

В. М. БОЖКОВ, В. П. КУШНЕР

**О ПРИМЕНЕНИИ «РЕПЕРОВ» ОПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
 $\alpha$ -,  $\beta$ -И «НЕУПОРЯДОЧЕННОЙ» ФОРМ ПОЛИПЕПТИДНОЙ  
ЦЕПИ ПРИ АНАЛИЗЕ ДИСПЕРСИИ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ  
ГОЛБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 19 XI 1971)

При определении степени спиральности  $X_\alpha$  белков по величине какого-либо параметра дисперсии оптического вращения (д.о.в.) или эффективного вращения  $[m']_\lambda$  при  $\lambda$  233 и 198 м $\mu$  <sup>(1)</sup> обычно используют экстремальные значения этих параметров, полученные для  $\alpha$ -спирали и клубка синтетических полипептидов <sup>(2, 3)</sup> в водном растворе. Учет  $\beta$ -формы возможен при двухпараметрическом методе расчета  $X_\alpha$  по параметрам уравнения Моффита  $a_0$  и  $b_0$  <sup>(4)</sup> или при анализе д.о.в. путем «подбора» такой суперпозиции трех «реперных» кривых, которая наилучшим образом отвечает экспериментальной кривой д.о.в. в у.-ф. области <sup>(5)</sup>. Однако эти методы в применении к глобулярным белкам часто дают значения  $X_\alpha$ , отличающиеся от истинных <sup>(1, 6)</sup>. В ряде случаев эти отличия могут быть вызваны влиянием на д.о.в. белка оптически активных ароматических и цистеиловых радикалов <sup>(6)</sup>, но более общая и принципиальная причина связана с выбором полипептидов — «реперов».

Применимость какого-либо гомополипептида в качестве универсального «репера» д.о.в.  $\beta$ -структуры более чем сомнительна, поскольку оптическая активность  $\beta$ -формы синтетических полипептидов варьирует в широких пределах <sup>(3, 6)</sup> и, как показано теоретически <sup>(7)</sup>, существенно зависит от типа и геометрии  $\beta$ -слоя. В определенной мере это относится и к спиральной и «неупорядоченной» конформациям, так как оптическая активность  $\alpha$ -спирали и клубка может зависеть от полярности и поляризуемости окружения пептидного хромофора <sup>(2, 8)</sup>, аминокислотного состава <sup>(2)</sup>, длины спирального участка <sup>(9)</sup>, степени компактности клубка <sup>(1)</sup> и других «неконформационных» факторов, свойственных структуре глобулярного белка. Прямым подтверждением этому служат результаты работы Штрауса, Гордона и Воллаша <sup>(10)</sup>, которые, проанализировав спектры кругового дихроизма (к.д.) белков с известным из рентгеноструктурных данных составом вторичной структуры (гемоглобин, миоглобин, лизоцим), получили значения параметров (сила вращения, положение и полуширина) полос к.д. спиралей и «неупорядоченной» цепи, отличающиеся от параметров к.д. синтетических полипептидов.

Результаты работы <sup>(10)</sup> позволяют использовать эти белки в качестве «реперов» д.о.в.  $\alpha$ -,  $\beta$ - и «неупорядоченной» форм. В табл. 1 представлены экстремальные значения некоторых параметров д.о.в. этих структур\*, рассчитанные по данным <sup>(10)</sup> с помощью преобразования Кронига-Крамерса для гауссовых полос к.д. <sup>(2)</sup>. «Белковые» значения, полученные

\* Параметры  $a_0$  и  $b_0$  в табл. 1 и далее соответствуют значению  $\lambda_0 = 212$  м $\mu$  в уравнении Моффита.

для «неупорядоченной» и спиральной форм, существенно отличаются от канонических значений для  $\alpha$ -спирали и клубка (см. данные <sup>(2)</sup> для поли-*L*-глутаминовой кислоты (ПГК) в табл. 1).

