

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

Влияние формирования гидратной оболочки на тепловые свойства глобулярных белков.**Белопольская Т.В., Церетели Г.И., Грунина Н.А.***Научно-исследовательский институт физики Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, 198904*

Поступила в редакцию 25 ноября 1998 года

Методом ДСК определены абсолютные значения теплоемкости системы глобулярный белок-вода в широком интервале температур и концентраций как для нативного, так и для денатурированного состояний, так называемых, малых глобулярных белков: миоглобина, лизоцима и рибонуклеазы. Получено, что для всех изученных белков на термограммах нагревания денатурированных образцов, содержащих лишь связанную воду, наблюдается скачок теплоемкости, обусловленный, очевидно, процессом стеклования белка. Установлена зависимость температуры скачка теплоемкости от содержания воды в системе белок-вода. Вычислены значения теплоемкости собственно белка в нативном и денатурированном состояниях при изменении концентрации воды от 0 до 90 %, т.е. от сухого образца до белка с полностью сформированной гидратной оболочкой. Обнаружено, что для всех глобулярных белков кривые, характеризующие зависимость суммарной теплоемкости, а также теплоемкости собственно белка от содержания воды однотипны и имеют S-образный вид, что, повидимому, является отражением процесса расстекловывания белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сканирующая калориметрия, глобулярные белки, теплоемкость, стеклование, гидратация, влажность.

Проблема гидратации белков, несмотря на уже имеющийся большой экспериментальный материал, продолжает оставаться актуальной до настоящего времени [1-5]. Недавно, нами был выполнен цикл исследований по определению теплоемкости системы фибриллярный белок коллаген – вода в широком интервале концентраций и большом диапазоне температур [6,7]. В результате было высказано мнение, что рассмотрение теплоемкости системы белок-вода при вариации содержания компонентов в широком интервале концентраций невозможно без учета того факта, что белки при обезвоживании способны, как и синтетические полимеры, переходить в стеклообразное состояние.

Целью настоящей работы является аналогичное исследование тепловых свойств водных систем малых глобулярных белков во всем возможном диапазоне изменения концентраций компонентов – от концентрированного раствора до белка, имеющего лишь связанную воду, а также изучение изменений теплоемкости собственно белка в процессе формирования его гидратной оболочки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ.

Исследование тепловых свойств систем белок-вода выполнено на дифференциальном сканирующем калориметре ДСК-111 фирмы Сетарам в интервале температур $-30 \div 150^\circ\text{C}$. Детали эксперимента подробно описаны в статье [8], посвященной изучению фазовых переходов в нативном и денатурированном миоглобине. В настоящей работе основное внимание уделено изучению изменения молекулярной подвижности исследуемой системы белок-вода вне областей фазовых переходов на основе анализа абсолютных значений теплоемкости. Ошибка в определении абсолютных значений теплоемкости не превышала 1% при уменьшении концентрации белка вплоть до 10%. В качестве объектов исследования использовались: миоглобин (*Mb*), лизоцим (*Lys*) и рибонуклеаза (*RNC*-аза). Скорость нагрева $5^\circ\text{C}/\text{мин}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

На рис. 1 приведены температурные зависимости абсолютных значений теплоемкости (C_p) системы *Mb*-вода при первом и втором нагреваниях в широком интервале концентраций. Отметим, что денатурация, образование и плавление упорядоченных структур, возникающих в денатурированном *Mb*, были подробно рассмотрены нами в работе [8]. В связи с этим у представленных на рис. 1 кривых не приведена высокотемпературная часть. Кроме того, для настоящей работы, посвященной, в основном, абсолютным значениям теплоемкости исследуемой системы в интервале температур $20-90^\circ\text{C}$, существенно, что кривые, относящиеся ко второму нагреванию образца, отражают температурную

Влияние формирования гидратной оболочки на тепловые свойства глобулярных белков

зависимость теплоемкости денатурированного *Mb* во всех случаях [8]. При этом последний находится либо в полностью разупорядоченном состоянии, либо в нем присутствуют гель-структуры.

