вес 68, 146, 157—167, 281—284
—, синтез 78, 103, 178, 485, 488, 553 и д.
— сократительные 176, 254
—, спектры колебательные 326—334
—, — ПМР 340, 341
—, — ЭПР 344—346
—, структура 69 и д.
—, — вторичная 183, 220, 233
—, — первичная 69, 73—78, 118, 177 и д.
—, — третичная 220, 233, 252, 253
—, — четвертичная 220, 231
— структурные 254
— фибриллярные 132, 228, 254—260
— —, денатурацня 257
— —, строение 255, 265, 276—281
—, функция 176 и д.
Биополимеры 17 и д.
—, полупроводниковая модель 109, 110, 409
Биорегуляторы 102, 110
Биотонная закономерность 16, 33

Взаимодействие ван-дер-ваальсово 190—196, 220, 503
— внутримолекулярное 501—507
— гем — гем 421, 425, 428, 447
— гидрофобное 219—230, 233, 397
— дисперсионное 191, 502, 503
— спин-орбитальное 343
— спин-решеточное 336, 337
Взаимодействне спин-спиновое 337, 339
— стабилизирующее 435
— электронно-конформационное 110, 115, 146, 178, 248, 324, 407—410, 432, 569
Вирусы 487 и д.
Витализм 11—13
Витамины 95—97
Вода 196 и д.
—, структура 202—207
—, — льдоподобная 203—207, 224, 225
Вращение внутреинее 121—127
— оптическое 291 и д.
— —, дисперсня 294
— —, — аномальная 297—320, 379, 398, 445, 449
— —, — нормальная 294, 296, 319, 445
— — магнитное 441—451
— — —, дисперсня 443
— — —, — аномальная 443—451
— — молекулярное 291
— — удельное 291, 507

Гем 99, 231, 232, 421 и д.
Гемоглобин 76, 78, 98, 100, 108, 251, 421—439, 479
—, оксигенация 234, 427—433, 437, 479
—, свойства 421—433
—, — равновесные 433—439
—, структура 231—234, 250, 251, 274
—, — четвертичная 231, 421, 428, 429
Ген 34, 484 и д.
—, механизм функционирования 484
—, синтез 587, 588
Гипохромизм 286—290, 498, 499, 503, 507, 524, 527
Гирация 293
Глобула белковая 220—224, 226 и д.
— —, линейная память 236
— —, пространственное строенне 249—254
— —, самоорганнзация 253
— —, структура 230—242, 244
— —, устойчивость 230
— —, форма 226—228
— —, ядро 226—233, 240, 251
Гормоны 100—102
— белковые 100, 101
— стероидные 101
Графы 462
—, теория 462—473
Группы простетическне 94, 98, 100 и д.

Двойное лучепреломление 112—167
— — круговое 290, 292, 439, 440
Демон Максвелла 33
Дихроизм 332
— круговой 80, 292, 296—320, 380, 381, 445, 449, 498, 499
— — магнитный 441—451

Дихронизм круговой, теория 313—315
— линейный 499
ДНК 82 и д.
—, взаимодействие внутримолекулярное 501—507
—, — с малыми молекулами 528—536
—, денатурация 498, 507, 514, 517, 538
—, —, кинетика 520—527
—, плавление 213, 507, 509
—, —, температура 213—217, 507—520, 539
—, —, теория 508—514
—, расплетание 520—524, 528—530, 539, 542
—, редупликация 484—486, 489, 495, 536—548
—, ренатурация 527
—, синтез матричный 488, 537—547, 553 и д.
—, — репарационный 547
—, структура 489—501
—, — вторичная 485, 489
—, — двуспиральная 489, 492 и д.
Дыхание 103, 105

