

ТЕРМОДИНАМИКА НАТИВНОЙ СТРУКТУРЫ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА

Хечинашвили Н.Н., Кондратьев М.С.

Институт биофизики клетки РАН

г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: nikolay@icb.psn.ru

Поступила в редакцию: 08.07.2020

Аннотация. Проведен анализ температурной зависимости теплоемкости нативной структуры глобулярных белков в водном растворе. Показано, что эта зависимость линейна. Это обусловлено составляющими вкладками вибрационной и конформационной теплоемкости и свидетельствует об отсутствии фазовых переходов второго рода вплоть до начала основного конформационного перехода. Макромолекула белка имеет двухуровневую организацию пространственной структуры. Внутренняя область белка представляет собой «ядро», ответственное за устойчивость глобулярной структуры. Боковые радикалы аминокислотных остатков поверхностного слоя динамичны и составляют основу биологической функции белка.

Ключевые слова: энергия связей, энтропия, свободная энергия.

Введение.

Абсолютная свободная энергия Гиббса является фундаментальным параметром, характеризующим нативное состояние глобулярных белков в водной среде. Последнее представляется важным фактором для формирования трехмерной структуры глобулярного белка и определяет термодинамическое поведение белка [1-3]. Знание численного значения энергии Гиббса важно для понимания пределов стабильности трехмерной структуры и представляется необходимым для анализа биохимических реакций при выполнении белками множества функционально важных задач. К числу таких задач относятся связывание лигандов белками, белок-белковых и белок-ДНК взаимодействий. В предыдущей работе [4] нами предложен подход для оценки численных значений термодинамических параметров – абсолютной свободной энергии и энтропии, характеризующих нативную конформацию глобулярных белков в водном окружении. Он основан на знании энергии слабых внутримолекулярных взаимодействий, полученной с помощью анализа процесса температурно-индуцированного разворачивания в водной среде и полуэмпирических расчетов. Наиболее ответственным моментом в предлагаемом подходе являлось утверждение, что с процессом прогрева нативного белка в растворе ее свободная энергия убывает и становится близка нулю в пред-переходном состоянии. В настоящей работе приведены термодинамические свойства прогреваемого раствора нативного белка, касающихся температурной зависимости парциальной теплоемкости, и на основе имеющихся данных проведен анализ термодинамических и структурных свойств глобулярных белков.

Температурная зависимость теплоемкости белка в водном растворе.

Экспериментальные данные микрокалориметрии свидетельствуют, что температурная зависимость парциальной теплоемкости белка в водном растворе линейна. Для компактных глобулярных белков при температуре 293 К она одинакова и равна, $[C]_p^{pr} = 0,31 \pm 0,02$ кал g^{-1} град $^{-1}$ (1 кал = 4,184 Дж) [5]. Это значение является интегральной величиной и определяется суммой вкладов двух составляющих

$$[C]_p^{pr} = [C]_p^{vib} + [C]_p^{conf} \quad (1)$$

где $[C]_p^{pr}$ – парциальная теплоемкость белка в водном растворе, $[C]_p^{vib}$ – теплоемкость вибрационных мод, обусловленная вкладками ковалентно связанных атомов и рассчитана с применением инфракрасной и Раман-спектроскопии [6]. Ее численное значение равно, $[C]_p^{vib} = 0,25$ кал g^{-1} град $^{-1}$. Тогда значение конформационной составляющей, обусловленная вкладками боковых цепей, составляет, $[C]_p^{conf} = 0,06$ кал g^{-1} град $^{-1}$. Эту величину можно оценить также, используя значение конформационной энтропии, полученной нами на основе полуэмпирических расчетов Table 3 [4]. В качестве примера можно воспользоваться данными, например, для лизоцима со значением конформационной энтропии равной, $S^{conf} = 36,5$ Дж/К моль остатка. Взаимосвязь между энтропией и теплоемкостью, предложенная в работе [7] для вибрационной компоненты $C_p^{vib} = S^{vib} / 1,05$ справедливо и для конформационной составляющей, характеризуемая флуктуациями боковых цепей аминокислотных остатков. Тогда будем иметь $[C]_p^{conf} = S^{conf} / 1,05 = 36,5/1,05 = 34,8$ Дж/ К моль остатка = 0,07 кал g^{-1} град $^{-1}$ и на основании равенства (2) для теплоемкости белка имеем $[C]_p^{pr} = 0,25 + 0,07 = 0,32$ кал g^{-1} град $^{-1}$. Это значение находится в пределах экспериментальной ошибки, полученной методом сканирующей калориметрии. Линейная температурная зависимость теплоемкости определяется как сумма вкладов вибрационной и конформационной компонент

$$d[C]_p^{pr}/dT = d[C]_p^{vib}/dT + d[C]_p^{conf}/dT \quad (2)$$

Численные значения $d[C]_p^{pr}/dT = (2,2 \pm 0,5) \times 10^{-3}$ кал g^{-1} град $^{-2}$ [1] и $d[C]_p^{vib}/dT = 1 \times 10^{-3}$ кал g^{-1} град $^{-2}$ [2] и тогда для конформационной составляющей она равна, $d[C]_p^{conf}/dT = 1,2 \times 10^{-3}$ кал g^{-1} град $^{-2}$. Из полученных данных

