



УДК 577.11

МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ
FOLCH-PI-АПОПРОТЕИНА*Мревлишвили Г. М., Джапаридзе Г. Ш., Сохадзе В. М.,
Чанчалашвили З. И.**Институт физики Академии наук ГССР, Тбилиси**Альфсен А., Нико К.**Отдел биохимии медицинского факультета Университета им. Р. Декарта,
Франция, Париж*

Методом низкотемпературной сканирующей микрокалориметрии изучена гидратация типичного «внутреннего» белка мембран — Folch-Pi-апопротеина, характеризующегося большим содержанием гидрофобных аминокислотных остатков. Выявлен аномальный характер гидратации этого белка. Показано, что Folch-Pi-апопротеин имеет малое сродство к полярному растворителю и в водной среде образует полимеризованный агрегат, состоящий из 3 или 4 субъединиц. Структура агрегата стабилизирована сильными гидрофобными взаимодействиями; процесс образования четвертичной структуры в водной среде сопровождается значительной дегидратацией мономерных единиц и увеличением жесткости (термостабильности) структуры агрегата.

В настоящее время принято считать, что структура мембран формируется в результате специфического взаимодействия фосфолипидов с белками двух классов: молекул белков, «пронизывающих» двойной слой фосфолипидов («внутренние» белки мембран), и белков, «адсорбированных» на поверхности бислоя липидов. Остается невыясненным, какова истинная природа сил, определяющих такое распределение белков в мембране. Кроме того, до настоящего времени нет прямых данных о характере взаимодействия внутренних мембранных белков с молекулами растворителя, т. е. сольватации этих макромолекул и роли белково-водного комплекса в термической стабильности мембран.

Folch-Pi-апопротеин является типичным «внутренним» белком мембран с большим содержанием гидрофобных аминокислотных остатков (см. [1] и таблицу). Было показано, что в органических растворителях апопротеин существует в виде мономера с молекулярным весом ≈ 20000 . В водных растворах апопротеин образует полимеризованную структуру с большим молекулярным весом ($\sim 60\ 000$), состоящую из трех субъединиц. Было показано также, что в водной среде процесс полимеризации мономеров не сопровождается образованием β -структуры, и высказано предположение, что основным фактором, определяющим стабильность комплекса, являются сильные гидрофобные взаимодействия [2].

Цель настоящей работы — выяснение механизмов сольватации этого белка в водной среде. Этот вопрос является принципиальным, так как, во-первых, гидратация макромолекул Folch-Pi-апопротеина до настоящего времени не исследовалась и, во-вторых, характер и величина гидратации во многом могут определить как механизм полимеризации белка в водной

**Характеристика гидратации аминокислотных остатков
Folch-Pi-апопротеина**

| Амино- кислотные остатки | Число остатков на моль [1] | Число гидрата- ции, моль H ₂ O/моль остатка [9] | Σ чисел гидра- тации, моль H ₂ O |
|--------------------------------|-------------------------------|---|--|
| Asp | 9,0 | 2 | 18,0 |
| Thr | 16,5 | 3 | 49,5 |
| Ser | 9,9 | 2 | 19,8 |
| Glu | 12,5 | 3 | 37,5 |
| Pro | 6,1 | 2 | 12,2 |
| Gly | 20,7 | 1 | 20,7 |
| Ala | 24,0 | 1 | 24,0 |
| Val | 14,5 | 1 | 14,5 |
| Cys | 9,3 | — | — |
| Met | 2,5 | 1 | 2,5 |
| Pe | 9,9 | 1 | 9,9 |
| Leu | 22,5 | 1 | 22,5 |
| Tyr | 10,4 | 3 | 31,2 |
| Phe | 16,9 | 0 | 0 |
| Trp | — | 2 | — |
| Lys | 9,3 | 4 | 37,2 |
| His | 4,5 | 4 | 18,2 |
| Arg | 5,5 | 3 | 16,5 |

среде, так и термодинамическую стабильность отдельных мономеров и целого комплекса.

Для измерения гидратации апопротеина использовали метод низкотемпературной сканирующей микрокалориметрии [3–5] (см. рис. 1).

