

А. И. ГАСАН, В. Я. МАЛЕЕВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНО-КОНЦЕНТРАЦИОННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ В РАСТВОРАХ

(Представлено академиком И. М. Лифшицем 17 XII 1970)

При калориметрическом исследовании растворов сывороточного альбумина человека было обнаружено существенное уменьшение скрытой теплоты перехода с увеличением концентрации раствора и указана предельная концентрация, при которой отсутствуют энергетические различия между нативным и денатурированным состояниями белка (1).

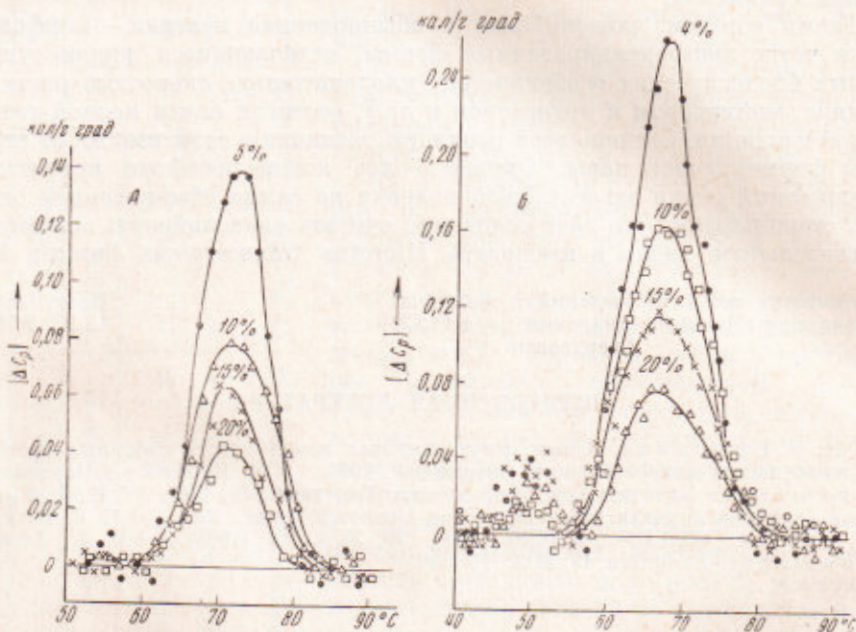


Рис. 1. Температурная зависимость избыточной теплоемкости растворов яичного альбумина (А) и сывороточного альбумина (В) разных концентраций

Возникает естественный вопрос, в какой мере это явление отражает общие закономерности температурно-концентрационной устойчивости белковых молекул в растворе. В связи с этим было проведено изучение концентрационной зависимости скрытых теплот перехода растворов яичного альбумина, принадлежащего к той же группе глобулярных белков, что и сывороточный альбумин, но отличающегося от последнего количеством дисульфидных связей (1 против 17) которые, как известно, играют существенную роль в стабилизации вторичной структуры.

Измерения проводились на калориметрической установке, описанной ранее (1), водные растворы яичного альбумина готовились в таких же условиях (рН 6 в присутствии 0,15 М КСl), как и растворы сывороточного альбумина.

Таблица 1

С, вес. %	Яичный альбумин				Сывороточный альбумин			
	5	10	15	20	4	10	15	20
ΔF (298° К), кал/моль	23±2	18±2	11±1	6±1	43±3	31±3	22±2	15±2
$T_{пл}$, °С*	72,0	71,5	71,0	70,0	68,0	67,5	67,0	66,0

* Ошибка в $T_{пл}$ не превышает $\pm 0,5^\circ$.

На рис. 1А приведены температурные зависимости избыточной теплоемкости (связанной только с процессом теплового перехода) растворов яичного альбумина разных концентраций, а на рис. 1Б — семейство аналогичных кривых для сывороточного альбумина. Из приведенных зависимостей видно, что с увеличением концентрации белка в растворе происходит небольшое понижение температуры плавления (соответствующей максимуму на кривой зависимости Δc_p от T) и одновременно существенно уменьшается энтальпия перехода ΔH , определяемая площадью, ограниченной кривой перехода для данной концентрации (рис. 2). Поскольку величиной, характеризующей стабильность системы, является разность свободных энергий ΔF между двумя конформационными состояниями, определим ее через ΔH , предполагая в первом приближении независимость изменения энтальпии от температуры (что вполне оправдано для случая, когда тепловой эффект не сильно растянут по температуре).

$$\Delta F(T) = \Delta H(T_{пл}) (1 - T / T_{пл}). \quad (1)$$

Значения ΔF при $T = 298^\circ \text{К}$, рассчитанные на моль среднего аминокислотного остатка для исследованных концентраций яичного и сывороточного альбуминов, даны в табл. 1.

