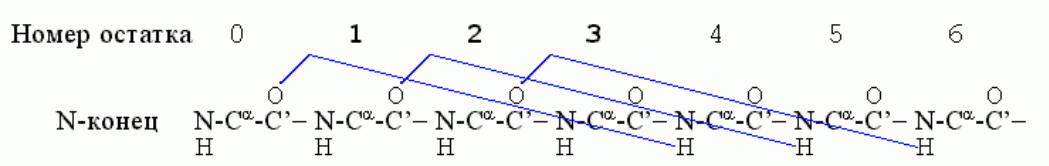
ВЛИЯНИЕ ВОДЫ НА МЕЖ И ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ. ПЕРЕХОД СПИРАЛЬ-КЛУБОК

Начнем с α-спиралей. Первая водородная связь в ней, $(CO)_0$ — $(HN)_4$, фиксирует конформации трех остатков — 1, 2, 3; следующая водородная связь, $(CO)_1$ — $(HN)_5$, дополнительно фиксирует конформацию только одного остатка — остатка 4; связь $(CO)_2$ — $(HN)_6$ дополнительно фиксирует остаток 5, и т.д.



Значит, если в спирали фиксировано *n* остатков, то их фиксирует *n*-2 водородные связи. Рассмотрим свободную энергию образования такой спирали из клубка в водном окружении ("клубок" — это полимер без структуры и без взаимодействия дальних по цепи звеньев). Эту свободную энергию можно записать как

$$\Delta F_\alpha = F_\alpha - F_{клуб.} = (n-2)f_H - nTS_\alpha = -2f_H + n(f_H - TS_\alpha) \qquad (1.1)$$

Здесь f_H — свободная энергия водородной связи в α-спирали (вы помните, что f_H — не просто энергия, как было бы в вакууме: в нее входит и энергия, и энтропия перестроек водородных связей в водном окружении), а S_α — потеря энтропии при фиксации одного остатка в спирали.

Вы видите, что в ΔF_α есть два члена. Один ($-2f_H$) не зависит от длины спирали; величина

$$f_{INIT} = -2f_H \qquad (1.2)$$

традиционно называется свободной энергией инициации спирали (на самом деле, f_{INIT} — суммарная свободная энергия обеих границ спирали с клубком — учитывает и инициацию, и терминацию спирали). Другой член, $n(f_H-TS_\alpha)$, прямо пропорционален длине спирали; величина

$$f_{EL} = (f_H-TS_\alpha) \qquad (1.3)$$

называется свободной энергией элонгации спирали на один остаток. В общем виде,

$$\Delta F_\alpha = f_{INIT} + n \cdot f_{EL}\ . \qquad (1.4)$$

При этом отношение вероятности чисто спирального состояния цепи из *n* остатков к ее же чисто клубковому (и начисто лишенному спиральных примесей)

состоянию, равно

$$\exp(-\Delta F_\alpha/kT) = \exp(-f_{INIT}/kT)\cdot[\exp(-f_{EL}/kT)]^n = \sigma s^n \qquad (1.5)$$

Здесь я использовал общепринятые обозначения:

— фактор элонгации спирали: $s = \exp(-f_{EL}/kT)$;

— фактор инициации спирали: $\sigma = \exp(-f_{INIT}/kT)$;

ясно, что $\sigma \ll 1$, так как $\sigma = \exp(-f_{INIT}/kT) = \exp(+2f_H/kT)$; а свободная энергия водородной связи — большая отрицательная величина, порядка нескольких kT.

Прежде, чем говорить о том, как экспериментально определяются величины σ и s, — выясним общий вопрос о том, как образуется спираль при изменении условий среды (температуры, растворителя и т.д.) — переходом "все-или-ничего" или постепенно?

Поначалу кажется, что такая отличная от клубка структура, как спираль, должна "вымораживаться" из него путем фазового (т.е. "все-или-ничего") перехода — как лед из воды...

Однако на этот счет есть теорема Ландау, которая гласит, что в системе, где обе фазы *одномерны*, — фазовый переход первого рода невозможен. Попытаюсь объяснить эту теорему.

Прежде всего — что значит "одномерность". Это значит, что размер границы, "стыка" фаз не зависит от размера кусков этих фаз. В этом смысле и спираль, и клубок в полимере — одномерны. Рисунок 1-1 поясняет, что граница (стык) спирали и клубка не зависит ни от длины спирали, ни от длины клубка, — в то время как поверхность, граница трехмерной фазы (например, льдинки в воде) зависит от ее размера. Соответственно, свободная энергия границы спирали и клубка не зависит от их длин, а свободная энергия поверхности трехмерной фазы растет как $n^{2/3}$ с ростом числа n вовлеченных в нее частиц.