Зигота 16, 18, 33, 34, 484

Изомерия поворотная 121, 125—127
— —, теория 130—137
Ингибитор 365 и д.
— аллостерический 453
— конкурентный 365, 376, 384, 387, 388
— неконкурентный 365, 389
— транскрипции 528
Индексы миллеровские 267, 268, 276
Интеркаляция 528, 529
Информация 16
— генетическая 178, 553, 560
—, избыточность 34, 36
—, количество 29—37, 82
—, — в цепи 75, 76
—, —, единица 30
—, передача 34—37, 452, 561
—, спиралеобразующая 251, 252
—, теория 29—37, 46
—, ценность 37, 46, 611
—, шум 35—37

Карты стерические 183—189, 234
Катализ 49, 356—360
— гетерогенный 358—360, 387
— гомогенный 358, 360
— кислотно-основный 384, 411
Кератин 254, 258—260
Кислоты нуклеиновые 8, 9, 12 и д.
— —, денатурации 489—507
— —, основные цепи 82—91
Клубок статистический 134, 139, 143—145, 160, 207, 240
— —, набухание 168
— — однонитевой 507
— —, плотность звеньев 144, 145
Код генетический 35, 47, 178, 485, 486, 553 и д.
— —, вырождение 557—560
— —, расшифровка 583—589
— —, физический смысл 589—595
Кодовое отношение 554—557
Кодон 505, 554 и д.
Коллаген 254—258
Комплекс активированный 356—360, 414
— —, время существования 357
— —, фермент-субстратный 360, 365, 374 и д.
Константа ингибирования 365, 453
— Михаэлиса 363, 364, 394, 453
Конфигурация 79, 119 и д.
Конформации 55, 110 и д.
—, перестройка 110, 127 и д.
Конформация α-спиралн 179 и д.
— β-формы 180 и д.
Конформон 409
Кооперативность 38 и д.
— косвенная 457, 459
—, модель МУШ 457, 459, 467—469
— отрицательная 468
—, параметр 210—214, 468
— поведения ферментов 455
— положительная 459, 463
— прямая 457, 459, 460, 467
Кофактор 94, 374, 376, 384, 410
Коферменты 94—97, 99, 100, 312, 378
— никотинамидные 95, 96, 103—108, 391
— флавиновые 95, 96
Коэффициент мутности 158
— трансмиссионный 357, 405—408

Лизогения 488
Липиды 91—94, 108
Люминесценция 320
—, выход квантовый 320—325
—, деполяризация 322—325

Магнетон Бора 295, 341
— ядерный 335, 336, 341
Матрицы 539, 542—547, 560 и д.
Мембраны 55
Металлоферменты 410—416
Метка спиновая 344—346
Метод ЛКАО МО 110, 111, 186
Миоглобин 76, 98, 231, 251, 410
—, свойства 421
—, — конформационные 432
—, структура 231—233, 250—254, 272, 274, 421—433
Миозин 254
Модель Изинга 40, 43, 137, 139, 141, 209, 479, 509, 539
Момент дипольный 190 и д.
— магнитный 294, 295, 302
Мутагенез 489, 503, 601
Мутагены 528
Мутации 505, 555 и д.
— сдвига рамки 557, 558, 600
— супрессорные 556
— точечные 505, 556, 558
— хромосомные 600

Наследственность 16, 484, 485
Нуклеозиды 85, 95 и д.
Нуклеотиды 54, 86, 95, 100 и д.

Олигомеры 73 и д.
Основания азотистые 82, 83, 95 и д.
— — канонические 84
— — минорные 84, 90, 570, 577
Остатки аминокислотные 54—61, 73, 226 и д.
— — гидрофильные 226—230
— — гидрофобные 226—230
— —, классификация 250—254
Отношение гиромагнитное 335

Память линейная 143—145, 178, 236, 242
Пара уотсон-криковская 492, 496, 501, 503, 524, 538, 554
Пептиды 61, 73 и д.
Переходы безызлучательные 321
— глобула-клубок 242—249
— излучательные 321
— кооперативные 38, 242, 248
— порядок-беспорядок 39, 207, 507
— — —, термодинамика 507, 518—520
— спираль-клубок 207 и д.

