

М. К. ПУЛАТОВА, В. Г. ПАСОЯН, Л. П. КАЮШИН, Н. А. КРАВЧЕНКО

СПЕКТРЫ Э.П.Р. γ -ОБЛУЧЕННОГО МОНОКРИСТАЛЛА ХЛОРИДА ЛИЗОЦИМА

(Представлено академиком Г. М. Франком 25 XI 1969)

Интерпретация спектров электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.) поликристаллических препаратов облученных белков затруднена. Определение природы радиационных нарушений существенно облегчается, если известна пространственная структура белка.

В настоящей работе делается попытка исследовать спектры э.п.р. монокристаллов фермента лизоцима хлорида, подвергнутых действию γ -радиации.

Лизоцим был выделен из яичного белка. Молекулы лизоцима имеют эллипсоидальную форму с размерами $45 \times 30 \times 30$ А. Полипептидная цепь из 129 аминокислотных остатков (¹⁻⁵). Молекула «сшита» в четырех местах поперечными дисульфидными мостиками. В молекуле лизоцима около шести спиральных участков, некоторые из которых очень коротки. По сведениям, полученным при измерении дисперсии оптического вращения (^{6, 7}), на долю α -спиралей приходится 42% полипептидной цепи.

Монокристаллы хлорида лизоцима*, по данным работ (⁸⁻¹²), являются тетрагональными с пространственной группой $P4_32_12$ и со следующими размерами элементарной ячейки: $a = b = 79,4$, $c = 37,9$ А. Внешний вид монокристалла и расположение его кристаллографических осей показано на рис. 1. В элементарной ячейке восемь молекул лизоцима.

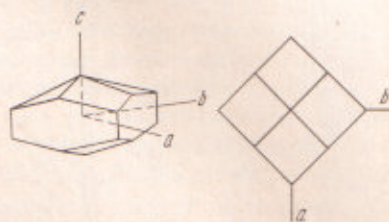


Рис. 1. Внешний вид монокристалла хлорида лизоцима и расположение его кристаллографических осей (слева). Вид кристалла вдоль оси c на плоскость ab (справа)

Для всех ориентаций γ -облученного при 77° К монокристалла хлорида лизоцима относительно направления внешнего магнитного поля наблюдается сложный асимметричный спектр э.п.р., форма которого зависит от ориентации кристалла.

Типичные спектры э.п.р. γ -облученного при 77° К монокристалла лизоцима показаны на рис. 2 для двух случаев, когда внешнее магнитное поле ориентировано в различных кристаллографических плоскостях.

Было прослежено изменение спектров э.п.р. γ -облученного монокристалла лизоцима в зависимости от температуры в интервале значений от 77° до 300° К (рис. 2). При повышении температуры до $213-223^\circ$ исчезает компонент сигнала э.п.р., который вносит асимметрию в форму общего сигнала э.п.р. и резко изменяет форму спектра при изменении ориентации кристалла. Одновременно исчезает мультиплетный сигнал э.п.р., сверхтонкое расщепление которого зависит от ориентации кристалла. Выше указанной температуры наблюдается симметричный синглетный сигнал э.п.р. с шириной ~ 22 эрст., который при повышении температуры превращается в дублетный. Проявляется дублетное расщепление при 230° К. Дальней-

* При выращивании монокристаллов хлорида лизоцима была полезной любезная методическая консультация доктора К. Блейка и проф. Д. Филлипса.

шее нагревание препарата приводит к увеличению дублетного расщепления сигнала э.п.р. Максимальная величина дублетного расщепления отмечалась при 260° К.

Для спектров э.п.р. γ -облученного монокристалла лизоцима с максимальной величиной дублетного расщепления (260° К) была определена ориентационная зависимость спектра э.п.р. относительно направления внешнего магнитного поля. На рис. 3 показано изменение величины дублетного расщепления спектров э.п.р. с ориентацией кристалла.

Отношение величин дублетного расщепления для двух ориентаций монокристалла, различающихся на 90°, было равно 0,5. Отношение этих же величин для двух ориентаций образца при 228° К равно 0,7.

Было обнаружено, что в γ -облученном при 77° К монокри-

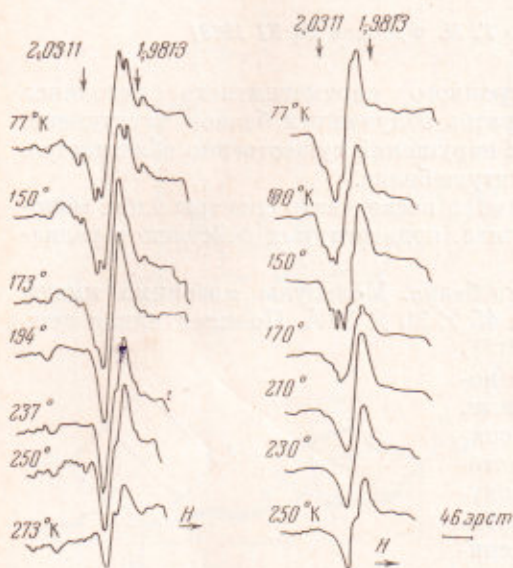


Рис. 2

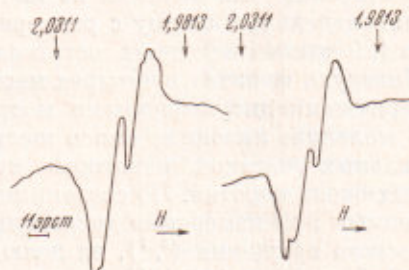


Рис. 3

сталла лизоцима возникают светочувствительные центры, исчезающие при действии света в интервале длин волн от 340 до 500 м μ . При этом разрешение сверхтонкого расщепления сигнала э.п.р., стабильного к действию света парамагнитного центра, улучшается. Светочувствительные парамагнитные центры имеют асимметричный сигнал э.п.р.

Изменение величины дублетного расщепления спектров э.п.р. для двух ориентаций монокристалла лизоцима, различающихся друг от друга на 90° относительно направления внешнего магнитного поля. Температура образца была доведена от 77 до 260° К. Спектр э.п.р. был записан при 77° К

Температурные исследования изменения спектров э.п.р. γ -облученного монокристалла лизоцима показали, что наблюдаемые при 77° К спектры э.п.р. представляют собой сумму трех сигналов: синглетного, с шириной 22 эрст. и величиной $g = 2,0030$, асимметричного спектра э.п.р. с расстоянием между точками максимального наклона 60 эрст. и мультиплетного (рис. 3). Асимметричный спектр обусловлен серосодержащим парамагнитным центром, анион-радикалом $R - S - S = R$ (¹⁹).

Во всех случаях наблюдается асимметрия сигнала. При локализации плотности неспаренного электрона на участках молекулы только с атомами N, O и C подобная асимметрия сигнала э.п.р. не должна была бы наблюдаться даже в случае различной ориентации в элементарной ячейке монокристалла химически эквивалентных парамагнитных центров. Поэтому наблюдаемая асимметрия сигнала э.п.р. обусловлена локализацией плотности неспаренного электрона на атоме серы, причем ориентация серосодержащих радикалов должна быть различна в элементарной ячейке монокристалла. Этот вывод согласуется с данными рентгеноструктурного

анализа (⁸), из которых следует, что в элементарной ячейке имеется 8 молекул лизоцима, в каждой из которых 4 S—S-связи, различно ориентированные в пространстве. Подобная интерпретация природы асимметричного сигнала э.п.р. коррелирует с результатами работ (¹³⁻¹⁶). Мультиплетный сигнал э.п.р. обусловлен свободными радикалами, возникающими либо при разрыве C_α—C-связи полипептидной цепи, либо при отрыве атома водорода от СН₂-группы алифатических аминокислотных остатков, имеющих длинную цепь.

При определении природы синглетного сигнала э.п.р. нужно учесть тот факт, что при повышении температуры препарата наблюдается постепенное превращение его в дублетный сигнал. Это изменение необратимо. При охлаждении препарата до 77° К (после предшествующего нагревания) наблюдается этот же дублетный сигнал э.п.р. Ранее было показано (¹⁶), что дублетный спектр э.п.р. обусловлен парамагнитными центрами с локализацией плотности неспаренного электрона на атоме кислорода водородной связи. Из проведенных ориентационных исследований монокристалла лизоцима была найдена зависимость величины дублетного расщепления от ориентации кристалла (¹⁷). Такой результат мог наблюдаться только в том случае, когда неспаренный электрон локализован на атоме кислорода водородной связи α-спиральных участков белковой молекулы. По данным рентгеноструктурного анализа, в элементарной ячейке монокристалла нет строго направленной ориентации α-спиральных участков молекулы. Однако найденная зависимость величины дублетного расщепления спектров э.п.р. от ориентации монокристалла объясняется имеющейся в элементарной ячейке преимущественной для одного из направлений ориентацией α-спирали белковой молекулы. Такого выделенного направления не существует для любого другого участка полипептидной цепи, в частности для предполагаемого — \dot{C} —радикального фрагмента, который образуется при



разрыве C—H-связи, где R — глициновый остаток. Для подобного свободного радикала не должно наблюдаться зависимости дублетного расщепления от ориентации монокристалла.

В работах (¹⁶, ¹⁷) было предположено, что парамагнитный центр с локализацией плотности неспаренного электрона на атоме кислорода водородной связи возникает при отрыве любого атома H от участка полипептидной цепи: —CONH—C—CONH, где R — любой аминокислотный остаток.



При повышении температуры происходит перераспределение плотности неспаренного электрона по сопряженному участку полипептидной цепи (атом C_α при разрыве C—H-связи переходит из тетраэдрического в тригональное состояние, т. е. имеет sp²-гибридное состояние и неспаренный p-электрон) с возникновением радикального фрагмента, в котором плотность неспаренного электрона в основном локализована на атоме кислорода. Синглетный сигнал э.п.р. можно объяснить в данном случае делокализацией плотности неспаренного электрона по этому сопряженному участку цепи, что приводит к неразрешенной сверхтонкой структуре спектра э.п.р. При повышении температуры происходит локализация спиновой плотности на атоме кислорода водородной связи.

Институт биологической физики
Академии наук СССР

Поступило
26 IX 1969

Пушино-на-Оке Московской обл.
Институт агрохимических проблем и гидропоники
Академии наук АрмССР

Ереван

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. E. Canfield, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2698 (1963). ² J. Jolles, J. Jouregue-Adell, P. Jolles, *Biochim. et biophys. acta*, **78**, 68 (1963). ³ P. Jolles *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B., **167**, 1009, 350 (1967). ⁴ P. Jolles, J. Jouregue-Adell, *J. Jolles, C. R.*, **258**, 3926 (1964). ⁵ R. E. Canfield, A. K. Liu, *J. Biol. Chem.*, **240**, 1997 (1965). ⁶ P. Urnes, P. Doty, *Adv. Prot. Chem.*, **16**, 401 (1961). ⁷ K. Hamaguchi, K. Imahori, *J. Biochem. (Japan)*, **55**, 388 (1964). ⁸ C. C. F. Blake, D. F. Koenig, et al., *Nature*, **206**, 757 (1965). ⁹ C. C. F. Blake, G. A. Mair et al., *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B., **167**, 1009, 365 (1967). ¹⁰ G. Alderton, J. Fevold, *J. Biol. Chem.*, **164**, 4 (1946). ¹¹ C. C. F. Blake, R. H. Fenn et al., *Nature*, **196**, 1173 (1962). ¹² K. J. Palmer, M. Baltantyre, J. A. Calvine, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 906 (1948). ¹³ W. Gordy, W. B. Ard, H. Shields, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **41**, 983 (1955). ¹⁴ W. Gordy, H. Shields, *ibid.*, **46**, 8, 1124 (1960). ¹⁵ T. Henriksen, *Proc. of a Confer. Held at Gatlinburg, Tennessee, U.S.A., May 10-12, 1965*. ¹⁶ Л. П. Каюшин, К. М. Львов, М. К. Пулатова, Исследование парамагнитных центров в облученных белках, «Наука», 1969. ¹⁷ М. К. Пулатова, Л. П. Каюшин и др., ЭПР облученных монокристаллов аминокислот и белков. Тез. докл. на Всесоюзн. юбилейн. конфер. по парамагнитному резонансу, Казань, 1969, стр. 125.