

Е. Н. ФРОЛОВ, А. Д. МОКРУШИН, Г. И. ЛИХТЕНШТЕЙН, В. А. ТРУХТАНОВ,
член-корреспондент АН СССР В. И. ГОЛЬДАНСКИЙ

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ГАММА-РЕЗОНАНСНЫХ МЕТОК

Современные теории ферментативного катализа связывают уникальные каталитические свойства белков с их динамической структурой. Для регистрации конформационных перестроек белков широкое применение получил метод спиновых меток. Однако метод позволяет регистрировать движения меток только в диапазоне частот 10^7 — 10^{10} сек $^{-1}$ ($^{1-3}$). Кроме того, значительные размеры спиновых меток не позволяют непосредственно наблюдать за молекулярным движением собственно белковых групп.

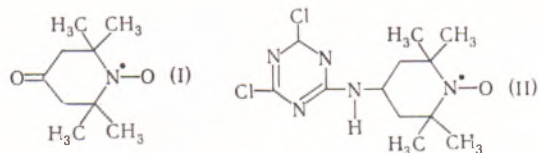
Существенная информация о динамике локальных движений отдельных участков белковой глобулы может быть получена с помощью метода ядерного гамма-резонанса (я. г. р.) при использовании в качестве меток соединений, включающих мёссбауэровские изотопы. Ненаправленное движение метки (аналогичное диффузионному) должно приводить к уширению линии резонансного поглощения (4). С другой стороны, увеличение амплитуды колебаний мёссбауэровского ядра приводит к уменьшению вероятности поглощения без отдачи f' (4). Таким образом, подвижность мёссбауэровской метки, прикрепленной к определенной группе белка, должна оказывать существенное влияние на спектр г. р. метки.

В настоящей работе на примере альбумина из сыворотки крови человека (САЧ), модифицированного ионами Fe^{57} , анализируются возможности применения г. р. меток для исследования динамической структуры белков.

Присоединение меток к белковой поверхности проводили путем инкубации в течение часа $2 \cdot 10^{-3}$ *М* раствора альбумина в 0,06 *М* фосфатном буфере при pH 7,0 с пятикратным избытком водного раствора $Fe^{57}Cl_3$ с последующим осаждением сульфатом аммония и лиофилизацией. Другой способ модификации основывался на синтезе модельного железо-серного белка (МЖСБ) при реакции ионов Fe^{57} с цистеиновыми остатками альбумина в присутствии неорганического сульфида (5). Ионы железа в МЖСБ образуют многоядерный комплекс внутри белковой складки, характеризующийся специфическими для класса природных железо-серных белков физико-химическими свойствами (5). Исследование подвижности указанных белков проводили путем измерения температурной зависимости спектров я. г. р. сухих препаратов, растворов их в воде и глицерине при концентрации $4 \cdot 10^{-3}$ *М*, а также водной суспензии альбумина, уплотненной центрифугированием.

В качестве спинового зонда при исследованиях состояния среды использовали химически инертный по отношению к белку стабильный иминоксильный радикал I. В качестве спиновой метки использовали радикал II, присоединяемый к МЖСБ по методике, описанной в (2).

Мёссбауэровские измерения проводились на обычном электродинамическом спектрометре с источником Co^{57} (Pd).



Спектры резонансного поглощения для всех образцов представляют собой четко выраженные дублеты с квадрупольным расщеплением и изомерным сдвигом, характерными для высокоспинового трехвалентного железа ($\delta = 0,73 \pm 0,05$ мм/сек, $\Delta = 0,75 \pm 0,05$ мм/сек и $\delta = 0,58 \pm 0,05$ мм/сек, $\Delta = 0,67 \pm 0,05$ мм/сек) для образцов из альбумина и МЖСБ соответственно.

Величина изомерного сдвига для всех препаратов альбумина и МЖСБ в исследованном диапазоне температур оставалась постоянной, что указывает на неизменность химических связей ионов железа с белками.

