

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Том IV

1962

№ 7

ТЕРМОДИНАМИКА ПЕРЕХОДОВ СПИРАЛЬ — КЛУБОК В БЕЛКАХ

B. Г. Алдошин, С. Е. Бреслер, Е. М. Саминский

Глобулярные белки содержат в качестве основного элемента своей вторичной структуры участки α -спиралей Полинга — Кори, чередующиеся с неупорядоченными участками полипептидной цепи. Степень спиральности белковой молекулы может быть определена различными методами: по изменению оптической активности при плавлении спирали, по дисперсии оптической активности, по гипохромному эффекту в области 190 мк, по изотопному обмену водорода в связях $\text{C}=\text{O}\dots\text{HN}$. Все эти методы имеют свои слабые стороны, и только рентгеноструктурный метод дает точное и окончательное решение вопроса. Он был применен до сих пор только для гемоглобина [1] и миоглобина [2].

Спиральные участки растворенной белковой молекулы плавятся довольно резко, причем точка плавления большинства белков лежит в пределах 60—85°.

Как при всяком кооперативном переходе, для точки плавления спиралей (мы будем так называть середину интервала плавления вторичной структуры) справедливо термодинамическое соотношение

$$\Delta U - T_c \Delta S = 0 \quad \text{или} \quad T_c = \frac{\Delta U}{\Delta S},$$

где ΔU — изменение энергии одного звена при плавлении спирали, ΔS — изменение энтропии звена, T_c — температура перехода. Для количественного понимания процесса перехода спираль — клубок при проверке различных моделей белковой молекулы необходимо знать эти основные термодинамические величины. До настоящего времени в литературе существовала лишь порядковая оценка величины ΔU по температурной зависимости равновесия мочевины со своими полимерами, связанными водородными связями [3]; величина ΔU оценивалась в 1 000—2 000 кал/моль. Эти значения и служили для порядковой оценки ΔU и у белков. В настоящем исследовании была поставлена задача прямого измерения энтальпии плавления спиральной структуры белковых молекул. При этом можно было не только измерить эту величину достаточно точно для гемоглобина, степень спиральности которого известна, но, воспользовавшись энтальпией плавления гемоглобина для калибровки метода, определить степень спиральности других белков.

Экспериментальная часть

Принцип построения калориметра. Главное экспериментальное затруднение при измерении ΔU заключается в том, что переход совершается не в одной точке, а в интервале температур шириной в 10—15°. Следовательно, чтобы осуществить переход спираль — клубок, мы вынуждены нагревать раствор белка и для этого вводить в него извне значительное количество тепла. Легко видеть, что, если в калориметр помещено 100 мл 0,5%-ного раствора белка (концентрация должна быть достаточно низкой, чтобы избежать агрегации и повышения вязкости при нагревании), то весь ожидаемый тепловой эффект будет порядка 3 кал, а количество энергии, вводимое в калориметр извне, чтобы перевести систему через интервал плавления, составит 1500 кал. Ясно, что необходимо построить дифференциальную систему из двух калориметров,

одинаковых во всем, кроме того, что один содержит раствор белка в буфере, а второй — чистый буфер. Если в растворы внутри обоих калориметров вводятся точно одинаковые электрические мощности и при этом соблюдается полная адиабатичность каждого из них, т. е. отсутствие теплообмена с окружающей средой, то между калориметрами не будет возникать никакой разности температур вплоть до интервала плавления белка. Здесь вследствие поглощения тепла (изменения энталпии при плавлении порядка 3 кал) калориметр с белком отстанет от второго сосуда примерно на $0,03^\circ$. Если мы хотим измерить этот эффект с точностью до 5%, необходимо непрерывно регистрировать разность температур между обоими сосудами с точностью до $0,0015^\circ$. Далее, для соблюдения достаточной адиабатичности системы, даже если калориметры хорошо изолированы, необходимо, чтобы температура внешней оболочки все время нарастала и точно следила за ростом температуры внутри калориметров.

Задача решена с помощью оболочки, имеющей малую теплоемкость и хорошую теплопроводность.

Конструкция дифференциального динамического калориметра

На рис. 1, а, б изображен дифференциальный динамический калориметр, представляющий собой два дьюаровских сосуда *A* и *B*, заключенных в наружную алюминиевую адиабатизирующую оболочку.