Рис. 2 демонстрирует, каким образом при фиксированной температуре изменяется суммарная удельная теплоемкость системы *Mb*-вода в нативном и денатурированном состояниях (кривые 1-3) при переходе от полностью обезвоженных образцов к образцам со значительным (90%) содержанием воды. Из рис. 2 видно, что все построенные кривые, как для нативного, так и для денатурированного состояния белка однотипны и состоят из двух участков: нелинейного *S*-образного и практически линейного, соответствующего концентрациям воды более 50%. Таким образом, из приведенных данных следует, что теплоемкость системы *Mb*-вода ни в нативном, ни в денатурированном состояниях не может быть рассмотрена по простой аддитивной схеме в широком интервале концентраций в предположении, что теплоемкости *Mb* и воды остаются постоянными. Наши данные наглядно демонстрируют, что такой подход к вычислению теплоемкости белка некорректен в области концентраций, где происходит формирование гидратной оболочки. На наш взгляд, его применение правомерно только в ограниченной области концентраций: либо для полностью обезвоженных белков, либо для разбавленных растворов, как это и было сделано, например, в работе [9].

Теплоемкость собственно *Mb* (рис. 2, кривые 1'-3') вычислена в предположении, что теплоемкость всей воды, как свободной, так и, в первом приближении, связанной в интервале температур 20-90°C остается постоянной и равной 4,18 Дж/г·град.

Установленный *S*-образный характер всех приведенных кривых обусловлен, по-видимому, постепенным переходом влажных белков в стеклообразное состояние. Наличие инкремента теплоемкости (рис. 1,3) и приведенные на рис. 4 зависимости его температуры от присутствия пластификатора, роль которого в данном случае играет вода, являются калориметрическим проявлением процесса стеклования и наглядно подтверждают нашу точку зрения. Следует подчеркнуть, что резкий скачок теплоемкости при расстекловывании может быть обнаружен лишь в случае строго контролируемых режимов нагревания и предварительного охлаждения. В противном случае во всем интервале стеклования будет наблюдаться лишь постепенное увеличение теплоемкости.

Выполненные нами исследования для *Lys* и *RNC*-азы при изменении их водного окружения (рис. 3,4) показали, что рассмотренные выше тепловые свойства системы *Mb*-вода носят достаточно общий характер. Следует, однако, отметить, что наблюдаемая величина скачка теплоемкости в *Mb* существенно меньше, чем в *Lys*, *RNC*-азе, а также в коллагене [6,7]. Кроме того, сам рассматриваемый переход в *Mb* происходит в гораздо более широкой области температур, чем при соответствующих значениях влажности в случае других белков. Указанные отличия в поведении скачка теплоемкости в *Mb*, значительно маскирующие проявление процесса стеклования, обусловлены, на наш взгляд, тем, что в данном случае стеклующейся системой является денатурированный белок, содержащий ненативные упорядоченные структуры [8], в отличие от других исследованных нами денатурированных белков, не образующих таких структур при аналогичных условиях проведения калориметрического эксперимента [12,13]. Интересно отметить, что в случае некоторых синтетических полимеров (а денатурированный белок мы рассматриваем как полимер) присутствие даже небольшого процента кристаллической фазы, т.е. аналогично упорядоченной структуре в денатурированном белке, может привести к размыванию скачка стеклования, ярко проявляющегося в полностью аморфном полимере [10].

Далее, полученные данные позволяют проследить, как происходит переход дегидратированного белка в раствор при увлажнении, а также какие состояния при этом проходит белок. Как нативный, так и денатурированный *Mb*, например, при комнатной температуре при содержании воды от 0 до 10% находится в состоянии стекла, и его теплоемкость при этом не зависит от влажности и равна 1,30 Дж/г·град. Эта величина находится в хорошем согласии с имеющимися литературными данными для обезвоженного состояния белков вне зависимости от их первичной структуры [2-5,9]. Обнаруженный факт, свидетельствующий о нечувствительности теплоемкости *Mb* к присутствию первых 10% воды, является довольно неожиданным, поскольку свидетельствует о том, что начало формирования гидратной оболочки не приводит к изменению тепловых свойств белка. Установлено, что при дальнейшем увлажнении до 20% теплоемкость начинает расти и белок при комнатной температуре оказывается в интервале стеклования. Такое состояние является самым неравновесным из всех возможных для стекла и, как показали наши исследования, теплоемкость белка при этом зависит не только от тепловой предыстории и способа задания влажности тестируемого образца, не только от величины скорости нагревания при определении теплоемкости, но и от времени нахождения при этой температуре, в данном случае комнатной. При этом состояние белка продолжает оставаться неравновесным и при появлении в исследуемой системе первых процентов свободной воды.