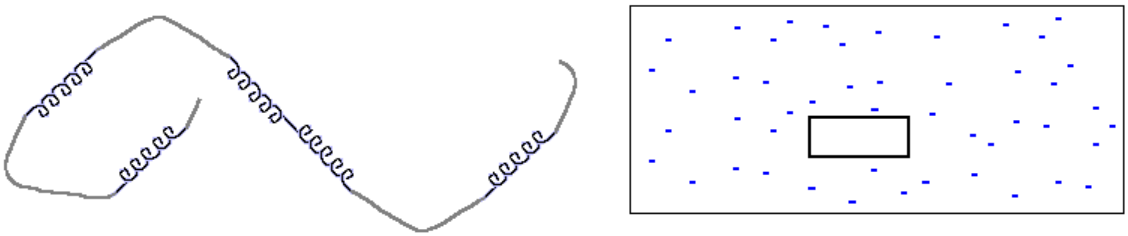


Рис.1-1. Сравнение одномерной (клубок со спиралями) и трехмерной (льдинка в воде) систем. Размер стыка спирали и клубка не зависит их длин; поверхность трехмерной льдинки зависит от ее размера.

Теперь — что значит "происходит как фазовый переход первого рода". Это значит, что при температуре перехода стабильной может быть либо одна, либо

другая фаза, но перемешивание фаз (например, льда и воды) ведет к повышению свободной энергии, и потому нестабильно. Здесь вас не должна вводить в искус картина плавающего в воде льда: при любой температуре такое состояние неустойчиво (из-за повышенной свободной энергии на границе воды со льдом), и со временем лед или растает, или охватит всю воду — конечно, если нет тока подземного тепла, течений и других неравновесных вещей...

Выгодно ли сосуществование фаз в трехмерной системе? *Нет*. Почему? Обратимся опять к Рис.1-1. Рассмотрим температуру, где безграничная вода и безграничный лед имеют равную свободную энергию (это и есть условие "точки перехода"). Если в воде плавает льдина из n молекул, свободная энергия границы пропорциональна $\xi n^{2/3}$, где $n^{2/3}$ — характерное число пограничных молекул, а $\xi>0$ — энергия границы в расчете на одну из них. (Замечание. Если $\xi<0$, "перемешивание" — оно при этом всегда термодинамически выгодно — произойдет на молекулярных масштабах, и двух фаз не будет вообще). Значит, поверхность льдинки повышает свободную энергию на $\xi n^{2/3}$. Правда, льдинка имеет еще позиционную энтропию, так как может находиться в разных точках сосуда. Но эта энтропия не превосходит величину порядка $k\cdot\ln(N)$, если в сосуде — всего N молекул (т.е. N точек, с которых может начинаться льдинка). Итого — свободная энергия льдинки — порядка $[\xi n^{2/3} - kT\cdot\ln(N)]$. Но логарифм — очень "слаборастущая" при больших N функция. Если льдинка занимает заметную часть сосуда (скажем, n~N/10), и N очень велико [скажем, 10 000 000 000], то ln(N) [в данном случае - 23] очень мал по сравнению с $(N/10)^{2/3}$ [в данном случае - с 1 000 000], — то есть в свободной энергии льдинки доминирует граничный член $\xi n^{2/3}$, а он противится ее образованию... Поэтому в трехмерной системе макроскопические фазы разделяются ("льдинки" из нескольких молекул — не в счет: это просто микроскопические, локальные флуктуации), и фазовый переход первого рода в ней возможен.

А выгодно ли сосуществование фаз в одномерной системе? *Оказывается, да*. Рассмотрим опять температуру "середины перехода", где спираль и клубок имеют равную свободную энергию, т.е. где $f_{EL}=0$. Свободная энергия обеих границ спирали и клубка, f_{INIT}, не зависит ни от размера спирали, ни от размера клубка. Позиционная энтропия спирали длины n в цепи длины N равна $k\cdot\ln(N-n)$. Итого, свободная энергия этой плавающей спирали есть $f_{INIT} - kT\cdot\ln(N-n)$. При больших N, член с $\ln(N-n)$ *всегда* доминирует в этом выражении, даже если $n \sim 0.1$ N; а этот логарифмический член понижает свободную энергию и способствует внедрению спирали в клубок (и, точно так же, — клубка в спираль)... Поэтому в одномерной системе фазы *не* разделяются, они стремятся перемешаться, — а раз так, то и фазовый переход первого рода (или типа "все-или-ничего") *не*возможен — при достаточно большой длине цепи. Теорема Ландау доказана.

Теперь можно поставить вопрос — при каких характерных длинах цепи начинается смешение клубковой и спиральной фаз?

