

В. Я. МАЛЕЕВ, А. И. ГАСАН

КОНЦЕНТРАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ ВЕЩЕСТВ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ

(Представлено академиком И. М. Лифшицем 6 X 1972)

При исследовании влияния межмолекулярного взаимодействия на процесс тепловой денатурации синтетических полипептидов ⁽¹⁻³⁾ и глобулярных белков ⁽⁴⁾ были обнаружены общие закономерности, заключающиеся в существенном уменьшении энтальпии перехода по мере роста концентрации полипептида (белка) при отсутствии в то же время заметной концентрационной зависимости таких параметров перехода, как температура и интервал плавления.

В настоящей работе предлагается объяснение указанных эффектов на основе статистико-механического рассмотрения взаимодействия макромолекул (полипептидов) через агрегационные контакты, возникающие в процессе плавления структуры.

Пусть в объеме V находятся N одинаковых макромолекул, каждая из которых описывается статистической суммой $Q_0(x)$, где x — некоторые параметры, определяющие внутреннюю структуру макромолекулы. В случае полипептидной цепочки из n_0 звеньев эта статистическая сумма имеет вид ⁽⁵⁻⁷⁾

$$Q_0(n, m) = g_{n, m} \exp \left\{ -\frac{1}{kT} (n\Delta F_0 + m\Delta F_i) \right\}, \quad (1)$$

где ΔF_0 — изменение свободной энергии при разрыве водородной связи, ΔF_i — энергия «инициации» величины n (среднее число, «расплавленных» элементов) и m (среднее число границ между спиральными и клубковыми участками) играют роль параметров x , $g_{n, m} = C_n^m C_{n_0-n}^m$ — число реализаций состояний цепочки с данными n, m ; T — температура, k — постоянная Больцмана.

Явные выражения для статистической суммы системы N взаимодействующих макромолекул можно найти в предельном случае разбавленного раствора ($Nv \ll V$, v — объем, занимаемый макромолекулой) и в случае конденсации, когда макромолекулы образуют единый агрегат.

В первом предельном случае основную роль играют парные столкновения, число которых пропорционально N^2 . Следуя схеме, используемой при вычислении свободной энергии неидеального газа ⁽⁸⁾, находим

$$Q_N \left(x, \frac{N}{V} \right) = \frac{V^N}{N!} Q_0^N(x) \exp \left\{ -\frac{N^2 \Delta F_{\text{ст}}(x)}{2VkT} \right\}, \quad (2)$$

где $\Delta F_{\text{ст}}$ — изменение свободной энергии при столкновении двух частиц. Будем предполагать, что главный вклад в эту величину дают возникающие в процессе плавления спиральной структуры новые, более устойчивые, водородные связи типа $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{N}$ между расплавленными амидными груп-

нами сталкивающихся частиц. На существование таких связей указывают данные инфракрасной спектроскопии о появлении в спектре денатурированного белка «агрегационной» полосы за счет колебаний водородно связанной карбонильной группы $(C=O...H)_{agr}$, максимум которой смещен в длинноволновую сторону относительно «спиральной» полосы $(C=O...H)_{sp}$ (⁹⁻¹¹). Наиболее вероятны агрегационные контакты между двумя свободными элементами и между свободным элементом и элементом на границе спирального участка (рис. 1). Комбинаторный анализ процесса столкновения двух частично расплавленных спиральных цепочек приводит к результату

$$\Delta F_{ст} = 2\alpha n \Delta F_a + 2\beta m \Delta F_{ai}, \quad (3)$$

где ΔF_a , ΔF_{ai} — вклады в свободную энергию за счет установления контактов указанных типов, α , β — параметры, а множитель 2 введен для удобства. Параметры структурного перехода можно определить, найдя экстремум по n , m статистической суммы $Q_N(n, m, N/V)$, полученной при подстановке выражений (1), (3) в формулу (2). Так, для энтальпии и энтропии перехода имеем

$$\begin{aligned} \Delta H_{пер} &= \Delta H_0 + \alpha c \Delta H_a; \\ \Delta S_{пер} &= \Delta S_0 + \alpha c \Delta S_a. \end{aligned} \quad (4)$$

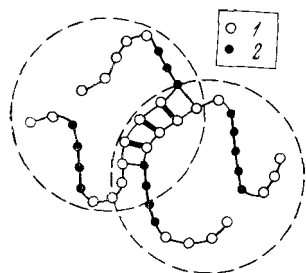


Рис. 1. Схема возможных агрегационных контактов при столкновении частично расплавленных полипептидных цепочек. 1 — свободный элемент, 2 — элемент, принадлежащий спиральной форме

Здесь $c = N/V$ концентрация, ΔH_0 , ΔS_0 — изменения энтальпии и энтропии при переходе из спиральной в менее упорядоченную клубковую форму, ΔH_a , ΔS_a — соответствующие величины при образовании агрегационных связей. Это означает, что величины ΔH_0 , ΔH_a и ΔS_0 , ΔS_a имеют противоположные знаки, т. е. из (4) следует, что и энтальпия, и энтропия перехода с ростом концентрации уменьшаются по линейному закону, а поскольку температура плавления определяется отношением этих величин, ее зависимость от концентрации будет слабой.

