

G.Mrevlishvili, M.Khvedelidze, T.Mdzinarashvili
The Physical Nature of Phase Transition in the Aqueous
Solutions of "Molten Globule"

Presented by Academician M.Zaalishvili, March 4, 1997

ABSTRACT. We suggest that thermal unfolding of the molten globule state of horse cytochrome C is a cooperative process with a small, but distinct and positive $\Delta C_p = 0.2 \pm 0.02 \text{ J/gK}$. Results suggest that transition "molten globule-unfolded state" for cytochrome is like phase transition of the first order. However, by certain attribute this transition is close by to second-order phase transition, for example, the heat of transition is small $\Delta H = 173 \text{ KJ}^\circ\text{M}^{-1}$.

Key words: MOLTEN GLOBULE, PHASE TRANSITION, CALORIMETRY.

The positive heat capacity change observed for the thermal denaturation of globular proteins indicates that hydrophobic interaction is the dominant driving force stabilizing the unique native structure of proteins [1,2].

By using a precise scanning microcalorimetry it was found also that melting of molten globule i.e. unfolding of this intermediate state is associated with the significant heat capacity change. Some authors classified this transition as a second order phase transition, because we see the change of second derivative of thermodynamic potential, but not the enthalpy and entropy [3].

In present paper we study the physical nature of phase transition in aqueous solutions of the molten globule of horse cytochrome C. The globular protein - Horse cytochrome C was purchased from Sigma. "Molten globule" state was obtained at pH 2.0 (glycine buffer solution, 0.5M NaCl).

Differential adiabatic scanning microcalorimeter DASM-4A (made in Puschino, Russia) was used. Besides the potentialities of DASM-4, DASM-4A allow to deal with preparations which have not constant viscosity and bad heat conductivity. The other advantages are: high sensitivity; high reproducibility of base line; the control of the device is possible

by the computer; the possibility of automatization of data processing.

The temperature dependence of the partial heat capacity of cytochrome C in solution at different pH values in the presence of salt (0.5M NaCl) is given in Fig. 1. It is well known, that at pH 1.8 - 2.0 and in the presence of salt cytochrome C is in the state of molten globule. As we see that the transition: native state (pH 3.7) \rightarrow molten globule (pH 2.0) accompanied by change in the heat capacity at 25°C. Note that the partial heat capacity value for molten globule is intermediate between native (folded) and dena-

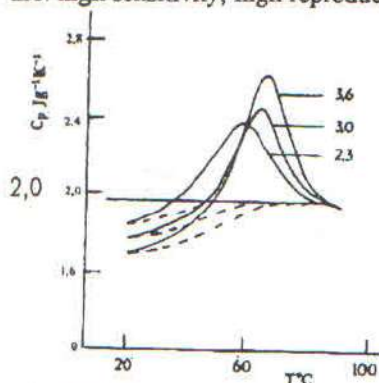


Fig.1. Temperature dependence of partial specific heat capacity of cytochrome C in solution at different pH values

tured (unfolded) states (Fig. 2,3). We measure the temperature dependence of the heat capacity at different scanning rate (0.125; 0.25; 0.50; 1.0; 2.0 degree per 1 h); the reversibility of the process "molten globule" unfolded state was checked by reheating; this process was found to be reversible and could be adequately represented by a two-state process (see also [4-5]).

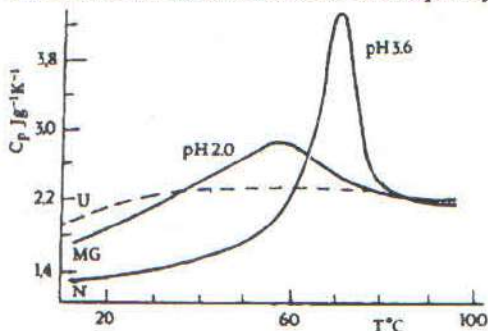


Fig. 2. Temperature dependence of partial specific heat capacity of cytochrome C in the various conformational states of protein: 1- unfolded state, 2-native state at pH 3.7; 3-"molten globule" state at pH 2.0 (0.5M NaCl)