Рассмотрим цепь из N звеньев при температуре "середины перехода", где спираль и клубок имеют равную свободную энергию, т.е. $f_{EL}=0$. При этом свободная энергия элонгации спирали (а равно и клубка) — ноль, ее инициации — f_{INIT}, а число возможных положений спирали в цепи из N звеньев — порядка $N^2/2$ (она может начинаться и кончаться в любом месте при единственном условии, что ее длина — не менее трех остатков); и ни расположение спирали в цепи, ни ее длина (при $f_{EL}=0$) не влияют на ее свободную энергию. Для получения качественной оценки — пренебрежем мелочами (цифрами) по сравнению с главным (буквами). Итак: размещений спирали — порядка N^2, т.е. их энтропия — $k \times 2\ln(N)$, а полная свободная энергия внедрения куска новой фазы (спирали с

флуктуирующими концами) в цепь длины N — примерно f_{INIT} - 2kT·ln(N). Если она, эта свободная энергия, больше нуля — новая фаза не внедрится; если она меньше нуля — новая фаза может внедриться неоднократно. Значит, смешение клубковой и спиральной фаз начинается в кусках длины N ~ n_0, а величина n_0 получается из уравнения f_{INIT} - 2kT·ln(n_0) = 0. Итак: характерная длина кусков спирали и клубка в середине перехода

$$n_0 = \exp(+f_{INIT}/2kT) = \sigma^{-1/2}. \qquad (1.6)$$

Точка (температура) середины перехода на опыте находится как та точка, где спиральность очень длинного полипептида составляет 50% (спиральность обычно измеряют при помощи КД спектров, как о том говорилось выше; при 50% спиральности КД спектр полипептида выглядит как полусумма спектров клубкообразного полипептида и полипептида, спирального на 100%). В этой точке f_{EL}=0, т.е. s = exp(-f_{EL}/kT) = 1.

Измеряя в тех же условиях (когда s=1) зависимость спиральности от длины полипептида, можно найти n_0, — как ту длину цепи, при которой ее средняя степень спиральности в 4 раза меньше, чем у очень длинной цепи (т.е. чем 50%).

Точный расчет и доказательство того, что цепь из $n_0 = \sigma^{-1/2}$ звеньев имеет именно ($^1/_4$) 50% = 12% спиральности при s=1, — выходит за рамки нашего курса. Однако получить приблизительную оценку нетрудно. В самом деле, в цепи из n_0 звеньев сумма вероятностей всех состояний, включающих α-спираль, близка — по определению — к 50%. А так как состояние "со спиралью" обычно имеет вид типа "клубок_на_одном_конце_цепи — спираль — клубок_на_другом_конце_цепи", то, в среднем, эта спираль — если она есть вообще (а вероятность этого "вообще" — 50%) — включает $^1/_3$ звеньев цепи. Итого — средняя спиральность цепи из n_0 звеньев приближенно равна 50% x ($^1/_3$) = 17%.

Наконец, зная n_0, — можно вычислить f_{INIT} и σ. Для большинства аминокислот $n_0 \approx 30$, $f_{INIT} \approx 4$ ккал/моль, и $\sigma \approx 0.001$.

Теперь мы можем найти свободную энергию образования водородной связи (вкупе со всеми сопутствующими образованию Р-связи в α-спирали взаимодействиями): согласно (1.2), $f_H = -f_{INIT}/2 \approx -2$ ккал/моль. Можно найти и конформационную энтропию, теряемую при фиксации одного звена в α-спирали: согласно формуле (1.3), $TS_\alpha = f_H \approx 2$ ккал/моль.

Оба параметра стабильности спирали — и f_{EL}, и f_{INIT} — зависят от температуры, но по-настоящему сильно влияет на стабильность спирали именно отклонение величины f_{EL} от 0. Дело в том, что в спирали, состоящей из ~n_0 звеньев, это отклонение умножается на большое число n_0 — и уже в таком виде входит в свободную энергию спирали. Когда величина f_{EL}xn_0/kT составляет порядка +1 (более точная оценка: f_{EL}xn_0/kT = +2), спиральность практически исчезает, а когда f_{EL}xn_0/kT = -2, — практически исчезает клубок. Значит, при n_0≈30, переход спираль-клубок в очень длинных (N>>n_0) полипептидных цепях происходит в области -0.07 < f_{EL}/kT < 0.07 (Рис.1-2). Это — пример резкого, кооперативного, — но *не* фазового (т.к. ширина его не стремится к нулю по мере роста длины цепи) перехода.

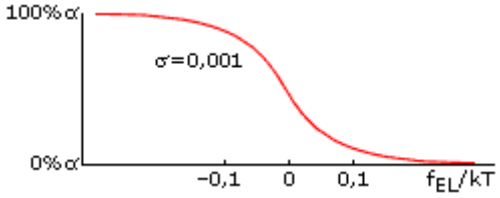


Рис.1-2. Переход спираль-клубок всегда — даже для бесконечно длинных цепей — имеет конечную ширину. Это — пример *не фазового*, но кооперативного перехода: при малой величине фактора инициации спирали (σ<<1) он совершается при совсем небольшом (много меньше, чем на kT) изменении величины f_{EL}, — что показывает, что "единица перехода" кооперирует много звеньев цепи, — но отнюдь не всю эту цепь.