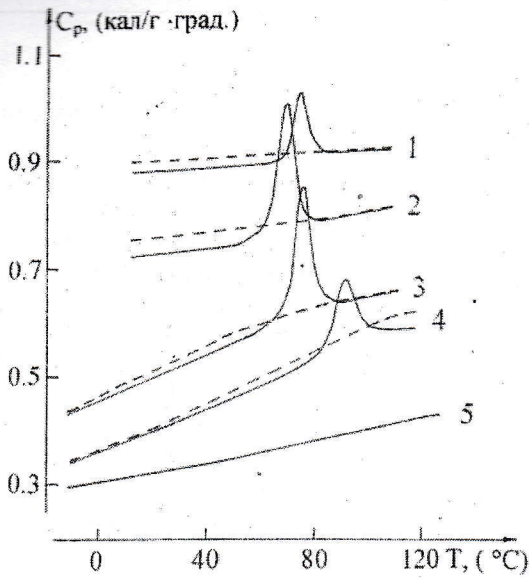


Рис.1

Рис. 1. Температурные зависимости абсолютных значений теплоемкости системы Mb-вода при концентрациях воды 80% (1); 50% (2); 21% (3); 11% (4) и 0% (5). Сплошная линия – первое нагревание. Пунктирная линия – второе нагревание. Скорость нагревания 5°C/мин.

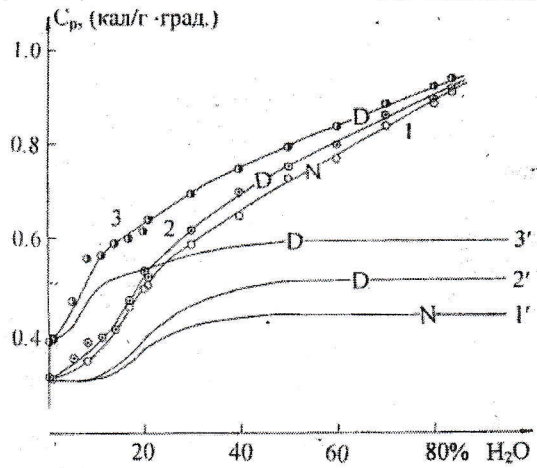


Рис.2

Рис. 2. Зависимость суммарной теплоемкости системы Mb-вода (1-3) и теплоемкости собственно белка (1'-3') для нативного и денатурированного состояний при различных температурах. 1,2 – 20°C; 3 – 90°C.

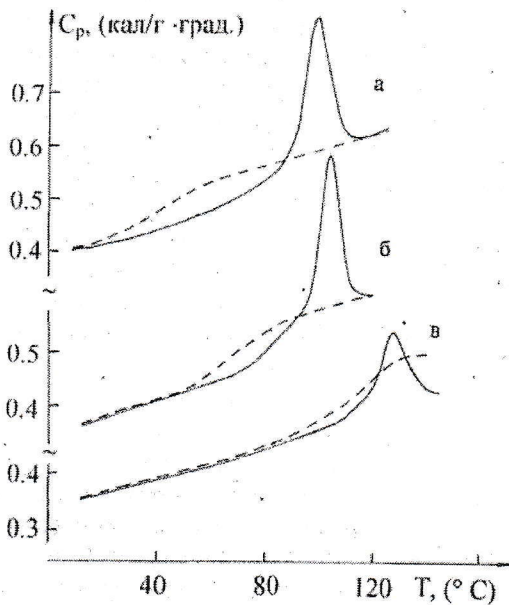


Рис.3

Рис. 3. Температурные зависимости абсолютных значений теплоемкости влажных глобулярных белков: RNC-азы (а), Lys(б), Mb(в). Сплошная линия – первое нагревание. Пунктирная линия – второе нагревание. Скорость нагревания 5°C/мин.