Таблица 1  
Экстремальные значения параметров д.о.в.  $\alpha$ -,  $\beta$ - и «неупорядоченной» форм в лизоциме и миоглобине

Структура	$-[m']_{223}$	$b_0$	$a_0$
Спираль в лизоциме	7 225	-380,3	119,0
Спираль в миоглобине	11 207	-562,6	75,1
$\alpha$ -Спираль ПГК <sup>(2)</sup>	14 600	-666	48
«Неупорядоченная» цепь лизоцима	820,5	14,8	-435,3
Клубок ПГК <sup>(2)</sup>	1 770	80	-808
$\beta$ -Форма в лизоциме	5 141	-184,4	-38,4

Рассчитанные значения мы использовали при анализе д.о.в. некоторых белков, хотя заведомо ясно что полипептидная цепь в различных белках и тем более при различных состояниях их третичной структуры может отличаться по оптическим свойствам от цепи конкретных «белковых ренеров». Анализ д.о.в. проводили дупараметрическим методом, который в общем виде основан на уравнениях

$$\sum_j X_j^{(p)} = 1, \quad P^{(i')} = \sum_j X_j^{(p)} P_j^{(i')}, \quad P^{(i'')} = \sum_j X_j^{(p)} P_j^{(i'')}. \quad (1)$$

Здесь  $j = \alpha, \beta, r$  ( $\beta$  и  $r$  — индексы  $\beta$ - и «неупорядоченной» форм);  $P^{(i')}$  и  $P^{(i'')}$  — экспериментальные значения двух любых параметров д.о.в, являющихся линейной функцией  $[m]_\lambda$ ;  $P_j^{(i')}$  и  $P_j^{(i'')}$  — их экстремальные значения, а индекс  $p$  характеризует пару параметров  $P^{(i)}$ . В качестве  $P^{(i)}$  использовали параметры, приведенные в табл. 1, а также значения  $[m']_\lambda$  при длинах волн 222,2 227,3 и 238,1 м $\mu$ , соответствующих волновым числам 45, 44 и  $42 \cdot 10^{-3}$ . Величины  $X_\alpha^{(p)}$  и  $X_\beta^{(p)}$  рассчитанные для белков и полипептидов с известной структурой, отличались от истинных значений  $X_j$  в разной степени в зависимости от выбора параметров  $P^{(i)}$  в уравнениях (1). Это не удивительно, если учесть, что разные  $p$ -методы различаются по величине экспериментальной ошибки

$$\delta X_j^{(p)} = \sum_i \left| \partial X_j^{(p)} / \partial P^{(i)} \right| \delta P^{(i)},$$

а также по «устойчивости» к «неконформационным» изменениям оптической активности. «Устойчивость» значений  $X_j^{(p)}$  к изменениям сил вращения характеризовали величинами  $\beta_{km, j}^{(p)}$  подобно тому, как это было сделано в работе <sup>(2)</sup> для однопараметрических методов расчета  $X_\alpha$ . В случае смеси трех структур величина

$$1/\beta_{km, j}^{(p)} \equiv \frac{R_{km}}{X_m} \frac{\Delta X_j^{(p)}}{\Delta R_{km}}, \quad m, j = \alpha, \beta, r, \quad (2)$$

показывает, какова ошибка  $\Delta X_j^{(p)}$ , если  $k$ -я полоса к.д., принадлежащая  $m$ -й структуре, меняет почему-либо величину силы вращения на 100% по сравнению с «реперным» значением  $R_{km}$  (при  $X_m = 1$   $\Delta X_j^{(p)} = 1/\beta_{km, j}^{(p)}$ ).

Анализ отличий величин  $X_j^{(p)}$  от истинных значений  $X_j$ , проведенный с учетом возможных экспериментальных ошибок  $\delta X_j^{(p)}$  и «неконформационных» вариаций сил вращения, показал, что в случае рассмотренных нами биополимеров эти отличия обусловлены в основном «неконформационными» вариациями сил вращения, которые, судя по данным Штрауса и соавторов <sup>(10)</sup>, меняются наиболее сильно при переходе от одного белка к другому.

Очевидно, что для надежного определения степени спиральности белка при любых состояниях его третичной структуры требуются поиски не столько «реперов», являющихся лучшим приближением по сравнению с синтетическими полипептидами, сколько методов анализа д.о.в., «устойчивых» к изменениям сил вращения полос к.д., принадлежащих доминирующим в глобулярных белках структурам — «неупорядоченной» цепи и  $\beta$ -форме. Эту задачу мы свели к усреднению величин  $X_{\alpha}^{(p)}$ :

$$X_{\alpha}^{(\varphi)} = \sum_p C_{\alpha}^{(p)} X_{\alpha}^{(p)} / \sum_p C_{\alpha}^{(p)}. \quad (3)$$