Для измерения влияния отдельных аминокислотных остатков на стабильность спиралей сейчас чаще всего используются короткие (длиной ~n_0 или менее) полипептиды. В них может образоваться только одна спираль, и оценить влияние каждой аминокислотной замены на спиральность здесь наиболее просто. Сейчас известно, что вклад аминокислотного остатка в стабильность спирали лежит в следующих пределах: аланин; самый "спиралеобразующий" остаток: $s \approx 2$, т.е. $f_{EL} \approx$ -0.4 ккал/моль; глицин, самый "спиралеразрушающий" остаток: $f_{EL} \approx +1$ ккал/моль, т.е. $s \approx 0.2$; правда, у пролина — *имино*кислоты (не имеющей NH группы, которая должна завязывать структурообразующую водородную связь в α-спирали) — у него величина s еще много меньше, порядка 0.01 — 0.001, но точно она еще не измерена.

Ранее аналогичные оценки делались, используя статистические сополимеры (например — цепи, включающие случайным образом перемешанные 80% Glu и 20% Ala), и именно так были получены первые — а значит, и самые важные оценки, но с появлением возможности синтеза полипептидов с заданной последовательностью — такие работы на случайных сополимерах, видимо, отошли в прошлое.

Используя короткие пептиды с заданной первичной структурой, можно даже оценить влияние на спиральность каждой точечной аминокислотной замены в каждом конкретном месте такого пептида — т.е., фактически, в зависимости от расположения аминокислотного остатка относительно N- и C-концов спирали. Боковые группы взаимодействуют с этими концами по-разному — в частности, заряженные группы, потому что на N-конце спирали, как уже говорилось, сидят свободные от водородных связей NH-группы главной цепи (и парциальный заряд N-конца α-спирали равен +e/2), а на другом ее конце — CO-группы (с суммарным парциальным зарядом в половину электронного, — -e/2).

Кроме того, для измерения стабильности спирального состояния (величины f_{EL}) в полипептидах, включающих кислотные или основные боковые группы (например, в поли(Glu) или поли(Lys)), используется потенциометрическое титрование. Идея этого подхода — в том, что заряжая спираль, мы разрушаем ее (т.к. в спирали заряды боковых групп более сближены и потому сильнее расталкиваются), — так что стабильность спирали можно рассчитать, зная, как суммарный заряд цепи зависит от pH среды. К сожалению, более подробное рассмотрение этого интересного метода выходит за рамки данного курса.

Аналогичные подходы применяются и для измерения стабильности β-структуры в полипептидах. Однако они менее развиты, так как β-структура сильно агрегирует. Сейчас стабильность β-структуры часто измеряют прямо в белке — путем оценки влияния на его стабильность точечных замен отдельных, лежащих на его поверхности β-структурных аминокислотных остатков. Способность разных остатков стабилизировать β-структуру мы рассмотрим на следующей лекции.

Рассмотрим теперь **скорость образования** вторичной структуры в пептидах.

α-спирали образуются быстро — показано, что за десятую долю микросекунды спираль охватывает пептид из 20-30 остатков (для столь быстрых измерений приходится греть раствор пико— или наносекундным лазерным ударом). Значит, спирали нарастают со скоростью по крайней мере порядка 1 остаток за несколько наносекунд.

Я сказал "по крайней мере", так как скорость образования спирали зависит не только от скорости, с которой она нарастает, но и от скорости, с которой в цепях появляются первые зародыши спиральной структуры. А инициация спирали требует преодоления активационного барьера — и потому образование первого витка спирали требует много больше времени, чем ее последующее удлинение еще на один виток. Так что возможно, что элонгация спирали идет много быстрее, а все наблюдаемое время тратится на ее инициацию. Разберемся в этом вопросе чуть внимательнее.

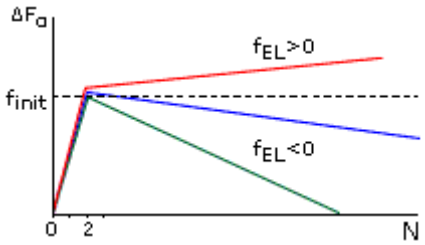


Рис.1-3. Характерная зависимость свободной энергии спирали (ΔF_α) от числа вовлеченных в нее аминокислотных остатков (N) при разных свободных энергиях ее элонгации (f_{EL}). При $f_{EL}<0$ — длинная спираль стабильна, но ее образование требует инициации, — преодоления активационного барьера высотой f_{INIT}. При $f_{EL}>0$ — спираль любой длины нестабильна и, следовательно, не образуется.

Характерная зависимость свободной энергии спирали от ее длины показана на Рис.1-3. Даже когда $f_{EL}<0$ — т.е. когда достаточно длинная спираль стабильна — образование первого витка в ней требует преодоления активационного барьера высотой f_{INIT}. По теории переходных состояний, преодоление такого барьера и образование первого витка в данном месте цепи происходит за время

$$t_{INIT} = \tau \cdot \exp(+f_{INIT}/kT)\ , \qquad (1.7)$$

где τ — время элементарного шага (в данном случае — элонгации спирали на один остаток), а экспонента учитывает малую населенность барьерного состояния. В силу уравнения (1.6)

$$t_{INIT} = \tau/\sigma. \qquad (1.8)$$

Однако инициация может произойти в любой точке спирали, а ее длина — порядка $n_0 = \sigma^{-1/2}$. Значит, характерное время инициации первого витка *в каком-то месте* будущей спирали составляет в n_0 раз меньше времени, а $t_{INIT}/n_0 = \tau/(n_0\sigma) = \tau/\sigma^{1/2}$.