So we suggest that thermal unfolding of the "molten globule" state of horse cytochrome C is a cooperative process with a small, but distinct ΔC_p and the enthalpy change of unfolding $\Delta H=173 \text{ kJ M}^{-1}$. The enthalpy of unfolding transition for molten globule is equal to only $1/2$ of total enthalpy differences between folded and unfolded states (381 kJ M^{-1}); heat capacity change is also small, but distinct and positive $\Delta C_p(N-U)=0.6 \pm 0.06 \text{ JK}^{-1} \text{ g}^{-1}$; $\Delta C_p(MG-U)=0.2 \pm 0.02 \text{ JK}^{-1} \text{ g}^{-1}$; all these results suggest that transition of "molten globule-unfolded state" for cytochrome is similar to

the first order phase transition, or it may be same mixed transition. The last possibility is demonstrated in the precise statistical theory of globule-coil transition [6]. Thus, for the rigid chains globule-coil transition represent as abrupt first-order phase transition with definite change of density. However, by certain attribute this transition close by to second-order phase transition, for example, the heat of transition is small [6].

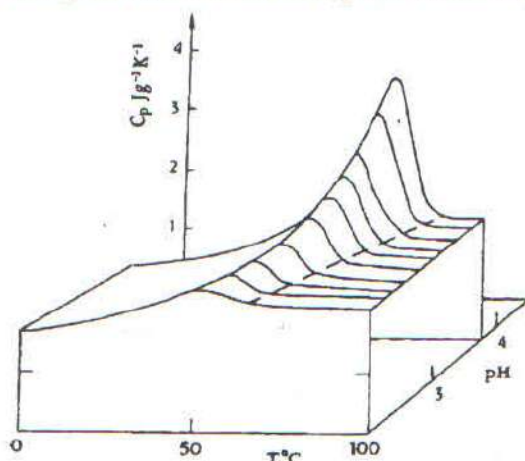


Fig. 3. Heat capacity surface for cytochrome C at different temperatures and pH

The "molten globule" placed in the middle of funnel [7], where the polymer chains "going" half of the way towards the folded structure. Our thermodynamic measurements give the funnels slope (the effective search size is reduced, making the computational task easier)

Our experimental result is very important for detailed computer simulations and calculations of realistic protein folding energy landscapes resemble a funnel [7] in which the protein is guided through a myriad of pathways to its natural shape, referred as its "native structure". Although the folding protein eventually finds its way to a minimum-energy the landscape has rugged features. These features correspond to "local" minima in which the still-folding protein may be temporarily trapped because different chain segments are "frustrated", i.e. they have conflicting interactions when brought together at random.

while separate measurements on the motions of molten globules by NMR give an estimate of the motions of the ruggedness.

I.Javakhishvili Tbilisi State University

REFERENCES

1. *P.L.Privalov*. *Adv. Prot. Chem.*, **38**, 1979, 167.
2. *J.M.Sturtevant*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**,6, 1977, 2236.
3. *P.L.Privalov*. *J. Mol. Biol.*, **258**, 1996, 707.
4. *D.Hamada, S.Kidokoro, H.Fukada, K.Takahashi and Y.Goto*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1994, 10325.
5. *D.Hamada, Y.Kuroda, M.Kataoka*. *J.Mol. Biol.*, **256**, 1996, 172.
6. *I.M.Lifshits, A.Yu.Grosberg and A.R.Khokhlov*. *Uspokhi Fizicheskikh Nauk*, **127**, 1979, 353 (Russian).
7. *J.N.Onuchic, P.G.Wolynes, Z.Luthey-Schulten and N.Socci*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1995, 3626.