Эти данные свидетельствуют, прежде всего, о том, что нативное состояние по отношению к денатурированному для сывороточного альбумина является более устойчивым, чем для яичного альбумина. Это и не удивительно, если учесть, что сывороточный альбумин «вулканизирован» 17 дисульфидными связями, естественно затрудняющими разрушение вторичной структуры. В то же время средние температуры «плавления» для обоих белков при идентичных условиях эксперимента практически не различаются (табл. 1), что возможно только при условии, если температурный коэффициент изменения разности свободной энергии (ΔF) для сывороточного альбумина больше, чем для яичного. Однако более интересной особенностью в поведении исследуемых белков являются, по-видимому, не столько найденные отличия, сколько общая тенденция к уменьшению энергетической разницы между двумя конформационными состояниями при увеличении концентрации, что указывает на уменьшение стабильности нативного состояния макромолекул. Это явление, вероятно, обусловлено межмолекулярным взаимодействием, приводящим к ограничению подвижности структурных звеньев, что создает благоприятные условия для

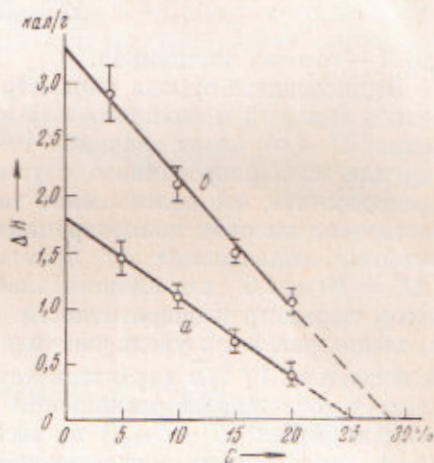


Рис. 2. Концентрационная зависимость скрытой теплоты перехода растворов белков. а — яичный альбумин, б — сывороточный альбумин человека

восстановления разорванных связей в молекулах белка, и одновременно повышающим вероятность образования водородных связей между молекулами.

Заметим, что линейный характер наблюдаемой зависимости изменения энтальпии перехода с концентрацией растворов находится в соответствии с результатами статистической теории Флори (2) и Пеллера (3).

Обнаруженные особенности в изменении ΔF с концентрацией белковых растворов, возможно, являются общим свойством систем взаимодействующих биополимеров. Так, например, интересно отметить, что при исследовании процесса термического разрушения естественных комплексов белков с ДНК (фаг Т-2) было обнаружено, что энтальпия перехода для ДНК в фаге меньше, чем энергия перехода для изолированной ДНК (4).

В теоретической модели Зимма — Брегга (5), описывающей переходы спираль — клубок в полипептидах, основной величиной, характеризующей «резкость» перехода, является параметр кооперативности σ , учитывающий корреляции состояний отдельных мономеров в структуре молекулы и связанный с измеряемыми величинами (интервалом «плавления» ΔT , температурой перехода $T_{пл}$ и изменением энтальпии при переходе ΔH) соотношением

$$\Delta T = 2 \sqrt{\sigma} \frac{RT_{пл}^2}{|\Delta H|}, \quad (2)$$

где R — газовая постоянная.

Вычисленный отсюда параметр кооперативности σ для исследуемых белков (яичный и сывороточный альбумин) в случае бесконечного разведения ($C \rightarrow 0$) имеет значения $1 - 5 \cdot 10^{-4}$, что отвечает результатам теории для идеализированного случая гомополимера (полипептида). Если предположить, что соотношение такого типа остается справедливым при достаточно высоких концентрациях белка в растворе, то, поскольку $T_{пл}$ и интервал «плавления» ΔT практически не зависят от концентрации ($\Delta T = 10 \pm 1,5^\circ$ для яичного альбумина и $\Delta T = 14 \pm 2^\circ$ для сывороточного), параметр кооперативности оказывается пропорциональным $(\Delta H)^2$ и, следовательно, с увеличением концентрации будет стремиться к нулю. А поскольку $1 / \sqrt{\sigma}$ характеризует радиус корреляции состояний, отсюда следует возможность расширения «зоны кооперативности» при больших концентрациях ($C \rightarrow C_{пред}$) на весь исследуемый объем, что, вообще говоря, не противоречит существующей гипотезе о «генерализованных переходах» (6). Однако подобное заключение носит сугубо предварительный характер. Доказательство его справедливости требует как увеличения количества экспериментальных данных о температурно-концентрационной устойчивости растворов биополимеров, так и обобщения теоретической модели перехода спираль — клубок на случай больших концентраций.

Институт радиофизики и электроники
Академии наук СССР
Харьков

Поступило
17 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. И. Гасан, В. Я. Малеев, Докл. АН УССР, № 3 (1971). ² P. Flory, Proc. Roy. Soc. A, 234, 60 (1956). ³ L. Pellen, J. Phys. Chem., 63, 1199 (1959). ⁴ М. А. Семенов, А. И. Гасан, В. Я. Малеев ДАН, 198, № 6 (1971). ⁵ В. Н. Zimm, J. K. Bragg, J. Chem. Phys., 31, 271 (1959). ⁶ С. В. Конев, С. Л. Аксенцев, Е. А. Черницкий, Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970.