На то, чтобы уже инициированная спираль охватила все свои $\sim n_0$ звеньев, требуется потом примерно то же (что и на инициацию) время, $\sim\tau n_0 = \tau/\sigma^{1/2}$. Значит, все время перехода клубок-спираль в полипептиде должно составлять примерно

$$t_\alpha = 2\tau/\sigma^{1/2}, \qquad (1.1)$$

и половина, грубо говоря, этого времени идет на инициацию спиралей в разных местах цепи, а половина — на элонгацию, протекающую, в согласии с предварительной оценкой, со скоростью порядка 1 остаток за наносекунду.

Кинетика образования α-спиралей относительно проста: они всегда образуются быстро. Кинетика образования β-структуры много сложнее и интереснее.

β-структура в полипептидах часто образуется очень медленно — за часы, а бывает — за недели (хотя бывает, что и за миллисекунду). Почему? И, в то же время, — белки с β-структурой сворачиваются не медленнее α-спиральных белков. Как они успевают? И что отвечает за аномалии в образовании β-структуры в полипептидах — медленная инициация или медленная элонгация?

"Аномальная" (по сравнению с переходом спираль-клубок) кинетика образования β-структуры связана с тем, что она — двумерный (а не одномерный, как спираль или клубок) объект (Рис.1-4).

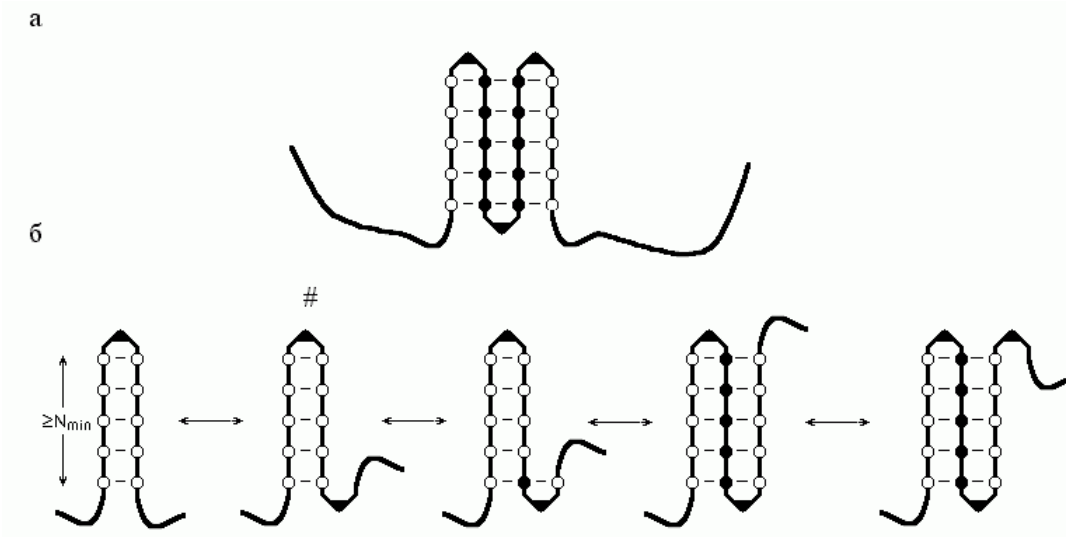


Рис.1-4. (а) Схема β-листа. Аминокислотные остатки внутренних β-участков показаны черными кружками, краевых β-участков — пустыми кружками; изгибы (или петли), соединяющие β-участки, изображены в виде уголков. (б) Описанный в тексте сценарий роста β-листа. Самая нестабильная структура помечена значком #.

Находящиеся на краю листа звенья цепи имеют меньше контактов с другими, чем внутренние звенья листа. Иными словами, край β-листа (как и граница любой другой фазы — например, капли воды, льдинки или α-спирали) имеет повышенную свободную энергию. Однако — в отличие от α-спирали (и в сходстве с каплей) — β-лист не одномерен, т.е. размер его края (а значит, и его свободная энергия) растет с числом вовлеченных в этот лист звеньев цепи. Поэтому переход клубок — β-структура становится фазовым переходом первого рода — как образование капли или льдинки. Покажем, что из-за этого на пути образования β-листа возникает высокий (особенно при образовании лишь слегка стабильной β-структуры) свободно-энергетический барьер, который может в миллионы и миллиарды раз замедлить инициацию ее сворачивания.