Искомые значения весовых коэффициентов  $C_{\alpha}^{(p)}$  должны удовлетворять минимуму величины  $\sum_{km} \left( \sum_p C_{\alpha}^{(p)} / \beta_{km, \alpha}^{(p)} \right)^2 / \left( \sum_p C_{\alpha}^{(p)} \right)^2$  при условии, что величина  $\sum_p \left( \sum_j C_{\alpha}^{(p)} \partial X_{\alpha}^{(p)} / \partial P^{(j)} \right)^2 / \left( \sum_p C_{\alpha}^{(p)} \right)^2$ , определяющая «чувствительность»  $X_{\alpha}^{(\varphi)}$  к ошибкам измерения  $\delta P^{(j)}$ , не превышает наперед заданного небольшого числа. Примеры решения этой задачи представлены в виде следующих формул для расчета  $X_{\alpha}^{(\varphi)}$  («репер» д.о.в.  $\alpha$ -спирали — миоглобин, а  $\beta$ - и «неупорядоченной» формы — лизоцим):

$$X_{\alpha}^{(\varphi_1)} = (-0,27 [m]_{222,2} + 4,14 [m']_{227,3} + 9,33 [m']_{233,0} - 18,83 [m']_{238,1} - 86,9b_0) \cdot 10^{-5} - 0,070 \pm 0,035; \quad (4)$$

$$X_{\alpha}^{(\varphi_2)} = (2,45 [m']_{222,2} + 5,10 [m']_{227,3} + 0,79 [m']_{233,0} - 13,01 [m']_{238,1} - 3,0b_0) \cdot 10^{-5} - 0,029 \pm 0,017. \quad (5)$$

В конце правых частей формул приведены значения ошибки  $\delta X_{\alpha}^{(\varphi)}$ , соответствующие ошибкам изменения  $\delta [m]_{\lambda} = 100$  и  $\delta b_0 = 10$ . В табл. 2 представлены значения  $\beta_{km, \alpha}$ , характеризующие в соответствии с равенством (2) общепринятые однопараметрические методы расчета  $X_{\alpha}$  (данные работы (2), «репер» д.о.в. — ПГК) и формулы (4) и (5). По «устойчивости» к изменениям сил вращения полос к.д. «неупорядоченной» цепи величины  $X_{\alpha}^{(\varphi)}$  не уступают наилучшей в этом отношении величине  $X_{\alpha}^{198}$  и практически не зависят от выбора «реперных» значений  $R_{kr}$ . Высока «устойчивость»  $X_{\alpha}^{(\varphi)}$  и к изменениям сил вращения двух полос к.д.  $\beta$ -формы I (6).

Таблица 2

«Устойчивость» различных методов расчета  $X_{\alpha}$  к изменениям сил вращения. Значения  $\beta_{km, \alpha}$  для полос к.д. при различных длинах волн

Параметр д.о.в.	$\sim 193$ (1 $\alpha$ )	$\sim 207$ (2 $\alpha$ )	$\sim 223$ (3 $\alpha$ )	195 (1 $\beta$ )	217 (2 $\beta$ )	198 (1 $r$ )	217 (2 $r$ )	235 (3 $r$ )	B	C
$[m']_{193}$	+1,6	+4,4	+8,2	—	—	-54	+51	+1700	+520	+400
$[m']_{233}$	-1,6	+2,5	+0,73	—	—	+3,7	-8,9	-190	-380	-105
$a_0$	+0,28	-0,70	-0,48	—	—	-0,76	+4,6	-6,1	+52	+5,6
$b_0$	+1,4	-8,9	+3,5	—	—	-4,8	-110	+170	+250	+9,5
$\varphi_1$	+6,8	-63	+1,06	+26	+32	-39	+115	+33	+770	+18
$\varphi_2$	-16	-9,7	+0,84	-55	+21	-910	+97	+46	-2500	-710

Примечание. 1. В скобках указан индекс полос кт. 2. B и C соответствуют вкладам в оптическое вращение «неупорядоченной» цепи коротковолновых ( $\lambda < 190$  мк) переходов, рассчитанным по данным для клубка ПГК (2).