Температурные зависимости избыточной теплоемкости растворов апопротеина в области фазового перехода лед — вода при различных концентрациях полимера (рис. 2а, б) показывают, что увеличение концентрации полимера приводит к смещению температурного интервала фазового перехода воды в сторону низких температур (относительно точки плавления чистой воды — 0°) и к расширению интервала плавления. Качественно такая картина наблюдается для всех биополимеров (глобулярных и фибриллярных белков, нуклеиновых кислот и др.; см. работу [7], в которой приводятся экспериментальные результаты калориметрического исследования фазового перехода воды в растворах биополимеров и теоретические данные, объясняющие причину «вырождения» резкого фазового перехода воды в размазанный переход типа «порядок — беспорядок»). Однако количественные значения термодинамических параметров фазового перехода воды в растворах биополимеров (температура, ширина температурного интервала, энтальпия и энтропия плавления) зависят от конкретной конформации макромолекул и определяются характером взаимодействия биополимеров с растворителем [3, 7].

Сравнение термодинамических параметров фазового перехода воды в растворах апопротеина с термодинамическими величинами, наблюдаемыми в растворах ряда белков (гемоглобин, миоглобин, овальбумин и др. [7]), свидетельствует о том, что в данном случае мы имеем дело с резко отличающимся механизмом взаимодействия макромолекул белка с молекулами растворителя. Так, например, обращает на себя внимание тот факт, что даже при высоких концентрациях белка (~60–80% по весу; кривая 2 на рис. 2а и 2б) пик теплопоглощения все еще достаточно острый и «точка перехода» (максимум пика теплопоглощения) смещена в сторону низких температур относительно 0°: всего лишь на 3° для 61% раствора и на 7° для 77% раствора. Для макромолекул, оказывающих сильное влияние на окружающие слои воды, при соответствующих концентрациях температурные «точки» фазовых переходов воды смещены относительно 0° на 10–20° в сторону низких температур. Так, например, в водных растворах ДНК

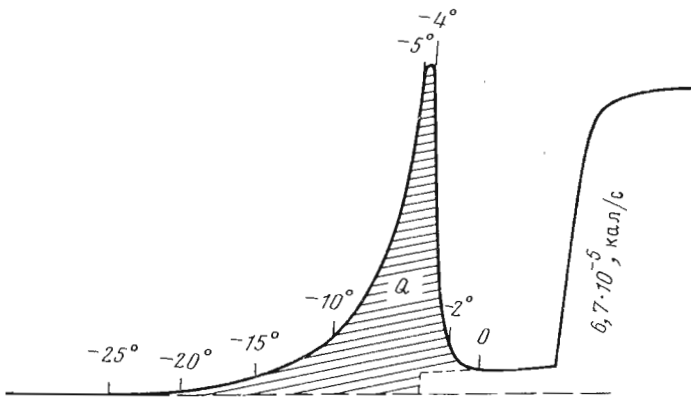


Рис. 1. Микрокалориметрическая запись процесса теплопоглощения, наблюдаемого в водных растворах Folch-Ri-апопротеина в температурной области фазового перехода лед - вода (вес образца 4,26 мг; концентрация белка 61,5% (по весу); скорость прогрева 13°/ч; в конце кривой дана калибровочная метка; Q - площадь, соответствующая теплоте плавления)

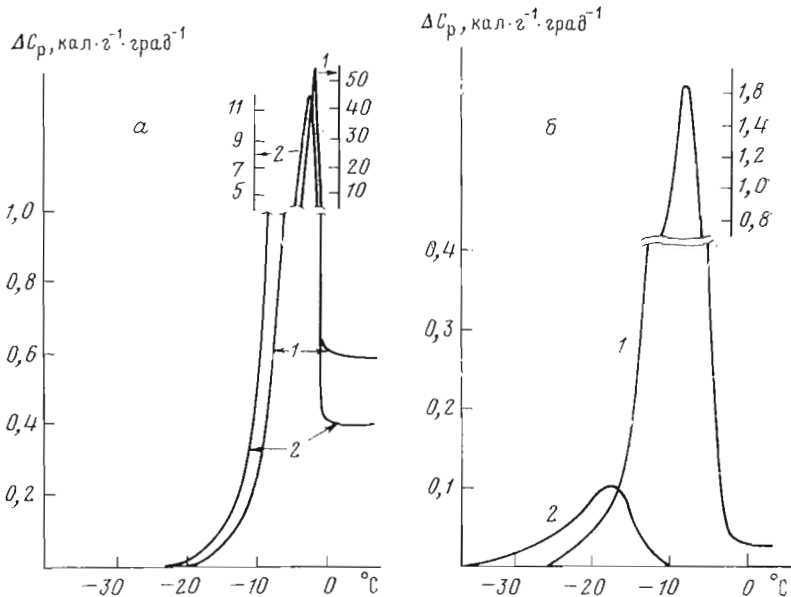


Рис. 2. Температурная зависимость изменения теплоемкости водных растворов Folch-Ri-апопротеина при различных концентрациях белка (вес. %): а: 1 - 10; 2 - 64; б: 1 - 77; 2 - 90