ბ.გომელისვილი, მ.ხვედელიძე, თ.მინარაშვილი

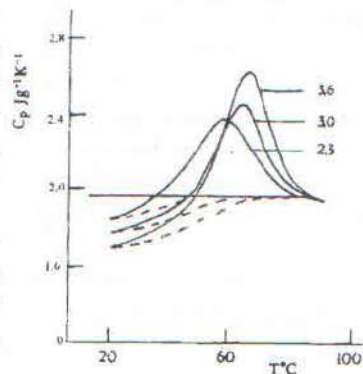
„გალღობილი გლობულის“ წყალხსნარში ფაზური გადასვ-
ლების ფიზიკური მახასიათებლები

წარმოადგინა აკადემიკოსმა მ. ზაალიშვილმა 4.03.1997

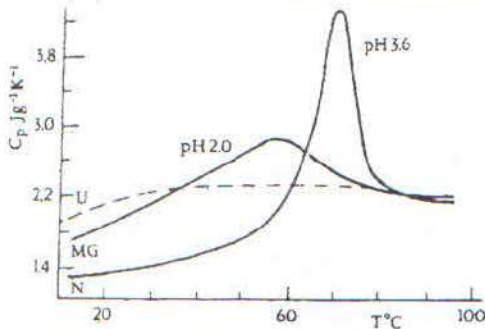
სითბოტევადობის დადებითი ცვლილება, დამზერილი ცილების სითბური დენატურაციის დროს, მიგვანიშნებს, რომ ჰიდროფობული ურთიერთქმედებანი წარმოადგენენ დომინანტურ მმართველ ძალას, რომელიც ანიჭებს სტაბილობას ცილების უნიკალურ ნატიურ სტრუქტურას [1,2]. პრეციზიული სკანირებადი მიკროკალორიმეტრის გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ ე.წ. გაღობილი გლობულის დნობა, ე.ი. ცილის უშუალოდ კონფორმაციული მდგომარეობის დენატურაციის პროცესი დაკავშირებულია სითბოტევადობის მნიშვნელოვან ცვლილებასთან. ზოგი ავტორი ამ გადასვლას ახასიათებს, როგორც II-რიგის ფაზურ გადასვლას, რადგან ადგილი აქვს თერმოდინამიკური პოტენციალის მეორე წარმოებულების ცვლილებას, და არა ენტალპიისა და ენტროპიისა [3].

წინამდებარე ნაშრომში შესწავლილია „გალღობილ მდგომარეობაში“ მყოფი ცხენის ციტოქრომი C-ს წყალხსნარის ფაზური გადასვლის ფიზიკური ბუნება. გლობულარული ცილა - ცხენის ციტოქრომი-C შესყიდულ იქნა ფირმა "SIGMA"-საგან. იგი იმყოფება „მოლტენ გლობულარულ“ („გალღობილი გლობულა“) მდგომარეობაში pH 2,0 დროს (გლიცინის ბუფერი, 0,5M NaCl). იყო გამოყენებული დიფერენციალური ადიაბატური სკანირებადი მიკროკალორიმეტრი DASM-4A (გამოშვებულია პუშჩინოში, რუსეთი). DASM-4A-ს პოტენციალური შესაძლებლობები გეაძლევს საშუალებას ვაწარმოოთ კვლევა პრეპარატებისა, რომელთაც არ გააჩნია მუდმივი სიბლანტე და აქვთ ცუდი სითბოგამტარებლობა. დამატებით ხელსაწყო ხასიათდება მაღალი მგრძობიარობით, ბაზისური ხაზის ზუსტი განმეორადობით; შესაძლებელია შედეგების კონტროლი კომპიუტერით; აგრეთვე შესაძლებელია გაზომვის პროცესების ავტომატიზაცია.

1 სურათზე ნაჩვენებია ციტოქრომი C-ს ხსნარის პარციალური სითბოტევადობის ტემპერატურული დამოკიდებულება pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობებისთვის 0,5M NaCl მარილის შემ-



სურ.1 ციტოქრომი C-ს ხსნარის პარციალური სითბოტევადობის ტემპერატურული დამოკიდებულება pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობებისთვის.