Температура последней автоматически поддерживается равной температуре жидкости в сосуде *A* с точностью до $0,01^\circ$. Датчиком устройства служила медно-константановая термопара. Вторая такая же термопара служила для определения разности температур сосудов *A* и *B*. ЭДС термопары записывалась самописцем. Чувствительность при записи составляла примерно $51,000 \text{ град/мм}$. Внутри каждого из дьюаров находились: стеклянная спиральная мешалка, нагреватель из константана (сопротивлением около 150 ом) и спай термопары. Нагреватели и термопары были помещены в тонкостенные стеклянные трубы, заполненные маслом. Детали прибора и основные размеры видны из рис. 1 б.

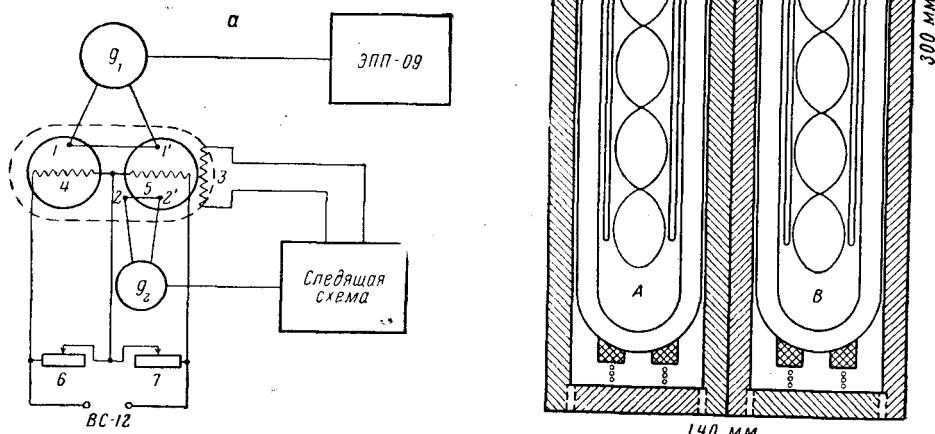


Рис. 1. а — Блок-схема прибора; б — конструкция дифференциального динамического калориметра

Автоматическое регулирование наружного терmostата осуществлялось с помощью устройства, общая схема которого изображена на рис. 2. Термопара $2-2'$ (рис. 1, а) включалась в цепь гальванометра чувствительностью $2 \cdot 10^{-8} \text{ в/мм}$. Световое пятно от гальванометра падает на фотосопротивление ФСК-1 (рис. 2), расположенное относительно гальванометра так, что при нулевой ЭДС термопары освещается половина фотосопротивления. Последнее включается в схему фазовращателя, напряжение с которого управляет током тиристоров ТГ-3 0,1/1,3. Чем меньше регулируемая мощность, тем большую точность регулировки может обеспечить такая схема без опасности самовозбуждения.

В нашем случае регулировалось около 25% всей мощности нагревателя 3 (рис. 1, а), составлявшей в среднем около 25 вт. По мере нагревания необходимое среднее зна-

чение регулируемой мощности устанавливалось через каждые $10-15^\circ$ с помощью автотрансформатора (рис. 2). Запись разности температур между калориметрами производилась следующим образом. ЭДС термопары 1-1' (рис. 1, а) поступала на зеркальный гальванометр типа М 21/3 с чувствительностью $5 \cdot 10^{-9} \text{ в/мм}$. Световое пятно гальванометра освещало фотосопротивление ФСК-1, включенное в диагональ моста, питаемого переменным напряжением, причем ФСК-1 было закреплено на каретке пишущего потенциометра ЭПП-09. Напряжение с диагонали моста поступало непосредственно на вход усилителя ЭПП-09. Изменение освещенности ФСК-1 приводило к нарушению баланса моста, вызывая движение каретки. Фаза питания моста выбиралась таким образом, чтобы каретка двигалась все время за световым пятном гальванометра, осуществляя тем самым запись возникающей ЭДС дифференциальной термопары.