при концентрации ДНК, равной 60 вес.%, максимум сильно размытого пика теплопоглощения фазового перехода воды расположен при -22° (рис. 3); при концентрации ДНК, равной 65%, пик теплопоглощения вообще отсутствует [3]. Для глобулярных белков температура максимума пика теплопоглощения, соответствующего плавлению воды, при концентрациях полимеров 60-70% колеблется от -10 до -5° [7]. Кроме того, как подчеркивалось, ширина температурного интервала плавления воды в растворах апопротеина существенно меньше, чем в растворах других биополимеров. Необходимо отметить также величину скачка теплоемкости (δC_p) после фазового перехода. δC_p в растворах апопротеина соизмеримо с $\delta C_{p(\text{лед-вода})}$ (0,4-0,6 кал/г·град).

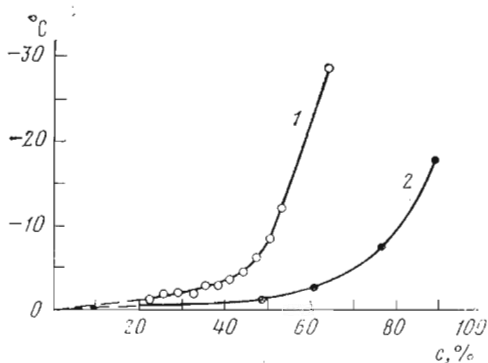


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость температуры плавления воды от концентрации Folch-Pi-апопротеина (2) (для сравнения приведена аналогичная зависимость, наблюдаемая в водных растворах ДНК (1) [3])

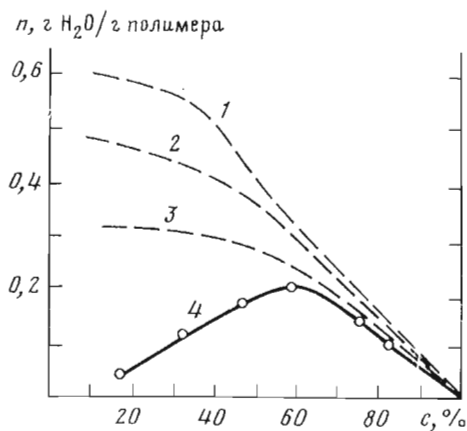


Рис. 4

Рис. 4. Кривые гидратации для различных биополимеров в водных растворах (ДНК (1), коллаген (2), глобулярные белки (3) [3, 7]) и Folch-Pi-апопротеина (4). n — число гидратаций

Таким образом, приведенные данные показывают, что характер взаимодействия макромолекул апопротеина с водой существенно отличается от механизмов гидратации других биополимеров, исследованных нами ранее методами калориметрии. Термодинамические параметры фазового перехода воды свидетельствуют о том, что Folch-Pi-апопротеин характеризуется малым сродством к водному окружению и макромолекулы этого белка незначительно влияют на структуру окружающих слоев воды.

Прямым подтверждением этому служит кривая гидратации апопротеина, построенная нами исходя из термодинамических величин фазового перехода воды (см. «Экспериментальную часть») при различных влажностях белка. «Колоколообразная» форма кривой гидратации необычна. Правая ветвь зависимости (концентрационный интервал между полностью дегидратированным белком и 60% раствором) отражает процесс постепенного насыщения гидратационных центров макромолекул и формирования гидратных «оболочек» белка. Монотонный характер роста количества связанной воды (число гидратации, n) в этом интервале влажностей не отличается качественно от картины, наблюдающейся для других биополимеров. Однако после достижения концентраций, при которых начинается полное растворение полимера и образование изотропного раствора, степень гидратации начинает резко уменьшаться и в разбавленных растворах количество связанной воды минимально.

Чтобы наглядно представить «аномальный» характер гидратации апопротеина, на рис. 4 приводятся типичные кривые гидратации для нуклеиновых кислот, фибриллярных белков и глобулярных белков. Из приведенных зависимостей видно, что, несмотря на некоторые различия в характере кривых гидратации, обусловленных структурными различиями макромолекул, для всех случаев, кроме Folch-Pi-апопротеина, наблюдается постепенное завершение построения гидратных слоев, приводящее в конечном итоге к формированию изотропного разбавленного раствора макромолекул.

«Аномальный» ход кривой гидратации апопротеина требует особого рассмотрения.