Переходы спираль-клубок теория 209—219
— — —, термодинамика 507—520
— фазовые 38
— — второго рода 39, 43, 219
— — первого рода 39, 218, 219, 240, 243
Плотность электронная 202, 266—273, 277, 279, 408, 447
Показатель поглощения 291, 292
— преломления 156—158, 165, 290—315, 440
— —, дисперсия 296
— —, флуктуации 157
Полиамфолиты 167
Поликонденсация 60, 86, 117 и д.
Полимеризация 117 и д.
Полимеры изотактические 119, 134, 135
—, растяжение 136, 137
— синдиотактические 119, 134, 135
Полипептиды 55, 68, 109 и д.
Полисома 563, 582, 597, 599
Полосы поглощения 199, 284 и д.
— — параллельные 329—331
— — перпендикулярные 329—331
— —, расщепление 286, 305
Поляризация 165, 286 и д.
—, вектор 294
—, степень 321
Поляризуемость 164—167, 186, 190 и д.
—, анизотропия 164—167
Постоянная Верде 439
— экранирования 338
414
Потенциал окислительно-восстановительный 414
— связывающий 437, 438
Правило Чаргаффа 89—91, 492, 495
Принцип Данкова 36
— дополнительности 14, 15
— наименьшего действия 19
— обратимости 24
Профаг 488

Радикалы свободные 342, 343
Рассеяние излучения макромолекулами 156—161, 265—274, 281—284
Расщепление давыдовское 286, 287, 332
Реакция автокаталитическая 28, 29
— гидролиза 69, 86, 112
— гликолиза 103, 104
—, кооперативность 45
— ферментативная 45, 49, 360 и д.
— —, кинетика 44, 360—367, 462—473
— —, — предстационарная 468—473
— —, — стационарная 454—457, 471
— — простая 360—367
— —, равновесие 354, 433—435
— —, —, константа 354, 356, 426, 433, 435, 466—473, 476
— —, скорость 354—373, 453—473
— —, —, константа 354—368, 379, 396, 404, 411—413, 458—479, 524
— — сложная 462—473
Резонанс Ферми 327
Релаксация 25
—, время 337, 343, 474, 477
— спин-решеточная 336, 337, 343
— спин-спиновая 337, 343
— химическая 473—479
Решетка обратная 268, 269, 279
Рибосомы 485, 561, 562, 577 и д.
—, самосборка 580
РНК 82, 485 и д.
— вирусная 90, 487, 560 и д.
— матричная 90, 485, 488, 560 и д.
— рибосомальная 90, 485, 488, 560 и д.
— синтез 560 и д.
транспортная 90, 283, 485, 488, 561, 570—577
Ротамеры 125—127, 130—142, 236

Саморепродукция 16
Самосборка 220, 577, 580
Связи водородные 110, 179, 186, 195—207 и д.
— —, энергия 199, 200
—, дипольные моменты 326
— макроэргические 103
— пептидные 60, 68 и д.
—, поляризуемости 326
—, углы поворота 122—137, 185
—, эффект орнеитации 123, 185
—, — скрещения 123, 185
Седиментация 150, 154
— в градиенте плотности 153, 154
—, константа 151, 565 и д.
Сигиатура 35
Сила ван-дер-ваальсова 186, 189—196, 221, 226
— вращательная 294, 295, 297—315, 319
— дипольная 285, 294, 297—315
— дисперсионная 191—196
— ионная 65, 167
— осциллятора 285, 287, 301
Симметрия 39
Системность 45, 46
Смесь рацемическая 79
Соотношение Кронига — Крамерса 297, 298, 445
Спектры поглощения 198, 284 и д.
— — инфракрасные 326—334
— —, теория 326
— протонного магнитного резонанса 338—340
— рассеяния комбинационного 326, 334
— электронного магнитного резонанса 334, 341—346, 374, 382
— ядерного магнитного резонанса 334—341, 376, 382
Спин ядерный 335, 336, 338, 339
Состояние неустойчивое 19—21, 28, 29, 36
— равновесия 19, 23—29
— стационарное 25—28, 36
— устойчивое 19—21
Степень спиральности 212—219, 316, 319, 397—399, 498, 499, 509, 514, 525
Структурное соответствие 359, 387, 393, 402, 563
— — индуцированное 388—391, 393, 402
— —, теория 388—391
Субстрат 360 и д.
Суммы статистические 39—46, 137—139, 206 и д.
Сфера Эвальда 268—270, 275, 276
Схема валентно-оптическая 48, 165, 326