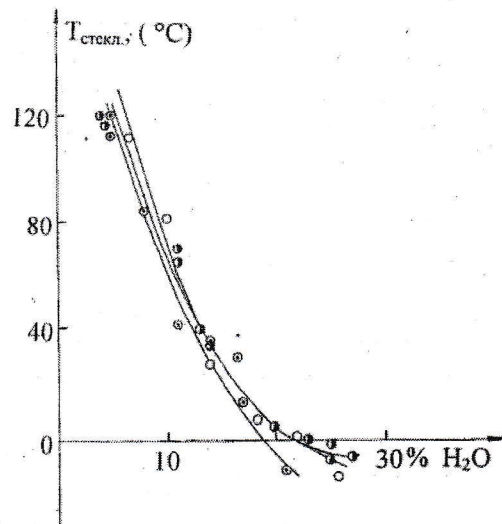


Рис.4

Рис. 4. Зависимость температуры стеклования денатурированных глобулярных белков от влажности. O—RNC-аза, O — Lys, O — Mb.

Когда количества свободной и связанной воды становятся сопоставимыми, теплоемкость белка вновь перестает зависеть от влажности. Показано, что последний результат относится не только к комнатной температуре, но также и ко всем другим в интервале до 90°C. Получено также, что при повышении температуры область интенсивного изменения теплоемкости постепенно смещается в сторону меньших влажностей, в то время как линейный участок лежит при концентрациях воды выше 50%. Отсюда можно сделать вывод, что хотя граница между связанной и свободной водой с повышением температуры смещается в сторону меньших значений влажности, завершение формирования гидратной оболочки, чему соответствует независимость теплоемкости белка от влажности, во всех случаях происходит при концентрациях воды около 50%.

ВЫВОДЫ.

Установленный нами S-образный рост теплоемкости глобулярных белков при увлажнении, как и в коллагене [6,7,11], является отражением процесса расстекловывания при нагревании влажных белков. Наблюдаемый инкремент теплоемкости представляет собой скачок C_p при стекловании. Как следствие, ниже этого скачка денатурированный белок находится в состоянии стекла, выше – в так называемом высокоэластическом состоянии [10]. Основное термодинамическое различие этих состояний, как известно [10], обусловлено проявлением при расстекловывании трансляционной сегментальной подвижности.

Переход от стеклообразного состояния к высокоэластическому при повышении температуры, так же как и переход от стеклообразного состояния к раствору при увлажнении, связан, на наш взгляд, с появлением в белке трансляционной сегментальной подвижности, запрещенной в стеклообразном состоянии [10].

В денатурированном состоянии белка проявление трансляционной подвижности находит свое отражение в виде скачка теплоемкости. Как следствие, теплоемкость денатурированного глобулярного белка в растворе должна превышать теплоемкость сухого белка, находящегося в стеклообразном состоянии, по крайней мере, на величину скачка теплоемкости при расстекловывании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ :

1. Privalov P.L., Gill S.J. // *Advances in Protein Chemistry* 1988, Vol. 39, P. 191-234.
2. Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул, Тбилиси, 1984, С.188.
3. Гасан А.И., Кашпур В.А., Малеев В.Я. // *Биофизика*, 1994, Т. 39, С. 588-593.
4. Рапли Д., Янг П., Толлин Г. Вода в полимерах / Пер. с англ.: под редакцией Г.Е.Зайкова М. 1984. С.114-136.
5. Хёве Ч. Вода в полимерах / Пер. Пер. с англ.: под редакцией Г. Е. Зайкова М., 1984. С. 137-149.
6. Церетели Г.И., Белопольская Т.В., Мельник Т.Н. // *Биофизика*, 1997, Т. 42, С. 68-74.
7. Церетели Г.И., Белопольская Т.В., Мельник Т.Н. // *Биофизика*, 1997, Т. 42, С. 584-590.
8. Белопольская Т.В., Церетели Г.И., Грунина Н.А. // *Вестник С.-Петербург. ун-та. Сер.4*, 1997, вып.4, С.66-73.
9. Suurkuusk J. // *Acta Chemica Scandinavica*, 1974, Vol. B28, P. 409-417.
10. Годовский Ю.К. Теплофизические методы исследований полимеров. М. 1976, С. 216.
11. Церетели Г.И., Смирнова О.И. // *Биофизика*, 1989, Т. 34, Вып. 5, С. 905-906.
12. Белопольская Т.В., Сочава И.В., Казицина С. Ю. // *Биофизика*, 1990, Т. 35, С. 751-755.
13. Belopolskaya T.V., Sochava I.V. // *Biophys Chem.*, 1992, V. 43, P. 1-8.