Проанализируем, насколько может быть стабильной в водной среде мономерная единица апопротеина, исходя из общих критериев стабильности глобулярных белковых структур, предложенных в хорошо известных ра-

ботах Фишера [8]. Как известно, основным параметром в модели Фишера является отношение объемов, занимаемых полярными (V_p) и неполярными (V_n) остатками, т. е. отношение числа полярных и неполярных остатков $P=V_p/V_n$. Сравнение теоретической зависимости $P=f(V_i)$ (где $V_i=V_p+V_n$, т. е. молекулярный вес белка), полученной для сферической молекулы, с экспериментальными значениями P и V_i позволяет охарактеризовать форму белка и условия его существования в водной среде только двумя величинами: относительной полярностью P и общим числом остатков (объем V_i) [8].

Для Folch-Pi-апопротеина, аминокислотный состав которого хорошо известен [1], параметр $P=V_p/V_n=0,8$ при $M \approx 20\,000$. Согласно [8], при таких значениях P и V_i полярные остатки не закрывают неполярные даже при сферической форме молекулы: на поверхности белка будут находиться неполярные остатки и гидрофобные взаимодействия приведут к агрегации мономеров, т. е. к появлению некоторой четвертичной структуры или статистической агрегации. Как уже говорилось, этот факт действительно установлен для Folch-Pi-апопротеина, который в водной среде существует в виде полимеризованной структуры, состоящей из трех или четырех мономеров.

Важная роль гидрофобных взаимодействий при формировании таких агрегатов следует и из сравнения экспериментальных величин гидратации апопротеина с величинами, полученными расчетным путем (см. таблицу). Исходя из полного аминокислотного состава мономера и экспериментальных данных Кунтца по гидратации отдельных аминокислот [9], мы получаем теоретическое значение гидратации мономера $H_T \approx 350$ моль H_2O /моль белка. Для влажностей, соответствующих максимуму «колокола», при которых заканчивается формирование первичных гидратных слоев мономеров и начинается собственно процесс растворения белка (переход из «твердой» фазы в изотропный раствор), гидратация составляет 0,19 г H_2O /г белка или, в пересчете на моль, $H_{\text{исч}}=250$ моль H_2O /моль протеина. Сравнение расчетных и экспериментальных значений гидратации свидетельствует о том, что уже при данных концентрациях $\sim 1/3$ группы не участвует в контакте с растворителем. Следовательно, уже в мономере гидрофобные взаимодействия близлежащих неполярных групп на поверхности белка снижают общее количество связанных молекул растворителя.

Таким образом, переход апопротеина из твердой фазы в изотропную жидкость приводит к возникновению полимеризованной структуры, стабилизированной гидрофобными взаимодействиями. Дальнейшее увеличение активности воды сопровождается «разрушением» гидратных слоев мономеров и выталкиванием значительного количества растворителя в объемную жидкость, что можно объяснить вовлечением большого количества неполярных групп в это взаимодействие и возникновением плотного гидрофобного ядра в центре агрегата. В разбавленных растворах апопротеина в результате образования плотного гидрофобного ядра возникают радиальные напряжения по всему агрегату, что может приводить к потере значительного количества внутренних степеней свободы и к увеличению жесткости тримера в целом, т. е. к увеличению термостабильности полимеризованной структуры. Структура агрегата окончательно фиксируется образованием S—S-сшивок, наличие которых показано в работах [1, 2], что еще больше увеличивает жесткость агрегата. По-видимому, именно эти обстоятельства и являются причиной того, что первые наши попытки зарегистрировать конформационный переход апопротеина в разбавленных растворах ($c \ll 10\%$) в интервале температур 5—100°, т. е. вызвать термическую денатурацию агрегата, не увенчались успехом даже при самых высоких чувствительностях калориметрических установок.

Таким образом, полимеризованная структура апопротеина в водной среде образуется в результате сильных гидрофобных взаимодействий, приводящих к возникновению развитого гидрофобного ядра в центре агрегата.

та. Не исключено также, что изменение влажности приводит к структурным изменениям самих мономеров. Эти процессы сопровождаются значительной дегидратацией мономерных единиц и увеличением жесткости структуры агрегата.

По нашему мнению, существенно, что такие конформационные перестройки достигаются изменением лишь одного параметра — влажности (активности воды). Динамический характер гидратной «оболочки», определяющий конформационную подвижность макромолекул, не может не играть большую роль при функционировании Folch-Pi-апопротеина в составе мембран. Любые флуктуации активности воды внутри мембраны и на ее поверхности могут быть источником энергии конформационных флуктуаций молекул апопротеина, обратимо переводящих молекулу этого белка из состояния мономера в состав полимеризованного агрегата.

В настоящее время нами предпринимаются эксперименты по выяснению термической стабильности апопротеина в органических растворителях и механизмов гидратации белка при концентрациях $< 10\%$.