Край β-листа сложен из (а) краевых β-тяжей, и (б) изгибов или петель, соединяющих все β-тяжи (Рис.1-4а). Пусть свободная энергия клубка принята за 0 (т.е. за начало отсчета), f_β — свободная энергия остатка в центре β-листа, $f_\beta+\Delta f_\beta$ — свободная энергия остатка на его краю (т.е. Δf_β — краевой эффект), и U — свободная энергия изгиба. Раз β-лист вообще образуется — то он стабилен (т.е. $f_\beta<0$), а краевые эффекты препятствуют его распаду на кусочки (т.е. $\Delta f_\beta>0$ и $U>0$).

В кинетике образования β-структуры надо различать два случая:

А) $f_\beta+\Delta f_\beta<0$, т.е. длинная β-шпилька сама по себе стабильнее клубка. Тогда только образование изгиба в вершине этой шпильки требует преодоления активационного барьера (примерно такого же, как при образовании α-спирали), а дальнейший рост β-структуры идет быстро — примерно как элонгация α-спирали (см. линию с $f_{EL}<0$ на Рис.1-3).

Б) $f_\beta+\Delta f_\beta>0$, т.е. β-шпилька сама по себе нестабильна, и только прилипание к инициирующей β-шпильке последующих β- тяжей стабилизует β-лист. Активационному барьеру тогда соответствует образование "зародыша" — такого β-листа или β-шпильки, что дальнейший рост листа пойдет уже с общим

понижением свободной энергии.

Образование и последующее "прорастание" зародыша новой фазы — характернейшая особенность фазовых переходов первого рода, к коим принадлежит и образование β-структуры. Однако преодоление связанного с образованием зародыша активационного барьера, как мы скоро убедимся, может быть очень и очень медленным.

Рассмотрим следующий простейший сценарий роста стабильного β-листа (Рис.1-4б): образование инициирующей β-шпильки из изгиба и двух β-тяжей, по N звеньев (аминокислот) в каждом; образование последующего изгиба на ее конце; прилипание к листу β-тяжа из N звеньев; образование последующего изгиба; прилипание β-тяжа; и так далее.

Возникновение — из клубка — β-шпильки из изгиба и двух N-звенных β-тяжей повышает свободную энергию цепи на $U+2N(f_\beta+\Delta f_\beta)$; образование последующего β-изгиба повышает ее еще на U. Прилипание к N-звенному краю этой шпильки N-звенного β-тяжа снижает свободную энергию на Nf_β (ведь при этом число краевых звеньев не меняется, а число внутренних растет на N); образование последующего β-изгиба опять повышает свободную энергию на U; прилипание нового N-звенного β-тяжа снова понижает ее на Nf_β, и т.д.

Цикл "прилипание нового β-тяжа и образование нового β-изгиба" изменяет суммарную свободную энергию на $Nf_\beta+U$. А так как в результате такого цикла свободная энергия должна снижаться (только тогда сворачивание цепи пойдет быстро), то прилипающий β-тяж (а равно и тот, к которому он прилипает) должен состоять не менее чем из $N_{min} = U/(-f_\beta)$ звеньев.

"Переходным", т.е. самым нестабильным состоянием по ходу образования β-структуры является (по нашему сценарию) β-шпилька с последующим изгибом. Так как стабильность шпильки падает с удлинением, а β-тяж в инициирующей шпильке должен состоять как минимум из N_{min} звеньев, то минимальная свободная энергия инициирующей β-шпильки составляет

$$F^{\#} = U+2N_{min}(f_\beta+\Delta f_\beta)+U = 2(U\Delta f_\beta)/(-f_\beta). \qquad (1.10)$$

Это — свободная энергия переходного состояния при образовании β-листа *по нашему сценарию.* Теперь осталось только показать, что, какой сценарий ни возьми, существенно более стабильных переходных состояний быть не может.

Чтобы показать это — оценим, как будет меняться минимальная свободная энергия β-листа с его увеличением. Общий ход изменения показан на Рис.1-5. Пока лист мал, доминируют краевые эффекты, и свободная энергия повышается. В большом же листе доминируют внутренние остатки, и его свободная энергия падает.

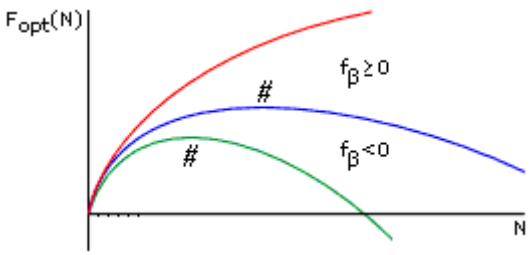


Рис.1-5. Общий ход изменения F_{opt}, минимальной свободной энергии β-листа, с увеличением числа M звеньев в нем. Кривые относятся к разным свободным энергиям f_β внутренних звеньев β-листа. # — точка максимума величины F_{opt} по ходу роста β-листа. При росте β-листа (в отличие от роста α-спирали, см. Рис.1-3) максимум его свободной энергии не приходится на самое начало этого процесса.