Анализ экспериментальных спектров сводился к определению вероятности резонансного поглощения без отдачи f' (по площади резонансной кривой) и ширины дублетной линии на половине высоты. На рис. 1 и 2 представлены температурные зависимости относительных величин f' соответственно для альбумина и МЖСБ в сухом виде, в глицериновой среде, для уплотненной суспензии альбумина и в водной среде. Сухие препараты белков обладают слабой температурной зависимостью величины f' и постоянной полушириной линии в интервале 77–300° К, что характерно для собственных колебаний ядер Fe^{57} в твердой матрице.

Иной характер температурной зависимости f' наблюдается

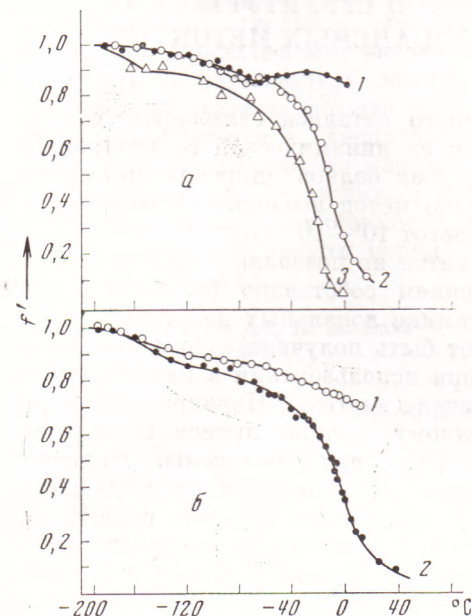


Рис. 1. Температурная зависимость относительной вероятности эффекта $f'(T)$ для альбумина (а) и МЖСБ (б): 1 — сухие препараты; 2 — глицериновая среда; 3 — суспензия альбумина

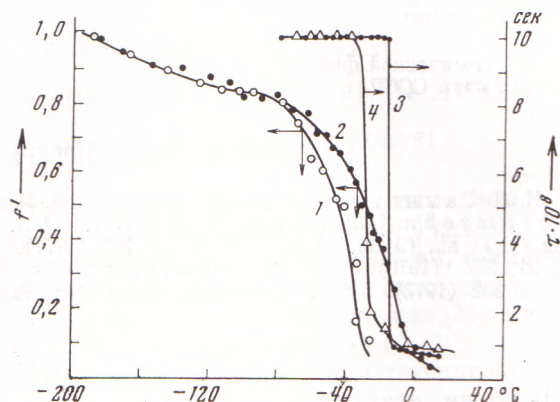
для белков в воде*. Слабо изменяясь в области низких температур, вероятность эффекта резко уменьшается при температурах, превышающих -60° (рис. 2). Это уменьшение отражающее увеличение амплитуды движения ядер, наблюдается в области температур ($-60 \div -20^\circ$), когда растворенный в водной среде спиновый зонд I остается в сильно заторможенном состоянии (время корреляции $\tau > 10^{-7}$ сек), соответствующем жесткой структуре среды.

Последнее, по-видимому, свидетельствует о невозможности движения макромолекул белков как целого, поскольку их размеры более чем в десять раз превышают размеры зонда I. Можно полагать, что движение мессбауэровских атомов, прочно связанных с белком, отражает ограниченный локальный характер движения поверхностных групп белка в альбумине и нескольких сульфгидрильных групп, входящих в состав многоядерного железосерного комплекса в МЖСБ.

* Учитывая ограничения метода спиновых меток (3) на рис. 2 принимается $\tau = \tau_{\text{кор}}$, если $10^{-10} < \tau_{\text{кор}} < 10^{-7}$ и $\tau = 10^{-7}$, если $\tau_{\text{кор}} \geq 10^{-7}$ сек.