სურ.2 ციტოქრომი C-ს პარციალური სითბოტევადობის ტემპერატურული დამოკიდებულება ცილის სხვადასხვა კონფორმაციული მდგომარეობებისთვის: 1. დენატურირებული მდგომარეობა; 2. ნატიური მდგომარეობა, pH 3,7; 3. „მოლტენ გლობულარული“ მდგომარეობა pH 2,0 (0,5M NaCl)

ცველობის დროს. კარგად არის ცნობილი, რომ pH 1,8-2,0 და მარილის თანაობისას ციტოქრომი-C იმყოფება „მოლტენ გლობულარულ“ მდგომარეობაში [4]. როგორც ვხედავთ გადასვლას ნატიური მდგომარეობა (pH 3,7) → მოლტენ გლობულა (pH 2,0)-თან ახლავს სითბოტევადობის ცვლილება 25°C-ზე. უნდა აღინიშნოს, რომ პარციალური სითბოტევადობის მნიშვნელობა „მოლტენ გლობულისა“ არის საშუალოდ ნატიურისა (დახვეულ) და დენატურირებულ (გაშლილ) მდგომარეობებს შორის (სურ. 2,3). ჩვენ გავზომეთ სითბოტევადობების ტემპერატურული დამოკიდებულება სკანირების

სიჩქარეების სხვადასხვა მნიშვნელობების დროს (0,125; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 გრადუსი 1 წუთში); შექცევადობა პროცესისა მოლტენ გლობულა - დენატურირებული მდგომარეობა შემოწმებულია ხელმეორედი სკანირებით; ეს პროცესი აღმოჩნდა სრულიად შექცევადი და წარმოდგენილ იქნა, როგორც მხოლოდ ორ უკიდურეს მდგომარეობას შორის გადასვლის პროცესის ადეკვატური [4,5]. ჩვენ აგრეთვე დავრწმუნდით, რომ ცხენის ციტოქრომი C-ს მოლტენ გლობულარული მდგომარეობის სითბური დენატურაცია არის კოოპერატიული პროცესი მცირე, მაგრამ საესებით გარკვეული ΔCp -თი; დენატურაციის ენთალპიის ცვლილება უდრის $\Delta H=173 \text{ კჯ } M^{-1}$. დენატურაციის ენთალპია „მოლტენ გლობულის“ გადასვლისთვის შეადგენს მხოლოდ 1/2 საერთო ენთალპიისა დახვეულ და გაშლილ მდგომარეობებს შორის ($381 \text{ კჯ } M^{-1}$); ადგილი აქვს სითბოტევადობის მცირე, მაგრამ გამოკვეთილ და დადებით ცვლილებას $\Delta Cp(N-U) = 0,6 \pm 0,06 \text{ კჯ } K^{-1}g^{-1}$; $\Delta Cp(MG-U) = 0,2 \pm 0,02 \text{ კჯ } K^{-1}g^{-1}$; ყველა ეს შედეგები გვარწმუნებს, რომ გადასვლა „მოლტენ გლობულა - დენატურირებული მდგომარეობა“ ციტოქრომისათვის არის მსგავსი I-რიგის ფაზური გადასვლისა, ან უკიდურეს შემთხვევაში წარმოდგენს გარკვეულწილად „შერეულ“ გადასვლას. ეს უკანასკნელი შესაძლებლობა არის ნაწინასწარმეტყველები გლობულა - დახვეული გორგალი გადასვლის ზუსტი სტატისტიკური თეორიით [6]. ასე მაგალითად, გადასვლა გლობულა - დახვეული გორგალი ხისტი ჯაჭვებისათვის წარმოდგენილია, როგორც მკვეთრი I-რიგის ფაზური გადასვლა სიმკვრივის გარკვეული ცვლილებით. მაგრამ ეს გადასვლა ხასიათდება რიგი პარამეტრით, რომლებიც ახლოსაა II-რიგის ფაზურ გადასვლასთან, მაგალითად, გადასვლის სითბო არის მცირე [6].