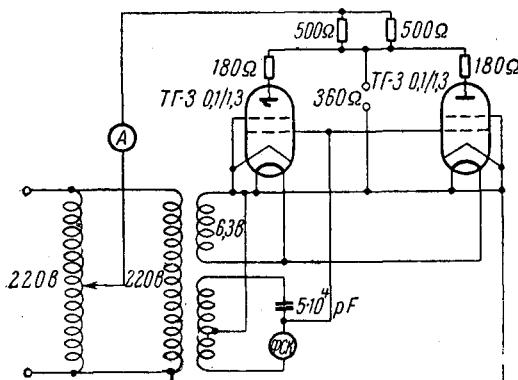


Рис. 2. Схема следящей системы
адиабатизирующей оболочки

Процедура измерений и расчетов

В дьюаровские сосуды заливали точно равные объемы (85 мл) раствора белка и растворителя, выбирали режим нагрева (обычно $0,3^\circ/\text{мин.}$) и, шунтируя один из нагревателей (4 или 5 рис. 1, а), магазином сопротивлений 6 или 7 добивались равен-

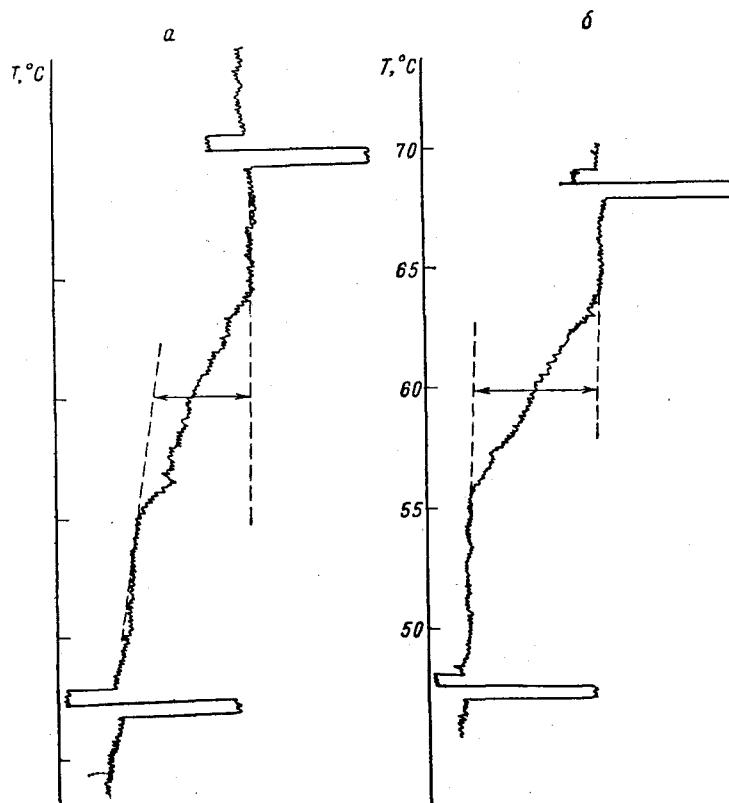


Рис. 3. Термограммы плавления гемоглобина:
а — белка 0,554 г, энталпия плавления 5,76 кал; б — белка 0,843 г, энталпия плавления 7,78 кал

ства скоростей нагрева обеих частей калориметра. При этом условии ЭДС дифференциальной термопары была равна нулю и самописец регистрировал нулевую прямую вплоть до начала плавления спиральной структуры белковых молекул. Тепловой эффект перехода спираль — клубок наблюдался в виде излома на термограмме. Примеры таких термограмм приведены на рис. 3, а, б. Калибровку прибора проводили в начале и в конце каждого опыта с помощью импульсов джоулева тепла. Так как электрические параметры нагревателей точно известны, то количества тепла, вводимые в один из сосудов в процессе калибровки, были точно известны (с погрешностью меньше 1%).

Оценка точности измерений

Точность измерений зависит в основном от флуктуаций температуры в местах расположения термопар, а также от степени адиабатичности и симметрии системы. Флуктуации температур в основном зависят от качества перемешивания жидкости, так как в систему вводится большая мощность. С другой стороны, мешалки должны быть достаточно тихоходными, чтобы избежать выделения тепла от трения, особенно неприятного благодаря изменению вязкости при денатурации белков. Применявшиеся стеклянные мешалки вращались синхронным двигателем со скоростью 70 об/мин. Однако при скоростях нагрева, существенно больших, чем 0,3°/мин., наблюдались значительные флуктуации нулевой линии, влияющие на точность измерений. Поправку на неадиабатичность и несимметричность системы вводили графически (рис. 3, б). Суммарная поправка составляла обычно 10—20% от всего эффекта, а точность ее определения можно оценить в 2—3% от эффекта. Общую погрешность измерения, возникающую от вышеперечисленных причин, можно считать равной $\pm 0,25$ кал. Такая оценка погрешности подтверждается воспроизводимостью результатов измерений на модельном веществе — парафиновом углеводороде — дицетиле, для которого была измерена теплота плавления (при 70,2°) [4].