В пользу этого предположения свидетельствуют и другие факты. Спиральная метка II, находящаяся в складке белковой глобулы МЖСБ, начинает растормаживаться при $T > -30^\circ$ (рис. 2). Плотная суспензия САЧ, представляющая собой конгломерат слипшихся кристалликов белка, пропитанных водой, также демонстрирует падение f' , начиная примерно

Рис. 2. Зависимость $f'(T)$ для альбумина (1) и МЖСБ (2) в водной среде; температурная зависимость времени корреляции $\tau_{\text{корр}}$ зонда I в растворителе (3) и метки II, присоединенной к МЖСБ (4) для МСЖБ в водной среде



с -60° . Альтернативное объяснение этого эффекта движением отдельных макромолекул как целого в этих условиях представляется менее вероятным.

При проведении опытов в 95% растворе глицерина кривые размораживания смещаются в область более высоких температур по сравнению с суспензиями, несмотря на несомненно большую вязкость последних. Интенсивность локального движения белковых групп, таким образом, зависит от природы растворителя. Уширение линии резонансного поглощения в этих образцах становится заметным лишь на конечных участках зависимостей $f'(T)$, т. е. при таких температурах, когда вероятность поглощения без отдачи мала. В качестве примера на рис. 3 приведен ряд спектров я. г. р. для альбумина в глицерине: наблюдаемое уширение линии не превышает 50% от ширины линии при низких температурах.

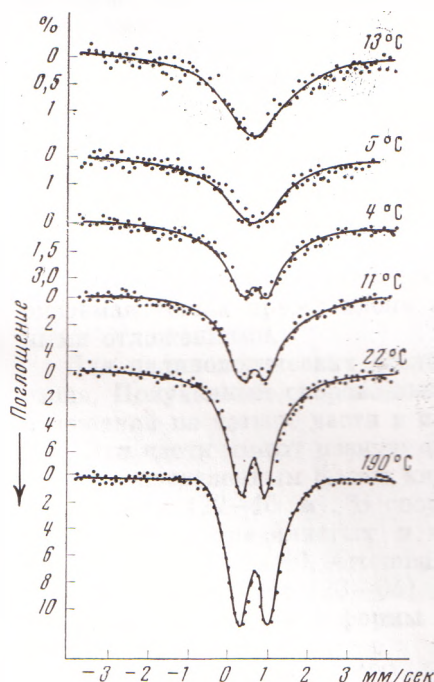


Рис. 3. Спектры резонансного поглощения альбумина в глицерине при различных температурах

Поскольку модель непрерывной диффузии предсказывает, что для отдельных изолированных молекул, с молекулярным весом того же порядка, что и исследуемые нами белки, в растворе соответствующей вязкости уширение должно было бы в несколько раз превышать экспериментально наблюдаемое⁽⁶⁾, то полученные результаты свидетельствуют о наличии крупных ассоциатов макромолекул САЧ.

Наблюдаемые эффекты зависимости $f'(T)$ и уширение линии для меченых белков, как нам кажется, открывают перспективы непосредственного исследования с помощью эффекта Мёссбауэра динамических свойств

биологических структур, включая активные центры ферментов. Представляется возможным также исследовать явления ассоциации биологических макромолекул в физиологических и модельных условиях. Малые размеры гр-меток в ряде случаев могут обеспечить преимущество их применения по сравнению со спиновыми метками.

Авторы выражают благодарность проф. Л. А. Блюменфельду за ценное обсуждение.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
15 I 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ К. Л. Гамильтон, Г. М. Макконнелл, Усп. хим., **39**, 531 (1970). ² Г. И. Лихтенштейн, Усп. биохим., **12**, 3 (1971). ³ A. N. Kuznetsov, A. M. Waserman et al., Chem. Phys. Letters, **12**, 103 (1971). ⁴ D. C. Champeney, Phys. Bull., **21**, 248 (1970). ⁵ Г. И. Лихтенштейн, Е. Н. Фролов и др., Мол. биол., **6**, 202 (1972). ⁶ P. P. Graig, N. Sutin, Phys. Rev. Letters, **11**, 460 (1963).