Для интервала плавления получаем формулу

$$\Delta T = \frac{2kT_{пл}^2}{|\Delta H_0 + \alpha c \Delta H_a|} V \bar{\sigma} \exp \left\{ - \frac{\beta c}{2kT} \Delta F_{ai} \right\} \quad (5)$$

($\sigma = \exp(-\Delta F_i/kT)$ — параметр кооперативности), переходящую при $c \rightarrow 0$ в обычное выражение для ΔT в теории перехода спираль — клубок для изолированного полипептида (⁷). Считая, что добавочная свободная энергия инициации ΔF_{ai} (как и ΔF_i) имеет в основном энтропийное происхождение с $\Delta S_{ai} < 0$, из (5) видим, что эффективный параметр кооперативности уменьшается с концентрацией (линейно при $|\Delta F_{ai}| \ll |\Delta F_i|$) и тем самым возможное расширение интервала плавления за счет уменьшения $\Delta H_{пер}$ может быть скомпенсировано этим эффектом. Таким образом, в случае малых концентраций рассматриваемая модель качественно объясняет наблюдаемые экспериментально закономерности, по крайней мере, для полипептидов (¹⁻³).

В предельном случае больших концентраций статистическую сумму для N макромолекул можно найти, принимая во внимание эффект исключенного объема (по Флори (¹²)) и учитывая изменение свободной энергии ΔF_j за счет образования агрегационных контактов между j -й макромолекулой и агрегатом из $j-1$ частицы

$$Q_N = \frac{V^N}{N!} Q_0^N(x) \mathcal{G} \exp \left\{ - \frac{1}{kT} \sum_j \Delta F_j(x) \right\}, \quad (6)$$

где G — множитель, учитывающий изменение подвижности звеньев цепочки за счет эффекта исключенного объема. Можно показать, что эта величина зависит в основном от отношения объемов v/V . Поэтому фактор G приводит к понижению энтропии всей системы, не оказывая существенного влияния на параметры структурного перехода.

Изменение свободной энергии системы за счет образования контактов пропорционально числу частиц ($\Sigma \Delta F_i = N \Delta \bar{F}$), а не их квадрату, как было в случае разбавленных растворов. Это означает, как нетрудно видеть, что в рассматриваемом предельном случае не должно быть концентрационной зависимости параметров структурного перехода, например энтальпии пе-

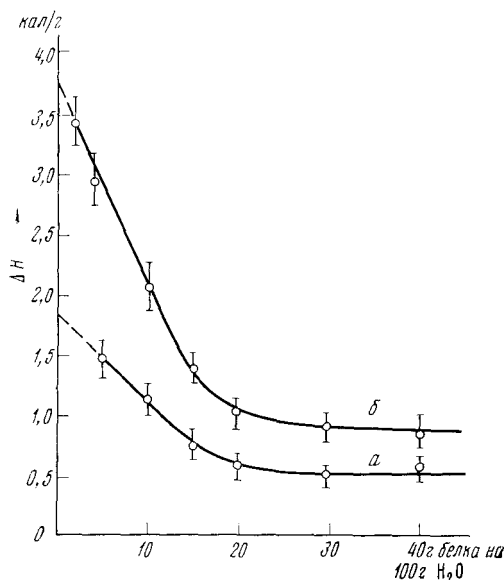


Рис. 2. Зависимость регистрируемой теплоты перехода от концентрации белка в растворе: а — яичный альбумин, б — сывороточный альбумин

рехода (эффект насыщения). Полученный результат имеет отношение не только к полипептидам, но и к белкам, поскольку мы нигде не использовали явного вида статистической суммы изолированной макромолекулы $Q_0(x)$. В связи с этим для экспериментальной проверки этого вывода теории мы провели калориметрические измерения энтальпии перехода для исследованных нами ранее глобулярных белков — яичного и сывороточного альбуминов⁽⁴⁾, существенно расширив при этом диапазон изученных концентраций. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 2. Как видно отсюда, начиная с некоторых концентраций белка, действительно наблюдается эффект насыщения, а при малых концентрациях энтальпия перехода уменьшается по линейному закону в соответствии с формулой (4). И, хотя при выводе этой формулы был использован явный вид статистической суммы⁽¹⁾ для полипептидов, а конкретная форма $Q_0(x)$ для глобулярных белков неизвестна, указанное совпадение, по-видимому, не является случайным, а отражает общность характера межмолекулярного взаимодействия веществ белковой природы при их тепловой денатурации.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Th. Ackerman, H. Rüterjans, Ber. Bunsenges. Phys. Chem., **68**, 850 (1964).
- ² Th. Ackermann, E. Neumann, Biopolymers, **5**, 649 (1967). ³ Puett, A. Ciferri, Biopolymers, **10**, 547 (1971). ⁴ А. И. Гасан, В. Я. Малеев, ДАН, **200**, 716 (1971). ⁵ L. Peller, J. Phys. Chem., **63**, 1194 (1959). ⁶ J. Applequist, J. Chem. Phys., **38**, 934 (1963). ⁷ D. Poland, H. A. Scheraga, Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers, N. Y.—London, 1970. ⁸ Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц, Статистическая физика, «Наука», 1964. ⁹ H. Lenormant, Bull. Soc. chim. France, 1953, p. 214. ¹⁰ T. Mijazawa, J. Chem. Phys., **32**, 1647 (1960). ¹¹ Ю. М. Боярчук, М. В. Волькенштейн, Биофизика, **12**, 341 (1967).
- ¹² P. Flory, Principles of Polymer Chemistry, Ithaca, 1953.