Результаты расчета  $X_\alpha$  с использованием «белковых реперов» д.о.в

Белок	$X_\alpha$ (рентген)	$X_\alpha^{(b_0)}$	$X_\alpha^{(233)}$	$X_\alpha^{(\varphi_1)}$	$X_\alpha^{(\varphi_2)}$
Миоглобин, $I = 0,2$ <sup>(10)</sup>	0,77	—	0,76	—	0,78
$\alpha$ -Химотрипсин, рН 2 <sup>(11)</sup> *	0,07	0,26	0,36	0,04	0,07
Химотрипсиноген, рН 2,7 <sup>(12)</sup> *	0,05	0,26	0,40	0,06	-0,01
Фосвитин, рН 7,7; $I = 0,1$ <sup>(13)</sup>	—	0,06	0,02	-0,01	-0,01
» , рН 7,9; $I = 0$ <sup>(14)</sup>	—	0,03	0,14	0,02	0,03
» , рН 1,8 <sup>(14)</sup>	—	—	0,19	—	0,03
$\beta$ -Лактоглобулин А, рН 2,0 <sup>(4)</sup>	—	0,13	0,08	0,11	0,11
То же , рН 8,7 <sup>(4)</sup>	—	0,16	0,15	0,10	0,11
» » , рН 11,6 <sup>(4)</sup>	—	0,16	0,26	0,13	0,11

\* «Репер» д.о.в.  $\alpha$ -спирали — лизоцим.

В табл. 3 приведены примеры использования формул (4) и (5), а также величины  $X_\alpha^{(b_0)}$  и  $X_\alpha^{(233)}$ , рассчитанные при «белковых» экстремальных значениях  $b_0$  и  $[m']_{233}$  из табл. 1. В отличие от этих величин значения  $X_\alpha^{(\varphi)} \simeq 0$ , полученные для фосвитина, не зависят от образования  $\beta$ -формы при рН 1,8 и набухания клубка в растворе с низкой ионной силой <sup>(14)</sup>. Не сказываются на значениях  $X_\alpha^{(\varphi)}$  и изменения д.о.в., наблюдаемые на первых стадиях щелочной денатурации (рН < 12)  $\beta$ -лактоглобулина <sup>(4)</sup>. Значения  $X_\alpha^{(\varphi)}$  рассчитанные для миоглобина, химотрипсина и химотрипсиногена, согласуются с данными рентгеноструктурного анализа этих белков.

Рассчитываемые по д.о.в. в узком интервале 220—240 м $\mu$  значения  $X_\alpha^{(\varphi)}$  зависят в основном от силы вращения пл<sup>\*</sup>-перехода  $\alpha$ -спирали ( $\sim 223$  м $\mu$ , см. табл. 2). Оценка их «устойчивости» к сдвигам полос к.д. показала, что они в  $\sim 2$  раза более чувствительны по сравнению с  $X_\alpha^{(b_0)}$  к сдвигу этого перехода, но в  $\sim 10$  раз менее чувствительны к сдвигу полосы  $1r$ . Поэтому мы полагаем, что представление здесь формулы более пригодны, чем однопараметрические методы анализа д.о.в. в видимой области спектра, в случае содержащих  $\beta$ -форму малоспиральных молекул и менее пригодны — в случае многоспиральных. Изложенный выше принцип позволяет получить аналогичные формулы и для расчета  $X_\beta$ .

Институт цитологии  
Академии наук СССР  
Ленинград

Поступило  
19 XI 1971

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> B. Jirgensons, Optical Rotatory Dispersion of Proteins and other Macromolecules, Berlin — Heidelberg — N. Y., 1969. <sup>2</sup> J. P. Carver, E. Shechter, E. R. Blout, J. Am. Chem. Soc., 88, 2550, 2562 (1966). <sup>3</sup> P. K. Sarcar, P. Doty, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 55, 981 (1966). <sup>4</sup> S. N. Timasheff, R. Townsend, L. Mescanti, J. Biol. Chem., 241, 1863 (1966). <sup>5</sup> N. Greenfield, B. Davidson, G. D. Fasman, Biochemistry, 6, 1630 (1967). <sup>6</sup> S. Beychok, Ann. Rev. Biochem., 37, 437 (1968). <sup>7</sup> R. W. Woody, Biopolymers, 8, 669 (1969). <sup>8</sup> J. Y. Cassim, E. W. Taylor, Biophys. J., 5, 553 (1965). <sup>9</sup> J. Tinoco, R. W. Woody, D. T. Bradley, J. Chem. Phys., 38, 1317. (1963). <sup>10</sup> J. H. Straus, A. S. Gordon, D. F. H. Wallach, J. Europ. Biochem., 11, 201 (1969). <sup>11</sup> R. Biltonen, R. Limry et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 1018 (1965). <sup>12</sup> B. Jirgensons, J. Biol. Chem., 242, 912 (1967). <sup>13</sup> G. E. Perlmann, S. E. Allerton, Nature, 211, 1089 (1966). <sup>14</sup> G. Taborsky, J. Biol. Chem., 243, 6014 (1968).