Экспериментальная часть

Folch-Pi-апопротеин, полностью очищенный от липидов согласно методике, детально описанной в работах [1, 2], растворяли в бидистиллированной воде. Все измерения были проведены только на водных растворах апопротеина. Изменение концентрации белка достигалось путем постепенного выпаривания растворов непосредственно в калориметрических ячейках в эвекаторе при 4° . Были проведены контрольные эксперименты в условиях, когда изменение концентрации достигалось постепенным разбавлением концентрированных водных растворов апопротеина. При соответствующих концентрациях в калориметрических данных не было обнаружено различия в пределах точности измерений.

Микрокалориметрические измерения проводили на низкотемпературном сканирующем дифференциальном микрокалориметре отдела физики биополимеров ИФ АН СССР [3–5].

Основные технические характеристики низкотемпературного сканирующего микрокалориметра следующие: рабочий диапазон температур от -196 до 150° , скорость прогрева $2-25$ град/ч, рабочий объем измерительных ячеек $0,03$ мл, чувствительность 10^{-7} Вт, точность регистрации температуры $\pm 0,1^\circ$.

Микрокалориметр позволяет проводить измерения тепловых эффектов в процессе равномерного прогрева в широкой области концентрации биополимеров (от разбавленных растворов вплоть до сухих пленок и порошков [4]).

На рис. 1 приведена микрокалориметрическая запись процесса теплопоглощения, наблюдаемого в водных растворах Folch-Pi-апопротеина в температурной области фазового перехода лед — вода. Гидратация биополимера (количество невымораживаемой — связанной воды) определяется измерением термодинамических величин наблюдаемого фазового перехода воды (рис. 1), согласно методике, разработанной в работах [3, 6–7]. Связанная вода (число гидратации, n) определяется как вода, не участвующая в фазовом переходе лед — вода при охлаждении и прогреве системы. Точное измерение теплового эффекта плавления «свободной» воды (площадь под пиком теплопоглощения, рис. 1) позволяет получить прецизионные величины гидратации макромолекул в широком интервале влажностей [3]. Погрешность при определении связанной воды не превышает $\pm 0,02$ г H_2O /г белка.

Авторы выражают глубокую благодарность Э. Л. Андрионикашвили за всестороннюю поддержку при проведении совместных исследований и обсуждение результатов. Авторы также благодарны сотрудникам лаборато-

рии химии белка Института биоорганической химии АН СССР за обсужденные результаты работы на семинаре и замечания, которые мы постарались учесть.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vacher-Leprêtre M., Nicot C., Alfsen A., Jolles J., Jolles P. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **420**, 323–331.
2. Nguen Le T., Nicot C., Alfsen A., Barrat M. D. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **420**, 44–56.
3. Мревлишвили Г. М. (1977) *Биофизика*, **1**, 180–191.
4. Монаселидзе Д. В., Бакрадзе Н. Г. (1973) в сб.: Конформационные изменения биополимеров в растворах, «Наука», М.
5. Мревлишвили Г. М., Джапаридзе Г. Ш., Сохадзе В. М., Чанчалашвили З. И., Билинска Б. (1978) *Биофизика*, **4**, 605–609.
6. Привалов П. Л., Мревлишвили Г. М. (1967) *Биофизика*, **12**, 22–26.
7. Mrevlichvili G., Sirniov Y. (1974) *Studia biophys.*, **3**, 155–165.
8. Fisher H. F. (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 1285–1289.
9. Küntz I. D. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 514–520.

Поступила в редакцию
25.IX.1978

После доработки
4.I.1979

MICROCALORIMETRIC STUDY OF FOLCH-PI APOPROTEIN HYDRATION

MREVLISHVILI G. M., JAPARIDZE G. Sh., SOKHADZE V. M.,
CHANCHALASHVILI Z. I., ALFSEN A., NICOT C.

*Institute of Physics, Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi;
Équipe de Recherche des Etats Lies Moleculaires Université R. Descartes, Paris*

Hydration of a typical intrinsic membrane protein, Folch-Pi apoprotein, having a high content of hydrophobic amino acid residues has been studied by the low temperature differential scanning microcalorimetry. The unusual character of this protein hydration has been shown. The Folch-Pi apoprotein has a low affinity for polar solvents and in aqueous media forms a polymeric aggregate consisting of 3 or 4 subunits. The aggregate structure is stabilized by strong hydrophobic interactions. The process of quaternary structure acquisition in aqueous media is accompanied by a considerable dehydration of monomers and an increase in the aggregate structure hardness (thermostability).