В настоящее время проводится работа по дальнейшему усовершенствованию прибора путем устранения остающихся потерь тепла, которые имеют существенное значение при приближении к 100°.

Объекты измерений

Как было упомянуто выше, в качестве белка, о котором имеются исчерпывающие данные по рентгеноструктурному анализу, нами был взят гемоглобин (лошади). Кроме гемоглобина, мы исследовали яичный альбумин, сывороточный альбумин (лошади) и γ -глобулины (человека).

Перед постановкой калориметрических опытов все препараты подвергались поликриSTALLИЧЕСКОМУ исследованию. Полученные значения $[\alpha]_0$ для всех белков находились в хорошем соответствии с литературными данными [5]. Все белки перед измерениями диялизовались против воды и буфера. Концентрации растворов белков определялись как по поглощению при 280 м μ , так и анализом на азот.

Результаты измерений

Калориметрические опыты проводили в условиях, для которых раньше были изучены кривые плавления вторичной структуры белков по изменению оптической активности [6]. Применялись следующие буфера: для гемоглобина — Tris pH 7,0, $\mu = 0,2$, для сывороточного альбумина и яичного альбумина — борат pH 9,15, $\mu = 0,2$, для γ -глобулина — борат pH 9,4, $\mu = 0,2$.

На рис. 4 представлены результаты измерений теплот плавления белковых спиралей, отнесенных к граммолекуле соответствующих средних аминокислотных остатков белка. По оси ординат отложена теплота плавления в калориях на моль остатков, по оси абсцисс — весовая концентрация растворенного белка. Опыты проводили при нескольких концентрациях, чтобы исключить возможное влияние теплоты агрегации белка, которая растет с концентрацией белка в растворе. Опыт показывает, что в случае

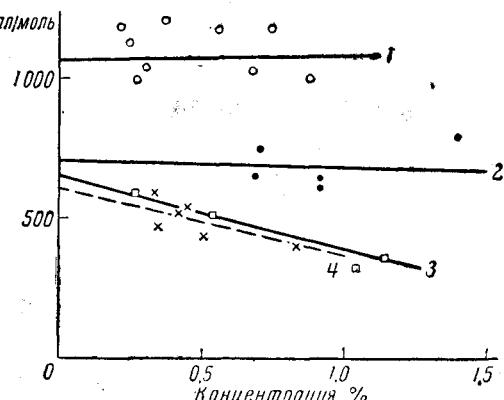


Рис. 4. Результаты измерений:
 1 — гемоглобин; 2 — сывороточный альбумин лошади;
 3 — яичный альбумин; 4 — γ -глобулин человека

яичного альбумина и γ -глобулина учет агрегации имеет существенное значение. Измеренные теплоты экстраполировали к нулевой концентрации белка; при этом теплота агрегации исключается.

Белок	ΔU , кал/звено	Степень спиральности по		
		ΔU	$[\alpha]_D$	θ_0
Гемоглобин Л	1080	75*	—	—
Сывороточный альбумин Л	700	50	48	52
Яичный альбумин	650	48	48	45
γ -Глобулин	600	43	47	—

* Взято из рентгеноструктурного анализа.

В таблице представлены результаты измерений энталпий перехода для исследованных белков.

Исходя из известного значения степени спиральности для гемоглобина, равного 75%, и найденного нами значения теплоты плавления, можно рассчитать изменение энталпии при плавлении на моль звеньев идеальной спирали Полинга — Кори $\Delta U_{\text{ид}} = 1080/0,75 = 1400$ кал/моль. Это значение энергии относится к разрыву одной водородной связи. Вторая графа дает значения степени спиральности остальных белков, рассчитанных, исходя из этой цифры, и измеренных энталпий плавления. Третья и четвертая графы дают степени спиральности для тех же белков, рассчитанные из величины оптической активности и дисперсии оптической активности (по литературным данным) [5].