Теперь перейдем к расчетам. Сначала оценим минимальную свободную энергию M-звенного β-листа. Свободная энергия листа, состоящего из m β-тяжей (равной длины, чтобы минимизировать краевую свободную энергию) и m-1 изгиба, равна

$$F(M,m) = Mf_\beta + 2(M/m)\Delta f_\beta + (m-1)U \qquad (1.11)$$

Варьируя число β-участков m, найдем минимум этой свободной энергии из условия

$$dF/dm = -2(M/m^2)\Delta f_\beta + U = 0. \qquad (1.12)$$

Отсюда следует оптимальное число β-участков в этом листе, $m_{opt} = M^{1/2}[2\Delta f_\beta/U]^{1/2}$ и его свободная энергия, $F_{opt}(M) = F(M,m_{opt}) = Mf_\beta - U + 2M^{1/2}[2\Delta f_\beta \cdot U]^{1/2}$. Варьируя величину $F_{opt}(M)$ по M, находим ее максимум (см. Рис.1-5) из условия

$$dF_{opt}/dM = f_\beta + M^{-1/2}[2\Delta f_\beta \cdot U]^{1/2} = 0. \qquad (1.13)$$

Далее можно определить размер β-листа, соответствующего этому максимуму, $M^* = 2(\Delta f_\beta \cdot U)/(-f_\beta)^2$, и его свободную энергию

$$F^* = F_{opt}(M^*) = 2(\Delta f_\beta \cdot U)/(-f_\beta) - U. \qquad (1.14)$$

Величины F^* и $F^\#$ (см. формулу 1.10) совпадают в главном члене, $2(\Delta f_\beta \cdot U)/(-f_\beta)$. Именно из-за него свободная энергия переходного состояния $F^\#$ *всегда* велика, когда свободная энергия стабилизации β-структуры ($-f_\beta$) мала, т.е. когда β структура находится на грани стабильности. В сущности, $F^\#$ стремится к

бесконечности, когда β структура приближается к термодинамическому равновесию с клубком, т.е. когда $(-f_\beta) \to 0$.

Так как, согласно теории переходного состояния, время процесса t зависит от свободной энергии переходного (самого нестабильного промежуточного) состояния $F^\#$ как

$$t_\beta \sim \tau_\beta \cdot \exp(+F^\#/kT), \qquad (1.15)$$

где τ_β — время элементарного шага (в данном случае — элонгации β-листа на один остаток; и нет причин, чтобы скорость элонгации β-листа качественно отличалась бы от скорости элонгации спирали), то характерное время образования β листа, при малых $-f_\beta$, есть

$$t_\beta \sim \tau_b \cdot \exp[A/(-f_\beta)] , \qquad (1.16)$$

где A — некая константа. Каково бы ни было ее численное значение, — видно (см. Рис.1-6), что при малых $-f_\beta$ время образования β структуры будет огромно (в пределе — бесконечно велико).

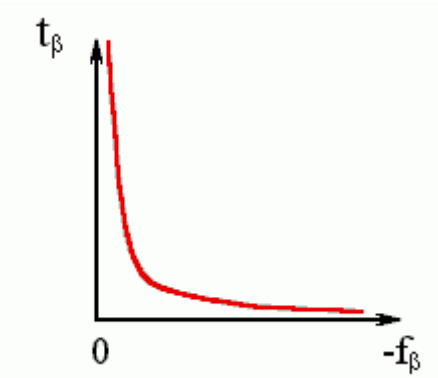


Рис.1-6. Общий вид зависимости характерного времени образования β-листа от стабильности β-структуры.

Итак: малостабильная β-структура (а именно она наблюдается в неагрегирующих полипептидах) должна образовываться очень медленно, — и причина здесь не в медленной элонгации, а в медленной инициации — трудно собрать свободную энергию из теплового движения и преодолеть высокий барьер.

Так объясняется и экспериментально наблюдаемая, очень медленная скорость образования β-структуры в неагрегирующих полипептидах, и резкий ее рост с повышением стабильности β-структуры.

В то же время стабильные β-листы и шпильки (а именно они и наблюдаются в белках) должны образовываться довольно быстро — примерно как α-спираль.

Крайне медленная инициация — общее свойство фазовых переходов первого рода, когда возникающая фаза находится на грани стабильности. Вспомните: переохлажденная жидкость, перегретый пар... Все это связано с большой свободной энергией обширной граница раздела фаз. А β-структура как раз и образуется фазовым переходом первого рода — со всеми вытекающими последствиями...

Наоборот, α-спираль *не* образуется фазовым переходом первого рода [вспомните: граница спирали, в отличие от границы β-структуры (или льдинки), *не* растет с ее размером] — поэтому барьер, который нужно преодолеть при сворачивании спирали, всегда имеет конечную (и небольшую) величину, и она может успеть "проинициироваться" за микросекунду.

Заключительное замечание: что такое "*клубок*". Этим термином я много раз пользовался, говоря о цепи, не имеющей определенной структуры. Действительно, клубок не имеет никакого дальнего порядка — что, однако, не исключает слабый (на масштабе всего нескольких подряд идущих звеньев цепи) ближний порядок.