видно, что парциальная теплоемкость вибрационных мод ковалентно связанных атомов при 293 К превосходит конформационную составляющую парциальной теплоемкости белка приблизительно в четыре раза парциальную теплоемкость боковых цепей аминокислотных остатков, обусловленная в основном вкладами поверхностных остатков. Близкие значения температурных зависимостей теплоемкостей $d[C]_p^{conf}/dT$ и $d[C]_p^{vib}/dT$ свидетельствует о том, что интенсивность роста конформационной теплоемкости с температурой выше по сравнению с температурной зависимостью теплоемкости вибрационных мод. Из данных ЯМР следует, что боковые цепи остатков на поверхности глобулы претерпевают крупномасштабные флуктуации и участвуют в непрерывном процессе разрушения и образования водородных связей с участием полярных и заряженных остатков [4, 8]. На основании имеющихся результатов можно сделать вывод о том, что линейная температурная зависимость парциальной теплоемкости белка, в исследуемой области температур, свидетельствует об отсутствии фазовых переходов второго рода, связанных с изменением объема или иных признаков конформационных изменений в структуре белка вплоть до начала кооперативного разрушения ее трехмерной структуры. Основываясь на данных, приведенных выше, о свойствах теплоемкости белка и ее температурной зависимости в водном растворе, и в соответствии с равенством

$$G^{NC}(T) = E - T_{tr} \cdot S^{NC} \quad (3)$$

(где G^{NC} – абсолютная свободная энергия нативной конформации белка, E – энергия внутримолекулярных связей, S^{NC} – энтропия нативной конформации белка) можно утверждать, что с ростом температуры абсолютная свободная энергия, $G^{NC}(T)$, убывает в результате возрастающей с температурой энергии теплового движения, $T \cdot S^{NC}$. В пред-переходном состоянии при температуре, близкой к температуре кооперативного конформационного перехода белок сохраняет все элементы нативной структуры, определяемое нами как референтное состояние [4]. В этом состоянии энергия теплового движения становится сопоставимой с энергией слабых связей, приводя значение свободной энергии нативного белка близкое к нулю. Значение конформационной энтропии определяется как $S^{NC} = E/T_{tr}$. Энергия слабых связей в компактных белках с массой 7-24 кДа одинакова и составляет $12,8 \pm 0,8$ кДж/моль остатка, T_{tr} – температура перехода. Основополагающий вывод состоит в том, что конформационная энтропия нативного белка, S^{NC} , определяемая в основном преобладающим вкладом поверхностных остатков, является независимым от температуры параметром. Такой вывод основан на данных ЯМР белков и состоит в том, что подвижные боковые цепи на поверхности белка формируют конформационное пространство, в пределах которого индивидуальный остаток реализует множество изоэнергетических ротамерных состояний. В рассматриваемой модели допускается, что с повышением температуры число ротамеров остается неизменным, но при этом возрастает частота перескоков из одного конформационного состояния в другое. Численное значение S^{NC} анализируемых белков при 298 К находится в пределах, 34,4-39,1 Дж/К моль остатка. Рассчитываемые значения абсолютной свободной энергии белков, G^{NC} , в соответствии с равенством (3) при 298 К находятся в пределах 1,15-2,55 кДж/моль остатка близкое к значению энергии теплового движения, определяемая величиной kT . Отсюда следует, что нативная структура белка находится на грани стабильности.

Заключение.

Современное представление о пространственно- организационной структуре и динамических свойствах глобулярных белков в водном растворе является результатом прогрессивного развития методов РСА и ЯМР и опубликованных работ за последние, примерно, 25 лет. К примечательной особенности глобулярного белка следует отнести две структурные области, несущие разную функциональную нагрузку. Внутренняя область представляется как плотное ядро, сформированное неполярными боковыми цепями остатков и элементами вторичной структуры, включающими α - и β -конформации, как основной источник водородных связей. На поверхности белка располагаются преимущественно полярные и заряженные боковые цепи аминокислотных остатков. Они обладают высокой подвижностью, оцениваемые пикосекундным интервалом времени [7]. Каждая боковая цепь формирует конформационное пространство, в пределах которого она изоэнергетически преобразуется из одного конформационного состояния в другое и несет определяющую нагрузку по функциональной обеспеченности белков-ферментов. Из анализа равенства (3) для ядра макромолекулы следует ожидать высокое значение свободной энергии, обусловленное энергией слабых внутримолекулярных взаимодействий, E , и низкого значения величины $T \cdot S^{conf}$, а свободная энергия поверхности нативного белка должна быть близка к нулю. Отсюда также можно заключить, что энергетический барьер, разделяющий конформационное состояние остатков крайне низок. Это важное свойство белков-ферментов и оно обеспечивает выполнение функциональных задач – катализ биохимических реакций, а также белок-белкового и белок-ДНК узнавания. Эту роль выполняют аминокислотные остатки, целенаправленно располагающиеся на поверхности белка, формируя активные центры. Современные данные о разнообразии белков с различной структурной организацией и функциональными свойствами позволяют заключить, что внутриклеточный синтез белка является результатом генетически детерминированного процесса посредством переноса генетической информации по пути ДНК – мРНК – рибосомальный комплекс [9-11]. Детерминированность синтеза белка включает в себя прямолинейные тяжи полипептидной цепи, повороты, формирование вторичной структуры и гидрофобного ядра, и дальнейшее приобретение функционально активных форм нативного белка с участием системы шаперонов. Что касается формирования пространственной структуры белка с заданными свойствами, нам представляются прогрессивными работы по поиску механизма трехмерного конструирования структуры

