

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

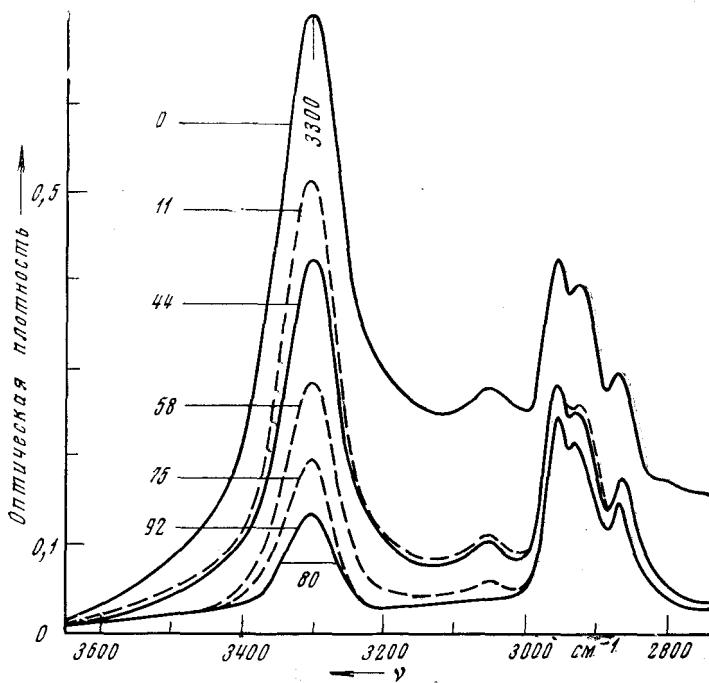


Рис. 1. И.-к. спектры пленок миоглобина кашалота при разной влажности тяжелой воды. Цифры на кривых — относительная влажность в процентах

структуры. Если приготовить пленку глобулярного белка быстрым высыпыванием 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 (3), 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 (2), а ее интенсивность (4) 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  $p / p_0$

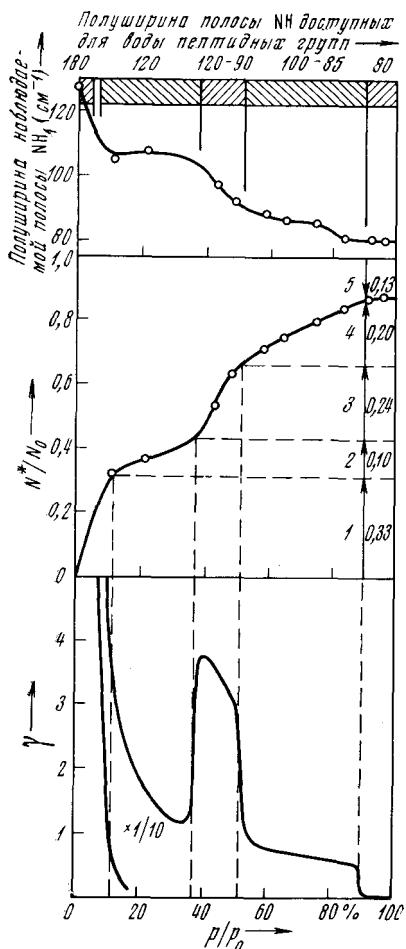


Рис. 2. Спектральные характеристики, число доступных для воды пептидных групп и коэффициент доступности миоглобина кашалота в зависимости от давления паров воды

шили над силикагелем при комнатной температуре. Сушка продолжалась около часа, толщина пленок составляла около 0,5 мкм. Инфракрасные спектры в области валентных колебаний NH, кроме пептидного поглощения около  $3300\text{ cm}^{-1}$ , содержат также полосы поглощения групп лизина около  $3100\text{ cm}^{-1}$  и гистидина — в области  $3200—3000\text{ cm}^{-1}$ . Однако уже при первой низкой влажности эти группы замещаются одновременно с быстрозамещающей 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 фибронаина шелка с таковыми

в качественном 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 (2), а ее интенсивность (4) 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 обменявшихся 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 обменяющихся пептидных групп.

Полуширина наблюдаемой полосы NH заметно уменьшается по мере повышения влажности (рис. 2). Соответственно, быстрозамещаемая 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 приблизенно описать прямыми отрезками с разными паклонами. По виду кривой коэффициента доступности легко определить  $\gamma_i$  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 полуширике полосы NH мы можем отнести области доступности к отдельным участкам молекулы миоглобина (5). 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 прымкают 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-

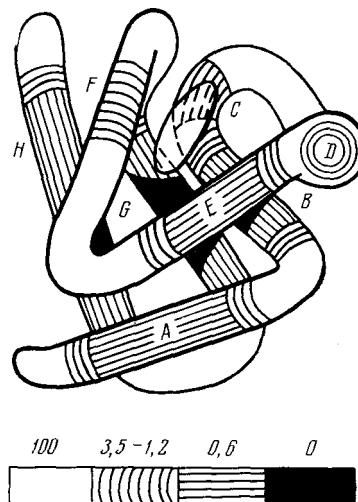


Рис. 3. Идентификация участков молекулы миоглобина кашалота по доступности для воды (по подвижности). Изображение молекулы при разрешении 6 Å взято из работы (3). Светлые участки соответствуют большей подвижности, цифры над шкалой доступности равны коэффициентам  $\gamma_i$ . Классы 2 и 3 (табл. 1) помечены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

Таблица 1

Характеристика доступности для воды отдельных областей молекулы миоглобина кашалота

№ класса	Полуширина полосы NH, $\text{см}^{-1}$	$N_i^*/N_0$	$\gamma_i = \frac{\Delta(N_i^*/N_0)}{\Delta(p/p_0)} \cdot \frac{p_0}{p}$	$\frac{p}{p_0} \cdot \%$
1	180	0,33	>400	0–10
2	120	0,10	3,5–1,2	10–40
3	120–90	0,24	3,8–3,0	40–50
4	100–85	0,20	0,8–0,6	50–90
5	80	0,13	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.