Обсуждение результатов

Представленные данные позволяют найти энергию ΔU на звено цепи в идеальной спирали Полинга — Кори. Эта величина 1400 кал/моль относится к разрыву одной водородной связи карбонильного кислорода с имидным водородом и замещению ее на связи с молекулами воды. Следовательно, это разностный эффект. Тот факт, что степень спиральности обоих альбуминов, вычисленная из энталпии перехода, отлично совпадает с данными оптических измерений, свидетельствует об универсальности измеренной величины ΔU . Это само по себе интересно, так как показывает, что энергия плавления на звено спирали не зависит от специфичности белка, т. е. от его вторичной и третичной структуры. Из термодинамического соотношения следует, что вариация температуры плавления разных белков:

$$\frac{\delta T_c}{T_c} = \frac{\delta \Delta U}{\Delta U} + \frac{\delta \Delta S}{\Delta S}. \quad (1)$$

Если вариация температуры целиком определяется вариацией энергии ΔU , то для крайних случаев среди известных белков

$$\frac{\delta \Delta U}{\Delta U} = \frac{\delta T_c}{T_c} = \frac{25}{340} \approx 7,5\%.$$

Таковы незначительные колебания, которые должны наблюдаться у различных белков. Поэтому найденное выше совпадение вполне понятно. Из соотношения (1) сразу же следует, что и для одного белка, плавление которого производится в разных средах, сохраняется универсальность величины ΔU .

Из этой величины и среднего значения температуры плавления $T_c = 340^\circ$ К мы определим изменение энтропии одного звена при переходе спираль — клубок

$$\Delta S = \frac{\Delta U}{T_c} = \frac{1400}{340} = 4,1 \text{ ед. энтропии.}$$

Если трактовать изменение энтропии звена как результат возникновения в вращательных степенях свободы у звена при переходе от жесткой спирали к неупорядоченному клубку, то, воспользовавшись выражением для энтропии роторатора, получим:

$$\Delta S = \frac{vR}{2} \ln \frac{T_c}{T_0},$$

где R — газовая постоянная, T_c — температура перехода, T_0 — квантовая постоянная, так называемая температура вырождения, зависящая от момента инерции роторатора I , $T_0 = h^2/8\pi^2 e k I$ (h — постоянная Планка, k — постоянная Больцмана, e — заряд электрона), что по порядку величины близко к 1° К.

Отсюда $\ln T_c / T_0 \approx 6$ и $v = 0,7$, что вполне естественно, так как полипептидная цепь не столь уж гибкая, чтобы в каждом звене осуществлялась свобода вращения.

Выводы

- Построен прибор, позволяющий измерить изменение энталпии перехода спираль — клубок в глобулярных белках.
- Измерены энталпии перехода для гемоглобина лошади, яичного альбумина, сывороточного альбумина (лошади) и γ -глобулина (человека).
- Степени спиральности, рассчитанные из калориметрических измерений, находятся в хорошем согласии с данными оптических измерений.
- Универсальность значения ΔU для различных белков еще раз подчеркивает преобладающее значение водородных связей во вторичной структуре белков.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
12 III 1962

ЛИТЕРАТУРА

- M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will, A. C. T. North, Nature, 185, 416, 1960.
- I. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, D. C. Phillips, V. C. Shore, Nature, 185, 422, 1960.
- F. Gucker, H. Pickard, J. Amer. Chem. Soc., 62, 1947; 1940.
- Р. Д. Оболенцев, Физические константы углеводородов, жидких топлив и масел, Гостопиздат, 1953.
- P. Doty, Collections, 22, 5, 1957.
- С. Е. Бреслер, В. П. Кушнер, С. Я. Френкель, Биохимия, 24, 685, 1959.

THERMODYNAMICS OF THE HELIX—COIL TRANSITION IN PROTEINS

V. G. Aldoshin, S. E. Bresler, E. M. Saminskii

Summary

The energy change in globular proteins during thermal denaturation has been measured with the aid of a differential, adiabatic, dynamic calorimeter. Hemoglobin, serumalbumin, (horse) ovalbumin and γ -globulin (human) served as the objects of investigation. The degree of helicity calculated for these proteins from the calorimetric measurements is in good agreement with optical data. The numerical value for the enthalpy of melting of hydrogen bonds in the helical parts of protein molecules has been determined. This is equal to 1400 cal/mole per hydrogen bond.