Таутомерия 85, 202, 601, 602
Телеономия 18
Температура Кюри 41, 43, 141
Теория Дебая — Хюккеля 62—65, 169
— одноэлектронная 301, 309
— переходного состояния 355, 404
— поворотно-изомерная 127—137
— Уаймана 433, 434
Трансдукция 488
Транскрипция 528, 560—570, 599
Трансляция 564, 581, 582, 595—600

Углеводы 55, 83, 91—94, 108 и д.
Уравнение Аррениуса 354, 367
— Михаэлиса — Ментен 363, 404
— Уаймана 433, 434
— Хилла 423, 424, 435

Фаги 487 и д.
Фактор Больцмана 336
— расщепления 335, 342
— структурный 267, 275
— трансферный 580, 597

Ферменты 49, 51, 94, 312 и д.
—, активность 373, 384, 392—410
— аллостерические 51, 176, 451—461
— —, модель МУШ 457, 459, 467, 469, 477, 479
— —, обратная связь 453—455
—, свойства 387
—, — конформационные 387—416
—, — кооперативные 421—479
—, центры активные 312, 365, 374—388, 393—395, 404—413, 454
Формула Аррениуса 44
— Беккереля 441
— Дебая 160, 282
— Друде 304, 305, 318, 398
— Моффита 305, 310, 398
— Шеинова 31, 32
Фотосинтез 98, 103—108, 115
Функции связанные 438
Функция диссипации 23, 27
— насыщения 426, 433, 457—461
— Паттерсона 271, 279

Хиральность 79—82, 113, 293, 304
Хлоропласты 106
Хлорофилл 98, 103
Хроматография 69—73
Хромосома 484 и д.

Цепь белковая 73, 75, 118 и д.
— дыхательная 105
—, конформации 119 и д.
—, кооперативность 139, 184, 209
— Маркова 31, 141—143
Цепь полимерная 117 и д.
— —, гибкость 121, 127, 129, 131, 166
— полипептидная 69, 178 и д.
— α-спиральная 179 и д.
—, β-форма 180 и д.
—, эквивалентность звеньев 133
Цикл Кребса 105, 106
Цитохромы 76, 77, 98, 99, 105, 409, 414

Число оборотов 373, 385

Эволюция 12, 18, 29, 36, 51, 484
Экситон 286
Энергия 39, 44 и д.
— активации 44, 45, 325, 354, 405, 406
Энтальпия 38 и д.
Энтропия 12, 21—29, 31—37, 42 и д.
—, поток 22—29
—, продукция 22—29
Эффект Бора 425, 431, 432, 436
— гипохромный — см. гипохромизм
— динамооптический 162
— —, теория 162—166
— дополнительности 408
— Зеемана 440, 444
— Керра 165, 166
— компенсационный 370—373
— Коттона 297
— Макалузо — Корбино 443
— Мёссбауэра 424, 447
— Ми 160
— объемный 142—144
— Фарадея 439—445
— фотоэластический 166
Эффектор аллостерический 453, 456, 457, 460

Отсканировал Семенюченко Владимир
chem_vova@mail.univ.kiev.ua; vova2002@mail.ru

М. В. ВОЛЬКЕНШТЕЙН

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА