

Ю. Н. ЧИРГАДЗЕ

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКАХ ОБЛАСТЕЙ  
С РАЗНОЙ ДОСТУПНОСТЬЮ ДЛЯ МОЛЕКУЛ ВОДЫ  
ПО ЗАВИСИМОСТИ ДЕЙТЕРООБМЕНА ОТ ДАВЛЕНИЯ ПАРОВ ВОДЫ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 12 VII 1971)

Структура модельных пептидных соединений в твердом состоянии существенно зависит от давления паров воды <sup>(1)</sup> и может быть зафиксирована при быстром переходе к низким влажностям <sup>(2)</sup>. Это наводит на мысль о том, что подвижность в пептидных структурах имеет гидратационный характер и определяется доступностью молекул воды к отдельным участкам

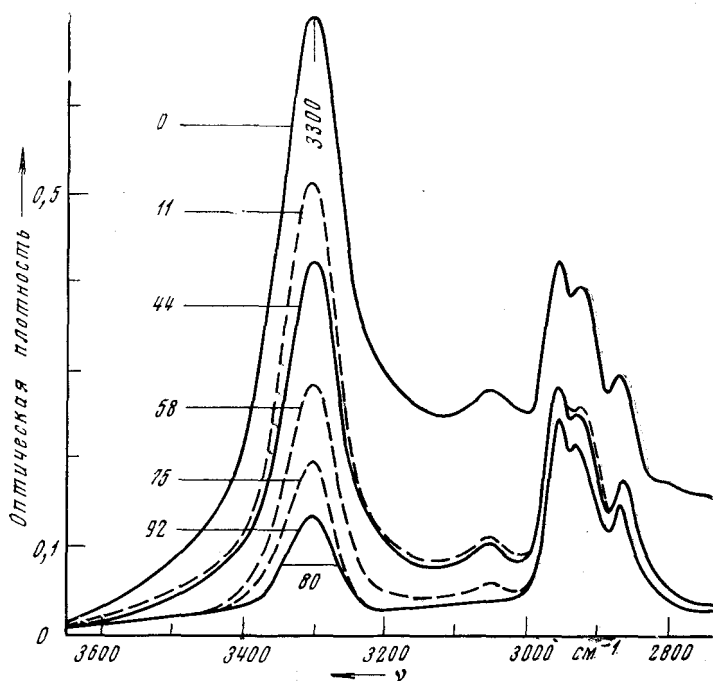


Рис. 1. И.-к. спектры пленок миоглобина кашалота при разной влажности тяжелой воды. Цифры на кривых — относительная влажность в процентах

структуры. Если приготовить пленку глобулярного белка быстрым высушиванием водного раствора, то структура молекулы в твердом состоянии при разной влажности будет незначительно отличаться от структуры нативного состояния в растворе. Мы убедились в этом, измерив спектры кругового дихроизма пленок миоглобина кашалота, а также некоторых других белков, и сравнив их со спектрами водных растворов. Такое «замораживание» структуры глобулярных белков свидетельствует о потере подвижности в основной части молекулы при удалении воды, вследствие чего ее структура уже не может сильно измениться.

Исходя из этого для глобулярных белков можно предложить метод определения областей с разной доступностью для воды и, следовательно, с разной подвижностью. Метод основан на том, что при разном давлении водяных паров молекулы воды могут попадать в области с разной доступностью, при этом, чем меньше доступность, тем большее давление требуется. Доступность пептидных групп для воды можно определить по дейтерообмену, который, как известно <sup>(3)</sup>, происходит только при непосредственном контакте пептидной группы с молекулой тяжелой воды. В качестве метода наблюдения результатов дейтерообмена удобно использовать инфракрасную спектроскопию в области валентных колебаний NH пептидных групп. Ширина полосы NH очень чувствительна к типу структуры <sup>(2)</sup>, а ее интенсивность <sup>(4)</sup> соответствует числу пептидных групп. Доступность для воды можно характеризовать эффективностью обмена в пересчете на одно и то же число атакующих молекул тяжелой воды, что позволяет сравнивать между собой величины, полученные при разном давлении. В соответствии с этим мы введем для *i*-й области коэффициент доступности  $\gamma_i$  при данном относительном давлении водяных паров  $p/p_0$

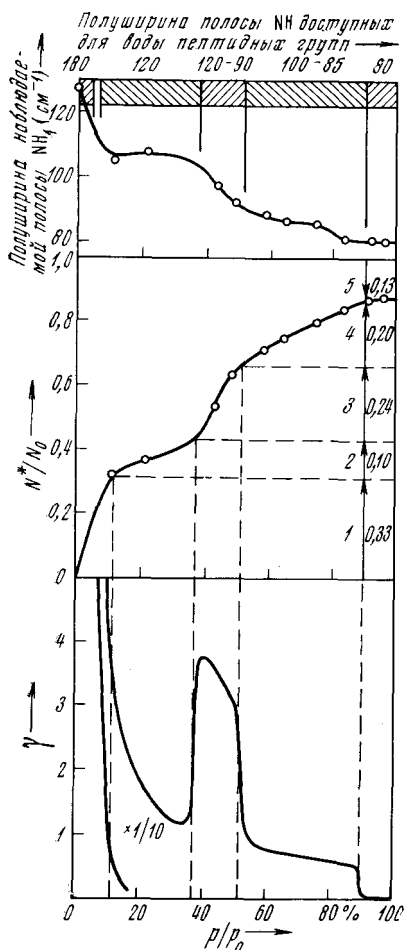


Рис. 2. Спектральные характеристики, число доступных для воды пептидных групп и коэффициент доступности миоглобина кашалота в зависимости от давления паров воды

нили над силикагелем при комнатной температуре. Сушка продолжалась около часа, толщина пленок составляла около 0,5  $\mu$ m. Инфракрасные спектры в области валентных колебаний NH, кроме пептидного поглощения около 3300  $\text{см}^{-1}$ , содержат также полосы поглощения групп лизина около 3400  $\text{см}^{-1}$  и гистидина — в области 3200—3000  $\text{см}^{-1}$ . Однако уже при первой низкой влажности эти группы замещаются одновременно с быстросамещающейся частью пептидных групп (рис. 1). Замещение в парах тяжелой воды при данном давлении заканчивается в течение нескольких часов. Мы считали, что интенсивность поглощения полосы NH в беспорядочной и спиральной формах одинакова. Это было проверено сопоставлением абсолютных интенсивностей беспорядочной формы фиброина шелка с таковыми

в области валентных колебаний NH пептидных групп. Ширина полосы NH очень чувствительна к типу структуры <sup>(2)</sup>, а ее интенсивность <sup>(4)</sup> соответствует числу пептидных групп. Доступность для воды можно характеризовать эффективностью обмена в пересчете на одно и то же число атакующих молекул тяжелой воды, что позволяет сравнивать между собой величины, полученные при разном давлении. В соответствии с этим мы введем для *i*-й области коэффициент доступности  $\gamma_i$  при данном относительном давлении водяных паров  $p/p_0$

$$\gamma_i = \frac{\Delta(N_i^*/N_0)}{\Delta(p/p_0)} \cdot \frac{1}{p/p_0}.$$

Здесь  $N_i^*/N_0$  — доля доступных для воды пептидных групп от их общего числа. Трудность разделения областей на классы заключается в том, что экспериментально измеряемая величина обменивавшихся при данном давлении пептидных групп является суммой по всем классам, т. е.

$$N^*/N_0 = \sum N_i^*/N_0 \text{ и } \gamma = \sum \gamma_i.$$

Зависимость дейтерообмена от влажности была изучена для миоглобина кашалота. Обессоленный раствор при pH 6 хроматографически чистого препарата в мет-форме наносили на окна камеры влажности из флюорита кальция и су-

для спиральной формы. Используя это, можно определить долю обменивающихся пептидных групп.

Полуширина наблюдаемой полосы NH заметно уменьшается по мере повышения влажности (рис. 2). Соответственно, быстрообмениваемая часть имеет полуширину около  $180 \text{ см}^{-1}$ , при большем давлении обмениваются группы с полушириной полосы около  $120 \text{ см}^{-1}$ , далее около  $100 \text{ см}^{-1}$  и остаточная полоса имеет полуширину около  $80 \text{ см}^{-1}$ . Доля доступных воде пептидных групп выражается кривой, которую можно приближенно описать прямыми отрезками с разными наклонами. По виду кривой коэффициента доступности легко определить  $\gamma$  отдельных областей, поскольку они заметно отличаются. Можно сказать, что в миоглобине кашалота имеется одна «доступная насыщаемая», три «полудоступные» области и одна «недоступная» (табл. 1). Доля NH-групп в этой последней области равна 0,13, что согласуется с данными для раствора (3).

По полуширине полосы NH мы можем отнести области доступности к отдельным участкам молекулы миоглобина (3). В первый класс с очень высокой подвижностью попадают неупорядоченные участки, а также часть групп на концах спиральных участков, так как в противном случае число  $N_i^*/N_0$  было бы равно всего 0,23. Ко второму классу относятся более упорядоченные участки. Обмен в третьем классе происходит только в области 40–50% влажности, будем считать, что сюда относятся короткие спиральные отрезки C, D и F, содержащие всего 7 (C, D) и 10 (F) остатков. Подвижность четвертой области очень мала, на этом основании можно отнести к ней некоторые участки длинных спиральных отрезков A, B, E, G и H. К последнему классу — недоступной области — относится всего около 20 остатков. Нет оснований отнести к нему какой-нибудь один спиральный отрезок, разумнее считать, что соответствующие пептидные группы примыкают к гидрофобному ядру молекулы. В каждой из длинных спиралей — это всего 4–5 остатков. Области с разной подвижностью изображены на модели молекулы миоглобина (рис. 3). Видно, что молекула может относительно легко совершать перестройки, при кото-

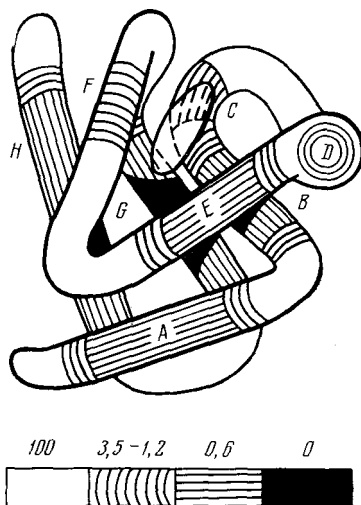


Рис. 3. Идентификация участков молекулы миоглобина кашалота по доступности для воды (по подвижности). Изображение молекулы при разрешении 6 Å взято из работы (3). Светлые участки соответствуют большей подвижности, цифры над шкалой доступности равны коэффициентам  $\gamma$ ; классы 2 и 3 (табл. 1) помечены на модели одинаковым образом

Таблица 1

Характеристика доступности для воды отдельных областей молекулы миоглобина кашалота

№ класса	Полуширина полосы NH, см <sup>-1</sup>	$N_i^*/N_0$	$\gamma_i = \frac{\Delta(N_i^*/N_0)}{\Delta(p/p_0)} \cdot \frac{p_0}{p}$	$\frac{p}{p_0}, \%$	
1	180	0,33	>100	$\gamma_1 = 3,2 \cdot p_0/p$	0—10
2	120	0,10	3,5—1,2	$\gamma_2 = 0,4 \cdot p_0/p$	10—40
3	120—90	0,24	3,8—3,0	$\gamma_3 = 1,6 \cdot p_0/p$	40—50
4	100—85	0,20	0,8—0,6	$\gamma_4 = 0,5 \cdot p_0/p$	50—90
5	80	0,13	0	$\gamma_5 = 0$	90—100

рых сохраняются длинные спиральные отрезки. Обе плоскости группы гема обращены к областям с высокой подвижностью.

В заключение автор выражает благодарность А. М. Овсепян за помощь в проведении экспериментальной части работы, а также профессорам А. С. Спирину и О. Б. Птицыну за интерес к работе и ее обсуждение.

Институт белка  
Академии наук СССР  
Пущино-на-Оке

Поступило  
6 VII 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> E. R. Blout, H. Lenormant, *Nature*, **179**, 960 (1957). <sup>2</sup> В. В. Кобяков, В сборн. Свойства и функции макромолекул и макромолекулярных систем, «Наука», 1969, стр. 42 и 58. <sup>3</sup> A. Hvidt, S. O. Nielsen, *Adv. Protein Chem.*, **21**, 287 (1966). <sup>4</sup> Ю. Н. Чиргадзе, Е. П. Рашевская, *Биофизика*, **14**, 608 (1969). <sup>5</sup> R. E. Dickerson, In: *The Proteins*, **2**, N. Y., 1964.