белка [12]. Они указывают на взаимосвязь между торсионными ϕ , ψ углами основной и χ_1 углами боковой цепи, зависящими от типов аминокислотных остатков. Серьезность таким выводам придают работы по обнаружению высоких численных значений энергетических барьеров вращения вокруг NC^α и C^αC связей основной цепи [13 и ссылки в ней]. Этим, по-видимому, можно объяснить, что энергия теплового движения (энтропийный фактор) не способна полностью преодолеть энергетические барьеры и развернуть полипептидную цепь белка. В таком случае справедливее говорить о тепловой денатурации, а также о денатурации химическими агентами, как о процессе перехода типа «порядок-беспорядок» в состояние клубка с разрушенными внутримолекулярными слабыми связями и гидратированной поверхностью остатков во внутренней области белка. По мере удаления возмущающего фактора и благодаря свойствам полипептидной цепи, структура белка будет возвращаться в исходное нативное состояние. По-видимому, справедливее говорить о целенаправленном ко-трансляционном механизме синтеза белка на рибосоме.

Список литературы / References:

1. Lumry R., Biltonen R. (1969). Thermodynamic and kinetic aspects of protein conformations in relation to physiological functions. In Timasheff S.N., Fasman G.D. (Eds.). *Structure and stability of biological macromolecules*, New York, M. Dekker, pp. 65-212.
2. Brandts J.F. Conformational transition of proteins in water and in aqueous mixture. In Timasheff S.N., Fasman G.D. (Eds.). *Structure and stability of biological macromolecules*, New York: M. Dekker, 1969, pp. 213-220.
3. Creighton Th.E. Protein folding. *Biochem. J.*, 1990, vol. 270, pp. 1-16.
4. Khechinashvili N.N., Kabanov A.V., Kondratyev M.S., Polozov R.V. Thermodynamics of globular proteins. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2018, vol. 36, no. 3, pp. 701-710.
5. Privalov P.L., Khechinashvili N.N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study. *J. Mol. Biology*, 1974, vol. 86, pp. 665-684.
6. Kanehisa M.I., Ikegami A. Structural changes and fluctuations of proteins. II. Analysis of the denaturation of globular proteins. *Biophys. Chemistry*, 1977, vol. 6, pp. 131-149.
7. Sturtevant J.M. Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1977, vol. 74, pp. 2236-2240.
8. Jarymowycz V.A., Stone V.J. Fast time scale dynamics of protein backbones NMR relaxation methods, applications and functional consequences. *Chemical Reviews*, 2006, vol. 106, pp. 1624-1671.
9. Petermann M.L. The physical and chemical properties of ribosomes. *Elsevier Publ. Co. Amsterdam-London-New York*, 1964.
10. Roberts R.B. Studies of macromolecular biosynthesis. *Carnegie Institution*, Washington, 1964.
11. Спиринов А.С., Гаврилова Л.П. *Рибосомы*. М.: «Наука», 1979. [Spirin A.S., Gavrilova L.P. *Ribosomy*. М.: «Наука», 1979. (In Russ.)]
12. Chakrabarti P., Pal D. Review. The interrelationships of side-chain and main-chain conformations in proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2001, vol. 76, pp. 1-102.
13. Basharov M.A. The internal rotational barriers about NC^α and C^αC backbone bonds of polypeptides. *Eur. Biophys. J.*, 2012, vol. 41, pp. 53-61.
14. Tanford C. Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, 1968, vol. 23, pp. 121-282.

THERMODYNAMICS OF GLOBULAR PROTEINS NATIVE STRUCTURE

Khechinashvili N.N., Kondratyev M.S.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences
Pushchino, 142290, Russia; e-mail: nikolay@icb.psn.ru

Abstract. The analysis of the temperature dependence of the heat capacity of the native structure of globular proteins in an aqueous solution is carried out. It is shown that this dependence is linear. This is due to the constituent contributions of the vibrational and conformational heat capacity and indicates the absence of second-order phase transitions up to the start of the main conformational transition. The protein macromolecule has a two-level organization of spatial structure. The inner region of the protein is the “core” responsible for the stability of the globular structure. Lateral radicals of amino acid residues of the surface layer are dynamic and form the basis of the biological function of the protein.

Key words: bond energy, entropy, absolute free energy.