Самой интересной особенностью клубка (экспериментально наблюдаемой с помощью гидродинамических методов, при помощи рассеяния света и рентгеновских лучей) является его крайне малая плотность и совершенно особая зависимость его размеров — радиуса и объема — от длины цепи.

Для выяснения этой особенности, рассмотрим простейшую модель клубка, так называемую "свободно-сочлененную цепь" (Рис.1-7). Она состоит из звеньев-"палочек"; "звено" может включать в себя несколько мономеров полимерной цепи; главное — что каждая "палочка" может свободно, как угодно поворачиваться в сочленении относительно своих соседей по цепи. Пусть в цепи M "палочек", и длина каждой равна r.

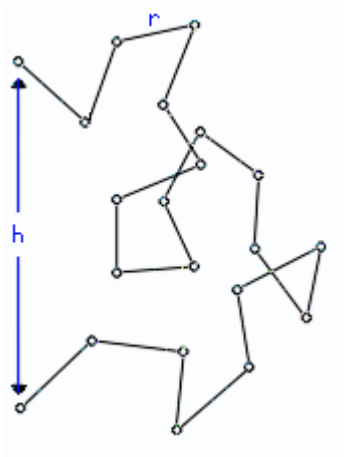


Рис.1-7. Свободно-сочлененная цепь — модель клубка.

Такую цепь можно описать как цепочку из векторов $\mathbf{r}_1$, $\mathbf{r}_2$,..., $\mathbf{r}_M$ (напомню: вектор в математике — это отрезок прямой, имеющий направление). Эти вектора имеют одинаковую длину r, и каждый из них направлен от предыдущего сочленения к последующему. Сумма векторов

$$\mathbf{h} = \sum_{i=1}^{M} \mathbf{r}_i \tag{1.17}$$

есть просто вектор, идущий от начала к концу цепи. Квадрат длины этого вектора есть

$$\mathbf{h}^2 = \left(\sum_{i=1}^{M} \mathbf{r}_i\right)^2 = \sum_{i=1}^{M} \mathbf{r}_i^2 + 2\sum_{i\neq j}^{M}\sum^{M} \mathbf{r}_i\mathbf{r}_j \tag{1.18}$$

Найдем теперь среднюю величину $<\mathbf{h}^2>$, т.е. усредним $\mathbf{h}^2$ по всем возможным тепловым флуктуациям цепи. При этом мы должны учесть, что $<\mathbf{r}_i^2>$, средний квадрат вектора $\mathbf{r}_i$, есть просто r^2, а среднее произведение любых векторов $<\mathbf{r}_i\mathbf{r}_j>$ есть 0 при $i\neq j$, так как, свободно вращаясь, эти вектора имеют ту же вероятность быть направленными что в одну, что в разные стороны.

Значит, средний квадрат расстояния между концами свободно-сочлененной цепи есть

$$<\mathbf{h}^2> = <\left(\sum_{i=1}^{M} \mathbf{r}_i\right)^2> = <\sum_{i=1}^{M} \mathbf{r}_i^2 + 2\sum_{i\neq j}^{M}\sum^{M} \mathbf{r}_i\mathbf{r}_j> = \sum_{i=1}^{M}<\mathbf{r}_i^2> + 2\sum_{i\neq j}^{M}\sum^{M}<\mathbf{r}_i\mathbf{r}_j> = Mr^2\,; \tag{1.1}$$

то есть линейные размеры (радиус и т.д.) клубка растут с ростом числа M звеньев в цепи как $M^{1/2}$. Отсюда следует, что объем клубка пропорционален $M^{3/2}$ — в то время как для всех "нормальных" (имеющих фиксированную плотность) тел объем растет только как число частиц M, — т.е. гораздо медленнее, чем $M^{3/2}$. Такая аномально сильная зависимость объема клубка от размера цепи и есть самое характерное свойство клубка. Из него, в частности, вытекает крайне низкая плотность клубка, образованного длинными цепями, и, как следствие — практическое отсутствие контактов между дальними по цепи звеньями.

Недостаток, недостаточная реалистичность свободно-сочлененной модели — в том, что она рисует клубок в сильно идеализированном виде, т.к. допускает, что в любом своем звене цепь может поворачиваться на любой угол, — а это, вообще говоря, не так. Однако формулу (1.11) можно переписать в более общем виде,

$$<\mathbf{h}^2> = Lr\,, \tag{1.20}$$

где L = Mr — полная ("контурная") длина цепи, пропорциональная числу звеньев в ней, а r — эффективное расстояние между "свободными сочленениями" цепи, т.е. характерная длина, на которой цепь "забывает" о своем направлении (для

справки: в полипептидной цепи эта характерная длина — или, как говорят, "длина Куновского сегмента" — составляет 30 — 40Å, т.е. Куновский сегмент такой цепи содержит около 10 аминокислотных остатков). В виде (1.20) формула, описывающая размер клубка, уже обретает достаточную общность и может применяться для описания реальных полимеров.