მიღებული ექსპერიმენტული შედეგები მეტად მნიშვნელოვანია იმისათვის, რომ მოეახდინოთ დეტალური კომპიუტერული მოდელირება, ე.წ. ენერგეტიკული პროფილისა („ლანდშაფტისა“), რომელიც ახასიათებს ცილის გაშლილ პოლიპეპტიდური ჯაჭვის სივრცულ სტრუქტურაში გადასვლის პროცესს. ენერგეტიკული

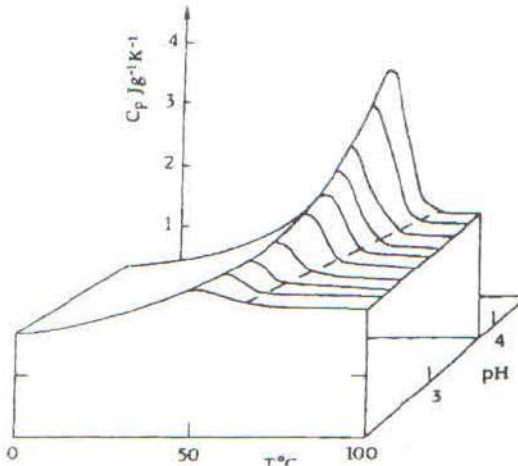
ლანდშაფტი" წარმოიდგინება, როგორც ენერგეტიკული „ძაბრი“ (Funnel), რომელიც უნდა გაიაროს ცილის მოლეკულამ მირიადი შესაძლებელი ბილიკის გავლის მეშვეობით, რათა მიაღწიოს იმ ბუნებრივ კონფორმაციულ ფორმას, რომელიც ცნობილია, როგორც „ნატიური სტრუქტურა“. მიუხედავად იმისა, რომ დაკეცვისა და დახვევის დროს პოლიპეტიდური ჯაჭვი მიჰყვება გზას, რომელიც აკმაყოფილებს ენერჯის მინიმუმს, ამ გზაზე ენერგეტიკულ „ძაბრს“ გააჩნია თავისებურებანი „არაგლუვი“ ზედაპირების სახით. ეს თავისებურებანი შეესაბამებიან ენერჯის „ლოკალურ“ მინიმუმებს, რომელშიაც დროებით თავსდება უკვე გარკვეულწილად დახვეული ჯაჭვი. ე.ი. ჯაჭვის სეგმენტები იმყოფებიან ე.წ. „ფრუსტრაციის“ ("frustrated") მდგომარეობებში. სხვა სიტყვებით რომ ვთქვათ, არსებობს წინააღმდეგობრივი ურთიერთქმედებანი ჯაჭვების სეგმენტების დაახლოების დროს ცილის დახვევის პროცესში.

„მოლტენ გლობულა“ ენერგეტიკულ „ძაბრში“ იკავებს შუალედურ მდგომარეობას [7], როდესაც პოლიმერულ ჯაჭვს უკვე გავლილი აქვს ნახევარი გზა სივრცობრივი სტრუქტურის ფორმირებისათვის. ჩვენი თერმოდინამიკური გაზომვები გვაძლევს ძაბრის ყელის კუთხური დაბრის მნიშვნელობას (ამ დროს ეფექტური კონფორმაციის ძიებისათვის საჭირო გამოთვლების მოცულობა მცირდება და უფრო ადვილი ხდება კომპიუტერული გამოთვლის ამოცანა) [7]. რაც შეეხება „მოლტენ გლობულის“ კონფორმაციების მოძრაობათა თავისებურებებს, ისინი შეიძლება დახასიათდნენ ბირთვული მაგნიტური რეზონანსის მეთოდით მიღებული შედეგებით.

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ლიტერატურა

1. P. L. Privalov. Adv. Prot. Chem., 38, 1979, 167.
2. J. M. Sturtevant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74,6, 1977, 2236.
3. P. L. Privalov. J. Mol. Biol., 258, 1996, 707.
4. D. Hamada, S. Kidokoro, H. Fukada, K. Takahashi and Y. Goto. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 1994, 10325.



სურ.3 ციტოქრომი C-ს სითბოტევადობის ცვლილების ზედაპირი სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH-ის დროს.

5. *D. Hamada, Y. Kuroda, M. Kataoka et al. J.Mol. Biol., 256, 1996, 172.*
6. *И. М. Лифшиц, А. Ю. Гроссберг, А. Р. Хохлов. Успехи физических наук, 127, 1979, 353.*
7. *J. N. Onuchic, P. G. Wolynes, Z. Luthey-Schulten and N. Succi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995, 3626.*